أنوار مكي
أسعد الطائي
علي شريف

المعالجة الحيوية للعناصر الثقيلة بأستخدام البكتريا

AUTHOR USE ONLY

المعالجة الحيوية للعناصر الثقيلة بأستخدام البكتريا

تهدف الدراسة الحالية الى معرفة قابلية بعض انواع البكتريا وبالاخص الانواع الموجبة لصبغة كرام والغير مرضية والتي عزلت من ستة انهر داخلية متفرعة من شط العرب في مدينة البصره-العراق على مقاومة عالية للعناصر الثقيلة مثل الرصاص والكادميوم والنحاس والنيكل وبالنظر لقابليتها على تحمل سمية هذه المعادن فانه يمكن استخدام تلك البكتريا في المعالجة الحيوية لمياه المجاري والمتدفقات الصناعية كونها بكتريا صديقة للبيئة ورخيصة مقارنة بالطرق التقليدية المتبعة.

انوار عبد الوهاب مكي, مدرس مساعد, احياء مجهرية. مركز علوم البحار/جامعة البصره

NOOR PUBLISHING

978-620-0-06108-9

أنوار مكي
أسعد الطائي
علي شريف

المعالجة الحيوية للعناصر الثقيلة بأستخدام البكتريا

FOR AUTHOR USE ONLY

FOR AUTHOR USE ONLY

أنوار مكي
أسعد الطائي
علي شريف

المعالجة الحيوية للعناصر الثقيلة بأستخدام البكتريا

FOR AUTHOR USE ONLY

Noor Publishing

Imprint
Any brand names and product names mentioned in this book are subject to trademark, brand or patent protection and are trademarks or registered trademarks of their respective holders. The use of brand names, product names, common names, trade names, product descriptions etc. even without a particular marking in this work is in no way to be construed to mean that such names may be regarded as unrestricted in respect of trademark and brand protection legislation and could thus be used by anyone.

Cover image: www.ingimage.com

Publisher:
Noor Publishing
is a trademark of
International Book Market Service Ltd., member of OmniScriptum Publishing Group
17 Meldrum Street, Beau Bassin 71504, Mauritius

Printed at: see last page
ISBN: 978-620-0-06108-9

Zugl. / Approved by: 2015، العراق ،جامعة البصره

Copyright © أنوار مكي, أسعد الطائي, علي شريف
Copyright © 2019 International Book Market Service Ltd., member of OmniScriptum Publishing Group

FOR AUTHOR USE ONLY

الاهداء

الى... رسول الإنسانيـــة محمد (صلى الله عليه وآلـــــه وسلم)

الى ... اخوتي واخواتي

الى ...طفلي الحبيبين

الى ... اصدقائي

FOR AUTHOR USE ONLY

أنوار

شكر وتقدير

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على سيد الخلق اجمعين محمد وعلى اله الطيبين الطاهرين. اتقدم بالشكر الجزيل الى رئاسة قسم علوم الحياة وإلى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة لتقديمها كافة التسهيلات الممكنة لاكمال متطلبات البحث و الى الاستاذ المشرف الدكتورعلي عبود شريف لاشرافه على الرسالة.

و لمن دواعي الوفاء ان اتقدم بخالص التقدير والاحترام وعظيم الامتنان الى استاذي الفاضل الاستاذ الدكتور أسعد محمد رضا الطائي على ما بذله من جهد مخلص ومتابعة مستمرة لانجاز هذه الدراسة والى قسم الكيمياء البحرية - ركز علوم البحار ومنتسبي القسم كافة ، واخص بالذكر المدرس المساعد زهيرعلي. كما أقدم شكري إلى الأستاذ الدكتور اسعد يحيى في كلية الزراعة والدكتورة وصال فخري لقيامهما بإجراء التحليلات الإحصائية لنتائج الدراسة ،واتقدم بالشكر الجزيل الى المدرس المساعد ميلاد علي حسين لقيامه برسم خريطة مواقع الدراسة.

كما أقدم جزيل شكري وامتناني لأعضاء لجنة المناقشة المحترمين الأستاذ الدكتورة عواطف حميد عيسى والأستاذ مساعد الدكتورة غيداء جاسم عبد النبي والأستاذ المساعد الدكتور سعد سلمان هميم .

FOR AUTHOR USE ONLY

الخلاصة

جمعت عينات الماء من ستة أنهر داخلية متفرعة من شط العرب في محافظة البصرة وهي نهر ابو الخصيب والرباط والخندق والعشار والخورة والسراجي و بواقع مكررين لكل محطة خلال المدة الممتدة من شهر تشرين الثاني وكانون الأول 2013.

تضمنت هذه الدراسة عزل وتشخيص ثلاثة أنواع من البكتريا العصوية التابعة لجنس *Bacillus* وهي *B. licheniformis* و *B. megaterium* و *B. badius* ،ونوعين من البكتريا الكروية التابعة لجنس *Micrococcus* وهما *M. halobius* و *M. kristinae* .

تم قياس الصفات الفيزيائية والكيميائية لعينات المياه والتي شملت قياس الدالة الحامضية PH ودرجة الحرارة والتوصيلية الكهربائية EC والأوكسجين المذاب DO إذ بينت النتائج عدم وجود علاقة ارتباط بين الصفات الفيزيائية والكيميائية لعينات المياه وتراكيز العناصر الثقيلة ماعدا درجة الحرارة فكانت هناك علاقة ارتباط معنوية سالبة مع تراكيز النيكل والرصاص.

م قياس تراكيز بعض العناصر الثقيلة heavy metals وهي النيكل Ni^{+2} و الرصاص Pb^{+2} والنحاس Cu^{+2} والكادميوم Cd^{+2} الذائبة في الماء وكانت تراكيز ايونات النحاس والرصاص أعلى من تراكيز ايونات النيكل و الكادميوم , وبصورة عامة كانت تراكيز تلك العناصر الثقيلة مرتفعة مقارنة مع المحددات المحلية والعالمية .

اظهرت جميع الانواع البكتيرية مقاومة عالية لأيونات العناصر الثقيلة (Cu^{+2} و Ni^{+2} و Pb^{+2} و Cd^{+2}) ابتداءً من يز 1 ملغرام /لتر،حيث اظهر النوع *B. licheniformis* مقاومة عالية Pb^{+2} وCu^{+2} وNi^{+2} بلغت 2600 ملغرام /لتر ، 500 ملغرام /لتر،300 ملغرام /لتر على التوالي ، اما بكتريا *M. halobius* فأظهرت مقاومة عالية Pb^{+2} وCd^{+2} بتركيز 2600 ملغرام/لتر و400 ملغرام/لتر على التوالي ،كذلك اظهر النوع *M.kristinae* اعلى مقاومة Ni^{+2} عند تركيز 300 ملغرام /لتر، وسجلت بكتريا *B.badius* مقاومة متوسطة لجميع العناصر اما بكتريا *B.megaterium* فأظهرت اقل مقاومة لجميع العناصر المدروسة مقارنة بالانواع الاخرى.

استخدمت الأنواع البكتيرية المشخصة في عملية المعالجة الحيوية لايونات العناصر الثقيلة (Cu^{+2}، Ni^{+2} ، Pb^{+2} ، Cd^{+2}) وبتراكيز مختلفة وهي (25 ، 50 ، 100) ملغرام \ لتر , أذ أظهرالنوع *B. licheniformis* أنه أكثر

FOR AUTHOR USE ONLY

قابلية من بقية الأنواع الأخرى على ازالة ايونات النيكل والنحاس والكادميوم, وكان معدل الازالة (28.30% ، 44.34 %،24.27%) ملغرام \ لتر على التوالي .أظهرت بكتريا *B. badius* أنها تمتلك قابلية كبيرة على إزالة ايون النحاس بمعدل ازالة 45.78 %ملغرام \ لتر, أما بكتريا *B. megaterium* فأظهرت اعلى ازالة للرصاص بمعدل 23.43 %ملغرام \ لتر و أظهرت بكتريا *M. halobius* اعلى ازالة للكادميوم بمعدل 25.42 % ملغرام \ لتر، في حين أظهرت *M.kristinae* قابلية متوسطة على إزالة العناصر الثقيلة المستخدمة في الدراسة.

تضمنت هذه الدراسة تأثير فترة الحضانة على إزالة ايونات العناصر الثقيلة ووجد أن أفضل فترة هي 72 ساعة مقارنة مع 24 و 48 ساعة .

وتضمنت الدراسة تأثير التركيز الأبتدائي في عملية المعالجة الحيوية، إذ اظهرت الدراسة ان تركيز 25 ملغرام/لتر افضل تركيز لازالة ايونات العناصر الثقيلة مقارنة بالتركيزين 50 و 100 ملغرام/لتر.

FOR AUTHOR USE ONLY

المحتويات

الفصل الاول – المقدمة واستعراض المراجع	9
1-1-المقدمة Introduction	9
1-2- استعراض المراجع	10
1-2-1-العناصر الثقيلة Heavy Metals	10
1-2-2- مصادر العناصر الثقيلة في البيئة المائية	11
1-2-3-التأثيرات الصحية للعناصر الثقيلة	11
1-2-3-1-النحاس Cu^{+2}	12
1-2-3-2-النيكل Ni^{+2}	12
1-2-3-3-الكادميوم Cd^{+2}	12
1-2-3-4-الرصاص Pb^{+2}	12
1-2-4- الوصف التشخيصي للاجناس المستخدمة في الدراسة	13
اولاً:جنس الـ *Micrococcus*	13
ثانياً:جنس الـ *Bacillus*	13
1-2-5- مقاومة الاحياء المجهرية للعناصر الثقيلة	15
1-النقل عبر غشاء الخلية Transport across cell membrane	15
2-الادمصاص الفيزيائي Physical adsorption	15
3-التبادل الايوني Ion exchange	16
4-تكوين المعقدات Complexation	16
5-الترسيب Precipitation	16
6-تفاعلات الاكسدة والاختزال Oxidation and Reduction Reaction	17
7-تحويل مجموعة المثيل Biomethylation	17
8- Metallothioneins	17
1-2-6-المعالجة الحيوية Bioremediation	19
الفصل الثاني – المواد وطرق العمل	25
2-1-المواد Materials	25
2-1-1-المواد الكيميائية المستخدمة	25
2-1-2-الاجهزة المستخدمة	26
2-1-3-الاوساط الزرعية الجاهزة المستخدمة	27
2-1-4-اوساط العزل Isolation media	27
2-1-5- اوساط الاختبارات الكيموحيوية Biochemical test medium	27
1- وسط تخمر المانيتول Mannitol salt agar medium	27
2- وسط اختبار الحركة Motility test medium	28
3- وسط النشا Starch agar medium	28
4- وسط Voges Proskauer broth medium	28
5-وسط اختزال النترات Nitrate broth medium	28

FOR AUTHOR USE ONLY

6-وسط المانو Phenol red mannose broth medium	28
7- وسط الاكسدة والتخم O/F Basal medium	29
2-1-6- الكواشف والمحاليل المستخدمة	29
1- كاشف الأوكسيديز Oxidase Reagent	29
2- كاشف الكاتليز Catalase Reagent	29
3- كاشف باريت Barritt's Reagent	29
4- كاشف اختزال النترات Nitrate Reduction Reagent	29
5- كاشف كوفاك Kovac's Reagent	30
6- محلول الايودين Lugol's Iodine Solution	30
2-1-7-الصبغات المستعملة Stain	30
2-2- طرائق العمل Methods	30
2-2-1-جمع العينات Samples Collection	30
2-2-2- القياسات الفيزيائية والكيميائية physical and chemical analysis	33
1- درجة الحرارة Temperature	33
2- التوصيلية الكهربائية Elecrical conductivity	33
3-الدالة الحامضية pH	33
4-الاوكسجين المذاب Dissolved oxygen	33
2-2-3-استخلاص العناصر الثقيلة من المياه	33
2-2-4-عزل البكتريا من عينات المياه	34
2-2-5-فحص العزلات وتشخيصها	34
2-2-5-1-الفحص الاولي	34
2-2-5-2-الاختبارات التشخيصية الكيموحيوية	35
1- اختبار الكاتليز Catalase Test	35
2- اختبار الأوكسيديز Oxidase Test	35
3- اختبار تخمر المانيتول Mannitol fermentation Test	35
4-اختبار تخمر الكلوكو Glucose fermentation Test	35
5-اختبار استهلاك السترات Citrate utilisation Test	35
6-اختبار اختزال النترات Nitrate Reduction Test	36
7- اختبار قابلية الحركة Motility Test	36
8-اختبار تحلل النشا Starch hydrolysis	36
9-اختبا Voges Proskauer	36
10-اختبار النمو في 6.5 % كلوريد الصوديوم NaCl	37
11-اختبار النمو عند 55 ^{0}	37
12-اختبار انتاج الاندول Indol production Test	37
13-اختبار تخمر اللاكتو Lactose fermentation	37
14-اختبار تخمر المانو Mannose fermentation test	37
2-2-6-حفظ العزلات	38
2-2-7-تحضيرمحاليل العناصر الثقيلة	38
2-2-8- بة مقاومة البكتريا للعناصر الثقيلة	38
2-2-9- ربة المعالجة الحيوية بواسطة البكتريا	39

FOR AUTHOR USE ONLY

2-2-10- التحليل الاحصائي	39
الفصل الثالث - النتائج	40
3- النتائج	40
3-1-الصفات الفيزيائية والكيميائية للمياه والعناصر الثقيلة الذائبة في الماء	40
3-2- استخلاص العناصر الثقيلة في المياه	40
3-3- عزل وتشخيص البكتريا من عينات المياه	43
3-3-1- *Micrococcus* spp.	43
3-3-2- *Bacillus* spp.	44
3-4- مقاومة البكتريا للعناصر الثقيلة (Pb^{+2},Cd^{+2},Cu^{+2},Ni^{+2})	45
1- *Micrococcus halobius*	45
2- *Micrococcus kristinae*	45
3- *Bacillus megaterium*	45
4- *Bacillus badius*	45
5- *Bacillus licheniformis*	46
3-5- تباين انواع البكتريا في ازالة العناصر الثقيلة (Pb^{+2},Cd^{+2},Cu^{+2},Ni^{+2})	48
1- الكادميوم	48
2- الرصاص	48
3- النيكل	49
4- النحاس	49
3-6-تأثير الفترة الزمنية للحضن على ازالة العناصر الثقيلة(Pb^{+2},Cd^{+2},Cu^{+2},Ni^{+2})	50
3-7-النسب المئوية لأزالة ايونات العناصر الثقيلة (Pb^{+2},Cd^{+2},Cu^{+2},Ni^{+2})	51
1- بكتريا *Micrococcus halobius*	51
2- بكتريا *Micrococcus kristinae*	52
3- بكتريا *Bacillus megaterium*	54
4- بكتريا *Bacillus badius*	54
5- بكتريا *Bacillus licheniformis*	55
الفصل الرابع – المناقشة	57
4-المناقشة	57
4-1-الصفات الفيزيائية والكيميائية لعينات المياه والعناصر الثقيلة	57
4-2-عزل وتشخيص البكتريا من عينات المياه	61
4-3-تحديد مقاومة البكتريا للعناصر الثقيلة	62
4-4-تباين انواع البكتريا المختبرة لأزالة العناصر الثقيلة	63
4-5- تأثير الفترة الزمنية للحضن على ازالة العناصر الثقيلة	65
4-6- النسب المئوية لأزالة ايونات العناصر الثقيلة	66
الاستنتاجات و التوصيات Conclusions and Recommendations	57
المصادر References	73

FOR AUTHOR USE ONLY

قائمة الجداول

الجدول	العنوان
1-2	المواد الكيميائية المستخدمة والشركات المجهزة لها
2-2	الاجهزة المستخدمة والشركات المجهزة لها
3-2	الاوساط الزرعية الجاهزة والشركات المجهزة لها
4-2	مواقع جمع العينات
1-3	الصفات الفيزيائية والكيميائية للمياه
2-3	راكيز العناصر الثقيلة الذائبة في المياه مقاسة بالملغرام/لتر
3-3	الاختبارات الكيموحيوية للنوعين *M.halobius* و *M.kristinae*
4-3	الاختبارات الكيموحيوية للانواع الثلاثة *B.megaterium* و *B.badius* و *B.lechniformis*
5-3	مقاومة البكتريا لأيونات العناصر الثقيلة (ملغرام/لتر)
6-3	مقاومة البكتريا لأيونات الرصاص (ملغرام/لتر)
7-3	متوسط النسب المئوية لازالة ايونات العناصر الثقيلة لجنس *Micrococcus* spp.
8-3	متوسط النسب المئوية لازالة ايونات العناصر الثقيلة لجنس *Bacillus* spp.

FOR AUTHOR USE ONLY

قائمة الأشكال

الشكل	العنوان
1-1	غشاء وجدار الخلية للبكتريا الموجبة لصبغة كرام
2-1	كثافة العناصر الثقيلة المتحورة في البيئة وتراكمها خلال السلسلة الغذائية
1-2	خارطة توضح محطات جمع العينات
1-3	قابلية البكتريا على ازالة ايونات العناصر الثقيلة (Cu^{+2},Ni^{+2},Pb^{+2},Cd^{+2})
2-3	تأثير فترة الحضن على أزالة ايونات العناصر الثقيلة (Cu^{+2},Ni^{+2},Pb^{+2},Cd^{+2})
3-3	النسب المئوية لأزالة ايونات العناصربواسطة *M. halobius*
4-3	النسب المئوية لأزالة ايونات العناصربواسطة *M. kristinae*
5-3	النسب المئوية لأزالة ايونات العناصربواسطة *B. megaterium*
6-3	النسب المئوية لأزالة ايونات العناصربواسطة *B. badius*
7-3	النسب المئوية لأزالة ايونات العناصربواسطة *B. licheniformis*

1-1- المقدمة Introduction

يتألف سطح الكرة الأرضية من 70 % من الماء وهو أثمن الموارد على هذا الكوكب ، وتعد مشكلة تلوث هذه الموارد المائية من اهم المشاكل التي نواجهها اليوم (Vijayaraghavan and Yun, 2007). تعتبر العناصر الثقيلة من أكثر الملوثات البيئية الهامة نظراً لأستخدامها بشكل واسع في صناعة الالكترونيات والبلاستك والبطاريات والأصباغ وقد يسبب تصريف العناصر الثقيلة في البيئة المائية مشكلة بسبب تأثيرها على النظام البيئي (Shapiro and Keasling, 1996). تلعب بعض العناصر الثقيلة دوراً حيوياً في العمليات الأيضية للكائنات الحية ، وهي ضرورية كمغذيات صغيرة مثل الكوبلت Co والكروم Cr والنيكل Ni والحديد Fe والمنغنيز Mn والخارصين Zn وتعرف بالعناصر النزرة Trace elements اضافة الى انها تعد منشطات لبعض الأنزيمات ومحفزة للتفاعلات الأنزيمية ومنظمة للتفاعلات الازموزية (Hussein *et al*., 2005 ; Nies, 1999). ومن جهة اخرى فأن بعض العناصر الثقيلة ليست ضرورية و تكون مضرة بالكائنات الحية حتى في التراكيز الواطئة جداً مثل الكادميوم Cd والزئبق Hg والرصاص Pb، وان التراكيز العالية لكل العناصر الثقيلة سواء الضرورية أو غير الضرورية تعمل على تثبيط نشاط الأنزيمات وتغير خصائصها (Koropatnick and Leibbrandt, 1995)، أضافة الى أنها تسبب ضرراً في الأغشية الخلوية و تعطل الوظائف الخلوية وتسبب ضرراً في تركيب الـ DNA وان سمية هذه العناصر يمكن ان تسبب ضرراً بوظائف الجهاز العصبي المركزي و مكونات الدم والرئتين والكليتين والكبد وغيرها من الأعضاء الحيوية والتعرض لها على مدى طويل ربما ينتج عنه انتكاس عصبي وضمور بالعضلات وتصلب الأنسجة والحساسية والتعرض الطويل الأمد والمتكرر مع بعض العناصر أو مركباتها ربما يسبب السرطان (Gupta and Kumar, 2012).

تعد الأحياء المجهرية من أكثر الكائنات الحية التي لها تأثير على العناصر الثقيلة في البيئة ،وبالرغم من انها لاتستطيع تحطيم العناصر ولكنها تستطيع أن تغير خصائصها الكيميائية من خلال عمليات الترسيب او تكوين معقدات كلابية فضلاً عن التراكم الحيوي Bioaccumulation , و الامتزاز الحيوي Biosorption ومن ثم تؤثر على انتقالها داخل السلاسل الغذائية (Gupta and Keegan , 1997) .

تستوطن الأحياء المجهرية الترب والمياه الملوثة بالعناصر الثقيلة وتمتلك آليات مختلفة لتقاوم التراكيز العالية للعناصر الثقيلة ، كما ان بعضها تستعمل بنجاح لمعالجة العناصر الثقيلة (Issazadeh *et al*.,2013)، ونظراً

FOR AUTHOR USE ONLY

لخطورة العناصرالثقيلة فأنه من الضروري إزالتها من المياه الملوثة وعادة ما تستخدم الطرق التقليدية مثل عمليات الترسيب الكيميائي Chemical precipitation والاكسدة والاختزال الكيميائي oxidation-Reduction والتبادل الايوني Ion exchange والترشيح Filtration والعمليات الالكتروكيميائية Electrochemical treatment والتي تكون غير فعالة ومكلفة جداً (Volesky, 1990).

أما المعالجة الحيوية Bioremediation وهي أستخدام الأحياء المجهرية (البكتريا ،الفطريات ،الطحالب) لإزالة الملوثات من البيئة وهي توفر بديلاً اقتصادياً وآمن مقارنة بالطرق االتقليدية (2011 ,Perpetuo *et al.*).

تهدف الدراسة الى أمكانية استخدام البكتريا في أزالة التلوث بالعناصر الثقيلة وهذا يتطلب:

1. تحديد تراكيز العناصر الثقيلة في الأنهرالداخلية لمدينة البصرة.
2. عزل أنواع من البكتريا في تلك الأنهر وتشخيصها.
3. دراسة قابلية الأنواع البكتيرية المعزولة على أزالة العناصر الثقيلة مختبرياً.

FOR AUTHOR USE ONLY

2-1 - أستعراض المراجع

2-1-1-العناصر الثقيلة Heavy Metals

تعرف العناصر الثقيلة بأنها العناصر ذات الوزن الذري أكثر من 5غم/سم ^{3} ، وهو أعلى خمس مرات من الوزن الذري للماء ، وتحدث سمية العناصر الثقيلة في تراكيز منخفضة اقل من (1-10) ملغرام /لتر ، ومن بين 90 عنصراً موجودة بشكل طبيعي فأن واحد وعشرين منها ليست عناصر وستة عشر هي عناصر خفيفة والثلاث وخمسين المتبقية هي عناصر ثقيلة ، معظم العناصر الثقيلة هي عناصر انتقالية مع اغلفة غير مشبعة تساعدها على تكوين مركبات معقدة ويعتبر 30 عنصرا" من العناصر الثقيلة ضرورية للحياة والتي تقسم الى 6 عناصر هيكلية Structural element و 5 عناصر كبيرة Macro element و 19 عنصراً نزراً Trace element (Florence, 1989).

تصنف العناصر الثقيلة أعتمادا" على سميتها (Thakur, 2006)

- عناصر ذات سمية واطئة مثل (الموليبدينيوم Mo والمنغنيز Mn والحديد Fe)
- عناصرذات سمية معتدلة مثل (الكروم Cr والكوبلت Co والنحاس Cu والخارصين Zn والنيكل Ni)

- عناصر ذات سمية عالية مثل (الفضة Ag والزرنيخ As والقصديرSb واليورانيوم U والكادميوم والرصاص (pb

1-2-2- مصادر العناصر الثقيلة في البيئة المائية

توجد العناصر الثقيلة في البيئة المائية بتراكيز منخفضة جداً لا تتجاوز 0.05 ملغرام /لتر عندما تكون هذه المياه بعيدة عن مصادر التلوث ، لكن هذه التراكيز قد تزداد نتيجة المصادرالطبيعية والمصادر البشرية (Little and Smith, 1994). تشمل المصادر الطبيعية عمليات التجوية لصخور المعادن الطبيعية وعمليات غسل التربة والكوارث الطبيعية والعواصف (Fernandes and Olalla, 2000) . يمكن ان تدخل العناصر الثقيلة للبيئة المائية نتيجة تحلل الإحياء المائية النباتية والحيوانية بعد موتها (AL -Saad *et al.,* 1996). أما المصادر البشرية فتشمل جميع المصادر الناشئة عن فعاليات الإنسان مثل الفضلات الصناعية كصناعة الأسمدة والنسيج والبطاريات والأصباغ و نواتج معامل تكرير النفط و وقود السيارات وللفضلات المنزلية دور كبير في إضافة كميات من العناصر الثقيلة للبيئة المائية (الشمري، 2013).

1-2-3 - التأثيرات الصحية للعناصر الثقيلة

تتمثل سمية العناصر الثقيلة وخطورتها بعدم قابليتها على التحلل مثل المواد السامة وأنما تميل إلى التراكم داخل الأنسجة ويمكن ان تسبب تهديدات صحية خطيرة وفي بعض الحالات الوفاة (Radhi, 2012) .

أما المخاطر الصحية للعناصر الثقيلة فتعتمد على مستوى التعرض ومدى التعرض و تقسم بشكل عام إلى قسمين : (Young, 2000)

1. التعرض الحاد : التماس مع مستويات عالية من العناصر الثقيلة في فترة قصيرة من الزمن .
2. التعرض المزمن : التماس مع مستويات قليلة من العناصر الثقيلة لفترة طويلة من الزمن .

إن معظم أيونات العناصر الثقيلة هي أيونات موجبة الشحنة Cations وهذا يحدد أمتزازها بواسطة المجاميع الوظيفية ذات الشحنة السالبة الموجودة على سطح الخلية مثل الهيدروكسيل (OH^-) residual hydroxide والكبريت thiol(SH^-) والأملاح السالبة الشحنة مثل الكبريتات (PO_4^-) والفوسفات (SO_4^-) (Roane and Pepper, 2001)، فضلاً عن أنها تمتلك جاذبية كهربائية وألفة ارتباط عالية الى المواقع التي تمتص فيها البكتريا العناصر الضرورية وعادة ما ترتبط مع مختلف التراكيب والجزيئات الحيوية مما تسبب زعزعة استقرار التراكيب والجزيئات الحيوية مثل جدار الخلية والأنزيمات والـ DNA والـ RNA وبالتالي تحدث

FOR AUTHOR USE ONLY

عيوب وتشوهات في عملية التضاعف ويترتب على ذلك الطفرات واضطرابات وراثية (Kawata *et al*., 2007) ومن هذه العناصر:-

1-2-3-2-1- النحاس Cu^{+2} Copper

هو مساعد أنزيمات ضروري للعديد من العمليات الحيوية وتشمل التنفس وتدمير الجذور الحرة (Pena *et al*., 1999) ، وهو ضروري للصحة ولكن عند التعرض لتراكيز عالية منه ولفترات طويلة فأنه يسبب تهيج في الانف و الفم و العيون و الصداع والغثيان ، وعند شرب ماء يحتوي على تراكيز عالية من النحاس فأنه يسبب قئ واسهال و تشنج بالمعدة وغثيان وممكن ان يسبب ضرر بالكبد والكلية وحتى الموت (Muneer, 2005).

2-2-3-2-1- النيكل Ni^{+2} Nickel

يلعب النيكل دوراً مهما في عمليات الأيض في الكائنات الدقيقة المثبتة للنيتروجين فهو ضرورياً لعمل أنزيم Nitrogenase وكذلك يعد عامل مساعد لبعض الإنزيمات مثل Urease ويتداخل مع أيض الحامض الأميني Methionine وفيتامين B12 ونقص هذا العنصر يؤدي الى اختزال في النمو ومشاكل تكاثرية (Marmiroli and Maestri, 2008)، وقد يكون سام في تراكيز معينة إذ يؤثرسلباً في نمو الأحياء خلال تثبيط الافعال الحيوية المختلفة (Punshon and Adriano,1999).

FOR AUTHOR USE ONLY

3-2-3-2-1- الكادميوم Cd^{+2} Cadmium

هوعنصرسام لجميع الكائنات وبمختلف التراكيز بسبب ارتباطه مع مجاميع الكبريت (SH^-) الذي يدخل في تركيب بعض الانزيمات (Vymazal, 1987)وان تناول الطعام والشراب الحاوي على تراكيز عالية من الكادميوم يسبب إسهال و قئ والتناول لفترات طويلة يؤدي الى تراكمه وضرر في الكلى وربما يسبب هشاشة العظام أما أستنشاق كميات عالية منه فيؤثر على الرئتين والكلى والعظام واستنشاقه لفترات طويلة يزيد من مخاطر الأصابة بسرطان الرئة (Ragan and Mast,1990) .

4-2-3-2-1- الرصاص Pb^{+2} Lead

هو عنصر شديد السمية وليس لديه أي وظيفة حيوية معروفة (Hussain*et al.*,2009) ويتداخل الرصاص مع مجموعة متنوعة من العمليات الحيوية في الجسم ويكون ساماً للعديد من

الأعضاء والأنسجة بما في ذلك القلب و العظام والأمعاء و الكلى والجهاز العصبي ويكون سام للأطفال ويسبب اضطرابات في التعلم والسلوك (El-Sayed *et al.*,2008).

4-2-1- الوصف التشخيصي للأجناس المدروسة:

أولاً:- جنس الـ *Micrococcus*

تعتبر الـ *Micrococcus* من البكتريا الموجبة لصبغة گرام وهي هوائية أجبارية تظهر بشكل خلايا كروية رباعية أو مجاميع غير منتظمة ، وعادة ماتكون غير متحركة و لاتكوّن سبورات والتغذية فيها Chemoorganotrophic ، واغلب انواعها ينتج صبغة الكاروتين ومحتوى GC في الـ DNA عالي بحدود (75-65) mol %، يمكن عزلها من مصادر مختلفة مثل التربة ومصبات الأنهاروالمياه العذبة والبحرية و النباتات والغبار والهواء (Holt *et al.*,1994). تمتلك جداراً خلوياً يحتوي على البيتيدوگلايكان L-Lys- Ala_{3-4} وتحتوي في جدارها على الـ Mycolic acid ولا تحتوي على الـ Teichoic acid، اما العنصر الأساسي للسكريات في جدارها هي السكريات الامينية Galactosamine و glucosamine يحتوي الغشاء البلازمي على الدهون diphosphatidylglycerol و phosphatidyglycerol (Schleifer and kandler,1972).

يمتاز هذا الجنس بامتلاكه سلسلة طويلة من المركبات الاليفاتية (C_{34}-C_{21}) وتعتبر ذات اهمية اقتصادية اذ يمكن استخراجها و معالجتها لزيوت التشحيم ، ومعظم افراد هذا الجنس ينمو بشكل جيد على وسط الاكار المغذي في 37 درجة سيليزية (س^0) ويمكن حفظها في الثلاجة في 5 س^0 لمدة (3-5) اشهر في انابيب محكمة الاغلاق او بطريقة التجفيد وذلك لحفظها على المدى الطويل ، وهي غير ممرضة للانسات والنبات (Kocur *et al.*,2006)

تحتوي على انواع عديدة منها *M. kristinae* وتكون ذات مستعمرات كبيرة دائرية ومحدبة برتقالية باهتة، تنمو بشكل جيد في الاوساط الحاوية على 10 % من كلوريد الصوديوم وبشكل ضعيف بوجود 15 % من كلوريد الصوديوم، يمكن ان تنمو لاهوائياً وتنتج حامض lactic acid من الكلوكوز (Kocur *et al.*,2006).

أما نوع *M . halobius* فتظهر المستعمرات على وسط Nutrient agar شفافة وملساء ودائرية وهي mesophilic تنمو بدرجات حرارة (20-40)س^0 والـpHالمثالي لها 7 (Onishi and Kamekura,1972) . يمتاز هذا النوع بقدرته على ازالة الهيدروكاربونات من البيئات الملوثة (Rakesh *et al.*,2011). وكذلك انتاج انزيمي الـamylase و pullulanase اللذين يستخدمان في صناعة النشا (RajdeviandYogeeswaran,1999).

FOR AUTHOR USE ONLY

ثانياً:- جنس الـ *Bacillus*

يعتبر جنس الـ *Bacillus* من البكتريا الموجبة لصبغة گرام ،خلاياه عصوية الشكل والصفة المميزة لأفراد هذا الجنس هي القدرة على تكوين السبورات التي يمكن مشاهدتها بسهولة بعد تصبيغها تحت المجهرالضوئي، ان وجود السبورات يعطي افراد هذا الجنس صفة المقاومة للظروف البيئية المختلفة ،منذ اكتشاف البكتريا ولحد الان تعتبر السبورات مفاتيح تصنيفية للبكتريا (Slepecky and Hemphill, 2006).

يمتاز جدارها الخلوي بأحتوائه على طبقة البيتيدوگلايكان والتي بدورها تحتوي على diaminopimelic meso- acid (m-DAP) كما تحتوي على glycerol teichoic acid في معظم افراد هذا الجنس ما عدا النوع *B. subtilis* يحتوي على ribitol teichoic acid وقد اعتبر جدار الخلية في هذ الجنس نموذج جيد لدراسة جدار البكتريا الموجبة لصبغة گرام (Doyle *et al*.,1988).

هناك تباين في الاحماض الدهنية الموجودة في غشاء الخلية،الدهون الفوسفاتية الرئيسية الموجودة هي phosphatidyglycerol,diphosphatidyglycerol,phosphatidyl ethanolamine ، ومحتوى GC -69 (32) % mol يمتاز بعض افراد هذا الجنس بقدرته على انتاج المضادات الحيوية والانزيمات خارج الخلية مثل(phospholipase C , protease, pencilillinase, nuclease, phosphatase, lipase) وتستخدم للاغراض الصناعية (Slepecky and Hemphill,2006).

FOR AUTHOR USE ONLY

يعتبر جنس الـ *Bacillus spp*. كلي الوجود في البيئة (Mishra*et al.,* 2009), ويضم 145 نوعاً منها *B.mgaterium* الذي يمتاز بخلاياه العصوية التي تكون بشكل ازواج او سلاسل ،لها القابلية على النمو بدرجات حرارة مختلفة (3-45) س^0 وهي هوائية اجبارية ، توجد في مواطن بيئية متنوعة ، غير ممرضة للانسان (Claus and Berkeley, 1986)، وهي من الانواع المهمة صناعياً لقدرتها على انتاج الانزيمات مثلProtease, glucosedehydrogenase, amylase بالاضافة الى انتاج pyruvite وفيتامين B_{12} وادوية مضادة للفايروسات والفطريات (Vary *et al*., 2007 ; ., Shumi *et al* 2004). أما النوع *B. badius* فتكون مستعمراته كبيرة خشنة ،ينمو بدرجات حرارة (35-40) س^0(Claus and Berkeley, 1986)، يمتلك القدرة على التكسير الحيوي للمركبات الفينولية (Sarwade and Gawai, 2014) ، وكذلك يمتاز بقدرته على ازالة الملوثات من مياه النفايات السائلة وذلك عن طريق تقليل المتطلب الحيوي الكيمياوي Chemical oxygen demand (Metha *et al.*, 2014).

اما النوع *B.licheniformis* فهو رُمي التغذية ، يوجد في جميع البيئات ،وفي التربة يوجد بشكل سبورات وما يميزه قدرته على النمو تحت الظروف اللاهوائية مخالفاً بذلك لمعظم العصويات وكذلك تحت الظروف الهوائية ، يستطيع النمو بدرجات حرارة عالية 55س^0 وينتج سبورات عالية المقاومة ، غير ممرضة وهو من البكتريا المهمة صناعياً لقدرته على انتاج الانزيمات مثل Amylase و Proteases وانتاج المضادات الحيوية (Pinto, 2012) .

يحتوي جدار الخلية على teichuronic acid بالاضافة الى teichoic acid وبالتالي هذه البوليمرات توفر شحنات سالبة لسطح البكتريا لذلك تمثل مواقع ارتباط فعالة لأيونات المعادن الموجبة الشحنة ، وان جدار هذه البكتريا مشابه لجدار *B.subtilis* ماعدا وجود حامض الـ teichuronic الذي يمثل صفة مميزة لها ويمثل مواقع ابتدائية لارتباط العناصر (Beveridge *et al.* , 1982).

1-2-5 - مقاومة الأحياء المجهرية للعناصر الثقيلة

هناك العديد من الآليات التي تلجأ اليها الاحياء المجهرية للتخلص من العناصر الثقيلة منها:

1. النقل عبر غشاء الخلية Transport across cell membrane

تنتقل العناصر الثقيلة عبر غشاء الخلية الميكروبية بنفس الآلية المهيأة لدخول وأمتصاص العناصر المهمة مثل المغنيسيوم Mg والبوتاسيوم K والصوديوم Na وأنظمة نقل العناصر تصبح مضطربة بوجود ايونات العناصر الثقيلة التي تحمل نفس شحنة أيونات العناصر المهمة وهذه الآلية غير مرتبطة بالنشاط الايضي اساساً فأن الامتزاز الحيوي Biosorption بواسطة الاحياء يتضمن خطوتين

أ- غير المعتمدة على الأيض الحيوي Non-metabolism dependant

حيث ان العناصر ترتبط بالجدار الخلوي .

ب- المعتمدة على الأيض الحيوي Metabolism dependant وفيه العناصر تنتقل عبر الغشاء الخلوي ويحدث هذا فقط في الخلايا الحية وهو نوع من أنظمة الدفاع في الأحياء المجهرية ويحدث فقط عند وجود عناصر سامة (Gadd *et al.*,1988; Huang *et al.*,1990; Costa and Leite,1991; Nourbakhsh *et al.*,1994).

2. الادمصاص الفيزيائي Physical adsorption

في هذه الآلية يحدث الادمصاص بمساعدة قوة فاندرفالس Van derWaals (Kuyucak and Volesky, 1988) ، حيث أن اليورانيوم و النحاس والكادميوم والزنك والكوبلت يدُّمص من قبل الكتلة الحية الميتة للطحالب والفطريات والخمائر ، بينما يحدث الادمصاص من خلال ايونات العناصر المتعادلة كهربائياً في المحاليل وجدران الخلايا

FOR AUTHOR USE ONLY

الميكروبية ، ووجد أن بكتريا *Zoogloea ramigera* وطحلب *Chiarella vulgaris* تكون مسؤولة عن ادمصاص النحاس (Asku, 1992).

3. التبادل الايوني Ion exehange

تحتوي جدران خلايا الأحياء المجهرية على السكريات المتعددة وأيونات العناصر ثنائية التكافؤ تتبادل مع الأيونات المتعادلة للسكريات المتعددة مثل الالكينات في الطحالب البحرية إذ تظهر تبادل ايوني مع أملاح البوتاسيوم K^{+2} والكالسيوم Ca^{+2} والصوديوم Na^{+2} والمغنيسيوم Mg^{+2} هذه الايونات تتبادل أيونياً مع الايونات المتعادلة مثل الكوبلت Co^{+2} والنحاس Cu^{+2} والكادميوم Cd^{+2} والخارصين Zn^{+2} مما يؤدي إلى أدمصاص العناصر الثقيلة (Kuyucake and volesky, 1988).

4. تكوين المعقدات Complexation

تحدث عملية أزالة العناصر من خلال تكوين معقدات على سطح الخلية من خلال التفاعل بين العناصر والمجاميع الفعالة ، إذ أفترض Asku (1992) أن ادمصاص النحاس من قبل بكتريا *ramigera Z.* وطحلب *C. vulgaris* يحدث من خلال تكوين أواصر تناسقية بين العناصر والاحماض الامينية والمجاميع الكاربوكسيلية للسكريات المتعددة الموجودة في جدران الخلية ،لقد وجد ان التعقيد هو الآلية الوحيدة المسؤولة عن تراكم الكالسيوم والمغنيسيوم والكادميوم والزنك والنحاس والزئبق في بكتريا *Pseudomonase syringae*.

تعمل الأحياء المجهرية على انتاج أحماض عضوية مثل (Citric,Oxalic, Gluconic ,Fumaric ,lactic Malic,) والتي تعمل على خلب العناصر السامة مما يؤدي الى انتاج جزيئات المعادن العضوية Metalloorganic molecules، ان هذه الأحماض العضوية تساعد على تذويب مركبات العناصر الثقيلة واخلابها من خلال سطح الخلية (Davis *et al.*, 2003).

5. الترسيب Precipitation

هي عملية تعتمد على التفاعل بين أملاح العناصر الثقيلة والكتلة الحية Biomass للاحياء المجهرية (Pagnanelli *et al.* ,2003) وربما عملية الترسيب تعتمد على أيض الخلية في حالة وجود العناصر السامة إذ ان العناصر تنتقل عبر الغشاء الخلوي وتتجمع داخل الخلية ، او ربما لا تعتمد على أيض الخلية اذا حصلت التفاعلات الكيميائية بين العناصر وسطح الخلية (Ercole *et al.* ,1994).

FOR AUTHOR USE ONLY

6. تفاعلات الأكسده والإختزال Oxidation & Reduction Reactions

تلعب الأحياء المجهرية دوراً في اكسدة العناصر مثل النحاسCu^{+2}, الحديدFe^{+2} , المغنيسيوم Ca^{+2} و الكالسيومMg^{+2} او اختزال الارسينات AsO_4^{-2} والمنغنيز Mn^{+4}والحديد Fe^{+3} وهي قادرة على تقليل ايونات العناصر الثقيلة (Gadd, 2004) .

7. تحويل مجموعة المثيل Biomethylation

هذه الآلية هي تحويل مجموعة المثيل (CH_3) للعناصر والفلزات إلى مركبات مثيلية تختلف في ذوبانها وسميتها ويمكن لمجموعة متنوعة من الأحياء المجهرية (البكتريا ،الفطريات ،الخمائر) تحويل مركبات الزئبق Hg والكادميوم Cd والسيلنيوم Se والتيتانيوم Te والرصاص pb الى مركبات اقل سمية (Roana and Pepper, 2001; Gadd, 2004) .

8. Metallothioneins

هي مجموعة من البروتينات تعمل كمضادات للأكسدة وتوجد موزعة في جميع الكائنات الحية وزنها الجزيئي واطئ وغنية بالسستين وأن وجود مجاميع thiol (SH^-) في التركيب الكيميائي للسستين يمكنها إمساك ايونات العناصر الثقيلة مثل الكادميوم Cd^{+2} ، الزئبق Hg^{+2} ،الحديد Fe^{+2} ،الخارصين Zn^{+2}والنحاس Cu^{+2} (Cobbett and Goldsbrough, 2002; Thirumoorthy *et al*., 2007).

FOR AUTHOR USE ONLY

تقاوم البكتريا العناصر الثقيلة بواسطة هذه الآليات التي تتنشط عندما تتعرض إلى تراكيز عالية إذ تتفاعل العناصر داخل الخلايا مع مختلف المسارات الأيضية وتشكل مركبات سامة (Nies,1999; Spain and Alm, 2003) ، وكما هو معروف فأن بعض العناصر الثقيلة ضرورية لوظائف الإنزيمات الخلوية ولنمو البكتريا والأيض الغذائي ومن ثم فأن آليات امتصاص العناصر الثقيلة موجودة مسبقاً في الخلايا البكتيرية ومن خلال هذه الآليات تدخل العناصر الثقيلة إلى داخل الخلية وهناك نوعين من آليات الامتصاص : Nies and (Silver, 1995; Spain and Alm, 2003)

أ- سريعة وغير محددة من خلال التنافذ الكيميائي Chemiosmotic gradient تمر عبر غشاء الخلية وبالتالي لا تتطلب ATP.

ب - بطيئة نسبياً وأكثر تحديداً وتعتمد على الطاقة ATP hydrolyis

بعض الأحيان تنتج أنظمة الامتصاص العالية فقط في أوقات الحاجة في حالة الجوع او الأيض الخاص بالحث (Nies and Silver ,1995) . البيئة المائية هي أكثر عرضة للتأثيرات الضارة للعناصر الثقيلة لان الكائنات المائية على اتصال وثيق وطويل الأمد مع العناصر القابلة للذوبان (Shoeb, 2006)، تكون البكتريا المعزولة من المناطق الملوثة بالعناصر الثقيلة أكثر مقاومة للعناصر من تلك التي جمعت في بيئات غير ملوثة بها (Chaudri *et al*. ,1992).

الدراسات التي انجزت في مجال مقاومة البكتريا للعناصر الثقيلة هي دراسة . Essa *et al* (2002) على البكتريا المختزلة للكبريت إذ اظهرت قدرة على ترسيب المعادن على شكل كبريتيد المعدن ولكنها تحتاج الى عمليات سيطرة لانها تطلق كميات كبيرة من غاز كبريتيد الهيدروجين السام ، ووجدا Odokuma and Ijeomah (2003) في دراستهما على أربعة أجناس من البكترياهي *Bacillus* و*Proteus* و*Alcaligenes* و*Arthrobacter* أن جنس الـ *Bacillus* هو الأكثر تحملاً للرصاص والكادميوم والنحاس والخارصين .

هذا فضلاً عن دراسة قامت بها الزيادي (2004) تناولت دراسة قابلية الجراثيم المختزلة للكبريتات لنوعين من البكتريا *Desulfotomaculum* و*Desulfobulbus* على ترسيب الرصاص والزئبق من مياه الفضلات الصناعية مختبرياً في محافظة البصرة ، وفي جنوب الهند وجد Raja *et al.* (2009) ان البكتريا المعزولة من مياه المجاري والمتمثلة *Proteus vulgaris* اظهرت مقاومة عالية للنيكل ولم تنمُ بوجود الكروم والزئبق ،بينما بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* و *Actinobacter radioresistens* اظهرتا مقاومة عالية للرصاص .

وجد Singh *et al.* (2010) ان بكتريا *Pseudomonas* المعزولة من المخلفات الصناعية السائلة في الهند اظهرت مقاومة لكل من الكروم والنحاس والنيكل والكادميوم ، وفي ايران وجد Nasrazadani *et al.* (2011) ان بكتريا heterotrophic المعزولة من المخلفات الصناعية كانت مقاومة للنحاس والرصاص والكادميوم و الخارصين و النيكل.

وجد . Abdelatey *et al* (2011) في دراسة له على ثلاث أنواع من البكتريا الموجبة لصبغة كرام والمتمثلة *Bacillus cereus*و*Bacillus subtilis* و *Staphylococcus aureus* والبكتريا السالبة لصبغة كرام والمتمثلة .*Pseudomonase* sp و .*Bordetella* sp في مصر والمعزولة من الترب مقاومة لكل من الكادميوم والكوبلت، كما وجد . Jackson *et al* (2011) في جنوب إفريقيا أن بكتريا .*Bacillus* spp و *Micrococcus* .spp المعزولة من نهر Plankenburg لها القابلية على مقاومة النحاس والخارصين والنيكل و الحديد والمنغنيز وألالمنيوم، وفي كوريا وجد Velusamy *et al.* (2011) ان بكتريا الـ *Bacillus megaterium* المعزولة من الترب الملوثة بالهيدروكاربونات لها القدرة على النمو بتراكيز عالية من النحاس والكادميوم والرصاص.

FOR AUTHOR USE ONLY

وجد Bisht *et al.* (2012) ان جنس الـ *Staphylococcus* المعزولة من المخلفات الصناعية في الهند تمتلك مقاومة متباينة للعناصر الثقيلة ،إذ اظهرت *S. saprophyticus* مقاومة عالية للنحاس مقارنة بالانواع الاخرى ، بينما اظهرا النوعان *S. aureus* و *S. epidermidis* مقاومة لعنصري الكوبلت والخارصين، وقد وجدا Gupta and Kumar2012)) أن جنس *Bacillus* spp. له القدرة على مقاومة التراكيزالعالية من النحاس في الهند ، في حين وجد Varghese *et al.* (2012) أن 45 % من عزلات جنس *Bacillus* spp. المعزولة من ترب ورواسب ومياه في الهند كانت لها القدرة على مقاومة الرصاص والكادميوم والنيكل والخارصين والكروم.

أجريت دراسة في الهند للنفايات السائلة المنزلية والصناعية من قبل *et al.*Samanta (2012) حيث بين ان سلالات جنس الـ *Bacillus* spp. المعزولة كانت مقاومة لكل من النيكل والكادميوم والكروم والكوبلت ، ووجد Mgbemena *et al* . (2012) في نيجيريا أن البكتريا المائية المعزولة من نهر Otamiri والتي تضمنت الاجناس *Bacillus,Micrococcus, Escherichia, Proteus, Pseudomonas, Aeromonas* قادرة على النمو بوجود تراكيز عالية من الرصاص والخارصين والحديد .

كما وجدا Hookoom and Puchooa (2013) ان بكتريا الـ *Bacillus creues* و *Bacillus subtilis* المعزولة من الاراضي الزراعية لها القدرة على النمو بتراكيز عالية من الرصاص والزئبق والفضة والخارصين والنحاس. ووجد Atieno *et al* . (2013) في كينيا ان البكتريا المعزولة من مياه الصرف الصحي ووحل الاغنام والماعز والمتمثلة *Salmonella, Vibrio,Fecal coliforms,Fecal streptococci* كانت مقاومة لكل من الرصاص والنيكل والنحاس والزئبق والكوبلت والخارصين وقد اعزى سبب المقاومة لامتلاك البكتريا بروتينات Metallothionein وكذلك وجود المحافظ السكرية .

وجد Issazadeh *et al* . (2013) في ايران ان بكتريا *Pseudomonase putida* لها القدرة على تراكم الكادميوم . كما وجد Sekhar (2013) في الهند عند دراسته لجنس *Bacillus* أن النوع *B. badius* له القدرة على مقاومة النحاس والكروم ولم يبد أي مقاومة للزئبق.

6-2-1- المعالجة الحيوية Bioremediation

تتضمن المعالجة الحيوية أستخدام النباتات أو الاحياء المجهرية الحية أو الميتة الطبيعية أو المعدلة جينياً لمعالجة البيئة الملوثة بالمركبات العضوية غير قابلة للكسر (Xenobiotics) من خلال تحويلها من

FOR AUTHOR USE ONLY

مواد سامة الى مواد قليلة السمية او معدومة ومن ثم تكوين منتجات مفيدة (Dobson and Burgess, 2007; Li and Li , 2011).

المعالجة الحيوية هي عملية متعددة الجوانب يمكن تطبيقها في الموقع الملوث او خارج الموقع ، وتنطوي على أزالة المواد الملوثة لتعامل في اماكن اخرى ، وعادة ما تحتاج المعالجة خارج الموقع إلى فترات أطول (Vidali, 2001 ; Tabak *et al*. ,2005) .

ان الطرق التقليدية لمعالجة البيئات الملوثة والتي تعتبر غير فعالة وغير اقتصادية وتشمل الطرق الفيزيائية والكيميائية ، مثل الاكسدة الكيميائية Chemical Oxidation والترسيب الكيميائي Chemisedimentation والكاربون النشط Active Carbon و التبا دل الأيوني ion exchange والتبخر evaporation والتي غالباً ما تكون غير كفوءة وغالية الثمن (Volesky,1990)، هذه الطرائق محدودة الاستخدام لأنها لا تتضمن إزالة كاملة لايونات المعادن فضلاً عن الحاجة إلى أنظمة للمتابعة والتحكم وكذلك تكوين مخلفات سامة تحتاج إلى معاملات أخرى للتخلص منها (Alluri *et al*., 2007; Goksungur *et al*., 2003).

أما المزايا التي توفرها المعالجة الحيوية فتشمل الكلفة المنخفضة و تقليل المخلفات الفيزيائية والكيميائية و كفاءة عالية وأنتقائية لعناصر محدده (Perpetuo, 2011).

هناك طرق حيوية مختلفة لأزالة الملوثات من اشهرها التراكم الحيوي Bioaccumulation والامتزاز الحيوي Biosorption إذ ثبت انها تمتلك امكانيات جيدة تحل محل الاساليب التقليدية لأزالة العناصر الثقيلة (Velosky and Holan, 1995 ;Malik, 2004). و يقصد بالتراكم الحيوي امتصاص المواد السامة عن طريق الخلايا الحية و تنتقل السمية في الخلية وتتراكم في الداخل عبر غشاء الخلية وخلال دورة الايض (Malik, 2004. اما الامتزاز الحيوي biosorption ويتم بواسطة الخلايا الحية والميتة للاحياء المجهرية (Volesky,1990)، والامتزاز هو تفاعلات فيزيوكيميائية بين أيونات العناصر الثقيلة وخلايا الأحياء المجهرية اعتماداً على أن الأحياء المجهرية تمتلك شحنة سالبة آتية من وجود مجاميع سالبة الشحنة في غشاء وجدار الخلية *et* (Kujan *al*. , 2005).

هناك عده عوامل تؤثر على عملية الامتزاز تتمثل :-

خصائص أيونات العنصر (الوزن الذري والتكافؤ)

1- طبيعة الممتزات (عمر الخلية والحالة الفسيولوجية)

2- الظروف البيئية (الدالة الحامضية pH و درجة الحرارة و وقت الاتصال و تركيز الكتلة الحية)

FOR AUTHOR USE ONLY

.(Wang and Chen, 2006 ; Chen and Wang, 2008)

اعتمدت معظم دراسات المعالجة الحيوية على الامتزاز الحيوي ثنائي الطور

أ- مرحلة سريعة لا تعتمد على الأيض أو درجة الحرارة وامتصاص الايونات يحدث في المحاليل وعلى سطح الخلية.

ب- مرحلة بطيئة تعتمد على الأيض وتتاثر بدرجة الحرارة حيث عند تواجد العناصر السامة والأحياء المجهرية تنتج مركبات تساعد على عملية الترسيب اثناء عملية الايض .

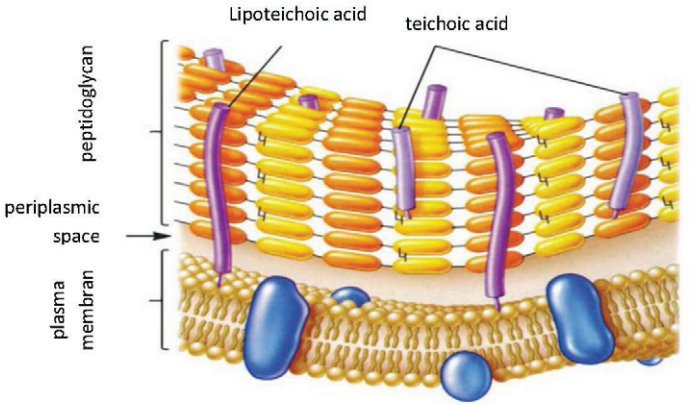
.(Ercole *et al.,* 1994 ; Roane and Pepper, 2001 ; Malik, 2004 ; Tabak, 2005)

تمتاز البكتريا الموجبة لصبغة گرام بخصائص مميزة تبعاً الى الاختلاف في تركيب جدار الخلية ووجود أنواع مختلفة من البوليمرات والأحماض الامينية والأحماض الكاربوكسيلية مما يجعل الجدار الخلوي لهذه البكتريا سالب الشحنة (Schaffer and Messner,2005)، إن الايونات السالبة في جدار الخلية يمكن أن تعمل كمواقع فعالة لأرتباط ايونات المعادن موجبة الشحنة (Gupta and keegan, 1997) .

يتألف جدار الخلية للبكتريا الموجبة لصبغة گرام من طبقات متتالية من البيتيدوكلايكان peptidoglycan , وتتصل كل طبقة منها بالتي فوقها والتي تحتها من خلال جسور الأحماض الامينية،والبيتيدوكلايكان عبارة عن بوليمر ذي وزن جزيئي عالي مؤلف من وحدتين رئيسيتين هما N-acetyl glucoseamine (NAG) و N-acetyl muramic acid (NAM) متصلتين ببيتيد صغير , ويرتبط البيتيدوكلايكان مع بوليمر ثاني هو teichoic acid او teichuronic acid الذي يتكون من glycerol phosphate , وتتأصر احماض teichoic تساهمياً مع طبقة البيتيدوكلايكان وتكون وظيفتها هي الارتباط بالمعادن (Schleifer and Kandler,1972).

أما الغشاء البلازمي فهو تقريباً متشابه في الخلايا البكتيرية كلها وهو السطح الداخلي لطبقة البيتيدوكلايكان او جدار الخلية , ويتكون من طبقتين من الدهون المفسفرة (phospholipids) تتخللها بعض البروتينات النشطة انزيمياً (Freeman , 1979), كما موضح في شكل (1 - 1) .

FOR AUTHOR USE ONLY



شكل (1-1)غشاء وجدار الخلية للبكتريا الموجبة لصبغة گرام (Willey *et al*.,2008)

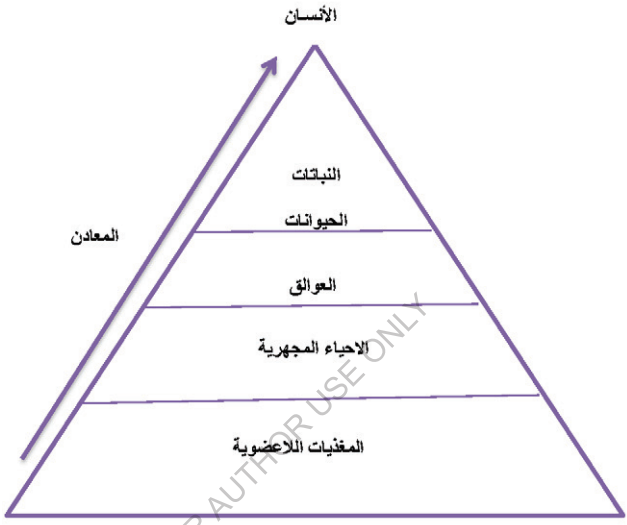
تختلف البكتريا الموجبة لصبغة گرام عن البكتريا السالبة لصبغة گرام في الجدار الخلوي،إذ ان البكتريا الموجبة لصبغة گرام تفتقر للغشاء الخارجي الموجود في البكتريا السالبة لصبغة گرام ،وتمتاز طبقة الببتيدوكلايكان بانها اكثر سمكاً مما عليه في البكتريا السالبة لصبغة گرام وتحتوي على احماض lipoteichoic acid التي تشكل اكثر من 60% من كتلة الجدار (Thomas *et al*.,2010).

تتفاعل العناصر الثقيلة مع المجاميع الفعالة السالبة الشحنة التي توجد في الجزيئات البوليمرية (Lipoproteins, polysaccharide, lipid, proteins) وغيرها في جدار الخلية وغشائها (Pagnanelli *et al*., 2003), وهذه البوليمرات الحيوية تجهز عدداً وفيراً من المجاميع الكيميائية مثل الهايدروكسيل والكاربوكسيل وغيرها من المجاميع الأخرى , إذ تعد هذه المجاميع مواقع ارتباط بالايونات المعدنية (Schiewer, 1996).

أن وجود الفوسفات العضوية في الأحماض النووية (DNA و RNA) وفي الدهون المفسفرة phospholipids (غشاء الخلية) وفي حامض teichoic الموجود في جدار الخلية , وفي الحقيقة ان phosphodiester الموجودة في جدران البكتريا هي واحدة من اكثر المواقع لارتباط ايونات المعادن (Beveridge *et al*., 1982) فضلاً عن ان الأحماض الامينية ومجاميع الكاربوكسيل والنتروجين والاوكسجين في اواصر الببتيد يمكن ان تغير خواصها الكيميائية لتتناسق وترتبط مع ايونات المعادن (Nweke *et al*., 2006) .

FOR AUTHOR USE ONLY

هناك دراسات عديدة تناولت المعالجة الحيوية للعناصر الثقيلة نظراً لقوة هذه العناصر وثباتها وتراكمها في الانظمة البيئية وانتقالها صعوداً في السلسلة الغذائية لتصل الى البشر الذين هم الجزء العلوي من هذه السلسلة (Volesky, 2001) كما موضح في المخطط رقم (1-2).



FOR AUTHOR USE ONLY

مخطط (1-2) كثافة العناصر الثقيلة المتحورة في البيئة وتراكمها خلال السلسلة الغذائية (Volesky,2001)

وجد Ashby *et al.* (1997) أن جنس الـ *Bacillus* له القابلية على تراكم الذهب والنحاس و الكروم والمنغنيز والكادميوم. كما توصلا Gupta and Keegen (1997) أن حوالي 25 % من الرصاص قد تمت إزالته من المياه الملوثة باستخدام مزارع نقية من بكتريا *Pseudomonas* و *Bacillus* و *Aeromonas* خلال عمليات الامتزاز الحيوي . وفي المانيا عزل Pobell *et al* . (1999) ثلاث أنواع من جنس الـ *Bacillus* هي *B. megaterium* ، *B.cereus* و *B.sphaericus* أوضح قدرة الخلايا الخضرية والسبورات على تراكم العناصر الثقيلة بكمية عالية لليورانيوم و الرصاص و الكادميوم والنحاس والالمنيوم .

توصل Clausen (2000) ان بكتريا *Bacillus licheniformis* لها القدرةعلى أزالة النحاس بنسبة93 % من نشارة الخشب الملوثة بالنحاس ويمتاز هذا النوع بأهميته في أنتاج الأنزيمات خارج الخلية وبشكل رئيسي Proetase و Lipase وهو يشترك مع النوع *B. subtilis* وكثيراً ما أستخدم لمعالجة مياه الصرف الصحي (kalia *et*

(; Vishwanatha *et al.*,2010 *al.*,1994; Hiatt,2000)، أما بكتريا *Bacillus cereus* فقد استخدمت في إزالة الرصاص من المحاليل المائية من قبل (Ray *et al.*, 2005).

استنتج El- Meleigy *et al.* (2010) ان البكتريا والفطريات المعزولة من مياه البحرفي مصر لها القدرة على ازالة العناصر الثقيلة ومن الانواع المعزولة كان *Micrococcus kristinae* و *M. roseus* و *Staphylcoccus aureus*و *Vibrio fluvials* بعد مزجها اظهرت قدرة على ازالة البوتاسيوم بنسبة 90.13 % والمنغنيز 52.29 % وكذلك أمتصاص كل من الكادميوم والنحاس والرصاص .

عزلت الموسوي (2010) البكتريا الخيطية من مياه هور شرق الحمار واظهرت جميعها قدرة عالية على ازالة النحاس والخارصين والكادميوم والرصاص وسجلت اعلى ازالة عند pH مساوياً الى 7 وبعد 24 ساعة من الحضن .

توصل Nanda *et al* . (2011) ان جنس *Bacillus* له القدرة على إزالة الزئبق بنسبة 45% والنحاس بنسبة62 %اما جنس *Pseudomonas* اذ بلغت نسبة ازالته للكادميوم 56% والارسنك 34% والكوبلت 53%، وفي دراسة حقلية على تربة ملوثة بالرصاص في إيران وجد Kafilzadeh *et al* (2012) ان جنس *Bacillus* له القدرة على أزالة الرصاص بنسبة 89.66 % وجنس *Pseudomonas* و*Corynebacterium* و *Staphylococcus*و *Escherichia.coli* بلغت نسبة ازالته للرصاص 87.97 % , 86.94 % , 64.82 %60.35,على التوالي، وفي رومانيا عزل Stefanescu *et al* . (2011) بكتريا *Bacillus megaterium* من الترب الغنية بالفوسفات ووجد قدرتها على تجميع الحديد والنحاس والخارصين.

اوضحت Radhi (2012) ان بكتريا *Staphylococcus aureus* المعزولة من مياه وترب مواقع مختلفة في بغداد ،اظهرت ازالة عالية للخارصين بنسبة 43 % وازالة قليلة للرصاص بلغت 7 %، أما في الهند فأستخدم Samarth *et al* (2012) بكتريا *B. licheniformis* لمعالجة مياه الصرف الصحي إذ أزالت الكروم بنسب 95 % والحديد بنسبة 52 % والنحاس بنسبة 32% . وفي مصر وجد Essa *et al* . (2012) ان بكتريا *Micricoccus halobius* المعزولة من وحل مياه الصرف الصحي مع أنواع اخرى كانت قادرة على أزالة الرصاص بنسبة 97.9 %، الكادميوم بنسبة 80.9 %، النحاس بنسبة 60.1 % النيكل بنسبة 94.2 %.

وجدا Kamika and Momba (2013) ان بكتريا *B. licheniformis*المعزولة من المخلفات الصناعية السائلة لها القدرة على أزالة الألمنيوم بنسبة 23 % ،الخارصين بنسبة 53 % ، وفي باكستان وجد Muneer *et al.* (2013) ان *Bacillus licheniformis* المعزولة من النفايات الصناعية السائلة للمدابغ لها القدرة على ازالة الكروم بنسبة 73 % بعد 72 ساعة من الحضن.

FOR AUTHOR USE ONLY

1-2 - المواد Materials

1-1-2 -المواد الكيميائية المستخدمة Chemicals

يبين الجدول (2-1) المواد الكيمياوية المستخدمة والشركات المجهزة لها .

الجدول (2-1) المواد الكيميائية المستخدمة والشركات المجهزة لها

المادة	الشركة المجهزة والمنشأ
Hydrochloric acid	BDH , UK
Nitric acid	
Ethanol	
α-naphthol	
Sodium iodide	
Dipotassium phosphate	
Sulfanilic acid	
α-naphthylamine	
Potassium hydroxide	
Glucose	
Potassium nitrate	
Methyl Red	
Sodium nitrate	
Crystal violet	
Safranine	
Starch	Difco-USA
Trypton	
Acetic acid	
Sodium chloride	Fluka,Switzerland
Coppre nitrate	
Mannitol	
Peptone	Himedia-India
Kovac's Reagent	
Beef extract	
Mannose	
Casein peptone	
Lead nitrate	MERCK-Germany
Nickel nitrate	
Cadmium nitrate	
Hydrous magnesium sulphate	

FOR AUTHOR USE ONLY

Phenol red	Maknur-Canada

2-1-2 - الاجهزة المستخدمة Apparatus

الجدول (2-2) الاجهزة المستخدمة والشركات المجهزة لها

اسم الجهاز	النوع	المنشأ
جهاز الامتصاص الذري اللهبي F.A.A.S	Phoenix – 986	Bio Tech (UK)
جهاز قياس الدالة الحامضية pH	HANA-HI-9812	Romania
جهاز قياس التوصيلية Ec	Condi 315i	Germany
جهاز تحديد المواقع GPS	Vista HCX	Germany
جامع عينات الماء	T.S.K	Japan
جهاز المؤصدة	HIRAYAMA	Japan
جهازالترشيح	Aurora	USA
ميزان حساس	Sartorium	Germany
حاضنة تدفئة	BINDER	Germany
مجهر ضوئي	Zeiss	Germany
صفيحة ساخنة	Ritesch	Germany
فرن حراري	BINDER	Germany
جهازالطرد المركزي	Beckman	USA
حمام مائي	GFL	Germany
حاضنة هزازة	Sartorius Stedim	Germany
جهاز تجفيد العينات	CHRIST ALPHA 1-2 LD PLUS	Germany

FOR AUTHOR USE ONLY

3-1-2 - الأوساط الزرعية الجاهزة المستخدمة

يوضح الجدول التالي الأوساط الزرعية الجاهزة والشركات المجهزة لها.

الجدول (2-3) الأوساط الزرعية الجاهزة والشركات المجهزة لها

الأوساط الزرعية الجاهزة	الشركة المجهزة
O/F Basal medium	Difco-UK
(LB agar) Luria-Bertain agar	Himedia- India
Nutrient Broth	
Agar	
(B.H.I) Brain-Heart infusion agar	Oxoid-UK
Peptone water	
Nutrient agar	
Simmon citrate agar	

FOR AUTHOR USE ONLY

عقمت جميع الاوساط بعد تحضيرها بجهاز المؤصدة (لمدة 15دقيقة , درجة الحرارة 121 درجة سيليزية (س^{0}), وضغط 15 باوند /انج^{2}) ما لم يذكر عكس ذلك.

4-1-2- أوساط العزل Isolation media

استخدم وسط العزل Nutrient agar وحضر حسب طريقة الشركة المصنعة له بأذابة 28 غم من الوسط في 1لتر من الماء المقطر وعقم بجهاز المؤصدة , ثم برد الى 50س^{0} وصب في اطباق بتري , ترك الوسط ليتصلب و أستخدم هذا الوسط لعزل جميع انواع البكتريا.

5-1-2 - اوساط الأختبارات الكيموحيوية Biochemical Test Media

1. وسط تخمر المانيتول Mannitol salt agar medium (Prescott and Harley, 1996)

حضر الوسط بأذابة 10 غم من Proteose peptone و 1غم Beef extract و 75 غم Sodium chloride و10غم D-Manitol و 0.025 غم Phenol red و15غم Agar في 1 لتر من الماء المقطر ,عدل الأس الهيدروجيني (pH) للمحلول الناتج الى 7.2 ،للكشف عن البكتريا القادرة على تخمر المانيتول.

2. وسط اختبار الحركة Motility test medium (Prescott and Harley, 1996)

حضر الوسط بأذابة 10 غم تربتون و5 غم كلوريد الصوديوم و5 غم اكار في 1لتر ماء مقطر , عدل الأس الهيدروجيني (pH) الى 7.2 ، وزع في انابيب اختبار حجم 10 مل ثم عقمت الانابيب بجهاز المؤصدة وتركت لتبرد بشكل اكار مائل slant واستخدم للتمييز بين البكتريا المتحركة وغير المتحركة .

3. وسط النشأ Starch agar medium (Prescott andHarley, 1996)

حضر هذا الوسط بأذابة 3 غم خلاصة لحم البقر و10 غم نشأ و12غم اكار في 1لتر ماء مقطرمعقم عدل الأس الهيدروجيني (pH) الى 7.5 ، عقم الوسط بجهاز المؤصدة ووزع في اطباق بتري معقمة وترك ليتصلب ،استخدم الوسط للتعرف على البكتريا القادرة على انتاج أنزيم amylase القادر على تحلل النشا.

4. وسط Voges proskauer broth medium (Prescott and Harley, 1996)

حضرهذا الوسط بأذابة 7 غم ببتون و5 غم كلوكوز و5 غم K_2HPO_4 في 1لترماء مقطر، عدل الأس الهيدروجيني (pH) الى 6.9، وزع في انابيب اختبار حجم 10 مل ،عقم الوسط بجهاز المؤصدة استعمل لغرض التعرف على البكتريا المخمرة لسكر الكلوكوز وتكوين مادة Acetoin.

FOR AUTHOR USE ONLY

5. وسط اختزال النترات Nitrate borth medium (Prescott and Harley, 1996)

حضر هذا الوسط بأذابة 5 غم ببتون و 3 غم خلاصة لحم البقر و1 غم نترات البوتاسيوم في 1لترماء مقطر، عدل الأس الهيدروجيني (pH) الى 7.4، وزع في انابيب اختبار حجم 10 مل ،عقم الوسط بجهاز المؤصدة استعمل لغرض التعرف على البكتريا المختزلة للنترات.

6. وسط المانوز phenol red mannose broth medium (Prescott and Harley,1996)

حضر هذا الوسط بأذابة 10 غم ببتون كازايين و 5 غم كلوريد الصوديوم و 5 غم مانوز و0.018 غم فينول ريد في 1لترماء مقطر عدل الأس الهيدروجيني (pH) الى 7.3 ، وزع في انابيب اختبار حجم 10 مل ،عقم الوسط بجهاز المؤصدة للكشف عن البكتريا المخمرة للمانوز.

7. وسط الاكسدة والتخمر O/F Basal medium

حضر وسط O/F Basal Medium حسب مواصفات الشركة المصنعة له Difco بأذابة 9.4 غم من الوسط في 1لتر من ماء مقطر , لكل 100مل من الوسط يضاف له 1 غم من الكلوكوز،عقم بجهاز المؤصدة ووزع في انابيب اختبار حجم 10 مل استعمل لمعرفة البكتريا التي تخمر او تؤكسد الكلوكوز.

2-1-6- الكواشف والمحاليل المستخدمة

1. كاشف الأوكسيديز Oxidase Reagent (Benson, 2002)

استعمل الكاشف المجهز من شركة (Marion Scientific, USA) للكشف عن قدرة البكتريا لأنتاج أنزيم Cytochrome oxidase .

2. كاشف الكاتليز Catalase Reagent (Prescott and Harley, 1996)

أستعملت مادة بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 بتركيز 3 % للكشف عن قدرة البكتريا لأنتاج انزيم Catalase.

3. كاشف باريت Barritt's Reagent (Prescott and Harley, 1996)

يتكون الكاشف من محلولين :

محلول A: حضر بأذابة 5غم من α-naphthol يذاب في 100ml ايثانول (95%) .

محلولB: فقد حضر بأذابة 40غم من هيدروكسيد البوتاسيوم في 100ml ماء مقطر. استعمل هذا الكاشف لغرض التعرف على البكتريا المخمرة لسكرالكلوكوز و تكوين مادة Acetoin .

4. كاشف اختزال النترات Nitrate Reduction Reagent (Prescott and Harley, 1996).

يتكون الكاشف من محلولين هما :

محلول A: حضر بأذابة 5غم α-naphthylamine في 30% من حامض الخليك تركيز(5N) حجم 1لتر.

محلول B: حضر المحلول من 8 غم من حامض السلفانيلك Sulphanilic acid في 30% من حامض الخليك تركيز(5N) حجم 1لتر. استعمل للكشف عن البكتريا المختزلة للنترات اذ يتغير لون الوسط الى اللون الاحمر .

FOR AUTHOR USE ONLY

5. كاشف كوفاك Kovac's Reagent

استعمل الكاشف المجهز من شركة Himedia لغرض الكشف عن امتلاك البكتريا لإنزيم Tryptophynase وتكوين حلقة الاندول نتيجة لتحلل الحامض الاميني Tryptophan بذلك الانزيم .

6. محلول الأيودين Lugol's Iodine Solution (Prescott and Harley, 1996)

حضر بأذابة 1غم من اليود مع 2غم ايوديد البوتاسيوم في 300 مل ماء مقطر .

2-1-7 - الصبغات المستعملة Stains

أ- صبغة غرام Gram Stain (Prescott and Harley, 1996).

ب- صبغة اخضر الملاكايت Malachite green stain (Prescott and Harley, 1996)

واستعملت للكشف عن وجود أو عدم وجود السبورات.

2-2 - طرائق العمل Methods

2-2-1 - جمع العينات Sample collection

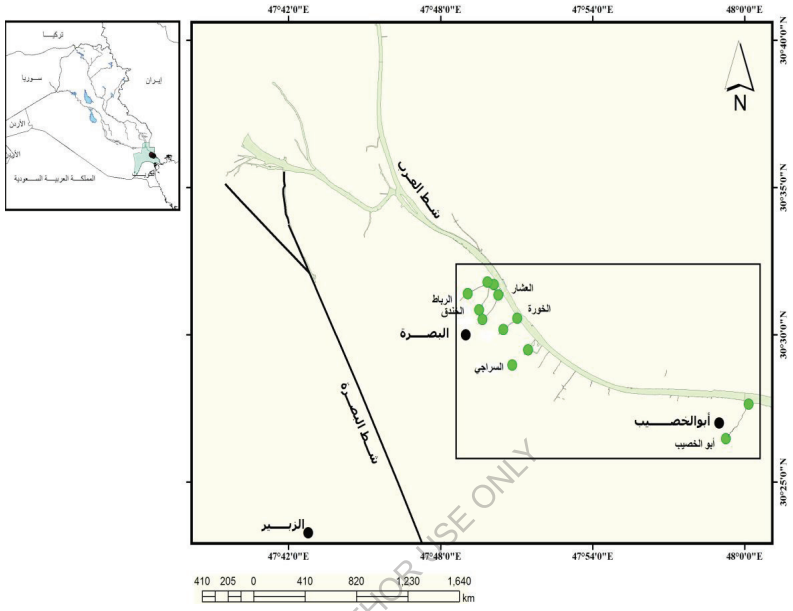
جمعت 12 عينة من عينات المياه للأنهر الداخلية المتفرعة من شط العرب- محافظة البصرة – جنوب العراق (شكل 2-1) خلال فصل الشتاء (تشرين الثاني وكانون الأول) لسنة 2013 وبواقع مكررين لكل محطة. المحطات المختارة تمثل الأنهر المتفرعة من شط العرب والتي تستخدم كقنوات ري تخترق المدينة في السنوات السابقة , اما حاليا فأصبحت تستخدم كقنوات تصريف لمخلفات المنازل والمياة الثقيلة والمشاريع الصناعية المنشأه عليها (حسن,2007) . تتوزع المحطات الدراسية المختارة على النحو الأتي :-

FOR AUTHOR USE ONLY

الجدول (2-4) مواقع جمع العينات

ت	النهر	موقع المحطة	المسافة(km) بين المواقع	احداثيات المواقع
-1	نهر الرباط	المصب (التميمية)	1.27	30°31'43.32"N 47°49'45.77"E
		المنتصف (قرب النادي الأثوري)		30°31'23.00"N 47°49'4.00"E
-2	نهر الخندق	المصب (السد المقام على نهر الخندق)	1.85	30°31'41.28"N 47°50'2.78"E
		المنتصف (الجسر الأحمر)		30°30'50.45"N 47°49'31.71"E
-3	نهر العشار	المصب (السد المقام على نهر العشار)	1.82	30°31'18.44"N 47°50'16.62"E
		المنتصف (قرب المحافظة)		30°30'30.75"N 47°49'38.34"E
-4	نهر الخورة	المصب (قرب مستشفى التعليمي)	1.17	30°30'32.95"N 47°51'0.83"E
		المنتصف (قرب ساحة الطيران)		30°30'9.87"N 47°50'27.78"E
-5	نهر السراجي	المصب (قرب القصور الرئاسية)	0.76	30°29'28.17"N 47°51'27.73"E
		المنتصف (جسر السراجي)		30°29'7.55"N 47°51'16.15"E
-6	نهر ابو الخصيب	المصب (الساحل)	2.82	30°27'38.00"N 48° 0'9.00"E
		المنتصف (جسر القنطرة)		30°26'28.00"N 47°59'15.00"E

FOR AUTHOR USE ONLY



FOR AUTHOR USE ONLY

شكل(2-1) خارطة توضح محطات جمع العينات

جمعت عينات المياه بواسطة جهاز جمع العينات Water Sampler على عمق 20 سم (1999) APHA ، في قناني زجاجية معقمة سعة 500 مل محكمة الأغلاق ووضعت في صناديق تحتوي على الثلج لحين الوصول للمختبر لأجراء التحاليل الخاصة بعزل البكتريا.

استخدمت قناني مصنوعة من البولي الأثيلين سعة 1لتر لجمع العينات الخاصة بالعناصر الثقيلة ,غلقت القناني بشكل محكم بعد غسل القناني بماء العينة ثلاث مرات قبل ملئها وسجلت المعلومات اللازمة على كل قنينة وتم تثبيت كل عينة بأضافة 2 مل من حامض النتريك وحفظت بدرجة حرارية 4 درجة سيليزية (Bartram and Balance,1996), استخدمت قناني ونكلر لجمع العينات لقياس الأوكسجين المذاب بالماء .

2-2-2- القياسات الفيزيائية و الكيميائية Physical and Chemical Analysis

1- درجة الحرارة Temperature

قيست درجة الحرارة للماء مباشرة في محطات الدراسة بواسطة جهاز قياس التوصيلية .

2- التوصيلية الكهربائية Electrical Conductivity

قيست التوصيلية الكهربائية للمياه حقلياً في محطات الدراسة باستخدام جهاز قياس التوصيلية الكهربائية .

3- الدالة الحامضية pH

قيست الدالة الحامضية بشكل مباشر في موقع الدراسة باستخدام جهاز حقلي لقياس الدالة الحامضية .

4- الأوكسجين المذاب Dissolved Oxygen

أتبعت طريقة تحوير الأزايد (Azide modification) لطريقة ونكلر لقياس الأوكسجين المذاب في الماء ، فقد تم تثبيت الأوكسجين المذاب بأضافة 2 مل من محلول كبريتات المنغنيز المائية و2 مل من محلول الأيوديد الأزايدي القاعدي الى قناني ونكلر المحتوية على عينات المياه ورجت القناني جيداً ، ثم أضيف 2 مل من حامض الكبريتيك المركز ، بعدها تم تسحيح حجم معين من العينة مع محلول ثايوسلفات الصوديوم المائية بتركيز (0.0125) عياري ، وأستخدم النشأ كدليل ثم عبر عن النتائج بوحدات ملغم / لتر (Bartram and Ballance, 1996) .

FOR AUTHOR USE ONLY

2-2-3-استخلاص العناصر الثقيلة من المياه Heavy metals extraction from water

أخذ 100 مل من العينة المثبتة (1.2.2) في دورق زجاجي وأضيف له 5 مل من حامض النتريك المركز، غطيت العينة بواسطة زجاجة ساعة وذلك للتقليل من التلوث . سخنت العينة على صفيحة ساخنة بدرجة حرارة 80 درجة سيليزية لاقل حجم ممكن (بحدود 10أو 20 مل) وقبل حدوث الترسيب تم الاستمرار بعملية التسخين واضافة حامض النتريك المركز كلما دعت الضرورة الى ذلك حتى تتم عملية الهضم و تكون محلول رائق ذو لون ابيض. غسل الدورق الزجاجي وزجاجة الساعة بماء مقطر خالي من الايونات وتم ترشيح المحلول. نقل المحلول المرشح الى دورق حجمي زجاجي قياس 50 مل وكمل بالماء المقطر الخالي من الأيونات ثم نقل الى عبوات خاصة مصنوعة من البولي اثيلين وبذلك تكون العينة جاهزة للقياس في جهاز الأمتصاص الذري اللهبي (F.A.A.S) وعبر عن الناتج بوحدة ملغرام/لتر (APHA,1999) .

سجات الأمتصاصية للعناصرالثقيلة واستخرج التركيز من منحنى المعايرة ثم حسبت تراكيز العناصر الثقيلة حسب المعادلة التالية (APHA,1999) .

$$E._{conc.} = (A*B)/C$$

اذ ان:-

$E._{conc.}$: تركيز العنصر الذائب في الماء (ملغرام/لتر) .

A : تركيز العنصر المستخرج من منحنى المعايرة (ملغرام/لتر).

B: الحجم النهائي للعينة (مليلتر).

C: الحجم الأبتدائي للعينة (مليلتر).

FOR AUTHOR USE ONLY

2-2-4- عزل البكتريا من عينات المياه Isolation of bacteria from water

عزلت البكتريا من العينات المائية بطريقتين :-

1- طريقة التخفيف: تم نقل 1 مل من كل عينة بواسطة ماصة زجاجية معقمة الى أنبوب أختبار يحتوي 9 مل ماء مقطر معقم لغرض الحصول على تخافيف عشرية (10^{-1},10^{-2},10^{-3},10^{-4}) ,ومن ثم رشحت العينات باستخدام اوراق ترشيح قطرها 0.45 مايكرون Milipore filter paper وزرعت على وسط Nutrient agar, و حضنت بدرجة حرارة 37 درجة سيليزية لمدة 24 ساعة .

2- طريقة النشر: يؤخذ 0.1 مل من كل عينة وتنشر باستعمال ناشر معقم على وسط Nutrient agar, وحضنت بدرجة حرارة 37 درجة سيليزية لمدة 24 ساعة.

2-2-5 - فحص العزلات وتشخيصها

2-2-5-1 - الفحص الأولي Identification of bacteria

أجري الفحص الأولي للأطباق المزروعة للتعرف على الصفات المظهرية العامة للمستعمرات, بعد ذلك نقلت المستعمرات المميزة والواضحة بطريقة التخطيط لغرض التنقية الى وسط Nutrient agar , حضنت الأطباق

المحتوية على العزلات المنقاه بدرجة حرارة 37 درجة سيليزية لمدة 24 ساعة . بعد فترة الحضن أجريت عملية التصبيغ باستخدام صبغة Gram stain (Prescott and Harley,1996) .

2-2-5-2 -الأختبارات التشخيصية الكيموحيوية Biochemical Identification Tests

1- أختبار الكاتليز Catalase Test

نقل جزء من المزارع البكتيرية النامية لمدة 24 ساعة على وسط Nutrient agar الى شريحة زجاجية نظيفة بواسطة عصا خشبية ,اضيف اليه قطرة من محلول بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 بتركيز 3 %, خروج فقاعات دليل على ان نتيجة الاختبار تكون موجبة واستخدم للكشف عن البكتريا المنتجة لأنزيم الكاتليز (Prescott and Harley,1996).

2- أختبار الأوكسيديز Oxidase Test

وضع قطرات من كاشف oxidase reagent على ورقة ترشيح ثم يُنقل جزء من المزارع البكتيرية النامية لمدة 24 ساعة بواسطة عصا خشبية , ظهور اللون الأزرق - البنفسجي بعد (10-15) ثانية تعد نتيجة موجبة وهذا يدل على أن البكتريا قادرة على انتاج انزيم الأوكسيديز (Benson , 2002) .

3- أختبار تخمر المانيتول Mannitol Fermentation Test

لقحت البكتريا على وسط Mannitol agar وحضنت بدرجة حرارة 30 درجة سيليزية ولمدة 24 ساعة, ظهور هالة صفراء تعد نتيجة موجبة ويستخدم هذا الكشف للتمييز بين *Staphylococcus aureus* والأنواع الأخرى من البكتريا (Prescott and Harley, 1996) .

4- اختبار تخمر الكلوكوز Glucose Fermentation Test

لقحت البكتريا النامية لمدة 24 ساعة على وسط O/F Basal medium وحضنت بدرجة حرارة 35 درجة سيليزية لمدة 7 ايام, تحول لون الوسط من اللون الأخضر الى الأصفر تعد نتيجة موجبة ،استخدم للكشف عن البكتريا القادرة على استهلاك الكلوكوز (Forbes *et al*., 2007).

5- أختبار استهلاك السترات Citrate utilisation Test

حضرت انابيب تحتوي على 10 مل من وسط Simmon citrate agar بشكل مائل ولقحت بمزارع بكتيرية نامية لمدة 24 ساعة وحضنت بدرجة حرارية 37 درجة سيليزية ولمدة 7 ايام, تحول لون الوسط من اللون الأخضر

FOR AUTHOR USE ONLY

الى الأزرق يشير الى ان النتيجة موجبة ,يستخدم هذا الاختبار للكشف عن البكتيريا القادرة على استهلاك السترات كمصدر وحيد للكاربون (Forbes *et al*.,2007).

6- أختبار اختزال النترات Nitrate Reducation Test

لقحت انابيب أختبار وسط النترات بالعزلات البكتيرية وحضنت في37 درجة سيليزية لمدة (24 -48) ساعة , بعد فترة الحضانة يؤخذ1 مل من المزرعة البكتيرية في أنبوبة اختبار ويضاف له1 مل من مزيج كاشف اختزال النترات , تعد النتيجة موجبة بتحول لون الوسط الاصفرالى اللون الاحمرنتيجة تحلل النترات الى نتريت (Prescott and Harley, 1996).

7- أختبار قابلية الحركة Motility test

لقحت الأنابيب بالمزارع البكتيرية النامية لمدة 24 ساعة بطريقة الطعن , حضنت الأنابيب الملقحة بدرجة حرارة 37درجة سيليزية ولمدة (24 – 48) ساعة , انتشار النمو حول خط منطقه الطعن تعد نتيجة موجبة (Prescott and Harley, 1996) .

FOR AUTHOR USE ONLY

8- أختبار تحلل النشأ Starch hydrolysis

لقح وسط Starch agar بالعزلات البكتيرية النامية لمدة 24 ساعة بطريقة النشر,حضنت بدرجة حرارة 37درجة سيليزية لمدة (24- 48) ساعة , بعد فترة الحضن تضاف عدة قطرات من محلول اليود في كل طبق لعدة دقائق,ظهور مناطق زرقاء دليل على ان النشأ غير متحلل اما وجود مناطق تحلل عديمة اللون حول النمو البكتيري تعد نتيجة موجبة (Prescott and Harley, 1996) .

9- أختبار Voges Proskauer (VP)

لقحت الانابيب بالنمو البكتيري النامية,حضنت عند درجة حرارة 37 درجة سيليزية لمدة 48 ساعة ، تم اضافة كاشف باريت Barritt Reagent,أذ اضيف 0.5 مل من محلول A و 0.5 مل من محلول B ، تلون الوسط باللون الأحمر بعد مرور 15 دقيقة تعد نتيجة موجبة ،للكشف عن البكتريا المخمرة لسكر الكلوكوز وتكوين مادة Acetoin(Prescott and Harley, 1996).

10- أختبار النمو في 6.5 % من كلوريد الصوديوم

لقحت الأطباق بالمزرعة البكتيرية النامية لمدة 24 ساعة على وسط Brain – Heart infusion agar , اضيف 6.5 غم من كلوريد الصوديوم لكل 100 مل من الوسط, حضنت الأطباق عند درجة حرارة 35 درجة سيليزية لمدة 24 ساعة , ظهور المستعمرات على الوسط تعد نتيجة موجبة (Holt *et al*.,1994) .

11- أختبار النمو عند 55 س^0

لقحت الأطباق بالنمو البكتيري النامي لمدة 24 ساعة على وسط Nutrient agar , حضنت الاطباق بدرجة حرارة 55 درجة سيليزية لمدة 24 ساعة, ظهورالمستعمرات على الوسط تعد نتيجة موجبة, استخدم هذا الاختبار للتفريق بين *Bacillus subtilis* و *Bacillus licheniformis* (Prescott and Harley, 1996)).

12 - اختبار إنتاج الاندول Indol Test

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط peptone water بالنمو البكتيري النامي لمدة 24 ساعة وحضنت عند درجة حرارة 35 درجة سيليزية لمدة 24 ساعة ،بعد ذلك أضيف 0.5 مل من كاشف كوفاك Kovac's reagent إلى الأنابيب، تكون حلقة حمراء اللون على سطح الوسط تعد نتيجة موجبة ،استخدم للكشف عن امتلاك البكتريا لإنزيم Tryptophynase (Prescott and Harley,1996).

13- اختبار تخمر اللاكتوز Lactose fermentation Test لقحت البكتريا النامية لمدة 24 ساعة على وسط O/F medium وحضنت بدرجة حرارة 35 درجة سيليزية لمدة 7 ايام, تحول لون الوسط من اللون الأخضر الى الأصفر تعد نتيجة موجبة ،استخدم للكشف عن البكتريا القادرة على استهلاك اللاكتوز (Forbes *et al*., 2007)

14- اختبار تخمر المانوز Mannose fermentation test

لقحت انابيب اختبار حاوية على وسط Phenol red mannose broth بالنمو البكتيري النامي لمدة 24 ساعة وحضنت في 37 درجة سيليزية لمدة 24 ساعة،تغير لون الوسط الى الاصفر يعد نتيجة موجبة للكشف عن البكتريا القادرة على استهلاك المانوز(Prescott and Harley, 1996) .

FOR AUTHOR USE ONLY

6-2-2 - حفظ العزلات Preservation

حضنت البكتيريا على وسط Nutrient agar بدرجة حرارة 37 درجة سيليزية ولمدة 24 ساعة ثم جفدت بأستخدام جهاز التجفيد , وحفظت بدرجة حرارة 20 درجة سيليزية وذلك لغرض استعمالها لاحقاً (Kocur *et al*.,2006)

7-2-2 - تحضير محاليل العناصر الثقيلة Preparation of stock solutions from heavy metals

حضرالمحلول القياسي Stock solution بتركيز1000ملغرام/لتر لأيونات العناصرCd^{+2},Ni^{+2},Cu^{+2} وتركيز(1000, 2000, 3000) ملغم/لتر لأيونPb^{+2} وذلك بأذابة أوزان محددة من املاح العناصر $Cu(NO_3)_2.3H_2O,Ni(NO_3)_2.6H_2O,Cd(NO_3)_2.4H_2O,Pb(NO_3)_2$ في ماء مقطر خالي من الأيونات وحضرت التراكيز المطلوبه باجراء التخفيف اللازم (APHA,1999) عقمت المحاليل المحتوية على ايونات العناصر الثقيلة بجهاز المؤصدة عند درجة حرارة 121س^0 ولمدة 15 باوند/انج ^{2} دقيقة , اضيف محلول ايونات العناصر الى الوسط الزرعي المعقم للحصول على التركيز المطلوب (Raja *et al*. , 2009).

8-2-2 - تجربة مقاومة البكتريا للعناصر الثقيلة bacteria of Resistance

heavy metals قيست مقاومة البكتريا للعناصر الثقيلة بطريقة method Agar diffusion ، نميت البكتريا على وسط Luria-Bertani agar (LB agar) الحاوي على تراكيز مختلفة من العناصر الثقيلة اعتماداً على النوع البكتيري ابتداءً من 1 ملغرام/لتر الى التركيز الذي تفشل في البكتريا بتكوين مستعمرات على الوسط,حضرت ثلاث مكررات لكل تركيز وحضنت بدرجة حرارة 37س^0 ولمدة (24, 48, 72) ساعة ، و تحديد التركيز المثبط الادنى MIC (Minimum Inhibition Concentration) هو اقل تركيز تكون فيه البكتريا غير قادرة على النمو (Rajbanshi, 2008; AL-Hejuje,2012).

FOR AUTHOR USE ONLY

9-2-2 - تجربة المعالجة الحيوية بواسطة البكتريا Bioremediation by bacteria

اجريت تجارب المعالجة الحيوية وقياس كمية الأزالة للعناصر الثقيلة بواسطة الخلايا الحية للعزلات البكتيرية (تم زرع البكتريا على وسط Nutrient broth لمدة 24 ساعة ثم فصلت الخلايا بواسطة الطرد المركزي 6000 دورة / دقيقة لمدة 15 دقيقة وغسلها ثلاث مرات في ماء مقطر خالي من الايونات),حضر وسط Nutrient broth (pH 7)الحاوي على تراكيز مختلفة من العناصر الثقيلة Pb^{+2},Cu^{+2},Ni^{+2},Cd^{+2} (100,50,25 ملغم/لتر) بشكل مفرد وبأستخدام الماء المقطر الخالي من الأيونات ,أخذ 50 مل من الوسط المحضر الحاوي على التراكيز المختلفة من العناصر الثقيلة الى دورق زجاجي سعة 250 مليلتر وأضيف 50 ملغرام من الخلايا الحية Biomass لكل دورق بنسبة 1:1 وحضنت الدوارق في حاضنة هزازة عند سرعة 120 دورة / دقيقة وبدرجة حرارة 30س^0 ولمدة (24 ،48, 72) ساعة

.(Tsuruta, 2005 ; Ray *et al*., 2005 ; Stefanescu *et al*., 2011)

يؤخذ 10مل في كل يوم من التراكيز المختلفة لكل عنصر ولكل نوع بكتيري وتطرد مركزياً عند سرعة 6000 دورة / دقيقة لمدة 15 دقيقة لفصل الراشح ومن ثم قياس تراكيز ايونات العناصر الثقيلة في الراشح باستخدام جهاز الأمتصاص الذري اللهبي (Philip *et al*. , 2000).

تحسب نسبة العناصر الثقيلة المزالة بأستخدام المعادلة التالية (Qin *et al*., 2006):-

$$R\% = ((C_0 - C_1)/C_0)*100$$

FOR AUTHOR USE ONLY

حيث ان :-

R= النسبة المؤية للأزالة %

C_0= تركيز ايونات العناصر الثقيلة في المحلول الأبتدائي (ملغرام/لتر) .

C_1= تركيز ايونات العناصر الثقيلة في المحلول النهائي (ملغرام/لتر) . كل تجارب المعالجة الحيوية تم استخدام عينة سيطرة لا تضاف اليها البكتريا وقيست الأمتصاصية لها بجهاز الأمتصاص الذري اللهبي .

10-2-2- التحليل الأحصائي Statistical analysis

حللت النتائج احصائياً باستخدام برنامج SPSS (Version 9) التحليل الاحصائي لنتائج هذه الدراسة تحت مستوى معنوية 0.05 واختبار اقل فرق معنوي LSD و برنامج Microsoft Excel 2010 اذ اجريت من خلاله الرسومات البيانية للتعرف على مدى التباين الحاصل في قابلية الأنواع البكتيرية على أزالة العناصر الثقيلة .

3- النتائـــــــج Results

3-1- الصفات الفيزيائية والكيميائية للمياه والعناصر الثقيلة الذائبة في الماء

بينت نتائج الصفات الفيزيائية والكيميائية للمياه التي جمعت من مواقع الدراسة والمتمثلة في الأنهر المتفرعة من شط العرب والداخلة الى محافظة البصرة (ابوالخصيب والخورة والسراجي والعشاروالرباط والخندق) خلال شهري تشرين الثاني و كانون الأول لسنة 2013 , بلغت قيم الدالة الحامضية المسجلة أعلى قيمة 8.24 في نهر ابوالخصيب وأدنى قيمة 7.58 في نهر العشار كما موضح في (جدول 3-1) وكانت هنالك فروق معنوية لجميع محطات الدراسة عند مستوى معنوي $P < 0.05$ (ملحق 1).

سجلت التوصيلية الكهربائية (EC) الموضحة قيمها في(جدول 3-1) ,أن اعلى قيمة لها 10.06 ملي سيمنز /سم في الخورة وأدنى قيمة لها 4.59 ملي سيمنز /سم في السراجي , أظهرت نتائج التحليل الأحصائي بأنه لاتوجد فروق معنوية عند مستوى معنوية $P < 0.05$ لجميع محطات الدراسة (ملحق 1).

بينما سجلت درجة الحرارة اعلى قيمة 19 درجة سيليزية في نهر الرباط وادنى قيمة 13.4 درجة سيليزية في نهر ابو الخصيب , اظهرت نتائج التحليل الأحصائي وجود فروق معنوية عند $P<0.05$ لكافة مواقع الدراسة (ملحق 1) .

قيست كمية الأوكسجين المذاب (D.O) فكانت اعلى قيمة مسجلة في السراجي (4.4 ملغرام/لتر) وادنى قيمة له (0.028 ملغرام/لتر) في العشار ,أظهرت نتائج التحليل الأحصائي وجود فروق معنوية لجميع مواقع الدراسة (ملحق 1) .

3-2- أستخلاص العناصر الثقيلة في المياه

بينت نتائج الدراسة الحالية أن تراكيز العناصر الثقيلة الذائبة في الماء اعلى من الحدود المسموح بها عالميا ومحلياً (جدول 3-2).ُسجل اعلى تركيز للنيكل في نهر ابو الخصيب حيث بلغ 0.089 ملغرام/لتر بينما كان ادنى تركيز في نهر الخندق حيث بلغ 0.046 ملغرام/لتر وكان ضمن الحدود المسموح بها المحلية واعلى من العالمية (جدول 3-3).

ُسجل اعلى تركيز للنحاس في نهر الخندق حيث بلغ 0.32 ملغرام/لتر بينما كان أدنى تركيز في نهر السراجي حيث بلغ 0.02 ملغرام/لتر وكان ضمن الحدود المسموح بها عالمياً واعلى من المحددات المحلية (جدول 3-3) .

FOR AUTHOR USE ONLY

سُجل اعلى تركيز للرصاص في نهر ابو الخصيب وادنى تركيز له في نهر الخندق (0.439- 0.219) ملغرام/لترعلى التوالي, اظهرت النتائج ان اعلى تركيز للكادميوم في نهر ابو الخصيب بلغ 0.047 ملغرام/لتر وادنى قيمة له في نهر الخندق حيث بلغ 0.009 ملغرام/لتر، ولا توجد هناك فروق معنوية لجميع مناطق الدراسة (جدول 3-3) ، (ملحق 1) .

أظهرت نتائج التحليل الأحصائي وجود علاقة ارتباط غير معنوية بين الصفات الفيزيائية والكيميائية وتراكيز العناصر الثقيلة الذائبة في الماء ما عدا النيكل والرصاص فكانت هناك علاقة ارتباط معنوية سالبة مع درجة الحرارة (ملحق 1).

جدول (3-1): الصفات الفيزيائية والكيميائية للمياه

الموقع	pH	التوصيلية الكهربائية ملي سيمنز /سم	درجة الحراة س^0	D.O(ملغرام/لتر)
ابو الخصيب	8.24	5.73	13.40	4.25
السراجي	8.20	4.59	14.85	4.40
الخورة	7.73	10.06	15.45	0.051
العشار	7.58	5.50	17.90	0.028
الرباط	7.64	5.23	19.00	0.036
الخندق	7.68	4.91	17.85	0.035
المعدل	7.84	6.00	16.40	1.46
LSD=P 0.05	0.472	N.S	2.050	4.198

*المحددات العراقية لنظام صيانة الأنهار 1967 pH = 6.5-8.5، التوصيلية الكهربائية = 3.14-3.6، D.O = >5

FOR AUTHOR USE ONLY

جدول (3-2): تراكيز العناصر الثقيلة الذائبة في المياه مقاسة بالملغرام/لتر

الموقع	المحطة	النيكل	النحاس	الرصاص	الكادميوم
ابو الخصيب	1	0.086	0.020	0.274	0.060
	2	0.093	0.032	0.604	0.033
	المعدل	0.089	0.026	0.439	0.047
السراجي	1	0.071	0.020	0.329	0.026
	2	0.064	0.020	0.439	0.040
	المعدل	0.068	0.020	0.384	0.033
الخورة	1	0.079	0.041	0.384	0.031
	2	0.071	0.020	0.274	0.036
	المعدل	0.075	0.030	0.329	0.034
العشار	1	0.064	0.094	0.384	0.023
	2	0.079	0.041	0.384	0.024
	المعدل	0.071	0.067	0.384	0.023
الرباط	1	0.050	0.032	0.219	0.019
	2	0.079	0.024	0.329	0.041
	المعدل	0.064	0.028	0.274	0.030
الخندق	1	0.050	0.024	0.164	0.017
	2	0.043	0.616	0.274	0.001
	المعدل	0.046	0.320	0.219	0.009
LSD=P 0.05		N.S	N.S	N.S	N.S
المعدل الكلي		0.069	0.082	0.338	0.029

FOR AUTHOR USE ONLY

***المحددات العراقية لنظام صيانة الأنهار من التلوث (1967) . (محمود ,2008) . 0.05 = Cu , 0.1 =Ni ,0.05=Pb ,0.005=Cd**

*** وكالة حماية البيئة الأمريكية U.S.EPA (1993) . 1=Cu , 0.05=Pb , 0.005 =Cd**

*** المحددات الدولية لمياه الشرب WHO (2004) . 0.02=Ni , 2= Cu , 0.01=Pb , 0.003=Cd**

3-3 - عزل وتشخيص البكتريا من عينات المياه

شخصت البكتريا المدروسة اعتماداًعلى الصفات المظهرية للمستعمرات النامية على وسط Nutrient agar وكذلك على الأختبارات الكيموحيوية. شخص اثنا عشر نوعاً من البكتريا وتم اختيار خمسة انواع من البكتريا المقاومة للتراكيز العالية من العناصر الثقيلة وهي :-

1-3-3 - *Micrococcus* spp.

عزلت المستعمرات الأفتراضية لجنس .*Micrococcus* spp النامية على وسط Nutrient agar حيث ظهرت المستعمرات بلون برتقالي فاتح شاحب ، شخص نوعين من البكتريا التابعة لهذا الجنس هما *M. halobius* و*M. kristinae* أعتماداً على الأختبارات الكيموحيوية والصفات المظهرية (جدول 3-3) ; Kocur *et al.*, (Holt *et al*.,1994 2006).

جدول (3-3) :الأختبارات الكيموحيوية للنوعين *M. halobius* و *M. kristinae*

Test	*M. halobius*	*M. kristinae*
Gram stain	+	+
Shape	**cocci**	**cocci**
Catalase	+	+
Oxidase	+	+
Motility	-	-
Acid from glucose	+	+
Mannitol	-	-
Lactose	+	-
Mannose	-	+
Nitrate reduction	-	-
Citrate utilization	-	-
VP(vogas proskauer)	-	+

Negative (-) Poistive (+)*

FOR AUTHOR USE ONLY

Bacillus spp. - 2-3-3

عزلت المستعمرات الأفتراضية لجنس *Bacillus* spp. النامية على الوسط Nutrient agar حيث كانت المستعمرات بلون ابيض كريمي وكبيرة ودائرية وملساء وذات شكل محدب. وبالأعتماد على الأختبارات الكيموحيوية الموضحة في الجدول (3-4), عزلت الأنواع*B. megaterium* و *B. badius* و *licheniformis B.* لغرض أعتمادها في الدراسة إذ كانت موجبة لصبغة كرام وعصوية الشكل ووجدت مفردة او على شكل سلاسل وشخصت بالأعتماد على (Claus and Berkeley,1986 ; Slepecky and Hemphill,2006).

جدول (3-4) :الأختبارات الكيموحيوية لبكتريا *Bacillus* spp.

Test	*B. megaterium*	*B. licheniformis*	*B. badius*
Gram stain	+	+	+
Shape	**Rod**	**Rod**	**Rod**
Endospore	**Central**	**Central**	**Terminal**
Motility	+	+	+
Indol	-	-	-
Catalase	+	+	+
Starch hydrolysis	+	+	-
(VP) Vogas Proskauer	-	+	-
Acid from glucose	+	+	-
Mannitol fermentation	+	+	-
Citrate utilization	+	+	-
Nitrate reduction	-	+	-
Growth on 6.5%NaCl	-	+	-
Growth on 55 ºC	+	+	-
		Negative (-)	**Poistive (+)***

FOR AUTHOR USE ONLY

4-3-مقاومةالبكتريا للعناصرالثقيلة (Pb^{+2},Cd^{+2},Cu^{+2},Ni^{+2})

تم تحديد التركيز المثبط الادنى MIC (Minimum Inhibition Concentration) هو اقل تركيز تكون فيه البكتريا غير قادرة على النمو وعمل ثلاث مكررات لكل تركيز من العناصر الثقيلة المختبرة ابتداءً من 1 ملغرام/لتر ولكل نوع من الانواع البكتيرية المختبرة.

1- *Micrococcus halobius*

أظهر هذا النوع من البكتريا مقاومة متباينة لأيونات العناصر الثقيلة , إذ كانت له القدرة على النمو بتراكيز عالية من النحاس والكادميوم (1-5-10-25-50-100-200-300-400) ملغرام/لتر, و عند التراكيز (100-200-1-5-10-25-50 ملغرام/لتر بالنسبة للنيكل (جدول3-5). اما بالنسبة لأيونات الرصاص فأستطاعت البكتريا من النمو في تراكيز عالية جداً بلغت(1-5-10-25-50-100-200-300-400-500- 1800-2000-2600) 1000-1200-1400-1600 ملغرام/لتر(جدول 3-6).

2- *Micrococcus kristinae*

أظهرت النتائج قابلية البكتريا على النمو في تراكيز (1-5-10-25-50-100-200-300) ملغرام/لتر من ايونات النيكل والكادميوم, وتراكيز(1-5-10-25-50-100-200-300-400) ملغرام/لتر بالنسبة للنحاس (جدول 3-5) . بينما كانت لها القدرة على النمو بتراكيز عالية من ايونات الرصاص بلغت (1-5-10-25-50-100-200 -300-400-500-1000-1200-1400-1600-1800-2000-2200)ملغرام/لتر (جدول 3-6).

3- *Bacillus megaterium*

قيست قابلية هذا النوع على النمو بتراكيز العناصر الثقيلة قيد الدراسة إذ كانت له القدرة على النمو بتركيز (100- 1-5-10-25-50 ملغرام /لترعلى الاوساط الحاوية على أيونات النحاس والكادميوم , وعند التراكيز (10-25-50-100-505-1) ملغرام /لتر للنيكل في حين كانت له القدرة على النمو بتراكيز عالية من ايونات الرصاص بلغت (1 -5-10-25-50-100-200-300-400-500-1000-1200-1400-1600-1800)ملغرام /لتر(جدول 3-5 ، 3-6).

FOR AUTHOR USE ONLY

Bacillus badius -4

أظهرت النتائج قابلية هذا النوع على النمو بتراكيز(1-5-10-25-50-100-200-300) ملغرام /لتر لأيونات النحاس والكادميوم, و بتراكيز (1-5-10-25-50-100-200) ملغرام /لتر لأيونات النيكل كما موضح في الجدول (3-5), بينما كانت له القدرة على النمو بتراكيز عالية من ايونات الرصاص بلغت (1-5-10-25- 50-100-200 -300-400-500-1000-1200-1400-1600-1800-2000-2200)ملغرام /لتر (جدول 3-6).

Bacillus licheniformis -5

أظهر هذا النوع مقاومة عالية إذ استطاع النمو بتراكيز عالية من ايونات النيكل والكادميوم بلغت (1-5-10-25-50-100-200-300) ملغرام / لتر, أما أيونات النحاس كانت له القدرة على النمو بتراكيز (1-5-10-25-50-100-200-300-400-500) ملغرام /لتر، أما بالنسبة لأيونات الرصاص بتركيز (1-5-10-25-50-100-200--30-400-500-1000-1200-1400-1600-1800-2000-2200 - 2400-2600) ملغرام /لتر (جدول3-5، 3-6).

FOR AUTHOR USE ONLY

جدول (5-3) مقاومة البكتريا لايونات العناصر الثقيلة (ملغرام/لتر)

العناصر / البكتريا	النحاس ملغم/لتر											التيكل ملغم/لتر										الكادميوم ملغم/لتر									
	1	5	10	25	50	100	200	300	400	500	550	1	5	10	25	50	100	200	300	400	1	5	10	25	50	100	200	300	400	500
M. halobius	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M. kristinae	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
B. megaterium	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
B. badius	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
B. Licheniformis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

FOR AUTHOR USE ONLY

جدول (3-6) مقاومة البكتريا لايونات الرصاص (ملغرام/لتر)

البكتريا	25-1 ملغم/لتر	1000-5 ملغم/لتر	1200 ملغم/لتر	1400 ملغم/لتر	1600 ملغم/لتر	1800 ملغم/لتر	2000 ملغم/لتر	2200 ملغم/لتر	2400 ملغم/لتر	2600 ملغم/لتر	2800 ملغم/لتر
M. halobius	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M. kristinae	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
B. megaterium	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
B. badius	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
B. licheniformis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

* + growth , - no growth

5-3 - تباين انواع البكتريا في ازالة العناصر الثقيلة (Pb^{+2} ,Cd^{+2},Cu^{+2} ,Ni^{+2})

أظهرت نتائج التحليل الأحصائي (شكل 3-1 ،ملحق 2) اختلافاً في قدرة الأنواع البكتيرية المستخدمة بالدراسة لأزالة العناصر الثقيلة في الأوساط الزرعية المحضرة المختبرية(جدول 3-7 , 3-8) كما يلي :-

FOR AUTHOR USE ONLY

1- الكادميوم

أظهرت النتائج ان بكتريا *M. halobius* لها قدرة عالية على ازالة الكادميوم اذ كانت بمعدل 25.42% ملغرام /لتر ,بينما كان معدل الازالة لبكتريا *B. licheniformis* 24.27 %ملغرام/لتر,ولم يظهر التحليل الاحصائي عند مستوى P< 0.05 اختلافاً معنوياً بين هذين النوعين. وكان معدل الازالة لبكتريا *M. kristinae* و *B. megaterium* و *B. badius* هو (17.75 % ،18.81 % و 20.79%) ملغرام/لتر على التوالي ولم يوجد فروق معنوية بينها في حين وجد فرقاً معنوياً بين بكتريا *M. kristinae* و *B. megaterium* من جهة وبكتريا *M .halobius* و *B. licheniformis* من جهة اخرى .أذ كانت قيمة LSD=6.524 والانحراف المعياري ±std = 2.985عند مستوى معنوية 0.05.

2- الرصاص

بينت النتائج الأحصائية ان بكتريا *B. megaterium* امتلكت اعلى معدل أزالة للرصاص حيث بلغت 23.43 %ملغرام /لتر و لم تظهر اختلافاً معنوياً P<0.05 عن بكتريا *B. badius* و *M. halobius M. kristinae* ,

اما بكتريا *B. licheniformis* فأظهرت ادنى ازالة لأيونات الرصاص اذ بلغت 15.18 % ملغرام /لتر والتي اختلفت معنوياً عن باقي انواع البكتريا . أذ كانت قيمة LSD=2.685 والانحراف المعياري ±std =1.277عند مستوى معنوية 0.05.

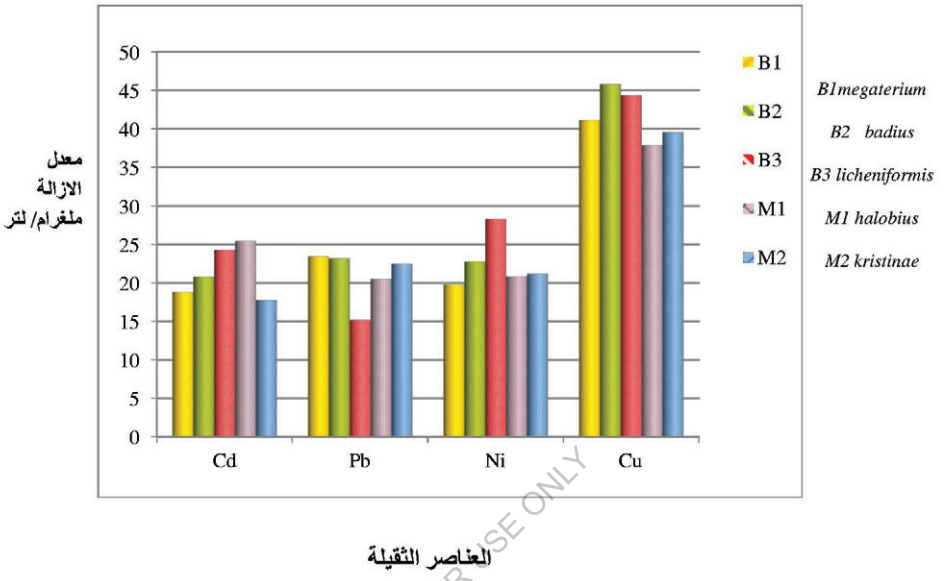
3- **النيكل**

بينت النتائج وجود فروقاً معنوية P<0.05 بين انواع البكتريا المختبرة على ازالة ايونات النيكل واظهرت بكتريا *B. licheniformis* قدرة اكبر عن باقي انواع البكتريا الأخرى على ازالة ايونات النيكل وكانت بمعدل 28.30 ملغم /لتر وقد اختلفت معنوياً عن باقي انواع البكتريا , اما بكتريا *B. megaterium* فأظهرت ادنى ازالة لأيونات النيكل إذ بلغت 19.79 %ملغرام /لتر . أذ كانت قيمة LSD=5.553 والانحراف المعياري ±std = 2.220عند مستوى معنوية 0.05.

4- **النحاس**

أوضحت النتائج ان بكتريا *B. badius* لها قدرة عالية على ازالة ايونات النحاس وكانت بمعدل 45.78% ملغرلم /لتر ولم تظهر اختلافاً معنوياً P<0.05 عن بكتريا *B. megaterium* و*B. licheniformis* بينما اظهرت اختلافاً معنوياً عن بكتريا *M. kristinae* و *M. halobius* , اما بكتريا *M. halobius* فأظهرت ادنى ازالة لأيونات النحاس بمعدل 37.86 %ملغرام /لتر وهي بذلك لم تختلف معنوياً عن بكتريا *M. kristinae* ولكنها اختلفت معنوياً عن بكتريا *B. megaterium* و*B. licheniformis* و *B. badius* . أذ كانت قيمة LSD= 4.670 والانحراف المعياري ±std =1.642عند مستوى معنوية 0.05.

FOR AUTHOR USE ONLY

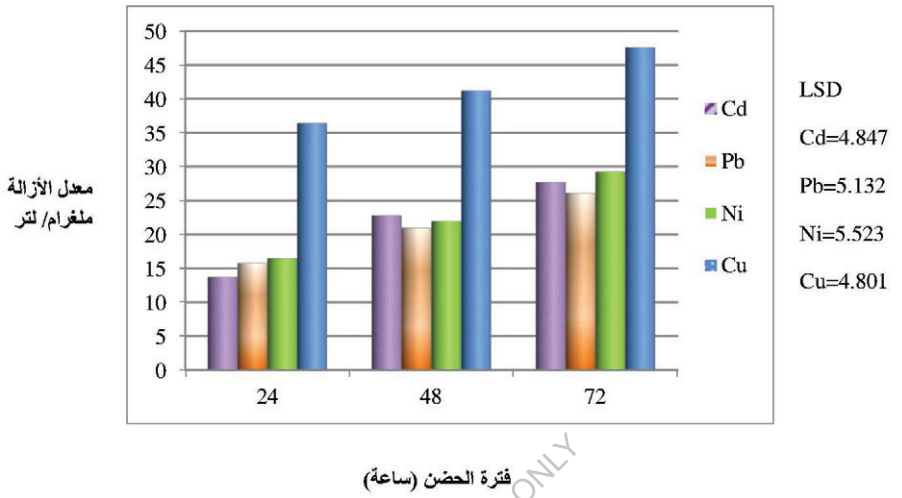


شكل(3 – 1) قابلية البكتريا على ازالة ايونات العناصر الثقيلة (Cu^{+2}, Ni^{+2}, Pb^{+2}, Cd^{+2})

FOR AUTHOR USE ONLY

6-3 - تأثير الفترة الزمنية للحضن على أزالة ايونات العناصر (Pb^{+2} ,Cd^{+2} ,Cu^{+2} ,Ni^{+2})

بينت النتائج (شكل 3-2) وجود فرقاً معنوياً $P<0.05$ عند حضن البكتريا في فترات مختلفة إذ كان حضن البكتريا لمدة 72 ساعة افضل من 48 ساعة و24 ساعة في ازالة جميع ايونات العناصر الثقيلة (ملحق 2).



شكل (3-2) تأثيرفترة الحضن على ازالة ايونات العناصر الثقيلة (Cu^{+2}, Ni^{+2}, Pb^{+2}, Cd^{+2})

FOR AUTHOR USE ONLY

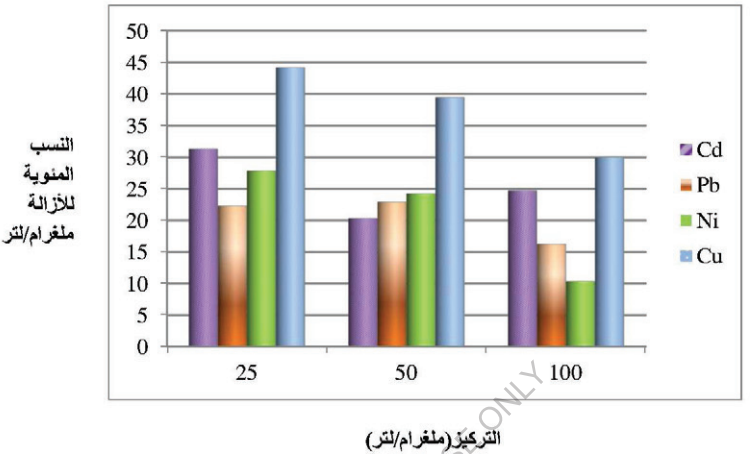
3-7 - النسب المئوية لازالة ايونات العناصر الثقيلة (Pb^{+2},Cd^{+2},Cu^{+2},Ni^{+2})

بينت النتائج انه كلما قل التركيز لايونات العناصر الثقيلة في الاوساط الزرعية المحضرة مختبريا كلما زادت النسبة المئوية لأزالة ايونات تلك العناصر , واظهرت النتائج الأحصائية ان اعلى ازالة للعناصر كانت في تركيز 25 ملغرام / لتر تليها 50 ملغرام / لتر وأقل ازالة عند تركيز 100 ملغرام / لتر وهنالك فروق معنوية بين التراكيز الثلاثة المستخدمة (100,50,25) ملغرام / لتر(ملحق 2) . كانت قيم الفرق المعنوي الاصغرLSD كالاتي Cd= 5.063، Pb= 2.553، Ni= 5.619، Cu=4.363.

1- بكتريا *M. halobius*

بينت النتائج ان تركيز 25 ملغرام / لتر لأيونات العناصر الثقيلة المختبرة هو التركيز المناسب , وقد بلغت نسبة الأزالة للعناصر الثقيلة Cd^{+2} , Ni^{+2} , Cu^{+2} 31.52% , 27.87% , 44.20% على التوالي , اما بالنسبة لأزالة

ايونات الرصاص فكان تركيز (25 , 50) ملغرام / لتر هو التركيز الأمثل للأزالة وكانت النسب المئوية 22.31% و 22.94% على التوالي (شكل3-3 ، جدول 3-7) .

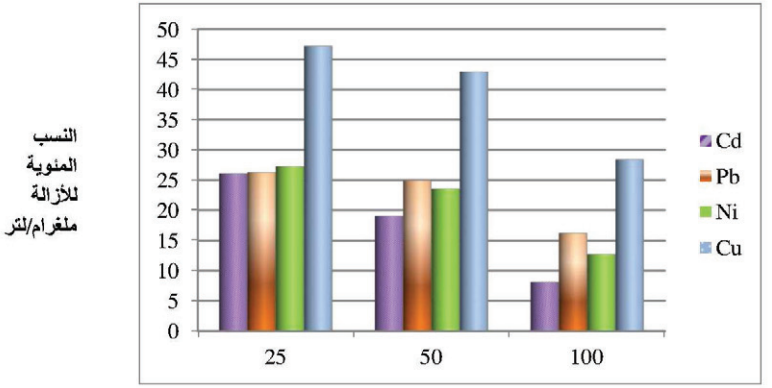


شكل (3-3): النسب المئوية لأزالة أيونات العناصربواسطة بكتريا *Micrococcus halobius*

FOR AUTHOR USE ONLY

2- بكتريا *M. kristinae*

أظهرت النتائج ان تركيز 25 ملغرام / لتر هو التركيز الأمثل لأزالة جميع ايونات العناصر الثقيلة Ni^{+2},Pb^{+2}, (Cu^{+2} ,Cd^{+2}) وقد بلغت معدلات النسب المئوية للأزالة بحدود 26.09% , 26.26% , 27.25% و 47.22% على التوالي (شكل 3-4،جدول 3-7).



شكل (3-4): النسب المئوية لأزالة أيونات العناصر بواسطة بكتريا *Micrococcus kristinae*

FOR AUTHOR USE ONLY

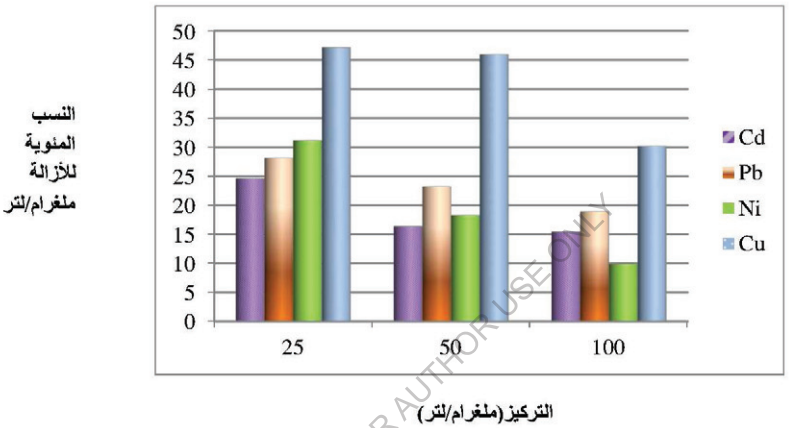
جدول (3-7) متوسط النسب المئوية لأزالة ايونات العناصر الثقيلة لأنواع الجنس *Micrococcus* spp.

M.halobius								
النحاس		النيكل		الرصاص		الكادميوم		C_o
R%	C_1	R%	C_1	R%	C_1	R%	C_1	
44.20	13.95	27.87	18.03	22.31	19.42	31.52	17.12	25
39.45	30. 28	24.27	37.87	22.94	38.53	20.35	39.83	50
29.95	70.05	10.36	89.64	16.26	83.74	24.73	75.27	100
37.86		20.83		20.50		25.42		معدل الأزالة
M.kristinae								
47.22	13.19	27.25	18.19	26.26	18.43	26.09	18.48	25
42.98	28.51	23.54	38.23	24.89	37.56	19.04	40.48	50
28.41	71.59	12.73	87.27	16.25	83.75	8.14	91.86	100
39.53		21.17		22.46		17.75		معدل الأزالة

* C_o تركيز الأولي C_1 تركيز النهائي R% النسبة المئوية للأزالة

3- بكتريا *B. megaterium*

بينت النتائج ان تركيز 25 ملغرام / لتر هو التركيز الأمثل لأزالة ايونات العناصر الثقيلة وقد بلغ معدل نسب الأزالة لأيونات العناصر (Cu^{+2} ,Ni^{+2},Pb^{+2} ,Cd^{+2}) بلغت 24.63% , 28.15% , 31.17% و 47.17% على التوالي (شكل 3-5 ،جدول 3-8).

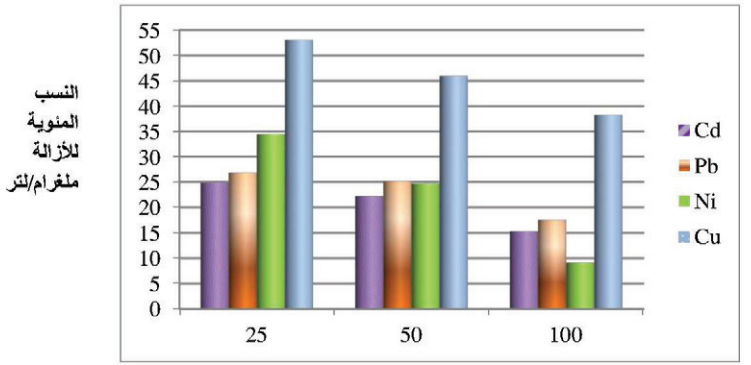


FOR AUTHOR USE ONLY

شكل (3-5) النسب المئوية لأزالة العناصر الثقيلة بواسطة بكتريا *Bacillus megaterium*

4- بكتريا *B. badius*

بينت النتائج ان تركيز 25 ملغرام / لتر هو التركيز الأمثل لأزالة ايونات العناصر الثقيلة وقد بلغ معدل نسب الأزالة لأيونات العناصر Cd^{+2} ,Ni^{+2},Pb^{+2} ,Cu^{+2} بحدود 24.84% ,26.86% , 34.47% و 53.1% على التوالي (شكل 3-6 ،جدول 3-8).

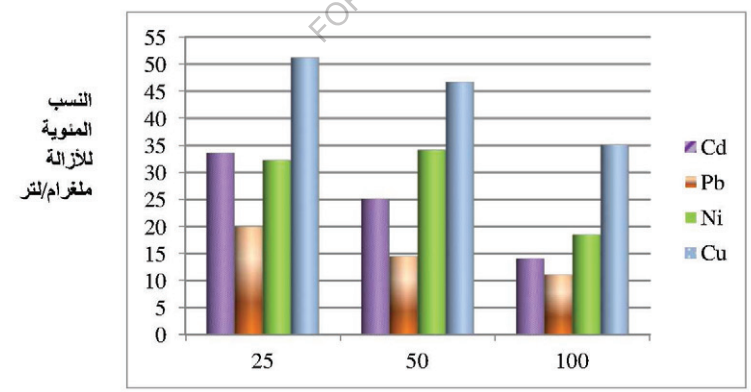


شكل (3-6): النسب المئوية لأزالة العناصر الثقيلة بواسطة بكتريا *Bacillus badius*

5- بكتريا *B.licheniformis*

FOR AUTHOR USE ONLY

أظهرت النتائج ان تركيز 25 ملغرام / لتر هو التركيز الأمثل لأزالة ايونات العناصر الثقيلة وقد بلغ معدل نسب الأزالة لأيونات العناصر Cd^{+2}, Pb^{+2}, Ni^{+2}, Cu^{+2} حوالي 33.6% , 19.95% , 32.27% و 51.18 % على التوالي (شكل3-7،جدول 3-8).



شكل (3-7) النسب المئوية لأزالة العناصر الثقيلة بواسطة بكتريا *Bacillus licheniformis*

جدول (3-8) متوسط النسب المئوية لأزالة ايونات العناصرالثقيلة لأنواع الجنس *Bacillus* spp.

C_o	الكادميوم		الرصاص		النيكل		النحاس	
	C_1	R%	C_1	R%	C_1	R%	C_1	R%
B.megaterium								
25	18.84	24.63	17.96	28.15	17.21	31.17	13.21	47.17
50	41.81	16.38	38.39	23.23	40.86	18.29	27.01	45.98
100	84.56	15.44	81.08	18.92	90.16	9.84	69.81	30.19
معدل الأزالة	18.81		23.43		19.79		41.11	
B.badius								
25	18.79	24.84	18.29	26.86	16.38	34.47	11.72	53.10
50	38.89	22.23	37.40	25.19	37.66	24.68	27.01	45.98
100	84.66	15.34	82.48	17.52	90.88	9.12	61.74	38.26
معدل الأزالة	20.79		23.19		22.75		45.78	
B.licheniformis								
25	16.60	33.60	20.01	19.95	16.93	32.27	12.21	51.18
50	37.43	25.15	42.74	14.52	32.92	34.16	26.65	46.70
100	85.92	14.08	88.91	11.09	81.50	18.50	64.89	35.11
معدل الأزالة	24.27		15.18		28.30		44.33	

C_o تركيز الأولي C_1 تركيز النهائي R% النسبة المئوية للأزالة

FOR AUTHOR USE ONLY

4- المناقشة

4 -1 - الصفات الفيزيائية والكيميائية لعينات المياه والعناصر الثقيلة

تتعرض الأنهار العراقية الى عمليات تلوث عديدة وبصورة متزايدة والتي أذا استمرت ستؤدي الى فقدان أحد أهم مصادر الثروة في البلد وهي مياه الأنهار العذبة .

تعد الأنهار المعتمدة في الدراسة الحالية والتي جمعت منها عينات المياه جزءاً من الأنهار العراقية ,وهي عبارة عن تفرعات من شط العرب أذ تأخذ مياهها منه الى داخل محافظة البصرة وتعاني هذه الأنهار من حركة مياه بطيئة وقد يعود السبب بذلك الى :-

1-عدم تنظيف الأنهر لسنين عديدة

2-استخدامها كمصبات لمياه المجاري

جمعت 12 عينة من المياه من ستة انهار متفرعة من شط العرب الى داخل مدينة البصرة بمعدل 2 عينة لكل من هذه الانهار (مصب الانهر والمنتصف). (جدول 3-2).

تعتبرالدالة الحامضية pH من أهم العوامل البيئية التي تؤثر على نمو الأحياء المجهرية في البيئة المائية ،حيث اظهرت النتائج (جدول 3-1) ان الدالة الحامضية كانت في الأتجاه القاعدي (7.58- 8.24) وهي ضمن الحدود المسموحه للمياه (6.5 -8.5) حسب المحددات العراقية لصيانة الأنهار من التلوث 1967 .

أن الانخفاض النسبي لقيم الدالة الحامضية في نهر العشار الى (7.58) قد يعزى الى ارتفاع محتواها من المادة العضوية والتي عند تحللها تطلق غاز ثنائي اوكسيد الكاربون الى البيئة المائية مما يعمل على خفض قيم الدالة الحامضية للمياه (Tietjen *et al* .,1999) , كانت هنالك فروق معنوية لجميع مواقع الدراسة مما يؤكد تأثير الظروف البيئية المائية من درجات الحرارة على عمليات التحلل البايولوجي والتفاعلات الكيميائية على مكونات المياه المعدنية والعضوية وهذه النتائج تتفق مع العديد من الباحثين الذين درسوا مياه شط العرب وروافده (الصباح ,2007 ; سلمان،2007 ; القاروني, 2011 ; الشمري , 2013) .اذ اكدت دراساتهم ان قيم الدالة الحامضية كانت ضمن المديات التالية (7.80- 8.06)،(7.8- 8.2)،(7.5- 8.56)،(8.06- 8.22) على التوالي.

كانت نتائج التوصيلية الكهربائية مرتفعة في جميع المحطات وهي اعلى من المحددات العراقية المسموحة 4.59 – 10.06 ملي سيمنز/سم (جدول 3 -1) وتعد التوصيلية الكهربائية مؤشراً للأملاح الذائبة في المياه Wetzel

FOR AUTHOR USE ONLY

(2001,) وتعتمد على التركيز الكلي للأملاح والصفات الكيميائية وحرارة المياه Ramachandra and) (2001 , Ahayla . قد يعزى سبب ارتفاع قيم التوصيلية الكهربائية الى الفضلات المنزلية ومياه الصرف الصحي التي تلقى الى الأنهار في محافظة البصرة والتي تحتوي على تراكيز عالية من الأملاح, ومن ثم تسبب زيادة في قيم التوصيلية (سلمان ,2007) .

تتفق هذه النتائج مع القاروني , (2011) في دراسته على شط العرب وقناة العشار اذ كانت قيم التوصيلية مرتفعة 22.1-69.4 ملي سيمنز/سم مبيناً سبب الارتفاع هو انخفاض مستوى المياه القادم من دجلة والفرات بشكل مستمر وزيادة تدفق المياه البحرية الى شط العرب , كما اظهرت النتائج عدم وجود فروق معنوية لجميع محطات الدراسة وهذا يؤكد شمول جميع مواقع الدراسة بنفس مصادر تلوث المياه الزراعية والصناعية والبشرية.

سجلت نتائج التوصيلية الكهربائية اعلى ارتفاع لها في نهر الخوره (جدول 3 -1) وقد يكون بسبب زيادة كمية الملوثات التي تطرح في هذه القنوات والمتمثلة بالفضلات المنزلية او الفضلات المطروحه من مستشفى التعليمي او حوض الأسالة (الصباح ,2007) .

اما درجة الحرارة فقد اظهرت النتائج تغاير في درجات الحرارة وكذلك وجود فروق معنوية بين جميع محطات الدراسة ,وقد يكون السبب في ذلك الى أختلاف وقت أخذ العينة وهذا جاء متفقاً مع القاروني (2011) و الشمري (2013) اللذين اكدا في دراستهما على التغاير في درجات الحرارة التي تتراوح (7-32) س^{0} (12.10- 33.50) س^{0} على التوالي وسبب الاختلاف في درجات الحرارة في المواقع المدروسة نتيجة طبيعة المناخ في العراق بصورة عامة.

FOR AUTHOR USE ONLY

للأوكسجين المذاب دور كبير في العمليات الأيضية لمختلف الأحياء المائية (Wetzel, 2001) , ويعد عامل محدد للكثير من الأحياء المائية (Smith, 2004) وكانت قيم الأوكسجين المذاب أقل من المحددات العراقية بكثير وخاصة انهار الخورة والرباط والخندق والعشار (جدول 3 -1) , وقد يعود السبب لذلك هو تأثرها بمياه المجاري كما أظهرت النتائج وجود فروق معنوية لجميع المحطات وهذه النتائج تتفق جزئياً مع القاروني (2011) حيث سجل اقل قيمة له في فصل الخريف وبلغت 2.9 ملغرام/لتر،وفصل الصيف 3.04 ملغرام/لتر مبيناً السبب يعود الى ضحالة المياه وكثرة المواد العضوية المتفسخة وتأثرها بمياه المجاري.

تتوزع العناصر الثقيلة في البيئة المائية بأشكال وحالات مختلفة , فقد تتواجد بشكل ذائب في الماء , او بشكل مدمص على سطوح العوالق او الرواسب , او ضمن التركيب الداخلي لها (APHA, 1999) , وتم تحليل عينات الماء المأخوذة من مواقع الدراسة لغرض تحديد تراكيز العناصر الثقيلة ومعرفة مدى تلوث المنطقة بها.

شملت الدراسة تقدير عناصر النحاس والنيكل والرصاص والكادميوم لأهميتها في العديد من الصناعات والأستخدامات الزراعية والمنزلية ولكونها تطرح الى البيئة المائية بشكل مباشر او غير مباشر . اظهرت النتائج (جدول 3-2) ان تركيز النيكل كانت ضمن الحدود المسموح بها محلياً واعلى من المحددات العالمية اما عنصر النحاس فسجل اعلى من الحدود المسموح بها محلياً واقل من العالمية وسجل عنصري الرصاص والكادميوم اعلى من المحددات المحلية والعالمية ، أن سبب ارتفاع تركيز عنصر النحاس لأستخدامات عنصر النحاس ومركباته في صناعة الأسلاك الكهربائية وانابيب المياه واوعية الطبخ وفي صناعة الرقائق الألكترونية وأيضاً يدخل كمضافات غذائية (WHO,1993) , اما عنصر الرصاص قد يعزى سبب ارتفاع تراكيزه نتيجة لأستخداماته البشرية العديدة مثل استخدامه في انتاج حوامض البطاريات والسولدر والسبائك وكذلك استخدامه بأنتاج الوقود (WHO,1993) .

تحتوي مياه الصرف الصحي على تراكيز عالية من العناصر الثقيلة مثل الرصاص والنحاس والخارصين والكروم (Ryu *et al*., 2003). حيث تطرح مياه الصرف الصحي الى الانهار الصغيرة في مدينة البصرة وبدون معالجة, سجل تركيز عنصر الكادميوم ارتفاعاً وقد يعود السبب الى استخدامات ذلك العنصر في العديد من الصناعات مثل صناعة الفولاذ والصناعات البلاستيكية وان مركبات الكادميوم واسعة الأستخدام في صناعة البطاريات ويطرح الى البيئة مع المطروحات الصناعية وكذلك يأتي من استخدام الأسمدة الكيميائية وتلوث الهواء المحلي (WHO,1993) . اكد عزيز (1995) ان مياه الصرف الصحي تحتوي على تراكيز عالية من العناصر الثقيلة واشار الى ان الأجزاء الصلبة فيها تحتوي على تراكيز اعلى من الجزء السائل .

FOR AUTHOR USE ONLY

بينت النتائج جدول (3 – 2) أن تراكيزايونات النحاس والرصاص في المناطق المدروسة كانت أعلى من تراكيز ايونات النيكل والكادميوم وقد سجلت اعلى قيمة لايونات النحاس الذائبة في الماء في نهر الخندق حيث كانت 0.32 ملغرام / لتر اما الرصاص في نهر ابو الخصيب وكانت 0.439 ملغرام / لتر وعند مقارنة نتائج الدراسة الحالية بنتائج دراسات أخرى , نلاحظ وجود زيادة نسبية في تراكيز النحاس والرصاص للدراسة الحالية ولكنها عامة كانت اعلى من الحدود المسموح بها في المقاييس العراقية للمياه الداخلية .

وبشكل عام اتفقت نتائج الدراسة الحالية لتركيز الرصاص والكادميوم مع الامارة (2001) في دراسته لتلوث مياه شط العرب عند مدينة البصرة بالعناصر النزرة (النيكل والرصاص والخارصين والكادميوم والكروم) أذ كانت تراكيز Ni,Pb,Cd (1.364, 0.095, 0.239) ملغم/لتر على التوالي واوضح ان احد اسباب التلوث بهذه العناصر هو وسائط النقل المائية وحركة السفن والبواخر الكبيرة وما تسببه عمليات تحميل وتفريغ النفط في هذه الوسائط من تلوث، فكانت اعلى من المحددات المسموحة.

اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع نتائج سلمان (2007) الذي درس على الأنهر المتفرعة من شط العرب ووجد ان تراكيزعناصرالرصاص والكادميوم والنحاس كانت اعلى من المحددات المحلية (0.6,0.11,0.67)ملغم/لترعلى التوالي ولذلك استنتج ان أهم اسباب التلوث الرئيسية هي مياه الصرف الصحي والنفايات المنزلية.

أكد القاروني (2011) في دراسته تقدير تراكيز العناصر الثقيلة (الحديد والكوبلت والرصاص والكادميوم والنحاس والنيكل) لشط العرب وقناة البصرة واعزى اسباب التلوث الناتج الى النشاط البشري وعدم وجود معالجة للعناصر الثقيلة فضلاً عن الفضلات الصناعية من المعامل والورش الصغيرة المنتشرة في مدينة البصرة.واتفقت نتائجة مع الدراسة الحالية لجميع العناصر ماعدا النيكل فكانت اعلى من المحددات المسموحة أذ كانت تراكيز Ni,Cu,Pb,Cd (0.117 ,0.247 ,0.073 ,0.399) ملغم/لتر على التوالي.

تتفق الدراسة الحالية لعنصري النحاس والرصاص لارتفاع قيمها مقارنة مع المحددات المسموحة مع الشمري (2013) وجد أن معدل تركيز عنصر الرصاص مساوياً الى 0.288 ملغرام /لتر وهو اعلى من المحددات المحلية والعالمية واعزى سبب الزيادة للفضلات المنزلية غير المعالجة وبالأخص المختلطة مع مياه مجاري الأمطار والقذف المباشر للملوثات في مياه شط العرب وفروعها الجانبية

أختلفت نتائج النيكل مع الدراسات المذكورة سابقاً وهي بذلك تتفق مع نتائج محمود (2008) إذ كانت تراكيز النيكل ضمن الحدود المسموحة المحلية في دراستها لتراكيز العناصر الثقيلة (الخارصين والرصاص والنيكل والنحاس والكادميوم والمنغنيز والكوبلت والحديد) لمياه ورواسب وبعض النباتات المائية في جنوب العراق.وكانت قيم جميع العناصر المدروسة في الدراسة الحالية اعلى من قيم هذه الدراسة وقد اختلفت مع الدراسة الحالية لعنصري النحاس والرصاص أذ كانت اقل من المحددات المحلية، أذ كانت تراكيز Ni,Cu,Pb,Cd (,0.026, 0.005 ,0.062 0.006) ملغم/لتر على التوالي.

أظهرت نتائج الدراسة الحالية وجود علاقة ارتباط غير معنوية بين المتغيرات البيئية وتراكيز العناصر الثقيلة الذائبة في الماء ماعدا عنصري النيكل والرصاص حيث سجلت بينهما علاقة ارتباط معنوية مع درجة الحرارة, هذه النتائج تتفق جزئياً مع دراسات اخرى حيث اشارت الحجاج (1997) الى وجود علاقة ارتباط غير معنوية بين المتغيرات البيئية وتراكيز العناصر الثقيلة .

بينما اشارت محمود (2008) عن وجود علاقة ارتباط معنوية بين درجات الحرارة وزيادة تركيز عنصر الكادميوم والخارصين في حين لم تكن لها علاقة مع العناصر الأخرى, كما ان سبب اختلاف الدراسة الحالية عن الدراسات الأخرى كون جمع العينات تم في فصل واحد وهو فصل الشتاء او قد يرجع الى تداخل عوامل أخرى عديدة منها

FOR AUTHOR USE ONLY

كمية ونوعية الفضلات المطروحة وكذلك هبوب الرياح المحملة بالعناصرالثقيلة بين محطات الدراسة وايضاً يتميز جنوب العراق وخاصة محافظة البصرة بعواصف ترابية مما يجعل الغبار المتساقط مصدراً اخر للملوثات في مياه الأنهار بالعناصر الثقيلة،وقدرة العواصف الترابية على نقل العناصر الثقيلة مثل الكادميوم،النحاس والرصاص الى البيئة المائية بكميات كبيرة (Nriagu and Davidson ,1986 والقاروني ،2011).

2-4 - عزل وتشخيص البكتريا من عينات المياه

عزلت البكتريا من البيئات الملوثة بالعناصر الثقيلة وتم اختيار الأنواع البكتيرية من المناطق الأكثر تلوثاً بالعناصر الثقيلة لدراستها. أذ اكدت دراسة (Abou-Shanab *et al*.,2007) قابلية البكتريا على مقاومة العناصر الثقيلة بتراكيز عالية عند عزلها من المناطق الملوثة بتلك العناصر.

شخصت الأنواع البكتيرية في الدراسة الحالية أعتماداً على الصفات المظهرية والأختبارات الكيموحيوية أذ شخصت الأنواع التابعة لجنس الـ *Bacillus* مثل *B.megaterium, B.licheniformis, B.badius* ، والأنواع البكتيرية التابعة لجنس الـ *Micrococcus* والمتمثلة *M. halobius* و*M. kristinae* . أختيرت الأنواع البكتيرية على عدة أعتبارات منها تواجد هذه الأنواع في جميع محطات الدراسة وخاصة المناطق الأكثر تلوثاً بالعناصر الثقيلة وكذلك امتلاك جنس *Bacillus* خصائص استثنائية التي تدعم عملية المعالجة وهي البيئة المتنوعة للأحياء وسهولة تنميتها مختبرياً وغير ممرضة للأنسان وقدرتها على تكوين السبورات وكذلك قدرتها على تحمل الأجهاد البيئي والجوع (Samarth *et al*.,2012), كذلك يمتاز جنس *Micrococcus* بصفات تدعم عملية المعالجة مثل التوفر بجميع البيئات،غير ممرضة للانسان وكذلك له القدرة على ازالة السمية او التكسير الحيوي للعديد من الملوثات البيئية (Zhuang *et al*. , 2003) وايضاً لكون جميع هذه البكتريا من البكتريا الموجبة لصبغة كرام والتي تمتاز بأمتلاكها جدار خلوي سميك يحتوي على العديد من البوليمرات التي توفر له الشحنات السالبة اللازمة لأرتباط ايونات المعادن موجبة الشحنة (Pagnanelli *et al*., 2003) .

FOR AUTHOR USE ONLY

3-4 - تحديد مقاومة البكتريا للعناصر الثقيلة

بينت نتائج الجدولين (3-5 و 3-6) ان بكتريا *B.licheniformis* هي اكثر مقاومة لعناصر النحاس ، النيكل والرصاص في حين اظهرت بكتريا *M.halobius* اكثر مقاومة لعنصري الرصاص والكادميوم , بينما اظهرت النتائج ان بكتريا *B.megaterium* هي اقل تحملاً لجميع العناصر الثقيلة مقارنة مع الأنواع الأخرى. ان المستويات العالية من المقاومة التي ُسجلت بين العزلات ربما يعود الى تراكيز العناصر الثقيلة العالية في المياه ماعدا عنصر النيكل اذ سجل اقل تركيزاً مقارنة مع باقي العناصر , إذ اظهرت جميع الأنواع البكتيـرية مقاومـة لهـذا العنصر لكنـها اقـل مـن بقيـة العناصـر نسبياً.

اكد العديد من الباحثين في دراسات مختلفة ان البكتريا المعزولة من المناطق الملوثة بالعناصر أكثر تحملاً للعناصر الثقيلة من البيئات غير الملوثة بها (Chaudri *et al*., 1992 ; Abou-Shanab *et al*., 2007 ; Stefanescu *et al*., 2011 ; Varghese *et al*., 2012)-Abdelatey *et al*.,2011;

أن اختلاف مستويات المقاومة بين الأنواع البكتيرية قد يكون بسبب الاختلاف في تراكيز العناصر الثقيلة المختلفة في البيئة وفي محطات الدراسة التي تعد من الأماكن الملوثة بالعناصر الثقيلة لسنوات طويلة والتي ربما اعطت البكتريا فرصة للتكيف مع البيئة اما بواسطة تطور اليات المقاومة أو انتقال جينات المقاومة عبر البلازميد (Silver, 1992) .وقد يعود السبب في اختلاف مستويات المقاومة الى أختلاف الأليات مثل الأختلاف في الأمتصاص او نقل العناصر السامة او في بعض الحالات ان العنصر يتحول انزيمياً بواسطة تفاعلات الأكسدة والأختزال و methylation او demethylation الى مواد كيمياوية تكون اقل سمية من المركب الأصلي (Wase and Forster , 1997 ; Silver , 1996) , او قد يعود السبب الى أختلاف التنوع الجيني للأحياء المجهرية وكذلك طبيعة التفاعلات بين الأحياء المجهرية والمعادن (Wase and Forster , 1997).

يعمل جدار الخلية البكتيرية على تجميع تراكيز عالية من النحاس والنيكل بآليات مختلفة وذلك نتيجة للألفة العالية بين هذه الايونات وشحنات جدار الخلية (Rehman *et al*., 2008). يعتبر الرصاص من العناصر السامة حتى في التراكيز الواطئة ،الا ان الأنواع البكتيرية المدروسة كانت لها القابلية على مقاومته مما يدل على ان التلوث بعنصر محدد قد يزيد من مقاومة البكتريا لذلك العنصر (Badar *et al*., 2000) , كما ان التأثير السمي للعناصر الثقيلة لا يعتمد على مقدار مايتراكم من العنصر الثقيل في البكتريا وأنما يعتمد على وفرة الايونات الحرة منه داخل الخلية والتي بدورها تؤثر على الفعاليات الحيوية للخلية (الموسوي،2010).

FOR AUTHOR USE ONLY

يعود السبب لمقاومة البكتريا لسمية الرصاص الى ادمصاص الجزء الاكبر منه على الجدار الخلوي ومنعه من النفوذ الى داخل الخلية حيث وجد العظماوي (1985) ان الكميات المتراكمة من الرصاص على السطح الخارجي للخلايا أكبر بكثير من الكمية المتراكمة منه داخل الخلايا . كما اشار Vymazal (1990) الى أرتباط الرصاص مع مواد أخرى داخل الخلية مثل الفوسفات مما يجعله غير فعال.

4-4 - تباين انواع البكتريا في أزالة العناصر الثقيلة

أختيرت خمسة انواع من البكتريا لتجربة أزالة العناصر الثقيلة مختبرياً وهي *M.halobius* , *M.kristinae,* *B.megaterium, B.licheniformis, B.badius* وهي أكثرالأنواع البكتيرية المعزولة مقاومة للعناصرالثقيلة،هذه الأنواع موجبة لصبغة گرام تمتاز بسمك الجدار(20-80) نانومتر والذي يشكل حوالي 90% من الوزن الجاف للخلايا ويؤلف الـ Peptidoglycan حوالي (60-90 %) منه (Rho and Kim, 2002) .

أن البيتيدوگلايكان تركيب قوي وصلب بصورة استثنائية فضلاً عن وجود بوليمر أخر في جدار الخلية هو Teichoic acid ووظيفة هذا الحامض هو الأرتباط بالمعادن (Abdullah,2006). يكون الحامض الأميني diaminopimelic acid في جنس *Bacillus* من نوع meso-DAP حيث تكون مجموعة الكاربوكسيل في الحامض الأميني غير مشغولة بأصرة الببتيد وكذلك يحتوي هذا الجنس على حامض teichoic acid كما يوجد في *B.licheniformis* فقط حامض teichuronic acid (Slepecky and Hemphill,2006) , اما جنس *Micrococcus* لا تحتوي على حامض teichoic acid ويكون البيتيدوكلايكان من نوع L-Lys-L-Ala_{3-4} (Kocur *et al*., 2006).

FOR AUTHOR USE ONLY

اختيرت العناصر الثقيلة (النيكل والنحاس والكاديوم والرصاص) لتجربة المعالجة الحيوية لكون عنصري النحاس والنيكل من العناصر الأساسية والرئيسية لنمو الكائنات الحية , اما عنصري الرصاص والكاديوم فتم اختيارهما بسبب سميتهما لكل الأنظمة الحية . استخدمت تراكيز عالية من ايونات العناصر الثقيلة (25 ,50, 100) ملغرام /لتر لكون جميع الأنواع البكتيرية المدروسة مقاومة لها (جدول 3-5 و3-6) .

أظهرت بوضوح نتائج التجربة (شكل 3-1) أختلاف قدرة الأنواع البكتيرية في الدراسة الحالية على ازالة العناصر الثقيلة وقد يعزى هذا الأختلاف الى تركيب جدار الخلية ومواقع تبادل الأيونات موجبة الشحنة في غشاء الخلية, اذ يوجد للببتيدوكلايكان في مختلف الأنواع على Alanine وGlucoseamine وMuramic acid و Glutamic acid مع وجود كميات من الحامض الأميني Diamino Pimelic acid (DAP) حيث يحتوي جنس الـ

Micrococcus فضلاً عما ذكر على حامض Mycolic acid بشكل سلاسل مستقيمة وهذا الحامض غير موجود في جنس *Bacillus* (Schleifer and Kandler, 1972) .

أوضحت النتائج (شكل 3-1) ان بكتريا *B.badius* لها قابلية عالية على ازالة النحاس، اما بكتريا *B.licheniformis* فأظهرت قابلية عالية على ازالة عنصر النيكل ، و سجل النوع *B.megaterium* اعلى معدل لأزالة عنصر الرصاص ويعزى ذلك الى تركيب جدار الخلية لهذه الأنواع كما مر ذكره سابقاً وتتفق هذه النتائج مع نتائج (Karakagh *et al.* (Kafilzadeh *et al*. 2012 ; Nanda *et al*. 2011 ; Jamil *et al*. 2014 ; 2012 . تحدث الأزالة للعناصر الثقيلة بواسطة جنس *Bacillus* لأمتلاكه سعة عالية من مواقع الأرتباط مع تلك العناصر وبسبب محتواه العالي من الفوسفات التابعة الى حامض teichoic acid أذ ان هذا البوليمر السالب الشحنة يكون حوالي (10 – 60) % من وزن الجدار الخلوي ووظيفته الأرتباط بالمعادن ويلعب دوراً اساسياً في التوازن الأيوني للمعادن (Schaffer and Messner , 2005) .

يحتوي النوع *B.licheniformis* على حامض teichuronic acid الذي يوفر شحنات سالبة لجدار الخلية لأحتواءه على مجاميع الهيدروكسيل بالأضافة الى الحامض teichoic acid الذي يوفر الفسفور بنسبة 97% وتعتبر هذه الأحماض مواقع متميزة للأرتباط مع ايونات المعادن (Beveridge *et al*., 1982). بينما وجدا Padmarathy and Vasudevan (2003) ان مجاميع الامين والكاربوكسيل الموجودة في جدار الخلية تعد مواقع مهمة لأمتزاز أيونات النيكل.

FOR AUTHOR USE ONLY

أضافة الى ذلك ان هنالك اسباب اخرى لأزالة العناصر الثقيلة منها الخصائص الفيزوكيميائية لهذه العناصر التي تتحكم بسلوكها في المحلول لأن معظم العناصر الثقيلة هي عناصر انتقالية غير مكتملة الملأ بالنسبة للأوربيتال من نوع d مما يعطي صفة الأيون الموجب للمعدن ومما يزيد قدرته على تكوين المعقدات (Abdullah,2006) , أذ يدخل العدد الذري في تكوين التناسقات وولوج ايونات المعادن مع الروابط التي تسمى الروابط Ligands في جدران الخلية (Doyle *et al*., 1980). اوضح Kortba *et al.* (1999) ان الروابط Ligands تكون ذات ألفة عالية للأرتباط بالنحاس في الأنظمة البايولوجية.

أما بالنسبة الى ازالة ايونات الكادميوم فكانت اعلى ازالة بواسطة بكتريا *M.halobius* وهذا يتفق مع نتائج Essa *et al.* (2012), أذ تقسم ايونات العناصر حسب ألفتها الى الأرتباط بهذه المواقع الى ثلاثة اصناف وهي:-

1- الصنف A: الذي يكون باحث عن الأوكسجين إذ يرتبط بالأوكسجين كذرة مانحة .
2- الصنف B: يبحث عن الروابط Ligands التي تحتوي على النتروجين والكبريت.

3- الصنف borderline : وهي الأيونات التي بأمكانها تكوين معقدات مستقره مع كل اصناف الروابط Ligands.

اذ يعد عنصرا النحاس والرصاص من الصنف borderline ولكنهما يميلان الى خصائص الصنف B بشكل كبير , اي ان هذين العنصرين تكون لهما الفة عالية لمجاميع الأمين أكثر من مجاميع الكاربوكسيل , بينما عنصري النيكل والكادميوم فهما من الصنف borderline الذي يكون له ألفة نحو مجاميع الأمين والكاربوكسيل ايضاً (Nieboer and Richardson,1980).

5-4 - تأثير الفترة الزمنية للحضن على ازالة العناصرالثقيلة

تشير نتائج الدراسة الحالية (شكل 3-2) ان فترة الحضانة 72 ساعة كانت الأفضل في عملية ازالة العناصر الثقيلة وقد تطابقت هذه النتيجة مع Nanganuru and Korrapati (2012) اللذان درسا امكانية استخدام الكتلة الحية بأستخدام بكتريا *Pseudomonase putida* لأزالة عنصر الكادميوم وقد تأثرت عملية الازالة بعدة عوامل مثل الدالة الحامضية ووسط الأمتصاص وفترة الحضن ومستوى الكتلة الحية وتركيز الكادميوم،أزيل 93 % من الكادميوم من الوسط الحاوي على تركيز 10 ملغم/لتر . وذلك لأن نسبة الأزالة تزداد مع الزمن وقد يعزى ذلك الى وجود عدد معين من مواقع الأرتباط الخاصة بكل نوع من الكتلة الحيوية للأحياء المجهرية(*al*.,2003 Ahalya *et*) إذ ان الامتزاز الحيوي بواسطة الكتلة الحية للأحياء المجهرية هو عملية سريعة وان وقت حدوث التوازن يكون سريعاً جداً كما بين Abdullh (2006) ان أقصى وقت لحدوث التوازن هو 72 ساعة.

اختيرت درجة الحرارة لعملية الأزالة في الدراسة الحالية 30 س^{0} حيث ان درجة الحرارة المثالية لحدوث الأمتزاز تكون بحدود (25-35) س^{0} (Roane and Pepper, 2003 ; Malik,2004 ; Tabak, 2005)

اختيرت الدالة الحامضية pH بحدود 7 حيث انه في القيم الواطئة من الدالة الحامضية تتنافس ايونات الهيدروجين مع ايونات العناصر الثقيلة وترتبط بالمواقع الفعالة على سطوح الخلايا ممايؤدي الى انخفاض ارتباط ايونات العناصر بالمواقع الفعالة , اما في حالة كون قيم الدالة الحامضية عالية فسوف تزداد المواقع بزيادة الشحنات السالبة مما يزيد من جاذبية ايونات العناصر الثقيلة ذات الشحنات الموجبة وتمتز على سطح الخلية , ان المواقع الفعالة تشمل (Hydroxyl, Chitin , Carboxyl , Amine ,Poly sacharide , Phosphate , Protein, Nucleic acid group).

(Esposito *et al*., 2002; Chen and Wang, 2008; Nishitani *et al*., 2010; Kuroda and Ueda, 2011)

FOR AUTHOR USE ONLY

كما وجد Beveridage *et al* (1982) أن جدار البكتريا الموجبة لصبغة گرام يتكون من بوليمرات متنوعة مختلفة ومتشابهة والتي تتحد وتنتج شحنات سالبة في نسيج الجدار عند الـ pH المتعادل.

6-4 - النسب المئوية لأزالة ايونات العناصر الثقيلة

بينت نتائج الدراسة الحالية (الأشكال 3-3 و3-4 و 3-5 و3-6 و3-7) ان نسبة ازالة ايونات العناصر الثقيلة تزداد عند نقصان التركيز الأبتدائي لهذه المعادن في المحاليل بعملية الأمتزاز الحيوي ويعزى السبب في ذلك الى ان زيادة تركيز العناصر الثقيلة يؤدي الى تشبع مواقع الأرتباط للأحياء المجهرية بايونات العناصر مما يؤدي الى تقليل عملية الامتزاز بزيادة تركيز تلك العناصر واتفقت هذه النتائج مع Nanganuru and Korrapati (2012), اما اذا استخدم تركيز واطئ للعناصر فان سعة الامتزاز الحيوي قد تستعمل بشكل كامل (Chatterjee,2006) .

FOR AUTHOR USE ONLY

الاستنتاجات Conclusions

1- سجلت الدراسة تواجد ملحوظ للجراثيم المقاومة للعناصر الثقيلة شملت عزل وتشخيص ثلاثة أنواع من البكتريا العصوية التابعة إلى جنس الـ *Bacillus* من مياه الأنهر الداخلية المتفرعة من شط العرب وهي *B. licheniformis* و *B. megaterium* و *B. badius*، كما عزل نوعين من البكتريا الكروية التابعة الى جنس الـ *Micrococcus* وهي *M. kristinae* و *M. halobius*.

2- العناصر الثقيلة الملوثة لمياه الأنهر الداخلية المتفرعة من شط العرب لها القدرة على الادمصاص على سطوح الجراثيم أذ أظهرت العزلات التابعة إلى بكتريا *Bacillus licheniformis* أنها أكثر قدرة على أزالة ايونات العناصر الثقيلة من العزلات البكتيرية الأخرى وخاصة في إزالة النحاس والنيكل والكادميوم, بينما كانت بكتريا *Bacillus megaterium* هي الأكثر قدرة على إزالة عنصر الرصاص.

3- ادى التلوث بالعناصر الثقيلة الى ظهور أنواع من الاحياء المجهرية المقاومة للعناصر الثقيلة امكانية استخدام الكتلة الحيوية الـ Biomass لإزالة العناصر الثقيلة من المحاليل المائية مختبرياً .

4- إن عملية ازالة العناصر الثقيلة بواسطة البكتريا المدروسة مرتبطة مع تحملها لسمية هذه المعادن الثقيلة .

5- أظهرت فترة الحضانة 72 ساعة أنها الأفضل في انجاز عملية الازالة مما يدل أنها عملية سريعة وتعتمد على التفاعلات الالكتروستاتيكية بين خلايا البكتريا وايونات العناصر الثقيلة .

FOR AUTHOR USE ONLY

التوصيات Recommendations

1. إجراء دراسات حول التنوع الحيوي للأحياء المجهرية في مياه الأنهر الداخلية المتفرعة من شط العرب .
2. إمكانية استخدام البكتريا المعزولة في معالجة مياه المجاري والمتدفقات الصناعية كونها بكتريا صديقة للبيئة ورخيصة مقارنة بالطرق التقليدية المتبعة.
3. يمكن زيادة الكتلة الحية وذلك بأنشاء مخمرات كبيرة وبالتالي الأستفادة منها من الناحية الاقتصادية.
4. إجراء دراسات جينية حول الاختلاف الجيني بين الأنواع المدروسة بالنسبة إلى تحملها للعناصر الثقيلة .
5. أجراء دراسات عن طبيعة التحور الحاصل في الغشاء البلازمي Plasma membrane لتلك الجراثيم والتي اعطتها صفة المقاومة.

(ملحق1) جداول التحليل الاحصائية للقياسات الفيزيائية والكيميائية والعناصر الثقيلة وعلاقة الارتباط بينها

FOR AUTHOR USE ONLY

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable:PH					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.865a	5	.173	73.983	.000
Intercept	739.344	1	739.344	316004.162	.000
location	.865	5	.173	73.983	.000
Error	.014	6	.002		
Total	740.224	12			
Corrected Total	.880	11			
a. R Squared = .984 (Adjusted R Squared = .971)					

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable:EC					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	41.199a	5	8.240	3.208	.094
Intercept	432.840	1	432.840	168.541	.000
location	41.199	5	8.240	3.208	.094
Error	15.409	6	2.568		
Total	489.448	12			
Corrected Total	56.607	11			
a. R Squared = .728 (Adjusted R Squared = .501)					

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable:Temperature					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	46.834a	5	9.367	52.280	.000
Intercept	3230.801	1	3230.801	18032.377	.000
location	46.834	5	9.367	52.280	.000
Error	1.075	6	.179		
Total	3278.710	12			
Corrected Total	47.909	11			
a. R Squared = .978 (Adjusted R Squared = .959)					

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable:DO					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	49.032[a]	5	9.806	161.156	.000
Intercept	25.825	1	25.825	424.403	.000
location	49.032	5	9.806	161.156	.000
Error	.365	6	.061		
Total	75.222	12			
Corrected Total	49.397	11			
a. R Squared = .993 (Adjusted R Squared = .986)					

FOR AUTHOR USE ONLY

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable:nickel					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1998.683[a]	5	399.737	3.876	.065
Intercept	57820.890	1	57820.890	560.650	.000
location	1998.683	5	399.737	3.876	.065
Error	618.791	6	103.132		
Total	60438.364	12			
Corrected Total	2617.474	11			
a. R Squared = .764 (Adjusted R Squared = .567)					

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable:copper					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	138702.320[a]	5	27740.464	.942	.516
Intercept	81576.030	1	81576.030	2.769	.147
location	138702.320	5	27740.464	.942	.516
Error	176740.450	6	29456.742		
Total	397018.800	12			
Corrected Total	315442.770	11			
a. R Squared = .440 (Adjusted R Squared = -.027)					

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:cadmium					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1553.177[a]	5	310.635	2.151	.189
Intercept	10621.821	1	10621.821	73.547	.000
location	1553.177	5	310.635	2.151	.189
Error	866.537	6	144.423		
Total	13041.534	12			
Corrected Total	2419.713	11			
a. R Squared = .642 (Adjusted R Squared = .343)					

FOR AUTHOR USE ONLY

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable:lead					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	65413.420[a]	5	13082.684	1.000	.489
Intercept	1377425.280	1	1377425.280	105.301	.000
location	65413.420	5	13082.684	1.000	.489
Error	78485.100	6	13080.850		
Total	1521323.800	12			
Corrected Total	143898.520	11			
a. R Squared = .455 (Adjusted R Squared = .000)					

Correlations								
	PH	EC	Temperature	DO	nickel	copper	lead	cadmium
PH	1	-.143	-.868-**	.973**	.465	-.433	.506	.511
EC	-.143	1	-.233	-.265	.247	-.069	.202	.045
Temperature	-.868-**	-.233	1	-.801-**	-.630-*	.373	-.586-*	-.537
DO	.973**	-.265	-.801-**	1	.459	-.421	.470	.488
nickel	.465	.247	-.630-*	.459	1	-.271	.644*	.729**
copper	-.433	-.069	.373	-.421	-.271	1	.134	-.503
lead	.506	.202	-.586-*	.470	.644*	.134	1	.224
cadmium	.511	.045	-.537	.488	.729**	-.503	.224	1
**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed). *. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).								

(ملحق 2) جداول الاحصاء للمعالجة الحيوية

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: ازالةCd					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Model	23726.456[a]	9	2636.273	65.743	.000
الوقت	1501.479	2	750.740	18.722	.000
البكتريا	403.719	4	100.930	2.517	.058
التركيز	1183.396	2	591.698	14.756	.000
Error	1443.584	36	40.100		
Total	25170.040	45			
a. R Squared = .943 (Adjusted R Squared = .928)					

FOR AUTHOR USE ONLY

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: ازالةCu					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Model	81798.445[a]	9	9088.716	748.925	.000
الوقت	948.236	2	474.118	39.068	.000
البكتريا	390.352	4	97.588	8.041	.000
التركيز	2107.250	2	1053.625	86.820	.000
Error	436.884	36	12.136		
Total	82235.330	45			
a. R Squared = .995 (Adjusted R Squared = .993)					

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: ازالةNi					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Model	27256.447[a]	9	3028.494	136.464	.000
الوقت	1228.470	2	614.235	27.677	.000
البكتريا	412.146	4	103.037	4.643	.004
التركيز	2698.579	2	1349.289	60.799	.000
Error	798.935	36	22.193		
Total	28055.382	45			
a. R Squared = .972 (Adjusted R Squared = .964)					

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: ازالةPb					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Model	21581.520[a]	9	2397.947	326.299	.000
الوقت	799.357	2	399.679	54.386	.000
البكتريا	422.278	4	105.569	14.365	.000
التركيز	599.657	2	299.829	40.799	.000
Error	264.561	36	7.349		
Total	21846.081	45			
a. R Squared = .988 (Adjusted R Squared = .985)					

FOR AUTHOR USE ONLY

المصادرالعربية

الامارة، فارس جاسم (2001). مستوى المعادن النزرة في مياه شط العرب عند مدينة البصرة ، مجلة الرافدين ، 16: 265-257.

الحجاج، مكية مهلهل خلف (1997). توزيع العناصر الثقيلة في مياه ورواسب قناتي العشار والخندق المرتبطة بشط العرب و بيان تاثيرها على الطحالب . رسالة ماجستير – كلية العلوم – جامعة البصرة. 110 ص .

الزيادي , انغام عمير صاحي (2004). دراسة قابلية الجراثيم المختزلة للكبريتات على ترسيب الرصاص و الزئبق من مياه الفضلات الصناعية مختبرياً . رسالة ماجستير – كلية العلوم – جامعة البصرة . 93 ص .

الشمري، احمد يوسف (2013). تقدير بعض العناصر الثقيلة في محار ورواسب ومياه شط العرب ومعالجتها بصخور البورسلينات . رسالة ماجستير – كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة البصرة. 100 ص .

الصباح، بشار جبار (2007). دراسة السلوك الفيزيوكيميائي للعناصر المعدنية الملوثة لمياه ورواسب شط العرب . رسالة ماجستير – كلية الزراعة– جامعة البصرة . 216 ص .

العظماوي , محمد عجة عودة (1985). بعض الجوانب البيئية لانواع من الطحالب الخضر المزرقة (السيانوبكتريا) المثبتة للنتروجين المعزولة من جنوب العراق . رسالة ماجستير – كلية التربية – جامعة البصرة . 72 ص .

القاروني، عماد هادي (2011). تقديرتراكيز بعض العناصر الثقيلة في المياه والرواسب وتراكمها الحيوي في بعض لافقريات نهر شط العرب وقناة شط العرب جنوب العراق. اطروحة دكتوراه – كلية التربية– جامعة البصرة. 243 ص .

الموسوي، انسام جاسم محمد (2010). قابلية بعض انواع من البكتريا الخيطية المعزولة من مياه هور شرق الحمار على الامتزاز الحيوي لبعض المعادن الثقيلة مختبرياً . رسالة ماجستير – كلية العلوم – جامعة البصرة . 140 ص.

حسن، وصال فخري (2007). دراسة جيوكيميائية وهيدروكيميائية لرواسب مجرى شط العرب والمياه الملامسة له. أطروحة دكتوراه – كلية الزراعة – جامعة البصرة . 205 ص .

سلمان، كريم حسين خويدم (2007). دراسة في الواقع البيئي لمحافظة البصرة. اطروحة دكتوراه – كلية العلوم– جامعة بغداد . 180 ص .

عزيز، احمد محمد (1995). تأثير بعض العناصر الثقيلة في المخلفات الصلبة ومياه المجاري على نمو نبات الخس وتلوث التربة. رسالة ماجستير– كلية الزراعة – جامعة بغداد. 70 ص .

FOR AUTHOR USE ONLY

محمود , امال احمد (2008). تراكيز الملوثات في مياه ورواسب و نباتات بعض المسطحات المائية في جنوب العراق. اطروحة دكتوراه – كلية العلوم- جامعة البصرة . 125 ص.

نظام صيانة الأنهار والمياه العمومية من التلوث (1967). تعليمات رقم 80406 صادرة في جريدة الوقائع العراقية عدد 2763 في 1980/3/13 والعدد 2786 في 28-7-1980.

FOR AUTHOR USE ONLY

المصادر الأجنبية

Abdelatey, L.M.; Khalil, W.B.K.; Ali, T.H. and Mahrous, K.F.(2011). Heavy metal resistance and gene expression analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Egyption soils. J. Environ. Sanitation, 6:201-211.

Abdullah, N.H.(2006). Chromium (VI) biosorption studies using non-living microorganisms . M.Sc. thesis . University technologi Malaysia . 135p.

Abou-Shanab, R.A.I.; Berkum, P. and Angle, J. S. (2007). Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. In Chemosphere, 68: 360−367.

Ahalya, N.; Ramachandra, T.V. and Kanamadi, R.D. (2003). Biosorption of heavy metals . Res. J. Chem. Environ., 7:71-78.

Al-Hejuje, M.(2012).Asynergistic effect of copper and nickel ions on the growth rates of *Pseudomonas aeroginosa* and *Staphylococcus aureus* isolates. J. Sci. Basra, 30:78-93.

Alluri, H.K. ; Ronda, S.R.; Settalluri, V.S.; Singh, J. and Venkateshwar, P.(2007). Biosorption an eco-friendly alternative for heavy metal removal . African. J. Biotechnol., 6: 2924-2931.

Al-Saad, H. T.; Al-Khafaji, B. Y. and Sultan, A. W. A. R. (1996). Distribution of trace metals in water, sediments and biota samples from Shatt Al-Arab estuary, Marina Mesopotamica, 11: 63-77.

APHA. (1999). Standard methods for Examination of water and waste water . 20th ed. American Public Health Association, Washington DC. USA. 1193 p.

Ashby, C.R.; Thompson, S.A. and Crusberg, T.C.(1997). Biomineralization of copper: Solutions for waste remediation and biomining.The Conference on Hazar. Waste Res., : 50-61.

Asku, Z .(1992). The biosorption of Cu (II) by *C. vulgaris* and *Z. ramigera*. J. Environ. Technol., 13: 579-586.

FOR AUTHOR USE ONLY

Atieno, N.R.; Owuor, O.P. and Omwoyo, O.(2013). Heavy metal and associated antibiotic resistance of Fecal coliform, Fecal streptococci and pathogens isolated from waste water of abattorirs in Nairobi, Kenya. J. Appl. Biosci., 64: 4858-4866.

Badar, U.; Abbas, R. and Ahmed, N. (2000). Characterization of copper and chromate resistant bacteria isolated from Karachi tanneries effluents. J. Ind. Environ. Biol., 39: 43-54.

Bartram, J. and Balance, R. (1996). Water Quality Monitoring : A practical Guid to the Design and Implementation of Freshwater Quality Studies and Monitorings Programmes . UNEP and WHO .425 P.

Benson, H. J.(2002). Microbiological Applications , Laboratary Manual in General Microbiology.8th edition, Boston, USA. 478p.

Beveridge, T.J.; Forsberg C.W. and Doyle, J. (1982). Major sites of metal binding in *Bacillus licheniformis* walls. J. Bacteriol., 150: 1438-1448.

Bisht, S.S.; Praveen, B.; Rukmini, M. and Dhillon, H. (2012).Isolation and screening of heavy metal absorbing bacteria from the industry effluent sites of the river Nagavali. Inter. IJPSR., 3:1448-1451.

Chatterjee, N.(2006). Biosorption of cadmium by fungi . M. Sc.thesis .Department, Biotechnology and Environmental Sciences – Deemd University . 32 P.

Chaudri, A.M.; Mcgrath, S.P. and Giller, K.E. (1992). Metal tolerance of isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii from soil contaminated by past applications of sewage sludge .J. Soil Biol. Biochem., 24:83-88.

Chen, C. and Wang, J. (2008). Removal of Pb^{2+}, Ag^{+}, Cs^{+}, and Sr^{2+} from aqueous solution by brewerys waste biomass. J. Hazard Mater., 151: 65-70.

Claus, D. and Berkeley, R.C.W. 1986. Genus *Bacillus* Cohn 1872. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.2 (Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G., eds.), Williams & Wilkins, Baltimore, pp 1105-1139.

Clausen, C.A. (2000). Isolation metal-tolerant of removing cooper, chromium, and arsenic from treated wood. J. Waste Manag. Res., 18:264-268.

FOR AUTHOR USE ONLY

Cobbett, C.and Goldsbrough, P. (2002). Phytochelatins and Metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. J. Annu. Revol. Plant Biol., 53: 159-82.

Costa, A.C.A. and Leite, S.G.F. (1991). Metals biosorption by sodium alginate immobilized Chiarella homosphaera cells. J. Biotechnol. Left., 13:555-562.

Davis, T.A.; Volesky, B.and Mucci, A.A. (2003). Review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. J. Water Res., 37:4311- 4330.

Dobson, R.S. and Burgess, J.E. (2007). Biological treatment of precious metal refinery wastewater: A review. J. Min. Eng., 20: 519-532.

Doyle, R. J.; Mathews, T.H. and Streips, U.N. (1980). Chemical basis for selectivity of metal ions by the *Bacillus subtilis* cell wall. J. Bacteriol.,143 :471-480.

Doyle, R. J.; Chaloupka, J. and Vinter, V. (1988). Turnover of cell walls in microorganisms. J.Microbiol. Rev., 52:554–567.

El-Meleigy, M.A.; El-kasaby, A.M. and Osman, N.H . (2010). Microorganisms as a tool in biotechnology of Sea Water treatment. J. Basic Appl. Sci., 4:1083-1099.

El-Sayed, S. M.; Mohamed, R.M. and Shoreit, A.A. (2008). Behavioral response of resistant and sensitive *Pseudomonas aeruginosa* S22 isolated from Sohag Governorate, Egypt to cadmium stress. J. Biotechnol., 7: 2375-2385.

Ercole, C.; Veglio, F.; Toro, L.; Ficara, G. and Lepidi, A.(1994). Immobilisation of microbial cells for metal adsorption and desorption. In: Mineral Bioprocessing II. Snowboard. Utah.

Esposito, A.; Pagnanelli, F.E. and Veglio, F. (2002). pH-related equilibria models for biosorption in single metal systems. J. Chem. Eng. Sci., 57: 307-313.

Essa, A. M.; Macaskie, L. E. and Brown, N. L. (2002). Heavy metal precipitation by off- gases from aerobic culture of *Klebsiella pneumoniae* M426. J. Technol . Microbiol. UK: 1-9 .

Essa, A.M.; Abd-Alsalam, E.S. and Ali, R.M. (2012). Biogenic volatile compounds of activated sludge and their application for metal bioremediation. J. Biotechnol., 11:9993-10001.

FOR AUTHOR USE ONLY

Fernandes, L. G. and Olalla, H.Y. (2000). Toxicity and bioaccumulation of Lead and Cadmium in marine protozoan communities. J. Ecotoxicol. Environ. safety, 47: 266-276.

Florence, TM. (1989). Trace Element Speciation in Biological Systems. In: Batley, G. E. ed. Trace Element Speciation: Analytical Methods and Problems. Boca Raton, Florida: CRC Press, 319-338.

Forbes, B.A.; Sahm, D.F. and Weissfeld, A.S.(2007).Diagnostic Microbiology, Inter. Ed. 12th ed., Bailey and Scott's,Mosby,China.1056 P.

Freeman, B.A.(1979). Barrows Textbook of Microbiology . 21 th Ed.W.B.Sanders Company . 1 st . Anne's Road . Eastbourne , East Sussex BN213 UN, England . 1138 P.

Gadd, G.M. and De Rome, L. (1988). Biosorption of copper by fungal melanine. Appl. Microbiol. Biotechnol. , 29: 610–617.

Gadd, G.M. (2004). Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. J. Geoderma, 122 :109-119.

Goksungur, Y.; Uren, S. and Guvenc, U.(2003). Biosorption of copper ions by caustic treated waste baker's yeast biomass . Turk. J. Biol., 27:23-29.

Gupta, G. and Keegan, B. (1997). Bioaccumulation and biosorption of lead by poultry litter microorganisms. Poultry Sci., 77:400-404.

Gupta, N. and Kumar, V.(2012). Identification and Isolation of heavy metal (Copper) Resistant Bacteria. Arch. Appl. Sci. Res., 4:577-583.

Hiatt, W.N. (2000). Denitrifying bacterial preparation and method, US Patent No.6025152.

Holt, J. G.; Krieg, N. R.; Sneath, P. H. A.; Staley, J. T. and Williams, S. T. (1994). Bergey's Manual of Determination Bacteriology . 9th Ed. Williams and Wilkins , Baltimore , USA.

Hookoom, M.and Puchooa, D.(2013). Isolation and identification of heavy metals tolerant bacteria from Industrial and Agricultural Area in Mauritius. Curr. Res. Microbiol. Biotechnol., 1:119-123.

FOR AUTHOR USE ONLY

Huang, C.; Huang, C. and Morehart, A.L. (1990). The removal of copper from dilute aqueous solutions by *Saccharomyces cerevisiae*. Water Res., 24:433– 439.

Hussein, H.; Farag, S.; Kandil, K. and Moawad, H. (2005).Tolerance and uptake of heavy metals by *pseudomonads*.Process Biochemistry, 40:955-961.

Hussain, M A.; Salleh, A. and Millow, P.(2009). Characterization of the Adsorption of the Lead (II) by the Nonliving Biomass *Spirogyra neglecta* (Hasall) Kützing. American J. Biochem. Biotechnol., 5: 75-83.

Issazadeh, K. ; Jahanpour, N. ; Pourghorbanali, F. ; Raeisi, G.and Faekhondeh, J. (2013).Heavy metals resistance by bacterial strians. Biol. Res., 4:60-63.

Jackson, V.A.; Paulse, A.N. ; Odendaal, J.P. ; Khan, S.and Khan, W.(2011). Identification of metal-tolerant organisms isolated from the plankenburg river,Western Cape,South Africa. Water SA., 38:29-38.

Jamil, M.; Zeb, S.; Anees, M.; Roohi, A.; Ahmed, I.; ur Rehman, S. and Phas, E.S.(2014). Role of *Bacillus licheniformis* in phytoremediation of nickel contaminated soil cultivated with rice. J. Phytoreme. 16:554-571.

Kafilzadeh, F.; Afrough, R.; Johari, H. and Tahery, Y.(2012). Range determination for resistance/tolerance and growth kinetic of indigenous bacteria isolated from lead contaminated soils near gas stations . J. Exprem. Biol., 2:62-69.

Kalia, V.C. ; Jain, S.R. and Kumar, (1994). Fermentation of biowaste to H_2 by *Bacillus licheniformis*, World, J. Microbiol. Biotechnol., 10: 224-227.

Kamika, I. and Momba, M.N.B. (2013). Assessing the resistance and bioremediation ability of selected bacterial and protozoan species to heavy metals in metal-rich industrial wastewater. BMC, Microbiol., 13:28.

Karakagh, R. M.; Chorom, M.; Motamedi, H.; Kalkhajeh1, Y.K. and Oustan, S.(2012). Biosorption of Cd and Ni by inactivated bacteria isolated from agricultural soil treated with sewage sludge. J. Ecohydrol. Hydrobiol., 12:191-198.

Kawata, K.; Yokoo, H.; Shimazaki, R. and Okabe, S. (2007). Classification of heavy-metal toxicity by human DNA microarray analysis. J. Environ. Sci .Technol., 15:3769-3774.

FOR AUTHOR USE ONLY

Kocur, M.; Kloos, W. and Schleifer , K.H. (2006).The genus *Micrococcus*.In Dworkin, M.; Falkow, S. ; Rosenberg, E. ; Schleifer, K.H. and Stackebrandt, E. Eds.The prokaryotes (3rd Ed., 3: 961-971). New york, Springer.

Koropatnick, J. and Leibbrandt, M.E.I. (1995). Effects of metal on gene expression.In R.A. Goyerand M.G. Cherian, Eds.,handbook of Experimental Pharmacology, Toxicology of metals, Biochemical Aspects, 115, Spinger Verlag, New York, pp 93-120.

Kotrba, P.; Dolekova, L.; Lorenzo, V. and Rumi, T.C. (1999). Enhanced bioaccumulation of heavy metal ions by bacterial cells due to surface display of short metal binding peptides . Appl. Environ. Microbiol., 65: 1092-1098.

Kujan, P.; Prell, A.; Safar, H.; Sobotka, M.; Rezanka, T. and Holler, M. (2005) . Removal of copper ions from dilute solutions by *Streptomyces noursei* mycelium , comparison with yeast biomass . Folia . J. Microbiol. 14: 309-313.

Kuroda, K. and Ueda, M. (2011). Yeast Biosorption and Recycling of Metal Ions by Cell Surface Engineering. In:Kotrba,P.,Mackdva,M.,Macek,T.(Eds.), Microbial Biosorption of Metals. 10: 235-247,

Kuyucak, N. and Volesky, B. (1988). Desorption of cobalt-laden algal biosorbent .J. Biotechnol. Bioeng., 33: 815-822.

Li, Y. and Li, B. (2011). Study on fungi-bacteria consortium bioremediation of petroleum contaminated mangrove sediments amended with mixed biosurfactants. J. Adv. Mat. Res., 183: 1163-1167.

Little, D. I. and Smith, J. (1994). Appasial of contamination in sediment of the inner bristol channel and severn estuary, Biol. J. Linn. Soc., 51 : 55-69 .

Malik, A. (2004). Metal bioremediation through growing cells. Environ. Inter., 30(2): 261-278.

Marmiroli, N. and Maestri, E.(2008).Health implications of trace element in the environment and food chain. John Wiley and Sons, Inc.,pp 23-39.

Metha, J.; Yadar, A.; Dilbaghi, N. and Sharma, P.(2014). Physico-Chemical characterization of distillery effluent and COD reduction by using *Bacillus badius* and *lysinibacillus fusiformis*. Inter. J. Emerg. Trends. Sci. Technol., 1:340-346.

FOR AUTHOR USE ONLY

Mgbemena, I.C.; Nnokwe, J.C.; Adjeroh, L.A. and Onyemekara, N.N.(2012). Resistance of bacteria isolated from Otamiri River to heavy metals and some selected antibiotics. J. Biol. Sci., 4:551-556.

Mishra, R.R.; Bal, S.; Rath, B.; Sahu, H.K. and Thatoi, H.N. (2009). Characterization and extracelluar enzyme activity or predominant Marine *Bacillus* spp.isolated from Seawater of Orissa Coast, India. Malaysian J., Microbiol., 5:87-93.

Muneer, B .(2005). Role of microorganisms in Remediation of heavy metals in the waste water of Tanneries. PHD. thesis , Zoology department, University of Punjab, Pakistan, 280p.

Muneer, B.; Iqbal, M.J.; Shakoori, F.R. and Shakoori, A.R.(2013). Tolerance and biosorption of mercury by microbial consortia: Potential use in bioremediation of wastewater. J. Zool., 45:247-254.

Nanda, M.; Sharma, D. and Kumar, A.(2011). Removal of heavy metals from Industrial effluent using bacteria. J. Environ., 2:781-787.

Nanganuru, H.Y. and Korrapati, N.(2012).Studies on biosorption of cadmium by *Pseudomonas putida.* J. Inter. Engin. Res. Appl., 2:2217-2219.

Nasrazadani, A.; Tahmourespour, A. and Hoodaji, M. (2011). Determination of bacteria resistance threshold to lead, zinc and cadmium in three industrial wastewater samples. J. Environ. Stud., 36:25-27.

Nieboer, E. and Richardson, D. H. S.(1980). The replacement of the nondescript term "heavy metal" by a biologically and chemically significant classification of metal ions. J. Environ. Poll. Ser. B., 1:3-26.

Nies, D.H. (1999) Microbial Heavy-metal Resistance. Appl Microbiol. Biotechnol., 51: 730-750.

Nies, D.H. and Silver, S. (1995). Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. J. Ind. Microbiol., 14: 186–199.

Nishitani, T.; Shimada, M.; Kuroda, K. and Ueda, M. (2010). Molecular design of yeast cell surface for adsorption and recovery of molybdenum, one of rare metals. Appl. Microbiol Biotechnol., 86: 641–648.

FOR AUTHOR USE ONLY

Nourbakhsh, M. ; Sag, Y. ; Ozer, D. ; Aksu, Z. ; Kustal, T. and Caglar, A. (1994). A comparative study of various biosorbents for removal of chromium (VI) ions from industrial waste waters. Process Biochem., 29: 1-5.

Nriagu, J. O. and Davidson, C. I. (1986). Toxic metals in the atmosphere. John Wiley and Sons, Inc. Canada. 635 p.

Nweke, C.O. ; Okolo, J.C. ; Nwanyanwa, C.E. and Alisi, C.S. (2006) .Responce of planktonic bacteria of new calabar river to zinc stress. African. J. Biotechnol. 5:653-658.

Odokuma, L.O. and Ijeomah, S.O.(2003).Tolerance of bacteria to toxicity of heavy metals in the New Calabar River. J. Environ. Sci., 2:128-132.

Onishi, H. and Kamekura, M.(1972). *Micrococcus halobius* sp.n., J. Syst. Bacteriol., 22:233-236.

Padmarathy, V. and Vasudevan, P.(2003).Thermal end spectroscopic studies on sorption of nickel (II) ion on protonated baker's yeast.Chemosphere, Elsevier Ltd., 52:1807-1817.

Pagnanelli, F; Esposito, A.; Toro, l. and veglio, F.(2003). Metal speciation and pH effect on Pb^{+2} ,Cu^{+2},Zn^{+2} and Cd^{+2} biosorption onto *spaerotilus natanl*: Lang muir type empirical model . J. water. Res., 37:627-633.

Pena, M.M.; Lef, J. and Thiele, D.J. (1999). Adelicate balance:homeostatic control of Copper uptake and distribution. J. Nutr., 129:1251-1260.

Perpetuo E.A., Souza C.B., Nascimento C.A.O.(2011).: **Engineering Bacteria for Bioremediation.** In: *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications* Edited by Capri A. InTech .646 p.

Philip, L.; Lyengar, L.and Venkobachar, C. (2000).Biosorption of U, La, Pr, Nd, Eu and Dy by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Industr. Microbiol. Biotechnol., 25: 1-7.

Pinto, C. (2012). Physiological characterization of a *Bacillus licheniformis* strain in chemostat cultivations. J. Bacteriol., 168:839-842.

Pobell, S.S.; Panak, P.; Miteva, V.; Boudakov, I.; Bernhard, G.and Nitsche, H.(1999). Selective accumulation of heavy metals by three indigenous *Bacillus* strains, *B.*

FOR AUTHOR USE ONLY

cereus, *B. megaterium* and *B. sphaericus*, from drain waters of a uranium waste pile. FEMS, Microbiol. Ecol., 29:59-67.

Prescott, L.M. and Harley, J.P.(1996). Laboratory Exercises in Microbiology.3rd ed.WCB/McGraw-Hill,USA. 484p.

Punshon, T. and Adriano, D.C.(1999). Nickel uptake by hybrid poplar:assessing phytoremediation potential.5th Intern.Conf. Biogeochem. Trace Metals, Vienna: 920-921.

Qin, Y.; Shi, B. and Liu, J.(2006).Application of chitosan and alginate in treating waste water containing heavy metal ions. J. Chem. Technol., 13:464-469.

Radhi, S.N. (2012). Optimization of heavy metals chlorides resistance by *Staphylococcus aureus* and its ability to remove them. Iraqi, J. sci., 53:778-785.

Ragan, H.A. and Mast, T.J. (1990).Cadmium inhalation and Male reproductive toxicity. J.Rev. Environ. Contam. Toxicol., 114:1-22.

Raja CE, Selvam GS, Omine K. (2009). Isolation, identification and characterization of heavy metal resistant bacteria from sewage. Int. Joint Symp. on Geodisaster Prevention and Geoenvironment in Asia. 205-211.

Rajbanshi, A. (2008). Study on heavy metal resistance bacteria in guesswork sewage treatment plant. Our Nature, 6: 52-57.

Rajdevi, K. and Yogeeswaran, G. (1999). Co-expression of saccharifying alkaline amylase and pullulanase in *Micrococcus halobius* OR-1 isolated from tapioca cultivar soli. World , J. Microbiol. Biotechnol., 15:223-229.

Rakesh, K.; Singh, R.N.; Amir, K. and Goindi, H.K.(2011).Biodegredation of anthracene and dibenzothiophene in model oil by the desulfurizing cells of *Micrococcus halobius* ED3. J. Pharamacy Res., 4:4025.

Ramachandra, T. V. and Ahalya, N. (2001). Essentials in Limnology and Geography information System (GIS). Energy and Wetlands Research Group, Centre for Ecological Sciences, Indian Institute of Science, Bangalore 560 012, India.

Ray, L.; Paul, S.; Bera, D. and Chattopadhyay, P. (2005). Bioaccumulation of Pb (II) from aqueous solutions by *Bacillus cereus* M_{16} . J. Hazar . Res ., 5: 1-20 .

FOR AUTHOR USE ONLY

Rehman, A.; Shakoori, F.R. and Shakoori, A.R. (2008). Uptake of heavy metals by *Stylonychia mytilus* and its possible use in decontamination of industrial wastewater. World, J. Microbiol. Biotechnol., 24: 47-53.

Rho, J. Y. and Kim, J. H. (2002). Heavy metal biosorption and its significance to metal tolerance of *Streptomyces* . Korea. J. Microbiol .,40: 51-54 .

Roane, T.M. and Pepper, I.L. (2001). Environmental microbiolology In: ROANE, T. M, PEPPER, I. L. (Ed.). Microorganisms and Metal Pollutants. Academic Press, 17:403- 423.

Ryu, H.; Moon, H. S.; Lee, E.; Cho, K. and Choi, H. (2003). Leaching characteristics of heavy metals from Seawage sluge by (*Acidithio bocillus- thiooxidans*) MET, J. Environ. Quality, 32: 745-750.

Samanta, A.; Bera, P.; Khatum, M.; Sinha, C.; Pal, P.; Lalee, A. and Mandal, A.(2012). An investigation on heavy metal tolerance and antibiotic resistance properities of bacterial strain *Bacillus sp*. isolated from Municipal waste. J. Microbiol. Biotechnol. Res., 2:178-189.

Samarth, D.P. ; Chandekar, C.J. and Bhadekar, R.K.(2012). Biosorption of Heavy Metals from Aqueous Solution using *Bacillus licheniformis.* Int. J. Pure Appl. Sci. Technol., 10: 12-19.

Sarwade, V.D. and Gawai, K.R.(2014). Biodegradation of phenol by alkaliphilic *Bacillus badius* D1. J. Environ. Sci. Toxicol. Food Technol., 8:28-35.

Schaffer, C. and Messner, P. (2005) . The structure of secondary cell wall poly- mers : how Gram – positive bacteria stick their cell walls together . J. Microbiol ., 151: 615-643.

Schiewer, S. (1996). Modelling of the proton – metal ion exchange in biosorption . J. Environ . Sci. Technol., 39: 3048-3049 .

Schleifer, K.H. and Kandler , O.(1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications . J. Bact. Res., 36: 407-477.

Sekhar, S.M.CH. (2013). Identification and characterization of predominant heavy metal resistant bacteria isolated from industrial effluents. Society for Sci. Dev. in Agri. Technol., 8:312-315.

FOR AUTHOR USE ONLY

Shapiro, N. and Keasling, J.D.(1996).The recA gene and Cadmium toxicity in *E.coli* K12. J. Microbios, 86:23-26.

Shoeb, E. (2006). Genetic basis of heavy metal tolerance in bacteria. Pak. Res. Repository, 11: 389-490.

Shumi, W.; Hossain, M.d.T. and Anwar, M.N.(2004). Proteolytic activity of a bacterial isolate *Bacillus fastidiosus* den Dooren de Jong. J. Biol. Sci., 4: 370-374.

Silver, S. (1992). Plasmid-determined metal resistance mechanisms: range and overview. In *Plasmid,* 27: 1-3.

Silver, S. (1996). Bacterial resistance to toxic metal ions a review. J. Env. Health Perspective, 105: 98-102.

Singh, V.; Chauhan, P.K.; Kanta, R.; Dhewa, T. and Kumar, V. (2010). Isolation and characterization of *pseudomonase* resistant to heavy metals contaminants. Inter. J. Pharm. Sci. Rev. Res., 3:164-167.

Slepecky, R.A. and Hemphill, H.E. (2006). The genus *Bacillus* . In: Dworkin, M.; Falkow, S. ; Rosenberg, E. ; Schleifer, K.H. and Stackebrandt E. Eds.The prokaryotes. (3rd Ed., 4: 530-562). New york,Springer.

FOR AUTHOR USE ONLY

Smith, R. (2004). Current methods in aquatic science. University of Waterloo, Canada. 382p.

Spain, A. and Alm, E. (2003) .Implications of microbial heavy metal tolerance in the environment. Rev. Undergraduate Res., 2: 1–6.

Stefanescu, I.A.; Gavrila, L.; Mocanu, R.D.; Olariu, R.I. and Arsene, C.(2011). Bioremediation perspective of *Bacillus megaterium* towards heavy metals in environments enriched with phosphogypsum. Rev. Chim. (Bucharest), 62: 245-249.

Tabak, H.H.; Lens, P.; Hullebusch, E.D.V. and Dejonghe, W. (2005). Developments in bioremediation of soil and sediments polluted with metals and radionuclides–1. Microbiolal processes and mechanisms affecting bioremediation of metal

contamination and influencing metal toxicity. Rev. Environ. Sci. Biotechnol., 4: 115-156.

Thakur, I.S. (2006). Environmental Biotechnology Basic concepts and Applications. I. K. International Publishing House, Pvt. Ltd. 486p.

Thirumoorthy, N.; Kumar, K.T.M.; Sundar, A.S.; Panayappan, L.and Chatterjee, M . (2007). Metallothionein: An overview. World, J. Gastroenterol., 13: 993-996.

Thomas, J.; Silhavy; Kahne, D. and Walker, S.(2010).The bacteria cell envelope ,Cold Spring Harb. Perspect Biol., 2:1-23.

Tietjen, J.H.; Khanbilvadi, R.; Gorchenko, Y. and Kulakova, P. (1999) . Biological water quality assessment of macro invertebrates Inhabiting small streams in the Sasyk reservoir region of Ukraine. In: Environment Practice J. Nat. Assoc. Environ. Prof., 1: 97 - 101 .

Tsuruta, T. (2005).Separation of rare earth elements by microorganisms.J. Nucl. radio. chem. Sci., 6 :81-84.

US-EPA, Environmental Protection Agency. (1995). Vascular plants as indicators of Prairie wetland integrity. Report EPA 1600/R. 96/082.

Varghese, R.; Krishna, M.P.; Babu, A.V. and Hatha, A.A.M.(2012).Biological removal of lead by *Bacillus sp*. obtained from metal contaminated industrial area. J. Microbiol. Biotechnol., 2:756-770.

Vary, P.s.; Biedendieck, R.; Fuerch, T. and Meinhardt, F. (2007).*Bacillus megaterium* from simple soil bacterium to industrial protein production host. Appl. Microbiol. Biotechnol., 76:957-967.

Velusamy, P.; Awad, Y. M.; Abd El-Azeem S. A. M. and Ok, Y. S.(2011). Screening of heavy metal resistant bacteria isolated from hydrocarbon contaminated soil in Korea. J. Agri. Environ. Sci., 23:40-43.

Vidali, M. (2001). Bioremediation. Overview. Pure Appl. Chem., 73:1163-1172.

Vijayaraghavan, K and Yun, YS. (2007). Utilization of fermentation waste (*Corynebacterium glutamicum*) for biosorption of Reactive Black 5 from aqueous solution. J. Hazard Mater., 141: 45–52.

FOR AUTHOR USE ONLY

Vishwanatha, T.; Jain, S.N.; Reena, V.; Divyashree, B.C.; Siddalingeshwara, K.G.; Karthic, J. and Sudipta, K.M. (2010). Screening of substration for Protease production from *Bacillus licheniformis.* Int. J. Eng. Sci. Technol., 2: 6550-6554.

Volesky, B. (1990). Biosorption of Heavy Metals. CRC press, Inc., N. W., Boca Raton, Florida, 33431. United stated. 372p.

Volesky, B. (2001). Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. Hydrometallurgy, 59: 203-216.

Volesky, B. and Holan, Z.R.(1995). Biosorption of heavy metals .Biotech. Prog., 11: 235–250.

Vymazal, J. (1987). Toxicity and accumulation of cadmium with respect to algae and cyanobacteria: A review. In: Toxicity Assessment: An International Quarterly, New York: J. Wiley & Sons, 2: 387-415.

Vymazal, J. (1990). Toxicity and accumulation of lead with respect to algae and cyanobacteria . Acta Hydrochem. Hydrobiol. 18 : 531-535.

Wang, J. and Chen, C. (2006). Biosorption of heavy metal by *Saccharomyces cerevisiae.* J. Biotechnol. Adv., 24: 427-451.

Wase, B. and Forster, C.(1997). Biosorbents For Metal Ions. Taylor and Francis Ltd, Gunpowder square, Lndon EC4A 3DE. 410p.

Wetzel, R. G. (2001). Limnology, lake and river ecosystems 3th ed. Academic Press, an Elsevier Science imprint, San Francisco, New York, London.1006.

WHO (1993). Guidelines for drinking water Quality. 2nd ed., (1), Geneva.

WHO (2004). Guidline for Drinking Water Quality. 3rd ed., (1), Geneva.

Willy, J.; Sherwood, L. and Woolverton , C.(2008) . Prescott's Principles of Microbiology. MC. Graw-Hill , Newyork.

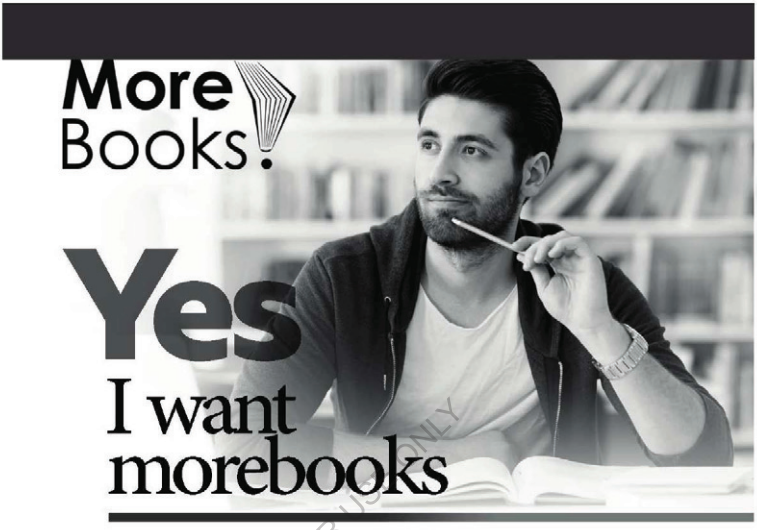
Young, R.V. (2000). World of Chemistry. Farmington Hills, MI: Gale Group,1360p.

FOR AUTHOR USE ONLY

Zhuang, W.; Tay, J.; Maszenan, A.; Krumholz, L. and Tay, S. (2003). Importance of gram positive naphthalene-degrading bacteria in oil contaminated tropical marine sediments . Lett. Appl. Microbiol., 36:251-257.

FOR AUTHOR USE ONLY

FOR AUTHOR USE ONLY



اشتري كتبك سريعا و مباشرة من الأنترنيت, على أسرع متاجر الكتب الالكترونية في العالم
بفضل تقنية الطباعة عند الطلب, فكتبنا صديقة للبيئة

اشتري كتبك على الأنترنيت
www.morebooks.shop

FOR AUTHOR USE ONLY

Kaufen Sie Ihre Bücher schnell und unkompliziert online – auf einer der am schnellsten wachsenden Buchhandelsplattformen weltweit! Dank Print-On-Demand umwelt- und ressourcenschonend produziert.

Bücher schneller online kaufen
www.morebooks.shop

KS OmniScriptum Publishing
Brivibas gatve 197
LV-1039 Riga, Latvia
Telefax: +371 686 204 55

info@omniscriptum.com
www.omniscriptum.com

OMNIScriptum

FOR AUTHOR USE ONLY

FOR AUTHOR USE ONLY