

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
جامعة منتوري قسنطينة  
كلية العلوم  
قسم علوم الطبيعة و الحياة

رسالة:

قدمت للحصول على شهادة دكتوراه دولة

تحت عنوان .

**تأثير التلوث بالزئبق على انتشار فطريات التربة بمنطقة  
مزابية**

إعداد : مناد احمد

2007

## 1. المقدمة وأهداف البحث

إن كمية الزئبق التي تحركت وتحتررت إلى داخل الغلاف الحيوي تزايدت منذ عصر النهضة الصناعية. وبينت تقديرات تدفق الزئبق من كل من المصادر الطبيعية والبشرية أن انتشار الزئبق من المصادر البشرية قد تجاوز المصادر الطبيعية (Mason و آخرون، 1994). أغلب الزئبق في الغلاف الجوي يكون على الصور المعدنية التي تتحرك داخل الغلاف الجوي وبالتالي يمكن أن تنتشر على بعد آلاف الكيلومترات مؤدية إلى تلوث كل من التربة والمسطحات المائية. إن كمية الزئبق المتحررة نتيجة النشاط البشري قد انخفضت نتيجة لمنع استخدامه في بعض المسارات الصناعية وتوقف انبعاثه من بعض المناجم القديمة (Biester و آخرون 2002). أثناء حركة الزئبق بين كل من الغلاف الجوي والغلاف الأرضي والغلاف المائي فإنه يخضع لسلسلة من التحولات الفيزيائية والكيميائية المعقدة مثل الميثلة الحيوية واللاحيوية أو الأكسدة مما يزيد من مدى سمية هذا المعدن ومعدل تيسره الحيوي. يمثل الحرق البارد وحرق الفضلات أحد مصادر انتشار الزئبق الهامة من مصانع الكلور والصودا الكاوية التي تستخدم الزئبق المعدني في عملية التحلل الكهربائي أثناء إنتاج الكلور. بينت العديد من الدراسات أنه بالرغم من أن الزئبق المنبعث من المصانع ينتشر على مسافات بعيدة ولا يترسب حول بجوار المصانع سوى كميات قليلة إلا أن التربة المجاورة لهذه المصانع تحتوي على تراكيز من الزئبق تصل إلى 75 مرة ضعف القيم المرجعية. كما أن الزئبق المترسب في التربة يتعرض للعديد من التحولات البيولوجية والكيميائية مثل أكسدة  $Hg^0$  واختزال  $Hg^{2+}$  أو الميثلة و التي تعتمد على حموضة التربة و الحرارة ومحتوى التربة من حمض الهيوميك (Weber، 1993).

إن حركة الزئبق في التربة من خلال تكوين مركبات زئبق لا عضوية ذائبة مثل  $Hg(OH)$  و  $HgCl_2$  ذات أهمية نسبية في وجود المادة العضوية وذلك نتيجة الارتباط القوي للزئبق بالمواد الدبالية. إذ أن تكوين معقدات الزئبق تمثل الأنظمة الأكثر سيادة نتيجة ألفة  $Hg(II)$  ومركباته غير العضوية إلى المجاميع الوظيفية المحتوية على الكبريت. فمن جهة فإن هذا السلوك في تكوين المعقدات يحدّ بقوة من حركة الزئبق في التربة وذلك لأن أغلب الزئبق في التربة يكون مثبتا بالمادة العضوية وبالتالي لا يكون متحركا إلا من خلال التمليص من خلال ارتباطه التربة المعلقة والدبال. ومن جهة أخرى فإن  $Hg(II)$  يمتص جزئيا في مركبات التربة العضوية مثل أحماض fulvic وبالتالي يمكن أن ينتشر جزئيا في الطور الذائب. إلا أن معدل توضع الزئبق من الغلاف الجوي إلى التربة يفوق معدل غسله من التربة لذا فإن توزيع الزئبق يمثل جزءا صغيرا من كمية الزئبق المخزنة في التربة. بالرغم من أن الزئبق يتميز بزمن احتباس كبير في التربة إلا أنه يمكن أن يتحرر إلى

أسطح المياه مع مرور الزمن، وعليه فإنّ استمرار تدفق الزئبق من المصدر البشري يؤدي إلى تلوث المحيط البيئي وقد أوضحت التقديرات الحديثة أنّ حوالي 95 % من الزئبق ذو المصدر البشري يبقى في التربة الأرضية (EPA، 1997).

يمثل الزئبق أحد المعادن الثقيلة الشديدة السمية؛ وقد أعتبر ملوثا عاما نظرا لإمكانية تحركه لمسافات بعيدة عبر الجو وتراكمه الحيوي (Mormo-Jiménez وآخرون، 2006)، لذا أوليت دراسة سلوكيات الزئبق في المحيط العالمي اهتماما كبيرا منذ ثمانينات القرن العشرين (Wang وآخرون، 2003). بعد انتشار الزئبق لمسافات معينة في الجو فإنه يعود ثانية إلى التربة من خلال الترسب الرطب أو الجاف حيث أنّ أكثر من 90 % منه يدخل إلى النظام البيئي الأرضي وتصبح التربة الحاضن الأكبر للزئبق (Fitzgerald، 1995) ويوجد الزئبق في الغلاف الجوي أساسا على صورتين رئيسيتين هما الزئبق المعدني ( $Hg^0$ ) ومركبات الزئبق الثنائي التكافؤ وكل منها يكون في الحالة الغازية أو مرتبطا بالجسيمات (Lindqvist وآخرون، 1991)، وعموما فإنّ الزئبق العضوي أكثر سمية بالنسبة للأحياء من الصور غير العضوية، إلا أنه في بعض الظروف الخاصة فإنّ الصور غير العضوية يمكن أن تتحول إلى الصور العضوية (WHO، 1976) وأهمها تحول الزئبق من الصور غير العضوية إلى مثل الزئبق الذي يمثل الصورة الأكثر خطورة والتي تكون وراء التسمم البشري الحاد والمزمن بسبب تميزها بمعدل التراكم الحيوي العالي الناتج عن قابلية ذوبانها بالأغشية الحيوية (WHO، 1976).

عند تراكم المعادن الثقيلة في الخلايا الفطرية فإنّ سميتها تؤدي إلى تثبيط النمو، ويعتمد بقاء الخلايا على قدرتها على تنظيم التركيز الداخل خلوي لأيونات المعدن. تستطيع العديد من الفطريات تخزين وتحمل تراكيز عالية من المعادن الثقيلة (Miersch وآخرون، 2001)، وتتضمن الاستجابات البيوكيميائية ترسيب المعادن في الجدر الخلوية أو ربطها مع مركبات أخرى أو التقليل من النفاذية الغشائية أو زيادة تدفق هذه المعادن الثقيلة أو مخلبتها داخل السيتوزول ونقلها إلى داخل الفجوات العصارية (Ow وآخرون، 1998).

في الجزائر أقيم في السبعينات (1970s) مصنع لاستخلاص الزئبق بمنطقة عزّابة بالشرق الجزائري والذي يتم استخراجها من مناجم كبريتيد الزئبق ( $HgS$ ) الموجودة بالمنطقة. يتم الحصول على الزئبق المعدني من خلال أكسدة كبريتيد الزئبق هوائيا على درجة حرارة 800 م° حيث يتحول الزئبق إلى الصورة المعدنية الغازية التي يتم تكثيفها وتمييعها إلى الصورة السائلة عن طريق إمرارها في أنابيب تبريد ثم يجمع في قوارير خاصة للتسويق، أما الكبريت فيتحد في ظروف هذا التفاعل مع الأكسجين مكونا ثاني أكسيد الكبريت ( $SO_2$ ) الذي يتطاير مع المخلفات الغازية الناتجة من التفاعل

عبر مدخنة الفرن الحراري الخاص بعملية الصهر. وعلى أساس هذا التفاعل يتم الحصول على 95 % من الزئبق المعدني المتواجد ضمن صخور الـHgS بينما تتلاشى 5 % على صورة مخلفات غازية وصلبة يتم تفريغها في المحيط البيئي المجاور.

و قد تمّ غلق هذا المصنع منذ سنة 2004 إلا أنّ عملية التصنيع هذه والتي دامت لما يزيد عن الثلاثين سنة قد خلفت آثارا بيئية لا زالت تعاني منها هذه المنطقة والتي تعتبر من أهم المناطق الزراعية بالشرق الجزائري. وتهدف هذه الدراسة إلى إجراء تقييم للتأثير الذي خلفه التلوث بالزئبق على فطريات تربة الأراضي الزراعية المجاورة لبقايا المصنع بعد توقف نشاطه، ولتحقيق هذا الغرض فقد أخذت الدراسة المراحل التالية :

- 1- دراسة التوزيع العمودي والسطحي لتركيز الزئبق في تربة الطبقة السطحية (0-20 cm) وتحت السطحية (20-40 cm) في 18 موقعا تحيط بالمصنع.
- 2- تحديد العلاقة بين تركيز الزئبق في التربة والخواص الفيزيائية والكيميائية للتربة من خلال الدراسة الإحصائية عن طريق تحليل المكونات الرئيسية (APC) والانحدار الخطي.
- 3- تحديد المواقع التي يمكن اعتبارها لازالت تحت تأثير التلوث والمواقع التي يمكن اعتبارها خارج مجال التلوث من خلال تحديد الحد الأدنى لتركيز الزئبق المسموح به في تربة المنطقة والمبني على أساس خواص التربة.
- 4- دراسة انتشار وترداد الفطريات على مستوى تربة الطبقة السطحية (0-20 cm) للمواقع المنتخبة.
- 5- تحديد العلاقة بين تركيز الزئبق في التربة وترداد الفطريات على مستوى تربة الطبقة السطحية (0-20 cm) للمواقع المنتخبة من خلال الدراسة الإحصائية عن طريق تحليل المكونات الرئيسية (APC) والانحدار الخطي.
- 6- تحديد الأنواع الفطرية الحساسة والمقاومة لعنصر الزئبق من خلال الدراسة المخبرية لتأثير كلوريد الزئبق على الفطريات التي تمّ عزلها من التربة.
- 7- دراسة آليات المقاومة لدى الأنواع التي لها القدرة على تحمل ومقاومة الزئبق عن طريق دراسة تأثير التراكم الحيوي للزئبق بالميسليوم الفطري على كل من: الكتلة الحيوية، الأحماض الدهنية، الأحماض العضوية، الأيضيات الثانوية، البروتينات، المركبات الثيولية، الإجهاد التأكسدي،
- 8- دراسة آليات المقاومة لدى الأنواع التي لها القدرة على تحمل الزئبق على المستوى الجيني باستخدام تقنية الـRAPD-PCR

- 9- تحديد هذا التأثير على مستوى مظهر الشكليات من خلال الفحص المجهر الضوئي وعلى مستوى العضيات الخلوية من خلال الفحص بالمجهر الإلكتروني.
- 10- وبغرض البحث عن إمكانية استخدام الكتلة الحيوية في التخلص من الزئبق الذي يلفظ مع مياه الصرف المتخلفة عن بعض النشاطات الصناعية للزئبق واستعادته للاستعمال مرة أخرى دون أن ينجم عن ذلك تلوث بيئي فقد أجريت دراسة حول الإدمصاص الحيوي للزئبق بواسطة ميسيليوم الفطريات المقاومة ثم تحديد منحنيات التعادل الحراري التي يمكن أن تصف عملية الإدمصاص.

2

# موضوع الدرسة في المراجع

## 2. موضوع الدراسة في المراجع

### 1.2 الزئبق في الطبيعة

#### 1.1.2 معدن الزئبق

الزئبق معدن سائل أبيض فضي، وهو المعدن الوحيد الذي يكون سائلاً عند درجة الحرارة العادية وتحت الضغط العادي. يتبخر عند درجة الحرارة العادية. يذوب في حمض النتريك المخفف ولكنه لا يذوب في الماء، كما أنه يدخل في تفاعلات طاردة للحرارة مع المعادن القلوية وعند تسخينه يتحد بسهولة مع الكبريت ويتحد مع الهالوجينات في درجات الحرارة العادية. ويكوّن ملغماً مع كل المعادن باستثناء الحديد والنيكل والألمنيوم والكوبالت والبلاتين ويتميز بناقلية كهربائية جيدة. يؤكسد بواسطة حمض الكبريتيك وحمض النتريك المركزين ويتميز بثلاثة أنواع من درجات التكافؤ وذلك حسب صورته في الطبيعة وهي الصورة المعدنية ( $Hg^0$ )، صورة الزئبقوز ( $Hg^{2+}$ ) وصورة الزئبقيك ( $Hg_2^{2+}$ ). وحسب (Glinkac، 1987) تتلخص خواصه الفيزيائية فيما يلي:

1- الرمز الكيميائي Hg

2- الرقم الذري 80

3- الوزن الذري 200.89

4- التكافؤ 0، 1، 2

5- درجة الغليان 356.72 م

6- نقطة الانتشار 38.72 م

7- الكثافة ( عند درجة حرارة 25°م) 13.534

خلال تمرير التيار الكهربائي خلال أبخرة الزئبق يظهر تفرغ كبير للأشعة فوق البنفسجية وتستغل هذه الظاهرة في صناعة الإضاءة اليومية.

#### 2.1.2 مشتقات الزئبق

يوجد في الطبيعة نوعان من مشتقات الزئبق. مشتقات عضوية ومشتقات غير عضوية. المشتقات غير العضوية قد تكون أحادية التكافؤ مثل كلوريد الزئبقوز  $Hg_2Cl_2$  وقد تكون ثنائية التكافؤ مثل كلوريد الزئبقيك  $HgCl_2$ . أما المشتقات العضوية فإن الصيغة العامة لها هي  $R-Hg-X$ ، وقد تكون R جذر الكيل أو الكوكسيل أو فنيل. تكون المشتقات ثنائية التكافؤ أكثر ذوباناً من المشتقات الأحادية التكافؤ، أما المشتقات العضوية فإنها تذوب في الدهون وعلى الخصوص ميثيل الزئبق مما يفسر تراكمه الحيوي وانتشاره في الأجسام والمشتقات المعدنية أقل تطايراً من الزئبق

المعدني. بعض المشتقات العضوية شديدة التطاير وخاصة ثنائي مثيل الزئبق Me-Hg-Me مما يفسر انتشار الزئبق في الجو و حدوث عمليات التسمم المهني في أماكن العمل. يختلف الثبات الكيميائي لمركبات الزئبق حسب الصورة الكيميائية له، فالمشتقات المعدنية سهلة الاختزال إلى الزئبق المعدني ( $Hg^0$ )، أما المشتقات العضوية فمختلفة الثبات حيث نلاحظ أنّ المشتقات الألكيلية أكثر ثباتاً من المشتقات الألكوكسيلية والأريلية التي لها قابلية للتحلل محررة أيونات  $Hg^{2+}$  (keck، 1979).

### 3.1.2 مصادر الزئبق في الطبيعة

#### 1.3.1.2 المصادر الطبيعية

ينتشر الزئبق في الغلاف الحيوي بكل مكوناته وإن كانت صورته الكيميائية تختلف من جزء إلى آخر. ففي الغلاف الصلب يحتل الزئبق الرتبة السادسة عشر في قائمة المعادن المتواجدة بالقشرة الأرضية حيث يكون متواجداً بشكل أساسي على صورة كبريتيد الزئبق، يصل المعدل العام للزئبق في القشرة الأرضية إلى 50 ng/g. وقد يتجاوز هذه المعدلات في كثير من الأجزاء وخاصة في التربة العضوية (Lofroth، 1972)، كما يلعب النشاط البركاني دوراً هاماً جداً في عملية تحرر الزئبق على صورة بخار ( $Hg^0$ ). وقد لوحظ أنّ المعدلات الطبيعية العالية للزئبق المنتشرة بالتربة توجد بالتوازي مع الأحزمة الأرضية المتحركة والمناطق المضطربة التي تتميز بنشاط بركاني ونشاط زلزالي (keck، 1979). أغلب الزئبق المعدني المتواجد في الجو يكون على صورة بخار ويختلف معدله حسب المناطق الجغرافية. فيتواجد بكثرة في الأماكن التي تكون فيها التربة غنية بالزئبق وكذلك في المناطق التي تنشط فيها الميثلة الميكروبية للزئبق غير العضوي لقدرة الزئبق الكبيرة على التبخر، ومعظم الزئبق المتطاير في الجو يعود مرة ثانية إلى المسطحات المائية عن طريق الأمطار (Wallace وآخرون، 1979) مؤدياً إلى تلويثها، كما يلعب التآكل الطبيعي للزئبق المتواجد ضمن التربة والصخور دوراً رئيسياً في زيادة تركيز الزئبق في الجو وفي المياه وعلى هذا الأساس فإن أعلى تراكيز الزئبق المتواجد في الغلاف المائي تتواجد في المياه الصالحة للشرب.

### 2.3.1.2 مصادر النشاط البشري

#### 1.2.3.1.2 المصادر الزراعية

ظهر استعمال مركبات الزئبق الألكيلية كمبيدات فطرية في بداية الأربعينيات حيث استخدمت على نطاق واسع جداً لأنه كان يظن أنه عند استعمال المبيد بطريقة جيدة في تحسين الزراعة فإنه يترك آثاراً بسيطة من الزئبق في المحصول وعلى ذلك فقد تم تحضير أكثر من 180 مبيد حشري



يدخل في تركيبها الزئبق (D'tiri، 1972) إلا أنه ظهر فيما بعد بأن هذا الاستعمال كان السبب وراء تراكم الزئبق عبر السلاسل الغذائية عن طريق الطيور والحيوانات آكلات البذور التي تعمل على تركيز الزئبق في مفترساتها (WHO، 1976). كما ظهر تسمم جماعي في العديد من مناطق العالم نتيجة تناول الحبوب المعاملة، كما حدث في الولايات المتحدة الأمريكية (Pierce وآخرون، 1972) وفي العراق (Bakir وآخرون، 1973)، مما دفع بعض الدول إلى التقليل من استخدام المبيدات الزئبقية في العمليات الزراعية. فامتعت السويد عن استعمال المركبات الألكيلية للزئبق في معاملة البذور (WHO، 1976) مما أدى إلى انخفاض الزئبق في كثير من المواد الغذائية، كما منع في كندا استخدام المبيدات الفطرية وذلك ابتداء من سنة 1973 (Wheatly، 1979). وقد عملت بعض الدول على استبدال المشتقات الألكيلية وخاصة مثل الزئبق بالمشتقات الألكوكسيلية. ولا يقتصر تأثير هذه المركبات على الفعل التراكمي بل يؤدي كل من التطاير لبعض منها وكذا عملية الغسيل التي تقوم بها الأمطار إلى انتقال الزئبق إلى المياه الجوفية.

### 2.2.3.1,2 المصادر الصناعية

يؤدي استخلاص الزئبق عن طريق صهر كبريتيد الزئبق وكذلك حرق مصادر الطاقة مثل الفحم والبتروكيمياويات إلى انتشار كميات عالية جدا من الزئبق في الجو والماء والتربة (Wallin، 1976). كما يعتبر الزئبق المتواجد ضمن المخلفات الصناعية مثل صناعة الورق وصناعة الأجهزة الكهربائية والمواد الكيميائية المصدر الرئيسي للزئبق غير العضوي المتواجد في المجاري والمساحات المائية وفي الهواء (keck، 1979). وقد كان يظن أن مركبات الزئبق غير العضوية المترسبة في المياه تكون غير ضارة نسبيا إلا أنه ظهر فيما بعد أن الزئبق غير العضوي تتم ميثلته بواسطة بعض الكائنات الدقيقة التي تتواجد بوفرة في الوديان ورواسب البحيرات (Jernelov و Jensen، 1969). ومثل الزئبق الناتج من الكائنات الدقيقة يتركز عبر السلاسل الغذائية حتى يصل إلى معدلات مرتفعة جدا في أجسام الكثير من الأسماك والثدييات ودون أن يحدث له أي تغيير في صورته الكيميائية (Swedish Expert Groups، 1979)، فمثلا في السويد وجد أن معدل الزئبق في بعض الأسماك التي تم صيدها من المناطق الملوثة كان يصل إلى 1 mg/Kg بينما وصل في بعض الكائنات المائية الأخرى إلى تركيز 5 mg/Kg، وأما في منطقة ميناماتا باليابان والتي ظهر بها أول تسمم وبائي بالزئبق فقد تراوح معدل ميثل الزئبق في الأسماك بين 10 و 30 ppm (Trukayama، 1977). ويمثل هذا أحد مصادر انتقال الزئبق إلى الإنسان، مما دفع المختصين بعلم التسمم البيئي إلى التدخل وتحديد حدود الأمان لتراكيز الزئبق في المياه وفي المواد الغذائية. كما بينت منظمة الصحة العالمية أن بعض النشاطات الصناعية الأخرى مثل إنتاج الإسمنت والفسفات وصهر وسبك المعادن تساهم ولو بنسبة قليلة في انتشار الزئبق (WHO، 1979).

## 2.2 الفطريات في التربة

لا تكون الفطريات الجزء الأكبر من محتوى الكائنات الحية بالتربة، إلا أنها تمثل جزءا كبيرا من الكتلة الحيوية في الأراضي الزراعية جيدة التهوية، وترجع القلة النسبية لعددها وفي نفس الوقت تمثيلها لجزء كبير من الكتلة الحيوية إلى غزارة نموها على صورة هيفات سميكة ومنشبكة، وتسود الفطريات كبقية الكائنات الحية الدقيقة في المخلفات النباتية بالأراضي الزراعية وكذا الأراضي الغنية بالمادة العضوية. وعموما تعتبر الفطريات المسؤول الأول عن تحليل المواد العضوية في الأوساط الحامضية. تنمو الفطريات في صورة هيفات تتشابك مع بعضها مكونة غزلا فطريا يطلق عليها اسم الميسليوم. والهيفا قد تكون مقسمة أو غير مقسمة بجدر عرضية. ويكون سيتوبلازم الهيفات غير المقسمة على صورة كتلة واحدة تحتوي على العديد من الأنوية. قد تكون الهيفا خضرية وقد تكون خصبة أي تحتوي على أبواغ جنسية ولا جنسية. وتكون الجراثيم الجنسية محدودة الانتشار بينما تكون الكونيديات أو الأبواغ اللاجنسية وفيرة وواسعة الانتشار وتتأثر مجمل هذه الصفات بالعوامل البيئية المحيطة.

### 1.2.2 تأثير العوامل البيئية على فطريات التربة

يختلف انتشار الفطريات ونشاطها الفيزيولوجي باختلاف المواقع، بل إن الموقع الواحد تحدث فيهذبذبة واضحة في إعداد الفطريات ونشاطها الكيميائي الحيوي وهذا باختلاف الأوقات. إضافة إلى ذلك يؤدي اختلاف نوع التربة وخواصها الكيميائية والطبيعية إلى اختلاف كثافة الميكروبات والأجناس السائدة فيها، وتعتمد مقدرة أي فطر على البقاء ومدى تأقلمه واستقراره في وسط ما على الظروف البيئية المحيطة ومن أهمها: المادة العضوية، الأس الهيدروجيني (pH)، التسميد العضوي والمعدني، نسبة الرطوبة، التهوية، الحرارة، الموقع من قطاع التربة، فصول السنة، نوعية الزراعة القائمة.

### 1.1.2.2 المادة العضوية

تعتمد الفطريات في توزيعها على مدى توفر المواد العضوية القابلة للأكسدة وذلك لأنها من الكائنات ذاتية التغذية. وعموما تختلف أعداد الفطريات باختلاف محتوى التربة من المادة العضوية. تؤدي إضافة بقايا المحاصيل أو أي مادة كربونية أخرى للتربة إلى زيادة ملحوظة في كثافة الفطريات والتي تعتبر الأنواع السائدة حيث تنتشر على وجه الخصوص أجناس *Mucor*، *Penicillium*، *Fusarium*، *Apergillus*، *Trichoderma* ويبلغ التأثير المنشط للمادة العضوية على الفطريات أشده خلال الفترة الأولى لتحلل المادة العضوية التي غالبا ما تتخللها شبكة الهيفات الفطرية وتتميز

بعض الأنواع بكثافة أعدادها فور إضافة المادة العضوية ثم تأخذ في النقصان السريع بعد ذلك، بينما نجد أنواع أخرى تحافظ على الزيادة في أعدادها لفترة أطول نسبيا بعد إضافة البقايا النباتية، كما يختلف تأثير المادة العضوية باختلاف التركيب الكيماوي للمادة العضوية ذاتها وباختلاف الظروف البيئية المحيطة حيث نجد أنّ الفطريات تسود المجاميع الميكروبية على الخصوص عقب إضافة المادة العضوية إلى أوساط بيئية حمضية ومزودة بمصادر نيتروجين كافية.

### 2.1.2.2 الأس الهيدروجيني (pH)

تؤثر درجة الأس الهيدروجيني على ذوبان الشوارد المعدنية في محلول التربة. حيث يزداد تحررها مع انخفاض الأس الهيدروجيني بينما يقل تيسرها عند ارتفاع الأس الهيدروجيني بسبب دخولها في تكوين معقدات غير قابلة للذوبان، ويؤثر كبح هذه الشوارد على النشاط الأنزيمي الذي يحتاج إلى الأوساط المعدنية، وتتأثر النفاذية الغشائية للخلايا بسبب الاختلال بين التركيز الداخلي والتركيز الخارجي. يختلف الأس الهيدروجيني الملائم لنمو الفطريات باختلاف الأجناس والأنواع والسلالات. وكثير من الأنواع تنمو في نطاق أس هيدروجيني واسع ينحصر بين الحموضة الشديدة والقاعدية الزائدة وكثيرا ما يوجد بعض الأنواع لها القدرة على النمو عند أس هيدروجيني من 2-3، بينما العديد من الأنواع تحافظ على نشاطها عند أس هيدروجيني 9 أو أكثر والقليل ينمو عند أس هيدروجيني أكبر من 9، وتسود الفطريات في الأوساط الحامضية وتلعب دورا أساسيا في التحولات الكيمائية الحيوية ولا يرجع ذلك إلى أن الحموضة تمثل الظروف المثلى لنمو الفطر ولكن يرجع ذلك إلى أنه في الوسط الحامض لا يوجد تنافس على المواد الغذائية حيث أنّ الفطريات يمكنها تحمل الحموضة في حين أن البكتيريا و الإكتنوميستات التي تحتاج إلى نطاق أس هيدروجيني ضيق تكون حساسة لهذه الحموضة ولذلك تتوفر الظروف لسيادة الفطريات.

### 3.1.2.2 الرطوبة

عموما تتطلب الفطريات نسبة عالية من الرطوبة لنموها ومعظمها يفضل درجة رطوبة أكبر من 95%، وينخفض نموها عند رطوبة اقل من 80% ، ويصل نشاط الفطريات الحد الأدنى عند الانخفاض الملحوظ في درجة الرطوبة. وإنّ التحسن في مستوى الرطوبة يؤدي إلى زيادة في أعدادها التي تتناسب مع كمية الرطوبة. بعض الفطريات تقاوم وتصمد في الظروف شبه الجافة. إلا أنّ زيادة الرطوبة إلى درجة كبيرة له تأثير معاكس لأنه يحد من انتشار الأكسجين داخل التربة وبذلك يقل التمثيل الغذائي للفطريات وخصوصا الهوائية، غير أنّ بعض فطريات *Mucor* تتناسبها هذه الظروف فتزيد أعدادها.

## 4.1.2.2 التهوية

تعتبر الفطريات الخيطية كائنات دقيقة هوائية إجبارية عموماً بالرغم من وجود بعض الشواذ التي تستطيع النمو بدرجة بسيطة في غياب الأوكسجين (Alexndar و Gunner، 1964). حتى إنه بالنسبة لبعض الأنواع الهوائية إجباراً نجد أنّ جزءاً من الغزل الفطري قد يتغلغل في بعض المناطق الخالية من الـO<sub>2</sub> ولكن غالبية كتلة الغزل الفطري تتواجد في المناطق المتوفرة بها الـO<sub>2</sub> وقد يفسر اعتماد الفطريات على الأوكسجين تمركزها في الطبقة السطحية من التربة وغياب هذه الكائنات الحية في الطبقات العميقة بالأراضي العضوية من أصل نباتي وبأراضي المستنقعات. وبالمثل في الأراضي المعدنية الغدقة تقل أعداد الفطريات لدرجة يكون فيها النشاط الحيوي متوقفاً. وبعض الفطريات يمكنها مقاومة هذه الظروف غير الملائمة لفترة طويلة بتكوينها أبواغ مقاومة.

## 5.1.2.2 الحرارة

معظم الفطريات وسطية الحرارة و توجد سلالات قليلة أليفة للحرارة في الأراضي العادية وهي توجد في الأسمدة العضوية حيث يزيد عددها بارتفاع درجة الحرارة أثناء عملية التخمير حيث يمكنها أن تتكاثر على درجة 50 م° وأحياناً 55 م°، والفطريات التي تنمو على درجة 37 م° تتمركز على سطح التربة حيث تتوفر الحرارة المناسبة خاصة خلال فصل الصيف. من الفطريات أليفة الحر والمنشرة في التربة بعض الأنواع التابعة لأجناس *Chaetomium* ، *Humicola* ، *Mucor* ، *Aspergillus* وقد تظهر نمو فطريات على أطباق فيري محصنه على درجة حرارة 6 م° *Mucor* ، *Penicillium* ، *Cladosporium* التي يزداد انتشارها في التربة بازدياد قطاع التربة.

## 6.2.2 عمق التربة

تنتشر الفطريات بأعداد كبيرة في الطبقة السطحية للتربة المزروعة في حين توجد أكبر كثافة عديدة غالباً في الأفق B لأراضي المراعي وتحتفظ الميكروبات بأعدادها الكبيرة في طبقات ما تحت التربة وإلى عمق قد يصل إلى الأكثر من متر وتزداد أنواع الفطريات الموجودة في الطبقة السطحية من القطاع، كما أن النوع السائد يختلف من طبقة إلى أخرى وتعزى الزيادة في أعداد الفطريات بدرجة ملحوظة في الطبقة العليا من القطاع في معظمها إلى تواجد المواد العضوية بكمية كافية. أما الاختلاف في الأنواع السائدة فقد يتعلق بتأقلمها على النمو في وجود تراكيز منخفضة من O<sub>2</sub> أو تراكيز عالية من CO<sub>2</sub> في المناطق العميقة.

## 3.2 فطريات التربة والتلوث بالمعادن الثقيلة

تتعرض الفطريات والكائنات الأخرى إلى مجموعة كبيرة من الملوثات عند نموها في البيئة. أهم هذه الملوثات يكون جويًا ويتمثل في كل من المطر الحامضي والمعادن السامة، إلا أن دراسة تأثير الملوثات على الفطريات مليء بالمصاعب وهذا ناتج أساسًا من عدم تماثل التقنيات المستخدمة والميسرة حاليًا في دراسة الفطريات في المحيط البيئي، غير أن تقدير تأثير الملوثات التي يمكن أن تؤثر على الفطريات يمكن الوصول إليه من خلال توافق وتجميع التقديرات والقياسات التالية:

1. تركيز وتركيب وتوزيع الملوث.
2. تركيز الملوث الذي يكون ميسرًا للمجاميع الفطرية.
3. تركيز الملوث الذي يمكن أن تكون له استجابة سمية أو فيزيولوجية *in vitro*.
4. تأثير الملوث على تركيب وحجم المجاميع والعشائر الفطرية.
5. التغيرات الثانوية التي تنتج من تأثير الملوثات على المجاميع الفطرية مثل تأثير تحلل قش الأوراق.

بالرغم من أن تركيب وتركيز الملوث يكون نسبيًا سهل المنال لتقنيات التحليل القياسية فإن العديد من استخدامات المحاليل المستخلصة الشائعة الاستخدام لا يمكن أن تعطي بدقة درجة تيسر الملوث. تتميز دراسة تأثير الملوثات على حجم وتركيب العشائر / والمجاميع الفطرية بصعوبة خاصة في التقييم. لجأ العديد من العاملين إلى طريقة العد بالأطباق المخففة للوصول إلى ما يطلق عليه العدد الفطري والتي تستخدم فيما بعد في تقييم أي تغيير في تركيب العشيرة الفطرية. تعرض ضعف هذه الطريقة لنقد شديد (Cooke و Ragner، 1984). إلا أن بعض الباحثين كان أقل نقداً لطريقة العد بالأطباق المخففة. فمثلاً States (1981) وكذا Fritze و Basth (1993) مثلاً دافع على ما اسموه قدرة التبوغ (Sporulation capacity) للتربة بما لأنها تعطي صورة عن تأثيرات التوضع القاعدي على المجاميع الفطرية مماثل لما يمكن الوصول إليه بطريقة غسيل التربة والتي يفترض أنها تساعد في عزل الهيفات الفطرية. إلا أنه يتفادى التخفيف خاصة في حالة الطرق التي تيسر تقدير الكتلة الحيوية للفطريات في التربة (Boath و Soderstrom ، 1980).

توجد العديد من الدراسات حول تأثير الملوثات مثل المعادن السامة و  $SO_2$  والمبيدات الفطرية على الفطريات عند تسميدها *in vitro*. ولكن وللأسف فإن العديد من هذه المعطيات قليلة عند ربطها بالتأثير الإقتدري للملوث على الفطريات الدقيقة (microfungi) النامية في البيئة. إن الصورة التي يستجيب بها الفطر للملوثات في المحيط لا يمكن أخذها من خلال دراسة استجابة الفطر للملوث المضاف لبيئة النمو سواء كانت سائلة أو صلبة. فمثلاً إن تأثير المعادن السامة على فطريات التربة

النامية *in vitro* يتأثر بصورة واضحة بتركيب مكونات البيئة المستخدمة، فالمعادن تكون أكثر سمية في البيئات التي يكون بها محتوى الكربون منخفضا مقارنة بالبيئات التي يكون غنية بالكربون حيث يؤدي إنتاج كميات كبيرة من السكريات المعقدة Polysaccharides والتفاعلات الكيميائية مع البيئة إلى التخفيض من تيسر المعدن. كما أن مكونات البيئة الغذائية يمكن أن يكون معقدات مع المعادن في الخارج بالمحلول مما يؤدي جعلها غير ميسرة (Hughes و Poole ، 1991). إن الدراسات القائمة على البيئات الغذائية تسقط تعقيدات الأنظمة البيئة الطبيعية. فمثلا إضافة معادن الطين إلى البيئة الغذائية يمكن أن تؤثر بصورة واضحة على الصورة التي تؤخذ عن سمية الملوثات التي يمكن أن تظهر في العينات الغذائية التي لا يضاف إليها معادن الطين. وأخيرا فإن التضافر بين الملوثات والكائنات يكون مستثنى في الدراسات *in vitro* بينما التدخلات (interaction) بين الملوثات المختلفة يمكن أن يكون له تأثير هام على سمية الملوث في البيئات والمحيط الطبيعي. إن نمو الفطريات في المزارع الاصطناعية يمكن أن يظهر استجابات غير نموذجية وغير قياسية والتي تكون نادرة الظهور في البيئات الطبيعية. فمثلا فإن العلاقة الخطية بين سمية أي ملوث و تزايد تركيز الملوث غالبا تكون مفترضة. إلا أنه في بعض الحالات فإن كمية قليلة من الملوث يمكن أن تحفز النمو وهو ما يطلق عليه مصطلح التأثير الـoligodynamic، بينما في حالات أخرى يمكن أن تظهر استجابات غير خطية عند تراكيز مختلفة (وهو ما يطلق عليه التأثير الـparadoxical).

### 1.3.2 الأثر البيئي لتلوث التربة بالمعادن الثقيلة على المجاميع الفطرية

يتوقع أن تؤدي الملوثات إلى كل من الاضطراب التخصصي والاضطراب الهدي للفطريات. بالرغم من أن الاضطراب التخصصي يكون الأكثر سيادة إلا أنه قد توجد حالات يكون فيها كل من النوعين من الاضطراب متواجدين معا. إن الاضطراب الهدي للمجاميع الفطرية يمكن أن يكون دمار وظيفي خاص للنظام البيئي في حين يكون الاضطراب المتزايد عرضا نادرا منتجا لتأثيرات مفيدة لمسارات التربة. إن الاضطراب السمي يؤدي اختزال في عدد الفطريات وفي تنوع الأنواع (species diversity) وكذا الكتلة الحيوية وتغير النشاطات التي تؤدي إلى تأثير مضر لبعض المسارات المهمة مثل تحلل القش. درجة تأثير الاضطراب السمي الناتجة يمكن أن تعتمد على كل من تراكيز السم ومدى تيسره للمجموع الفطري وكذا حساسية الأفراد الخاضعة له. إن الماد السامة يمكن أن تكون انتخابية ولا تؤثر سوى على عدد قليل من الأنواع أو قد يكون لها تأثير عام. إن التثبيط النوعي يكون له تأثير أقل على مجموع النشاط الفطري في التربة تكون أن الأنواع الحساسة يمكن أن تستبدل بأنواع مقاومة بعض منها يمكن أن يكون أكثر نشاطا في بعض منها يمكن أن يكون أكثر نشاطا في بعض منها يمكن أن يكون أكثر نشاطا في بعض المسارات الفيزيولوجية من المجموع الفطري الأصلي، وهذا يفسر أو يساعد في تفسير لماذا أن التأثير المضر للملوثات في الأنظمة الفطرية يكون غالبا أقل حدة من التأثير المتوقع

استقاؤه من المعلومات المأخوذة من الدراسات التي تستخدم فيها مزارع اصطناعية نقيّة. عموماً إنّ أغلب الدراسات تركز على تأثيرات التركيز، مما يدعو للتساؤل لماذا غالباً مسألة تيسر المادة السامة يتقادها الباحثون في دراساتهم لتأثير الملوثات على الكائنات الدقيقة، ففي التربة مثلاً فإن تيسر الملوث عموماً يعتمد على بعض العوامل مثل:

1. الامصاص من قبل المواد العضوية وغير العضوية.
2. الصورة التي يظهر فيها الملوث (الذائبة أو غير الذائبة).
3. الهدم break down الميكروبي المنخفض.
4. الغسيل.

تختلف الفطريات في بقائها ثابتة وراثياً عندما تتجابه مع عامل مسمم، والمجاميع المقاومة تتميز في تشابهها في أنها تتطور وهذا يمثل عاملاً مهماً في تحديد مدى استجابة الفطريات لهذا الملوث. ومن جهة أخرى أوضحت بعض الدراسات أن الفطريات المعزولة التربة الملوثة بالمعادن تبدي تكيفاً وتأقلاً أقل للمعادن السامة مثل التجانس بخلاف المتوقع (Yamamoto وآخرون 1985).

عامل هام آخر يرتبط بتأثير الملوثات على فطريات التربة وهو تيسر المغذيات. غالباً تتأثر الفطريات بالمحتوى المنخفض للكربون الموجود في أغلب الترب وفي بعض البيئات (Wainwright، 1992) حيث تنمو ببطء في مثل هذه الظروف وتكون أكثر حساسية للملوثات مقارنة بنموها في البيئات المغذية الغنية. تختلف استجابة العشائر والمجاميع الفطرية في بقائها ثابتة لأن كل من تركيز وتركيب أي تأثير مضر تلوثي بسبب تأثيراً على البيئة يمكن أن يتغير. نتيجة لذلك فإن العشائر في التربة غير الملوثة يمكن أن تساعد في إيجاد توازن ديناميكي جديداً باستجابة لتأثير الملوث، والذي يمكن أن يسبب اضطراباً عند تغيير تركيب أو تركيز الملوث. لذلك فإن العشائر أو المجاميع الفطرية في البيئات الملوثة يمكن أن تتغير باستمرار كاستجابة للتغير في تركيب تأثير الملوث.

## 2.3.2 الأثر السمي للمعادن الثقيلة على فطريات التربة

إن قدرة الفطريات على العيش في وجود معادن شديدة السمية يعتمد على عدد من الخصائص البنوية والبيوكيميائية والتي تتضمن التأقلم الفيزيولوجي أو الوراثي والتغير المرفولوجي وأخيراً التعديلات البيئية للملوث من حيث تنوعه ومدى تيسره وكذا سميته (Gadd، 1990) إن مصطلحات مثل المقاومة والتحمل عادة تستخدم بالتبادل في المراجع ويمكن تؤسس خطأ على مدى قابلية النمو عندها في وجود بعض تراكيز المعادن في البيئات المخبرية (Baath، 1991) (Gadd، 1992). إن مصطلح المقاومة يمكن أن يعرف بصورة ملائمة على أنه قابلية الكائن على مجابهة سمية المعدن

بواسطة عدد من الآليات منتجا استجابة غير مباشرة لأنواع وصور المعدن المدروس، وأحسن مثال على ذلك بناء الميتالوثيونين وبيبتيدات الـ  $\gamma$ -glutamyl الاستجابة لوجود المعادن (Mehra و Winge، 1991). تحمل المعدن يمكن تعريفه بقدرة الكائن على مقاومة سمية المعدن بواسطة خصائص داخلية ذاتية أو تعديلات بيئية للسمية (Gadd، 1992 b). تتضمن هذه الخصائص الذاتية الداخلية التي تحدد هذه المجابهة امتلاك الفطريات لجدر خلوية مصبوغة غير نفاذة وإفراز خارجي لأيضيات وعدادات السكاكر خاصة عندما تؤدي هذه إلى إزالة سمية صور المعدن عن طريق الارتباط أو الترسيب (Gadd، 1993). إلا أنّ مثل هذا التميز بين المصطلحين غالبا يصعب تقبله وذلك بسبب تضمن مقاومة وبقاء الفطر في استجابته لسمية المعدن على العديد من الآليات البيولوجية والفيزيوكيميائية.

تشمل الآليات البيولوجية التي تساعد في بقاء الفطر، (والتي تتميز عن التعديلات البيئية للسمية) الترسيب خارج خلوي، تكوين المعقدات والتبلور تحويل صور الزئبق عن طريق مثالا الأكسدة، الاختزال و الميثلة، إزالة الألكيل، الامتصاص في الجدر الخلوية، الصبغات وعدادات السكاكر الخارجية، جفص عملية النقل أو التجزؤ الداخل خلوي وأخيرا الترسيب وأو الحجز (sequestration). يجب أن تؤكد أنّ أغلب هذه المعلومات الميسرة عن الاستجابة الخلوية للمعادن السامة تمّ استيفائها من الدراسات *in vitro* والتي تستخدم فيها مزارع نقية ولا يزال غالبا يسود الغموض عن الآليات المذكورة سابقا وكيفية عملها في البيئات الطبيعية.

## 4.2 الزئبق وفيزيولوجيا الفطريات

حسب Ross (1975) فإن ارتباط الزئبق بخلايا الخميرة يختلف في كثير من الطرق عن باقي المعادن، إذ يكون معدل الارتباط بطيئا وكذا عملية استعادته (desorption) تكون بطيئة ومرتبطة بالحرارة. عند درجة 38م° فإن إستعادته في وجود فائض من cystein تكون 90% أما عند 72م° فيكون 40% فقط بعد ساعتين ومنحنى الزئبق المضاف على صورة  $HgCl_2$  يبدي مرحلة انحدار حتى معدل 18 mM/Kg ولكنه بعد هذه النقطة يظهر انعطاف. في حالة أيون  $UO_2^{2+}$  وكاتيونات اخرى معروف أنها ترتبط بمجاميع الفوسفوريك فإن مرحلة الانحدار لمنحنى الارتباط تضمن فقط 1 mM/Kg. هذا يوحي أنّ الـ Ligands التي ترتبط بالزئبق تكون مختلفة عن تلك التي ترتبط بالكاتيونات الأخرى (Rosthstein، 1959). امتصاص الزئبق بواسطة خلايا الخميرة كان مرفوقا بفقد سريع لأيونات البوتاسيوم من الخلايا (Rothstein، 1959). إنّ التغير في نفاذية البوتاسيوم لا يكون نوعيا لأيونات  $K^+$  وحركة الأيونات خلال الغشاء تكون متاحة في الاتجاهين ولا يوجد ارتباط بين الزئبق المضاف وتدفق الـ  $K^+$  وقد يكون هناك استجابة للخلايا الفردية (Passaw وآخرون



(1960). وقد يكون لجسور الـ S-Hg-S في الغشاء يكون دور في الاجهاد الذي يؤدي حتما مباشرة إلى انتشار هدم الغشاء. توجد معطيات محدودة عن امتصاص الزئبق من قبل الخلايا الأخرى، درس Owens و Miller (1958) توزيع الزئبق المشع  $^{203}\text{Hg}$  بجرعات أقل من السامة لكونيديات فطر *Aspergillus niger* و *Neurospora sitophela*. ووجد أن كمية هامة من الزئبق توجد في ترسبات كسور خاصة عند التثقيب  $80000-10000 \times g$  وخلص Miller, Owens (1958) إلى أن الزئبق قد امتص من قبل الخلايا ثم أصبح مرتبطا بمركبات العضيات الخلوية. تختلف معايير انتخاب تراكيز الزئبق القريبة من التراكيز المميته والتي تكون ضارة لقدرتها على تخريب الأغشية الخلوية عن التراكيز التي تؤدي إلى الضرر في حالة الفطريات الأخرى. عند دراسته امتصاص مثل خلايا الزئبق (PMA) في كل من السلالات المقاومة والحساسة لفطر *P. avence* (a (Greenaway, 1972) حيث ارتبطت أيونات  $\text{Phenyl Hg}^+$  بسرعة بخلايا كل من العزلات المقاومة والحساسة وكمية مماثلة تحررت بعد غسلها في 2mM من الـ cysteine. إن (Greenaway, 1972) قد اعتبر أن أيونات  $\text{Phenyl Hg}^+$  التي لم تتحرر بواسطة الغسيل عن طريق الـ cysteine قد انتقلت إلى داخل الخلايا. إلا أن عودة أيونات  $\text{Hg}^{2+}$  في محلول الـ cysteine يكون بطيئا خاصة عند درجة الحرارة العادية أو أقل (Passaw و Rothstein, 1960) ويختلف بمجرد الغمس السريع في محلول cysteine 2mM الذي لا يمكن ان يحرر كل الزئبق المرتبط بالسطح الخارجي للخلايا. بينت بعض الدراسات الحدث بطرق غير مباشرة أن الزئبق ينتقل إلى داخل خلايا بعض الفطريات وتقوم هذه فطريات بميثلة الزئبق غير العضوي عند تراكيز لم يكن لها تأثير ظاهري على النمو (Ross 1975).

#### 1.4.2 مظهر التأثيرات الفيزيولوجية للزئبق على الفطريات

حسب Weeb (1966) للزئبق ألفة كبيرة بمجاميع SH وهذا هو الأساس في سميته، وهو مثبط انزيمي قوي، وهناك اعتقاد كبير بأنه في حالة الخمائر فإن الخلايا ممكن أن تموت من خلال تخرب الغشاء الخلوي ولكن لا يوجد معلومات ميسرة للمقارنة بالفطريات الأخرى. يرتبط الزئبق مع أنظمة الأغشية الدالية للخلايا (Matsui وآخرون، 1962) ويتفاعل مع النواة ولكن غير معروف إن كان قبل او بعد تخريب النفاذية الخلوية (Ross, 1975). إن التأثير التراكمي للزئبق في الحيوانات وإعادة تحويله إلى أيون مثل الزئبق  $\text{MeHg}^+$  بواسطة البكتيريا قد نوقش من قبل العديد من الباحثين ولكن توجد معلومات قليلة في حالة الفطريات. إن ميثلة الزئبق المضاف على صورة  $\text{HgCl}_2$  يمكن أن تتم بواسطة *Nerospora crassa* (Landner, 1971) والـ *A. niger* (Kaars و Vonk) و *DL-Homosystein* يحفز مثيله أيون  $\text{Hg}^{+2}$  لاحظ Landner (1971) أن *DL-Homosystein* يحفز مثيله أيون  $\text{Hg}^{+2}$  والـ *DL homocystein* معروف أنه آخر طليعة للميثيونين في فطر *Nerospora* (ref). واقترح Landner (1971) أن الزئبق يرتبط بمجاميع الـ SH في *DL homocystein*. إن الميثلة الطبيعية

للـ DL homocystein إلى ميثيونين يمكن أن تعوّض بنقل مجموعة ميثيل إلى ذرة الزئبق . لم يجد Kaais Sijpesteijn و Vonk (1973) تأثيراً تحفيزياً للـ homocystein على ميثلة الزئبق بواسطة فطر *A. Niger* أو *S. brevicaulis*. ولكنه أشار إلى أن المحتوى العالي للمركبات الكبريتية الذاتية الداخل لخلوية مثل ما يظهر ذلك في *A. niger* (Ashworth و Amin، 1964) يمكن أن تغطي تأثير المركبات الكبريتية المضافة.

#### 2.4.2 مقاومة الفطريات للزئبق

سجلت المقاومة ضد الزئبق من قبل العديد من الفطريات، فقد لاحظ Spanis وآخرون (1962) أن فطر *Penicillium sp* و *Aspergillus sp* يمكن ان تطور مقاومة لبقايا المبيدات الفطرية الزئبقية في التربة . كما أن استعمال مثل هذه المبيدات تؤكد أنه يؤدي إلى زيادة المقاومة لدى فطر *Pyrenophora avenae* (Ross ، 1975) و *Penicillium roqueforti* (Russel، 1955). هذه المقاومة تمّ تسجيلها أيضا لدى العديد من الفطريات التي تكون فوق بذور الشوفان (Greenaway، 1972). لقد اقترح أن المقاومة لدى فطر *Candida utilis* (Bonaly وآخرون، 1961) والـ *Aspergillus niger* (Ashworth و Amin، 1964) تعود إلى المعدل العالي إلى المركبات الكبريتية غير البروتينية داخل الخلية والتي يمكن ان ترتبط بالزئبق ثم تؤدي إلى إزالة سميته . وجد Ross و Old (1973) ان مقاومة الزئبق لفطر *pyrenophora avenae* قد انخفضت عند المعاملة بالمركبات (reagent) والمواد التي تستطيع الارتباط بمجاميع الثيول مثل حمض خلات اليود وأقترح أن مقاومة الزئبق في هذه الفطريات يعود إلى إزالة التسمم الداخل خلوي بواسطة مركبات الثيول. إلا أنه بالرغم من وجود كمية هامة من الثيول غير البروتيني في كل من العزلات المقاومة والحساسة للزئبق في فطر *P.avenae* فلم يكن هناك فرق بينهما لا من الناحية الكمية ولا من ناحية التركيب الكيميائي (Ross، 1974). اقترح أن إنتاج الصبغات الحمراء التي لها القدرة على التخلب مع الزئبق في العزلات المقاومة انها الأساس في المقاومة (Greenaway، 1971) إلا أن (Sheridan ، 1971) لم يوجد ارتباط بين إنتاج الصبغات ومقاومة الفطر. إن إمكانية أن انخفاض النفاذية يعزى إلى الزئبق وتفسيره بمقاومة الزئبق لم يدرس بصورة ملائمة وكاملة، إذا لم يوجد فرق في النفاذية لدى كل من السلالات الحساسة والمقاومة لفطر *P.avenae* عند معاملتها بـ  $Phenyl Hg^+$  (Greenaway، 1971). يبدو انه يوجد تلازم بين أبيض الميثيونين ومقاومة الزئبق في الخمائر (Singh و Sherman ، 1974) و *Nerospora crassa* (Landner، 1971). ففي خميرة *Saccharomyces cervisiae* فإن مقاومة ميثيل الزئبق كانت مرتبطة بالحاجة إلى الميثيونين الذي أمكن تخفيفها بميثيل الزئبق  $MeHg^+$  ومظهر مقاومة  $MeHg^+$  أمكن إزالته بواسطة إضافة الميثيونين للبيئة (Singh و Sherman ، 1974) هذه الملاحظات أمكن تفسيرها من خلال افتراض

أنّ مركبا قابلا لإزالة سمية  $MeHg^+$  ومتلازم مع تخليق الميثونين يتراكم في الخلايا المقاومة ويشبب بناء الميثونين مؤديا إلى وجود عوز في الميثونين. تقليل الحاجة إلى الميثونين في وجود  $MeHg^+$  يمكن ان نعود إلى ارتباط هذا المركب بـ  $MeHg^+$  في حالة *N.crassa* فإن الحالة تختلف في بعض الأحيان. إنّ الميثونين يخفض مقاومة كل من  $HgCl_2$  وميثيلة الزئبق (Landner ، 1971). الذي يبدو أكثر غرابة، إن إزالة التسمم بالزئبق تتم من خلال تحويله إلى الصورة التي تعتبر أكثر صور الزئبق العضوي سمية (Webb، 1966). وفي فطر *Aspergillus Niger* فإن انخفاض الزئبق لم يكن له ارتباط باختزال الميثلة الزئبق وبالمثل فإن اختزال مقاومة  $HgCl_2$  التي لوحظت في وجود الميثونين لم تكن نتيجة لاختزال ميثلة الزئبق لذا فإن العلاقة بين الزئبق والميثونين تتطلب المزيد من الدراسة. الاعتبار المهم الذي يجب أن يؤخذ هو قدرة وقابلية  $Hg^{+2}$  على تكوين معتقدات مع الميثونين (*in vitro* Birgeron و آخرون، 1973) والذي يمكن أن يؤثر على الامتصاص وبالتالي على مصير كل منهما عند إضافتهما مع بعض إلى البيئة المغذية.

#### 1.2.4.2 آلية مقاومة الزئبق ومركباته

##### 1.1.2.4.2 إزالة سمية الزئبق اللاعضوي

إنّ إزالة نسبة أيونات  $Hg^{2+}$  ومركبات الزئبق العضوية تتضمن إزالة المعادن من بيئة النمو، وحسب Robinson و Tuovinen (1984) فقد تم اقتراح آليتين متضافرتين هما:

1. بناء وتخليق مركبات ثيولية لها القدرة على الارتباط بمركبات الزئبق وبالتالي تنقص من سميتها للخلية.
2. وجود حاجز للنفاذية يمكن له أن يحدّ من دخول الزئبق إلى الخلية.

يتضمن المسار الأول مركبات غنية بالكبريت يطلق عليه مصطلح الممخلبات النباتية (Ortiz وآخرون، 1995). تتميز الممخلبات النباتية بكونها مركبات ذات وزن جزيئي صغير تتكون من بيبتيديات مرتبطة بالمعادن وقد وجدت على مستوى كل من النباتات والفطريات (Winge وآخرون، 1998). ينطلق بناء هذه الممخلبات النباتية من تكوين كتل من الجلوتاثيون. إضافة إلى الدور الهام الذي يلعبه الجلوتاثيون في حماية الخلية من الإجهاد التأكسدي وكذا كونه يمثل الطليعة في بناء الممخلبات النباتية فإنه ذاته يمكن أن يكون معقدات مع المعدن الثقيلة في الخلايا. أثبت البناء الحيوي لمعدّات Cd(II)-GSH في فطر *Candida glabrata* (Dameron وآخرون، 1989) حيث لوحظ أنّ المقاومة المكتسبة للمعدن تعود إلى جزيء سيتوزولي يتحفز بارتفاع الكاديوم وهو يتكون من البيبتيدات الكبريتية التي تغطي بلورات كبريتيد الكاديوم والتي تمّ تعريفها فيما بعد بفطر *Schizosaccharomyces pombe* (Li وآخرون، 1997). لاحظ (Miersch وآخرون، 1997)

زيادة في بناء المركبات الكبريتية في وجود الكاديوم في الفطرين المائين *Heliscus ludumensis* و *Varicosporium elodeae* عندما يرتفع تركيز الكاديوم إلا أن ذلك لا يحدث في حالة وجود كل من الزنك أو النحاس.

وفي كل الحالات التي تمّ دراستها إلى حدّ الآن والتي تتضمن أكثر من 100 كائن مقاوم للزئبق (Robinson و Tuovinen 1984) فقد لوحظ أنّ الزئبق يتحول إلى الصورة المتطايرة والتي من خلالها يزال من بيئة النمو (شكل 1). إنّ الزئبق المتطاير مرده تأثير أنزيم *mercuric reductase* القابل للتحفيز والذي لوحظ على مستوى العديد من السلالات البكتيرية مثل *P. aureginosa*، *S. aureus*، *T. ferroxidants*، *P. putida*... إلخ. لقد أمكن وبصورة مطلقة التمييز بين السلالات الحساسة والسلالات المقاومة على أساس تحويل  $Hg^{2+}$  إلى الصورة المتطايرة باستخدام  $HgCl_2^{203}$  أو  $Hg-^{203}PMA$ . وجد أنّ المستحضرات الأنزيمية النقية من بكتيريا *E. coli*، *S. aureus* و *Pseudomonas sp.* لها القدرة على تحويل  $Hg^{2+}$  إلى الصورة المتطايرة مثل ما هو الحال في حالة المعلق الخلوي الكلي لهذه السلالات. إلا أنّ تحديد طبيعة الزئبق المتطاير يبدو أنّها مسألة حرجة وذلك لأنّ كلاً من الزئبق المعدني ( $Hg^0$ ) ومركبات الزئبق العضوية مثل ثنائي ميثيل الزئبق تكون متطايرة. وفي أغلب الحالات التي درست وليس كلها تبيّن أنّ الزئبق المعدني ( $Hg^0$ ) هو الناتج النهائي المتطاير لعملية إزالة السمية، لدرجة أصبحت فيها مقاومة الزئبق وتطاير الـ  $Hg^0$  مترادفين أساسيين. لقد تبيّن أنّ كلا من الخلايا السليمة والمستحضرات الأنزيمية لسلسلة *E. coli* المقاومة للزئبق تستطيع أن تحول الزئبق المضاف على صورة  $HgCl_2$  إلى الصورة المتطايرة. إنّ المستحضر الأنزيمي ينشط  $Hg^{2+}$  بالاعتماد على أكسدة NADPH مما دفع الباحثين إلى استخلاص أنّ  $Hg^{2+}$  يختزل بالتلازم إلى الزئبق المعدني.

وإلى حدّ الآن فإنّ أغلب الأدلّة المقنعة على أنّ الزئبق المعدني هو الصورة المتطايرة للزئبق الناتج من عملية إزالة سمية  $Hg^{2+}$  مصدرها التحاليل المتضافرة باستخدام كل من كروماتوغرافيا الغاز ومطيافية الكتلة. لوحظ أنّ الصورة المتطايرة للزئبق الناتج من سلالة *E. coli* تكون قابلة للذوبان في المذيبات العضوية مثل benzene، cyclohexone، chlocoform و toluene (Silver و Summers، 1972). إنّ الزئبق المعدني يذوب في المذيبات العضوية حتى تركيز  $10^{-5} M$  (Moser و Voight، 1957). إلا أنه نظراً لأنّ مركبات الزئبق العضوية مثل ميثيل الزئبق تذوب أيضاً في المذيبات العضوية فإنّ دراسة تنوع الزئبق المتطاير يبدو أنّها حرجة لتقنياتها وذلك لإمكانية أنّ ميثيل الزئبق يمكن أن يكون الناتج النهائي لعملية إزالة السمية. أظهرت مستخلصات toluene لمزارع بكتيرية تمّ تعرضها للـ  $HgCl_2^{203}$  لمدة 7 دقائق على درجة 37°م بعد تحليله بالجهاز المتزوج بين كل من الكروماتوغرافيا ومطيافية الكتلة قمة واحدة في كروماتوغرافيا الغاز وبزمن احتباس مميز

للزئبق المعدني. و لم يلاحظ وجود مركبات ذات وزن جزئي كبير تحتوي على صور أخرى للزئبق ، لذا أصبح تطاير الزئبق بالبكتيريا المقاومة مرادفا لإنتاج الزئبق المعدني (Robinson و Tuovinen، 1984). وهذا قد يكون في بعض الأحيان مضللاً وذلك لأنه بالرغم من أن آلية مقاومة  $Hg^{2+}$  تبدو متماثلة في العديد من الأجناس البكتيرية إلا أن دراسة تنوع الزئبق المتطاير لم تجري إلا على عدد محدود من السلالات. ومع ذلك فإن هذه الآلية المقترحة تدعمها الدراسات الأنزيمية التي أشارت إلى الاختزال المرتبط بالـNADPH لأيونات  $Hg^{2+}$ . وبما أن العديد من البكتيريا لها القدرة على تحويل  $Hg^{2+}$  إلى صورة أخرى متطايرة للزئبق والتي يكون من ضمنها مثيل الزئبق فإن إمكانية أنه تحت بعض الظروف فإن هذه السلالات يمكن أن تكون مركبات زئبق متطايرة أخرى.

#### 2.1.2.4.2 إزالة سمية مركبات الزئبق العضوية

يعتقد أن إزالة سمية مركبات الزئبق العضوية تنتج من هدم الرابطة C-Hg بإنزيم organomercurial lyase يتبع ذلك اختزال  $Hg^{2+}$  إلى  $Hg^0$  بواسطة إنزيم mercuric reductase. ولقد أمكن تنقية هذين الأنزيمين من البكتيريا المقاومة. أول ما اكتشف من هدم لمركبات الزئبق العضوية كان ذلك بواسطة البكتيريا المقاومة للزئبق *Peusodomonas sp.* المعزولة من التربة. حيث تبيّن (باستخدام  $Hg^{203}$  أو  $C^{14}$  المرتبط بالـPMA) أن هذه السلالة تقوم بهدم PMA إلى  $Hg^0$  وبنزين. ويختفي حوالي 70% من الـ  $Hg^{203}$  أو الـ  $C^{14}$  من البيئة المغذية خلال ساعتين. نواتج التفاعل يمكن فصلها عن طريق الادمصاص بواسطة الكربون النشط ثم تجري لها التلميص بواسطة الـtoluene مما يدل على أن الرابطة C-Hg قد انفكت. تبيّن عن طريق كروماتوغرافيا الغاز أن جدر الفينيل للـPMA يتحول إلى البنزين بينما الزئبق المتبخر فقد اتضح أنه زئبق معدني. في تجارب مماثلة تبيّن أن نواتج مثيل الزئبق هي الميثان والزئبق المعدني (Furukawa، 1969). تبيّن بعد ذلك أن مستحضر الأنزيمات النقية من هذه السلالات لها القدرة على هدم pHMB إلى  $Hg^0$  وحمض البنزويك الذي تمّ فصله بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (Tonomura و Tezuka، 1976 ؛ 1978). إن بلازميدات مقاومة الزئبق ذات المجال الواسع الواسعة لبكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* تشفر لمقاومة كل من PMA ، MMC ، EMC ، ، ، pHMB ، merbromin ، thimerosal، ولكن هذه البكتيريا لا تستطيع هدم سوى الأربع مركبات الأولى. وبالمقابل فإن بلازميدات مقاومة الزئبق ذات المجال الواسع لبكتيريا *E. coli* تشفر للزئبق المتطاير من PMA و thimerosal. أي أن السلالة ذات المجال الواسع الواسعة لـ *E. coli* تكون حساسة للـ EMC ، MMC ، pHMB ، ولكن لها القدرة على تبخير الزئبق من هذه المركبات عند التراكيز المنخفضة جدا. إن *E. coli* مثل *Pseudomonas aeruginosa* حساسة لـ merbromin و FMA ولكنها لا تقوم بهدم أي منها. السلالات المقاومة للزئبق من بكتيريا *Stophylococcus*

*aureus* تستطيع هدم PMA، pHMB، thimerosal بينما تصبح حساسة لهذا الأخير (Weiss وآخرون، 1978). يبدو أنّ آلية هدم مركبات الزئبق العضوية متماثلة على مستوى البكتيريا إلا أنّ نواتج الهدم لم تكتمل دراستها بعد لتشمل كل العزالات المقاومة ذات المجال الواسع. إنّ المستحضرات الأنزيمية النقية لـ organomercurial lyase من سلالة بكتيريا *Pseudomonas sp K62* تستطيع هدم pHMB بينما الخلايا السليمة لـ *aeruginose Pseudomonas* لا تستطيع هدم pHMB بالرغم من أنها مقاومة له، وقد يعود هذا إلى وجود آلية أخرى مثل حاجز النفاذية.

#### 2.2.4.2 أنظمة إزالة سمية الزئبق

إنّ آلية مقاومة الزئبق العضوي والزرئبق غير العضوي تتضمن تحفيز بناء أنزيمي mercuric reductase و organomercurial lyase بتراكيز منخفضة من  $Hg^{2+}$  أو من مركبات الزئبق العضوية. إنّ الطبيعة التحفيزية لأنظمة مقاومة الزئبق تم توضيحها لدى كل السلالات البكتيرية المقاومة المدروسة و التي تضم أكثر من 100 سلالة. وفي كل الحالات التي تمّ اختبارها فإنّ انزيمي إزالة السمية mercuric reductase أو organomercurial lyase أو كليهما ينتج فقط استجابة لوجود الزئبق غير العضوي أو لوجود نوع من مركبات الزئبق العضوية. بالرغم من أنّ بعضا من هذه المركبات لا يمثل مادة تفاعل قابلة للهدم بواسطة البكتيريا المقاومة؛ أي أنها مركبات محفزة مجانا. إنّ التحفيز المتقاطع cross- induction لنظام مقاومة الزئبق يبدو أنّه شائع في البكتيريا حيث أنّ التحفيز بمركب زئبق عضوي أو  $Hg^{2+}$  والذي تكون السلالة البكتيرية مقاومة له يحفز القدرة على مقاومة أنواع أخرى من مركبات الزئبق. إنّ أنزيمي كل من mercuric reductase و organomercurial lyase أتضح أنّهما تحفيزيان ولكن ليس دائما بطريقة متناسقة دائما (Robinson و Tuovinen، 1984).

#### 3.2.4.2 ميثلة الزئبق بواسطة الكائنات الدقيقة.

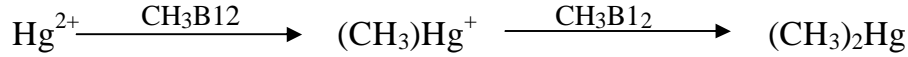
استرعت ميثلة الزئبق اهتماما كبيرا منذ أن أكتشف أن الميثل الزئبق يوجد بمعدلات عالية نسبيا في الكائنات الحية المائية بالرغم من عدم رمي مركبات الزئبق العضوية في البيئات المائية. وكانت أهم صورة للـ Hg في المياه العذبة أو مياه البحر من  $Hg^{2+}$  بينما الصورة الأكثر سيادة للـ Hg في الأسماك هي ميثل الزئبق. يتميز ميثل الزئبق وثنائي ميثل الزئبق بالذوبانية العالية في الدهون والمذيبات العضوية والألفة الكبيرة لمجاميع SH، والبروتينات. بسبب ميثل الزئبق سمية للجهاز العصبي ويمكن أن يتراكم عبر السلاسل الغذائية مما يؤدي إلى حدوث مشاكل صحية. إنّ سمية ميثل الزئبق للكائنات الدقيقة تعتمد على زمن بقائه ومدى ثباته في الأنظمة المائية (0). تلعب الميثلة البيولوجية بواسطة الكائنات الدقيقة دورا هاما في تكوين ميثل الزئبق في الأحياء المائية والرواسب.

وتمثل مسار استكمال لدورة الزئبق في البيئة. وبالرغم من أنّ مثيل الزئبق أكثر سمية من الزئبق العضوي إلاّ أنه أكثر تطايرا وبالتالي فإن الميثلة يمكن أن تمثل آلية لإزالة التسمم.

#### 1.3.2.4.2 آليات ميثلة الزئبق

هناك ثلاث مسارات للميثلة استرعت انتباه الباحثين:

1. الميثلة اللاحيوية والكيموضوية للـ  $Hg^{2+}$ .
2. ميثلة الـ  $Hg^{2+}$  في الرواسب عن طريق البكتريا التي تفرز مركب methyl cobalamin الذي يلعب دور المانح لمجموعة الميثيل.
3. ميثلة الزئبق بواسطة الفلورا البكتيرية للأحياء المائية والتي يمكن أن تستخدم methyl cobalamin. إن ميثلة الزئبق لا يزال يكتفها الكثير من الغموض. في حالة الميثلة اللاإنزيمية فإنها تتضمن النقل لمجموعة الميثيل من methyl cobalamin. وتكن في حالة الميثلة الأنزيمية فقد أقتراح ثلاث مرافقات إنزيمية يمكن أن تدخل في عملية نقل مجموعة الميثيل: S-adenosyl methionine، فيتامين B<sub>12</sub> methyl cobalamin، ومشتقات Methyl tetrahydropfolate. يعتقد فيتامين B<sub>12</sub> هو المسؤول عن ميثلة الزئبق غير العضوي  $Hg^{2+}$  لأنه العامل الوحيد الذي يستطيع نقل أملاح مجاميع مثيل الكاربانيون (carbanion methyl) (17.5). يعتقد أن تفاعل عملية الميثلة ثم من خلال هجوم إلكتروني. فيلي لأيون الزئبق على أنواع الـ carbanion والتي يتم تثبيتها عن طريق ذرة الكوبالت (De Simone وآخرون، 1973) وقد أقتراح التفاعل التالي:



المرحلة الأولى من الميثلة تتمّ بسرعة 6000 مرة ضعف المرحلة الثانية. إنّ methyl cobalamin يتفاعل بسرعة أكبر مع  $HgCl_2$  ولكنه يتفاعل ببطء مع مركبات الزئبق العضوي في المحاليل المائية. إنّ النقل الأنزيمي لمجموعة الميثيل الذي تم اقتراحه لم يوضح بعد بدرجة كافية. يدخل الـ cobalamin في بناء الـ methionine من خلال عملية ميثلة الـ homocysteine في البكتريا. مما يوحي أنه قد يساهم كمانح لمجموعة الميثيل. يمكن تكوين مثيل الزئبق في الظروف الهوائية وفي الظروف اللا هوائية.

#### 1.1.3.2.4.2 الميثلة اللا هوائية

لوحظ أنّ الرواسب العميق وكذا مجنس الأسماك يمكن أن يؤدي إلى إنتاج كل من الميثيل وثنائي مثيل الزئبق انطلاقا من أيونات  $Hg^{2+}$ . كما لوحظ أيضا تكوين أحادي وثنائي مثيل الزئبق في الظروف اللا هوائية في المستخلص الخلوي لبكتيريا الـ methanogene (Wood وآخرون، 1968). وقد لوحظ أنّ الـ methylcobalamin كان موجودا ضمن مواد التفاعل وأنّ التفاعل يحتاج إلى الـ ATP

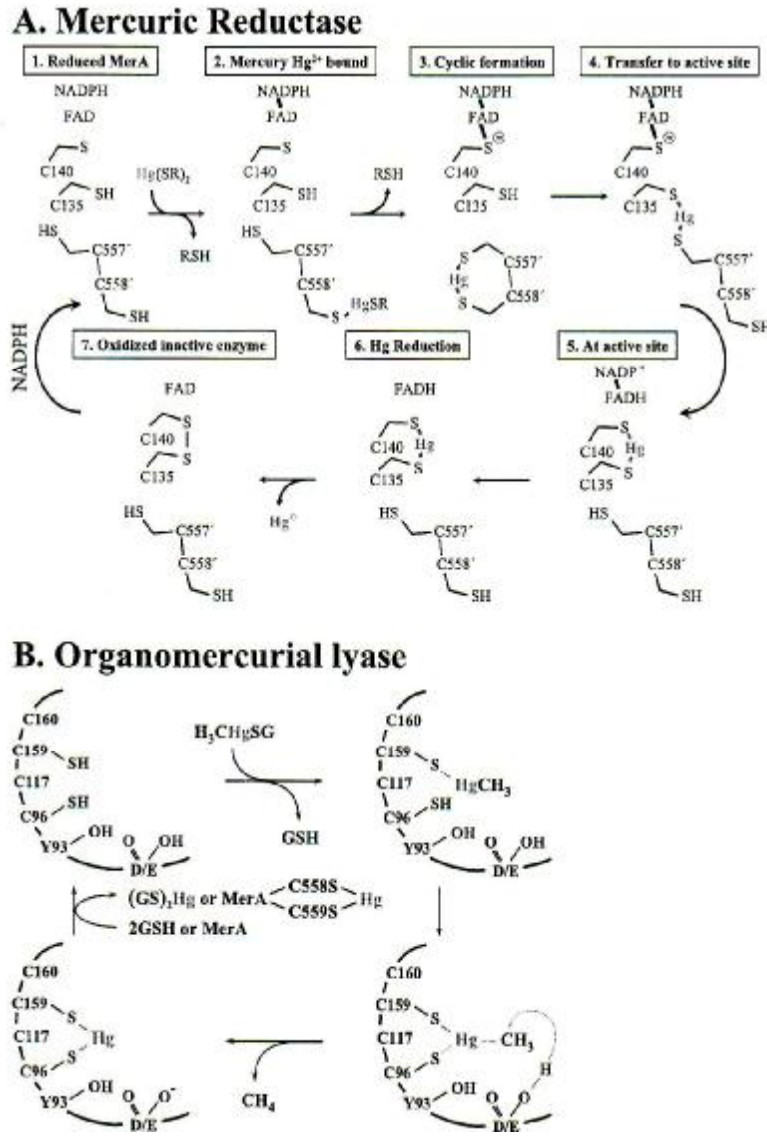
والهيدروجين كمصدر للإلكترونات. وقد أقتراح أن نقل مجاميع المثل من  $\text{Co}^{2+}$  إلى  $\text{Hg}^{2+}$  يكون إنزيميا. إلا أن السرعة العالية جدا لعملية الميثلة عند التراكيز المرتفعة من  $\text{Hg}^{2+}$  توحي أن عملية المثل من  $\text{Co}^{2+}$  إلى  $\text{Hg}^{2+}$  يمكن أن يتم بطريقة غير أنزيمية. إن مكونات خليط التفاعل لا تسمح بتحديد إذا كان هذا النقل يتم بطريق إنزيمي أو غير إنزيمي، وقد أمكن تكوين مثل الزئبق من كل من  $\text{HgCl}_2$ ،  $\text{HgI}_2$ ،  $\text{HgO}$ ،  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ ،  $\text{HgSO}_4$ ،  $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  ولكن ليس من  $\text{HgS}$  بطريقة لا هوائية باستخدام بكتريا *Clostridium cochlearium*.

#### 1.1.3.2.4.2 الميثلة الهوائية

لقد سجل أن مثل الزئبق يمكن أن يتكون بطريقة هوائية في الرواسب باستخدام مزارع كائنات دقيقة هوائية (Hamdy و Noyes، 1975). عند المقارنة بين الميثلة الهوائية والميثلة اللا هوائية في رواسب خليج San Francisco للـ  $\text{HgCl}_2$  فقد لوحظ تكوين مثل الزئبق يتم بصورة أسرع وبمعدلات أكبر في حالة الظروف اللا هوائية وفي العينات التي تحتوي على محتوى عال من المادة العضوية (Olson و Cooper، 1976) السلالة البكتيرية *Enterobacter aerogenes* التي تم عزلها من الرواسب النهرية لها القدرة على ميثلة الزئبق ولكن ليس لها القدرة على اختزال  $\text{Hg}^{2+}$  إلى  $\text{Hg}^0$  (Hamdy و Noyes، 1975). والظروف الهوائية تحفز إنتاج مثل الزئبق بهذه السلالة. لوحظ أن تكوين مثل الزئبق ينخفض بوجود L-cysteines في رشاحات المزارع، وعند إضافة methylcobalamine فإن مثل الزئبق يتكون في كل المزارع الخلوية. وجد أن المزارع النقية لـ *Pseudomonas* *Bacillus megaterium*، *E. coli* و *Enterobacter aerogenes* تقوم بميثلة  $\text{Hg}^{2+}$  بمعدلات عالية في الظروف الهوائية مؤدية إلى إنتاج من 240 وحتى 865 ng/l من مثل الزئبق انطلاقا من 20 mg/l من  $\text{HgCl}_2$  المضاف للبيئة الغذائية. إضافة methyl cobalamin إلى مزارع *E. coli* لم يكن له أي تأثير بينما لم يتكون أي مثل زئبق في حالة غياب methyl cobalamin بمزارع *Enterobacter aerogenes* (Vonk و Sijpesteijn، 1973). المزارع الفطرية لكل من *A. niger*، *Scopariopsis brevicaulis* و خميرة *Saccharomyces cerevisiae* تنتج مثل الزئبق حتى تركيز 240 mg/g (على أساس الوزن الجاف) بعد 28 يوما من النمو. وقد لوحظ نتائج مماثلة في حالة فطر *Neurospora crassa*. إن عزلات البكتريا المأخوذة من أمعاء الإنسان كذلك تبين أنها قادرة على ميثلة الزئبق، إلا أن البكتريا الهوائية تنتج مثل الزئبق بصورة أقل مقارنة بالبكتريا الهوائية اختياريا (Rowland، 1975).



#### 4.2.4.2 تحفيز أنزيمات إزالة سمية الزئبق



شكل 1 خصائص أنزيمات مقاومة الزئبق (Silver و Hobman، 2007)

يمكن التمييز بين السلالات المقاومة للزئبق والسلالات غير المقاومة للزئبق من خلال كون السلالات الحساسة لا تملك القدرة على إنتاج أي من الإنزيمات المسؤولة عن إزالة سمية مركبات الزئبق. وذلك لأن إزالة سميه مركبات الزئبق العضوية بإجماع ينتج عنه تطاير للزئبق المعدني من بيئة النمو. في كل السلالات البكتيريا *E. coli* و *P. aeruginosa* المقاومة للزئبق والتي تم تحفيزها

فإن معدلات الزئبق غير العضوي  $Hg^{2+}$ . وهذا يمثل أحد الفروق في كفاءة التحفيز لدى كل من المواد العضوية وغير العضوية للزئبق.

بالرغم من أنه يبدو أن آلية إزالة التسمم تكون متماثلة إلا أنه في مجال المواد المحفزة يتباين من سلالة لأخرى ومن مادة لأخرى، وبعض المركبات التي تحفز نظام إزالة السمية تكون ولا تمثل مواد تفاعل لنظام إزالة السمية. تنتشر مثل هذه المحفزات المجانية بشكل واسع في كل السلالات المقاومة التي تم دراستها حتى الآن. هذا التحفيز المشترك يتقاطع مع حالة الزئبق حيث أن التحفيز بالزئبق  $Hg^{2+}$  أو الزئبق العضوي غالبا يعطي خاصية المقاومة والتطير لكل المركبات التي تستطيع السلالة مقاومتها.

#### 1.4.2.4.2 التحفيز المتناسق لنشاط كل من Mercuric reductase و Oyanomercurial lyase

يبدو أن الأنزيمات الداخلة في عملية إزالة سمية الزئبق أو مركبات الزئبق العضوية تكون منفصلة. يقوم إنزيم organomercurial lyase بتفكيك مركبات الزئبق العضوي مثل PMA لإنتاج البنزين و  $Hg^{2+}$  والذي يكون متبوعا باختزال  $Hg^{2+}$  إلى  $Hg^0$  بواسطة أنزيم mercuric reductase مسألة التحفيز المتناسق لنشاط كل من الأنزيمين ثم محاولة الإجابة عنها في دراسات أجريت على سلالات كل من *S.aureus* و *Pseudomonas sp* (Weiss وآخرون، 1977)

التحفيز المتناسق لهذا النشاط يدل على المراقبة المشتركة للتنظيم الجيني المكون للأوبيرون. كل الدراسات ترى أن كل من أنزيمي organomercurial lyase و mercuric reductase يمكن أن يتم استنساخهما من مناطق operotor-promotor منفصلة ولكن يمكن أن تتقاطع تحت بعض الظروف ولكن ليس دائما في تناسق بينهما. عموما فإن الدراسات تشير إلى أن نشاط أنزيم lyase هو المرحلة أو العتبة المحددة في عملية إزالة سمية مركبات الزئبق العضوية. ولعل هذا يبين لماذا يبدو التطاير الزئبق كبيرا في حالة الزئبق غير العضوي  $Hg^{2+}$  مقارنة عته في حالة مركبات الزئبق العضوية وكذا لماذا تفاوتت فعالية المركبات فيما بينها في عملية تحفيز تنشيط عملية تطاير الزئبق.

#### 5.2.4.2 قابلية تحريك جينات مقاومة الزئبق

إن جينات مقاومة الزئبق كغيرها من جينات المقاومة تكون محمولة على بلازميدات وعادة تظهر على صورة جينات متحركة (transposons) وهذه العناصر المتحركة عبارة عن تتابع DNA نوعي يمكن أن يندمج تقريبا بصورة عشوائية ضمن تتابع DNA آخر في غياب الخلية العائلة التي تتوسط وظائف إعادة الإدماج. يعتقد أن، هذه العناصر لعبت دورا في عملية التطور (Kleckner، 1981). لقد تم تعريف العديد من هذه العناصر المتحركة وتحديد خصائصها ويعتقد أنها واسعة الانتشار في الطبيعة. إن الجينات المتولدة عن البلازميد والمقاومة لبعض المضادات الحيوية يبدو أنها توجد على transposan واحد مفرد أو قد تكون بتناسق. هذه العناصر لها القدرة على التحرك من بلازميد إلى

بلازميد آخر أو من بلازميد إلى كروموزم حاملة الجينات المقاومة للمضادات الحيوية وكذا تقوم مجموعة من الوظائف التي تشمل كل من اندماج جزيئات الـ DNA غير المرتبطة ، deletion ، inversion ، excision وكذلك إشارات بداية أو إيقاف عملية الاستساخ (Kleckner، 1981). لقد تم وصف العديد من هذه الـ transposons المرافقة لاكتساب صفة مقاومة الزئبق. فلقد أمكن تحديد خصائص إن العنصر المتحرك Tn501 المرافق لمقاومة الزئبق.

تم وصف Tn501 على أنه قطعة منفصلة من الـ DNA وزنها 5.2 Mdal، يستطيع هذا الـ Tn 501 أن ينتقل إلى العديد من البلازميدات البكتيرية. قد يوجد Tn 501 ضمن الكروموزومات كما لوحظ ذلك في حالة *E. coli*. حيث يكون ثابتا ولا يحتوي على طفرات auxotrophic. تتابع النهاية الطرفية لهذا العنصر تكون معكوسة وتتكون من تكرار قطعة نيوكليوتيدية طولها 38 زوج من القواعد، كما لوحظ أن Tn 501 يكون مجنح بتكرار مباشر لـ 5 أزواج من القواعد يعتقد أنها تتولد في الـ DNA المستقبل أثناء الاندماج. أما في بكتريا *Pseudomonas* فإنّ المحدد لمقاومة الزئبق جين متحرك يطلق عليه أسم Tn1861 وزن 5.2 Mdal. وقد وصف بأنه عنصر يستطيع أن يتحرك من كروموزوم *P. putida* إلى البلازميدات ومنها إلى كروموزوم *E. coli* ثم يمكن أن يعود ثانية إلى بلازميدات أخرى.

#### 1.5.2.4.2 البنية الجينية لمحددات mer

أكثر المحددات دراسة هو Tn 501 والذي عزل أول مرة من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*، وهو يحتوي على بنية الجينات الخاصة بأنزيم mercuric reductase (mer A) والبروتينات الناقلة mer T و mer P والمحاطين بكل من mer R و mer D اللذان يدخلان في تنظيم التعبير للجينات البشرية المستجيبة لأملح الزئبق. وهذه الجينات تكون على الترتيب mer RTPAD والجين mer R يعبر بطريقة منفصلة ومختلفة عن mer TPAD ويقوم بتنظيم الـ promotor بينها.

حديثا تم تعريف جين mer E ويكون بعيدا عن الـ mer d واقترح بأنه يلعب دورا في عملية النقل لكن تنقص الدلائل التجريبية على ذلك. إن mer R هو أكثر المنظمات دراسة في مدى استجابتها للتحفيز بالعوامل البيئية وتنشيط التعبير الجيني. إن الـ mer R بالرغم من كونه في البداية منشطا في وجود  $Hg^{2+}$  فإنه يسبب بعض الكبح التعبير جينات mer في غياب أملاح الزئبق. ويقوم ذاتيا بتنظيم بنائها. بعض محدد mer في البكتريا موحبة الجرام تحتوي على جينات إضافية. فمثلا الـ mer operon tn21 الموجود على البلازميد R 100 يكون صغيرا جدا بالمقارنة مع Tn 501 ولكنه يحتوي على جين mer C وبالتالي تكون بنية الأوبرون هي mer RTPCADE. إن المحدد في البلازميد pMER 327/419 يحتوي على جين mer F وفي موضع من كل الـ mer C الذي

يوجد في Tn 502 (Blaghen وآخرون، 1983). المحددات الموجودة في البكتريا ذات المجال الواسع من المقاومة مثل pDU 1258 تحتوي على جين إضافي يشفر لإنزيم organomercurial lyase.

#### 2.5.2.4.2 الأوبيرون mer

تم دراسة كل الجينات المشفرة لمقاومة الزئبق والتي تقع على البلازميد r 100 حيث لوحظ أن مقاومة الزئبق يتحكم فيها مجموعة الجينات المشفرة للمواد التالية:

Mer A: إنزيم Mercuric reductase.

Mer B: إنزيم organomercurial lyase

Mer C: بروتين يعتقد أنه يساهم في وظيفة امتصاص الـ  $Hg^{2+}$ .

Mer T: بروتين يعتقد أنه يساهم في وظيفة امتصاص الـ  $Hg^{2+}$ .

Mer R: الجين الذي يشفر للبروتينات المنظمة المسؤولة عن تحفيز هذا النظام.

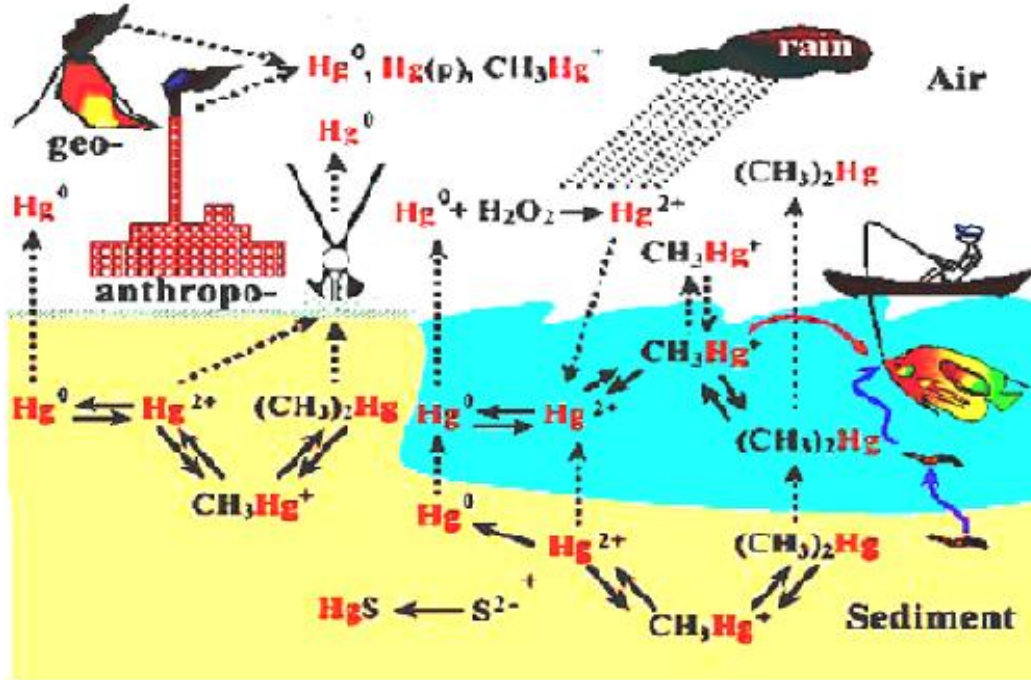
#### 5.2 الادمصاص الحيوي للزئبق بواسطة الفطريات

إن أهم وسائل معالجة مياه الصرف المتفق عليها تتمثل في الترسيب والتخثير والاختزال وأنظمة الأغشية والتبادل الأيوني والادمصاص. إلا أن استخدام هذه الطرق أصبح محدودا بسبب العوائق الاقتصادية و/ أو التقنية. فمثلا عمليات الترسيب لا تضمن الحد الأدنى للتركيز المطلوب للحالات القياسية وتنتج عنها مشاكل في عملية الصرف تستدعي بدورها المعالجة مرة أخرى. ومن جهة أخرى فإن التبادل الأيوني والادمصاص معالجات فعالة جدا ولكنها تتطلب وسائل ثمينة جدا ومكلفة للغاية وبالتالي استصلاح صناعي صعب. لذا فإن الدراسات الحديثة في مجال البحث عن مواد ادمصاص للمعادن فعالة واقتصادية تحاول أن تركز على المواد الحيوية (biomaterials) مثل الكتلة الحيوية لكل من البكتيريا والطحالب والفطريات. إن إيجابيات الادمصاص الحيوي تجمع في ذات الوقت بين الإلتقان الجيد لتحرير المعدن (والذي يكون غالبا منافس اقتصادي سهل) وكلفة إمكانية استخدام مواد الطحالب والفطريات والمخافات الناتجة من أجهزة التخمر أو العمليات الزراعية. أحد الايجابيات الأخرى للإدمصاص الحيوي هو الانتخاب النوعي الذي تبديه بعض الكتل الحيوية تجاه المعادن الثقيلة حتى في وجود تراكيز عالية من المعادن الأخرى مثل الـ alkalines. يتأثر الادمصاص الحيوي لأيونات المعادن الثقيلة بمجموعة من العوامل التجريبية مثل الأس الهيدروجيني، درجة التآين، تركيز الكتلة الحيوية، الحرارة، ووجود أيونات بعض المعادن الأخرى في المحلول. إن تنوع هذه العوامل في مياه الصرف يجعل من الضروري معرفة مدى تأثيرها على كفاءة الادمصاص الحيوي. ونتيجة لاحتمال التفاعلات المتداخلة المتعددة فإن معرفة ظاهرة الادمصاص الحيوي معقدة جدا وتتطلب دراسة كل من كيمياء المحاليل وآلية امتصاص المعدن. يمثل الادمصاص الحيوي خاصية لبعض النماذج غير

النشطة من الكتلة الحيوية (biomass) للميكروبات غير الحية يسمح لها بالارتباط وبتركيز أي محلول مائي ممدّد. إنّ الكتلة الحيوية التي تتميز بهذه الخاصية تؤثر فقط على صورة مادة كيميائية تسمح بعملية التبادل الأيوني (ion exchanger) رغم أنّها ذات منشأ حيوي. وتضم بالخصوص بنية الجدار الخلوي لبعض الطحالب والفطريات والبكتيريا التي لوحظ بأنّها مسؤولة عن هذه الظاهرة (Volesky، 1990). يعتقد إلى حدّ الآن أنّ البحث في مجال الادمصاص الحيوي الخيار الأمثل لإزالة التلوث بالمعادن من مياه المصبات والأنهار، وحسب Modak و Natarayan (1995) فإنّ للإدمصاص إيجابيات عديدة يمكن تلخيصها في ما يلي:

- 1- نتيجة استقلالية النمو فإنّ الكتلة الحيوية (biomass) غير الحية (non living) لا تكون عرضة لتأثير السمية على الخلايا، ولا حاجة للمغذيات المكلفة التي يتطلبها نمو الخلايا في محلول التغذية. وعليه فإنّ مشكلة التصرف في فائض المغذيات ونواتج الأيض لا تكون مطروحة أصلاً.
- 2- إنّ الكتلة الحيوية يمكن الحصول عليها من مصانع (صناعات) التخمير حيث تكون أساساً مخلف ناتج من عملية التخمير.
- 3- نظام لا تحكمه العوائق الفيزيولوجية للخلايا الميكروبية الحية.
- 4- نتيجة لكون أنّ الكتلة الحيوية غير الحية تسلك سلوك التبادل الأيوني فإنّ هذه المعالجة تكون سريعة جداً وتحدث خلال بضع دقائق إلى بضع ساعات، وشحن المعادن في الكتلة الحيوية عادة يكون عالياً جداً إذ ينتج عن امتصاص معدل المعادن بكفاءة عالية جداً.
- 5- نتيجة لكون أنّ الخلايا لا تكون حية فإنّ ظروف المعالجة لا تكون قاصرة على تلك الملائمة لنمو الخلايا. بمعنى أنّه ممكن أن يوجد مجال واسع من الظروف التجريبية لإتمام هذه المعالجة
- 6- يمكن إزالة المعدن بسرعة واستعادته إذا كانت قيمة وكمية المعدن المستعاد هامة ومعنوية وإذا كانت الكتلة الحيوية وافرة إذ أنّ الكتلة الحيوية المحتوية على المعدن يمكن هدمها وبالتالي إزالتها بعد المعالجة وتحرير المعدن.

6.2 الدورة البيوجيوكيميائية للزئبق



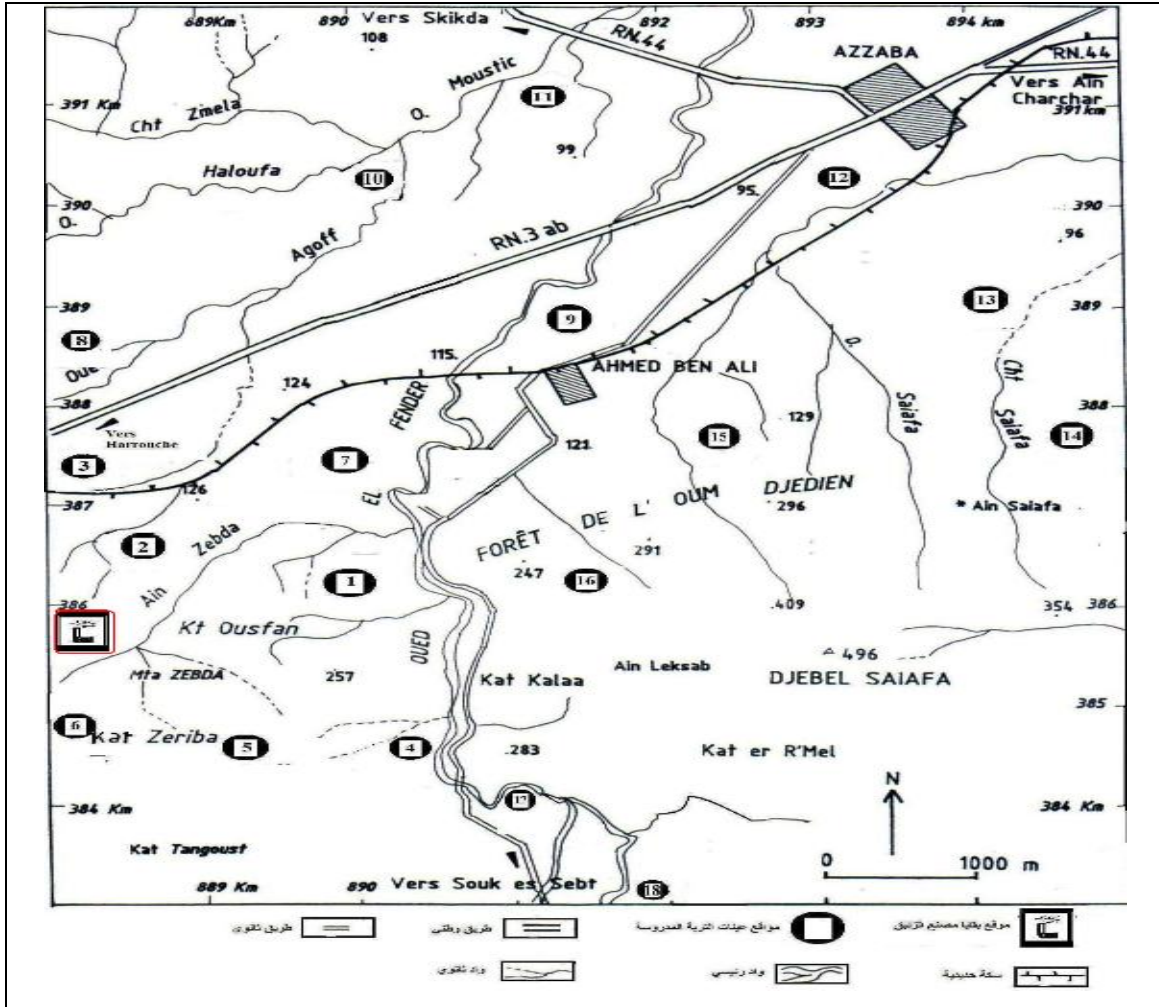
شكل 2 الدورة البيوجيوكيميائية للزئبق (Silver و Hobman، 2007)

# المواد وطرق العمل

### 3. المواد وطرائق العمل

#### 1-3 وصف منطقة الدراسة

تقع منطقة عزابة بولاية سكيكدة على بعد 500 كيلومتر إلى الشرق من الجزائر العاصمة بين خطي عرض  $36^{\circ} 76' 08''$  و  $36^{\circ} 85' 35''$  شمالا وخطي طول  $7^{\circ} 20'$  و  $7^{\circ} 40'$  غربا. تقع بقايا مصنع إسماعيل لاستخلاص الزيت على هضبة koudiat Ousfan شكل 1 على بعد 7 كيلومتر إلى الجنوب الغربي من مدينة عزابة و3 كيلومتر شمال مدينة السبت وعلى بعد 2 كيلومتر من المجمع السكني مشنة الزاوية و 5 كيلومتر من المجمع السكني رأس الماء. يسود المنطقة مناخ البحر الأبيض المتوسط الذي يتميز بفصل حار وجاف يمتد من شهر مايو إلى شهر سبتمبر وفصل بارد ورطب يمتد من شهر أكتوبر إلى شهر أبريل.



شكل 3 توزيع مواقع أخذ عينات التربة



### 2-3 تحضير عينات التربة

تمّ تحضير عينات التربة من الأراضي الزراعية المجاورة لمنطقة المصنع، وقد أمكن انتخاب 18 موقعا للدراسة يوضحها الشكل 1. وقد قسمت هذه المواقع على أساس البعد عن مخلفات المصنع إلى أربعة مجموعات تضم كل منها المواقع المتماثلة البعد الجدول 1. تشمل هذه المواقع أراضي تنتشر بها الزراعات المسقية وأراضي تنتشر بها حقول الزيتون وحقول الفاكهة. من كل حقل تم أخذ خمس (5) عينات من التربة باستخدام أداة ثقب حديدية، وكل عينة تتكون من خمس تحت عينات أخذت ضمن متر مربع واحد وتخلط مع بعضها لتكون عينة واحدة وذلك على مستوى الطبقة السطحية (عمق 0-20 سم) والطبقة تحت السطحية (عمق 20-40 سم). توضع كل عينة في كيس بلاستيكي ثم تنقل إلى المختبر لإجراء التحاليل. في المختبر تمّ تجفيف التربة هوائيا على درجة حرارة الغرفة، وبعد هرس التربة قليلا تمّ غربلتها بمنخل ذو ثقب 2 mm، ويحفظ هذا الجزء الأخير في علب على درجة حرارة 4 م° إلى حتى إجراء التحاليل.

جدول 1 توزيع المواقع على أساس البعد عن المصنع

المجال (متر)		البعد (متر)	الموقع
2300-870	D1	1750	1
		1100	2
		1500	3
		2300	4
		1500	5
		870	6
3250-2600	D2	2600	7
		2800	8
		3250	16
		3200	17
5000-4500	D3	5000	10
		4500	9
		5000	15
		4700	18
6850-6300	D4	6300	11
		6750	12
		6850	13
		6750	14

### 3-3 تحليل الخواص الفيزيائية الكيميائية للتربة

- pH<sub>(H2O)</sub> تم قياسه في معلق التربة والمحضر بنسبة (1: 2.5) في الماء المقطر.  
- المادة العضوية تم تقديرها على أساس أكسدة الكربون العضوي بواسطة K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> في وسط حامضي

(Cottenie وآخرون، 1979).

- السعة التبادلية الكاتيونية (س ت ك) تمّ تقديرها من خلال تشبيح معقد الإدمصاص بأيونات NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ثم غسل الفائض منها بواسطة الإيثانول ويقدر المدمص منها بعد إزاحته بواسطة أيونات الـK<sup>+</sup> (Cottenie وآخرون، 1979).

- كربونات الكالسيوم أمكن تقديرها من خلال حساب كمية حمض الكبريتيك (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) التي تتفاعل مع الـCaCO<sub>3</sub> وفق التفاعل  $CaCO_3 + H_2SO_4 \rightarrow CaSO_4 + CO_2 + H_2O$ . إنّ الـH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> الذي يضاف بفائض تعاد معايرته بواسطة NaOH (Cottenie وآخرون، 1979).

- تمّ دراسة قوام التربة من خلال تقدير نسبة التوزيع الحجمي لكل من الطين والسلت باستخدام ماصة Robinson على أساس قانون ترسب حبيبات التربة لـ Stokes بعد أن يتمّ فصل الأجزاء من 50 إلى 200 µm بالمناخل، وتوضح نتائج التحليل على مثلث القوام الأمريكي (USDA Mathieu وPieltain، 1998).

### 3-4 تقدير الزئبق في التربة

تم تقدير الزئبق الكلي في عينات التربة بطريقة الامتصاص الذري في غياب اللهب على أساس مبدأ Hatch و OTT (1968) وذلك باستخدام جهاز تحليل الزئبق من نوع Colman MAS50 حيث يكون التقدير على أساس أكسدة الزئبق بواسطة مؤكسد قوي (KMnO<sub>4</sub>) في وسط عالي الحموضة إلى أيونات Hg<sup>2+</sup> ثم يعاد اختزال هذه الأيونات (Hg<sup>2+</sup>) عن طريق كلوريد القصديروز (SnCl<sub>2</sub>) إلى الزئبق المعدني Hg<sup>0</sup> الذي يتبخّر ويدخل إلى خلية الامتصاص حيث يمر على مصدر ضوئي (λ = 253.8 nm). تقدر النفاذية (T %) ثمّ تحول إلى ما يقابلها من الامتصاصية (A = 2 - log T %) ويحدد تركيز الزئبق من المنحنى القياسي. بلغ الحد الأدنى للقياس بهذه الطريقة (0.08 µg/g) وتمّ تقديره من خلال معدل المحلول القياسي (Blank) مضافا إليه جداء قيمة t المأخوذة من جدول Student والمقابلة لتكرار المحلول القياسي (Blank) في الانحراف المعياري (SD) للمحلول القياسي، ومعامل التغير (CV) لمعدل ثلاث قياسات للمحلول القياسي كان أقل من 10 % .

### 3-5 عزل وتنقية الفطريات من التربة

#### 1.5.3 العزل

تمّ عزل الفطريات بتقنية العزل المباشر عن طريق المعلق المخفف (Devet و Rouxel، 1997) وتتمثل في تحضير معلق من التربة يتكون من 10 غ مذابة في 90 ملل من الماء المقطر المعقم، ثم الرج لمدة نصف ساعة وهذا يمثل تركيز  $10^{-1}$  ثم تجري سلسلة من التخفيفات المتولية بأخذ 10 ملل ثم تضاف إليها 90 ملل من الماء المقطر المعقم وتمّ ذلك من خلال استعمال ماصات معقمة يتم استبدالها في كل عملية. وبعد مرور فترة النمو والتي تتراوح ما بين 7-10 أيام تبدأ عملية فحص المستعمرات النامية ثم تنقيتها. حسب Parkinson و Thomas، 1965 فإن هذه الطريقة تكون ملائمة خاصة في حالة عزل للصور الميسليومية المنتشرة في المجال الجذري (rhizosphere). تمت عملية الزرع على الوسطين Potabo Dextrose Agar (PDA) و (MSA) Malt agar salt بوضع 1 ملل من التخفيين  $10^{-5}$  و  $10^{-6}$  في طبق بتري يحتوي على 20 ملل من الوسطين بثلاثة مكررات مع التحريك الدائري حتى ينتشر المعلق بصور متجانسة على البيئة الغذائية. حضنت الأطباق على 25م° ثم أحصيت المستعمرات النامية بعد مضي فترة التحضين.

#### 2.5.3 التنقية

تمت عملية تنقية الفطريات بالعزل المتكرر على وسط PDA و التحضين على درجة 25 م° ثم حفظت الفطريات المشخصة في الثلاجة على درجة حرارة 4 م° إلى حين استخدامها.

#### 3.6 تعريف الفطريات المعزولة

يتمّ تشخيص الفطريات بالمعاينة الماكروسكوبية والميكروسكوبية لتحديد المواصفات الخارجية للمستعمرة والصفات التركيبية للعزل الفطري والأعضاء التكاثرية.

#### 3.6.1 تحديد الأجناس

تمّ التعرف على الأجناس بالاعتماد على المراجع الأساسية: (Domsch و آخرون، 1970)، Booth (1971)، و Pitt Ellis (1971)، Raper و Fennell (1973)، Samson و Pitt (1985)، Samson (1993)، Domsch و Gams (1972)، Champion (1997)، Multon (1998)، Samson و آخرون (1995). وهذا من خلال تحديد المواصفات المرفولوجية التالية:

- لون المستعمرة من الوجهين الأمامي و الخلفي.
- بنية المستعمرة من شكل سطحها.

- وجود كتلة مركزية و الهالة المحيطة بالمستعمرة.
- قوام المستعمرة من حيث أنها جليدية أو قشرية و لها غزل هوائي أم لا.
- وجود قطرات ندى على الغزل الفطري.
- معدل نمو الغزل الفطري.
- وجود الأجسام الحجرية.
- وجود الحواجز العرضية بالهيفات الفطرية.
- شكل الحوامل البوغية.
- وجود الأكياس البوغية والأبواغ الكلاميدية وتوضعها.
- وجود الكونيديات وشكلها وتوضعها على الحامل.

### 2.6.3 - تحديد الأنواع

استعملت لهذا الغرض المزارع البيئية الخاصة بالتعريف و هي PDA و MEA) Malt Extract AGAR و (CYA) Czapek Yeast Extract حيث يزرع كل نوع من الأنواع المعزولة وحضنت على ثلاث درجات حرارية مختلفة 5م°، 25م°، 37م° ثم يعاين النمو الميسليومي بعد 7 أيام من التحضين مع مراعاة الصفات الأساسية التالي:

- لون الأصباغ المنتشرة في البيئة الغذائية.
- معدل سرعة نمو الميسليوم.
- وجود قطرات ندى أو عدم وجودها على الميسليوم.
- الدرجة المتلى لنمو الميسليوم.
- شكل و أنواع الكونيديات وتوضعها على الحامل.
- الملمس الخارجي للكونيديات والحوامل و اللون الداخلي لها ملمس الهيفات وطرق تشعبها.
- وجود الأبواغ الكلاميدية و صفاتها (الشكل، الحجم، التوضع، عدد الخلايا الموجود بها، شكل نهاياتها).

### 3.6.3 التعريف من خلال الدراسة المجهرية الآلية والمقارنة مع قاعدة البيانات

وأخيرا خضعت العزلات الفطرية إلى الدراسة بالمجهر الضوئي بنظام تحليل الصورة باستخدام (Soft-Imaging Gm bH Software (analysis Pro, Ver. 3) وكذا نظام قاعدة البيانات الحديثة التي تم إدخالها إلى المركز الإقليمي للفطريات و تطبيقاتها والخاصة بتعريف جنسي كل من *Aspergillus* و *Penicillium*.

### 7.3 الدراسة المخبرية لتأثير الزئبق على الفطريات المعزولة من التربة

#### 1.7.3 تحديد الأنواع الحساسة والأنواع المقاومة

تمّ تنمية الأنواع الفطرية النقية على أوساط مغذية تحتوي على تراكيز من الزئبق 0.5، 1، 2.5، 5، 10 ppm على صورة كلوريد الزئبق  $HgCl_2$  تحضر التركيز من المحلول الأم ثم يضاف إلى البيئة الغذائية بعد عملية التعقيم وفي ظروف معقمة. يتم تحديد مدى الحساسية من خلال قياس متوسط النمو القطري للمستعمرة الفطرية النامية على الوسط الصلب.

تمّ تقدير الزئبق بواسطة جهاز تحليل الزئبق MAS50 لتحديد أي تحول لمثيل الزئبق إلى زئبق عضوي أو العكس ثم اختيار اختزال نوعي لكل من كلوريد القصديروز ( $SnCl_2$ ) بوروهيدريد الصوديوم ( $NaBH_4$ ). الـ  $SnCl_2$  يمكن أن يختزل  $Hg^{2+}$  إلى الزئبق المعدني ( $Hg^0$ ) ولكنه لا يستطيع اختزال مثيل الزئبق. بينما الـ  $NaBH_4$  يختزل كل من  $Hg^{2+}$  و  $CH_3Hg^+$  إلى الزئبق المعدني ( $Hg^0$ ). يحسب تركيز مثيل الزئبق من خلال الفرق بينت الزئبق الناتج من الاختزالين.

كمية مثيل الزئبق = كمية الزئبق المختزل عي طريق  $NaBH_4$  - كمية الزئبق الناتجة عن اختزال ( $SnCl_2$ ). أي يقدر في العينة تراكيز الزئبق عن طريق  $SnCl_2$ .

#### 2.7.3 دراسة آليات المقاومة للزئبق لدى الفطري *A. niveus* و *A. tubingensis*

##### 1.2.7.3 تأثير الزئبق على الكتلة الحيوية

تمّ تحديد تأثير الزئبق على الكتلة الحيوية من خلال قياس الوزن الجاف لميسليوم الفطر النامي في البيئة السائلة (Roland و Benchat، 1984) المحتوية على الزئبق بتراكيز تتراوح من 0.5 إلى 10 ppm على صورة كلوريد الزئبق، و قد استخدمت لهذا الغرض بيئة

##### 2.2.7.3 تقدير الأحماض الدهنية

تمّ تقدير الأحماض الدهنية باستخدام جهاز كروماتوغرافيا الغاز/مطيافية الكتلة SHIMADZU GC/MS-QP 5050A بالمركز الإقليمي للفطريات والتكنولوجيا الحيوية يتكون عمود كروماتوغرافيا الغاز من عمود شعيري (بطول 25 متر وقطره داخلي  $0.5\mu m$  و سمك  $1.5\mu m$ ) و المرتبط كيميائيا مع dimethyl polysiloxane تبرمج درجة حرارة الجهاز على  $110^\circ C$  (لمدة دقيقة) ثم ترفع إلى  $200^\circ C$  لمدة دقيقة بمعدل  $5^\circ C/الدقيقة$  ثم ترفع إلى  $260^\circ C$  لمدة دقيقتين بمعدل  $3.5^\circ C/الدقيقة$  يثبت الكاشف Dectetor والـ Injector على درجة حرارة  $280^\circ C$ . تستخدم المعطيات

الطيفية للكثلة في تعريف المنحنيات (Peak) المفصولة على أساس قاعدة البيانات بذاكرة الجهاز وهذا بالمركز الإقليمي للفطريات و تطبيقاتها.

### 3.2.7.3 الأيضات الثانوية الداخلة خلوية بواسطة TLC

أ- استخلاص الأيضات:

تتم عملية الاستخلاص بالميثانول / الكلورفورم (1:2 v/v)؛ يجفف المستخلص عن طريق التجفيد ثم يضاف إليه 2 ملل من الميثانول. تحضر رقائق الـ Silica gel (20 x 20 cm) بتسخينها على درجة حرارة 80°م لمدة 5 دقائق، يحدد خط انطلاق الهجرة بـ 1.5 سم من القاعد و خط نهاية سريان المذيب بـ 1.5 سم من قمة الرقائق توضع العينات على خط الانطلاق بمقدار 10µl من المستخلص. تم استخدام Griseofulvin كقياسي بعد إذابته في المذيب كلورفورم / ميثانول (2:1 v/v). يحضر حوض الفصل بوضع كمية من محلول الفصل ويغلق بإحكام لمدة 2 ساعتين وبه المذيب كلورفورم/ أسيتون/بروبانول (85:15:20 v/v/v)؛ وتتم عملية الفصل على مسافة 17 سم. بعد جفاف رقائق TLC تفحص بالضوء العادي و بضوء الأشعة UV 365µm لتحديد البقع المفصولة. ترش رقائق TLC بـ Ceric Sulphate المذاب في حمض الكبريتيك 3M ثم تفحص بالضوء المرئي و ضوء أشعة الـ UV (365nm) تسخن الرقائق على درجة حرارة 110 م° لمدة 8 دقائق.

ب - تعريف الأيضات

تعرف الأيضات من خلال مقارنة كل من اللون و قيم معامل الاحتباس  $R_f$  مع تلك الموجودة في الـ database و (Paterson و Bridge، 1994).

### 4.2.7.3 فصل البروتينات

تم فصل البروتينات عن طريق جهاز Capillary electrophase حيث تحضر أنابيب ependorf وترقم بعدد العينات المدروسة توضع في كل منها كميات متماثلة من مستخلص العينات الفطرية الذي تم تحضيره سابقا بمحلول الكلورفورم ميثانول (2 : 1) . في حالة العينات غير المركز فيمكن تركيزها عن طريق الطرد المركزي لمدة دقيقة على الأقل من 4000 دورة.

تحضر عينات الجهاز في أنابيب ependorf دقيقة مصممة مع الجهاز ويوضع في كل منها 90 µl من العينة، 90 µl من عينة بروتينية و 10 µl من الماء المقطر ثم تترك في حمام مائي على

درجة الغليان وترج بالتقليب كل 5 دقائق. بعد حقن الجهاز بالعينات فإنه يقوم بفصل البروتينات و رسمها على منحنى بياني مع تحديد الوزن الجزئي لكل منها.

تمّ الفصل باستخدام جهاز الكتروفوريز شعيري 0 المجهز بـ Multi-wave length scanning detector الذي يستطيع فصل مختلف أنواع البروتينات والبيبتيدات ويحدد الوزن الجزئي لكل منها وهذا بالمركز الإقليمي للفطريات وتطبيقاتها بجامعة الأزهر القاهرة.

### 5.2.7.3 تقدير الأحماض الأمينية

#### تحضير العينات:

تمّ تقدير الأحماض الأمينية المرتبطة بجهاز Amino-acid analyzer تؤخذ كميات متماثلة من المستخلص الفطري الذي تمّ تحضيره عن طريق الكحول الإيثيلي بتركيز 70% وتوضع في أنابيب زجاجية محكمة الغلق، يضاف إليها حمض HCl بتركيز N 6 ثم تترك في الفرن الحراري للهضم لمدة ليلة كاملة (12 ساعة) على درجة حرارة وذلك من أجل عملية الهضم، بعد انتهاء فترة عملية الهضم تستقبل العينات في Ependorf ثم تطرد مركزيا على 15000 دورة في الدقيقة لمدة ربع ساعة، يؤخذ الطافي و يرشح بواسطة Holder بلاستيكي يحتوي على ورقة ترشيح Watman رقم 3 باستخدام إبرة حقن، يستقبل الراشح في أنابيب Ependorf مرقمة بعدد العينات.

#### حقن العينات في الجهاز

تؤخذ كميات من العينات المحضرة وتوضع في أنابيب Ependorf دقيقة خاصة بالجهاز ويجرى لها تخفيف 20/1 ويبرمج هذا التخفيف في ذاكرة الجهاز الآلية لكي يأخذ ذلك في الاعتبار عند القراءة . تحضر العينة بأخذ 10 ملل من العينة مضافا إليها 190 ملل من محلول خاص بالجهاز بواسطة ماصة آلية، يرج الأنبوب جيدا وتوضع الأنابيب في المكان الخاص بها في الجهاز ثم يشغل الجهاز. يرسم الجهاز المنحنى البياني الخاص بكل حمض أميني موضحا عليه تركيز ونسبة الحمض الأميني في العينة بعد مقارنتها بقاعدة البيانات الموجود في المنحنى القياسي بذاكرة الجهاز. تم فصل الأحماض الأمينية باستخدام جهاز تحليل الأحماض الأمينية (Ependorf / Biotronik (LC3000 (العمود Column P 125 x 4 mm و الـ P60 x 4 mm pre-column العينة القياسية / 4n mol aminoacid بالمركز الإقليمي للفطريات بجامعة الأزهر.

### 6.2.7.3 تقدير الأحماض العضوية

تم تقدير الأحماض العضوية بواسطة الـ GBC HPLC (العمود من نوع Hypersil C250x4.6 mm، المحلول المنظم ميثانول (0.08) حمض الفوسفوريك 0.2M (0.72)، الكاشف UV 254nm (Dedector) و جهاز جهاز كروماتوغرافيا الغاز المتزاوج مع مطيافية الكتلة (GC/MS system : SHIMADZU QP 5050A) بالمركز الإقليمي للفطريات و تطبيقاتها بجامعة الأزهر - القاهرة.

### 7.2.7.3 تقدير المركبات الثيولية

لدراسة تأثير الزيتق على الفطريات فقد تمّ تنمية الفطريات على البيئة السائلة، أخذت 4 أقراص (وقطرها 6 mm) من مزارع عمرها لمدة 7 أيام ونقلت إلى دوارق سعتها 200 ملل تحتوي على محلول مائي يحتوي على 0.5% مستخلص المالت و 0.1% بيبتون. يؤخذ المسليوم من خلال الترشيح بعد مرور فترة النمو ويغسل مرتين بالماء المقطر ويعصر بلطف بين أوراق الترشيح ويحدد الوزن قبل التجفيف. يجفف المسليوم بعد ذلك حتى ثبات الوزن (مدة 4 ساعات على 80 م°). استخلصت المركبات الثيولية وفقا لطريقة Grill (1991) المعدلة من قبل Miersch و آخرون (1997)، حيث يتم تقدير تركيز الثيولات الكلي بكاشف Ellman (1959)، إذ يمزج µl 100 من العينة القياسية أو الشاهد (H<sub>2</sub>O ذو pH 3 بواسطة TFA) مع µl 900 من كاشف Ellman ويحضن على درجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق. تقرأ الامتصاصية عند طول موجي 410 nm. يحضر المحلول القياسي باستخدام الجلوتاتيون بتراكيز 10 - 100 µ/ml. يعبر عن النتائج بـ nmol من الجلوتاتيون المكافئة لكل 1 g من الكتلة الجافة.

### 8.2.7.3 تقدير نشاط الإنزيمات المضادة للأكسدة

حصل على الميسيليوم أثر الترشيح تغسل مرتان بالماء المقطر المنزوع الأيونات مرتان و تضغط ما بين ورقتين ترشحييتين للتخلص من الفائض المائي، يمزج الميسيليوم مع الرمل (2g/g ميسيليوم) بهاون في وسط بارد لمدة 4 دقائق. يستقبل الخليط على المحلول المنظم (20 mM Tris، pH 7.5) ، (1mM EDTA) و يحصل على مستخلص الخلايا الحرة بعد التثقيب مرتان الأولى 6200 x g لمدة 10 دقائق والثانية 18.000 x g لمدة 4 دقائق (Azevedo وآخرون، 2007).



### 1.8.2.7.3 قياس نشاط (SOD) superoxide dismutase

قدر نشاط SOD وفقا لطريقة Fridovich و McCord (1969) اعتمادا على نظام xanthine و xanthine oxidase حيث أنّ الوحدة من SOD هي الكمية الأنزيمية اللازمة لتثبيت اختزال السيتروكوم C بـ 50 %.

### 2.8.2.7.3 قياس النشاط الـ catalase (CAT)

قدر نشاط الـ CAT وفقا لطريقة Aebi (1984) معتمدا على كمية الـ  $H_2O_2$  المفككة بالإنزيم خلال التحضين لمدة 30 ثا. ترصد اختلاف الامتصاصية على 240 nm. قياس نشاط Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH)

### 3.8.2.7.3 قياس نشاط G6PDH

يعتمد قياس نشاط G6PDH على تزايد الامتصاصية على 340 nm الناتج عن اختزال NADP وفقا لطريقة Postma (1989). يعبر عن الأنشطة الانزيمية التي قيست بالـ U/mg من البروتين الكلي. تم تقدير المحتوى البروتيني على أساس طريقة Lowry وآخرون (1951) باستخدام ألبومين المصل البقري.

### 4.8.2.7.3 تقدير نشاط الـ Glutathione peroxidase

تمّ قياس تناقص الامتصاصية على 340 nm الناتجة عن أكسدة NADPH على 37 °م، ويعبر عن الوحدة النشاطية بالوحدة المؤكسدة لـ 1  $\mu\text{mol}$  من الـ NADPH كل دقيقة (Rapoport وآخرون، 1994).

### 8.3 تجارب الـ RAPD-PCR

### 1.8.3 استخلاص DNA

بعد تنمية الفطر على بيئة سائلة من MEA ينزل الميسيليوم باستخدام الماء ثنائي التقطير ويستخدم المعلق السبوروي في تلقيح 100 ml من بيئة YES الوزعة ضمن أقماغ سعتها 250 ml وتحضن على لمدة 48 ساعة. يؤخذ الميسيليوم في ظروف معقمة ويخزن على درجة -20°م بعد طحن الميسيليوم على البارد يوضع مسحوق عينة الفطر في أنابيب Ependorf ويستخلص الـ DNA بواسطة DNeasy Kit واتباع الخطوات المشار إليها في الوثيقة المرفقة مع الـ Kit.

### RAPD-PCR 2.8.3

تمّ تضخيم القطع الجينومية للـDNA بواسطة جهاز الدوار الحراري (Thermo cycler) المبرمج وباستخدام ثلاث بادئات (primers)

Primer – 2 : 5'-d (GTTTCGCTCC)

Primer – 4 : 5'-d (AAGAGCCCT)

Primer – 6 : 5'-d (CCCGTCAGCA)

### 3.8.3 الهجرة الكهربائية

تمّ فصل نواتج الـPCR في 2% أجاروز في منظم TBE . بعد غليا الجيل يضاف إليه محلول ethidium bromide عند 55 م° وبعد هجرة الـDNA يصور باستخدام trasilluminator لنظام . documentation gel

### 9.3 تجارب الادمصاص الحيوي للزئبق

#### 1.9.3 تحضير المدمص الحيوي

يؤخذ الميسيليوم ويرشّيح ثمّ يغسل بالماء المقطر المنزوع الأيونات مرتان و تضغط ما بين ورقتي الترشيحي للتخلص من الفائض المائي، يضاف محلول KOH (5%) للميسيليوم ثمّ يترك لمدة 15 دقيقة. بعد أن يبرد المستحضر على درجة حرارة الغرفة تغسل الكتلة الحيوية جيدا بالماء المقطر حتى الـpH المتعادل ثم تخزن في محلول 0.1% أزيد الصوديومفي جو بارد إلى غاية الإستعمال.

#### 2.9.3 دراسة الادمصاص

بعد تحضير المحلول ذو الـ pH المحدد يؤخذ منه 50 ml وتوضح في دورق سعته 250 ml ، ثم يضاف إليها 0.3 g من الميسيليوم الفطري يوضع الدورق في حضان رجاج بمعدل سرعة 300 rpm وحرارة 25 م°. و بعد 24 ساعة يفصل الميسيليوم بغشاء ( 0.45 um ) و يقدر تركيز الـHg في المحلول. كمية المعدن المدمصة من قبل الفطر  $q_e$  تحسب من خلال المعادلة :

$$q_e = \frac{V}{m}(C_0 - C_e)$$

حيث :  $C_0$  = التركيز الابتدائي

$C_e$  = تراكيز الأيون  $Hg^{2+}$  بعد الاتزان

$V$  = حجم مادة الامتصاص

$m$  = كتلة مادة الادمصاص

### 3.9.3 منحنيات التعادل الحراري Equilibrium isotherms

إنّ منحنيات الاتزان الحراري (isotherms) تصف كيف تتفاعل المواد المدمصة (adsorbates) مع مواد الادمصاص (adsorbents). ولذا فإنّ ارتباط معطيات الاتزان بين كل من المعادلات النظرية (theoretical) و التجريبية (empirical) هام جدا في تحديد نموذج تطبيقي وإرساء أنظمة إدمصاص. تمّ في هذا البحث دراسة منحنيات التعادل الحراري لكل من Langmuir و Freundlich

### 4.9.3 أسترة المدمص الحيوي

تمّ إجراء عملية استرة المصاحم الكربوكسيلية بتحضير معلق من المدمص الحيوي في حمض HCl (0.5%) و الميثانول (20%) والرج على درجة 60 م°، وبعد غسل المدمص الحيوي تحدد سعة الادمصاص.

### 5.9.3 حلمة المدمص الحيوي المؤسّتر

تجرى عملية التحليل المائي للمدمص الحيوي المؤسّتر باستخدام NaOH (0.1 M) لإزالة مصاحم الأستر.

### 10.3 الدراسة الإحصائية

تمّ إجراء كل الدراسات الإحصائية بالاستعانة ببرنامج Statistica 6 في دراسة اختبار معامل الارتباط لـ Pearson، تحليل التباين (ANOVA) واختبار Newman-keuls لتحديد الفروق المعنوية وتحليل المكونات الرئيسية (APC)، والانحدار الخطي.

# 4- النتائج

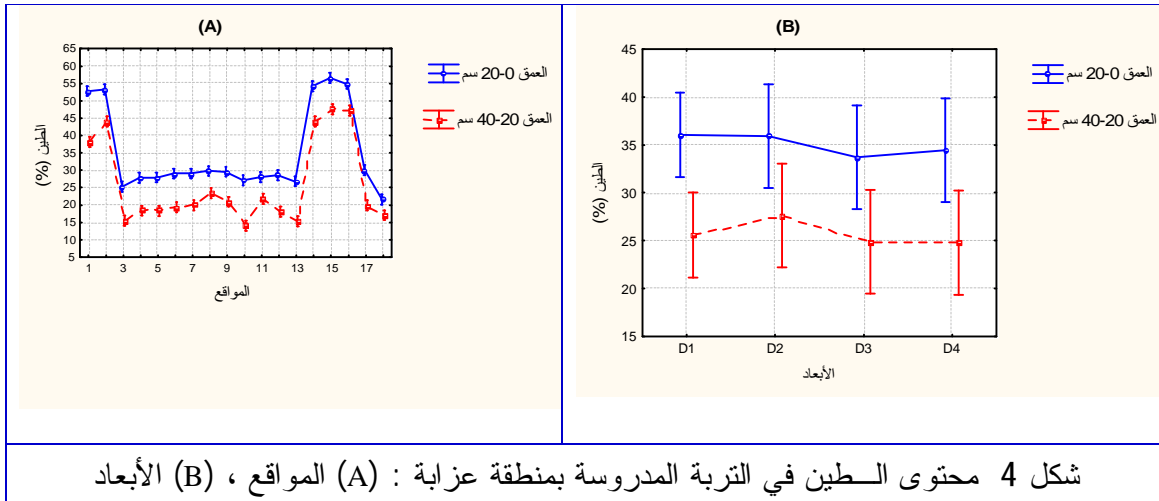
## 4. النتائج

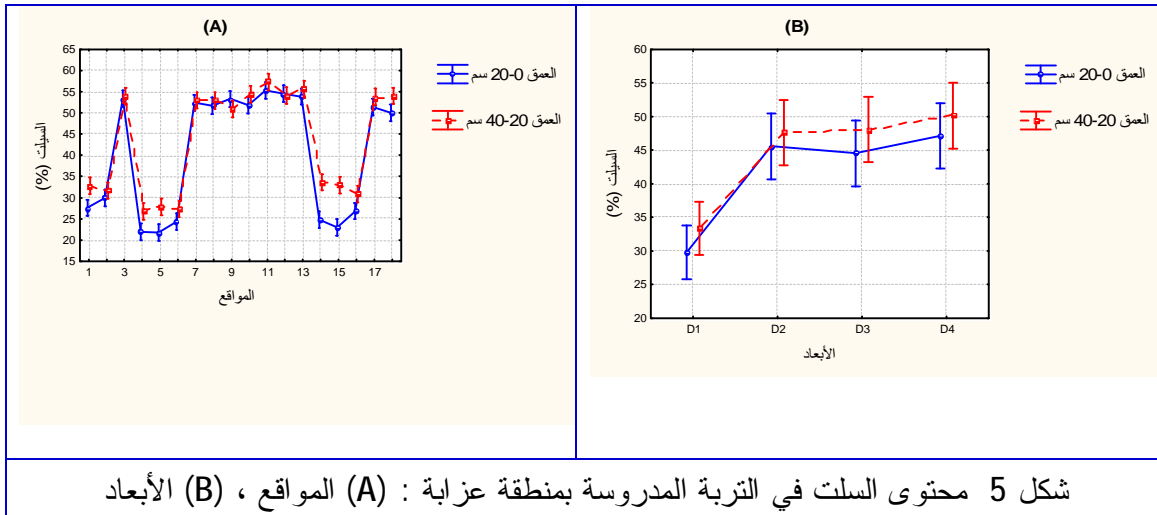
### 1-4 خصائص التربة

#### 1-1-4 القوام

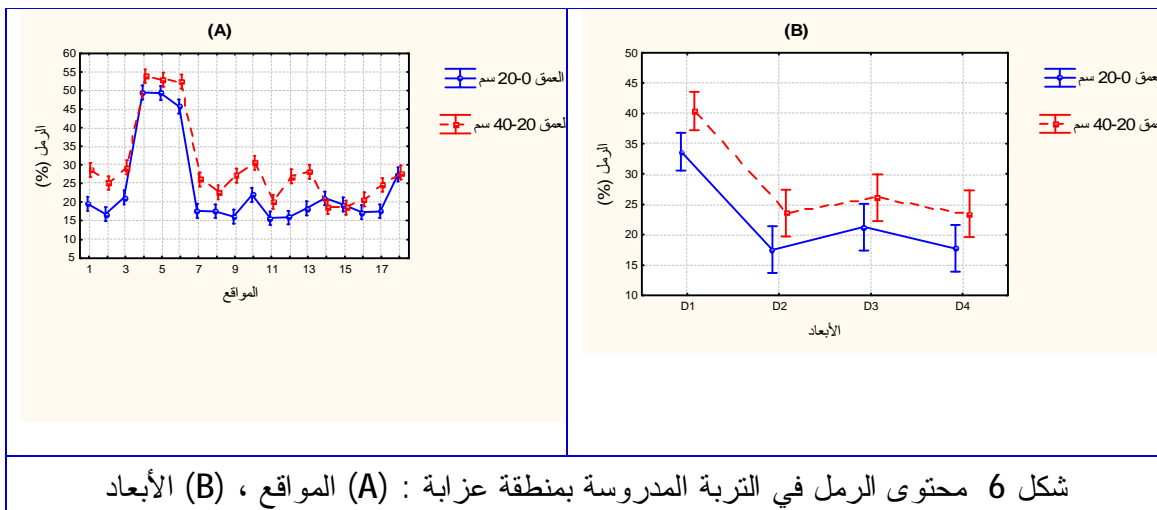
جدول 2 قوام تربة المواقع المدروسة بمنطقة عزابة

الأبعاد	المواقع	الرمل %	السيلت %	الطين %	قوام التربة
D1	1	24,13	30,20	45,47	طينية
	2	20,97	30,79	48,67	طينية
	3	25,33	53,61	20,36	طمية سيلتية
	4	51,64	24,39	23,07	طمية طينية رملية
	5	51,13	24,77	23,10	طمية طينية رملية
	6	49,02	25,81	24,18	طمية طينية رملية
D2	7	21,86	52,64	24,50	طمية سيلتية
	8	20,13	52,27	26,59	طمية سيلتية
	16	19,04	28,81	51,05	طينية
D3	17	21,10	52,55	24,95	طمية سيلتية
	9	21,67	52,09	25,24	طمية سيلتية
	10	26,31	53,14	20,56	طمية سيلتية
D4	15	18,96	27,94	52,06	طينية
	18	27,67	52,01	19,32	طمية سيلتية
	11	17,90	56,29	24,92	طمية سيلتية
	12	21,40	54,31	23,30	طمية سيلتية
	13	23,24	54,72	21,04	طمية سيلتية
	14	19,87	29,20	49,16	طينية





شكل 5 محتوى السلت في التربة المدروسة بمنطقة عزابة : (A) المواقع ، (B) الأبعاد

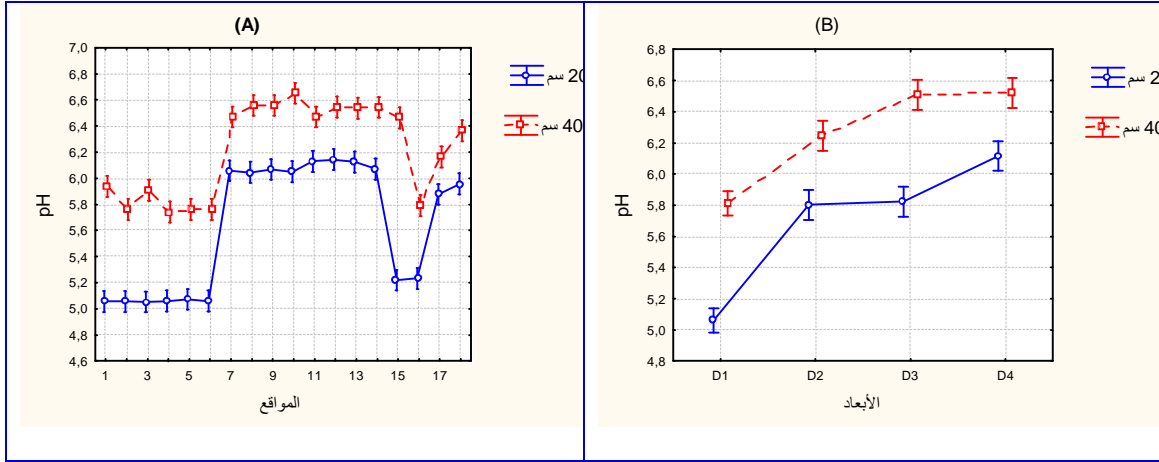


شكل 6 محتوى الرمل في التربة المدروسة بمنطقة عزابة : (A) المواقع ، (B) الأبعاد

من خلال تصنيف التربة على أساس مثلث USDA جدول 2 يلاحظ أنه توجد ثلاثة أنواع من الترب في المنطقة المدروسة وهي تربة طينية وتوجد على مستوى المواقع 1، 2، 14، 15، 16 وتربة طمية رملية وتوجد بالمواقع 4، 5، 6 وتربة طمية سلتية وتوجد على مستوى بقية المواقع. إن محتوى الطين بكل المواقع كان عاليا في الطبقة السطحية (0-20 سم) مقارنة بالطبقة تحت السطحية (20-40 سم) شكل A4 ولكنه بقي ثابتا مع زيادة البعد عن موقع المصنع شكل B4. ولكن بالنسبة لمحتوى السلت فباستثناء الأراضي الطينية والتي شهدت ارتفاعا مع زيادة العمق فإن تربة باقي المواقع ظلت بها نسبة السلت ثابتة مع زيادة العمق شكل A5؛ كما أن تربة المواقع القريبة من المصنع (البعد D1) قد احتوت على نسبة أقل من السلت مقارنة بالباقي من المواقع شكل B5. أما محتوى الرمل فقد كان أكثر ارتفاعا في الموقع ذات التربة الطمية الرملية (6،5،4)

وشهد ارتفاعا مع زيادة العمق في جميع المواقع ماعدا المواقع 14، 15، 16، 18 شكل A6. كما أنّ نسبته كانت عالية بالمواقع القريبة من المصنع ثم تتخفض لتظل ثابتة مع زيادة البعد شكل B6.

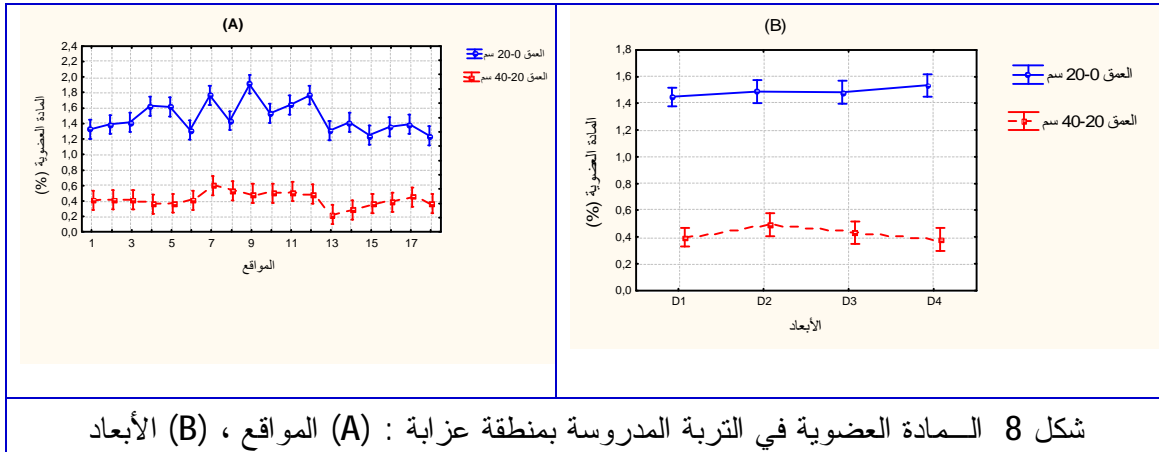
#### 4-1-2 الحموضة



شكل 7 الأس الهيدروجيني (pH) في التربة المدروسة بمنطقة عزابة : (A) المواقع ، (B) الأبعاد

تميزت تربة المنطقة المدروسة بأنها حامضية على مستوى الطبقة السطحية، وكانت أكثر حموضة بالمواقع القريبة 1- 6 من المصنع (البعد D1) وكذا الموقعين 15، 16؛ إلا أنّ هذه الحموضة خفت مع زيادة العمق وأصبحت حامضية مخففة بالمواقع 7 - 15 وكذا الموقعين 17، 18 شكل A7. كما أنّ الحموضة وفي العمقين المدروسين قد ارتفعت مع زيادة البعد عن موقع المصنع شكل B7.

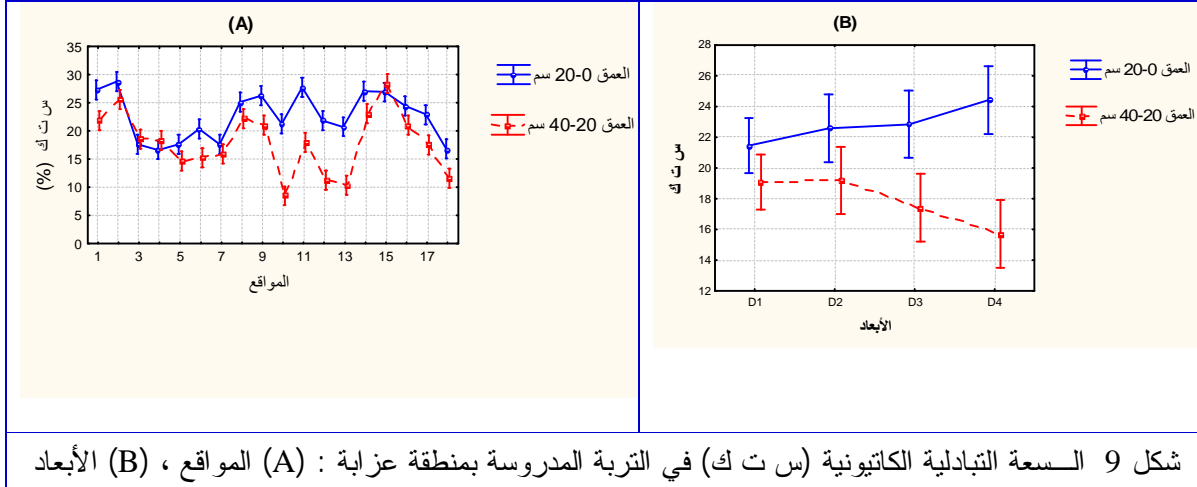
#### 4-1-3 المادة العضوية



شكل 8 المادة العضوية في التربة المدروسة بمنطقة عزابة : (A) المواقع ، (B) الأبعاد

تميزت التربة المدروسة بمحتوي منخفض من المادة العضوية على مستوى العمقين المدروسين. وقد تركزت المادة العضوية بالطبقة السطحية ثم انخفضت معنوياً مع زيادة العمق شكل A8 إلا أنها ظلت ثابتة مع زيادة البعد عن المصنع شكل B8.

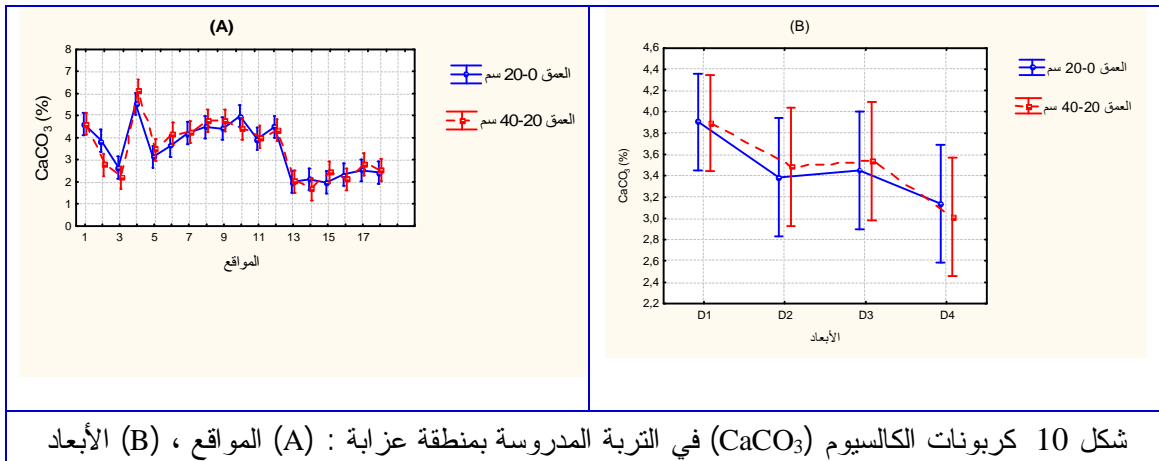
#### 4-1-4 السعة التبادلية الكاتيونية (س ت ك)



شكل 9 السعة التبادلية الكاتيونية (س ت ك) في التربة المدروسة بمنطقة عزابة : (A) المواقع ، (B) الأبعاد

تباينت السعة التبادلية الكاتيونية كثيراً بين تربة المواقع المدروسة، كما أن الفارق بين العمقين المدروسين لم يكن معنوياً سوى في المواقع 10 إلى 13 إذ ارتفعت السعة التبادلية الكاتيونية مع زياد عمق التربة (شكل 9 A). ومع زيادة البعد عن المصنع فقد ظلت السعة التبادلية الكاتيونية متماثلة بين كل المواقع ولكنها شهدت انخفاضاً مع زيادة العمق ابتداءً من المواقع الواقعة على مجال البعد D2 شكل B9.

#### 4-1-5 كربونات الكالسيوم ( $\text{CaCO}_3$ )

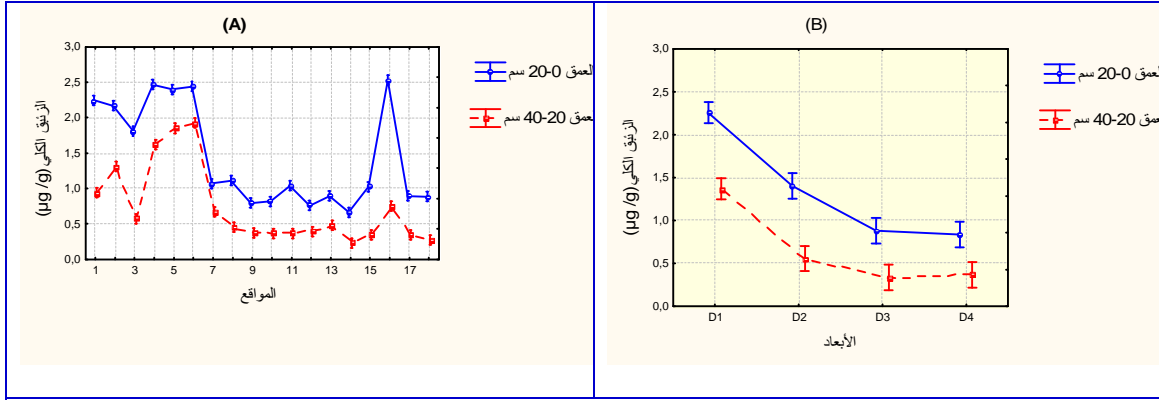


شكل 10 كربونات الكالسيوم ( $\text{CaCO}_3$ ) في التربة المدروسة بمنطقة عزابة : (A) المواقع ، (B) الأبعاد



في كل المواقع المدروسة لم يكن هناك أي فرق في محتوى كربونات الكالسيوم بين العمقين المدروسين. إلا أنّ المواقع من 13 إلى 18 قد كان بها معدل كربونات الكالسيوم أقل مقارنةً بالباقي من المواقع شكل A10. كما ينخفض محتوى كربونات الكالسيوم مع زيادة البعد عن المصنع شكل B10.

#### 2-4 تركيز الزئبق الكلي في التربة



شكل 11 تركيز الزئبق في التربة المدروسة بمنطقة عزابة : (A) المواقع ، (B) الأبعاد

جدول 3 تركيز الزئبق (µg/g) في التربة بالمواقع المدروسة بمنطقة عزابة

المعدل	العمق 0-40 cm	العمق 0-20 cm	الموقع
0.69±1,59	0.05±0,94	0.06±2,24	1
0.45±1,74	0.06±1,31	0.04±2,17	2
0.66±1,19	0.05±0,57	0.06±1,81	3
0.45±2,04	0.10±1,62	0.08±2,47	4
0.31±2,12	0.03±1,85	0.17±2,40	5
0.28±2,18	0.04±1,92	0.07±2,44	6
0.21±0,87	0.02±0,67	0.05±1,07	7
0.35±0,78	0.04±0,45	0.09±1,11	8
0.23±0,58	0.04±0,37	0.05±0,79	9
0.24±0,59	0.03±0,36	0.04±0,82	10
0.36±0,70	0.01±0,36	0.02±1,04	11
0.20±0,57	0.04±0,39	0.06±0,76	12
0.22±0,69	0.05±0,48	0.02±0,89	13
0.23±0,45	0.03±0,23	0.04±0,66	14
0.36±0,69	0.02±0,34	0.03±1,03	15
0.96±1,64	0.02±0,75	0.31±2,53	16
0.29±0,62	0.03±0,34	0.04±0,89	17
0.33±0,58	0.02±0,27	0.09±0,89	18
<b>0.72 ± 1.09</b>	0.55±0.74	0.71±1.44	<b>المعدل العام</b>

بلغ المعدل العام لتركيز الزئبق الكلي في التربة المدروسة  $0.72 \pm 1.09 \mu\text{g/g}$  (جدول 3). وتراكم الزئبق على مستوى الطبقة السطحية ثم انخفض انخفاضاً معنوياً مع زيادة العمق؛ وقد احتوت المواقع من 1 إلى 6 وكذا الموقع 16 على أعلى معدلات للزئبق مقارنة بباقي المواقع التي كانت بها معدلات الزئبق متقاربة شكل A11. وكانت المواقع القريبة من مخلفات المصنع (البعد D1) أكثر عرضة للزئبق والذي يتناقص مع زيادة البعد شكل B11. قيم تركيز الزئبق النشط والذي يتمثل في كل من الصور الذائبة والصور القابلة للتبادل كانت كلها دون الحد الأدنى للقياس.

#### 3-4 تحديد الحد الأدنى لتركيز الزئبق المسموح به في التربة

جدول 4 الحد الأدنى لتركيز الزئبق المسموح به في التربة على أساس نسبة كل من الطين والمادة العضوية بمنطقة عزابة

المعدل العام	
$0,72 \pm 1,09$	الزئبق الكلي ( $\mu\text{g/g}$ )
$0,57 \pm 0,95$	المادة العضوية (%)
$12,97 \pm 30,42$	الطين (%)
$1.16 \mu\text{g/g}$	الحد الأدنى المسموح به ( $\mu\text{g/g}$ )

إنّ قيمة الحد الأدنى المسموح به لتركيز الزئبق في التربة هو  $0.05 \mu\text{g/g}$  (Adriano وآخرون، 1995). والقيم المرجعية لكل المعادن مبنية على أساس عينات من التربة تحتوي 10 % طين و 2 % مادة عضوية. وأما الحد الأدنى المسموح به لأي معدن في التربة التي تختلف في محتواها من الطين والمادة العضوية عن التربة المرجعية يمكن حسابه وفقاً للمعادلة التالية:

$$N_{(x,y)} = A + XB + Y$$

$$A + 10B + 2C$$

حيث: X = نسبة الطين في عينة التربة المدروسة.

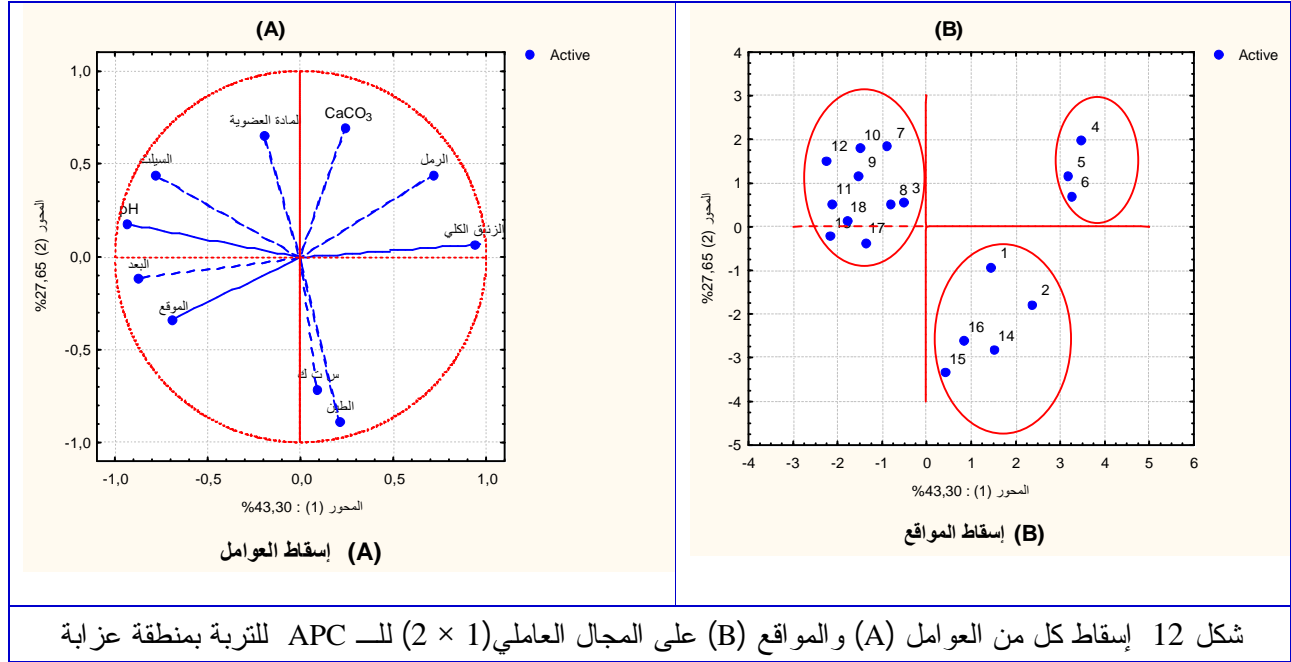
Y = نسبة المادة العضوية في عينة التربة المدروسة.

A، B، C ثوابت خاصة بكل معدن قيد الدراسة؛ و في حالة الزئبق فإن  $A = 0.55$  ،

$$B = 0.0046، C = 0$$

ولذا وعلى أساس المعدل العام لكل من الطين والمادة العضوية يكون الحد المسموح به للزئبق في التربة المدروسة مساو لـ 1.16  $\mu\text{g/g}$  جدول 4.

#### 4-4 الدراسة الإحصائية عن طريق تحليل المكونات الرئيسية (APC)



#### جدول 5 إحدائيات إسقاط العوامل المدروسة على مجال الـ APC

المحور (2)	المحور (1)	المواقع
-0,34	-0,69	المواقع
-0,11	-0,87	البعد
0,068	0,93	الزئبق الكلي
0,18	-0,94	pH
0,65	-0,20	المادة العضوية
0,69	0,24	CaCO <sub>3</sub>
-0,71	0,08	س ت ك
-0,88	0,21	الطين
0,44	-0,78	السيلت
0,44	0,71	الرمل

أستخدم التحليل العاظمي باستخدام الـ APC بغرض تجميع المعطيات المتحصل عليها في توافق خطية قصد تقييم مدى أهميتها، وعلى هذا فإن العامل الذي يكون له التأثير الأكبر في التآلف الخطي للمحور الأول هو الذي يعتبر الأكثر أهمية من الناحية الإحصائية. بلغت نسبة التباين التراكمي

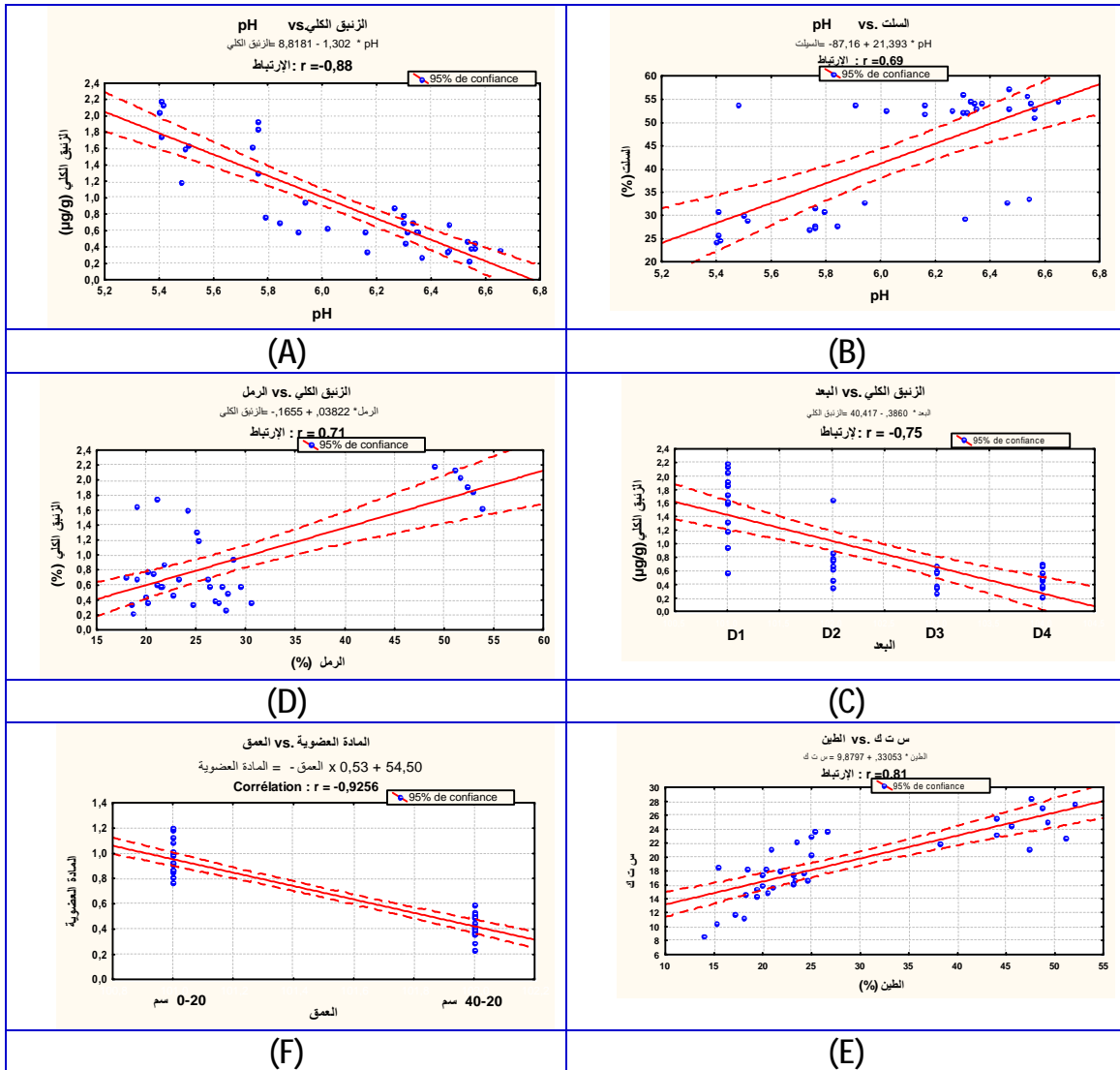
للـ APC 70.95 % توزعت بين المكوّن الرئيسي للمحور الأول بـ 43.30 % والمكوّن الرئيسي للمحور الثاني بـ 27.65 % شكل A12 . يبين إسقاط قيم العوامل المدروسة على مجال الـ APC المحدد بالمحورين الأول والثاني المبينة في الجدول 5 أنّ أقوى ارتباط للمحور الأول كان مع الـ pH (r = -0.94) بينما كان أقوى ارتباط للمحور الثاني مع الطين (r = -0.88). وهذا يعني أنّ التأثير الأقوى في التربة المدروسة يعود إلى عامل الـ pH . يبين توزيع المواقع في مجال المحدد بالمحورين الأول والثاني للـ APC شكل B12 أنّها انتشرت في ثلاث سحابات تضم كل منها المواقع المشتركة في مجموع العوامل المدروسة وهي كما يلي: المجموعة (أ) و تضم المواقع 4، 5، 6 ؛ والمجموعة (ب) وتضم المواقع 1، 2، 14، 15، 16 ؛ و المجموعة الثالثة وتضم بقية المواقع.

### 3-5 التأثير المتداخل بين العوامل المدروسة.

جدول 6 قيم معامل الارتباط بين عوامل التربة المدروسة بمنطقة عزابة

العامل	العمق	البعد	الزنيق الكلي	pH	المادة العضوية	CaCO <sub>3</sub>	س ت ك	الطين	السلت
العمق									
البعد	-0,00								
الزنيق الكلي	-0,30	-0,75*							
pH	0,37*	0,78*	-0,88*						
المادة العضوية	-0,93*	0,01	0,22	-0,23					
CaCO <sub>3</sub>	0,00	-0,25	0,26	-0,00	0,22				
س ت ك	-0,24	-0,14	0,07	-0,24	0,19	-0,13			
الطين	-0,19	-0,05	0,10	-0,29	0,06	-0,36	0,81*		
السلت	0,06	0,51	-0,71	0,69*	0,10	0,01	-0,41	-0,59	
الرمل	0,13	-0,55	0,71*	-0,48	-0,16	0,40	-0,41	-0,43	-0,48

\* قيم معنوية عند  $p < 0.05$

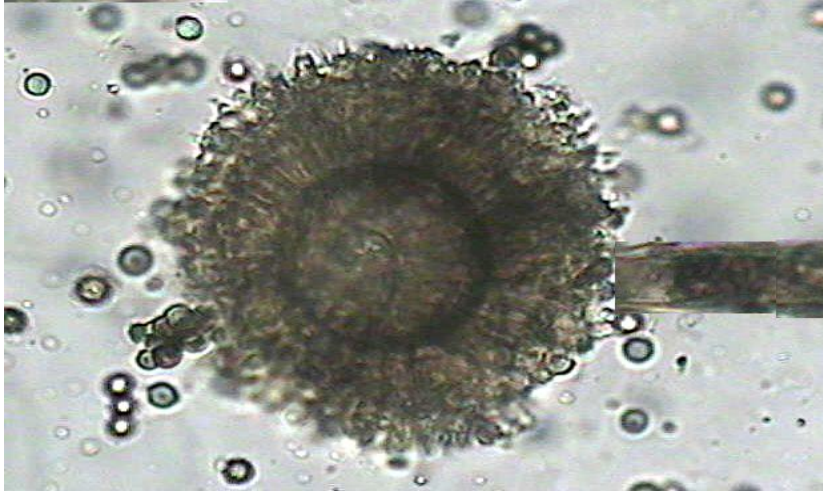


شكل 13 الانحدار الخطي بين عوامل التربة المدروسة ذات التداخل المعنوي

يبين الجدول 6 معاملات الارتباط بين مختلف العوامل المدروسة، ويتضح من خلال الانحدار الخطي أنّ الـpH قد أبدى ارتباطا عكسياً عالياً جداً ( $r = -0.88$ ) مع الزئبق الكلي شكل A13 وارتباطاً طردياً عالياً ( $r = 0.69$ ) مع محتوى السلت شكل B13. إنّ الزئبق الكلي الذي أظهر ارتباطاً طردياً عالياً ( $r = 0.71$ ) مع محتوى الرمل شكل C13 قد تناقص معنوياً ( $r = -0.75$ ) مع تزايد البعد عن موقع بقايا المصنع شكل D13. لم يبد العمق سوى ارتباطاً واحداً وكان عكسياً وعالياً جداً مع المادة العضوية ( $r = -0.93$ ) شكل F13. أمّا السعة التبادلية الكاتيونية فلم يكن لها ارتباط سوى مع محتوى الطين ( $r = 0.81$ ).

#### 6-4 تعريف الفطريات المعزولة من التربة

### *Aspergillus tubingensis* -1



شكل 14 ميكروغراف لفطر *Aspergillus tubingensis* المعزول من التربة بمنطقة عزابة

### التشخيص

جدول 7 مواصفات تشخيص فطر *Aspergillus tubingensis* المعزول من التربة بمنطقة عزابة

فحص المستعمرة :	خصائص النمو	يصل قطر المستعمرة 6.5 cm خلال 10 أيام عند درجة 28°م، على بيئة Czapeck وتكون ذات لون أسود.
الفحص المجهرى :	الحامل الكونيدي	قطره 15 µm
	الرأس الكونيدي	كروية ، 280 µm
	الحوصلة	شبه كروية ، 39 µm
	الsterigmata	ثنائية التسلسل، الsterigmata الأولية 4 × 15 µm ، الsterigmata الثنائية 3.9 × 8.5 µm
	Conidia	الكونيديات كروية ، 3.9 µm

## *Aspergillus niveus* -2



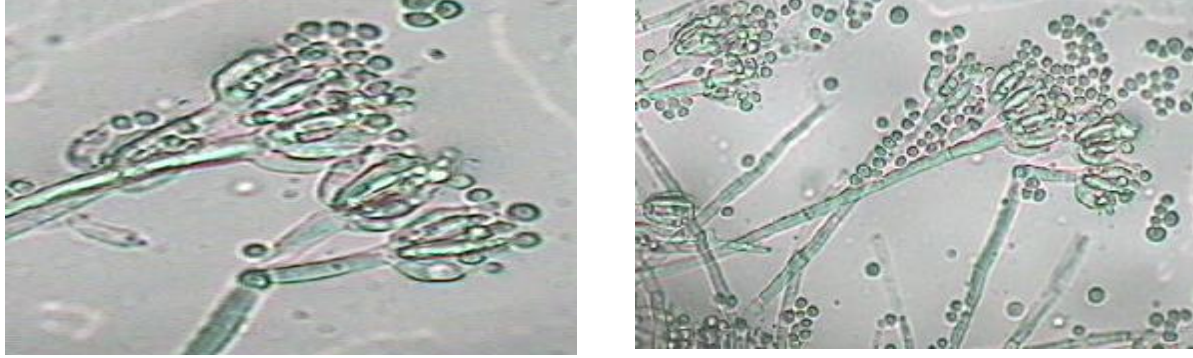
شكل 15 ميكروغراف لفطر *Aspergillus niveus* المعزول من التربة بمنطقة عزابة

### التشخيص

جدول 8 مواصفات تشخيص فطر *Aspergillus tubingensis* المعزول من التربة بمنطقة عزابة

فحص المستعمرة :	خصائص النمو	يصل قطر المستعمرة 3-4 cm خلال 7 أيام عند درجة 28°م، على بيئة Czapeck وتكون ذات لون أبيض.
الفحص المجهري :	الحامل الكونيدي	قطره 4.5 µm
	الرأس الكونيدي	كروية ، 30.5 µm
	الحوصلة	شبه كروية ، 12.3 µm
	الsterigmata	ثنائية التسلسل، الsterigmata الأولية 2.4 × 5.6 µm ، الsterigmata الثانية 2.2 × 4.5 µm
	conidia	الكونيديات كروية ملساء وذات جدار رقيق ، 3.9 µm

### Penicillium citrinum-3



شكل 16 ميكروغراف لفطر *Penicillium citrinum* المعزول من التربة بمنطقة عزابة

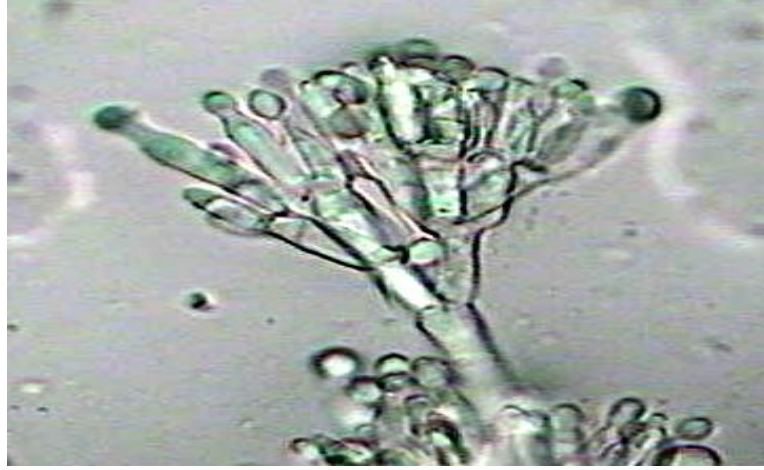
### التشخيص

جدول 9 مواصفات تشخيص فطر *Penicillium citrinum* المعزول من التربة بمنطقة عزابة

يصل قطر المستعمرة النامية على بيئة 2.8 cm CYA ، يكون الميسليوم أبيض في المساحات المحيطة ، وفي المركز يكون لون المستعمرة برتقالي مخضر ، الوجه الخلفي للمستعمرة بني محمر. يصل قطر المستعمرات النامية على بيئة 1.7 cm MEA عند درجة حرارة 5°م و 12 سم على بيئة CYA. لا يظهر نمو عند درجة حرارة 37°م.	خصائص النمو	فحص المستعمرة
(Biverticillate) ، تتكون الـ penicillia من 3-5 تفرعات (divrgents)	نموذج الـ Penicillus	الفحص المجهري
12.3 x 5.3 µm	الـ Metulae	
7.5 x 3 µm	الـ Phialides	
الكونيديات كروية ، 2.8 µm.	Conidia	



## *Penicillium viridicatum*-4



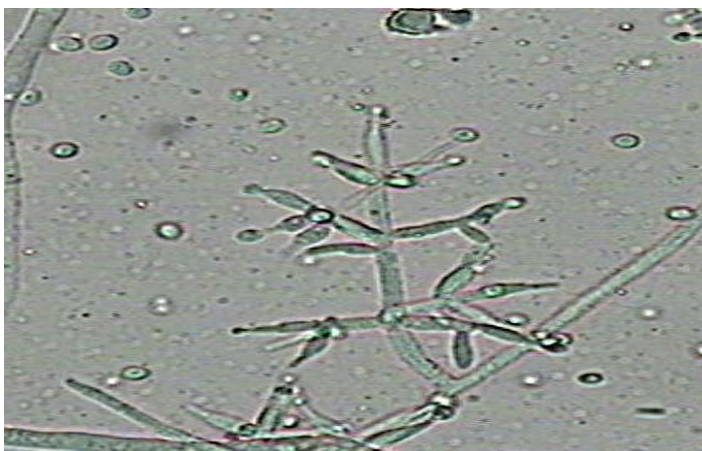
شكل 17 ميكروغراف لفطر *Penicillium viridicatum* المعزول من التربة بمنطقة عزابة

## التشخيص

جدول 10 مواصفات تشخيص فطر *Penicillium citrinum* المعزول من التربة بمنطقة عزابة

فحص المستعمرة	خصائص النمو	يصل قطر المستعمرة النامية عند درجة حرارة 25°م على بيئة cm CYA 2.5 ، يكون الميسليوم ذو قوام حبيبي لونه أخضر مصفر. يصل قطر المستعمرات النامية على بيئة 0.6 cm CYA عند درجة حرارة 5°م و لا يظهر نمو عند درجة حرارة 37°م.
الفحص المجهري	نموذج الـ Penicillus	Terverticillate
	التفرع	1-2 لكل penicillus ، 3.3 × 12 µm
	الـ Metulae	3.6 × 9.1 µm
	الـ Phialides	1.9 × 7.2 µm
	Conidia	الكونيديات شبه كروية ، ذات جدار أملس ، 3.2 µm

## Trichoderma viride-5



شكل 18 ميكروغراف لفطر *Trichoderma viride* المعزول من التربة بمنطقة عزابة

## التشخيص

جدول 11 مواصفات تشخيص فطر *Trichoderma viride* المعزول من التربة بمنطقة عزابة

يصل قطر المستعمرة 4.5-7.5 cm خلال 5 أيام. لون الميسليوم أخضر ضارب إلى البياض ذو مساحات كونيديية على صورة خصلات تظهر على صورة ظلال خضراء مزرققة. الوجه الخلفي للمستعمرة شفاف.	خصائص النمو	فحص المستعمرة
الحوامل الكونيديية غير منتظمة متفرعة هرمية	الحامل الكونيدي	الفحص المجهرى
تكون في مجاميع 2 إلى 4، أسطوانية $2.7 \times 6.2 \mu\text{m}$	Phialides	
الكونيدييات شبه كروية ، $3 \mu\text{m}$ .	conidia	
في بعض الحالات تظهر في المستعمرات المسنة	chlamydospores	



## Trichoderma atraviride-6



شكل 19 ميكروغراف لفطر *Trichoderma atraviride* المعزول من التربة بمنطقة عزابة

## التشخيص

جدول 12 مواصفات تشخيص فطر *Trichoderma viride* المعزول من التربة بمنطقة عزابة

يصل قطر المستعمرة 7.5 cm خلال 5 أيام. لون الميسليوم أخضر ضارب إلى البياض ثم يصبح أخضر زيتوني، الوجه الخلفي للمستعمرة شفاف.	خصائص النمو	فحص المستعمرة
الحوامل الكونيدية غير منتظمة متفرعة هرمية	الحامل الكونيدي	
طويلة ومتفرعة $10.2 \times 2.5 \mu\text{m}$	الـ Phialides	
الكونيديات بيضوية ، $3.2 \times 2.8 \mu\text{m}$ .	conidia	
يمكن مشاهدتها	chlamydospores	


## *Fusarium chlamyosporum*-7



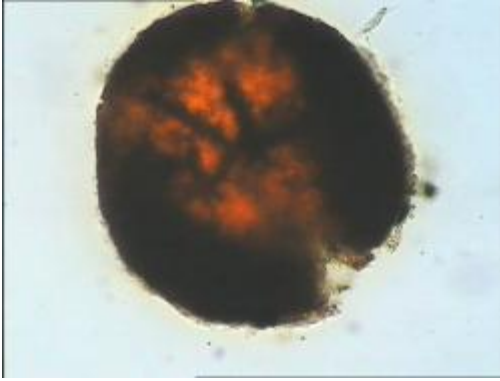
شكل 20 ميكروغراف لفطر *Fusarium chlamyosporum* المعزول من التربة بمنطقة عزابة

### التشخيص

جدول 13 مواصفات تشخيص فطر *Fusarium chlamyosporum* المعزول من التربة بمنطقة عزابة

خصائص النمو	فحص المستعمرة
يصل قطر المستعمرة النامية على بيئة PDA cm 3.5 خلال 4 أيام. لون الميسليوموردي ذو مظهر قطني.	فحص المستعمرة
الحوامل الكونيدية غير منتظمة متفرعة هرميا	
Micro-conidia colvate تكون على صورة blastospores ، 9 × 3.1 μm	
Macro-conidia ذات 3-4 حواجز عرضية، 4.1 μm × 32	
chlamyospores بينية قطرها 11 μm	chlamyospores


## *Erotium rubrum* -8



شكل 21 ميكروغراف لفطر *Erotium rubrum* المعزول من التربة بمنطقة عزابة

### التشخيص

جدول 14 مواصفات تشخيص فطر *Erotium rubrum* المعزول من التربة بمنطقة عزابة

فحص المستعمرة	خصائص النمو	نمو المستعمرة على بيئة PDA يكون محدودا 2 cm. لون الميسليوم ضارب إلى الأصفر تنتشر عليه أجسام الـ cleistothecia. الوجه الخلفي للمستعمرة برتقالي.
الفحص المجهرى	الرأس الكونيدي	مشنتت أو شعاعي قطره 200 µm
	الحامل الكونيدي	الحامل الكونيدي أملس قطره 10 µm
	الحوصلة	شبه كروية ، 2.5 µm
	conidia	الكونيديات كروية، 5.5 µm
	cleistothecia	كروية 112 µm
	Asci	13 µm

## Mucor racemosum-9



(A) chlamydospores + collumella



(B) sporangia



(B) sporangium

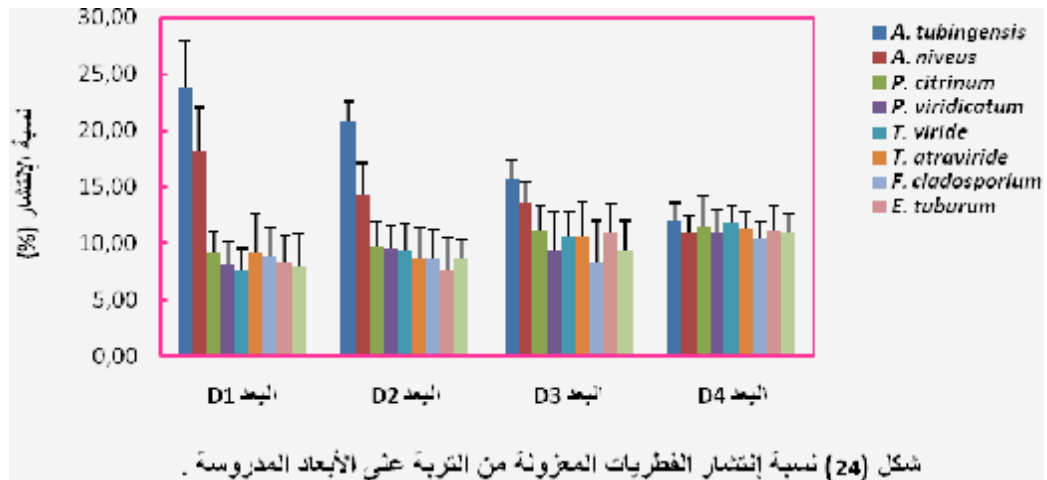
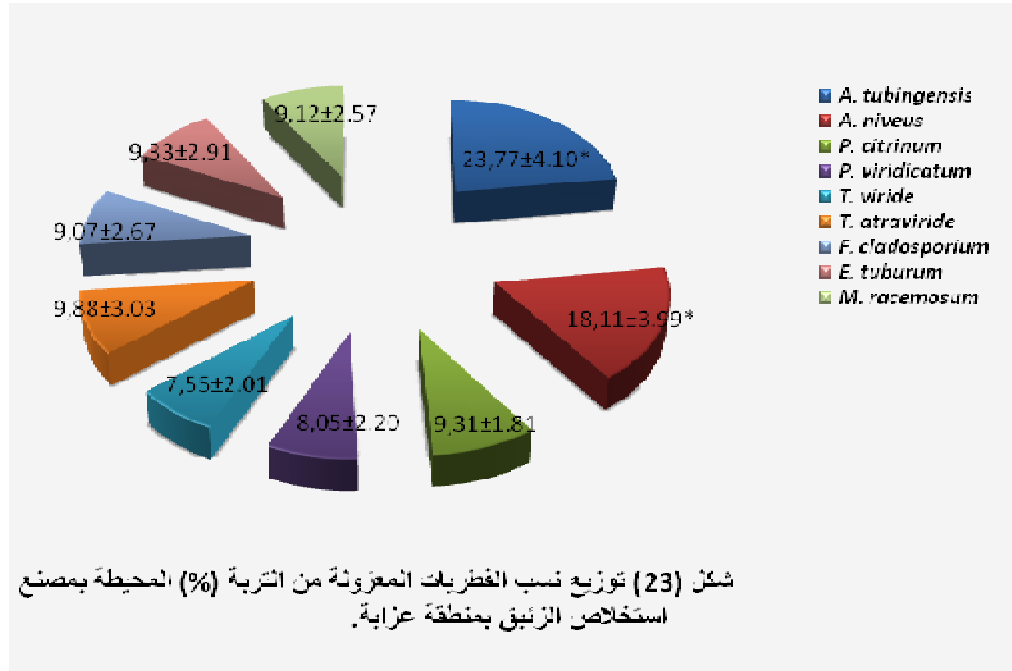
شكل 22 ميكروغراف لفطر *Mucor racemosum* المعزول من التربة بمنطقة عزابة

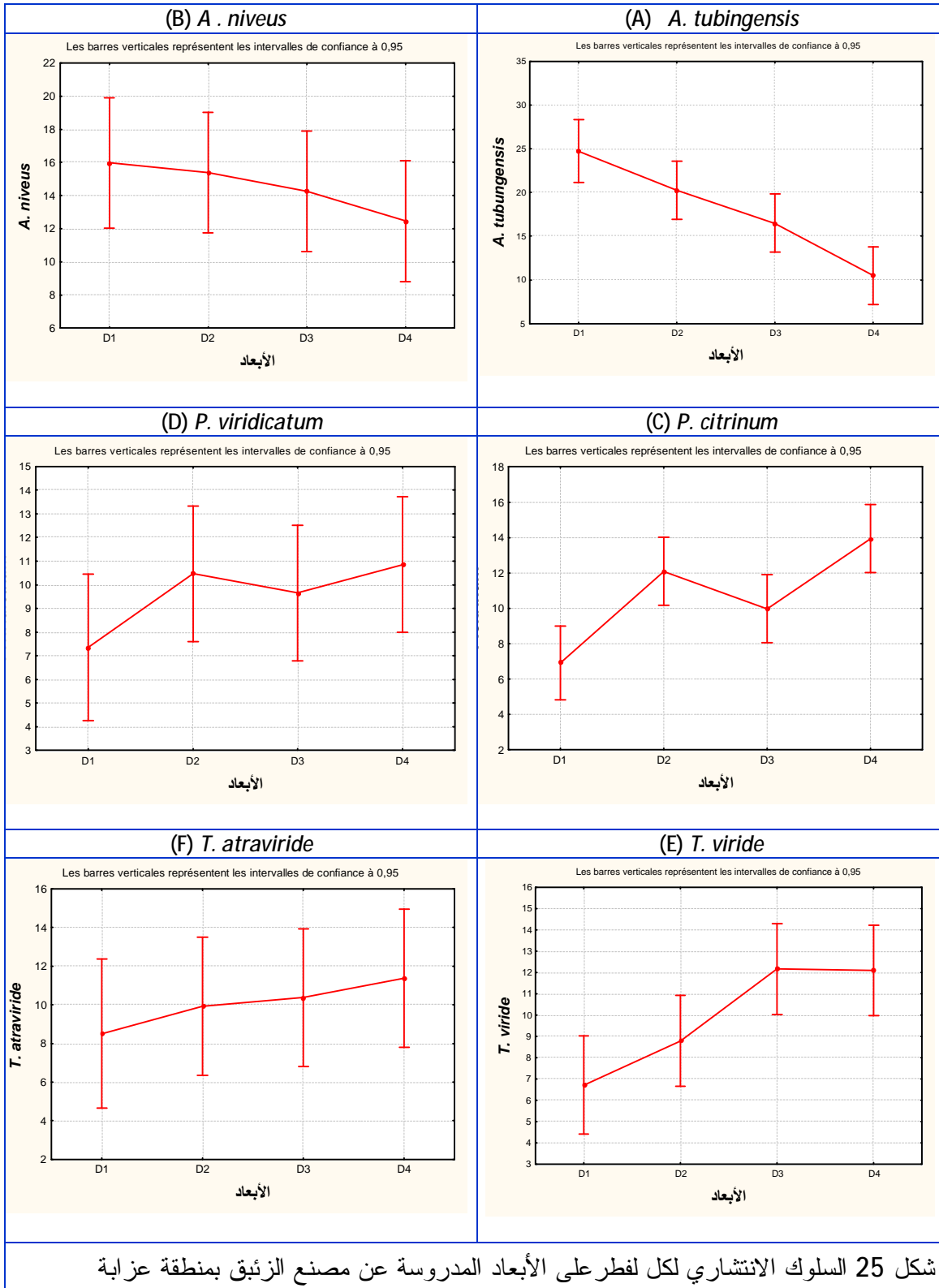
### التشخيص

جدول 15 مواصفات تشخيص فطر *Erotium rubrum* المعزول من التربة بمنطقة عزابة

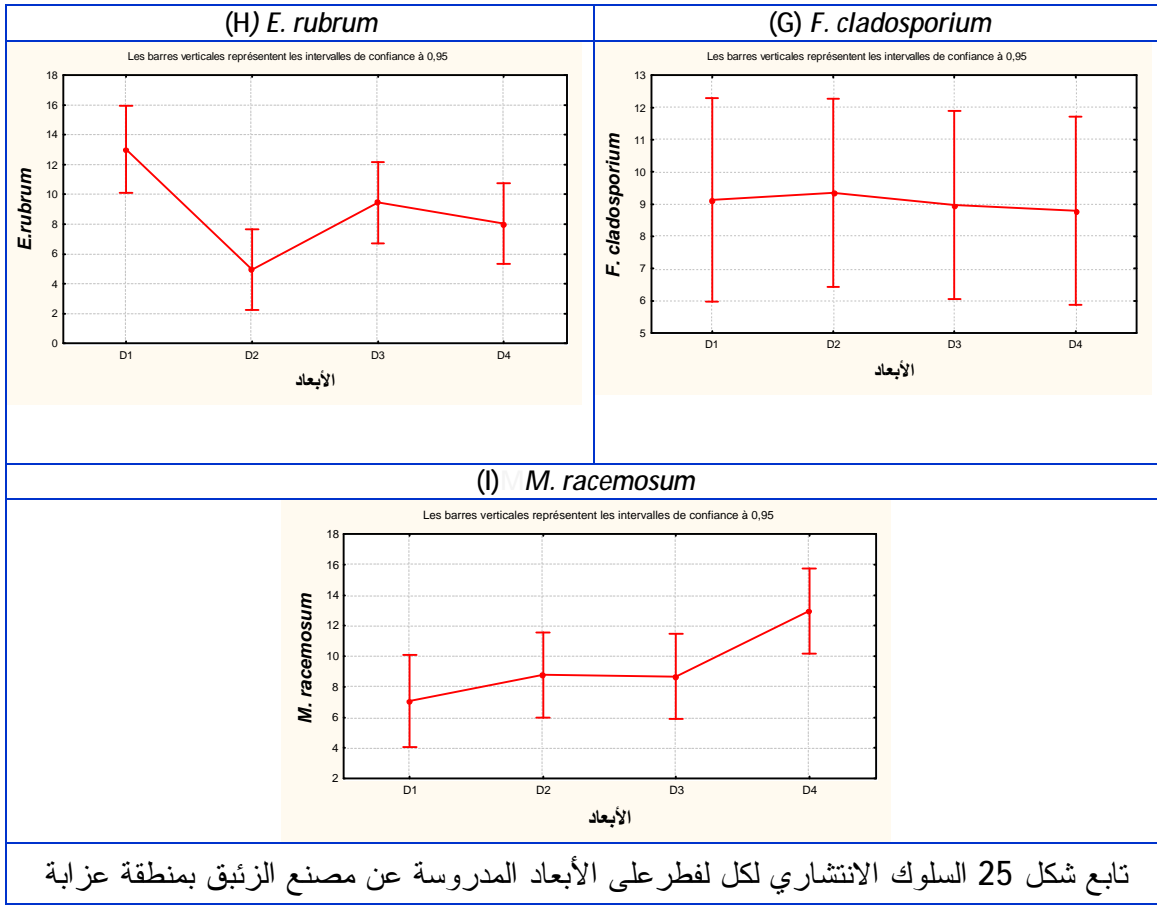
فحص المستعمرة	خصائص النمو	المستعمرات بيضاء يتحول لونها إلى أخضر ضارب إلى البني تنتشر عليه أجسام الـ clestothecia. الوجه الخلفي للمستعمرة برتقالي.
	sporangiophore	الحامل السبورنجي متفرع إلى أفرع أحادية أو مختلطة
	sporangia	العلبة السبورنجية شفافة تتحول إلى ضاربة إلى اللون البني مع تقدم العمر، قطرها 39 µm جدارها مقاوم.
الفحص المجهرى	columella	العويمداً أسطوانيشبه القطع المكافئ او pyriform ، قاعدته بتراء يتجاوز 32 µm .
	sporangiospores	الأبواغ السبورنجية بيضوية أو شبهكروية ، 5.6 × 4.1 µm
	chlamydospores	السبوريات الكلاميدية متعددة شكلها برميلي على شبه كروي، لونها ضارب إلى الأصفر.

7-4 تردد انتشار الفطريات في التربة









جدول 16 مصفوفة الارتباط بين الفطريات المعزولة وتركيز الزيتون في التربة

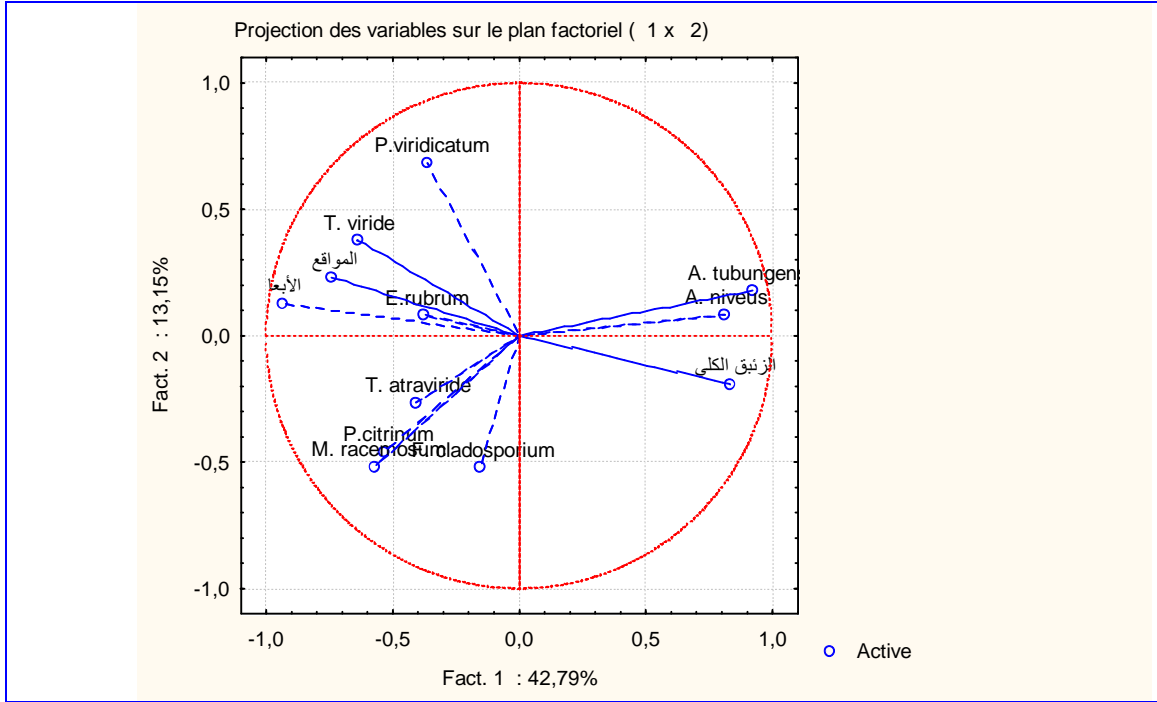
M. racemosum	E. rubrum	F. cladosporium	T. atraviride	T. viride	P. viridicatum	P. citrinum	A. niveus	A. tubungensis	الزئبق الكلي	الأبعاد	
										1,00	الأبعاد
									1,00	<b>-0,83</b>	الزئبق الكلي
								1,00	<b>0,70</b>	<b>-0,86</b>	<i>A. tubungensis</i>
							1,00	<b>0,71</b>	<b>0,58</b>	<b>-0,68</b>	<i>A. niveus</i>
						1,00	<b>-0,37</b>	<b>-0,55</b>	<b>-0,39</b>	<b>0,40</b>	<i>P.citrinum</i>
					1,00	<b>-0,11</b>	<b>-0,27</b>	<b>-0,17</b>	<b>-0,33</b>	<b>0,39</b>	<i>P. viridicatum</i>
				1,00	<b>0,30</b>	<b>0,15</b>	<b>-0,45</b>	<b>-0,56</b>	<b>-0,62</b>	<b>0,64</b>	<i>T. viride</i>
			1,00	<b>0,12</b>	<b>0,01</b>	<b>0,21</b>	<b>-0,34</b>	<b>-0,42</b>	<b>-0,23</b>	<b>0,31</b>	<i>T; atraviride</i>
		1,00	<b>0,03</b>	<b>-0,08</b>	<b>-0,16</b>	<b>0,04</b>	<b>-0,20</b>	<b>-0,19</b>	<b>-0,06</b>	<b>0,17</b>	<i>F;cladosporium</i>
	1,00	<b>0,01</b>	<b>0,04</b>	<b>0,09</b>	<b>0,10</b>	<b>0,12</b>	<b>-0,37</b>	<b>-0,39</b>	<b>-0,20</b>	<b>0,44</b>	<i>E. rubrum</i>
1,00	<b>0,04</b>	<b>0,24</b>	<b>0,25</b>	<b>0,18</b>	<b>0,03</b>	<b>0,48</b>	<b>-0,50</b>	<b>-0,62</b>	<b>-0,31</b>	<b>0,42</b>	<i>M. racemosum</i>

جدول 17 اختبار Newman-keuls لتحديد الفروق المعنوية بين نسب انتشار الفطريات

D4	D3	D2	D1	الأبعاد	الفطريات
				D1	A. tubungensis
			0,013329*	D2	
		0,00163*	0,000127*	D3	
	0,002097*	0,00127*	0,00159*	D4	
				D1	A. niveus
			0,003881*	D2	
		0,54	0,002046*	D3	
	0,038674*	0,024123*	0,000162*	D4	
				D1	P. citrinum
			0,457479	D2	
		0,048044*	0,021904*	D3	
	0,508155	0,026732*	0,007312*	D4	
				D1	P. viridicatum
			0,258411	D2	
		0,871754	0,159136	D3	
	0,277256	0,171903	0,024447*	D4	
				D1	T. viride
			0,013077*	D2	
		0,119096	0,000568*	D3	
	0,077342	0,004517*	0,000161*	D4	
				D1	T. atraviride
			0,673702	D2	
		0,217831	0,209232	D3	
	0,558323	0,118319	0,162190	D4	
				D1	F. cladosporium
			0,792623	D2	
		0,844303	0,888991	D3	
	0,208949	0,185152	0,134455	D4	
				D1	E. rubrum
			0,481896	D2	
		0,002394*	0,005795*	D3	
	0,877163	0,002933*	0,010355*	D4	
				D1	M. racemosum
			0,446160	D2	
		0,472797	0,304722	D3	
	0,106362	0,057389	0,016477*	D4	

يتبين من الشكل 23 أن، فطر *A. tubigenis* كان أكثر سيادة في الانتشار حيث بلغت نسبته  $23.77 \pm 4.1\%$  يليه فطر *A. niveus* بنسبة  $18.11 \pm 3.99\%$  ، بينما كانت نسبة باقي الفطريات الأخرى متماثلة (الفروق غير معنوية عند  $P < 0.05$ ). وقد ظهر ذلك جليا من خلال نسب الفطريات المعزولة ضمن كل بعد من الأبعاد الثلاث الأولى (D1، D2، D3) حيث كانت نسبة انتشار كل من *A. tubigenis* و *A. niveus* هي الأكبر مقارنة بباقي الفطريات. أمّا عند البعد D4 فقد كان توزيع نسب الفطريات المعزولة متماثلا (الفروق غير معنوية عند  $P < 0.05$ ) (الشكل 24). وعند دراسة السلوك الانتشاري لكل فطر على حدة مع البعد عن منطقة التي توجد بها بقايا المصنع فقد اتضح بأنه كان متباينا من فطر لآخر. فقد كان الارتباط عكسيا وعاليا جدا مع البعد في حالة فطر *A. tubigenis* ( $r = -0.86$ ) وعكسيا وعاليا في حالة فطر *A. niveus* ( $r = -0.68$ ) (جدول 16)، إذ تناقصت نسبتهما مع زيادة البعد (الشكل 25 A ، B) وكانت الفروق معنوية بين الأبعاد المدروسة وفقا لاختبار Newmankeuls عند  $P < 0.05$  (جدول 17). أمّا فطر *T. viride* أظهر ارتباطا طرديا عاليا مع البعد،  $r = 0.64$  (جدول 16) إذ تزايدت نسبة انتشاره مع البعد تزايدا معنويا حتى البعد الثالث (الشكل E25) وهنا ظلت النسبة ثابتة بين البعد D3 و البعد D4 والفروق غير معنوي حسب اختبار Newmankeuls (جدول 17). أمّا الفطريات *P. citrinum* ، *P. viridicatum* ، *E. rubrum* و *M. racemosum* فقد أبدت ارتباطا طرديا ضعيفا مع البعد حيث كانت قيم معامل الارتباط  $r = 0.40$  ،  $r = 0.39$  ،  $r = 0.44$  ،  $r = 0.42$  ، على الترتيب (جدول 16). أي أنّ تزايد نسبة انتشار هذه الفطريات مع البعد يكون نسبيا. بين تقدير معنوية فروق نسب هذه الفطريات بين الأبعاد وفقا لاختبار Newman-keuls أنها كانت متباينة من فطر لآخر، إذ كان الفرق معنويا بين البعد D1 مع كل من البعدين D3 و D4 من جهة و بين البعد D2 مع كل من البعدين D3 و D4 من جهة أخرى. أي بمعنى أنّ نسبة الانتشار بين البعدين D1 و D2 كانت متماثلة ثم ارتفعت عند البعد D3 وظلت ثابتة عند البعد D4 (جدول 17 ، شكل 25 C). أمّا بالنسبة لفطري *P. viridicatum* و *M. racemosum* فإنّ تزايد معدل نسبة انتشارهما مع البعد لم يكن معنويا سوى عند البعد D4 (جدول 17 ، شكل 25 D و I). كما أنّ انخفاض نسبة انتشار فطر *E. rubrum* مع زيادة البعد لم يكن معنويا سوى بين البعد D1 والأبعاد D3 و D4 ، أي أنّ نسبة انتشار هذا الفطر عند البعدين D1 و D2 متماثلة والفرق بينهما غير معنوي (جدول 17 ، شكل 25 C). فطر *T. atraviride* أبدى ارتباطا طرديا ضعيفا جدا ( $r = 0.31$ ) مع البعد (جدول 16) ؛ إلا أنّ الفروق بين الأبعاد لم تكن معنوية (جدول 17 ، شكل 25 F). أي بمعنى أنّه يمكن اعتبار انتشار هذا الفطر متماثلا في مجموع المواقع المدروسة. لم يبد فطر *F. cladosporium* أي ارتباط مع البعد (جدول 16) وكانت الفروق بين نسب الانتشار بين جميع الأبعاد غير معنوية (جدول 17 ، شكل 25 G). أي أنه أيضا كان متماثلا في التوزيع بين مجموع الأبعاد المدروسة.

#### 8-4 تحليل المكونات الرئيسية (APC) لانتشار الفطريات في التربة



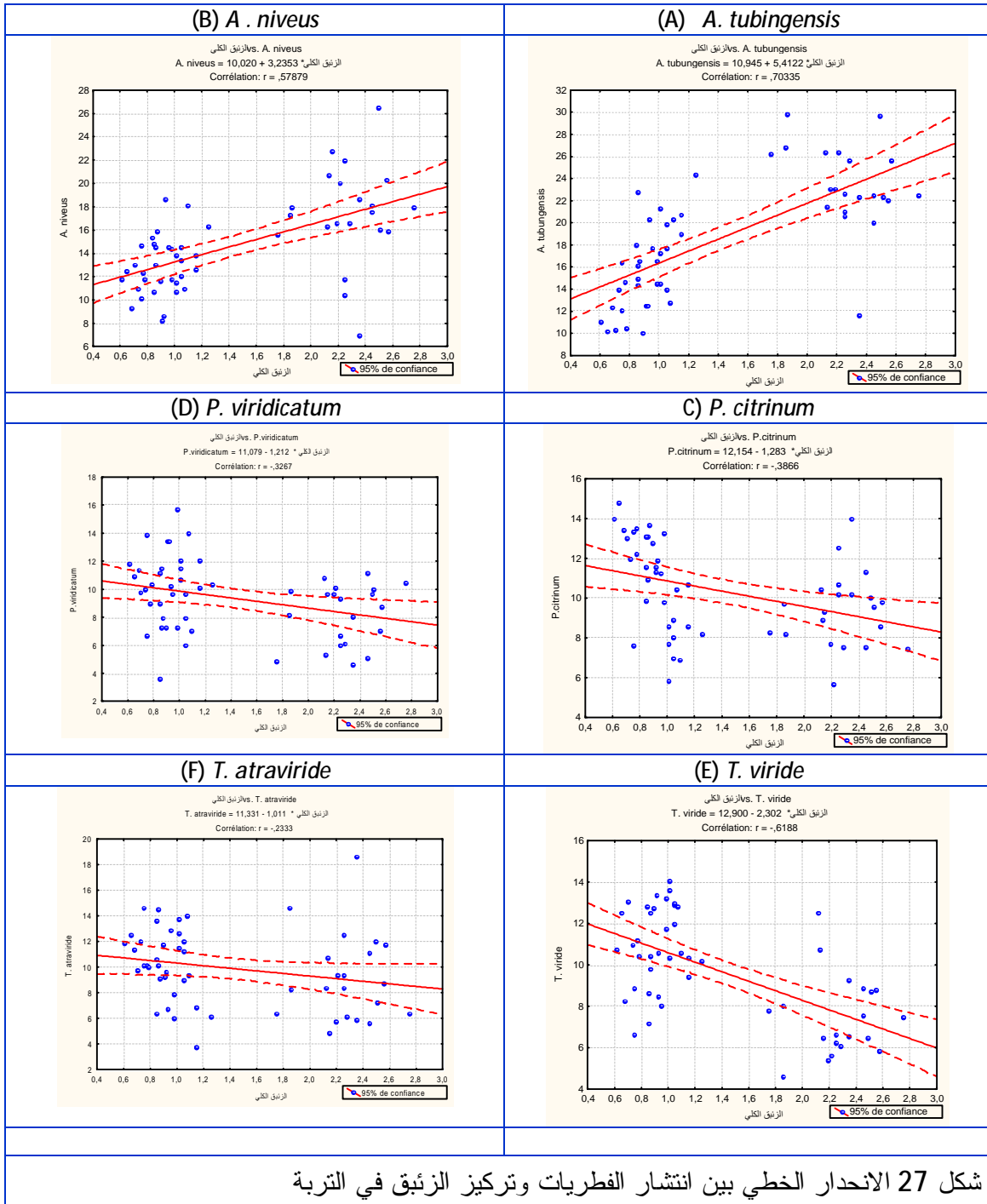
شكل 26 إسقاط الفطريات المعزولة من التربة المحيطة بمصنع الزئبق بمنطقة عزابة على المجال العاملي (2 x 1) للـ APC

جدول 18 إحدائيات إسقاط الفطريات المعزولة من التربة المحيطة بمصنع استخلاص الزئبق بمنطقة عزابة على مجال الـ APC.

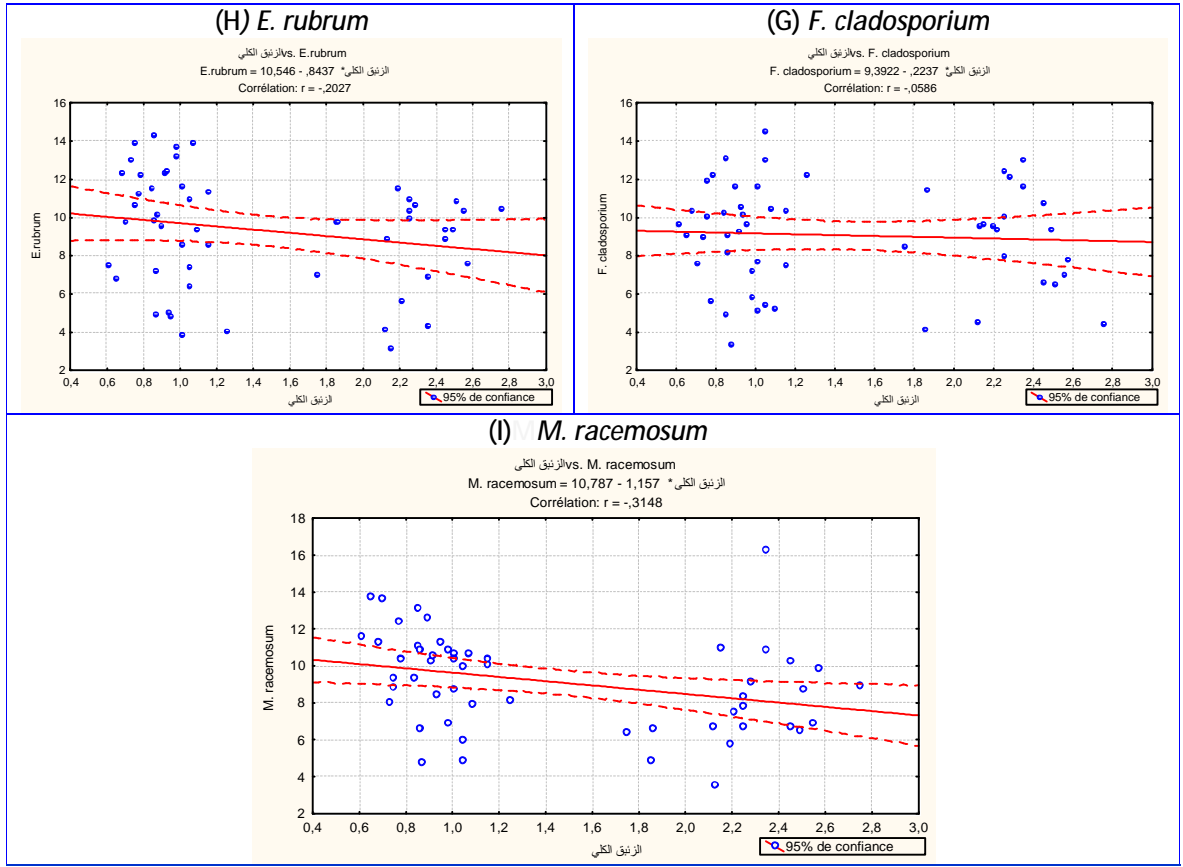
العوامل	Fact.1	Fact.2
الأبعاد	-0.94	0.13
المواقع	-0.74	0.23
الزئبق في التربة	0.83	-0.19
<i>A. tubingen</i>	0.93	0.18
<i>A. niveus</i>	0.81	0.08
<i>P. citrinum</i>	-0.54	-0.46
<i>P. viridicatum</i>	-0.36	0.68
<i>T. viride</i>	-0.64	0.38
<i>T. atraviride</i>	-0.41	-0.26
<i>F. cladosporium</i>	-0.16	-0.52
<i>E. tuburum</i>	-0.38	0.08
<i>M. racemosum</i>	-0.57	-0.52

بلغت نسبة التباين التراكمي باستخدام التحليل العائلي عن طريق تحليل المكونات الرئيسية (APC) 55.97 % وتوزعت بين المكون الرئيسي للمحور الأول بـ 42.79 % والمكون الرئيسي للمحور الثاني بـ 13.15 % (شكل 26). يوضح إسقاط قيم العوامل المدروسة على مجال الـ APC المحدد بالمحورين الأول والثاني والموضحة بالجدول 18 أن أقوى ارتباط للمحور الأول كان مع البعد وبصورة عكسية ( $r = -0.94$ ) بينما كان أقوى ارتباط للمحور الثاني مع *P. viridicatum* ( $r = 0.68$ ). وبما أن العامل الذي يكون له التأثير الأكبر في التآلف الخطي للمحور الأول هو الذي يعتبر الأكثر أهمية من الناحية الإحصائية فهذا يعني أن التأثير الأقوى في توزيع وانتشار الفطريات المعزول من تربة المنطقة المدروسة يعود إلى عامل البعد.

4-9 الانحدار الخطي بين انتشار الفطريات وتركيز الزئبق في التربة



شكل 27 الانحدار الخطي بين انتشار الفطريات وتركيز الزئبق في التربة



تابع شكل 27 الانحدار الخطي بين انتشار الفطريات وتركيز الزئبق في التربة

إنّ تركيز الزئبق في التربة والذي يتناقص مع زيادة البعد ( $r = -0.83$ ) (جدول 16) قد أبدى ارتباطات متباينة مع مجموع الفطريات المعزولة. فقد أظهر فطري *A. niveus* و *A. tubingensis* ارتباطا طرديا عاليا مع تركيز الزئبق في التربة،  $r = 0.70$  ،  $r = 0.58$  ، على الترتيب (جدول 16). أظهرت دراسة الانحدار الخطي أنّ ارتباطهما بتركيز الزئبق في التربة (الشكل 27 ، A ، B) كان على الترتيب وفق المعادلتين التاليتين: تركيز الزئبق  $A. tubingensis = 10.94 + 5.41 x$  ، تركيز الزئبق  $A. niveus = 10.02 + 3.23 x$

أبدى فطر *T. viride* ارتباطا عكسيا عاليا بتركيز الزئبق في التربة،  $r = -0.62$  (جدول 16) وكان وفقا لمعدلة الانحدار الخطي التالية: تركيز الزئبق  $T. viride = 12.9 + 2.3 x$

أظهرت الفطريات *M. rocesmosum* ، *P. viridicatum* ، *P. citrinum* ارتباطا عكسية ضعيفا مع تركيز الزئبق في التربة،  $r = -0.39$  ،  $r = -0.33$  ،  $r = -0.31$  ، على الترتيب (جدول 16) ؛ وكان وفقا لمعادلات الانحدار الخطي بالترتيب على الصور التالية :

$$P. citrinum = 12.15 + 1.28 \times \text{تركيز الزئبق}$$

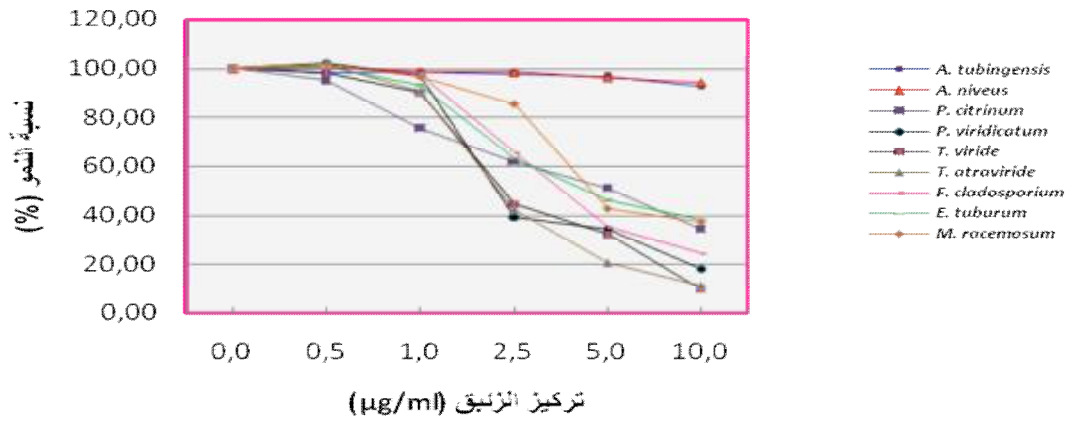
$$P. viridicatum = 10.94 + 5.41 \times \text{تركيز الزئبق}$$

$$M. rocesmosum = 10.94 + 5.41 \times \text{تركيز الزئبق}$$

أما الفطريات *E. rubrum* ، *F. cladosporium* ، *T. atraviride* فلم يبد انتشارها أي ارتباط مع تركيز الزئبق في التربة.

#### 10-4 دراسة حساسية الفطريات للزئبق

##### 10-4-1 تأثير الزئبق على النمو القطري للفطريات المعزولة من التربة



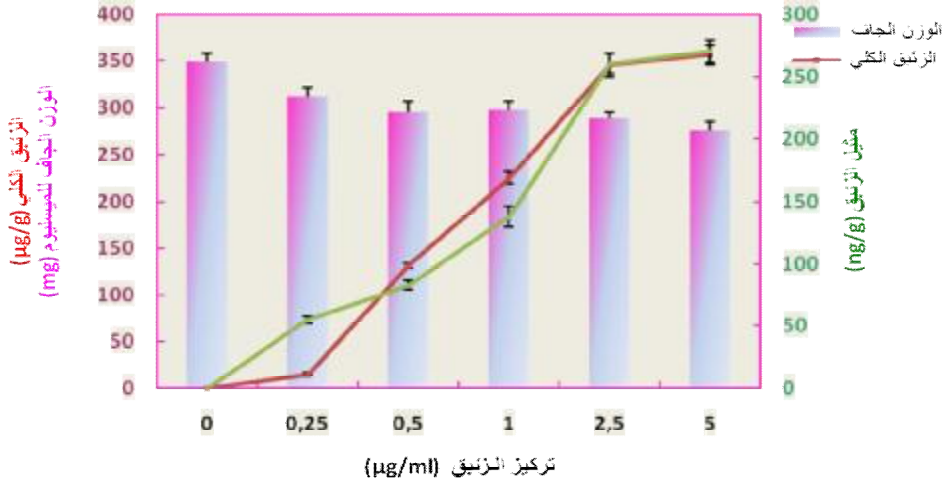
شكل (28) تأثير الزئبق على النمو القطري للفطريات المعزولة من التربة بمنطقة عزابة

من الشكل 28 يتضح أنّ الفطريات المعزولة من التربة قد اختلفت في مدى استجابتها للزئبق على صورة  $HgCl_2$  بتراكيز تراوحت بين 0.5 و 10 ppm في البيئة الغذائية. باستثناء العزلتين *A. tubingensis* و *A. niveus* اللتين أبدتا مقاومة ظاهرية للزئبق فقد تناسب النمو القطري عكسيا مع تركيز الزئبق في البيئة. ويصبح تأثير الزئبق أكثر وضوحا ابتداء من التركيز 2.5 ppm بما أنّ العزلتين *A. tubingensis* و *A. niveus* أظهرتا مقاومة أكبر للزئبق مقارنة بباقي العزلات فقد تم انتخابهما لاستكمال باقي الدراسات المولية الخاصة لمحاولة فهم آلية المقاومة لدى هاتين السلالتين.

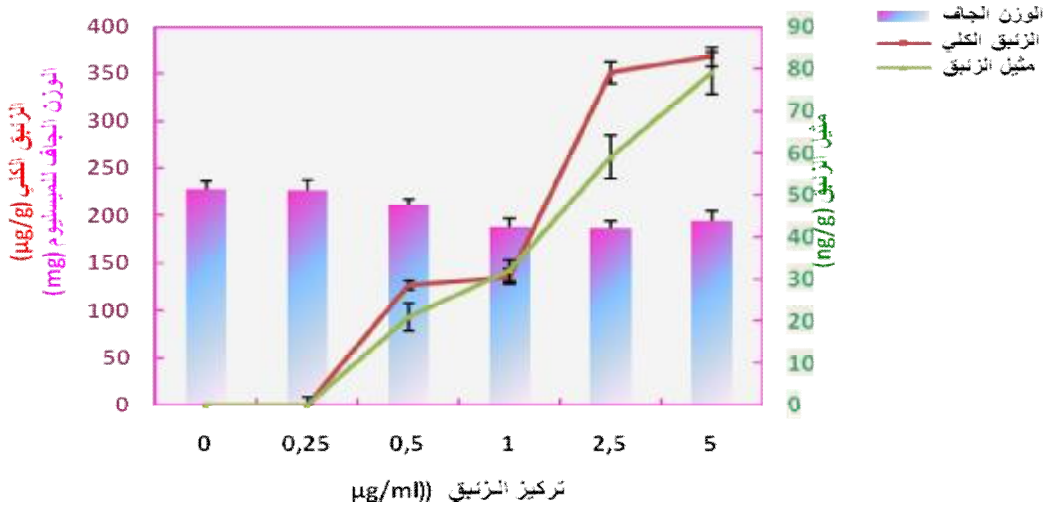


2-10-4 دراسة تأثير الزئبق على فطري *A. niveus* و *A. tubingensis*

1-2-10-4 تأثير كلوريد الزئبق على الكتلة الحيوية للفطريات *A. niveus* و *A. tubingensis*



شكل 29 الوزن الجاف، الزئبق الكلي، ومثيل الزئبق في ميسيليوم فطر *A. tubingensis*



شكل 30 الوزن الجاف، الزئبق الكلي، ومثيل الزئبق في ميسيليوم فطر *A. niveus*

جدول 19 مصفوفتي الارتباط بين كل من الوزن الجاف، الزئبق الكلي ومثيل الزئبق لدى فطري *A. tubingensis* و *A. niveus* المعاملين بكلوريد الزئبق

فطر *A. tubingensis*

مثيل الزئبق	الزئبق الكلي	الوزن الجاف	تركيز الزئبق	
				تركيز الزئبق
			<b>-0,73*</b>	الوزن الجاف
		<b>0,05*</b>	<b>0,85*</b>	الزئبق الكلي
	<b>0,98*</b>	<b>0,04*</b>	<b>0,89*</b>	مثيل الزئبق

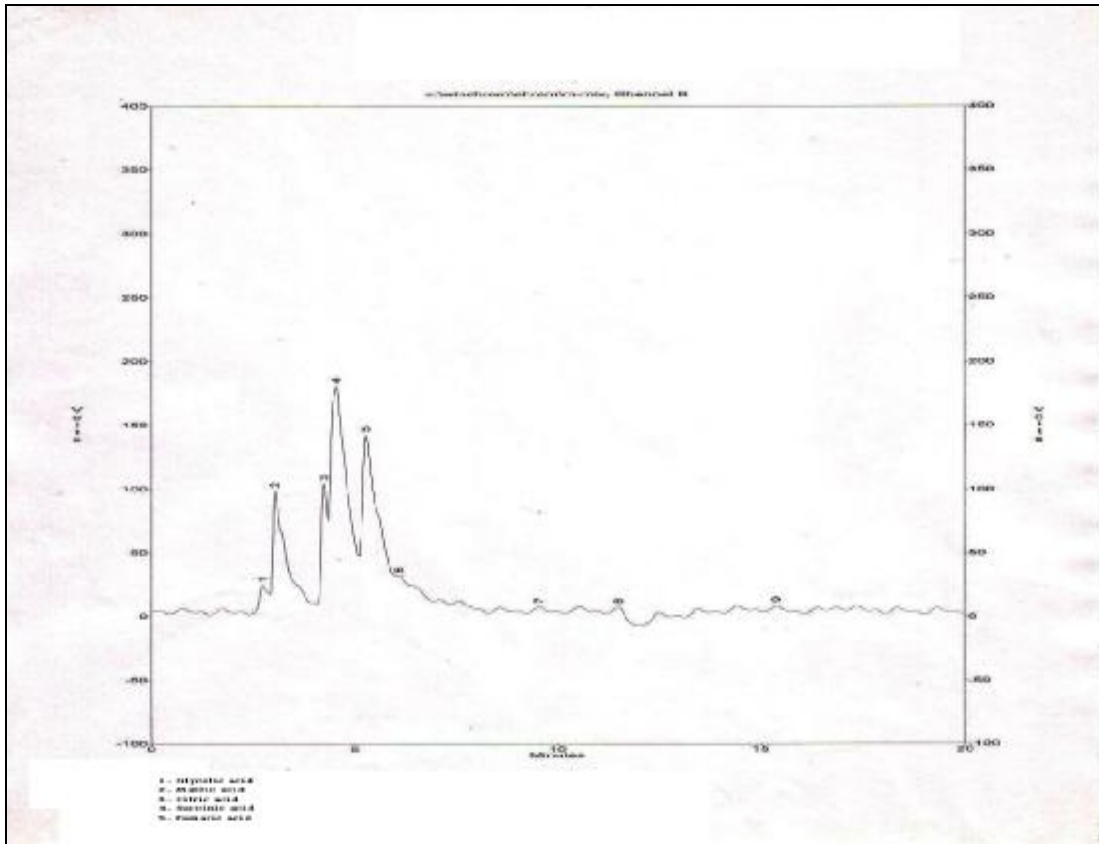
فطر *A. niveus*

مثيل الزئبق	الزئبق الكلي	الوزن الجاف	تركيز الزئبق	
			<b>1,00</b>	تركيز الزئبق
		<b>1,00</b>	<b>-0,63*</b>	الوزن الجاف
	<b>1,00</b>	<b>-0,77*</b>	<b>0,89*</b>	الزئبق الكلي
<b>1,00</b>	<b>0,97*</b>	<b>-0,77*</b>	<b>0,95*</b>	مثيل الزئبق

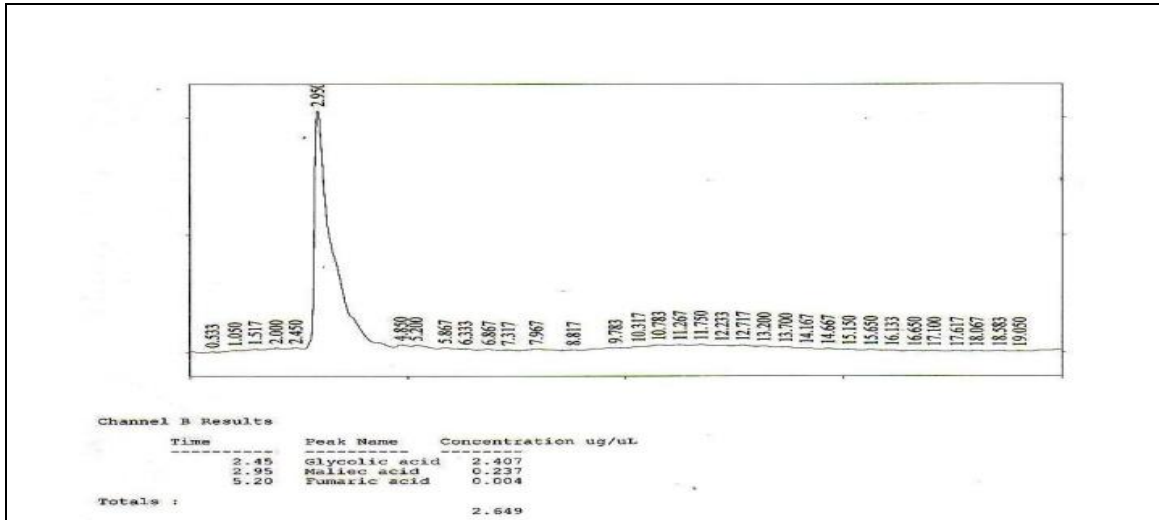
\* قيم معنوية عند  $P < 0.05$

يتبين من الشكلين 29 و 30 و الجدول 19 أن الفطرين المختبرين ينموان في البيئة ال غذائية المحتوية على تراكيز من الزئبق على صورة  $HgCl_2$  حتى تركيز 5 ppm . إلا أن وزن الميسيلوم لكلا الفطرين تناقص مع تزايد تركيز الزئبق في البيئة المغذية حيث بلغ بالنسبة  $r = -0.73$  في حالة *A. tubingensis* و  $r = -0.63$  في حالة *A. niveus* لم يلاحظ وجود علاقة بين وزن الميسيلوم مع كل من الزئبق الكلي و مثيل الزئبق في حالة *A. tubingensis* ( $r = -0.05$  ،  $r = -0.04$ ) بينما كانت في حالة *A. niveus* عكسية ( $r = -0.77$ ). أبدأ كل من الزئبق الكلي و مثيل الزئبق تناسباً طردياً عالياً جداً مع تركيز الزئبق في البيئة المغذية يترجمه معامل الارتباط الذي بلغ في حالة *A. tubingensis* 0.85 و 0.89 وفي حالة *A. niveus* على الترتيب.

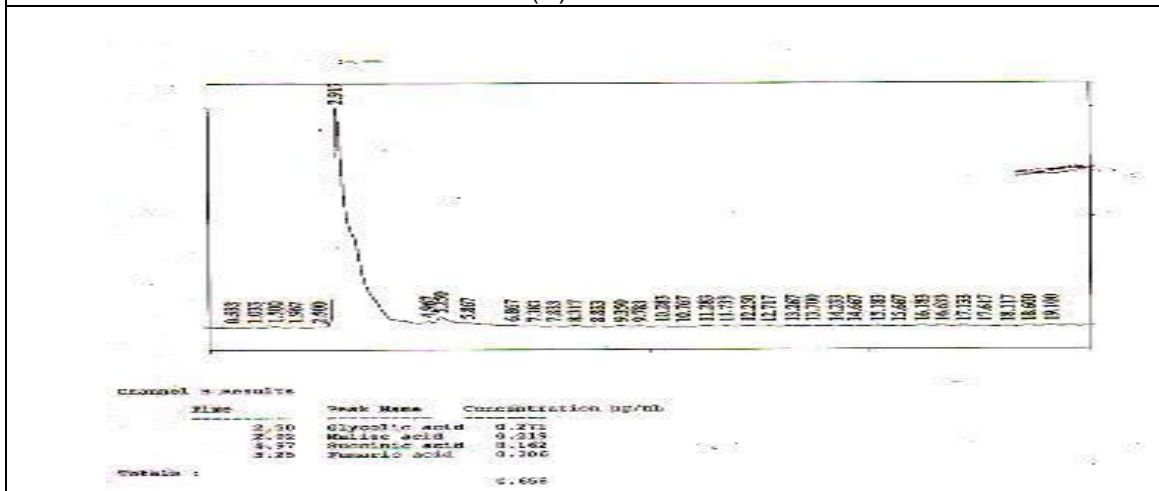
#### 2-2-10-4 تأثير الزئبق على الأحماض العضوية



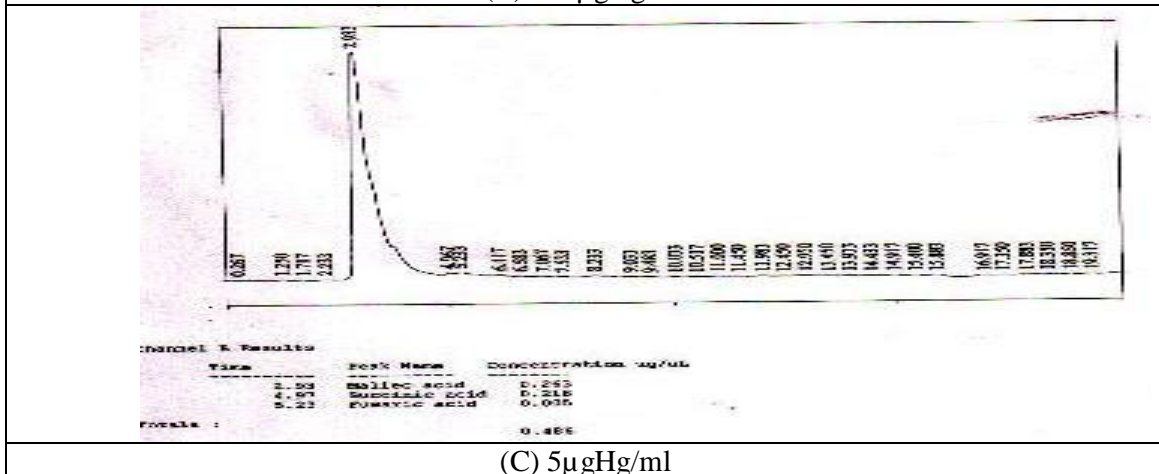
شكل 31 المنحنى القياسي للأحماض العضوية التي تم تقديرها في فطري *A. niveus* و *A. tubingensis* المعاملين بـ  $HgCl_2$



(A) الشاهد

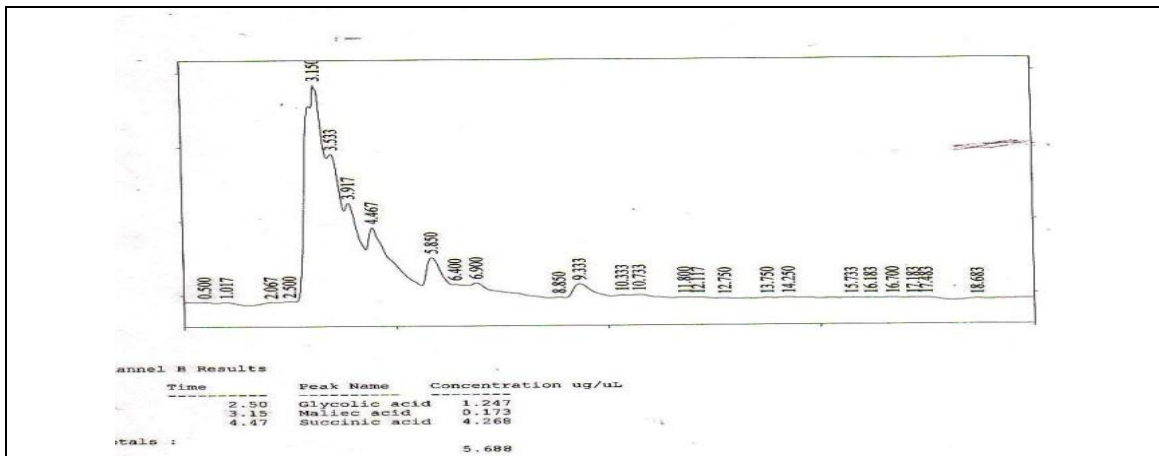


(B) 2.5 µgHg/ml

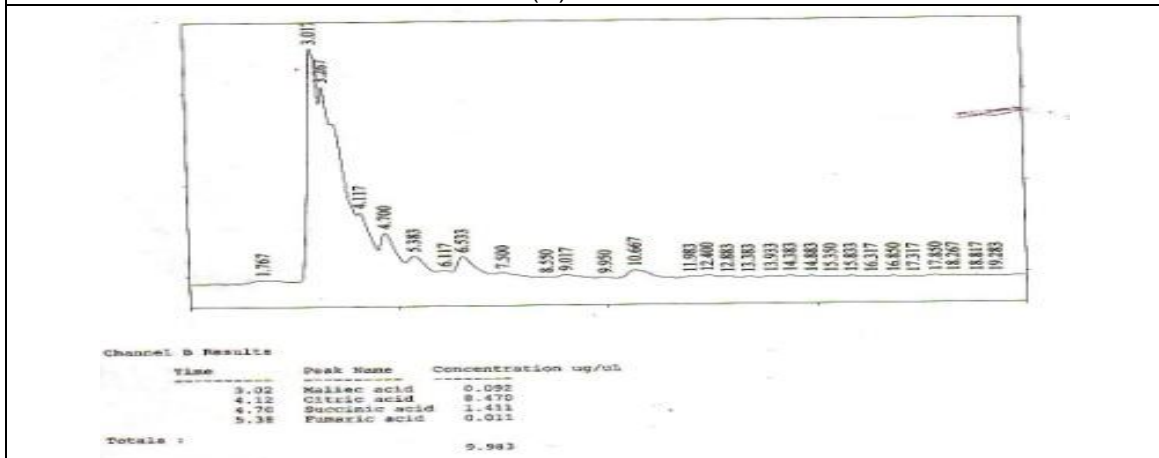


(C) 5µgHg/ml

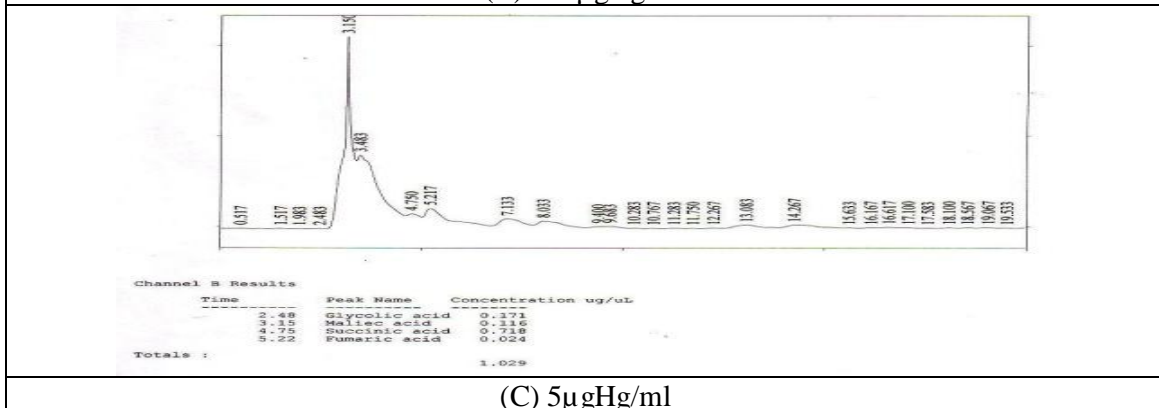
شكل 32 كروماتوغرام الأحماض العضوية المفصولة من فطر *A. tubingensis* المعامل بالزنك على صورة  $HgCl_2$



(A) الشاهد

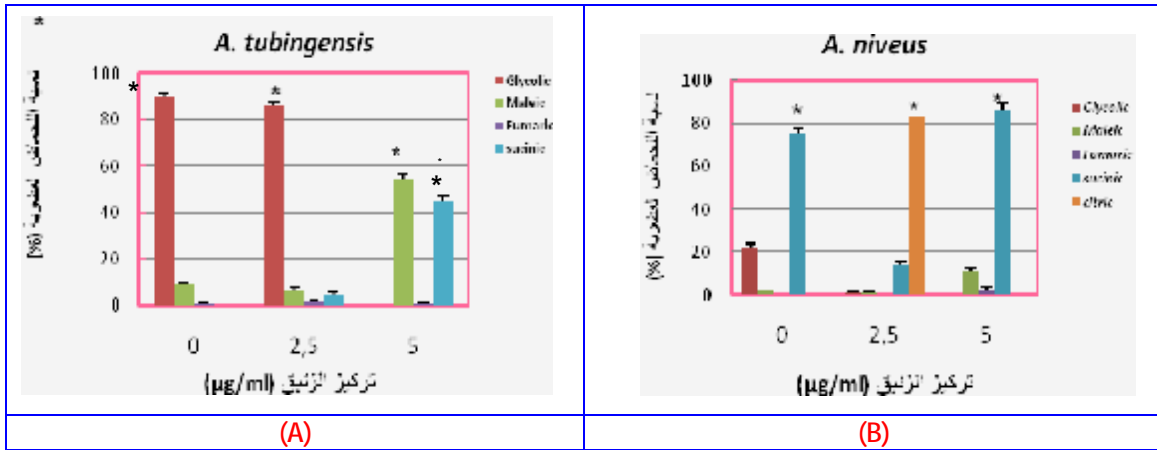


(B) 2.5 µgHg/ml



(C) 5µgHg/ml

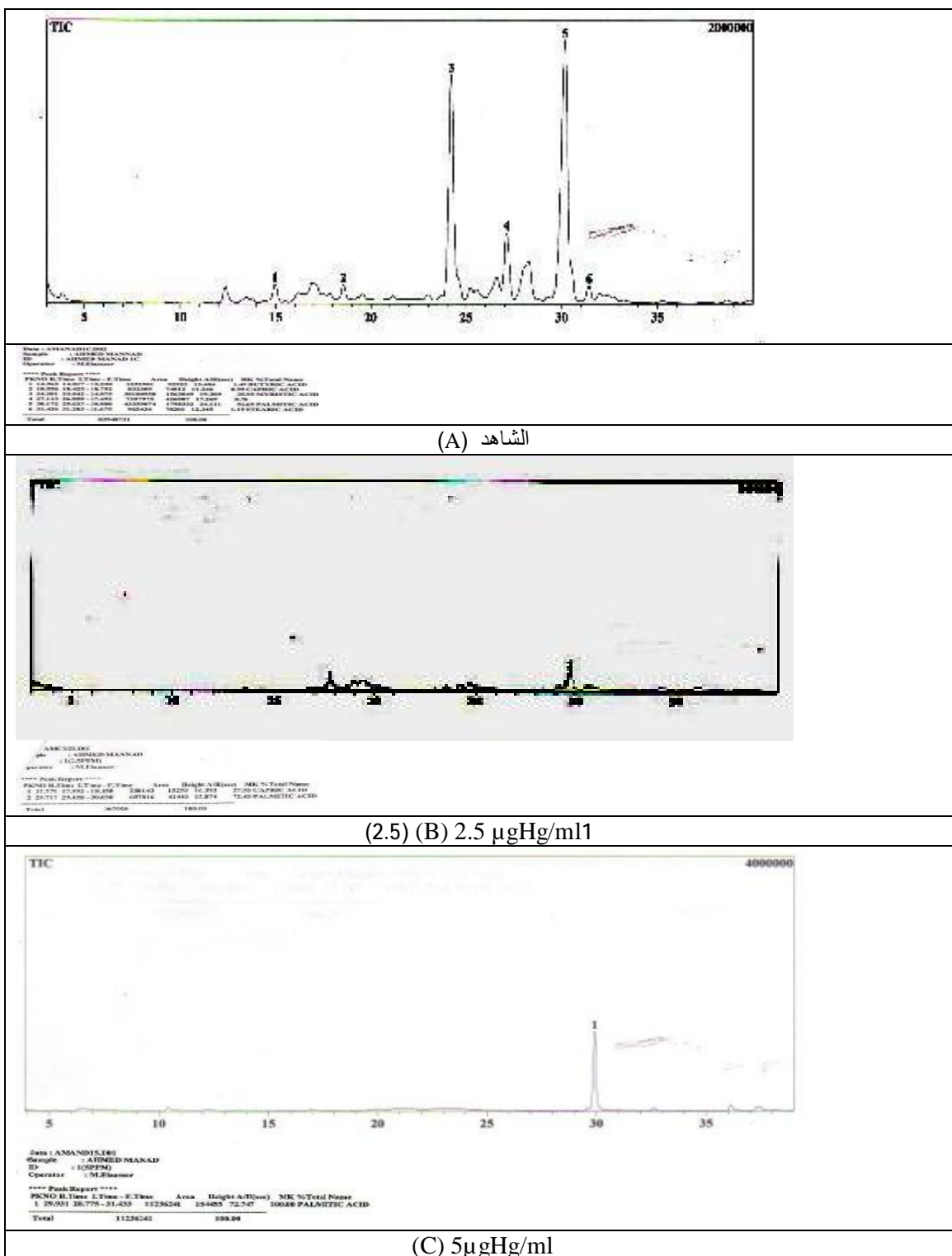
شكل 33 كروماتوغرام الأحماض العضوية المفصولة من فطر *A. niveus* المعامل بالزئبق على صورة  $HgCl_2$



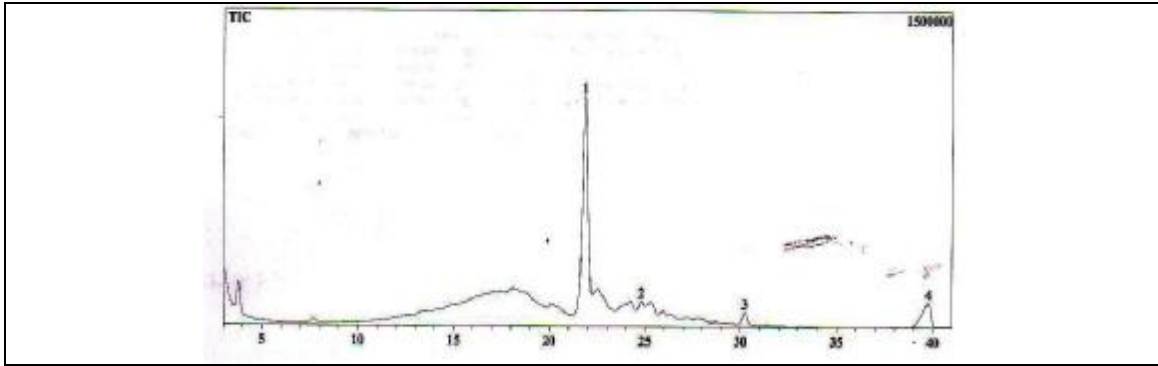
شكل 34 نسبة الأحماض العضوية (%) في فطري *A. tubingensis* و *A. niveus* المعاملين بـ  $HgCl_2$ .

اختلف سلوك الفطرين في مدى استجابتهما للزئبق الموجود في البيئة الغذائية على مستوى الأحماض العضوية. إن الزئبق في صورته المدروسة قد أدى إلى تحفيز تكوين الأحماض العضوية كلها عند التركيز 2.5 ppm حيث سجل أعلى معدل لمجموع الأحماض العضوية. ولكن مع ارتفاع الزئبق في البيئة انخفض المجموع الكلي للأحماض العضوية. اختلفت الاستجابة للزئبق من حمض عضوي لآخر لدى نفس الفطر فقد ارتفع حمض Glycolic عند التركيز 2.5 ppm لدى الفطر *A. tubingensis* ثم اختلف تماماً بارتفاع تركيز الـ  $Hg$  إلى 5 ppm. أما لدى الفطر *A. niveus* فقد كان هذا الحمض العضوي أكثر حساسية حيث يتناقص بوجود الزئبق في البيئة ويتلاشى تماماً عند ارتفاع تركيز  $Hg$ . أما حمض maleic فإنه لم يبد تأثير اتجاه وجود الزئبق في البيئة في حالة الفطر *A. tubingensis* ولكنه تناقص تناقصاً حاداً مع زيادة تركيز الـ  $Hg$  في البيئة لدى الفطر *A. niveus*. حمض Fumaric والذي كان تركيزه منخفضاً مقارنة بباقي الأحماض العضوية لم يتأثر بوجود الزئبق في البيئة لدى الفطر *A. niveus* حيث يلاحظ وجوده لدى عينات الشاهد. وقد تضاعف بناؤه مع زيادة تركيز الزئبق في البيئة إلى 5 ppm. حمض Succinic تحفز تخليقه بوجود الزئبق في البيئة وتضاعف إنتاجه مع ارتفاع تركيز الزئبق لدى الفطر *A. tubingensis* ولكن سلوكه كان مغايراً في حالة الفطر *A. niveus* حيث تناقص تركيزه تناقصاً ملحوظاً مع زيادة تركيز الزئبق في البيئة.

### 3-2-10-4 تأثير الزئبق على الأحماض الدهنية

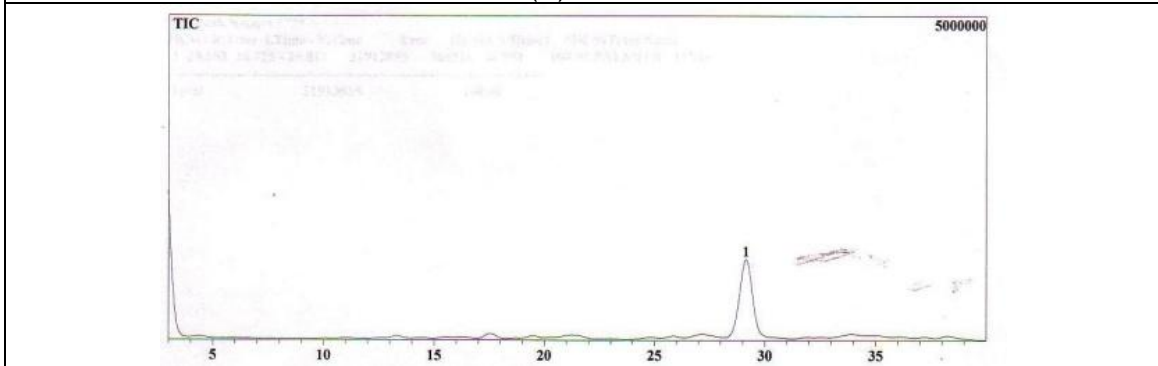


شكل 35 كروماتوغرام الأحماض الدهنية المفصولة من فطر *A. tubingensis* المعامل بالزئبق على صورة  $HgCl_2$



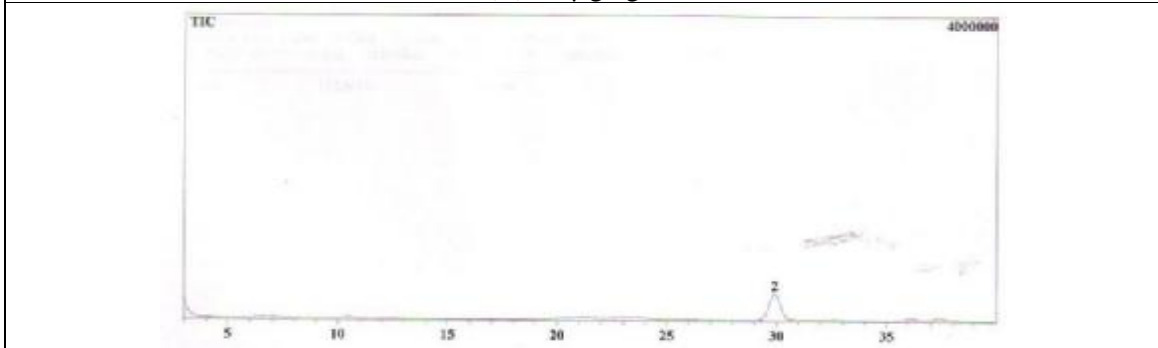
Retention Time (min)	Area	Height	Abundance	MS/MS	MS/MS	MS/MS
21.5	1191385	1191385	1191385	1191385	1191385	1191385

(A) الشاهد



Retention Time (min)	Area	Height	Abundance	MS/MS	MS/MS	MS/MS
29.5	3351385	3351385	3351385	3351385	3351385	3351385

(C) 2.5µgHg/ml

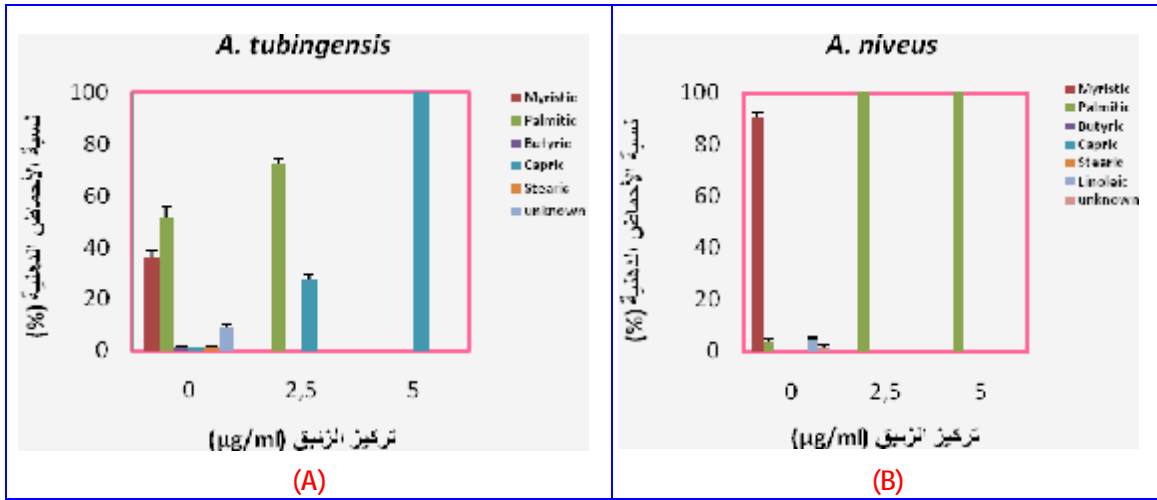


Retention Time (min)	Area	Height	Abundance	MS/MS	MS/MS	MS/MS
29.5	1128201	1128201	1128201	1128201	1128201	1128201

(C) 5µgHg/ml

شكل 36 كروماتوغرام الأحماض الدهنية المفصولة من فطر *A. niveus* المعامل بالزئبق على صورة  $HgCl_2$





شكل 37 نسبة الأحماض الدهنية في فطري *A. tubingensis* و *A. niveus* المعاملين بالزئبق على صورة HgCl<sub>2</sub>.

تباينت استجابة الفطرين المدروسين في مدى محتوَاهما وكذا نوعيتهما من الأحماض الدهنية. احتوى الفطر *A. tubingensis* على 6 أنواع من الأحماض الدهنية واحد منها غير معرف. كان أعلى الأحماض الدهنية نسبة حمض الـ palmitic (51.65%) يليه الـ myristic (35.95%). أما الحمضين الدهنيين butyric و stearic فقد كانت نسبتهما متقاربة إذ بلغت في كل منهما 1.49% و 1.15% على الترتيب. وظهر الحمض الدهني capric بأدنى نسبة 0.99% وبلغت نسبة الحمض الدهني الذي لم يمكن تعريفه 8.76%. تباينت استجابة الأحماض الدهنية في هذا الفطر *A. tubingensis* فقد أدى وجود الزئبق في البيئة الغذائية إلى الاختفاء الكلي للأحماض الدهنية myristic و butyric و stearic والحمض الدهني غيرالمعرف تماما من ميسيلوم الفطر *A. tubingensis*. حمض الـ palmitic ارتفعت نسبته إلى 72.45% عند التركيز 2.5 ppm ثم اختفى تماما بارتفاع تركيز الزئبق في البيئة إلى 5 ppm. الحمض الدهني الوحيد الذي تزايدت نسبته بارتفاع تركيز الزئبق في البيئة هو الـ capric حتى أصبح هو الوحيد حضورا عند التركيز 10ppm. أما بالنسبة لفطر *A. niveus* فقد احتوى على 5 أنواع من الأحماض الدهنية أحدها غير معرف ظهر بنسبة منخفضة (1.67%). أما باقي الأحماض الدهنية فقد مثلها كل من myristic بأعلى نسبة 90.21% والـ palmitic بنسبة 3.75% و linoleic بنسبة 4.37%. إن بروفيل

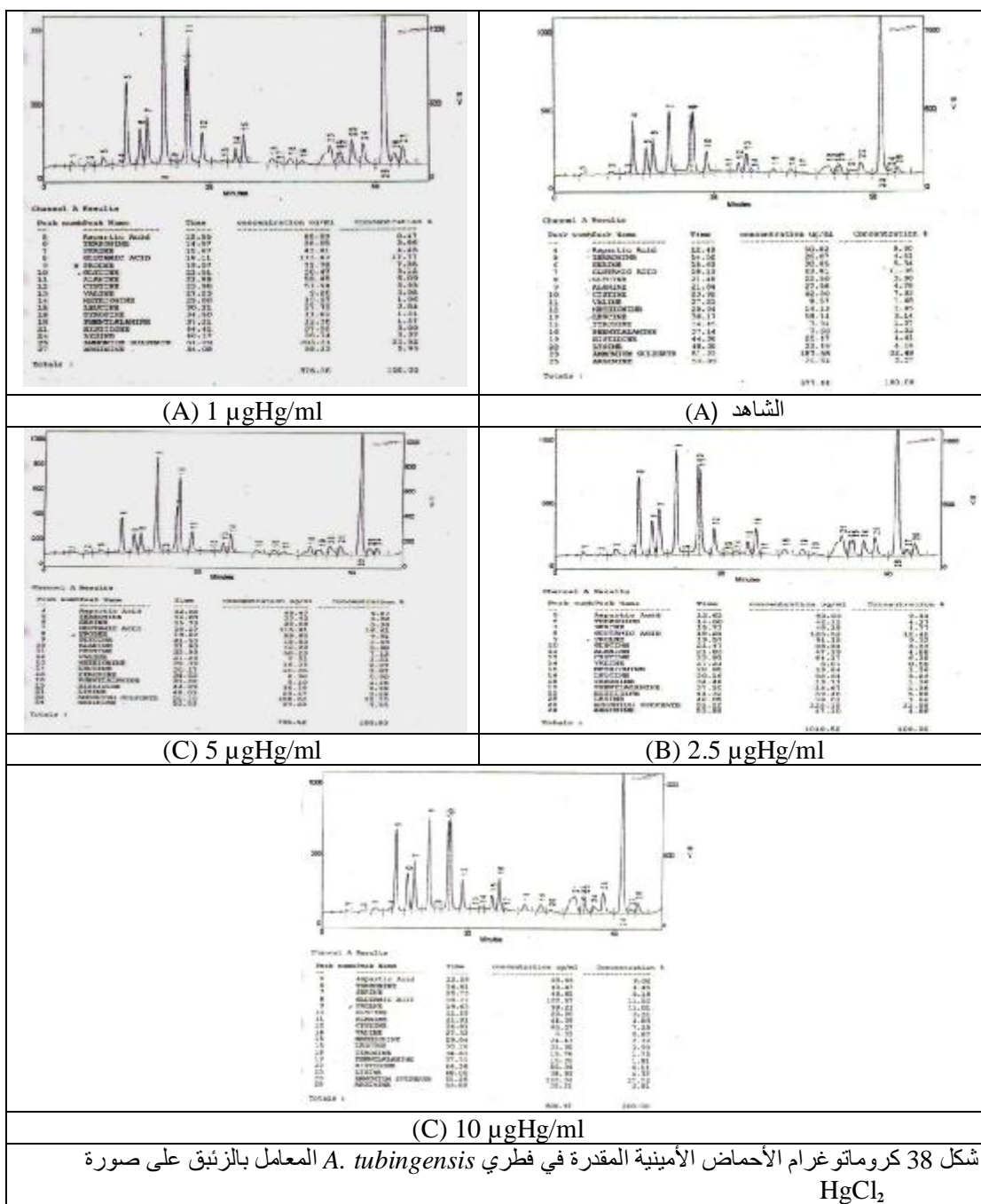
(profile) الأحماض الدهنية في الفطرين المدروسين يبين أنها كلها أحماض دهنية مشبعة stearic (18:0)، palmitic (16:0)، myristic (14:0)، butyric (4:0) و capric (6:0). إلا الفطر الثاني اختلف عن الفطر الأول في احتوائه على حمض دهني واحد غير مشبع (9.19 ، 2: 18) .linoleic

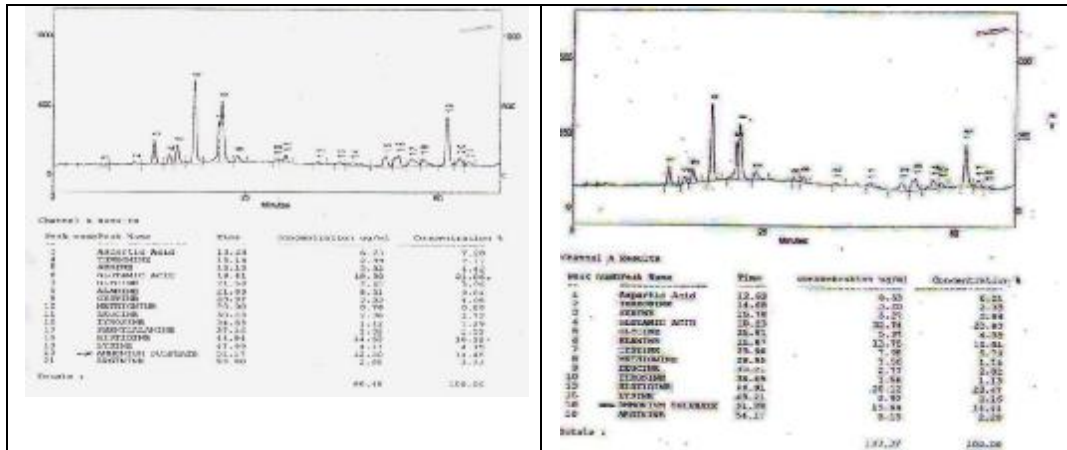
#### 4-2-10-4 تأثير الزئبق على الأيضيات الثانوية

جدول 20 الأيضيات الثانوية في فطري *A. tubingensis* و *A. niveus* المعاملين بالزئبق على صورة  $HgCl_2$ .

الفطر	تركيز الزئبق (µg/g)			الأيضيات الثانوية	
	5	2.5	0		
A. tubingensis	+	-	-	Grisofrelin	1
	+	+	+	Cytochalasine	2
	+	+	+	Rubrofusarine	3
	+	+	+	Hevalonic acid	4
	+	-	-	Desturkin	5
	+	-	-	Ochratoxin	6
	+	+	+	5'-hydroxyaspernten	7
	+	+	+	Xanthocillin	8
	-	-	+	Rugulovasine	9
	-	-	+	Physodic acid	10
	+	+	+	Dehydroxycarolic acid	11
	+	-	-	Carolic acid	12
	-	+	-	Wartmanin	13
	+	-	-	Unknown R <sub>f</sub> = 2	14
	+	+	+	Unknown R <sub>f</sub> = 6	15
	+	+	+	Unknown R <sub>f</sub> = 10	16
	+	+	+	Unknown R <sub>f</sub> = 63	17
A. niveus	-	+	+	Scytalone	1
	+	+	-	Brivianamide B	2
	+	-	-	Destruxin A	3
	+	+	+	Grseofulvin	4
	+	+	+	Hevalonic acid	5
	+	+	+	Cytochalasin	6
	-	+	-	Erthroskyrine	7
	+	+	+	Gradiolic acid	8
	-	+	+	Carlosic acid	9
	-	+	-	Stiptatic acid	10
	-	+	-	Unknown R <sub>f</sub> = 55	11

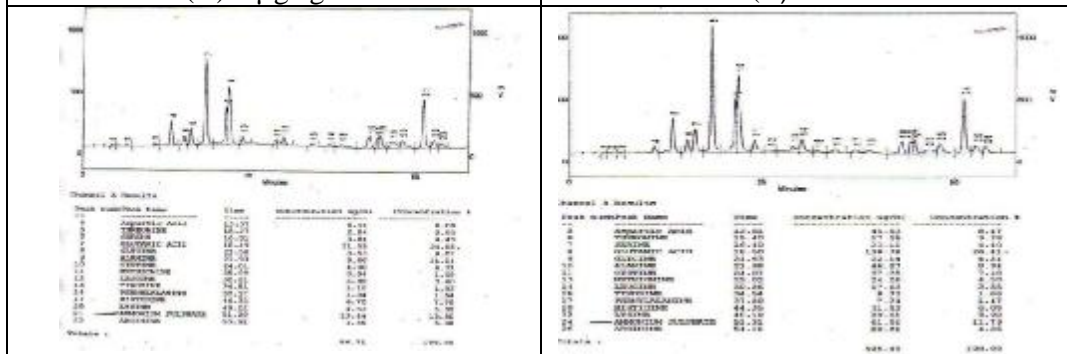
5-2-10-4 تأثير الزئبق على الأحماض الأمينية

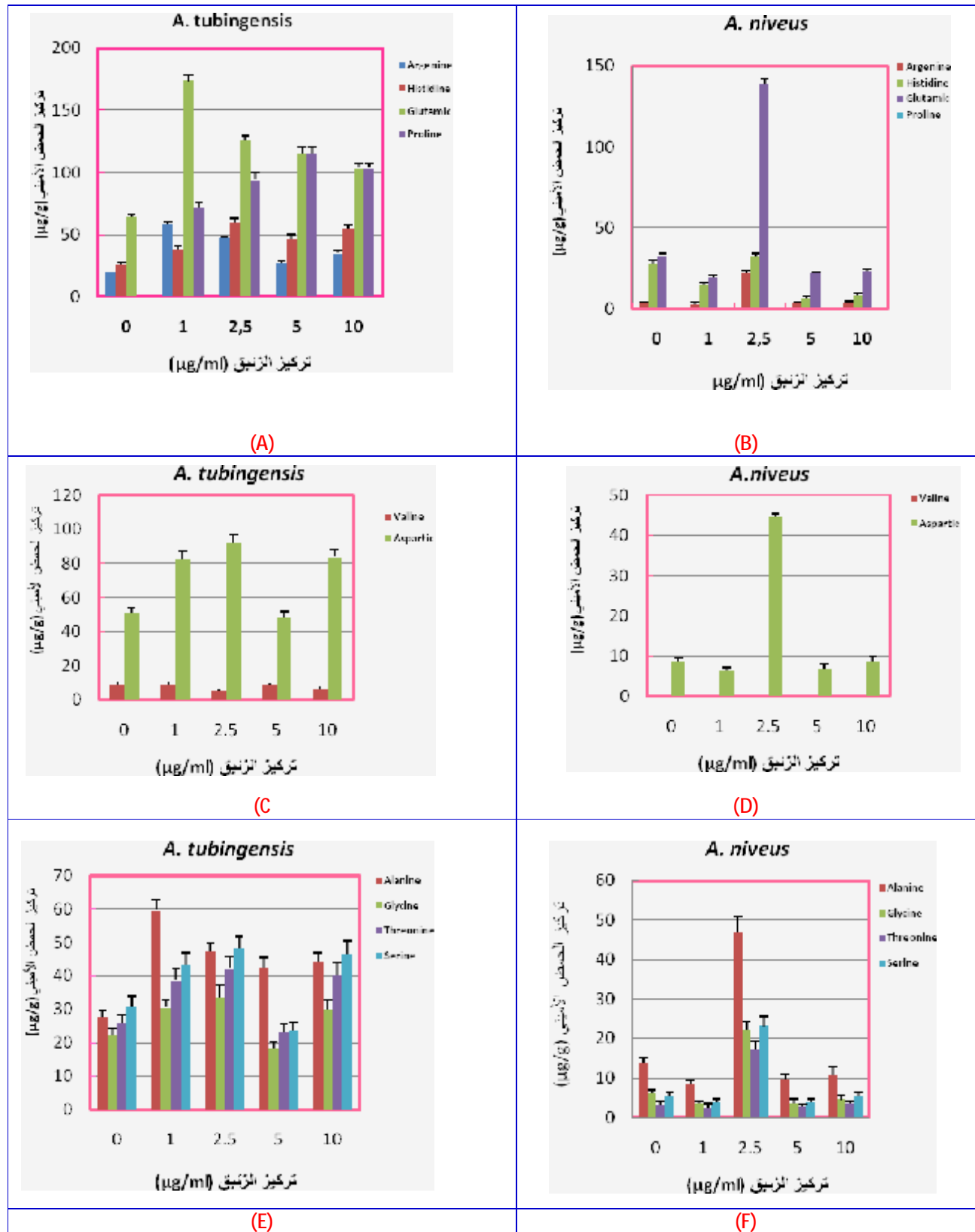




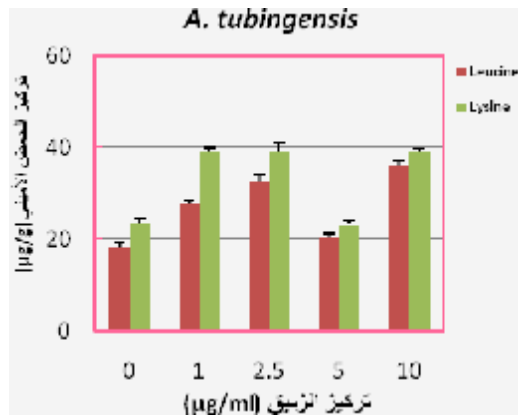
(A) 1 µgHg/ml

(A) الشاهد

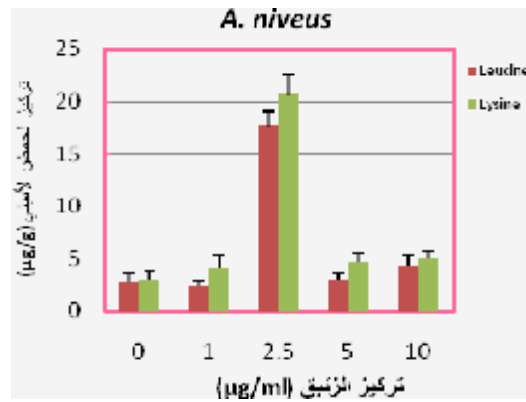




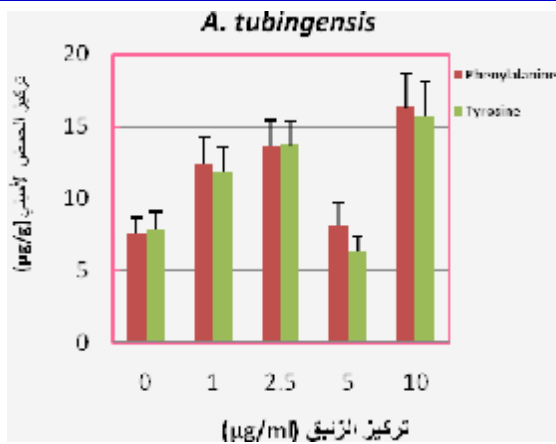
شكل 40 تركيز الأحماض الأمينية ( $\mu\text{g/g}$ ) في فطري *A. niveus* و *A. tubingenis* المعاملين بالزئبق على صورة  $\text{HgCl}_2$



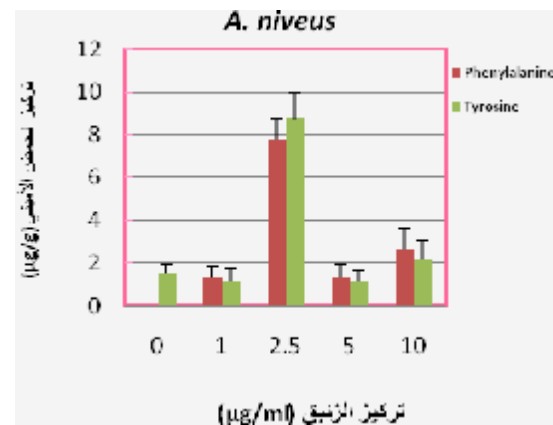
(G)



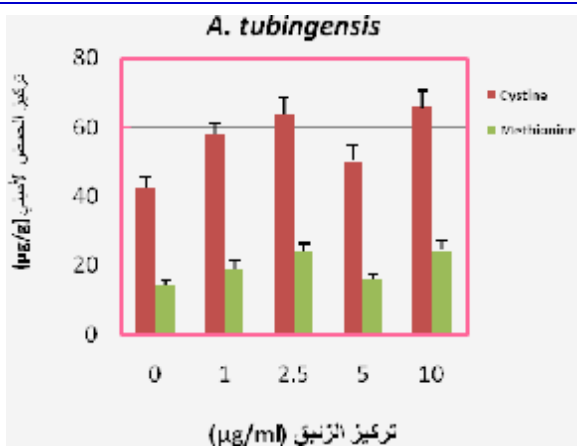
(H)



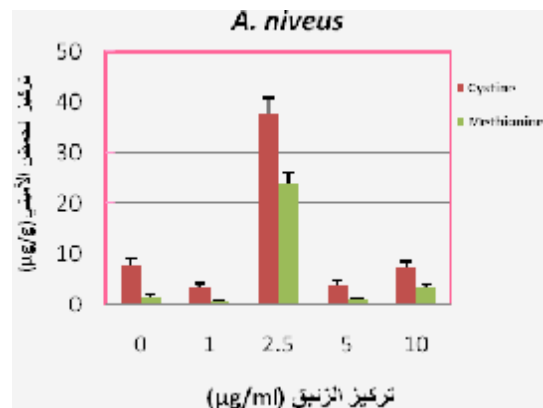
(I)



(J)



(K)



(L)

تابع شكل 40 تركيز الأحماض الأمينية ( $\mu\text{g/g}$ ) في فطري *A. tubingensis* و *A. niveus* المعاملين بالزنك على صورة  $\text{HgCl}_2$

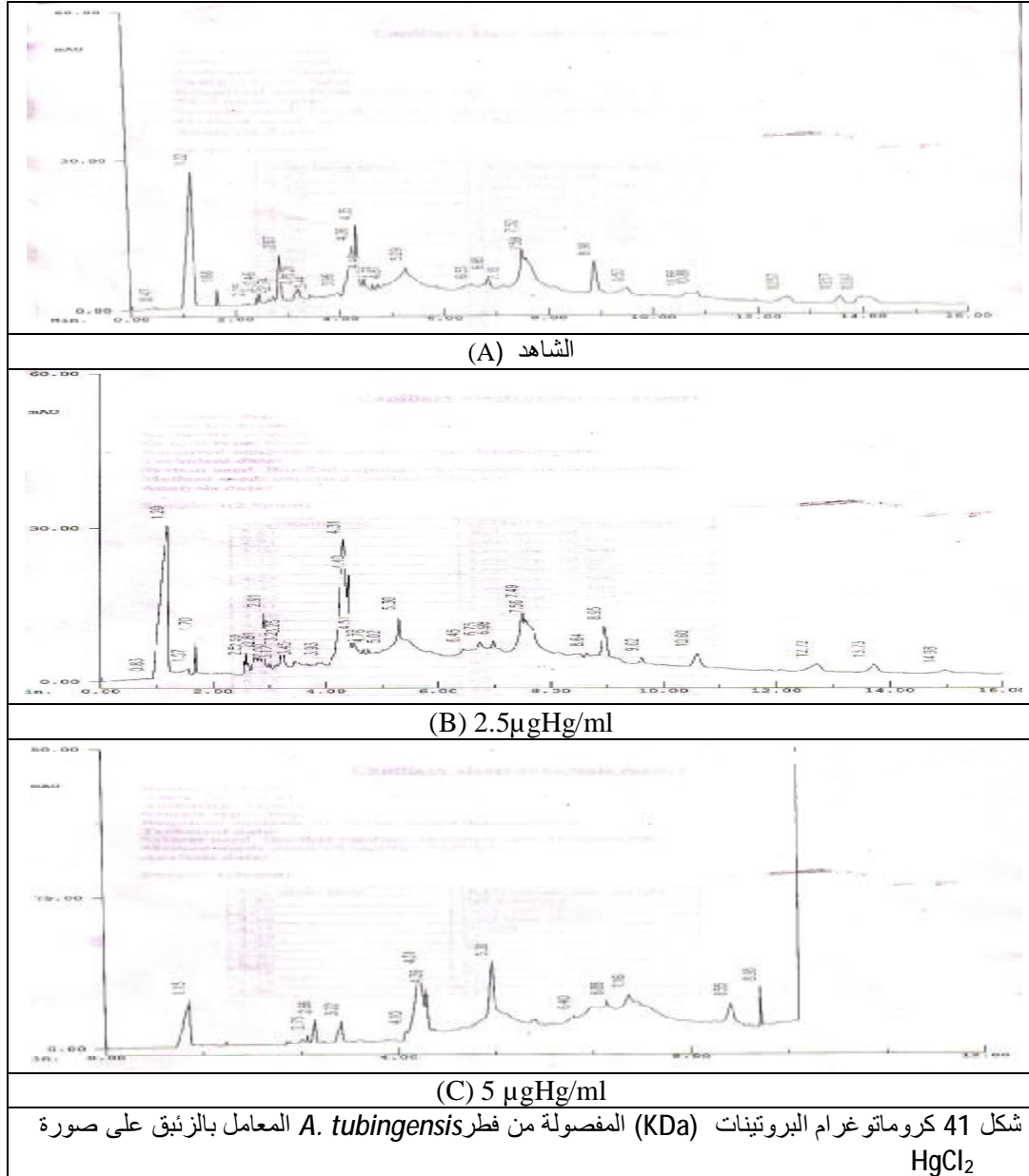
إنّ الأحماض الأمينية argenine ، histidine ، glutamic ، وال proline ينتهي بها المطاف الأيضي إلى تكوين الـ glutamate ، ويكون الأيض الهدمي (catabolisme) لـ glutamate مماثلاً للـ aspartate باستثناء أنّ الناتج في هذه الحالة يكون  $\alpha$ -Ketoglutarate. أبدت هذه الأحماض الأمينية استجابة متباينة بين الفطرين المدروسين. فالأحماض الأمينية argenine و histidine و glutamic أبدت نفس سلوك الحمض الأميني aspartate حيث أنه في حالة الفطر *A. tubingensis* (شكل 40 A) يتزايد تركيزها بوجود الزئبق في البيئة ثم ينخفض عند التركيز 5ppm ويرتفع عند التركيز 10 ppm. وأما في حالة الفطر *A. niveus* (شكل 40 B) فإنه يقل محتواها عند التركيز 1 ppm ثم يرتفع ارتفاعاً كبيراً عند التركيز 2.5ppm لينخفض بعد ذلك ويعود إلى تركيزه الطبيعي في التراكيز المولية. أما تركيز حمض الـ proline فقد تحفز بناؤه بوجود الزئبق في البيئة بالفطر *A. tubingensis* وتزايد طرداً مع تركيز الزئبق حتى بلغ أقصى قيمة له عند التركيز 5 ppm ثم انخفض بعد ذلك عند التركيز 10 ppm إلا أنّ الزئبق في البيئة المغذية لم يؤدي إلى بناء الـ proline في حالة الفطر *A. niveus*. ولعل ذلك يرجع إلى الأصول الوراثية. إنّ الحمض الأميني الـ valine والذي يكون ناتج هدمه الأيضي succinyl-coA لم يظهر سوى في حالة الفطر *A. tubingensis* (شكل 40 C) وغاب تماماً في حالة الفطر *A. niveus* (شكل 40 D). إلا أنّ إستجابته للزئبق بالتراكيز المدروسة لم تكن نموذجية. يمثل حمض الـ Aspartic الحمض الأميني الوحيد الذي يؤدي إلى تكوين Oxaloacetate. وقد تباين سلوكه في وجود الزئبق بين الفطرين المدروسين. ففي حالة الفطر *A. tubingensis* (شكل 40 C) حيث كان معدله أعلى فقد تزايد تركيزه حتى بلغ أقصى قيمة عند تركيز 2.5 ppm من الزئبق ثم انخفض بعد ذلك عند التركيز 5 ppm و ارتفع عند 10 ppm. أما في حالة الفطر *A. niveus* (شكل 40 D) فقد انخفض عند التركيز 1 ppm من الزئبق ثم ارتفع ارتفاعاً مهولاً عند التركيز 2.5 ppm ليعود بعد ذلك إلى تركيزه الطبيعي في التراكيز المولية. مجموعة الأحماض الأمينية التي تؤدي إلى تكوين الـ pyruvate والتي تتمثل في كل من الـ glycine ، alanine ، serine و threonine فقد تماثل سلوكها في وجود الزئبق حيث يتزايد تركيزها بتزايد تركيز في البيئة المغذية حتى يصل إلى أقصى قيمة له عند التركيز 2.5ppm ثم ينخفض عند التركيز 5 ppm ثم يرتفع عند التركيز 10 ppm (شكل 40 E ، F). لعل التزايد المطرد لتركيز هذه الأحماض الأمينية يكون مرده إلى الإجهاد الذي يعاني منه الفطر جراء تواجد الزئبق في البيئة المغذية إلى أن يصل أعلى قيمة له عند التركيز 2.5ppm ثم وبعد أن يتأقلم

الفطر مع ظروف البيئة المغذية المحتوية على الزئبق بيدي رد فعل ملحوظ يتمثل في الانخفاض الشديد لمعظم هذه الأحماض الأمينية عند التركيز 5 ppm يليه العودة إلى التركيز الطبيعي عند 10ppm من الزئبق. وقد تمثل هذا السلوك التأقلمي في الـ glycine الذي يدخل في بناء القواعد البيورينية إضافة إلى كونه أحد المكونات الرئيسية للـ glutathione والـ serine الذي يدخل في تكوين القواعد البيورينية إضافة إلى دخوله في بناء الـ sphingol الذي يساهم في تكوين sphingomgline حيث تكون على صورة O-phospho serine . أما الحمضين الأمينين alanine و threonine فإنّ وظيفتهما بنيوية حيث يعتبر الـ alanine أحد المكونات الرئيسية للجدر الخلوية في الكائنات الحية الدقيقة بينما يمكن للـ threonine أن يظهر في صورة روابط O-phospho threonine كما هو الحال بالنسبة للـ serine. أبدى الحمضين الأمينين leucine و lysine واللذين يكون ناتج هضمهما الأيضي acetaocetyl-coA سلوكا متماثلا على مستوى كل فطر. ففي حالة الفطر *A. tubingensis* (شكل 40 G) يرتفع تركيزهما بزيادة تركيز الزئبق في البيئة الغذائية إلى أن يصل أقصى قيمة له عند التركيز 10 ppm. أما في حالة الفطر *A. niveus* (شكل 40 H) فإن تركيزهما ينخفض عند 1 ppm من الزئبق ثم يرتفع ارتفاعا كبيرا (معنويا) عند التركيز 5 ppm لينخفض بعد ذلك مع زيادة تركيز الزئبق إلى تراكيز قريبة من التركيز الطبيعي. أظهر الحمضين الأمينين العطريين الـ phenylalanine والـ tyrosine سلوكا متماثلا على مستوى فطر *A. tubingensis* حيث يرتفع تركيزها مع زيادة الزئبق حتى يصل أعلى قيمة له عند التركيز 2.5ppm من الزئبق ثم ينخفض عند التركيز 5 ppm ثم يرتفع مجددا عند التركيز 10 ppm. بينما في حالة الفطر *A. niveus* فإنّ الـ phenylalanine والذي كان غائبا تماما في حالة الشاهد فقد تحفز بناءه بوجود الزئبق في البيئة وارتفع تركيزه إلى أن وصل قيمة له عند 2.5 ppm زئبق ثم انخفض عند التراكيز الموالية. كما أبدى الـ tyrosine والذي لوحظ وجوده على مستوى الشاهد في الفطر *A. niveus* سلوكا مماثلا للـ phenylalanine. يتميز هذان الحمضان العطريان بنوعين من المسارات الأيضية يؤدي أحدهما إلى تكوين الـ fumarate الذي يتحول إلى oxalaocetate بينما يؤدي الآخر إلى تكوين acetocetyl-coA الذي يؤدي هدمه الأيضي إلى تكوين acetyl-coA. تباين سلوك الحمضين الأمينين الكبريتين cystine والـ methionine حسب نوع الفطر حيث يرتفع تركيزهما في *A. tubingensis* (شكل 40 K) مع زيادة تركيز الزئبق في البيئة حتى يصل أقصى قيمة له عند التركيز 2.5 ppm ثم ينخفض محتواهما عند التركيز 5 ppm ويرتفع مجددا عند



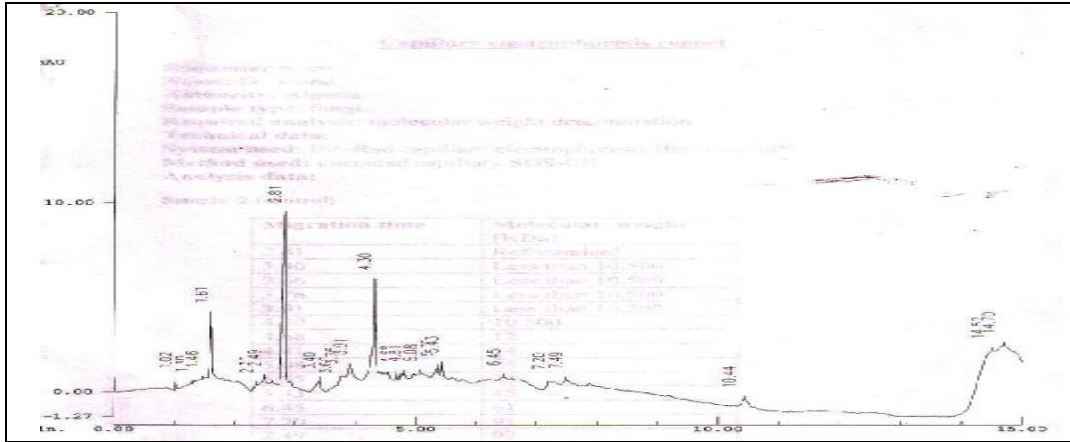
التركيز 10 ppm. أما في حالة الفطر *A. niveus* (شكل 40 L) انخفض محتواهما عند التركيز 1ppm ثم ارتفع ارتفاعا معنويا عند التركيز 2.5ppm لينخفض عند التركيز 5ppm ويرتفع مجددا عند التركيز 10 ppm.

#### 6-2-10-4 تأثير الزئبق على البروتينات

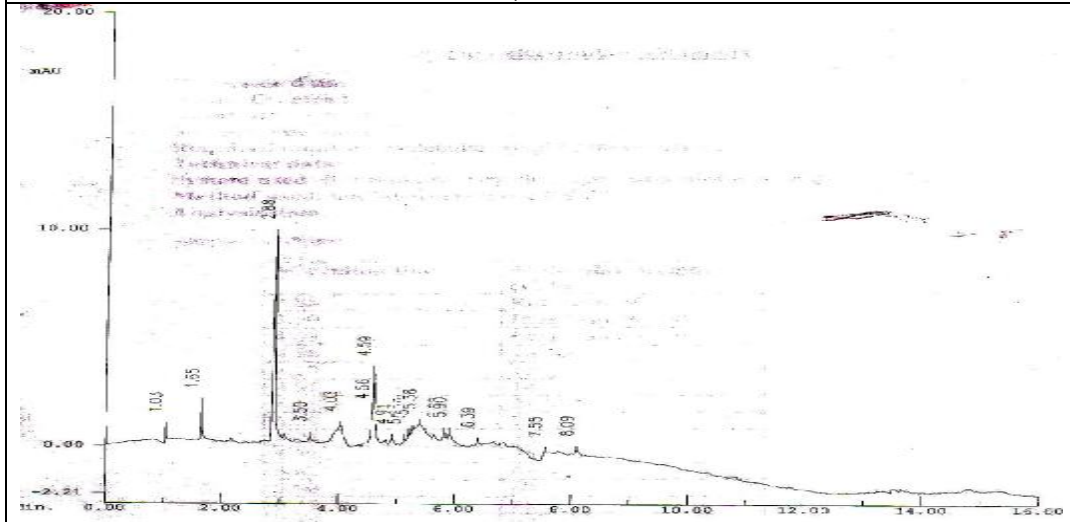


جدول 21 الوزن الجزيئي للبروتينات (KDa) المفصولة من فطر *A. tubingensis* المعامل بالزئبق على صورة  $HgCl_2$ .

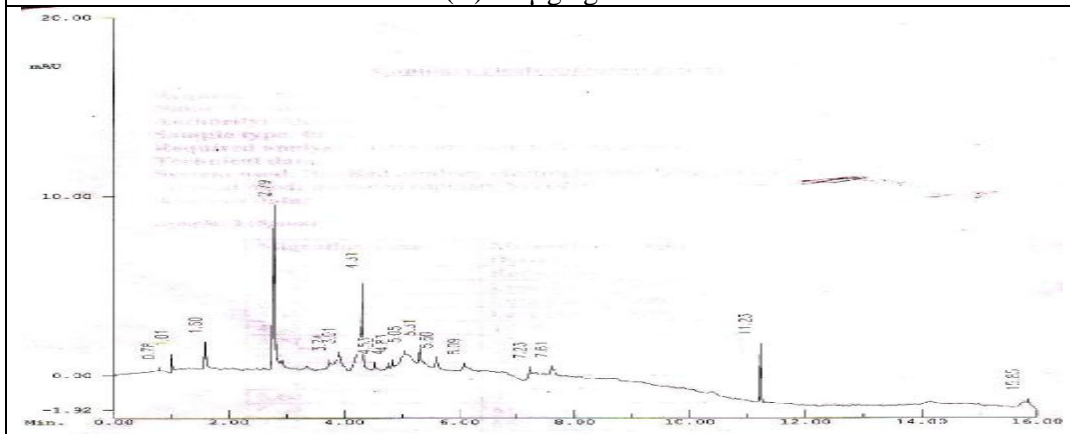
تركيز الزئبق ( $\mu g/g$ )					
5		2.5		0	
الوزن الجزيئي	زمن الهجرة (min)	الوزن الجزيئي	زمن الهجرة (min)	الوزن الجزيئي	زمن الهجرة (min)
المرجع القياسي	2.86	المرجع القياسي	2.81	المرجع القياسي	2.87
10.5 >	3.22	10.5 >	2.91	10.5 >	3.16
10.5 >	4.1	10.5 >	3	10.5 >	3.21
10.5	4.31	10.5 >	3.12	10.5 >	3.44
12	4.39	10.5 >	3.21	10.5 >	3.96
45	5.30	10.5 >	4.25	10.5 >	4.26
61	6.40	10.5 >	3.45	10.5 >	4.35
85	6.86	10.5 >	3.93	10.5	4.46
91	7.16	10.5 >	4.31	12	4.64
110	8.55	10.5	4.4	14	4.73
117	8.95	12	4.51	21.5	4.87
-	-	14	4.67	45	5.29
-	-	21.5	4.76	61	6.53
-	-	33	5.02	85	6.85
-	-	45	5.3	91	7.15
-	-	61	6.45	93	7.52
-	-	67	6.75	97	7.59
-	-	85	6.98	110	8.9
-	-	91	7.49	120	9.53
-	-	97	7.65	125	10.66
-	-	110	8.64	150	10.86
-	-	117	8.95	200	12.57
-	-	120	9.62	220	13.57
-	-	125	10.6	250	13.97
-	-	200	12.72	-	-
-	-	220	13.73	-	-
-	-	250 <	14.98	-	-



(A) الشاهد



(B) 2.5µgHg/ml



(B) 5 µgHg/ml

شكل 42 كروماتوغرام البروتينات (KDa) المفصولة من فطر *A. niveus* المعامل بالزئبق على صورة  $\text{HgCl}_2$ .

جدول 22 الوزن الجزيئي للبروتينات (KDa) المفصولة من فطر *A. niveus* المعامل بالزئبق على صورة  $HgCl_2$ .

تركيز الزئبق ( $\mu g/g$ )					
5		2.5		0	
الوزن الجزيئي	زمن الهجرة (min)	الوزن الجزيئي	زمن الهجرة (min)	الوزن الجزيئي	زمن الهجرة (min)
المرجع القياسي	2.79	المرجع القياسي	2.88	المرجع القياسي	2.81
10.5 >	3.74	10.5 >	3.5	10.5 >	3.4
10.5 >	3.91	10.5 >	4.03	10.5 >	3.66
10.5 >	4.31	10.5	4.56	10.5 >	3.76
10.5	4.53	12	4.59	10.5 >	3.91
12	4.77	14	4.91	10.5	4.3
14	4.83	21.5	5.13	12	4.68
25	5.05	23	5.20	14	4.81
33	5.31	33	5.26	25	5.08
45	5.6	45	5.38	33	5.35
61	6.09	61	5.82	45	5.43
66	7.23	63	5.9	61	6.45
97	7.61	85	6.39	91	7.2
150	11.23	97	7.55	97	7.49
-	-	110	8.09	120	10.44

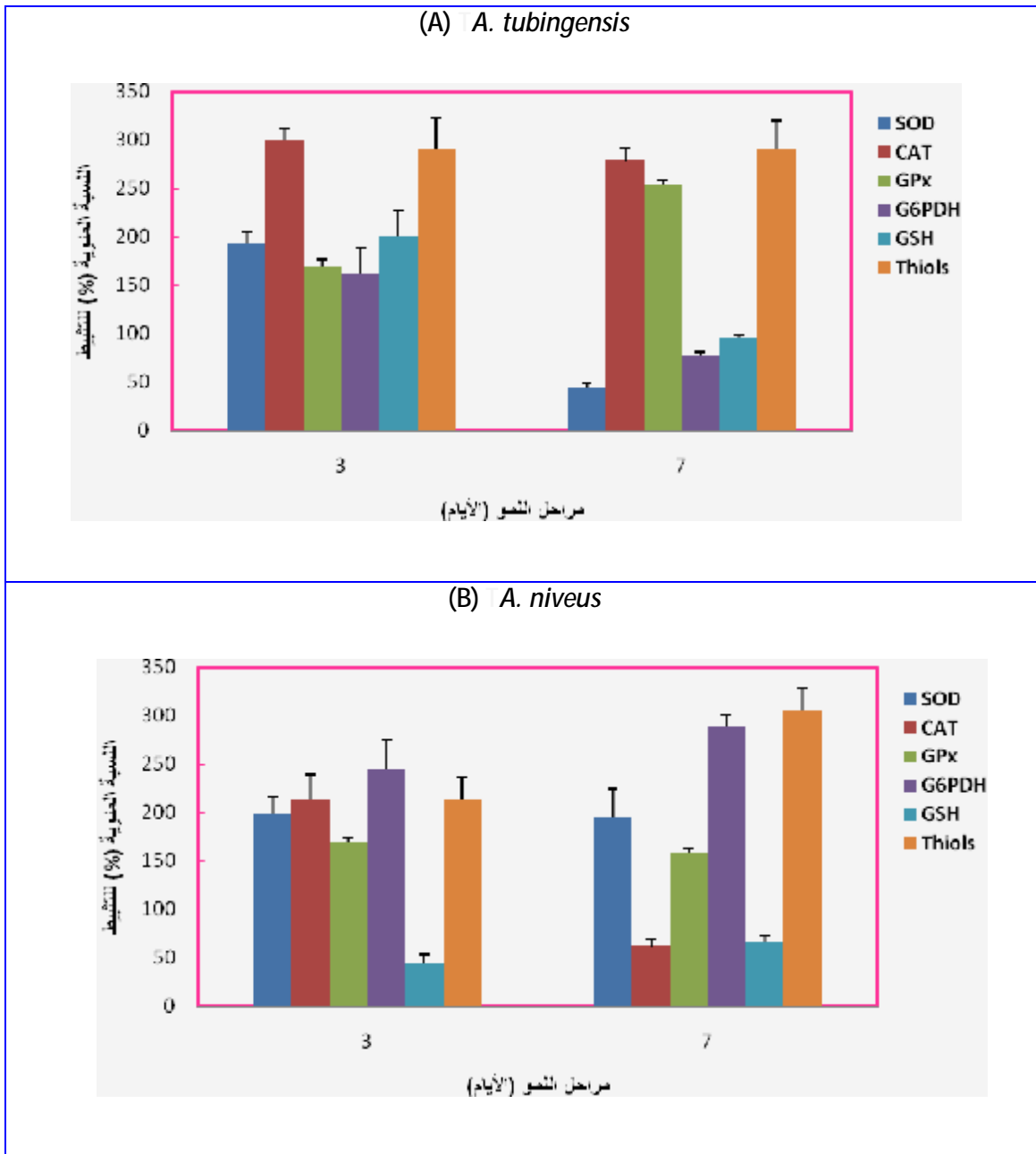
بغرض معرفة علاقة البروتينات في ميسيليوم العزلتين *A. niveus* و *A. tubigensis* بالزئبق في البيئة فقد تم اختبار تركيزي 2.5 و 5 ppm من الزئبق للدراسة . تم التقدير البروتيني بعد 7 أيام من نمو الفطرين على بيئة YES المحتوية على الزئبق. بالنسبة للفطر *A. tubigensis* (جدول 21) فقد لوحظ عند المعاملة بتركيز 2.5ppm من الزئبق وجود بروتينين وزنهما الجزيئي أقل من KDa 10.5 لم يكونا موجودين في الشاهد. واختفى عند هذا التركيز بروتينين وزنهما الجزيئي أكبر أحدهما 93 KDa والآخر 150 KDa. أمّا عند المعاملة بتركيز 5 ppm فقد اختفى عدد كبير من البروتينات ضم 6 من البروتينات التي وزنها الجزيئي أقل من 10.5 KDa والبروتينات التي يتراوح وزنها 14 و 34 KDa وبروتينين أحدهما وزنه الجزيئي 93 KDa والآخر 97 KDa واختفت كل البروتينات التي يكون وزنها الجزيئي أكبر من 120 KDa. أما بالنسبة لفطر *A. niveus* (جدول 22) فقد اختلف عن الفطر الأول *A. tubigensis* في احتوائه فقط على نوعين من البروتينات التي وزنها الجزيئي 10.5 KDa وكذا على البروتينات ذات الأوزان الجزيئية 67، 85، 93، 110، 117 KDa على الترتيب وكذا غياب كل البروتينات التي يفوق وزنها الجزيئي 125 KDa. أدت المعاملة بتركيز

2.5ppm من الزئبق إلى اختفاء كل البروتينات التي وزنها الجزئي أقل من 10.5 KDa وكذا البروتين الذي وزنه الجزئي 125 KDa وإلى ظهور بروتينين جديدين أحدهما وزنه الجزئي 85 KDa والآخر وزنه الجزئي 110 KDa . وعند معاملة الفطر *A. niveus* بتركيز 10 ppm من الزئبق ظل اختفاء كل البروتينات التي يقل وزنها الجزئي عن 10.5 KDa وكذا البروتينين اللذين وزنهما الجزئي 93 و 120 KDa . كما اختفى أيضا البروتين الجديدين (85 KDa ، 110 KDa) اللذين ظهرا عند التركيز 2.5 ppm . ولكن ظهر عند هذه المعاملة (10 ppm) بروتين جديد وزنه الجزئي 150KDa لم يظهر لا في الشاهد ولا عند التركيز 2.5 ppm .

#### 4-10-2-7 الزئبق والإجهاد التأكسدي

جدول 23 أثر الـ  $HgCl_2$  على مؤشرات الإجهاد التأكسدي بكل من *A. tubigenis* و *A. niveus*

مراحل النمو (اليوم)				العوامل المدروسة	الفطر
7		3			
معامله	شاهد	معامله	شاهد		
0.8 ± 6.2	0.8 ± 14.3	0.9 ± 15.3	3.1 ± 7.9	(U/mg protein) SOD	<i>A. tubigenis</i>
1.8 ± 38.7	1.7 ± 13.9	1.4 ± 13.5	0.8 ± 4.5	(U/mg protein) CAT	
54 ± 2590	30 ± 1020	50 ± 1001	20 ± 604	(U/mg protein) GPx	
$5^{-10} \times (2.8 \pm 62)$	$5^{-10} \times (2.8 \pm 80)$	$5^{-10} \times (6.7 \pm 40.3)$	$5^{-10} \times (1.5 \pm 25)$	(U/mg protein) G6PDH	
0.05 ± 0.4	0.8 ± 4.2	0.8 ± 6	0.9 ± 3	(nmol/mg protein) GSH	
0.95 ± 9.19	0.75 ± 3.16	0.35 ± 8.75	0.95 ± 3.06	المركبات الثيولية	
8.1 ± 40.34	2.4 ± 20.6	2.6 ± 30.4	1.9 ± 15.3	(U/mg protein) SOD	<i>A. niveus</i>
1.7 ± 15.3	1.4 ± 24.8	4.8 ± 20.1	0.9 ± 9.4	(U/mg protein) CAT	
36 ± 1900	34 ± 1200	50 ± 1500	31 ± 890	(U/mg protein) GPx	
$5^{-10} \times (3 \pm 73.78)$	$5^{-10} \times (3.4 \pm 25.6)$	$5^{-10} \times (3.1 \pm 21.5)$	$5^{-10} \times (2.1 \pm 10.5)$	(U/mg protein) G6PDH	
1.2 ± 12.1	2.1 ± 18.3	0.8 ± 3.2	0.8 ± 7.4	(nmol/mg protein) GSH	
0.73 ± 9.69	0.83 ± 3.18	0.96 ± 8.72	0.85 ± 4.08	المركبات الثيولية	



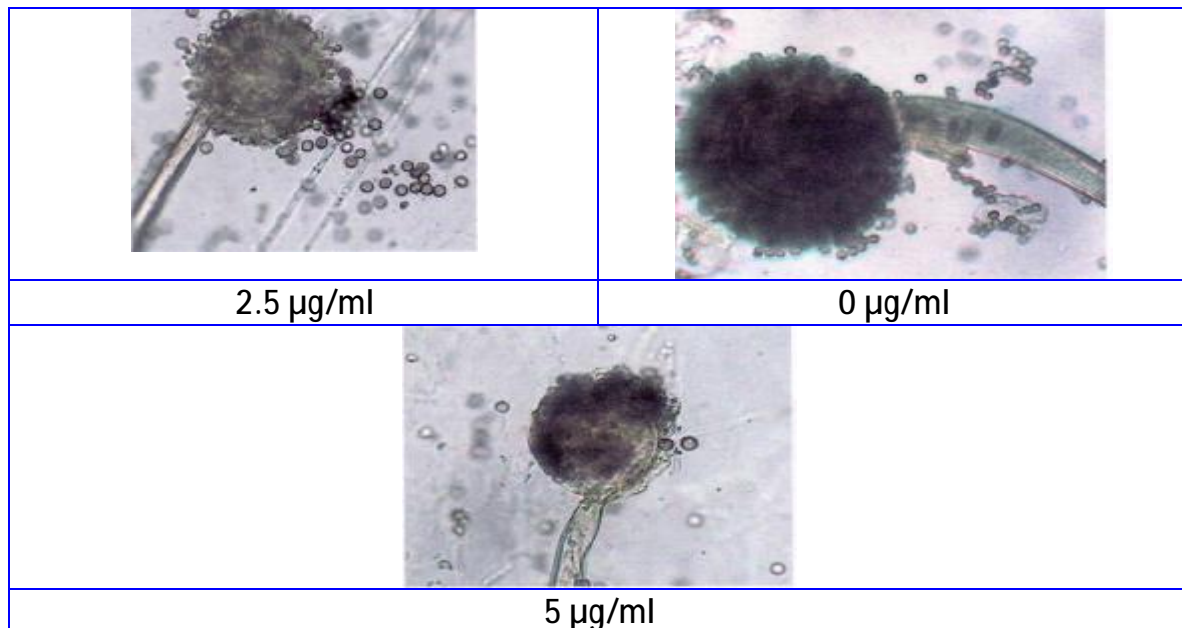
شكل 43 النسبة المئوية لاستجابة مؤشرات الإجهاد التأكسدي بكل من *A. tubigenis* و *A. niveus* المعاملين بـ  $HgCl_2$

يبين الشكل 43 أنه عند معاملة فطر *A. tubigensis* الزئبق بتركيز 5 ppm فقد ارتفع نشاط كل من SOD و G6PDH بوجود الزئبق في البيئة الغذائية خلال فترة النمو 3 أيام ولكنهما انخفضا انخفاضاً معنوياً عند مرحلة النمو 7 أيام إلى  $5.71 \pm 43.35$  % و  $3.5 \pm 77.5$  % على الترتيب، في حين نشاط الـCAT إلى ما يقارب الثلاثة أضعاف مقارنة بالشاهد وهذا خلال فترتي النمو المدروسة، كما تحفز نشاط أنزيم GPx بوجود الزئبق وازداد هذا التحفز معنوياً عند مرحلة النمو 7 أيام. محتوى المركبات الثيولية تضاعف بدوره إلى ما يقارب الثلاث مرات إلا أن محتوى الجلوتاثيون الذي زاد عند مرحلة النمو 3 أيام قد تراجع إلى ما يقارب الحالة الطبيعية ( $1.19 \pm 95.23$  %) عند مرحلة النمو 7 أيام. أما في حالة *A. niveus* فيتضح من الشكل 43 أن سلوك كل من SOD و G6PDH كان مغايراً حيث أن نشاطهما الذي تحفز بوجود الزئبق عند مرحلة النمو 3 أيام قد ظل مرتفعاً عند مرحلة النمو 7 أيام، في أن نشاط الـCAT الذي ارتفع عند مرحلة 3 النمو أيام قد انخفض انخفاضاً معنوياً عند مرحلة النمو 7 أيام إلى  $6.85 \pm 61.69$  %. نشاط أنزيم GPx الذي ارتفع بفعل الزئبق فقد ظل مرتفعاً خلال مرحلة النمو 7 أيام، إن المركبات الثيولية التي ارتفعت إلى الضعف عند مرحلة النمو 3 أيام قد ازدادت ارتفاعاً إلى الثلاثة أضعاف خلال مرحلة النمو 7 أيام، إلا أن محتوى الجلوتاثيون قد انخفض معنوياً بوجود الزئبق في البيئة وهذا عند فترتي النمو المدروستين إلى  $10.81 \pm 43.23$  % و  $6.55 \pm 66.12$  % على الترتيب.

#### 4-10-2-8 الدراما المجهرية لتأثير الزئبق على فطري *A. Tubigensis* و *A. niveus*

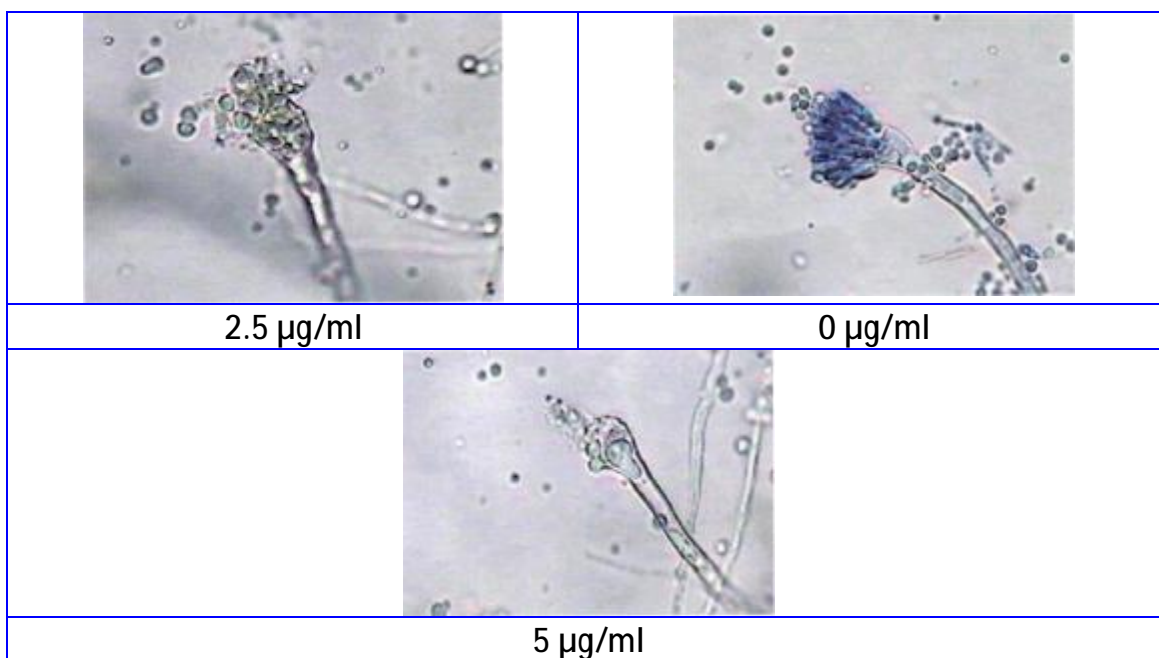
##### 4-10-2-8-1 دراسة المجهر الضوئي

##### فطر *A. tubigensis*



شكل 44 المظهر المرفولوجي لفطر *A. tubigensis* المعامل بالزئبق على صورة  $HgCl_2$

فطر *A. niveus*



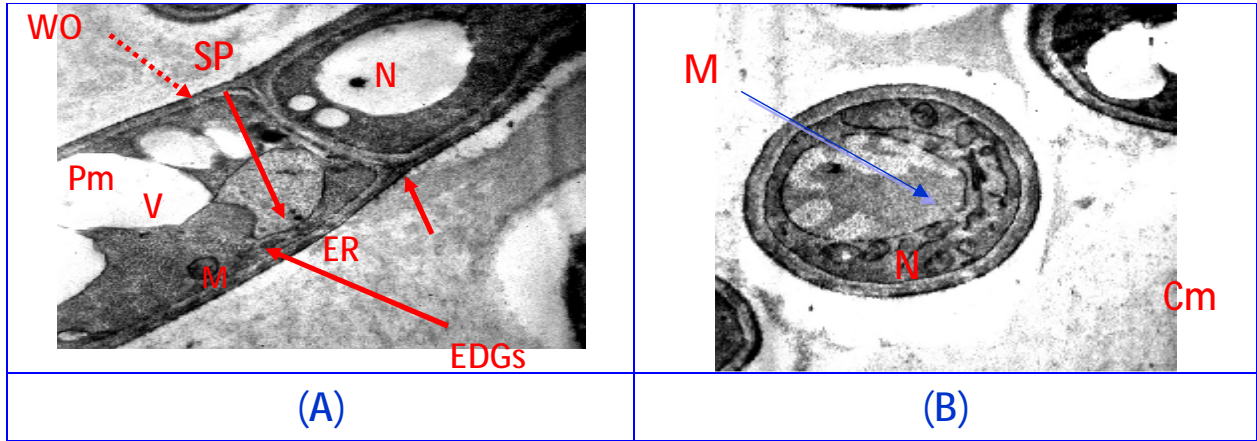
شكل 45 المظهر المرفولوجي لفطر *A. niveus* المعامل بالزنثبق على صورة  $HgCl_2$

جدول 24 تأثير الزنثبق على الأبعاد المرفولوجية لفطري *A. tubingensis* و *A. niveus*

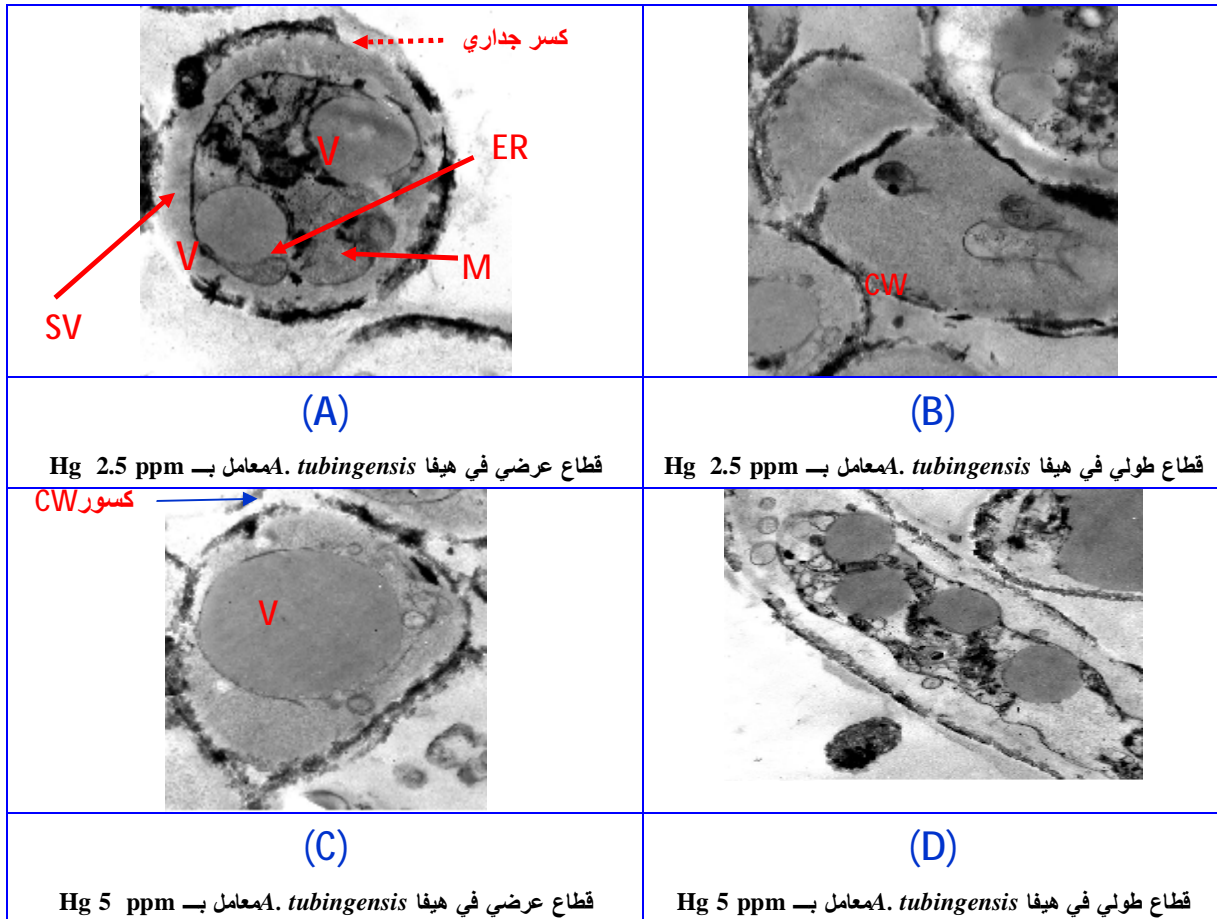
<i>A. niveus</i>			<i>A. tubingensis</i>			الفطر
5	2.5	0	5	2.5	0	تركيز الزنثبق (µg/ml)
3.3	3.4	4.5	5.3	8.6	15	الحامل الكونيدي
9 x 7	10.3 x 8.7	12.3 x 10.3	34.8 x 34	39.5 x 31.4	39 x 31.3	الحويصلة
4.1 x 1.3	4.3 x 2.2	5.6 x 2.4	6.4 x 2	8.1 x 2.6	15 x 3.7	Primary strigmata
-	-	4.5 x 2.2	4.6 x 1.7	7 x 2.7	8 x 3.8	Secondary strigmata
1.9	2	2.5	3	3.1	3.6	الكونيديا
15.8	16.3	30.5	88.7	114	280.3	الرأس الكونيدي



2-8-2-10-4 دراسة المجهر الإلكتروني  
*A. tubingensis* 1-2-8-2-10-4



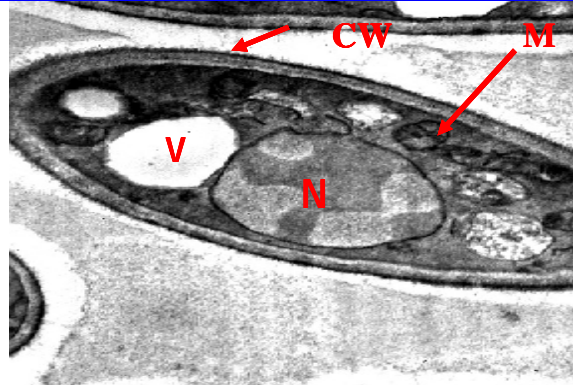
شكل 46 قطاع طولي (A) وآخر عرضي (B) في هيفا *A. tubingensis* غير المعامل بالزئبق



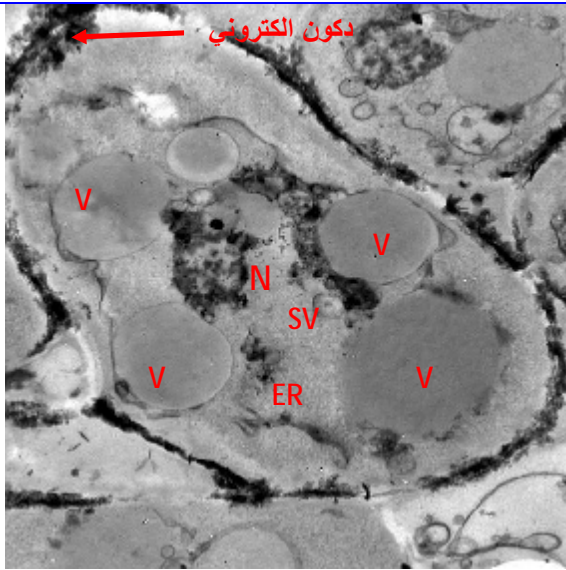
شكل 47 مقاطع طولية (B ، D) وأخرى عرضية (A ، C) في هيفا *A. tubingensis* المعامل بالزئبق

تبدى الصورة المجهرية الـ *transmission électron* لكل من القطاعين العرضي والطولي بالشكل 46 المظهر النموذجي للفطريات الأسكية (*ascomycetes*) حيث تأخذ القطعة الطرفية مظهر *spitzentiooper* لتغمرها حويصلات مختلفة الأحجام والكثافة الإلكترونية *electron opacity* وميتوكوندريا منتظمة الشكل *shaped* و الشبكة الأندوبلازمية ومناطق أخرى عاتمة ( *electron opaque*) التي تعكس وجود (*monoglycoproteins*). كما يظهر الجدار الخلوي (*cw*) متجانسا منتظما و يلتصق به داخليا الغشاء البلازمي الممتد بشكل متجانس بدورة هذا الشكل يعكس مرفولوجيا الفطر غير المعامل. بينما تبدى الصورة المجهرية الدراسات المجهرية الإلكترونية الخاصة بالفطر *A. tubigenis* المعامل بـ  $HgCl_2$  تظهر التغيرات المرفولوجية به على مستوى الجدار الخلوي و *plasmolemma* و النظام الغشائي بشكل عام [شكل 47 المقاطع الطولية (B ، D) والعرضية (A) ، (C)] حيث يدمص الـ  $HgCl_2$  و يظهر في صورة مساحة كثيفة حول الجدار الخلوي إذ يمتص بشكل غير متجانس ثم يترسب على سطح الجدار. يظهر انتشار المادة المتفاعلة مع الجدار الخلوي *cw* في صورة ومناطق داكنة (*électron opaque*) و يبدو أنها تلتصق بالطبقة الخارجية من الجدار شكل بينما يخلو منها مناطق الحواجز العرضية (*Sptun*)، وتبتعد الـ *plasmolemma* عن الجدار الخلوي اثر المعاملة بالزئبق بالتركيز (2.5 ppm) ويصاحب هذا عطب و كسور على امتداد في مستويات مختلفة بكل من الجدار و الغشاء البلازمي.

*A. niveus* 2-2-8-2-10-4

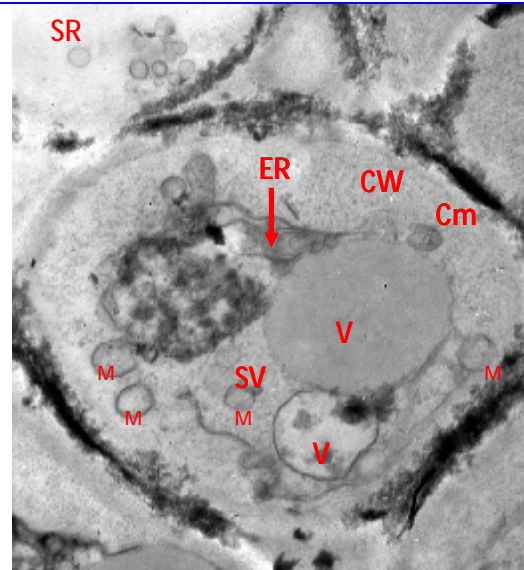


قطاع عرضي في هيفا *A. niveus* غير المعامل بالزنئبق (A)



(C)

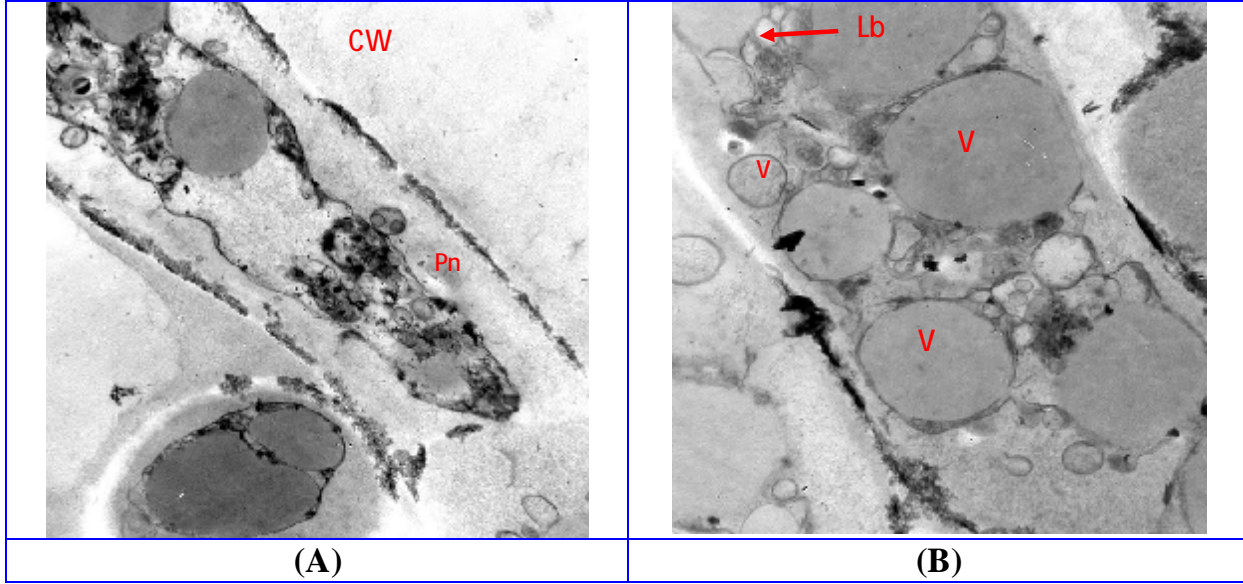
قطاع عرضي في *A. niveus* معاملة بـ 2.5 ppm من الزنئبق



(D)

قطاع عرضي في *A. niveus* معاملة بـ 5 ppm من الزنئبق

شكل 48 قطاع عرضي في هيفا *A. niveus* غير المعامل (A) والمعامل بالزنئبق (B ، C)



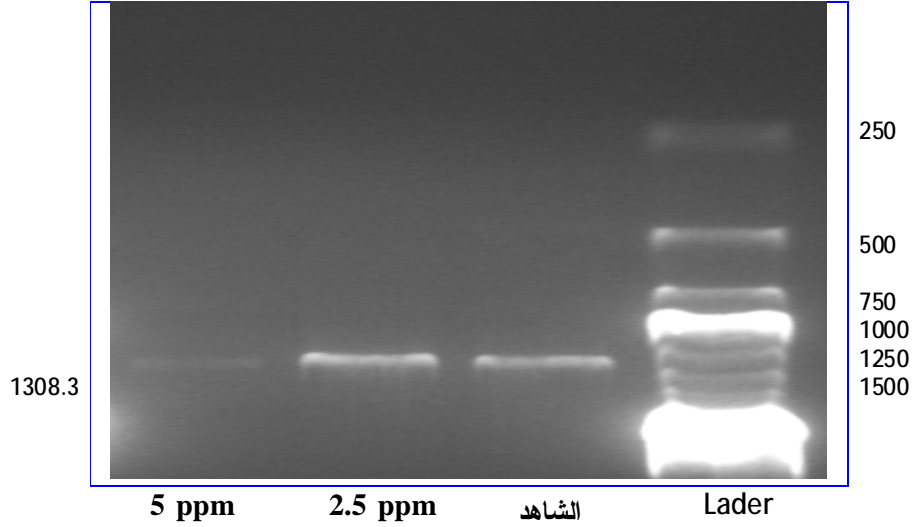
شكل 49 قطاع طولي في هيفا *A. niveus* والمعامل بالزئبق (A ، B)

تبين صور شكل 48 قطاعا عرضيا في هيفا *A. niveus* غير المعامل (A). احتفظت الأغشية الليوبروتية بصورة جيدة وهي تتضمن كل من الغشاء النووي و الغشاء الميتوكوندري و غشاء الشبكة الأبدوبلازمية .والغشاء السيتوبلازمي لا يمكن تمييزه. الحشوة النووية احتفظت بصورة سيئة إذلا يمكن تمييز النوية. المناطق الإلكترونية الشفافة يمكن أن تمثل المساحات التي حدث بها تخريب للمادة النووية أو الأماكن التي قامت مادة بمرنغات البوتاسيوم بتخريبها في الحشوة النووية .الشكل الغير منتظم للنواة يمكن أن يكون نتيجة انتفاخ المادة النووية وفي هذه المناطق لا يوجد وضوح لمساحات كثيفة إلكترونية للهيتيروكروماتين. عند معاملة هذا الفطر بالزئبق فيبدو من المقطع العرضي [ شكل 48 (B ، C)] ومن المقطع الطولي (شكل 49) أن تأثير الزئبق كان أبلغ حيث انفصل الغشاء البلازمي بشكل أوضح وتضاعفت الفجوات العصارية عددا وحجما، كما استهدفت أغشية العضيات خاصة منها الميتوكوندريا ويتجلى ذلك في عدم انتظام أشكالها وفي كثافة الحشوة وغياب الغلاف أو عدم انتظامه بالأحرى، وانعكس هذا الأثر على النظام الغشائي بعدم انتظام معالم النواة وانفتاح مكوناتها على السيتوبلازم لتكون في النهاية ككيس مفتوح من الحويصلات و الفجوات التي ينصهر الكثير منها في نهاية المطاف.

4-10-9- دراسات الـ RAPD-PCR لتأثير الزئبق على فطر *A. niveus* و *A. Tubingensis*

4-10-9-1 فطر *A. tubingensis*

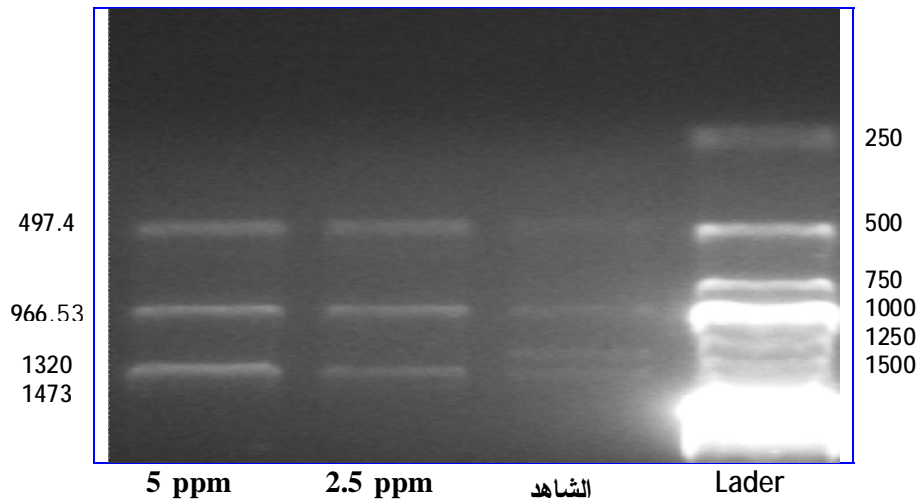
4-10-9-1-1 البادئة Primer 2



شكل 50 تحليل RAPD-PCR لفطر *A. tubingensis* المعامل بالزئبق باستخدام

كبادئة عشوائية Primer 2 : 5'-d (GTTTCGCTCC)

4-10-9-2 البادئة Primer 4

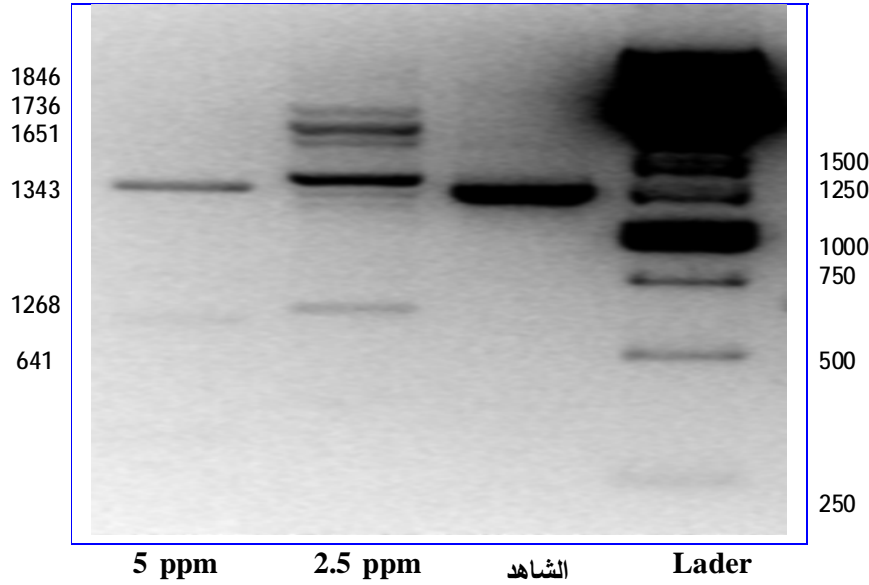


شكل 51 تحليل RAPD-PCR لفطر *A. tubingensis* المعامل بالزئبق باستخدام

كبادئة عشوائية Primer 4 : 5'-d (AAGAGCCCT)

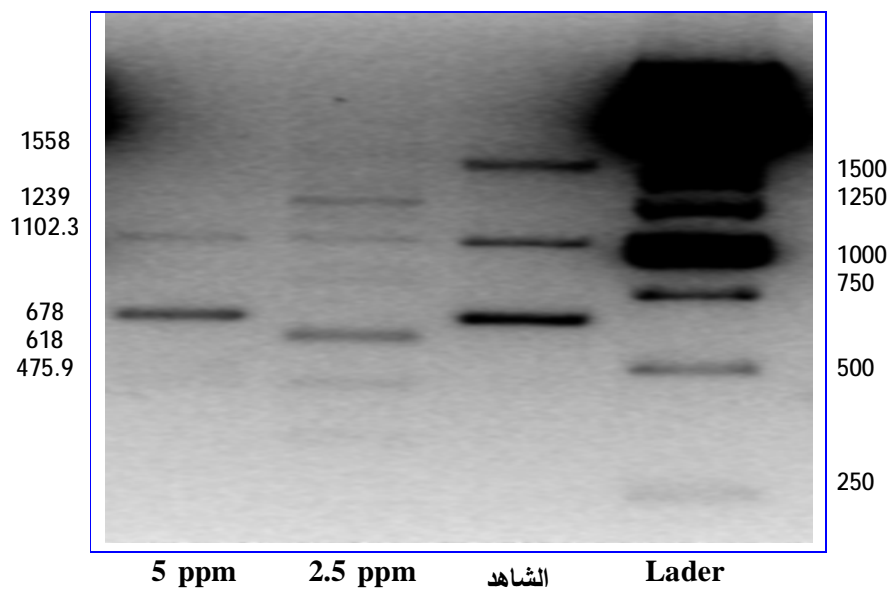
أبرزت البادئة Primer 2 عصابة واحدة في الفطر *A. tubingensis* غير المعامل بالزئبق وزنها الجزيئي 1308.3 bp. وقد ظلت هذه البادئة ثابتة في حالة وجود الزئبق في البيئة المغذية سواء عند التراكيز المنخفضة أو التراكيز المرتفعة (الشكل 50). أما البادئة Primer 4 (شكل 51) فقد أظهرت في هذا الفطر عند عدم معاملته بالزئبق أربع عصابات وزنها الجزيئي على الترتيب 1473 bp ، 1320 bp ، 966.53 bp، 497.4 bp ولكن في حال معاملة هذا الفطر بالزئبق فقد اختفت العصابة 1320 bp بينما ظلت الثلاث الأخر ثابتة سواء عند التركيز المنخفض أو التركيز المرتفع الشكل 51.

**A.niveus فطر 2-9-10-4**  
**Primer 2 البادئة 1-2-9-10-4**



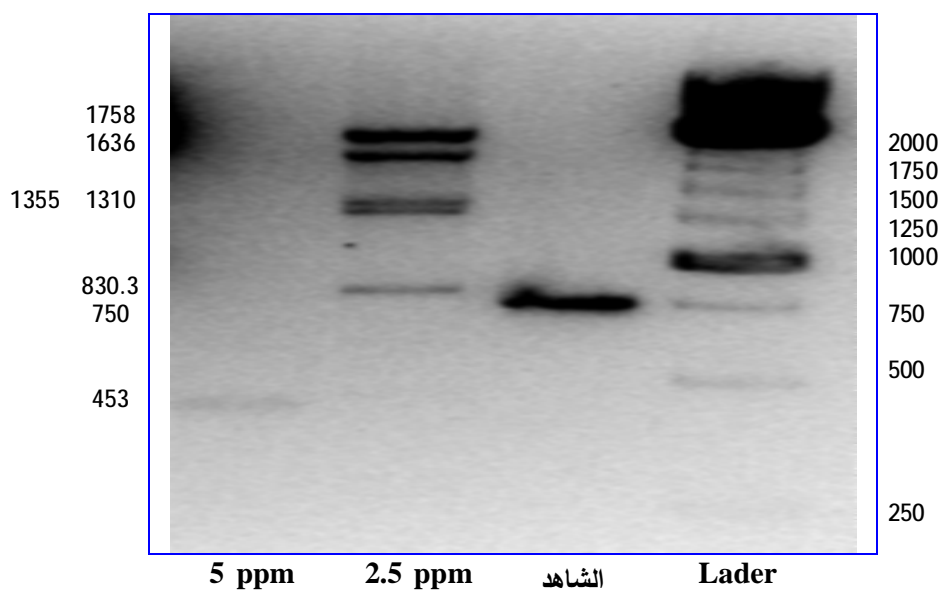
شكل 52 تحليل RAPD-PCR لفطر *A.niveus* المعامل بالزئبق باستخدام  
 كبادئة عشوائية Primer 2 : 5'-d (GTTTCGCTCC)

#### Primer 4 البادئة 2-2-9-10-4



شكل 53 تحليل RAPD-PCR لفطر *A.niveus* المعامل بالزئبق باستخدام  
كبادئة عشوائية Primer 4 : 5'-d (AAGAGCCCT)

#### Primer 6 البادئة 3-2-9-10-4



شكل 54 تحليل RAPD-PCR لفطر *A.niveus* المعامل بالزئبق باستخدام  
كبادئة عشوائية Primer 6 : 5'-d (CCCGTCAGCA)

عند دراسة الفطر *A. niveus* غير المعامل بالزئبق فقد أبرزت البادئة 4 Primer ثلاث عصابات أوزانها الجزيئية على الترتيب 678.2 bp ، 1102.3 bp ، 1558 bp على الترتيب الشكل 53. وعند معاملة هذا الفطر بالزئبق فقد ظلت العصابة 1102.3 bp ثابتة سواء كان التركيز مرتفعا او منخفضا. إلا أنه في حالة تركيز الزئبق المنخفض فقد اختفت العصابتان 678.2 bp و 1558 bp وظهرت ثلاث عصابات جديدة اخرى أوزانها الجزيئية على الترتيب 475.9 bp ، 618.8 bp ، 1239 bp. وبارتفاع تركيز الزئبق فقد ظلت فقط العصابتين 618.8 bp و 1102.3 bp بينما اختفت كل العصابت السابقة الشكل 53.

لم تظهر البادئة 2 Primer في هذا الفطر في غياب الزئبق سوى عصابة وزنها الجزيئي 1343 bp والتي ظلت ثابتة في كل الحالات التي عومل فيها هذا الفطر بالزئبق. إلا أن عند معاملة هذا الفطر بالزئبق فقد حفز التركيز المنخفض ظهور خمس عصابات أخرى أوزانها الجزيئية على الترتيب، 1417 bp ، 1651 bp ، 1736 bp ، 1846 bp بينما حفز التركيز المرتفع عصابة وزنها 641 bp الشكل 52.

أظهرت البادئة 6 Primer في فطر *A. niveus* غير المعامل بازئبق عصابة وزنها 750.7 bp إلا أن هذه العصابة تختفي بوجود الزئبق في البئة المغذية سواء كان تركيزه منخفضا أو مرتفعا، وقد أدت معاملة هذا الفطر بتركيز منخفض من الزئبق إلى ظهور أربع عصابات أوزانها الجزيئية على الترتيب 830.3 bp ، 1355 bp ، 1636 bp ، 1758 bp بينما أظهر التركيز المرتفع عصابة واحدة وزنها 453.3 bp الشكل 54.

#### 4-11 الأدمصاص الحيوي للزئبق

##### 4-11-1 معادلات التعادل الحراري (isothermes)

أجريت دراسة الأدمصاص الحيوي باستخدام منحنيات التعادل الحراري للأدمصاص لكل من Freundlich و Langmuir وتمّ تحديد ثوابت Freundlich و Langmuir من خلال دراسة

$$\text{العلاقة البيانية بين كل من } \frac{C_e}{q_e} \text{ و } \ln q_e .$$



#### 4-11-1-1-1 منحنى التعادل الحراري لـ Langmuir

إنّ منحنى التعادل الحراري للإدمصاص لـ Langmuir يفترض أنّ الطبقة المدمصة سمكها جزيئة واحدة وكل المراكز تكون متساوية مما يؤدي (ينتج عنه) طاقات متساوية و enthalpies الإدمصاص ويعتقد أنّ قوة التجاذب بين الجزيئات تنخفض وتتلاشى بسرعة مع المسافة (29) هذه المعادلة الخاصة بـ Langmuir هي كما يلي:

والصورة الخطية لهذه المعادلة هي:

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{K_L} + \frac{a_L}{K_L} C_e$$

حيث :  $K_L, a_L$  : ثوابت خاصة بمنحنيات التعادل الحراري لـ Langmuir. وتبعاً لمعادلة

$$q_m = \frac{K_L}{a_L} = (\text{mmol/g}) \quad q_m \text{ أقصى سعة الإدمصاص القصوى}$$

#### 4-11-1-2 منحنى التعادل الحراري لـ Freundlich

تتنبأ منحنيات التعادل الحراري لـ Freundlich بأنّ تركيز أيون الهيدروجين في مادة الإدمصاص (adsorbent) يتزايد مع تزايد الأيون في المحلول مثل هذا المنحنى هو صورة أخرى لمنحنى التعادل الحراري لـ Langmuir والذي وضعه للسطوح غير المنتظمة. إنّ الكمية المدمصة عبارة عن مجموع إدمصاص كل المراكز والتي يمتلك كل منها طاقة ارتباط  $q_e = K_F C_e^{b_F}$  حيث  $K_F$  = ثابت Freundlich ،  $b_F$  = أس Freundlich .

الصورة الخطية لهذه الدالة هي:  $L_n q_e = b_F L_n C_e + L_n K_F$

جدول 25 ثوابت نماذج منحنيات التعادل لكل من Langmuir و Freundlich و ثوابت معامل الارتباط

للأنحدر الخطي لإدمصاص الزئبق بواسطة الكتلة الحيوية لفطري *A. tubingensis*

و *A. niveus*

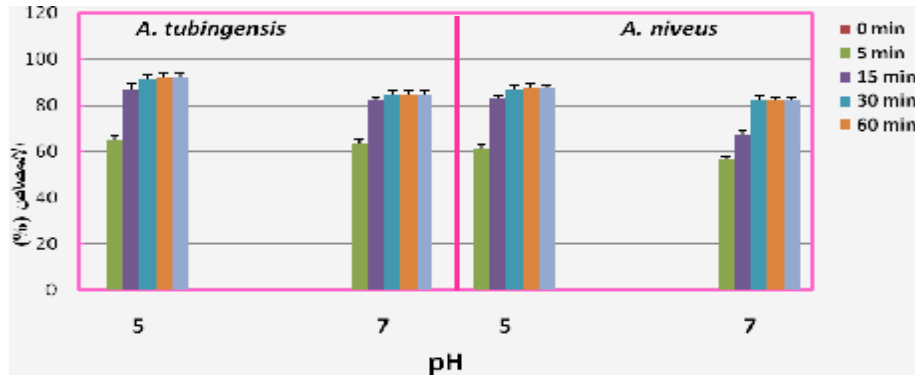
ثوابت Freundlich			ثوابت Langmuir			الفطر	
R	$b_F$	$K_F$	$q_m$ (mmol/g)	R	$K_L$ (mg/g)		$a_L/K_L$ $\frac{4}{x 10^4}$ mol/l)
0.98	1.63	2.11	0.0082	0.89	9.42	121.3	<i>A. tubingensis</i>
0.94	0.93	4.85	0.0790	0.87	12.11	153.15	<i>A. niveus</i>

إنّ الجدول 25 يبين أنّ معادلة Freundlich تعطي وصفاً دقيقاً للمعطيات التجريبية وهذا يؤكد معامل الارتباط لأنظمة التجريبية حيث كان أكبر مقارنة بمعادلة Langmuir وفي حلة الفطرين (0.98، 0.94). إنّ نموذج Langmuir لا يعتبر الأفضل في تفسير النتائج التجريبية المتحصل عليها وفي كل الحالات المدروسة فإنّ منحنى التعادل الحراري كان يعتبر الأضعف والأقل انطباقاً مع معطيات الإدمصاص مقارنة بالآخرين. لعل عدم تلاؤم نموذج Langmuir تلاؤماً جيداً مع المعطيات التجريبية يعود إلى التوزيع غير المتجانس للمراكز النشطة على سطح مادة الإدمصاص وذلك لأنّ معادلة Langmuir تفترض أن السطح متجانس وأنّ كل المراكز لها طاقات إدمصاص متساوية (Ng و آخرون 2002، Ozacar, sengil 2005). سعة الإدمصاص القصوى تم حسابها بعد تحديد ثوابت النموذج Langmuir

$$q_m = \frac{K_L}{a_L} \text{ . باستخدام المعادلة. الجدول 25.}$$

#### 2-11-4 الاستعادة الحيوية للزئبق (Desorption)

##### 1-2-11-4 أثر الأس الهيدروجيني على إدمصاص الزئبق

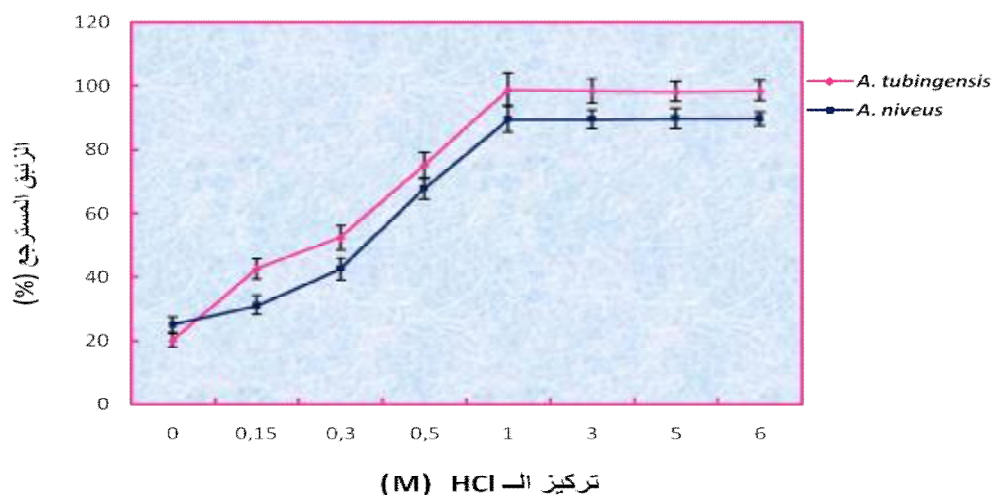


شكل 55 أثر الأس الهيدروجيني على إدمصاص الزئبق بواسطة ميسيليوم فطري *A. tubingensis* و *A. niveus* المعاملين بالزئبق على صورة  $HgCl_2$ .

عند دراسة ارتباط الزئبق بواسطة المدمص الحيوي المتمثل في الكتلة الحيوية للفطرين *A. tubingensis* و *A. niveus* بدلالة للزمن بمحلول 10 ml يحتوي على  $10 \mu g/ml$  عند رقمي الأس الهيدروجيني 5 و 7 يتبين من الشكل 55 أنّ ارتباط الزئبق يكون سريعاً خلال الخمس دقائق الأولى حيث تراوحت نسبة الإدمصاص من 56.4% - 65% من الزئبق الموجود في المحلول، ويكون أقصى إدمصاص خلال الفترة 15-30 دقيقة إذ أنّ الفرق في معدل الإدمصاص بين فترة

30 دقيقة والفترات التي تليها لم يكن معنويا، كما أنّ الإمصاص كان أعلى معنويا عند رقم الأس الهيدروجيني 5 مقارنة برقم الأس الهيدروجيني 7. وعلى هذا الأساس يمكن اعتبار أنّ الفترة 30 دقيقة و رقم الأس الهيدروجيني 5 هما الأفضل في استخدام الكتلة الحيوية للفطرين المدروسين.

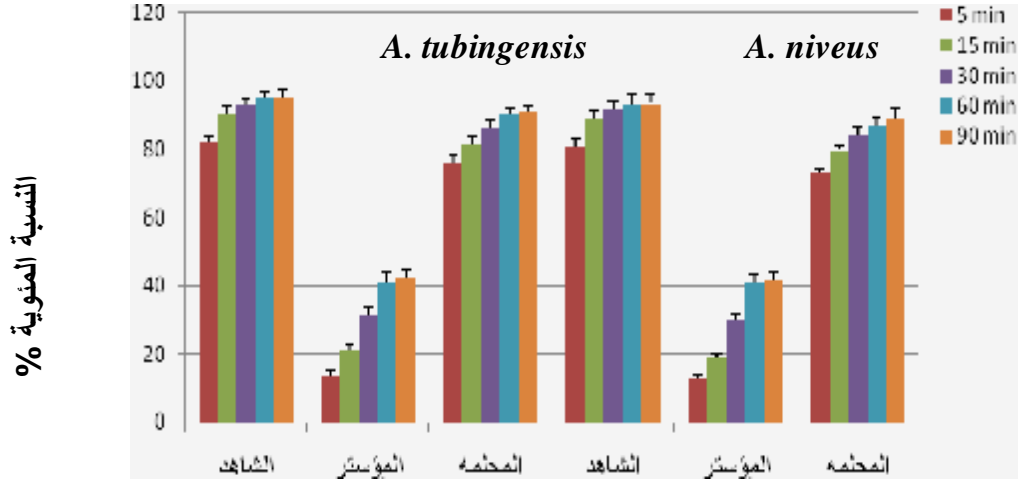
#### 2-2-11-4 إسترجاع الزئبق



شكل 56 نسبة إسترجاع الزئبق بواسطة ميسيليوم فطري *A. tubigensis* و *A. niveus* المعاملين بالزئبق على صورة  $HgCl_2$ .

يتضح من الشكل 56 الذي يبين نتائج دراسة استرجاع الزئبق من الكتلة الحيوية للفطرين *A. tubigensis* و *A. niveus* بدلالة تركيز الـ HCl أنّ تركيز 1M HCl كان له القدرة على استعادة أكثر من 90 % من الزئبق المدمص في حالة فطر *A. tubigensis* وأكثر من 80 % من الزئبق المدمص في حالة فطر *A. niveus*، ثمّ تظل بعد ذلك نسبة تحرر الزئبق ثابتة مع زيادة تركيز الـ HCl.

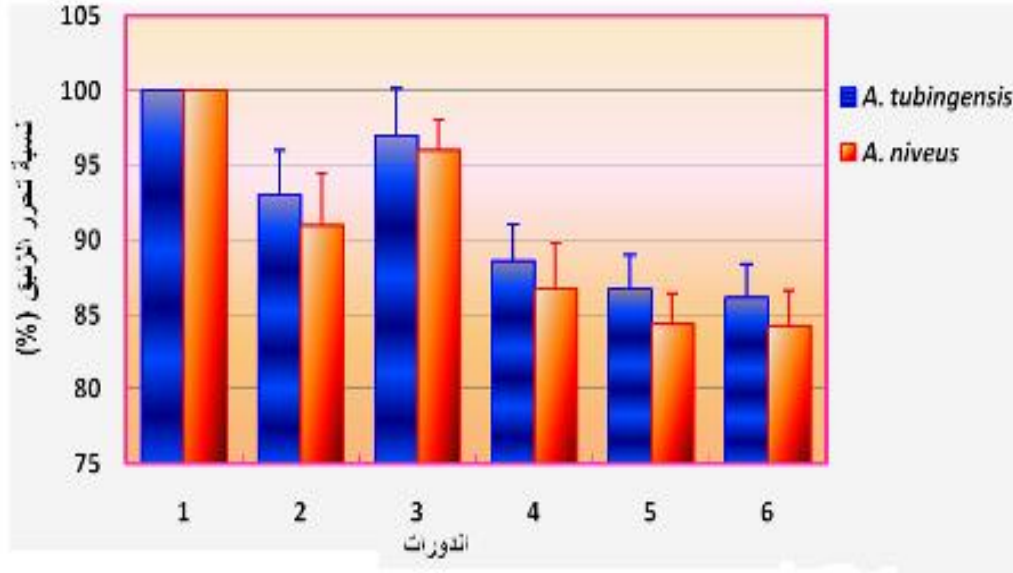
#### 3-3-11-4 دور المجاميع الكربوكسيلية في ادمصاص الزئبق



شكل 57 نسبة إسترجاع الزئبق بواسطة الكتلة الحيوية المؤسّتر والمحلّمة لفطري *A. tubingensis* و *A. niveus*

للبحث عن احتمال إمكانية تدخل المجاميع الوظيفية الكربوكسيلية للكتلة الحيوية للفطرين المدروسين في الارتباط بالزئبق المدمص فقد تمّ أسترة هذه المجاميع الكربوكسيلية بالميثانول واخضاعها لعملية ادمصاص الزئبق واسترجاعه؛ وبعد ذلك أجريت عملية تحلل مائي للمجاميع المؤسّتر باستخدام NaOH واخضاعها ثانية لعملية ادمصاص بالزئبق واسترجاعه؛ وقورنت النتائج المتحصل عليها مع الشاهد. تبدي النتائج المتحصل عليها والمبينة في الشكل 57 انخفاضاً شديداً في تحرر الزئبق من الكتلة الحيوية المؤسّتر للفطرين *A. tubingensis* و *A. niveus*. عندما أعيد إجراء عملية التحلل المائي ثانية لمجاميع الكربوكسيل المؤسّتر فقد لوحظت استعادة شبه كاملة لسعة تحرر الزئبق مما يوحي بوجود دور هام لمجاميع الكربوكسيل في عملية ارتباط أيونات  $Hg^{2+}$ .

#### 4-2-12-4 أثر الاستعمال المتجدد للكتلة الحيوية على كفاءة ادمصاص الزئبق



شكل 58 أثر تجديد الكتلة الحيوية لفطري على ادمصاص الزئبق *A. tubigenensis* و *A. niveus*

بغرض استقصاء امكانية الاستعمال المتجدد للكتلة الحيوية للفطرين *A. tubigenensis* و *A. niveus* في ادمصاص الزئبق فقد اجريت 6 دورات من عملية ادمصاص/الاسترجاع (adsorption/desorption)، وتمت عملية تلميص أيونات  $Hg^{2+}$  باستخدام 1M HCl والذي تبين سابقا (شكل 56) أنه يمثل أفضل تركيز لاسترجاع الزئبق. تغسل الكتلة الحيوية جيدا بالماء المقطر ثم يعدل رقم الأس الهيدروجيني إلى 5 لأنه أعطى أفضل نسبة ادمصاص (شكل 55) ثم تجرى الدورة الموالية. تبين النتائج المتحصل عليه والمدونة بالشكل 58 أن سعة الإدمصاص القصوى لأيونات  $Hg^{2+}$  تكون خلال الدورة الثالثة ثم تبدأ في الانخفاض ابتداء من الدورة الرابعة.

# والمناقشة

## 5- المناقشة

### 5-1 الزئبق في التربة

تطابق تحليل المكونات الرئيسية (APC) شكل B10 مع عملية تصنيف التربة على أساس القوام حيث توزعت المواقع المدروسة في ثلاثة مجاميع رئيسية متباينة (طينية، طمية طينية رملية، وطمية سلتية). وتميزت هذه التربة في مجموعها بسعة تبادلية كاتيونية متوسطة ومحتوى منخفض من المادة العضوية حسب MCF (1974). واتضح من خلال هذا التحليل أن الـpH يمثل أهم العوامل التي تتحكم في سلوك الزئبق بتربة المنطقة المدروسة. ولعله نتيجة لعمليات صهر الـHgS في الماضي فقد أدى انتشار غاز الـSO<sub>2</sub> من مدخنة الفرن وتوضعه في المناطق المجاورة إلى زيادة حموضة التربة لذا كانت تربة المواقع الأقرب من المصنع أكثر تأثراً بالتوضع الحمضي وعمليات التآكل الطبيعي مقارنة بتربة المواقع الأبعد.

حسب Steinnes (1997) فإنه عند قيم pH التي تتحصر بين 4.6-6.86 فإن كل من أكاسيد الحديد والطين المعدني تساهم بكفاءة في إدمصاص أيونات الـHg<sup>2+</sup> ويكون أقصى إدمصاص عند pH=7. أما عند 4.6-4 pH فيتوقع أن تكون المادة العضوية هي المسؤول الأول عن إدمصاص الزئبق (Do Valle وآخرون، 2005).

يبدو أن فترة استخلاص الزئبق الطويلة قد خلفت كميات هامة من الزئبق تراكمت على مستوى الطبقة السطحية للتربة وأن الزئبق الذي تراكم خلال هذه الفترة ظلّ شديد الثبات وقليل الذوبان ومقيد الحركة نحو الأسفل. وقد تطابق هذا مع ما لاحظته Tomiyasu (2003) من تراكم للزئبق البركاني على مستوى عمق الـ 5 سم الأولى من الطبقة السطحية واحتفاظ الطبقة تحت السطحية بتراكيز التخليق الصخري الأصلية ومع ما أبداه Biester وآخرون (2002) في دراسته لتربة ثلاث مناطق مختلفة تتعرض للتلوث بالزئبق من مصانع الصودا والكلور بأوروبا. كما أوضحت بحوث أجريت على تربة رملية بجنوب إفريقيا ملوثة بالمخلفات الصناعية أن الزئبق يتم تقييده على مستوى الطبقة السطحية (Macnab وآخرون، 1997). وبين Biester وآخرون (2002) أن الهجرة العمودية للزئبق تقل في التربة ذات المحتوى العالي من الطين.

في الوقت الذي يعتبر فيه كل من محتوى الطين والكربون العضوي أهم العوامل التي تحدد احتباس المعادن الثقيلة التي تظهر في صورة كاتيونات (Cu،Pb، Zn) فإن أغلب الكيمياء البيئية للزئبق تكون شديدة التعقد، إذ تتدخل العديد من الآليات في تنظيم الارتباط بالزئبق (Tack وآخرون، 2005). فمثلاً إن احتباس الزئبق في التربة لا يكون فقط من خلال الإدمصاص الأيوني للتكافؤ النوعي في المواد العضوية وغير العضوية ولكن ممكن أيضاً أن يتم تنظيمه بواسطة تكوين روابط تساهمية مع

المركبات العضوية أو بواسطة الترسيب على صورة كربونات أو فوسفات أو كبريتيد والتي تكون شديدة الثبات وغير قابلة للذوبان (Adriano وآخرون، 1995).

يقترح العديد من الباحثين أنّ المادة العضوية تلعب دوراً رئيسياً هاماً كحامل رئيسي للزئبق في التربة (Takashi وآخرون، 2003). إلا أنّ التغيير العمودي لنسبة المادة العضوية لم يكن له أي ارتباط مع تركيز الزئبق الكلي في التربة المدروسة. ولعل هذا يمكن أن يعزى إلى الدورات الزراعية المتكررة في المواقع المدروسة وإلى الظروف المناخية السائدة خاصة عملية تبادل الفصول الرطبة والجافة والتي تساهم في زيادة سرعة معدل تعمدن المادة العضوية. كما أنّ التوضع الحمضي للـ  $SO_2$  الذي قد يؤثر على خواص التربة يمكن أن يؤدي إلى هدم جزء هام من المادة العضوية. وقد يكون لعملية التجزؤ الفيزيائي للمادة العضوية مثل التحلل والإدمصاص وعملية الميثلة الميكروبية اللاهوائية للزئبق دوراً هاماً في انخفاض الزئبق بالطبقة تحت السطحية (Schuster، 1991). أشار Trost و Bisque (1972) إلى أنّ السعة الإدمصاصية للمواد الغنية بالدبال تكون أكبر مقارنة بالطين. إلا أنّ مراجعة هذه النتائج من قبل Fang (1978) و Landa (1978) بينت أن كمية المادة العضوية وحدها ليست محددة لسعة إدمصاص معدن الزئبق ولكن أيضاً نوعية المادة العضوية ذاتها. وقد تبين هذا فيما بعد من خلال مقارنة إدمصاص التربة مع محتوى الدبال للزئبق في أراضي ذات غطاءات نباتية متنوعة (Hissler وآخرون، 2006).

حسب Gotoh وآخرون (1978) فإنّ جزءاً من المعادن ثنائية التكافؤ بالتربة يكون متحدّاً في معقدات مرتبطة مع المادة العضوية، ووجود المعدن يجعل المادة العضوية في المعقد غير قابلة للذوبان في محلول التربة؛ وهذه المعقدات الثابتة يعتقد أنها تتكون من خلال ارتباط الزئبق مع مجاميع الكاربوكسيل (COOH) ومجاميع الهيدروكسيل الفينولية للمركبات الدبالية خاصة حمض الهيوميك (humic) وحمض الفلفيك (fulvic)، وبعد هذا الارتباط فإنّه ولا معدن بما في ذلك النحاس الذي يكون أشد المعقدات ثباتاً لأيونات المعادن الثنائية يستطيع أن يستبدل مع الزئبق عندما يصبح هذا الأخير مرتبطاً مع أمحاض الهيوميك والفلفيك. إن اتحاد الزئبق يمكن أن يتم بكفاءة بواسطة الأحماض الأمينية والبروتينات المحتوية على مجاميع الكبريت والتي تمثل أحد المكونات الشائعة في المادة العضوية ولعل هذه الآلية هي السبب الرئيسي لحركية الزئبق في التربة في حالة الـ pH المرتفع. تشير العديد من المراجع إلى أنّ تركيز الزئبق في التربة يتأثر بمحتواها من الطين وتوجد في الكثير من الحالات علاقة خطية بينهما (Schuster، 1991)؛ إلا أنّ غياب الارتباط بين محتوى الطين والزئبق الكلي يقوي احتمال أنّ المعقدات العضوية للزئبق قد تكون مدمصة ضمن حبيبات الطين. أي أنّ الزئبق في التربة المدروسة لا يكون مرتبطاً بصورة مباشرة بالطين؛ وبعد هدم المادة العضوية أثناء دراسة قوام التربة تحرر الزئبق مع المادة العضوية المتحللة وقد تجلّى ذلك في الارتباط المنعدم بين كل من الزئبق ومحتوى الطين. إنّ الارتباط الطردي العالي للزئبق من جهة أخرى مع محتوى الرمل ( $r = 0.71$ ) قد



يُوحى أنّ الصور غير العضوية هي الأكثر سيادة في هذه التربة وعُضد هذا بحوث سابقة أُجريت في المنطقة بينت أنّ الزئبق الموجود في المنطقة يكون في أغلبه مترسبًا على صورة كبريتيد الزئبق (Kakeliya وآخرون، 1976).

إنّ طريقة تقدير المحتوى الكلي للزئبق تعطي صورة عن الاحتياطي العام لهذا المعدن الذي يمكن أن تتحرر منه الصور الميسرة للكائنات الحية في ظل النشاط الميكروبي المتاح والخواص الكيميائية والفيزيائية السائدة في التربة ولكن لا تعطي أي فكرة عن الصور الميسرة والتي تمثل المصدر الحقيقي للتلوث البيئي بالتربة.

عادة يعتمد في تقييم التلوث البيئي للتربة على المعدلات المرجعية للمنطقة المدروسة ولكن نظرا لعدم وجود أي معدل مرجعي رسمي للزئبق سواء على مستوى المنطقة أو على مستوى الوطن فقد اعتمدنا في تقييمنا للتلوث بالزئبق على المقارنة بالحد الأدنى المسموح به لتربة المنطقة قيد الدراسة. وبما أنّ الصور الذائبة للزئبق في محلول التربة كانت كلها دون الحد الأدنى للقياس فقد اعتمدنا في المقارنة على الحد الأدنى المسموح به للزئبق الكلي وبالتالي نعتبر التربة ملوثة في المواقع التي يتجاوز بها تركيز الزئبق الكلي في التربة الحد المسموح به للمنطقة.

على هذا يمكن اعتبار أنّ تربة الطبقة السطحية للمواقع القريبة من بقايا المصنع (المواقع 1-6 وكذا الموقع 16) لا زالت تحت تأثير التلوث بالزئبق رغم مرور ثلاث سنوات على غلق المصنع لاحتوائها على تراكيز أعلى من الحد الأدنى المسموح به ( $1.16 \mu\text{g}$ ) جدول 4؛ ولعل هذا يعزى إلى المخلفات الصلبة والتي لازالت عرضة لتأثير العوامل المناخية المختلفة؛ على حين تعتبر بقية المواقع خارج مجال التلوث. إلا أنّ تركيز الزئبق بتربة هذه المواقع لا يشكل خطرا كبيرا ويمكن اعتماد هذه المواقع للزراعة لكون أنّ الصور الذائبة للزئبق كانت منخفضة جدًا ودون الحد الأدنى للقياس.

## 5-2 تأثير الزئبق على توزيع مجاميع فطريات التربة

عدد كبير من الفطريات ومن مختلف المجاميع والأصناف يمكن ان يوجد في البيئات الملوثة بالمعادن . وعموما فإنّ المعادن السامة يمكن أن تؤثر على المجاميع الفطرية من خلال اختزال انتشارها واختزال تنوع الأنواع، وانتخاب المجاميع المتحملة/ المقاومة. في الحقول المزروعة الأرز الملوثة "Zn, Cu, Cd" فإن المدى النسبي للتحمل الذي تبديه الميكروفلورا كان على الترتيب التالي فطريات/ بكتيريا/ أكتينومييسات (Hiroki وآخرون، 1992). بينما يمكن ان يؤخذ بعين الاعتبار الفروق الفردية بين الأنواع والسلالات في الاستجابة فإنه في الغالب يقبل أن الفطريات أقل حساسية للتلوث المعدني من البكتيريا (Doelman، 1985). إلا أنّ تأثير المعدن السام على الانتشار الميكروبي في البيئات الطبيعية يتغير حسب صور المعدن والكائن الموجود ويعتمد أيضا على تغير العوامل البيئية (Gadd و Griffithis، 1978). سجل اختزال عام لعدد الفطريات سجل في التربة

الملوثة بكل من Cu ، Cd ، Pb ، As ، Zn إلا أن التقدير العددي لوحده لا يمكن أن يعطي معلومات صحيحة لامكانية حدوث تغير في المجاميع الفطرية وفي الأنواع والذي يجب أن يؤخذ في عين الاعتبار. توجد العديد من الدلائل على امكانية حدوث تغير في الاستجابة عند التعرض للمعدن، ففي التربة الملوثة بـ Zn, Cu مثلا فإن *Geomyces* و *Paecilomyces* وبعض الصور العقيمة وجد أنها تزيد مع زيادة التلوث بينما عدد أطباق الـ *Penicillium* و *Oidodendrin* تنخفض في الأماكن الملوثة (Nordgren، 1988). إن فطريات *Trichoderma* ، *Tricherma hanatum* ، *Zygorrhynchus moelleri* ، *chryso sporium pannrum* ، *asperum* ، إذ عزلت بترداد أكبر في خليج أخضر حديث معامل بمركبات الزئبق العضوية مقارنة بالأماكن غير المعاملة، بينما أنواع كل من *Penicillium* ، *Chaetomium* ، *Paecilomyces* ، *Fusarium* فقد اختزلت كثيرا (William و Pugh ، 1975) . احد أحسن الأمثلة على تحمل المعادن وجد ضمن أفراد من جنس *Penicillium* التي تؤكد أنّ الاستجابة للمعدن تكون نوعية حسب السلالات (Strain-specific)، ففطر *Penicillium ochrochloum* يستطيع النمو في محلول مشبع من  $CuSO_4$  (Gadd وآخرون، 1984) و *Penicillium lilacinium* يسود الفطريات بالتربة الملوثة بصرف المناجم الحامضي (Tatsuama وآخرون، 1975). درس Smith (1977) تأثير المعادن الثقيلة على فطريات النامية على سطح النباتات ووجد أنّ فطريات *Phialophora verrucosa* ، *Epicoecum sp* ، *Aureobasidium pullulans* ، كانت جد متحملة بينما فطريات *Gnomia* ، *Cladosporium sp* ، *platini* ، *Pleurophomella sp* أبدت تحملا متوسطا وأما الأنواع التابعة لكل من *Pestalotiopsis* و *Chaetomium* فكانت حساسة. الفطريات التي تتحمل الزئبق تمّ عزلها من سطح البذور المعاملة بمركبات الزئبق وتشمل كل من *Pyrenophora avenae* ، *Penicillium crustosum* ، *Cladosporium cladosporates* ، *Syncephalastrum racemosam* ، *Ulocladium atrum* (Ross 1975).

مما سبق يتضح ان تركيز المعادن يمكن ان يؤثر على كل من التركيب الكمي والنوعي للمجاميع الفطرية إلا أنه يصعب كثيرا فصل تأثيرها عن تأثير المحيط. واضح أن بعض الفطريات تبدي تحملا هاما للمعادن السامة وبذلك تسود باقي الكائنات الدقيقة في بعض المواطن، إلا أنّ تنوع الأنواع يمكن أن يختزل في بعض الحالات؛ وكل من المقاومة والتحمل يمكن أن يظهر في فطريات من المناطق الملوثة وغير الملوثة، يختزل عدد الفطريات ويحدث اضطراب في تركيب الأنواع في تربة ملوثة مجاورة لمصنع الزنك، إلا أنه وجد فرق في تحمل الزنك في الفطريات المعزولة من الأماكن الملوثة وأغلبها يتحمل ويبيدي 50% من النمو عند تراكيز  $700 \mu M$  من الـ Zn (Jordan و Lechevalier، 1975). في دراسة أخرى تبين أنّ المجاميع الفطرية في التربة الملوثة بكل من Ni ، Cu ، Fe ، Co لم توجد فروق معنوية بينها وبين الأماكن الشاهد. أمكن عزل الفطريات المتحملة

لكل من Cu و Ni (إذ تتحمل 1,6 mM من Cu و Ni) ومن الأماكن الملوثة، والفطر الأكثر سيادة هو (60%) *Penicillium* متبوعا بالأجناس *Trichoderma*، *Rhodorula*، *Oidodendron*، *Mucor*، *Mortierella*. أكد فحص الفطريات الدقيقة المعزولة من تربة الغابات الملوثة وغير الملوثة أنها كانت دائما متحملة للنحاس إلا أنه يوجد تأقلم واضح نسبي لدى الأنواع التي تعرضت لفترة قصيرة أو طويلة من التلوث (Arnebrant، 1978). مثل هذه الدراسات تبين أنه في العديد من الحالات فإن حياة الفطر تعتمد أساسا على الخصائص الداخلية الذاتية للكائن أكثر من التعديلات التأقلمية والتي تدرس غالبا في ظروف المختبر. إن الخصائص الفيزيائية والكيميائية للمحيط والتي تتضمن أيضا التغيرات المرافقة للتلوث بالمعدن يمكن أن تؤثر على سمية المعدن وبالتالي تؤثر على تركيب الأنواع (a 1993).

تبين النتائج المتحصل عليها أن فطري *A. tubingensis* و *A. niveus* يستطيعان تحمل الزئبق في الصورة غير العضوية و يمكنهما أن ينموا و يتكاثرا مع وجود معدلات من هذا العنصر في نسيجهما. نتيجة انتشارها وقدرتها على تركيز الزئبق في أجسامها فإن دور الفطريات في ميثابولزم الزئبق في البيئة هام جدا ويستدعي دراسات مستقبلية.

بالرغم من أن معدلات الزئبق في البيئة عادة تكون أقل من 0.5 ppm، فإن الفطريات تستطيع تمرير كميات هامة من الزئبق إلى الإنسان؛ وخاصة عندما تكون ضمن السلسلة الغذائية. رجح Greenaway (1971) أن القدرة على المقاومة تعود إلى إنتاج صبغة لها القدرة على الارتباط بالزئبق ويتوقع أن ذلك يتم عن طريق المخلبة. إن بعض الفطريات تستخدم في إنتاج البروتين المأكول من المخلفات السليولوزية وهذا البروتين المستخلص من الفطريات يمكن أن تغلف به الحيوانات أو يتناوله الإنسان وهذه المخلفات السليولوزية والتي يمكن أن تحتوي على الزئبق أو بعض المعادن الأخرى يمكن أن تمتص وتتركز من قبل الفطريات، بعض من الزئبق يمكن أن يرتبط بالبروتين في خلايا هذه الفطريات.

إن تداخل المعادن الثقيلة مع المسارات التكاثرية والأنزيمية والفيزيولوجية للفطريات يكون له نتائج على المستوى البيئي. إن إيقاف النمو أو التكاثر في وجود المعادن يؤدي إلى حدوث تغيرات في بنى العشائر ويسبب فعل المعادن الثقيلة على النشاطات الأنزيمية تأثيرا على تدفق الطاقة داخل النظام البيئي، لذا ليس من المفاجئ أن الأنواع المختلفة للفطريات تتميز في درجة تحملها للمعادن الثقيلة. من بين 15 نوعا من فطريات عفن الخشب التي درست من قبل Baldrian و Gabriel (1997) فإن *Innotus obliquus* كان الأكثر حساسية للزئبق و بينما فطر *S. hirsutum* كان الأكثر الأنواع تحملا للزئبق. وقد لوحظ أن الزئبق يعمل على زيادة فترة Lag إضافة إلى اختزال معدل النمو الفطري (Mandal وآخرون، 1998). من بين الفطريات التي تم اختبارها من قبل Palmans وآخرون (1995) فإن *T. versicolor* كان مقاوما لكل المعادن الثقيلة المدروسة بما فيها Hg بينما الأنواع

الآخري كانت أقل مقاومة. أشار Baldrian (2003) إلى أنّ الاختلاف في تحمل الفطريات للمعادن الثقيلة قد يظهر على مستوى السلالات التابعة لنفس النوع. و من جهة أخرى فقد بينت التجارب المخبرية أنه يمكن ترويض بعض الفطريات وتحويلها إلى أنواع قابلة لتحمل تراكيز عالية من المعادن الثقيلة. لذا يبدو أنه لا يوجد انتخاب طبيعي للسلالات المقاومة للمعادن في الأماكن والبيئات الملوثة، إلا أنّ هذا الوضع قد يكون مختلفا في التربة حيث قد يكون تركيز المعادن عاليا. حيث أنّ مسار التأقلم مع الإجهاد بواسطة المعادن يكون حتما مرفوقا باستعداد الأنواع الفطرية الحساسة للمعادن. وهذا لا يقتصر على الفطريات فحسب بل يشمل كل الكائنات الدقيقة الموجودة في التربة. إذ أنّ إضافة المعادن الثقيلة تؤدي أيضا إلى إحداث تغيرات في النشاط الأيضي للكائنات الدقيقة والذي يتمثل في انخفاض تركيز الـ ATP و معدل التنفس ( Frostegard وآخرون، 1993)، إنّ العديد من الأنزيمات التي تفرزها الكائنات الدقيقة تساهم في تدوير المواد والمغذيات الموجودة بالتربة وبالتالي فإنّ معدل تحول هذه المواد يتم تعديله عند إضافة المعادن الثقيلة للتربة وذلك لأنها تؤثر على نشاط الأنزيمات الخارج خلوية ( Baldrian، 2003).

معروف أنّ الفطريات تمتلك قدرة على تراكم المعادن في أجسامها لذا فإنّ أغلب الدراسات التي أجريت على التراكم بواسطة الفطريات ركزت على عملية إزالة التسمم والتعافي من بعض المعادن الملوثة للمياه من خلال استخدام الفطريات كمد مصات حيوية. و قد فضلت الفطريات عن باقي الكائنات الدقيقة لقدرتها العالية على تحمل المعادن والظروف البيئية الأخرى المعاكسة مثل الـ pH المنخفض. أشار Tobin و آخرون (1984) إلى أنّ *Miscelium* فطر *Rhizopus arrhizus* له القدرة على تخزين و تراكم عدد كبير من الأيونات المعدنية هذه الملاحظات توحي أنّ الفطريات يمكن أن تؤثر على الحركة الكلية للمعادن في الأنظمة الأرضية خاصة وأنّ الفطريات تكون جزء هام جدا من الأسطح العضوية للتربة ( مثلا  $0.14 \text{ g/m}^2 <$  من التربة) كما بين ذلك Soderstrom (1979). تتكون الجدر الخلوية للفطريات من البروتينات والدهون وعديدات السكاكر التي تحتوي على مجاميع وظيفية له القدرة والقابلية على تكوين معقدات مع المعادن. وتختلف الأنواع الفطرية في التركيب الكيميائي لجدرها الخلوية مما ينتج عنه تغير معنوي في قابلية الامتصاص بين الأنواع و السلالات وأحيانا بين الخلايا المكونة لنفس الجسم (krantz-Rülker و آخرون، 1996).

بالرغم من أنّ تجارب تراكم المعادن الثقيلة يمكن أن تدلي بمعطياتها حول القدرة الامتصاصية للفطريات فإنها لا تعكس بشكل دقيق ما يحدث في حالة الظروف الطبيعية. ففي البيئة السائلة مثلا في حالة *Volvariella volrrea* فإنّ Cu يمتص بأفضلية بينما كل من Pb, Hg يمتص بأقل معدل. أما عند تنميته على بيئة تحتوي على القمح فإن أعلى امتصاص للأجسام الثمرية سجل في حالة Pb و أقل معدل كان في حالة Cd.

إنّ الآلية الجزئية لتراكم المعادن في الفطريات لا زال يكثرثها بعض الغموض في بعض الفطريات، فإنّ أنظمة النقل في حالة امتصاص المعادن الأساسية توجد على مستوى الغشاء الخلوي. أما المعادن غير الأساسية فعادة يتم امتصاصها عن طريق النقل المرافق باستخدام نفس الناقلات وذلك بسبب نوعيتها المنخفضة.

إنّ تراكم المعادن في الفطريات قد يكون مرتبطاً أو غير مرتبط بالمسارات الأيضية ( Gadd، 1988). إذ أن أغلب الكتلة الحيوية في التربة تكون عرضة للتحديد (limitating) والتأثر بكمية المغذيات المحددة. لوحظ امتصاص تماثل للفطريات المدروسة سابقا سواء في حالة starvation أم لا لكل من Zn, Cd, Hg قيم الـ pH المدروسة مما يشير إلى أن حدوث سيادة الامتصاص السلبي (passive) للمعادن على السطح الخلوي للفطر.

كان يعتقد سابقا أن تراكم المعادن في الفطريات الخيطية يعزي أساسا مسارات التراكم على السطح ( Gadd، 1988)، وأنّ الامتصاص المرتبط بأبيض الكايتونات غير معنوي. إلا أن النشاط الأيضي للفطريات الذي يحدث خلال عملية إنتاج الأيضات العضوية يلعب دورا هاما جدا في تنوع المعدن وتيسره الحيوي للمعادن (Townley و Ross، 1986).

أعزى (krantz-Rülker و آخرون، 1996) التراكم المنخفض للزئبق في فطر *Penicillium spinulasum* إلى احتمال ارتباط مركب يوجد على مستوى الجدار مع الزئبق و تكوين معقد و لكن هذا المعقد يتحرر من الجدار الخلوي. و قد أشار كل من Higham و آخرون (1984) غير أنّ الكائنات الدقيقة يمكن أن تفرز عوامل تعقيد تتفاعل مع المعادن تختزل بها تركيز الأيونات الحرة للمعادن في المحلول كآلية لإزالة التسمم، ففي حالة فطر الميكوريزا الخارجية *Paxillus involutus* فإنّ امتصاص Cd يتضمن ارتباط سريع بالجدار الخلوي ونقل بطيئ بواسطة حامل وسطي إلى داخل الخلية. إنّ الامتصاص يعتمد جزئيا على الاقتدار الغشائي ويكون مرتبطا بنقل الكالسيوم. على المستوى العضيات الخلوية فإنّ 50% من المعدن يكون مرتبطا بالجدار الخلوي و 30% تبقى في السيتوبلازم و 20% تنقل إلى الفجوات العصارية (Blaudez و آخرون، 2002).

### 3-5 التأثير على فيزيولوجيا الفطريات

بعد دخول المعادن الثقيلة إلى الخلية الفطرية فإنها تؤثر على كل من التفاعلات الفردية وكذا مسارات الأيض المعقدة، ويمثل النمو الظاهرة المعقدة الأكثر دراسة من حيث عملية التسمم بالمعادن الثقيلة. تؤدي إضافة 0.05 - 0.25 mM من الزئبق لبيئات نمو الفطر *Phanerocheate chryso sporium* إلى انخفاض معدل النمو، وفي حالة التراكيز المرتفعة يبدأ تحلل الميسليوم ويكون ذلك مرفوقا بانخفاض المحتوى البروتيني للميسليوم (Dhawale و آخرون، 1996). كما يسبب الزئبق

سمية عالية جدا بالنسبة لفطر *S. hirsutum* وكان المعدن الأكثر سمية في حالة فطر *Ganoderma K luidum* إن انخفاض معدل النمو يكون في بعض الحالات مرفوقا بزيادة المرحلة lag phase. فقد لوحظ زيادة مدة مرحلة الـ lag phase في حالة فطر *Pycnoporus cinnabarinus* النامي على بيئة محتوية على الزئبق (Mandal وآخرون، 1998). كما تؤثر المعادن الثقيلة على مرفولوجيا الميسليوم، إذ أن انخفاض معدل نمو الفطريات الناتج عن تأثير المعادن الثقيلة عادة يكون مرفوقا بتغيرات مرفولوجية للميسليوم النامي. إن نقل فطر *S. commune* إلى بيئة صلبة تحتوي على Cd يؤدي إلى زيادة تكوين الهيفات الهوائية وتغيرات مرفولوجية في بعض قطع نمو الهيفات. كما تظهر خيوط ضامة وعري مع زيادة تفرع الهيفات. إن امتداد هذه التغيرات يعكس التركيز المتزايد للمعدن K إن الجسيمات الكروية لفطر *D. quercia* النامي في بيئة سائلة محتوية على Cd تمثل مظهر غير منتظم وقصير لسطح الهيفا ويكون سطحها أملسا في البيئات المحتوية على Cd (Gabriel وآخرون، 1996).

إن التغيرات المرفولوجية الناتجة عن المعادن الثقيلة تكون عامة في كل المجاميع الفطرية. إن إضافة Cd إلى بيئة الفطر الميكوريزي الخارجي *P. involutus* تؤدي إلى زيادة كثافة الهيفات الناتجة عن زيادة عدد نقط التفرعات الجانبية وانخفاض المسافات بين هذه النقط التقريعية. إن المزارع الفطرية النامية في وجود المعادن الثقيلة يمكن أن تغير من لونها، فمثلا فطر *S. hirsutum* ينتج صبغة صفراء خارج خلوية وداخل الميسليوم عند تنميته في وجود 0.25 mM أو أكثر من Cd (Baldrian وآخرون، 1996)، وأثناء زرع *S. commune* في بيئة سائلة تحتوي على الرصاص تكون كريات سوداء بينما يبقى الشاهد لونه ترابي (Baldrian، 2003).

عموما فإن المعادن الثقيلة تعتبر مثبطات قوية للنشاطات الأنزيمية، فيمارس الزئبق تأثيره السمي أساسا من خلال ارتباطه بمجاميع SH الموجودة في المراكز التنظيمية أو المراكز النشطة للأنزيمات مؤديا إلى تثبيطها غير العكوسي. إن الـ Cd و Cu إضافة إلى ارتباطهما بمخلفات الأحماض الأمينية العطرية في الجزئيات الأنزيمية يمكنهما أن يسببا العطب التأكسدي للبروتينات من خلال تحفيز الإجهاد التأكسدي الذي يكون مرفوقا بإنتاج الأنواع الأوكسجينية النشطة مثل جذر الهيدروكسيل و جذور فوق الأوكسيد (Baghi و Stohs، 1995).

إن الأنزيمات التي يتم افرازها خارج الخلية عادة تجابه تراكيز عالية من المعدن وذلك لأنها غير محمية بآليات إزالة التسمم المعدني الخلوية، وبعد نفوذ المعدن إلى داخل الخلية فإنها يمكن أن تؤثر على الأنزيمات خارج خلوية من خلال التأثير على عملية تنظيم كل من النسخ و الترجمة. إن إضافة الزئبق إلى إنزيم laccase النقي يؤدي الفقد السريع للنشاط الأنزيمي وعند التراكيز المنخفضة فإنه يؤدي إلى تخفيض زمن ثبات هذا الإنزيم. من بين الوظائف التي تنسب إلى إنزيمات laccases الفطرية يعتقد أنها تدخل في تكوين بعض أنواع الصبغات. لوحظ أن الزئبق يقوم بتثبيط إنزيم

Arylalchol oxidase الذي يفرزه فطر *P. eryngu* و كذا فطر *P. chryso sporium* ، كما سجل أيضا تثبيط شديد لإنزيم  $\beta$ -glucosidase المعزول من *T. gibbosa* و كذا انزيمات Glucosidases المعزولة من فطري *Gloephyllum sepiarium* و *G. trabeum* (Mansfield وآخرون، 1998).

إن دراسة الأنزيمات الفطرية الداخل خلوية بتأثير المعادن الثقيلة تعتبر قليلة مقارنة بالأنزيمات خارج خلوية. لوحظ أن الـ Hg يثبط أنزيم ribonuclease في فطر *P. tuberregum* (Wang وآخرون، 2000). و من جهة أخرى فإن أنزيم superoxide dismutase الذي ينتمي إلى مجموعة الأنزيمات التي تحفز في حالات الاجهاد التأكسدي والتي يدل على وجود وجود المعادن الثقيلة التي من بينها الزئبق. يظهر هذا الإنزيم في حالة الاستجابة للإجهاد التأكسدي المحرض بالمعادن الثقيلة من خلال هدم جزئيات جذر فوق الأوكسيد ( $O_2^{\circ}$ ) (Baldrian، 2003) .

تمثل المعادن الثقيلة خطرا على تكاثر معظم المجاميع الفطرية وتكون المراحل التكاثرية للنمو ( تكوين الأبواغ، الإنبات) في فطريات التربة الرمية أو الميكوريزا أكثر حساسية للمعادن الثقيلة من النمو الميسليومي (Bladrian، 2003). يسبب الزئبق تأثيرا ساما لنمو الجسم الثمري لفطر *V. volvacea* الذي تتم زراعته من أجل الغذاء ويسبب أيضا انخفاضا في المحتوى البروتيني للجسم الثمري (Purkayastha وآخرون ، 1994).

إن تفاعل الفطريات مع المعادن الثقيلة يسبب تغيرات شديدة للمسارات الفيزيولوجية وفي بعض الظروف قد يؤدي إلى موت الميسليوم، لذا فإن الفطريات طورت آليات دفاع نشطة و التي تحد من سمية المعادن. وهذا الدفاع عادة يكون على أساس على تجميد (immobilization) المعادن الثقيلة من خلال المركبات المخلبة الداخل والخارج خلوية، وفي العديد من المجاميع الفطرية فإن المعادن الثقيلة تتم مخلبتها داخل الخلايا بواسطة مركبات بيبتيديية منخفضة الوزن الجزيئي ( الممخلبات النباتية أو الـ metallothioneins).

بالرغم من أن إنتاج هذه المركبات ذات الوزن الجزيئي المنخفض قد لوحظ في بعض الفطريات البازيدية فيبدو أن دورها في فطريات أخرى يكون محدودا. ففي فطريات العفن الأبيض وفطريات العفن البني فإن مخلبة المعادن خارج الخلايا أكثر أهمية ولكن ليس واضحا إن كان هذا مسارا دفاعيا نشطا أم لا؟ أحد المخلبات النشطة النموذجي الذي يتم إفرازه بواسطة أحد فطريات white-rot و Brown- rot هو الأوكسلات (Oxalate). إن إنتاج حمض الـ oxalic بواسطة الفطريات يعطي وسيلة لتجميد أيونات المعادن الذائبة أو يحولها إلى معقدات أوكسلات غير ذائبة مما يقلل من تيسرها الحيوي و يزيد من قدرة التحمل لهذه المعادن (Sayer و Gadd، 1997). المجموعة الأخرى من المركبات التي تفرزها الفطريات والتي يمكنها أن ترتبط بالمعادن هي الميلائين، الفينوليك و التي تكون موجودة ضمن الجدار الخلوي (Gadd و De Rom، 1988) .

يمكن للفطريات أن تفرز أحماضا عضوية في البيئة المحيطة بها؛ تكمن فائدة الأحماض العضوية في قدرتها على تحرير الكاتيونات من البيئة المحيطة مثل التربة وتحريك الفوسفات من صورته غير الذائبة ومجابهة سمية بعض المعادن من خلال تكوين معقدات مع أيونات هذه المعادن الموجودة ضمن محاليل البيئة. أي أنّ إفراز الأحماض العضوية يمكن أن يساهم في حركة بعض المعادن السامة في التربة أو قد يؤدي إلى تجميدها من خلال ترسيبها مع الأحماض العضوية أو إزالة سميتها من خلال تكوين معقدات (Mehrag، 2003).

إنّ الأحماض العضوية مثل citric ، maleic ، oxalic مواد عضوية سهلة الاستعمال مما يجعل حركيتها في البيئة شديدة التعقد إذ أنّ ألفتها لبعض الأيونات هام جدا في مدى دوران ومدى و حركة أوعدم حركة المعادن. وجد Martino وآخرون (2003) في دراستهم المهمة لقابلية بعض فطريات الميكوريزا في مواقع ملوثة وأخرى غير ملوثة في تحريكها لأوكسيد الزنك غير الذائب وفوسفات الزنك أنّ العزلات المأخوذة من المواقع غير الملوثة تحرك الزنك وتحرر هذه الصور الكيميائية للزنك. ويتمّ ارتفاع تحويله إلى الصورة الذائبة من خلال زيادة إفراز حمض citric الذي يقوم بمخلبه الزنك وحمض الماليك maleic في البيئة الغذائية المستخدمة بالمقارنة مع المواقع غير الملوثة. إذ إنّ إنتاج هذه الأحماض يتمّ تحفيزها بواسطة الزنك الذي يكون موجودا في البيئة، كما لاحظوا أنّ إفراز حمض oxalic في المجال الجذري يكون عاليا في ميكوريزا نبات المنطقة الملوثة مقارنة بالميكوريزا الشاهد حيث لا يوجد معادن سامة، وما لاحظوه حقيقي بالنسبة لعدد كبير من العزلات الفطرية التي اخذت من أماكن ملوثة (Ahonen-Jonnarth وآخرون، 2000). فعند التعرض للألومنيوم لوحظ افراز شديد لحمض oxalic في الميكوريزا النباتية مقارنة بالميكوريزا غير النباتية. لوحظ أنّ كلا من الكاديوم والنيكل لا يؤديان إلى إفراز oxalic بينما النحاس يزيد من إفراز حمض oxalic في ميكوريزا الأشجار. تختلف السلالات والأنواع الفطرية في إفرازها للأحماض العضوية في غياب ووجود المعادن السامة؛ فبالإضافة إلى إختلاف الإستجابية من معدن لآخر فإنّ الإختلاف أيضا قد يرتبط بالنوع الوراثي. يبدو أنّ إفراز الأحماض العضوية يمكن أن يلعب دورا في تأقلم الفطر مع البيئة الملوثة بمعدن معين. وهذا التأقلم يمكن أيضا أن يقلل من حركة المعادن السامة من خلال الإقلال من الإفرازات العضوية أو من خلال ترسيب المعادن مع هذه الأحماض العضوية.

إنّ التغير في تركيب الأحماض الدهنية يؤدي إلى تغير درجة تشبع الدهون الغشائية كما هو معروف في حالة استجابة البكتيرية للمواد المنشطة للأغشية مثل الأحماض العضوية (Weber و de Bont ، 1996). تبين النتائج المتحصل عليها وجود تغير معنوي في الأحماض الدهنية المكونة للفطرين. إذ تختفي معظم الأحماض الدهنية باستثناء palmitic مع ارتفاع تركيز الزئبق. لاحظ Dlugonski و Bernat (2007) أنّ الحمض الدهني palmitic قد انخفض لدى الفطر الخيطي



*Cunninghamella elegans* في وجود tributylin chloride وخلص من دراسته إلى أنّ درجة تشبع الأحماض الدهنية كانت شديدة الارتباط بالتحويل الحيوي للـ xenbiotic إلى مركبات أقل سمية مما يوحي أنّ مقاومة الفطر لهذا المركب تعود إلى حدوث تعديل في الأحماض الدهنية وإلى الهدم الحيوي لهذا المميت الحيوي (biocid). حسب Mysyatina و Funtikova (2000) أنّ تأثير المميت الحيوي للعديد من المركبات العطرية ذات الاستبدال الهالوجيني يرتبط بتنشيط الـ ATPase الغشائي البلازمي؛ إلا أنّ Kuyyakamond و QuesnoI (1992) وجد أنّ أحد هذه المركبات chlorhexidine لا يثبط إنزيم الـ ATPase الغشائي في *E. coli* ولكنه يقوم بإضعاف الغشاء البلازمي. إنّ الغياب الكلي للأحماض الدهنية غير المشبعة الذي نتج عن تأثير البيئة الأصلية التي تميزت خلال مرحلة زمنية بمعدل عال جدا من التلوث بالزئبق نتيجة النفايات الصلبة والغازية التي يلفظها المصنع قد أصبح صفة متوارثة عبر الأجيال كآلية من آليات التأقلم البيئي.

تمثل البروتينات بوليمرات للعشرين حمضا أمينيا المعروفة والتي ترتبط في تتابعات متنوعة وفي صورة روابط متعددة، لذا فمن البديهي أن يوجد عدد مهول من صور اتحاد الأحماض الأمينية والذي يعكس بدوره التنوع والتباين الخيالي الذي يظهر على مستوى الجزئيات البروتينية للكائنات الحية. إنّ تنوع البروتين الخلوي عادة يدرس عن طريق تقنيات الفصل الكهربائي، وحركة وتمائل البروتينات المفصولة يتم التعرف عليها عن طريق المقارنة. وقد استخدم الفصل الكهربائي على الجل للبروتينات ذات الوزن الجزئي الكبير في تصنيف البكتيريا والفطريات منذ سنة 1962 (Hennebert و Vancanneyt، 1998). قارن kulik و Brooks (1970) عزلات فطرية تابعة لكل من *A. flavus* و *A. fumigatus* و *A. ochraceus* حيث أبدت كل الأنواع عصابتين بروتينيتين مشتركتين والذي قد يعزى إلى الأصل التوادي. كما أظهرت خمسة عزلات من النوع *A. flavus* عصابتين إضافيتين مقارنة بباقي الأجناس المدروسة مما تشير إلى إنّ *A. flavus* أكثر قربا من *A. parasiticus* منه من باقي الأنواع المدروسة. إنّ البروفيل البروتيني يتباين معنويا على مستوى السلالات والأنواع إذ أوضح (Guimaras-soares وآخرون، 2006) أنّ البروتينات ذات الوزن الجزئي العالي تلعب دورا هاما في استجابة الفطريات الطحلبية المائية للمعادن أنّ بروتين ذو وزن جزئي يقارب 63 KDa كان أهم بروتين يرتبط بالـ Cd في الأنواع المدروسة. لاحظ Joho وآخرون (1985) أنّ بروتينا ذو وزن جزئي 30 KDa يرتبط بالـ Cd في خميرة *S. servisiae*، وأبدت سلالات هذه الخميرة المتأقلمة مع Cd بروتينا وزنه الجزئي 70KDa يرتبط مع أكثر من 70% من الكاديوم في الجزء الخلوي الذائب (Macara، 1978). إنّ تحفيز البروتينات أو الجزئيات الضخمة المحتوية على مجاميع SH في الفطريات الطحلبية يوحي أنه تحت الظروف القاسية أو الإجهاد التأكسدي فإنّ سعة إرتباط البروتينات المنخفضة والمنخفضة جدا في وزنها الجزئي يمكن أن يصل إلى حده الأقصى وأنّ بناء البروتينات

المرتبطة بالمعادن والتي تكون عالية الوزن الجزيئي يأتي استجابة لحماية الخلايا من سمية المعادن (Guimaras-soares وآخرون، 2006)، إذ أنّ التعرض للمعادن قد يؤدي إلى زيادة إنتاج الأنواع الأوكسجينية النشطة (ROS) وجذور الـperoxy والتي تمثل مصدرا خطر للخلية (Bai وآخرون، 2003).

إنّ مركبات الـ metallothionins تلعب دورا هاما في الدفاع الخلوي ضد الإجهاد التأكسدي (Ghoshal وآخرون، 1997) على مستوى الخميرة *S. cerevisiae* وتتميز بقدرة عالية على التقاط الـROS وجذور الـperoxy بمستوى يفوق قدرة الجلوتاثيون (Miura وآخرون، 1997). ولعله في حالة الفطرين المعرضين للزئبق في دراستنا فإنّ هذه البروتينات المشابهة قد استخدمت في التقاط مثل هذه المركبات مما يمكن أن يؤدي إلى التقليل من خطر هدم الجزيئات الحيوية الهامة مثل البروتينات والدهون والـDNA (Bai وآخرون، 2003) ويحمي الجلوتاثيون من الأكسدة (Quesada وآخرون، 1996).

إنّ أيض الأحماض الأمينية في الخلايا الفطرية يتأثر بشدة بعمليات النقل النشطة للفجوة العصارية، وأغلب الأحماض الأمينية الحرة عادة تكون مركزة في هذه العضية. إن العلاقة بين الفجوة العصارية والمكونات السيتوزولية تتباين حسب نوعية الحمض الأميني. إنّ الأحماض الأمينية المتمركزة في الفجوة العصارية تستخدم كمخزن للحفاظ على تركيز الأحماض الأمينية داخل السيتوبلازم ضمن حدود معينة ولهذا فإنها تعمل على إحداث التوازن نتيجة حدوث التغيرات الخارجية أو الفائض في البناء الحيوي أو أي متطلبات أيضية. وبما أنّ الأحماض الأمينية تعتبر طلائع ضرورة للنشاط الأيضية البنائية (anabolic) أو الهدمية (catabolic) فإنّه يعتقد أنّ المراقبة التنظيمية لمجموع الأحماض الأمينية (control) يكون له دلالة هامة جدا في التنظيم (regulation) الأيضي. تمّ التعرف في الكائنات الحية الدقيقة حقيقية النواة على العديد من النواقل التي تنشط امتصاص الأحماض الأمينية إلى داخل الفجوة العصارية على حساب صرف قوة تحريك بروتونية تتولد من قبل ATP ase الـtonoplast-H<sup>+</sup> Phosphatase والـtonoplast H<sup>+</sup> Phosphatase. إنّ الآلية الحقيقية التي تنظم تدفق الأحماض الأمينية المتركمة في الفجوة العصارية لازال يكتنفها غموض كبير جدا. أمّا الحمضيين الأمينين الكبريتيين للمثيونين والسيستئين فيختلف أيضهما حيث أنّ الدور الرئيسي للمثيونين يتمثل في دور المانح لمجموعة المثل ولذا يكون دوره الرئيسي ضمن تفاعلات الميثلة. ومجموعة المثل يمكن أن تنتقل إلى مشتقات البريدين كما هو الحال عند إزالة السمية لبعض المواد الحاوية على حلقة بيريدينية أما السيستئين فيدخل في تكوين الروابط S-S المسؤولة عن البنية الثانوية للبروتينات ويدخل في بنية بعض الأنزيمات وفي Coenzym-A.

تعيش العديد من الفطريات ببيئات ملوثة بالمعادن، بعض هذه المعادلة يكون ضروريا للنمو ليتحول إلى المركبات سامة بالتراكيز الأعلى كما هو الحال مع كل من  $Zn^{2+}$   $Cu^{2+}$  بينما لا يبدي البعض الآخر منها أي دور ابيولوجي وتتوقف قدرة الكائنات على البقاء حية بالبيئات الغنية بالأيونات المعدنية على مدى كفاءتها في رفع القدرة التحملية التي تعتمد على آليات عدة كالاحتفاظ بهذه المعادن عبر الجدر الخلوية أو مخلبتها خارج خلويًا أو عبر الإفراز الأيضي وتكوين معقدات داخل خلوية مع الـ metallothionins (Gadd ، 1993).

إنّ أهم آليات استحداث السمية المعدنية هي آليات توليد الجذور الحرة (ROS) التي تؤدي بتراكيز أعلى إلى عطب الجزيئات الضخمة كالدون، البروتينات والأحماض النووية مؤدية في نهاية المطاف إلى الموت الخلوي ( Bai وآخرون، 2003) تولد الجذور الحرة خلال الأيض العادي للخلايا أو إثر التعرض المفرط للعوامل الاجهادية كالتغيرات الحرارية والحضور الأيوني المعدني المفرط أو الدورات الوردوكسية . وكباقي الكائنات تملك الفطريات نظاما دفاعيا في صورة أنزيمات أو جزيئات منخفضة الأوزان تعرف بالنظام المضاد للأكسدة.

اهتمت هذه الدراسة بأهم آليات استراتيجيات مجابهة الأيونات المعدنية في صورة  $HgCl_2$  ومدى التآلف الفطري للتعيش في بيئة ملوثة كأسلوب مقاومة والتي يعكسها تحريض النظام المضاد للأكسدة المتمثل في تحفيز نشاط كل من CAT و SOD و GPX و G6PDH وانخفاض محتوى GSH. إنّ تنشيط كل من الـ CAT بالفطر *A. tubingensis* والـ SOD بالفطر *A. niveus* بهذه الدراسة مقابل الإجهاد التأكسدي المستحدث بالـ  $HgCl_2$  بالبيئات الفطرية النامية لمدتي 3 و 7 أيام يترجم مدى دور هذه الإنزيمات في استبعاد مستويات الـ  $O_2^{\cdot-}$  و الـ  $H_2O_2$  (Pocsi وآخرون، 2004).

إنّ الـ  $H_2O_2$  المنتج يتيسر له الانتقال عبر الأغشية وتراكمه في وجود الحديد يؤدي إلى توليد أخطر الجذور  $OH^{\cdot}$  عبر تفاعلات الـ Fenton ويقتضي هذا تدخل إنزيمات الـ Peroxidase لتدارك الوضع وصيانته (Kwon و Anderson، 2001). يفسر انخفاض الـ CAT بالفطر *A. niveus* خلال التعرض الطويل للـ  $HgCl_2$  بكون هذا الإنزيم عبارة عن مركب هيمي يكون مستهدفاً بالغزو الجذري المولد أثر التعرض الطويل المدى 7 أيام.

تظهر هذه الدراسة بأنّ حساسية الفطر للأثر السمي يحكمها كل من الأصل الوراثي وطور النمو حيث وجد بأنّ المقاومة الفطرية تكون على أقصاها بعد الفترة 3 أيام مقارنة بـ 7 أيام. حيث تباين سلوك النظام المضاد للأكسدة لدى الفطرين. إلّا كل من المركبات الثيولية والجلوتاثيون أبديا سلوكا متمثلا في الفطرين حيث ارتفع محتوى الثيولات بينما انخفض محتوى الـ GSH بكليهما عند مرحلتي النمو المدروستين .

إنّ ارتفاع نشاط الـ G6PDH ذي الدور الصياني للـ NADPH الداخل خلوي للحفاظ على التوازن الوردوكسي (Pocsi وآخرون، 2004) بالفطر الأول إثر التعرض للزئبق قد يفسر بمدى ارتباط الزئبق

بالمجاميع النشطة SH بالإنزيم GR المحفز بهذا النشاط. كما قد يفسر انخفاض نشاط الـ SOD بالفطر *A. tubingensis* إثر التعرض الطويل 7 أيام إلى سلوك الفطر الذي يميل إلى الإعتماد على CAT كمضاد أكسدة أولي بعد استنفاد نشاط الـ SOD إذ قد يفسر سلوك المقاومة بمدى الأقلمة مع المعادلة حيث أن الـ SOD قد يسلك إلى جانب مسلك اللاقط جذري مسلك الممخبل المعدني metallothionin (Culotte وآخرون، 1995).

قد يعود انخفاض GSH بكلي الفطرين إثر التعرض للزئبق إلى زيادة الاستنفاد في مجابهة الأكسدة الليبية المولدة بالنشاط المعدني حيث يشكل الـ GSH مع المعادن معقدات-GSH متزاوجة (Pocsi وآخرون، 2004) إذ يعتبر الـ GSH أحد طلائع phytochelatin بالفطريات (Clemens و Simin، 2003) حيث وجد بأن الـ GSH يشكل معقدات مع الكاديوم كآلية من آليات إزالة السمية (Zak، 2004). وعملية تشكل هذه المعقدات يحكمها مفهوم السلالة، طور النمو وتركيز المعدن، حيث أظهر فطر *S. cerevisiac* معقد Cd-bis-glutathionate دورا في نقله إلى الفجوات السيستوزولية وذلك بتدخل الناقل ABC- Transport YCF1 (Lie وآخرون، 1997). ويظهر مقاومة Cd تتوقف على مدى تخليق  $(Cd-GSH)_2$  و Cds-crisallites coated مع الـ GSH (Poninckx، 2000).

إن آلية ارتباط المعادن بالجدار الخلوي ليست جلية على وجه الدقة واليقين نتيجة الطبيعة المعقدة للكتلة الحيوية للميكروبات، إلا أن تحديد أماكن تواجد بعض المعادن أمكن الوصول إليه من خلال استخدام المجهر الإلكتروني ودراسة التحليل الانتشاري لطاقة أشعة X. يعتبر استخدام المطيافية الفوتوإلكترونية لأشعة X في دراسة التحاليل الكيميائية تقنية جديدة نسبيا في تجديد طاقة الربط لدى الذرات والجزيئات والتي تعتمد على توزيع الشحنات التكافؤية وبالتالي يمكن أن تعطي معلومات حول الحالة التأكسدية (oxidation state) للذرة أو الأيون. بينت دراسة Mullen وآخرون (1986) عن طريق المجهر الإلكتروني وجود أيونات  $Ag^{2+}$  على صورة جسيمات منفصلة في أو بجوار الجدار الخلوي للبكتيريا سواء كانت موجبة أو سالبة الجرام وقد تم تأكيد وجود الفضة من خلايا تحاليل الانتشار الطاقوي لأشعة X.

أظهرت دراسة Mclean و Beveridge (2001) حول *Pseudomonas* تم عزلها من بيئة ملوثة بالكروم باستخدام المجهر الإلكتروني ومطيافية أشعة X للانتشار الطاقوي أن  $Cr(VI)$  اختزل إلى  $Cr(III)$  والذي كان موزعا بانتظام وممتصا على سطح الخلايا في البداية، ثم بعد ذلك ترسب داخل الخلايا على صورة مجاميع كربوكسيل أو هيدروكسيل. وعلل ذلك أن ارتباط الكروم بسطح الجدار الخلوي يعود إلى المجاميع الوظيفية ذات الكهروسالبية مثل الكربوكسيل والهيدروكسيل والفوسفوريل. كشفت دراسة Beveridge (1988) باستخدام TEM والـ EDS أن  $Cr(III)$  يدمص ثم يرسب على سطح الخلايا الميكروبية وفي الأخير ينتشر داخل الخلايا على صورة كتل.

تمتلك الكائنات الحية الدقيقة مراكز نووية ممتازة تسمح بإنشاء تكوينات معدنية حبيبية وذلك لما تتميز به من سعة في المساحة السطحية وشحنات سالبية الكهربائية. إن المجاميع الوظيفية الموجودة على السطح ( مثل الكربوكسيل و الفوسفوريل والهيدروكسيل) تلعب دورا هاما جدا في التراكم الحيوي للمعادن ويمكن أن تقلل من سمية البعض منها. إن المعلومات المتيسرة حول الادمصاص الحيوي للمعادن الثقيلة بواسطة الفطريات محدودة جدا وقاصرة على عدد محدود من السلالات الفطرية. إن نتائج هذه الدراسة يمكن أن تفيد في إزالة التلوث بالزئبق من البيئة ومجاري الأنهار والأودية والمجاري المتخلفة عن المصانع. إن إزالة التلوث البيئي خاصة في الأماكن والمحيطات الصناعية دون التدوير (cycling) المصاحب لانتقال المادة عبر الغلاف الحيوي أصبحت حاجة ملحة وضرورة بحث علمي. تقنيات أخرى ونتائج تطبيقية ضرورية للفهم الجيد والتطبيق الفعال للإمتصاص الحيوي الفطري و كذا آليات الحماية لدى الفطر *A. tubingensis* و *A. niveus* لإزالة سمية الزئبق. إن إزالة سمية الـ Hg بواسطة *A. tubingensis* و *A. niveus* يمكن أن يتوسطها أيضا نظام الدفاع الأنزيمي المضاد للأكسدة مثل *ascrobate peroxide* ، *catalase* ، *peroxidase* و *phytochelatin* التي تقوم بعملية *sequestration* للمعادن وبالتالي تحدّ من الخلل الذي قد يصيب المسارات الأيضية من خلال اختزال أيونات المعادن الحرة التي تكون وراء السمية الخلوية.

إنّ الدراسة الحالية تعكس بأن الفطر المنمى ببيئة الـ  $HgCl_2$  والذي قد سبق جلبه من تربة ملوثة بالزئبق قد اكتسب مقاومة تؤهله إلى تسخير آليات المقاومة بالتراكيز المنخفضة. يبدو أن آليات الإدمصاص المعدني غير واضحة المعالم نظرا لطبيعة الكتلة الميكروبية المعقدة. عكست تحاليل إحدى التقنيات الحديثة *X-Ray photo electron spectroscopy chemical* مفاهيم عدة حول أطوار الأكسدة ما بين الذرة والمعدن وأظهرت هذه الدراسة بأن *Sar Gssun* المعامل بـ  $Fe^{2+}$  قد تراكم الحديد بكتلته الحيوية في صورة  $Fe^{3+}$  ، كما أن الكروم  $Cr(VI)$  يتحول إلى  $Cr(III)$  خلال توزيعه بشكل غير متجانس على السطح الخلوي (Nelean و Beveridge، 2001). و برر بأن هذا الإرتباط بسطح الجدار قد يكون مرده إلى وجود مجاميع وظيفية سالبة إلكترونيا مثل الكربوكسيل والهيدروكسيل و الفوسفوريل . ولعل هذا ما يفسر مدى تغير الوظيفة الإدمصاصية من سلالة لأخرى. عزى Geordan وآخرون (1996) بأنّ والكسور التحلل الجداري الذي لاحظته إثر معاملة *Candida albicans* بـ *Carera Papaya lute* إلى فقدان عديدات السكر بالجدر الخلوي. أما Neeta و Abhishek (2006) فقد أرجعا التغيرات المورفولوجية الحادثة على مستوى الجدار الخلوي عند معالجة *Phythin ultimum* بكل من *Thym* و *Lavender Oil* إلى مدى تداخل المركبات الزيتية مع التفاعلات الإنزيمية المسؤولة عن التخليق الجداري مما ينعكس على فعالية النمو والتشكل المورفولوجي. وأظهرت دراسات Abyane وآخرون (2006) بأن فطر *A. purasiticus* المعامل بـ

Cotton-leuf volatil قد أبدى تغيرات مرفولوجية تمثلت في اختزال النمو الشعاعي وانخفاض معدلات التبوغ والتحفيز غير الممتجانس للهيفات الهوائية والذي قد يرتبط بتنشيط النمو وعدم تصنيع الـAflatoxin. أيضا أظهرت دراسات على الجدار الخلوي لـ *A. niveus* وجود بلورات متراكمة عند معاملة هذا الفطر بالنيكل وقد اعتبر هذا التراكم صورة امصاصية واستيعادية للمعدن تتم بعد 50 ساعة من النمو، وقد وجد بأن الاستبعاد المعدني يتوقف على رقم الأس الهيدروجيني للبيئة الذي عادة ما ينخفض إثر تركز Oxalic acid وإذ تأخذ الترسبات المظهر البلوري بعد 100 ساعة من النمو وقد أكد التركيب الكيميائي وفقاً لتقنية XRD بأنها عبارة عن أكسالات النيكل (Papini وآخرون، 2001). ويبدو وفقاً لـ (Gadd، 1993) بأن الفطريات يمكنها ترسيب أوكسالات وسيترات وبيروفات كل من الكوبالت والنحاس والكروم.

إن ظهور الفجوات والمظهر المتوصل الذي يأخذه السيتوبلازم يعكس أيضاً أساليب وآليات المقاومة في استبعاد المعادن، حيث يظهر بأن الفجوات بالفطريات تتاطب بها العديد من المهام البيولوجية، كهدم ورسكلة البروتينات وتخزين الأيضيات والأيونات والأحماض الأمينية والحفاظ على هييموستازيا الحموضة، أو تصنيع الجليسرول، وقد وجد بأنها على مستوى الخميرة تخزن المركب الكبريتي S-adenosyl- methionne sufonomim وهو عامل مساعد للاحتفاظ بالمجاميع المثيلية (Amor وآخرون، 2000).

تسمح اختبارات طبع أصابع الـDNA المضخم عشوائياً (RAPD-fingerprinting) باكتشاف تتابعات نيوكليوتيدية صغيرة ومتعاكسة تتكرر على مستوى DNA. وفي حالة الـRAPD-PCR فإن التضاعف يتضمن فقط بادئات مفردة لتتابعات نيوكليوتيدية عشوائية. أساس اختبار RAPD يمكن تلخيصه باختصار فيما يلي: ترتبط بادئة مفردة بالـDNA الجينومي في مكاني ارتباط مختلفين وفي اتجاهين متعاكسين، والتضخيم بين هذه المناطق ينتج عنه ناتج متقطع. بما أنه يمكن أن نتوقع أن كل بادئة تتضاعف إلى العديد من الـ loci المنقطعة أي المنفصلة عن بعضها في الجينوم فإن الناتج النهائي عادة يتمثل في بروفيل من المنتوجات المضاعفة ذات أحجام مختلفة.

يفترض في مثل هذه الدراسة أن العصابات المتطابقة في حركاتها وفي شدة صبغها يكون لها نفس التتابع أو تتابع متماثل. وفي الحقيقة إن ذلك لا يكون دائماً معروفاً وكذلك هناك مشكل آخر وهو عدم معرفة ما إذا كانت هذه العصابات واسمة لتتابعات مشفرة أو تتابعات غير مشفرة وما إذا كانت تمثل جينات يمكن اعتبارها جينات قيد الانتخاب والدراسة.

بعض الخصائص الأخرى التي يجب أن تؤخذ بعين الاعتبار عند استخدام هذه الطريقة وهي إمكانية حدوث الطفرات العشوائية عند مواقع معينة وحساسية بعض التتابعات خلال عملية العبور والانفصال التي تتم أثناء الانقسام الاختزالي. فقد سجلت كل هذه الحالات لدى الفطريات وبالتالي يمكن

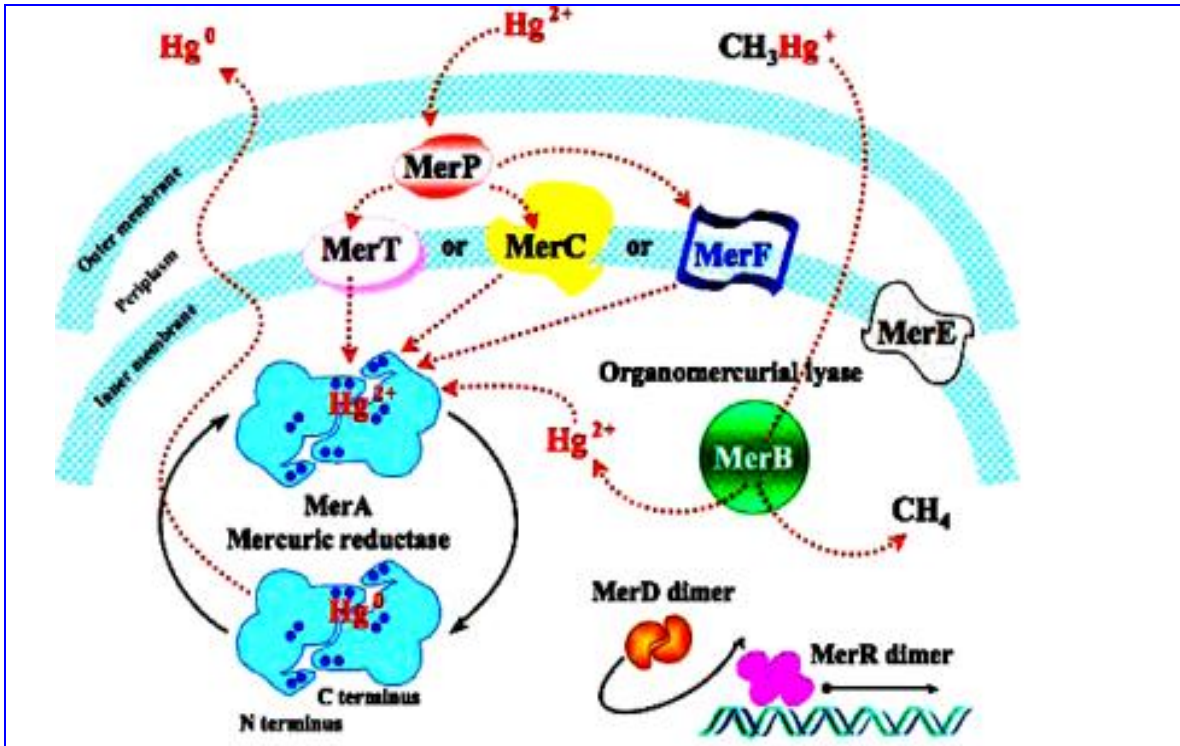
أن تؤدي إلى نماذج مختلفة مصدرها الأباء والتوالد، إلا أن ثبات هذه الطرق اثناء دراسة بعض الفطريات التي تتكاثر لاجنسيا يمكن أن يعطي عصابات نوعية ونموذجية (Bridge وآخرون، 1998).

#### 4-5 أنظمة امتصاص الزئبق وقاومته

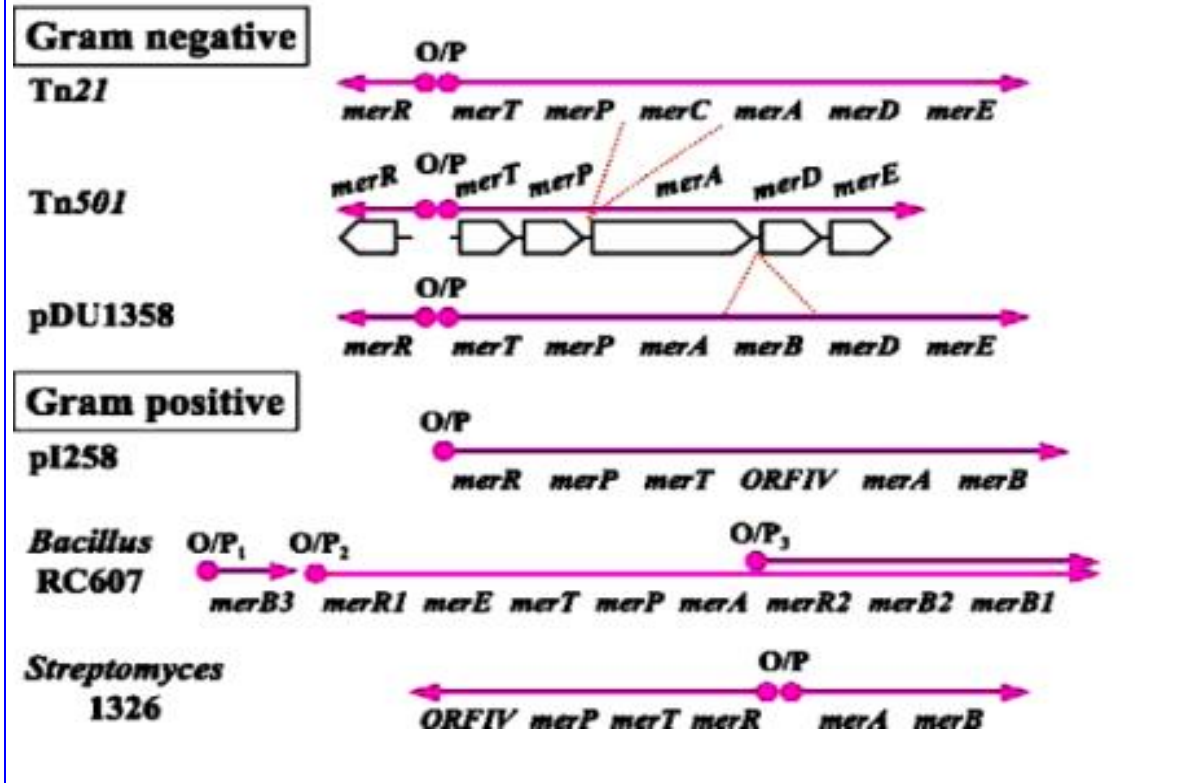
عند البداية من أيونات  $Hg^{2+}$  (أو أيونات مركبات الزئبق العضوية) الموجودة خارج سطح الخلية فإن المشكلة بالنسبة للميكروب تكمن في إدخال كاتيونات الزئبق الثنائي التكافؤ إلى الأنزيمات السيتوبلازمية (المسؤولة عن إزالة السمية) ودون السماح للزئبق أن يكون حرا أو يسبب عطا للخلية، وهذا يختلف عن أغلبية أنظمة المقاومة الميكروبية لكاتيونات المعادن الأخرى حيث يتم استعمال بروتينات مضخات التدفق على مستوى الغشاء الداخلي لتحرير المعادن من السيتوبلازم (Silver و Hobman، 1996).

بخلاف الحدس فإن نظام المقاومة mer يمتلك نظام إدخال أيونات  $Hg^{2+}$  والذي يرتبط مع  $Hg^{2+}$  الموجود خارج الخلية ثم يحركه في صورة شلال متسلسل (cascade) مكون من أزواج من cysteine موجودة على بروتينات مختلفة (تسمى مجموعة الثيولات المندفعة thiol bucket brigade) إلى أن يصل إلى cysteine الموجود بالمركز النشط لإنزيم Mercuric reductase الموجودة بالسيتوبلازم. لا يوجد أي بروتين من الغشائي الخارجي يكون مرفقا لهذا المسار الناقل، إلا أن أوبيرونات المقاومة (شكل B 59) تشفر بروتين mer P الصغير الذي يرتبط بـ  $Hg^{2+}$  في periplasm (في حالة البكتريا السالبة الجرام) أو على سطح الخلية (في حالة البكتريا الموجبة الجرام). بنية هذا البروتين الذي يبلغ طوله حوالي 72 حمضا أمينيا (بعد مسار تعديل البيبتيد الطليعة) أصبحت معروفة وتتكون من 4 صفائح  $\beta$  متوازنة بالضد، إضافة إلى منطقتين حلزونيتين  $\alpha$ -قصيرتين وعقدة تحتوي على gly-met asp Cys33- Ala-Ala -Cys 36 pro هي الجزء الذي يرتبط بـ  $Hg^{2+}$  بصورة S- $Hg$ -الخطية (Miller، 1999). يقوم mer P بتمرير  $Hg^{2+}$  في تبادل سريع مع اثنين من الأربع أحماض أمينية cysteine لبروتين الغشاء الداخلي Mer T، ويتقلب Mer T عند مروره عبر الغشاء 3 مرات ضعف على صورة المناطق الحلزونية- $\alpha$  (Barkay وآخرون، 2003؛ Wilson وآخرون، 2000) مع زوج من cysteine في حلزون الغشائي الأول يعتقد أنه كي يستقبل أيونات  $Hg^{2+}$  الأولية من بروتين Mer P. ثم بعد ذلك يستقبل زوج ثان من cysteine الموجود في السيتوبلازم أيونات  $Hg^{2+}$  من زوج cysteine الأول (Wilson وآخرون، 2000).

(A)



(B)



شكل 59 أنظمة مقاومة الزئبق لدى البكتريا (Hobman و Silver، 1996).



بما أنه لا يوجد نموذج للإرتباط بالـATP فإن إمتصاص  $Hg^{2+}$  عبر بروتين Mer T بالغشاء الخلوي الداخلي يمكن أن يتضمن عملية نقل من cystein إلى cysteine دون تزاوج طاقوي مرافق. في ذات الوقت الذي يوجد فيه Mer T غالبا في نواتج الـ Mer operen فقد أمكن معرفة بروتينات نقل غشائي تبادلي أخرى هي Mer C و Mer F. يقطع الـ Mer C الغشاء 4 مرات ضعف Mer T والـ Mer F مرتين ضعف Mer T ولكن كل هذه البروتينات الثلاث (Mer F ، Mer C ، Mer T) يبدو أنها تعمل بمسارات نقل متماثلة أي أنّ خلية واحدة (أو أوبيرون) يمكن أن يحتوي عل أكثر من بروتين نقل غشائي وأخيرا يمثل Mer E بروتين غشائي إضافي لوظيفة غير معروفة في الوقت الحالي .

بمجرد أن تصل  $Hg^{2+}$  إلى السطح الداخلي للغشاء الداخلي فإنها تكون قابلة للإنتقال مباشرة من الغشاء من بروتين Mer T الغشائي إلى إنزيم Mercury reductase بصورة أكثر من انتقاله من المركبات التيولية داخل خلوية الصغرى مثل الـ glutathione (أو الـ Mercaptoethanol الذي يستخدم في الاختبارات الأنزيمية للخلايا الحرة). يعتقد أن هذا أيضا يتم من تبادل زوج آخر من cysteine-to-Cysteine إلى النيتروجين (N) الطرفية لزوج cysteine لإنزيم الكبير Mercuric (Mer A) reductase. كل تنابعات Mer A المعروفة (بإستثناء واحدة في streptomyces) تمتلك هذه المجال الحامل N الطرفية (أو اثنين في حالة Bacillus) و التي تكون متماثلة البنية تماما في التنابع وتقوم بوظيفة مماثلة للـ Mer P .

إنّ مجال ارتباط  $Hg^{2+}$  الـ N- الطرفية في إنزيم Mercuric reductase غالبا يزال ثناء نشاط التحلل البروتيني (proteolytic) خلال التعبير (expression) أو التنقية (أي تنقية إنزيم Mercuric reductase) كما أنه لا يوجد في البنية البلورية لمستحضر إنزيم Mercuric reductase في بكتريا Bacillus (Pai و آخرون 1991) مما يوحي أنّ هذا المجال يفقد موقعا ثابتا في البنية البلورية؛ إلاّ أنّه يكون موجودا في بنية Mer P من Tn 501 بالبكتريا سالبة الجرام (Ledwige ، و آخرون ، 2005).

إنّ إنزيم Mercuric reductase الذي تم تنقيته و تحضيره وحفظ بنيته البلورية من الـ Bacillus يحتوي على اثنين من التابع المندمجة المشابهة للـ Mer P في احتوائه على النيتروجين الطرفية وعليه فإنّ مسار فقد وظائف مجال Mer A الذي يفقد الـ N الطرفية إنزيميا *in vitro* وظيفية إعطاء N طرفية يجب أن تدرس بدقة شديدة في التجارب الحركية للإنزيم. لذا فقد إفترض أن الـ  $Hg^{2+}$  هو الذي ينتقل فيما بعد بواسطة تبادل زوج آخر من الـ cysteine إلى زوج من الـ cysteine إلى ذرة كربون (C) الطرفية لزوج من الـ cysteine (C 558 – C 559) ثمّ يتم تجديده في تحت الوحدة Mer A . هذه الـ cysteine ضرورية للنشاط الإنزيمي الخلوي ولكن يمكن أن تتفادى ببعض مواد التفاعل المضافة. يرتبط  $Hg^{2+}$  بإنزيم Mercuric reductase بالكربوكسيل الطرفي 558 - 557 Cys لتحت

وحدة ثم ينقل بعد ذلك بالتبادل thiol-thiol السريع إلى زوج الـ thiol- للـ cys 135 – cys 140 للوحدة الأولية الأخرى (Backay ، 2003) . وأخيرا فإن  $Hg^{2+}$  عند زوج cys 135 – cys 140 يختزل بواسطة النقل الإلكتروني من العامل المساعد الـ FAD. بقايا الأربع الـ cysteine تبقى مرتبطة ببنية البروتين بقوة (Pai و آخرون 1991)، وبعد ذلك فإن بقايا Tyr في الارتباط بـ  $Hg^{2+}$ .

إن إنزيم Mercuric reductase عبارة عن FAD يحتوي على Flavoprotein أصفر يرتبط وظيفيا بإنزيم glutathione reductase وإنزيم lipoamide dehydrogenase (و هو واسع الانتشار في خلايا كل من بدائية و حقيقية النواة) إلا أنه لا يعرف على أية حالة تتعرف هذه التتابعات على مواد التفاعل النوعية والخاصة بها. إن التفاعل الإنزيمي للـ organomercurial لوحظ بأنه تهيئة لهجوم بروتوني (Prخton) على الرابطة Hg-C بواسطة آلية تفاعل (Begley ، و Ealick ، 2004) بعد أن يصبح مركب الزئبق العضوي مرتبطا بمجموعة الثيول بالحمض الأميني cysteine ولكن غير واضح كيف أن بقايا حمض ثنائي الكربوكسيل (Begley ، و Ealick ، 2004) أو tyrosine أو مجموعة ثيول الحمض أميني تمثل مصدر الإمداد بالبروتون لمثل الزئبق لتكوين الميثان أو فنيل الزئبق لتكوين البنزين. بعض الدراسات البنيوية والطفورية (mutagenesis) الحديثة لإنزيم الـ organomercurial lyase (Benison و آخرون، 2004)، وتقترح أن مجاميع الثيول يمكن أن تكون مصدر الإمداد بالبروتون الذي يهاجم الرابطة Hg-C (silver و Hobman ، 2007). ثلاثة cysteine (cys 96 و cys 117 و cys 159) في Mer B بالبلازميد R831 تبقى دائما محتفظا بها في تتابعات إنزيم الـ organomercurial lyase، وإن الـ cys 96 و cys 159 (و لكن ليس cys 117) تكون ضرورية لكل النشاط *in vitro*، إلا أن الـ cys 117 رغم أنه يحتفظ به كليا، فإنه قد يلعب دورا غير تنشيطي (Benison و آخرون ، 2004). إن cys 160 غير الأساسي وجد في إنزيمات الـ organomercurial lyase للبكتريا سالبة الجرام (مكونا زوج cysteine مع cys 159) و لكن لم يوجد في البكتريا موجبة الجرام. و الزوج cys 215 – cys 216 يكون زوج الـ cysteine المجاور لذرة C الطرفية في إنزيمات الـ organomercurial lyase للبكتريا موجبة الجرام. مجموعة ثيول ثانية من التابع الـ cys 196 يمكن أن تكون رابطة مع الـ Hg و البروتون  $H^+$  من الـ cys 96 أو من tyr 93 أو من الأحماض الأمينية aspartate و glutamate التي يتم الاحتفاظ بها (asp 98) يحتفظ به في إنزيمات الـ organomercurial lyase (تقوم بهاجمة الرابطة Hg - C مؤدية إلى تحرر الميثان أو أي منتج ألكيلي (alkyl) أو أريلي (aryl) آخر (Benison و آخرون، 2004، Barkay، و آخرون ، 2003). وبعد ذلك يرتبط الـ Hg بإنزيم الـ organomercurial lyase (المرحلة الثالثة) بمجموعتي ثيول، وأيون  $Hg^{2+}$  المحرر في اختبارات الخلايا الحرة عادة يحاول أن يضيف مركبات كبريتية صغيرة أخرى (thiols) مثل الجولوتيون، وفي الخلايا السليمة كذلك قد يرتبط بالثيول الذاتية أو ينتقل مباشرة إلى الأحماض الأمينية cysteines المجاورة للـ C الطرفية في الإنزيم Mercuric reductase شكل (Benison و آخرون ، 2004). إلا أن

المفاجئ مع وجود التنوع الكبير التابع Mer B وكذا الجينات فيوجد جهد ضئيل لتحديد الفروق بين خصوصية مواد تفاعل الزئبق العضوي الموجود ضمن كم هائل من مركبات الزئبق العضوي الأليفاتية والعطرية المعروف أنها مواد تفاعل لهذا الإنزيم .

إنّ الأوبرون Mer R المنظم لمقاومة كاتيون الزئبق هو أول ما وصف ودرس ضمن ما يطلق عليها عائلة محفزات (activators) الإستساح المستجيب للمعادن والتي تضم حاليا منظمات (regulators) كل من الزنك والنحاس والكاديوم والرصاص (Permina وآخرون ، 2006 ) و كذا المنظمات المستجيبة للإجهاد (stress) غير المعدني (nonmetal) مثل الإجهاد التأكسدي والإستجابة للأدوية (silver و Hobman ، 2007). إن المنظمات Mer R في كل من البكتريا موجبة وسالبة الجرام المقاومة لأيون  $Hg^{2+}$  هي منشطات تتكون من 140 حمض أميني (باستثناء حالة واحدة في حالة الـ Mer R الخاصة بـ *streptococcus luidans* و الذي يطلق عليه Mer R و لكن تتابعها ليس له علاقة بالمحرض (repressor) المستسخ. مع الأسف لا يوجد منشور على محدود علمي حول البنية البلورية للـ Mer R ، و لكن بني Mer R مماثلة خاصة بالنحاس Cue R و الزنك Znt R درست على مستوى *E. coli* ( Change Ia و آخرون ، 2003) يمكن أن تعطينا نموذج تصويري عن هذا البروتين. بينت تجارب إضافية من دراسات كل من تفاعلات Mer promotor والمطفرات المباشرة لمركز Mer R ودراسات تمّ فيها تمييز أجزاء صغيرة من Mer R كلها تتوافق مع البني البروتينية لمنظمات عائلة Mer R لكل من النحاس Cue R والزنك Znt R وساعدت في وضع نموذج عن كيفية تنظيم Mer R للتعبير الجيني للـ Mer عند استجابته للـ  $Hg^{2+}$  الذي ينتقل إلى داخل السيتوبلازم . وعلى أساس المعطيات التجريبية للمنظم الـ Mer Bacillus RC 607 والمنظمات Mer من Tn 501 و Tn 21 فإن النموذج الساري عن كيفية عمل Mer R هو أنّ Mer R ذو الوحدات المتجانسة (homodimer) يرتبط بنتابع DNA متماثل (symmetrical) بين العناصر 10 و 35 (elements) من المحرض (promoter) في وجود إنزيم RNA polymerase على هذا المحرض. إنّ المعقد الثلاثي Mer - RNA poly merase / apo - المحرض يكبح ببطء الاستنتاج من المحرض من خلال ثني الـ DNA المحرض (promoter DNA). إنّ المحرض Mer يكون غيرمثالي للتعبير الجيني لأنّ التباعد بين التتابع 35 والتتابع 10 يصل في غي العادة إلى طول 19 زوج قاعدة (bp) مقارنة بالمحرض قياسي الذي يكون بتباعد 16-18 زوج قاعدة (bp). إنّ طول التباعد يجعل منه غير مثالي في تكوين معقد فك الـ RNA polymerase و تنشيط الاستساح. إنّ أيونات الزئبق الثنائية ترتبط بأحد الـ cysteine ( cys 82 ) في أحد المونوميرات ( monomers ) الـ Mer R وبإثنين من الـ cysteine ( cys 117 و cys 126 ) في المونومير ( monomers ) الآخر من محرض الـ Mer المرتبط بالـ Mer homodimer في تناسق (coordination) ثلاثي. إنالنموذج الشائع لتنشيط الـ Mer R للتعبير الجيني للـ Mer R والمعتمد على أساس البني المحتوية على الكاتيون المعدني

لمنظمات عائلة Mer R التي تضم كل من CueR و Znt R الحساسة للمعادن والمبني على دراسات تمت حول المحض Mer تشير إلى أن ارتباط الـ  $Hg^{2+}$  ثنائي التكافؤ بالـ Mer homodimer يسبب تشوه للـ DNA، وفي ظروف انعطاف الـ DNA في منطقة المحض Mer الذي يرتبط به الـ Mer homodimer الذي يضم التتابع 10 والتتابع 35 المثاليين في ابتداء النسخ من المحض MER (Mer promobor). إن هذه الآلية المتمثلة في كبح التعبير في غياب  $Hg^{2+}$  وتنشيطه في وجود  $Hg^{2+}$  تؤدي تحفيز حساس جدا للنسخ استجابة ل تزايد وارتفاع معدلات الزئبق.

إن تحليل تتابع الـ DNA للـ merD توحى أن مجال ارتباط DNA بذرة N الطرفية للبروتين Mer D يكون له بعض التشابه والتمائل مع Mer R. لوحظ أن Mer D يرافق في تنظيم تعبير المحض Mer في عدد من الأبحاث المبكرة. أظهرت أعمال وأبحاث حديثة أن Mer D يقوم بتفكيك المعقد  $Hg^{2+}$  / Mer / Mer O / P سامحا بتكوين apo - Mer R جديد والذي بدوره يستطيع الارتباط بالمحض Mer (Champier وآخرون ، 2004)

## 5-5 الإدمصاص الحيوي للزئبق

تستخدم منحنيات التعادل الحراري بصورة واسعة لوصف النتائج التجريبية لادمصاص أيونات المعادن بواسطة الكتلة الحيوية وذلك لأنه يعتقد أن الإدمصاص الأولي السريع يعود إلى ارتباط أيونات المعدن بالجدار الخلوي. بينت العديد من الدراسات أنه عند التراكيز المنخفضة لأيون المعدن فإن كتلة أيون المعدن المتراكم تتناسب طرذا مع تركيز أيون المعدن في المحلول. (Saglam، وآخرون 2002). إن سعة الإدمصاص يمكن تقييمها بمنحنيات التعادل الحراري التي تبينها نماذج كل من

Freudrlish و Langmuir

إن الإدمصاص يمكن فهمه بسهولة حالة استخدام معدن مفرد، ولكن في حالة الأيونات المتعددة والتي تصادف عادة في المصبات فإن تقييم الإدمصاص يصبح أكثر تعقيدا. أغلب الدراسات التي أجريت باستخدام محلول يحتوي على معدن مفرد وتجارب واقعية يمكن أن يستنتج منها نتائج لمحاليل المعادن المختلطة عند درجة pH قاسية وتراكيز متغيرة من المعادن. تعتمد كفاءة الإدمصاص الحيوي على العديد من العوامل والتي تضم كل من سعة، ألفة ونوعية المدمص الحيوي وكذا ظروفه الفيزيائية والكيميائية في المصب.

يمثل ارتباط المعدن بالجدر الخلوية والأسطح الخارجية بمعزل عن الأيض يمثل الآلية الوحيدة في حالة الكتلة الحيوية للكائنات الميتة وهذا الإمتصاص المستقل عن الأيض يتضمن أساسا مسارات الأدمصاص مثل الإدمصاص الفيزيائي أو الأدمصاص الكيميائي أو الإدمصاص الأيوني. وتوجد على مستوى الجدر الخلوية للفطريات مجموعة من اللجند ligand تقوم بمخيلة المعادن، وهي تشمل مجاميع كل من الكربوكسيل، الأمين، الهيدروكسيل، الفوسفات والسلفاهيدريل. يمكن لأيونات المعادن أن

تدمص من خلال تكوين معقدات مع مراكز التفاعل السالبة الشحنة والتي تتواجد على مستوى السطح الخلوي (Gupa وآخرون، 2000). إنّ الأهمية والدور النسبي لكل مجموعة وظيفية غالبا يصعب تحديده.

إنّ الجدار الخلوي للميكروبات يكون غنيا بعديدات السكاكر والجليكوبروتينات مثل الجليكانات (glucan)، الكيتين (chitin)، الـ monans، الـ phospho-manans. تكون هذه البوليمرات مصدرا واسع الإنتشار للـ ligand التي ترتبط بالمعادن. إنّ الجدر الخلوية في الفطريات تكون هيكلا متعدد الطبقات تمثل فيها عديدات السكاكر الأمينية وغير الأمينية أكثر من 90 % (Farkas، 1980). وعموما فإنّ الجدار الخلوي للفطريات يمكن اعتباره نظاما يتكون من طورين، حيث يتكون أساسا من نسبة عالية من الكيتين المكونة للهيكل مطمور في حشوة من عديدات السكاكر المطاطة وغير البلورية (الإطار هيكلي) (Farkas، 1980). أكثر من 30 % من الكتلة الحيوية لفطر *Aspergillus niger* تتكون من تجمع كل من الكيتين والجلوكان (Muzzorilli و Tranfari، 1982). يعتقد أنّ الكيتين لا يلعب دورا هاما في امتصاص المعادن فقد أوضح Muraleedharan و Venkobachar (1990) أنّ فطر *Ganoderma lucidum* ينخفض به الامتصاص انخفاضا بسيطا جدا عندما يتم فصل الكيتين عن المدمص الحيوي مما يشير إلى أنّ الكيتين لا يلعب دورا هاما في هذا النظام على مستوى هذا الفطر. أوضحت الدراسات عن طريق أطيف الزئبق المغنطيسي الإلكتروني المدمص الحيوي وجود جذور حرة ( غير معروفة) بحشوة الجدار الخلوي والتي تتفاعل مع المعدن مؤدية إلى ارتباط المعدن بالخلايا. بينت دراسات أخرى على الفطريات أنّ مجاميع الفوسفات والكاربوكسيل للجدار الخلوي تمثل المركز الأول للارتباط بالمعادن (Ahluwalia و Goyal، 2007).

إنّ تحديد الآلية الدقيقة لارتباط المعادن يكون أيضا متعسرا بسبب كيمياء المحاليل المعقدة للمعادن ونتيجة صعوبة تحديد المعقد الذي يرتبط بالمعدن بدقة في المحلول (Tobin وآخرون، 1984)، إذ يصعب إخضاعه للتحليل بالأجهزة.

توجد فروق في تآلف كل من العناصر وأنواعها الأيونية مع الـ ligand الموجودة في الأنظمة البيولوجية، وبما أنّ التركيب الكيميائي للجدار الخلوي للفطريات يتباين حسب الأنواع فإنّ الكفاءة الأمتصاصية للمعادن تختلف من نوع لآخر. ومع هذا فقد أمكن تحديد أماكن ارتباط المعادن باستخدام المجهر الإلكتروني وتحاليل الانتشار الطاقوي للأشعة السينية. إنّ التحاليل الكيميائية عن طريق مطيافية الألكترونات الضوئية للأشعة السينية X تعتبر نسبيّا طريقة حديثة في تحديد طاقة ربط الإلكترونات في الذرات والجزيئات والذي يعتمد بدوره على الشحنات التكافئية وبالتالي يمكن أن يعطي فكرة عن الحالة التأكسدية للذرة أو الأيون (Gupta وآخرون، 2000).

إنّ الامتصاص الحيوي ظاهرة سريعة يتم من خلالها حجز المعدن عن طريق الامتصاص السلبي بواسطة الكتلة الحيوية للكائنات الغير الحية (Beveridge، Doyle، 1989)، وتعتمد كفاءة

الادمصاص الحيوي على العديد من العوامل من بينها قدرة و ألفة و نوعية المادة ذات الادمصاص الحيوي و كذا الظروف الكيميائية و الفيزيائية للوسط الذي تتواجد به هذه المادة، وإن معرفة و فهم الآلية التي تراكم بها الكائنات الدقيقة المعادن هامة جدا في تطبيق أنظمة ومسارات ميكروبية لاستصلاح أو إزالة أو زيادة تركيز المعادن في المحاليل المائية.

لوحظ بصفة عامة أنّ الادمصاص الحيوي لأيونات المعادن الثقيلة بواسطة الكائنات الدقيقة يظهر على مرحلتين: امتصاص أولي سريع يعود إلى الادمصاص السطحي للجدر الخلوية يتبعه بعد ذلك امتصاص بطيء يعود للنقل الغشائي لأيونات المعدن إلى داخل سيتوبلازم الخلايا. يمثل الادمصاص السطحي ظاهرة كيميائية فيزيائية. وبم أنّ الجدر الخلوية للعديد من الكائنات الدقيقة تتكون من عديدات السكار و البروتينات والدهون فبالنتالي فإنها تمنح حشدا من المجاميع الوظيفية القابلة للارتباط مع المعادن الثقيلة . إنّ هذه المجاميع الوظيفية مثل مجامع الأمين، الكربوكسيل، الفوسفات والثيول تختلف في مدى ألفة وتتنوع ارتباطها بالمعدن.

إنّ كمية توازن ارتباط أيون المعدن على السطح الخلوي يمكن تحديدها من خلايا الألفة النسبية لهذه المراكز مع المعادن السامة والكاتيونات الأخرى الموجودة في المحلول والتراكيز المتبقية لأيونات هذا المعدن التي لم تمتص من المحلول.

ينتقل أيون المعدن المرتبط بالسطح إلى السيتوبلازم من خلال حواجز الانتشار الموجود على مستوى الغشاء الخلوي. وبما أنّ الكتلة الحيوية للخلايا المثبتة تمنح عددا محدودا من مراكز الارتباط السطحي فإنّ الامتصاص الأولي والذي يكون عبارة عن ادمصاص سطحي يتوقع أنه يبدي حركات تشبيعية (saturation kinetics) بزيادة تركيز المعدن. إن توافق الادمصاص مع نموذج النقل الغشائي لوحظ سابقا في حالة استخدام الأيونات المعدنية المفردة. كما هو ملاحظ من فإنّ معدل الادمصاص يكون عاليا في البداية ثم يصبح المنحني بعد ذلك مستويا. بينت معطيات حول معدل ادمصاص أيونات المعادن الثقيلة وجود تباين كبير في زمن الادمصاص فمثلا يكون زمن اتزان الادمصاص الحيوي للكروم بواسطة الكتلة الحيوية المثبتة أو الميتة لفطر *Rhizopus arrhizus* ساعتان، أمّا معدل الادمصاص الحيوي الحيوي للـ *Phanerochaete chrysosporium* فقد ظلّ ثابتا ويصل إلى مرحلة التشبع خلال ساعتين. كما أنّ اتزان الادمصاص الحيوي للكتلة الحيوية لفطر *A. niger* فقد بلغ 5 ساعات (Saglam وآخرون، 2002). تجدر الإشارة إلى أنّ هناك العديد من العوامل التي تحدد معدل الإدمصاص الحيوي مثل معدل الـStirring، الخواص البنوية للحامل (support) ومادة الادمصاص الحيوي مثل تركيب كل من البروتينات والكربوهيدرات، كثافة الشحنة السطحية، مساحة و طبوغرافيا السطح، كمية المادة المدمصة (Sorbent) خواص الأيون قيد الدراسة، التركيز الأولي للأنواع الأيونية، وجود أيونات معادن أخرى والتي يمكن أن تتنافس مع النوع الأيوني المدروس على مراكز الادمصاص الحيوي، لذا توجد صعوبة في مقارنة معدلات الادمصاص المسجلة.

## 5-6 خاتمة وأفاق

إنّ النتائج المتحصل عليها مقنعة وسعة ارتباط الزئبق بالكتلة الحيوية للفطرين المدروسين يمكن أن تكون متماثلة مع راتنج التبادل الكاتيوني، وقد تبين أن سعة الإدمصاص يمكن تقييمها بمنحنيات التعادل الحراري التي تبينها نماذج كل من Freundlich و Langmuir.

وقد تبين من هذه الدراسة أنّ التجديد باستخدام الماء المقطر وحده يمكن أن يساعد في استرجاع سعة ادمصاص أيونات  $Hg^{2+}$  وقد يعود هذا إلى التركيز المستخدم عند كل دورة ادمصاص/استرجاع في الدراسة (10 µg/ml). وتبقى الأفاق في دراسة دور الأملاح المعدنية التي يمكن أن توجد في المياه الطبيعية وعلاقتها بالإدمصاص الحيوي إذ قد يشجع عدم تداخل هذه الأملاح في عملية إدمصاص المعادن الثقيلة استخدام المياه الطبيعية دون اللجوء إلى الماء المقطر.

كما بينت هذه الدراسة من خلال أسترة مجاميع الكربوكسيل أنّها يمكن أن تساهم في ادمصاص الزئبق بالكتلة الحيوية للفطريات عن طريق ارتباطها بأيونات  $Hg^{2+}$ . إنّ التحول الحيوي للمعادن الثقيلة ظاهرة معروفة على مستوى الأنظمة الميكروبية لذا فإنّ استخدام الخلايا الحية في الاستصلاح الحيوي يكون محدود المردود فضلا عن أنّ الاستعمال المتجدد للخلايا الحية طريقة غير عملية. إنّ خاصية اختزال الميكروبات للزئبق الأيوني ( $Hg^{2+}$ ) إلى زئبق معدني ( $Hg^0$ ) استخدمت لإزالة التلوث من المحيط، إلا أنّ هذه الطريقة تساعد فقط في تحرير الزئبق من التربة أو من المياه وتحويله إلى الغلاف الجوي، لذ فإنّ هذا التحويل الحيوي له اقتدار ضئيل علة إزالة التلوث بالزئبق.

صحيح أنّ النظام الذي تمّ اقتراحه في هذه الدراسة والمتمثل في استخدام الكتلة الحيوية غير النشطة للفطريات يحتاج إلى مواصلة البحث لمعرفة طبيعة هذه التحولات إلا أنّ جانبه التطبيقي والمتمثل في الاستعمال المتجدد لدمص ذومصدر حيوي (الكتلة الحيوية غير النشطة للفطريات) يتميز بسعة ارتباط جيدة تعتبر إيجابية يمكن أن تؤخذ بعين الاعتبار وذلك لأنّه قد يساهم في استخلاص كل أنواع الزئبق التي تلتف مع مخلفات المصانع المائية.

ووفقا للنتائج المتحصل عليها من هذه الدراسة يمكننا أن نقترح أنّ مستحضرات الكتلة الحيوية غير النشطة للفطر *A. tubingensis* والتي كانت أكثر كفاءة في امتصاص الزئبق واسترجاعه أو أي نوع فطري قريب منه وراثيا يمكن أن تعتبر مواد بيولوجية يمكن استخدامها بصورة جيدة في عملية إزالة المواد الملوثة بمركبات الزئبق واختبار كفاءتها في ادمصاص المعادن الثقيلة عموما.

إنّ إزالة المعادن الثقيلة من المحاليل المائية باستخدام الكتل الحيوية الميتة أو غير النشطة يعتبر ابتكارا وحلا وخيارا تكنولوجيا لإزالة هذه الملوثات الخطيرة، وتمثل الكتل الحيوية غير الحية لكل من الطحالب والسراخس المائية وكذا الكتل الحيوية المتخلفة عن صرف بقايا كل من النباتات والفطريات

من مصانع وصناعات التخمر مدمصات حيوية هامة لإزالة المعادن من المحاليل المائية ومن مياه الصرف.

كميات هامة جدا من هذا الزخم الطبيعي غير المكلف والمنتشر في البيئة يمكن أن تستخدم كدمصات، وكفاءة الإدمصاص تعتمد على العديد من العوامل والتي تضم كلا من مدى كل من سعة وألفة ونوعية المدمص الحيوي والظروف الفيزيائية والكيميائية التي تسود في المجرى المائي المتخلف. إنّ أنظمة إزالة المعادن عن طريق الإدمصاص الحيوي ليس بالضرورة أنها تحمل محل أنظمة وطرق المعالجة المستخدمة حاليا ولكن يمكن أن تكملها.



# 6- الملخص

## 7- الملخص

بغرض تقييم وتحديد معدل وتوزيع الزئبق في التربة المحيطة بمصنع استخلاص الزئبق الموجود بمنطقة عزابة بالشرق الجزائري ولأول مرة بعد أن تمّ غلقه منذ عام 2004 ومدى تأثيره على انتشار الفطريات في التربة فقد تمّ تقدير الزئبق الكلي ودراسة الخواص الفيزيائية والكيميائية للتربة وكذا عزل وتنقية وتعريف الفطريات من التربة في 18 موقعا تمّ تقسيمها على أساس البعد عن المصنع إلى 4 مجاميع: D1 (2300-870 متر)، D2 (2600-3250 متر)، D3 (4500-5000 متر) D4 (6300-6850 متر) وهذا بكل من الطبقة السطحية (0-20 سم) والطبقة تحت السطحية (20-40 سم). كما أجريت دراسة حول تأثير الزئبق على الفطريات المعزولة لتحديد الأنواع الحساسة والأنواع المقاومة وذلك من خلال تنميتها على بيئات تحتوي على تراكيز مختلفة من الزئبق في صورة  $HgCl_2$ . لدى الأنواع المقاومة لعنصر الزئبق تمّ تحديد آليات المقاومة وذلك من خلال دراسة الترمك الحيوي للزئبق، الأحماض الدهنية، الأحماض العضوية، المركبات الثيولية، الأيضيات الثانوية، الأحماض الأمينية، البروتينات. ولتوضيح مظهر تأثير الزئبق على الفطريات فقد تمّ دراسة الإجهاد التأكسدي المحرض بالزئبق على فطرين مقاومين وذلك من خلال تقدير النشاط الأنزيمي للنزيمات المضادة للأكسدة، (SOD) superoxide dismutase، catalase، glutathione peroxidase. وتمّ إبراز ذلك من خلال نظام تحليل الصورة بالمجهر الضوئي ودراسة العضيات الخلوية عن طريق المجهر الإلكتروني وإجراء دراسة جزيئية عن طريق التحليل باستخدام تقنية RAPD-PCR. وبغرض البحث عن إمكانية استخدام الكتلة الحيوية في التخلص من الزئبق الذي يلفظ مع مياه الصرف المتخلفة عن بعض النشاطات الصناعية للزئبق واستعادته للاستعمال مرة أخرى دون أن ينجم عن ذلك تلوث بيئي فقد أجريت دراسة حول الإدمصاص الحيوي للزئبق بواسطة ميسيليوم الفطريات المقاومة ثم تحديد منحنيات التعادل الحراري التي يمكن أن تصف عملية الإدمصاص.

أوضح تصنيف التربة أنها طينية في خمسة مواقع وطينية رملية في ثلاثة مواقع وطينية سلتية في الباقي وتتميز بمحتوى منخفض من المادة العضوية وسعة تبادل كتيونية متوسطة وهي حامضية وتشتد حموضتها بالمواقع المحاذاة لبقايا المصنع. بيّن التحليل عن طريق الـAPC أنّ الـpH يمثل العامل الأكثر تأثيرا في تنظيم سلوك بقية خواص التربة. إنّ الزئبق الذي تراكم في الطبقة السطحية قد انخفض مع زيادة كل من العمق والبعد عن بقايا المصنع. أظهر ارتباط Pearson أنّ ارتباط تركيز الزئبق كان عكسيا وعاليا جدا بالـpH ( $r = -0.88$ ) وعاليا بمحتوى الرمل ( $r = 0.71$ ). على أساس محتوى الطين ونسبة المادة العضوية فقد أمكن تحديد الحد الأدنى المسموح به للزئبق في المنطقة المدروسة بـ  $1.16 \mu g/g$ . إنّ تربة المواقع المجاورة لبقايا المصنع والتي تجاوز بها تركيز الزئبق بالطبقة السطحية الحد الأدنى المسموح به فيمكن اعتبارها ملوثة بينما باقي المواقع تعتبر خارج

مجال التلوث. معدل تركيز الزئبق الذائب في كل العينات المدروسة كان دون الحد الأدنى للقياس. تمثلت الفطريات التي أمكن عزلها عريفها في 9 أنواع هي *A. niveus* ، *A. tubingensis* ، *E. cladosporium* ، *T. atraviride* ، *T. viride* ، *P. viridicatum* ، *P. citrinum* ، *M. racemosum* ، *tuburum* . وكان أكثرها سيادة في الطبقة السطحية فطري *A. tubingensis* ، وذلك بتردد قدره  $4.10 \pm 23$  % و  $3.99 \pm 18.11$  % على الترتيب. بينت الدراسة الإحصائية عن طريق تحليل المكونات الرئيسية (APC) أنّ البعد عن بقايا موقع المصنع يمثل العامل الأكثر تأثيراً في توزيع الفطريات بالمنطقة المدروسة. تباينت الفطريات في مدى استجابتها لتأثير الزئبق وكان أكثرها مقاومة فطري *A. niveus* ، *A. tubingensis* . ومهما كانت مقاومة الفطريات فإنّ للزئبق تأثير ضار على الفطرين المدروسين. تجلّى هذا التأثير على المستوى المورفولوجي في اختزال كل من الكونيديات، الرأس الكونيدية، عرض الهيفات والحوامل الكونيدية. أمّا على المستوى الخلوي فقد تجلّى هذا الأثر في صور متمزق في الجدا السيلولوزي، وانفصال للغشاء السيتوبلازمي، وتشوه في العضيات الخلوية (الميتوكوندريا، الفجوات العصارية، والشبكة الأندوبلازمية). وأمّا الإجهاد التأكسدي المحرض بالزئبق فقد تميز بحدوث خلل في النشاط الأنزيمي للأنزيمات المضادة للأكسدة. بيّن التحليل عن طريق RAPD-PCR ظهور عصابات جينية متباينة بين السلالتين الفطريتين المدروستين مما يعكس الدور الرئيسي للمحتوى الوراثي في مقاومة فطريات التربة للزئبق. إن ادمصاص الزئبق بواسطة الكتلة الحيوية غير النشطة للفطرين تحكمه منحنيات التعديل الحراري التابعة لنموذجي Freundlich و Langmuir، ولكن بما أنّ معامل الارتباط للانحدار الخطي لمعادلة Freundlich كان أعلى فيمكن اعتبار منحنى التعادل الحراري لـ Freundlich أكفأ في وصف ادمصاص الزئبق بواسطة الكتلة الحيوية غير النشطة لكلا الفطرين المدروسين. كما أنّ استرجاع الزئبق من الكتلة الحيوية غير النشطة لفطر *A. tubingensis* تجاوز 90 % مما يسمح بإمكانية إعادة استخدامها في استعادة الزئبق من محاليله المائية.

## Effect of mercury pollution on the distribution of soil fungi at the district of Azzaba.

### Abstract

This is the first ever study concerned with evaluation of the contents and distribution of mercury at the vicinity of the closed factory of mercury located at Azzaba district, Eastern Algeria, since its closure. Total mercury content, as well as the physicochemical characteristics of the agricultural soils was studied in 18 sites. The soil specimens were collected from the sites of the study in two levels of depth: a) 0 – 20 cm and b) 20-40 cm. The sites of study were divided into four groups designated D1-D4 according to the distance from the mercury factory remains; D1 (870-2300m) D2 (2600-3250), D3 (4500-5000m) and D4 (6300-6850m). Distribution of fungi in the soil correlated to the concentrations of mercury was the parameter of this study. The fungal ecology of (the zone) of study was investigated. The fungi were isolated, purified and identified from the shallow soil specimens collected from all the sites of the study. The effect of mercury on the isolated fungi was studied. Fungal isolates were grown in media containing different concentrations of  $HgCl_2$  as sources of mercury among those isolates. In addition, the mechanisms of resistance to mercury in the mercury resistant isolated fungi were studied via bioaccumulation, analysis of fatty acid, amino acids, organic acids, thiols, secondary metabolites, and proteins in fungi. The mercury induced oxidant stress on two mercury resistant fungal isolates, *A. tubingensis* and *A. niveus*, was studied through the determination of the antioxidant enzymatic activity of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase. This was illustrated through analysis of the fungal morphology as seen by light microscopy and the study of cellular organelles as seen by electron microscopy and as confirmed by RAPD-PCR manipulation. The possibility of using the fungal biomass to scavenge the mercury released into drainage water of mercurial industries and recover it for further use without any environmental pollution was studied. This was achieved by adsorption of mercury by the inactivated fungal mycelia of mercury resistant fungi. The isotherm curves which control the adsorption processes were determined. Texture classification of the soil showed that the soils were clay in 5 sites, sandy clay beam in 3 sites, and silty beam in the other sites. Study of the pH of the soil specimens showed that all of the specimens were acidic and the acidity increases as the sites become closer to the mercury factory remains. All the studied soil specimens showed low content of the organic matter. The calcium carbonate content of the studied soil specimens (as a parameter of their calcium content) indicated the decrease of  $CaCO_3$  in the soil with the increase in distance far from the factory remains. No difference in  $CaCO_3$  content was detected on the two studied depths. The cation exchange capacity of the studied soil specimens showed

medium levels. Analysis of principal component (APC) indicates that the pH is the dominant factor which controls the behavior of the other soil characteristics. Mercury, prevailing in the topsoil specimens decreased with depth and distance away from the factory. Pearson's coefficient reveals that mercury is very highly negatively correlated with the pH ( $r = - 0.88$ ) and highly positively correlated with sand ( $r = 0.71$ ). According to the content of clay and organic in the soil of the studied zone, using the equation of Adriano et al, 1995, at 1.16  $\mu\text{g/g}$ . Topsoil specimens of the site located close to the factory remains are considered polluted because their total mercury content exceeded the admissible limit mentioned above. The concentration of mercury in the other sites studied and in deep soil specimens of all sites were within the admissible limit. The amount of water soluble mercury in all of the studied samples was beyond the limit of detection. Nine fungal species were isolated during the current study. This includes *A. tubingensis*, *A. niveus*, *P. citrinum*, *P. viridicatum*, *T. viride*, *T. atraviride*, *F. cladosporium*, *E. tuburum*, *M. racemoum*. The most prominent fungi in the topsoil specimens were *A. tubingensis* and *A. niveus* with a frequency of  $23.77 \pm 4.10 \%$  and  $18.11 \pm 3.99 \%$  respectively. APC analysis indicated that the distance from the mercury factory remains was the critical factor in determining the distribution of the fungal ecology in the studied area. The isolated fungi differed in their response to the presence of  $\text{HgCl}_2$  in the growth medium. The most mercury resistant isolate were *A. Tubingensis* and *A. niveus*. It found that mercury has an adverse effect on their cellular level. It causes oxidant stress in the mercury resistant fungi, through their effect in the activity of antioxidant enzymes. The harmful effect of mercury at the two species is expressed at the morphological level by the reduction of the conidia, the head conidial and the reduction in the width of the hyphae and the conidiophores. At the cellular level, it is translated by a tearing of the cellulose wall, a distance of the cytoplasmic membrane and a deformation of the cellular organelles (mitochondria, vacuoles, endoplasmic reticulum). The oxidative stress caused by mercury is characterized by the disturbance of the enzymatic activity of the enzymes antioxidants. Analysis RAPD-PCR revealed new different bands genomic between the two species, which reflects the capital role of the hereditary potential of resistance fungi of soil to mercury. The adsorption of mercury by the inactive biomass of the two resistant species is controlled by isotherms belonging to the models of Langmuir and Freundlich. Considering the very significant coefficient of correlation of the linear regression of the isotherm of Freundlich, it could better be placed for the description of the adsorption of mercury by the inactivated biomass of the two studied species. The desorption of mercury by the inactive biomass of species *A. tubingensis* is about more 90 % what allows its re-use for the recovery of mercury from their aqueous solutions.

## **Impact de pollution par le mercure sur la répartition des champignons du sol dans la région de Azzaba**

### **Résumé**

Dans le cadre de cette étude nous nous proposons, dans une première étape, d'évaluer la teneur en mercure total (Hg) dans les sols à vocation agricole situés au voisinage de l'ancienne usine de mercure d'Azzaba (wilaya de Skikda-Est Algérien), fermée, il y a de cela trois ans. Afin de mettre en évidence les phénomènes de microvariabilité et l'influence de l'usine sur le profil mercuriel, tant vertical qu'horizontal, nous avons procédé à des prélèvements de sol en surface et en profondeur. Ainsi 18 sites ont été choisis et répartis en quatre groupes selon leur distance par rapport à l'usine, D1 (870-2300 m), D2 (2600-3250 m), D3 (4500-5000 m) et D4 (6300-6850 m). Les prélèvements en profondeur se font à 0-20 et 20-40 cm de profondeur. Dans une seconde étape, l'étude de la distribution des champignons du sol corrélée à la concentration du mercure fut notre objectif primordial. Ainsi, les mycètes des échantillons collectés de la profondeur 0-20 cm ont été isolées, purifiées et identifiées. L'impact du mercure sur les espèces isolées a été évalué en utilisant des milieux de cultures contenant différentes concentrations de mercure sous forme de  $HgCl_2$ . Les mécanismes de la résistance au mercure chez les espèces résistantes furent élucidés par le biais de la bioaccumulation du mercure, le dosage des acides organiques, les acides gras, les acides aminés, les protéines, les thiols et les métabolites secondaires. Le stress oxydant provoqué par le mercure a été étudié en dosant l'activité enzymatique des enzymes antioxydants, la superoxide dismutase (SOD), la catalase (CAT), et la glutathione peroxidase (GPX). L'effet du mercure a été illustré au niveau morphologique par microscopie optique, au niveau des organites cellulaires par microscopie électronique et au niveau moléculaire par des analyses RAPD-PCR. L'adsorption du mercure par la biomasse inactive des espèces résistantes fut déterminée par les constantes des isothermes qui gouvernent ce phénomène.

L'analyse granulométrique a mis en évidence cinq sites de à texture argileuse; trois sites appartenant à la classe Loamo-argilosableuse et le reste Laomo-limoneux. Parallèlement aux analyses physico-chimiques, nous avons mené une étude statistique (APC). Les résultats de l'analyse statistique ont démontré que le pH est le facteur dominant. Une forte corrélation négative mais hautement significative existe entre le pH et la teneur en mercure avec un coefficient  $r = -0.88$ ; et une corrélation très significative entre le pH et la teneur en sable ( $r = 0.71$ ). Enfin les résultats obtenus montrent que les teneurs en mercure diminuent avec la profondeur et l'éloignement par rapport à l'usine et restent en deçà de la valeur norme tolérée en fonction de la teneur en argile et en matière organique et qui est de  $1.16 \mu g/g$ . Par contre, cette valeur est largement dépassée en surface dans les sites situés au

voisinage de l'usine. Le taux du mercure hydrosoluble était inférieur à la limite de détection dans tous les échantillons étudiés.

Ce travail a permis d'obtenir de neuf espèces fongiques : *A. tubingensis*, *A. niveus*, *P. citrinum*, *P. viridicatum*, *T. viride*, *T. atraviride*, *F. cladosporium*, *E. tuburum*, *M. racemoum*. Les deux espèces *A. tubingensis* et *A. niveus* sont les plus dominantes avec une fréquence de  $23.77 \pm 4.10$  % et  $18.11 \pm 3.99$  %. L'étude statistique (APC) a montré que la distance par rapport à l'usine est le facteur le plus important dans la répartition des champignons du sol de la zone étudiée. L'étude de la tolérance des espèces isolées au mercure a confirmé que *A. tubingensis* et *A. niveus* sont les plus résistantes; seulement les paramètres du mécanisme de la résistance, sélectionnés dans notre étude, ont révélé une variabilité très importante entre les deux espèces.

L'effet nocif du mercure chez les deux espèces est manifesté au niveau morphologique par la réduction des conidies, de la tête conidienne et la diminution de la largeur des hyphes et des conidiophores. Au niveau cellulaire, il est traduit par un déchirement de la paroi cellulosique, un éloignement de la membrane cytoplasmique et une déformation des organites cellulaires (mitochondries, vacuoles, réticulum endoplasmique). Le stress oxydant provoqué par le mercure est caractérisé par la perturbation de l'activité enzymatique des enzymes antioxydantes. L'analyse RAPD-PCR a fait apparaître de nouvelles bandes génomiques différentes entre les deux espèces, ce qui reflète le rôle capital du potentiel héréditaire de la résistance au mercure chez les champignons du sol.

L'adsorption du mercure par la biomasse inactive des deux espèces résistantes est gouvernée par des isothermes appartenant aux modèles de Langmuir et Freundlich. Vu le coefficient de corrélation très important de l'isotherme de Freundlich, il pourrait être mieux placé pour la description de l'adsorption du mercure par la biomasse inactive des deux mycètes étudiés. La désorption du mercure par la biomasse inactive de l'espèce *A. tubingensis* est de l'ordre de plus 90 % ce qui permet sa réutilisation pour la récupération du mercure de ses solutions aqueuses.

# ١- العرض الجمعي



1. **Abyaneh MP ; Ghehfarokhi, M,S ; Kawachi, M ; Eslamifar A Schmidt OJ, Schmidt , A ; Allameh , A ; Joshi nari, T ; (2006)** . Ultrastructural evidences of growth intibitory effects of a novel biocide, Kacid on a aflatoxicenic. *Aspergillus parasiticus Toxicin* 48: 1075-1082
2. **Adachi H, Ishii N, (2000)**. Effects of tokotrienols on life span and protein carbonylation in *Caenorhabditis elegans*. *Journals of Gerontology, Series A, Biological and Medical Sciences* 55: B280-B285
3. **Adriano, D.C. ; Chlopecka, A. ; Kaplan, D.I. Clusters, H.; Vangronsveld, J. (1995)**. Soil contamination and remediation: philosophy, science and technology. Contaminated soils, 3<sup>rd</sup> International Conference on the Biogeochemistry of Trace elements, Paris (France), May, 15-19, 1995.
4. **Ahluwalia, S.S; Goyal, D. (2007)**. Microbial and plant derived biomass for removal of heary metals from wastewater. *Bioresource technol*, 98, 2243-2257.
5. **Arnebrant K, Baath E, Nordgren A (1987)** Copper tolerance of microfungi isolated from polluted and unpolluted forest soil. *Mycologia* 79:890 -895.
6. **Ashworth, L.J.; J.R. Amin, J. V. (1964)**. A mechanism for mercury tolerance in fungi. *Phytopathology* 54, 1459-1463.
7. **Baath, E (1991)**. Tolerance of copper by entomogenous fungi and the use of copper-amended media for isolation of entomogenous fungi from soil .*Mycol Res* 95: 1140-1152.
8. **Bai, Z, Harvey LM, McNeil, B. (2003)**. Oxidative stress in submerged cultures of fungi. *Crit Rev Biotechnol*; 23:267-302.
9. **Baldrian P, Gabriel J, Nerud, F. (1996)**. Effect of cadmium on the ligninolytic activity of *Stereum hirsutum* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Folia Microbiol*;41:363-7.
10. **Baldrian P, Gabriel J. (1997)**.Effect of heavy metals on the growth of selected wood-rotting basidiomycetes. *Folia Microbiol*;42: 521-3.
11. **Baldrian, P. (2003)**. Interaction of heavy metals with white- rot fungi. *Enz Micidsiol*, 32, 78-91.
12. **Barkay T, Miller SM, Summers A.O (2003)**. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* 27:355–384

13. **Barkay T, Miller SM, Summers AO (2003).** Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* 27:355-384.
14. **Bath, E, Soderstrom, B. (1980)** .Comparison of the agar film and membrane filter methods for the estimation of hyphal lengths in soil with particular reference the effect of magnification. *Soil Biol Biochem* 12:385- 387.
15. **Begley TP, Ealick SE (2004).** Enzymatic reactions involving novel mechanisms of carbonation stabilization. *Curr opin Chem Biol* 8:508-515.
16. **Benison GC, Di Lello P, Shokes JE, Cospers NJ, Scott RA, Legault P, Omichinski JG (2004)** .A stable mercury-containing complex of the organomercurial lyase MerB: catalysis, product release, and direct transfer to MerA. *Biochemistry*
17. **Beveridge, T.C., Doyle, R.J., (1989).** *Metal Ions and Bacteria.* Wiley Interscience, New York.
18. **Biester, H.; Müller, G.; Schöler, H.F. (2002 a).** Estimating distribution and retention of mercury in Three different soils contaminated by emissions from chlor-alkali plants: part I. *Science of the Total Environment* 284, 177–189.
19. **Biester, H.; Müller, G.; Schöler, H.F. (2002 b).** Binding and mobility of mercury in soils contaminated by emissions from chlor-alkali plants/ *Science of the Total Environment* 284, 191–203.
20. **Birgersson, B., Drakenberg, T. & Neville, G. A. (1973).** Mercury (II) complexes of methionine. *Acta Chemica Scandinavica* 27, 3953-3960.
21. **Brown, N. L., C.-L. Choi, J. Grinsted, M. H. Richmond, and P. R. Whitehead. (1980).** Nucleotide sequences at the ends of the mercury resistance transposon, Tn501. *Nucleic Acids Res.* 8:1933-1945.
22. **Champier L, Duarte V, Michaud-Soret I, Coves J (2004).** Characterization of the MerD protein from *Ralstonia metallidurans* CH34: a possible role in bacterial mercury resistance by switching off induction of the mer operon. *Mol Microbiol* 52:1475-1485.
23. **Champier L, Duarte V, Michaud-Soret I, Coves J (2004).** Characterization of the MerD protein from *Ralstonia metallidurans* CH34: a possible role in bacterial mercury resistance by switching off the induction of the mer operon. *Mol Microbiol* 52:1475–1485
24. **Cook RC, Rayner ADM (1984).** *Ecology of saprotrophic fungi.* Longman, London.

25. **Cottenie, A. ; Verloo, M. ; Velghe, G. ; Kiekens, L. (1979).** Analytical methods for plants and soils. Laboratory of Analytical and Agrochemistry State, University of Ghent-Belgium, p 21-38
26. **Dameron, C. T., Smith, B. R. & Winge, D. R. (1989).** Glutathione-coated cadmium-sulphide crystallites in *Candida glabrata*. *The Journal of Biological Chemistry* 264: 17355-17360.
27. **Deleo, P.C.; Ehrlich. H.L (1994).** Réduction of hexavalent chromium by *Pseudomonas fluorescens* LB 300 in batch and continuous cultures. *Appl Microbiol. Biotech* 40: 765-759.
28. **Dhawale, S.S.; Lane, A.C.; Dhawale, S.W. (1996).** Effects of mercury on the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 56, 397-407
29. **Do Valle C.M.; Santana; G.P.; Augusti, R.; Egreja Filho, F.B.; Windmüller, C.C. (2005).** Speciation and quantification of mercury in Oxisol, Ultisol, and Spodosol from Amazon (Manaus, Brazil). *Chemosphere* 58, 779–792.
30. **Doelman, P. (1985).** Resistance of soil microbial communities to heavy metals. In: Jensen V, Kjoller A, Sorensen LH (eds) *Microbial communities in soil*. Elsevier, London, pp 369-384.
31. **Domsch K. H., Gams W. and Anderson T. H. (1980).** *Compendium of Soil Fungi*. Academic Press, London.
32. **Ellman, G. L. (1959).** Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 82: 70-77.
33. **Emri, T., Pocs, I., Szentirmai, A., (1998).** Analysis of the oxidative stress response of *Penicillium chrysogenum* to menadione. *Free Radical Research* 30, 125-132
34. **Engst S, Miller SM (1999).** Alternative routes for entry of HgX<sub>2</sub> into the active site of mercuric ion reductase depend on the nature of the X ligands. *Biochemistry* 38:3519–3529
35. **Engst S, Millet S.M. (1998).** Rapid reduction of Hg(II) by mercuric ion reductase does not require the conserved C-terminal cysteine pair using HgBr<sub>2</sub> as the substrate. *Biochemistry* 37:11496-11507.
36. **Fang, S.C. (1978).** Sorption and transformation of mercury vapor by dry soil. *Environ. Sci. Technol.* 12:285-288.
37. **Farkas, V., (1980).** Biosynthesis of cell wall of fungi. *Microbiological Reviews* 44m 117-141.

38. **Farkas, V., (1980).** Biosynthesis of cell wall of fungi. *Microbiological Reviews* 44, 117-141.
39. **Fitzgerald, W.F. (1995).** Is mercury increasing in the atmosphere ? The need for an atmosphere network. *Water, Air, Soil Pollution* 80, 245-254.
40. **Fritze H, Baath, E. (1993).** Microfungal Species composition and fungal biomass in a coniferous forest soil polluted by alkaline deposition. *Microbial Ecol* 25: 83 -92
41. **Frostgard, A, Tunlid A, Baath E. (1993).** Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. *Appl Environ Microbiol*,59:3605-17.
42. **Furukawa, K., T. Suzuki, and K. Tonomura. (1969).** Decomposition of organic mercurial compounds by mercury-resistant bacteria. *Agric. Biol. Chem.* 33:128-130.
43. **Furukawa, K.,, Tonomura, K. (1969).** Decomposition of organic mercurial compounds by mercury-resistant bacteria, *Agric. Biol. Chem. (Tokyo)*, 33, 128-130
44. **Furukawa, K; Suzuki, T.,Tonomura, K. (1969).**Decomposition of organic mercurial compounds by mercury – resistant bacteria . *Agric. Biol. Chem.* 33:128-130.
45. **Gabriel. J.; Kofronova, O.; Rysolovsky, P (1996).** Accumulation and effect of cadmium in the wood-rotting basidiomycetes *Daedalea quercina* Bull. *Environ. Contam. Toxicol.*, 57, 383-390.
46. **Gadd, G.M . (1993 a)** Interaction of fungi with toxic metals. *New Phytol* 124:25- 60
47. **Gadd, G.M .(1993b).** Microbial formation and transformation of organometallic and organometalloid compounds. *FEMS Microbiol Rev* 11: 297 -316.
48. **Gadd G. M. (1988)** Accumulation of metals by microorganisms and algae. In *Biotechnology — A Comprehensive Treatise* (H. J. Rehm and G. Reed, Eds), pp. 401-133. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
49. **Gadd G.M, (1993).** Interaction of fungal production of citric acid and oxalic acid : importance in metal speciation, physiology and biogeochemical processes. *Adv Micro Phys* 41 : 47-92.
50. **Gadd GM (1990).** Metal tolerance. In: Edwards C (ed) *Microbiology of extreme environments*. Open University press, Milton Keynes, pp 178 -210.

51. **Gadd GM (1992 b)** Metals and microorganisms : a problem of definition .FEMS Microbiol lett 100 : 197 -204
52. **Gadd, G.M., De Rom, L. (1988)**. Biosorption of copper by fungal melanins. Appl. Microbiol. Biotechnol. , 29, 610-619.
53. **Gadd, G.M., Griffiths A.J. (1978)**. Microorganisms and heavy metal toxicity. Microbial Ecol 4: 303 -317
54. **Ghoshal K, Majumder S, Li Z, Bray T.M, Jacob S.T. (1999)**. Transcriptional induction of metallothionein-I and -II genes in the livers of Cu. Zn-superoxide dismutase knockout mice. Biochem Biophys Res Commun, 264 :735-742.
55. **Giordani, R.; Cardenas, M.L, Moulin-Traffort, J.; Regli, P.; (1996)**. Fungicidal activity of latex sap from *Cervia papaya* and antifungal effect of D-(+)- glucisamine on *Candida albicans* growth. Mycoses 39, 103-110.
56. **Gotoh, S. ; Tkudome, S. ; Koga, H. (1978)**. Mercury in soil derived from igneous rock I northern Kyushu, Japan. Soil. Sci. Plant Nutr. 24(3), 391-406.
57. **Greenaway, W. (1971)**. Relationship between mercury resistance and pigment production in *Pyrenophora avenae*. Transactions of the British Mycological Society 56, 37-44.
58. **Greenaway, W. (1972 a)**. Permeability of phenyl-Hg<sup>+</sup>-resistant and phenyl-Hg<sup>+</sup>-susceptible isolates of *Pyrenophora avenae* to the phenyl-Hg<sup>+</sup> ion. Journal of Microbiology 73, 251-255
59. **Greenaway, W. (1972 b)**. Epiflora of oat seed treated with organomercury. Transactions of the British Mycological Society 58, 321-327.
60. **Guimaras-Soares, L ; Felicia, H ; Jaão Bebiano, M ; Cassio, F ; (2006)**. Metal – binding proteins and peptides in the aquatic fungi *fontanospora fusiformis* and *Flagellospora curta* exposed to severe metal stress Sci. Total Environ, 372, 148-156.
61. **Gupta, R., Ahuja, P., Khan, S., Saxena, R.K., Mohapatra, M., (2000)**. Microbial biosorbents: meeting challenges of heavy metals pollution in aqueous solution. Current Science 78 (8), 967-973.
62. **Hamdy, M.K., O.R. Noyes. (1975)**. Formation of methyl mercury by bacteria. Appl. Microbiol. 30: 424-432.
63. **Hart, P.J, Belbirine M.M, Ogihara M.L, Nersissian A.M, Weiss M.S, Valentine J.S, Eisenberg D. (1999)**. A structure-based mechanism for copper-zinc superoxide dismutase. Biochemistry 38: 2167-2178

64. **Hatch, W.R. ; OTT, W ;L. ;(1968).** Determination of sub-microgram quantities of mercury by atomic absorption spectrophotometry. *Analytical Chemistry* 40, 2085-2087.
65. **Higham D., Sadier P. J. and Scawen M. D. (1984).** Cadmium-resistant *Pseudomonas putida* synthesizes novel cadmium proteins. *Science* 125, 1043-1046.
66. **Hiroki, M (1992).** Effects of heavy metal contamination on soil microbial population. *Soil Sci Plant Nutr* 38: 141 -147
67. **Hissler ; C. ; Probst, J. (2006).** Impact of mercury atmospheric deposition on soils and streams in a mountainous catchment (Vosges, France) polluted by Chlor-alkali industrial activity: The important trapping role of the organic matter. *Science of the Total Environment* 361, 163–178.
68. Hobman JL, Wilkie J, Brown NL (2005) A design for life: prokaryotic metal-binding MerR family regulators, *Biometlas* 18:429-436.
69. Hogg T.J., J.W.B. Stewart, and J.R. Bettany. 1978. Influence of the chemical form of mercury on its adsorption and ability to leach through soils. *J. Environ. Qual.* 7:440-444.
70. **Hughes M.N, Poole R.K (1991).** Metal speciation and microbial growth – the hard and soft facts. *J Gen Microbiol* 137: 725 -734
71. **Izumi Y, Furuya Y, Yamada H. (1990).** Purification and properties of pyranose oxidase from basidiomycetous fungus 52. *Agric Biol Chem*,54:1393-9.
72. **Jamieson, D.J., (1995).** The effect of oxidative stress on *Saccharomyces cerevisiae*. *Redox Report* 1, 89-95.
73. **Jenson, S. A.; Jernelov, A. (1969).** Biological methylation of mercury in aquatic organisms, *Nature*, 223, 753-754
74. **Joho M.; Imai M, Murayama T. (1985).** Different distribution of  $Cd^{2+}$  between Cd-sensitive and Cd-resistant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol*,131:53-56.
75. **Kakeliya, S.A. ; Ambokadze, A.N.; Gudushauri, M.P. (1976).** Characteristic of distribution of mercury mineralization in the ore provinces of Mediterranean belt (as illustrated by greater Caucasus and Northern Algeria). *Prob. Geol. Metallog. Kavk* , 90-112 . In *Chimical Abstracts*, 88, 1978.
76. **Kapoor, A. Viraraghavan,T. (1995).** Fungal biosorption and alternative treatment option of heavy metal bearing wastewater : A review .*Biores Technol* 53 : 196.

77. **Kleckner, N. (1981).** Transposable elements in prokaryotes. *Annu. Rev. Genet.* 15:341-404.
78. **Kranty- Rucker, C ; Allard, B ; Schnurer, J. (1996).** Adsoption of II B-metals by three common soil fungi composition and assessment of importance for metal distribution in natural sol systems – *Soil Biol. Biochem*; 28 (7), 967-975.
79. **Lander, L.1971.**Biochemical model for the biological methylation of mercury suggested from methylation studies *in vivo* with *Neurospora crassa* . *Nature (London)* 230:452-454.
80. **Landner, L. (1972).** The biological alkylation of mercury. *Biochemical Journal* 130, 67-69.
81. **Landner, L.W. (1971).** Biochemical model for the biological methylation of mercury suggested from methylation studies *in vivo* with *Neurospora crassa*. *Nature (London)* 230:452-454.
82. **Ledwidge R, Patel B, Dong A, Fiedler D, Falkowski M, Zelikova J, Summers A.O, Pai EF, Miller S.M (2005).**NmerA, the metal binding domain of mercuric ion reductase, removes Hg<sup>2+</sup> from proteins, delivers it to the catalytic core, and protects cells under glutathione-depleted conditions. *Biochemistry* 44:11402-11416.
83. **Li, Z. S., Lu, Y. P., Zhen, R. G., Szczypka, M., Thiele, D.). S Red, P. A: (1997)** A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis (glutathionato) cadmium. *Proceeding of the National Academy of Sciences, USA* 94: 42-47.
84. **Lindqvist, O. ; Johansson, K. ; Aastrop, M. ; Anderson, A. ; Bringmark, L. ; Hovsenius, G. ; Håkanson, L.; Iverflidt, Å.; Meili, M.; Timm, B. (1991).** Mercury in the Swedish environment. *Air, Soil Pollution* 55, 1-261.
85. **Lo, W. Chua H, Jam KH, Bi S.P. (1999).** A comparative investigation on the biosorption of lead by filamentous fungal biomass. *Chemosphere* ; 39 : 2723-36
86. **Macara, I.G.( 1978).** Accommodation of yeast to toxic levels of cadmium ions. *J Gen Microbiol*,104:321-4.
87. **Macnab, N.J. ; Hughes, J.C. ; Howard, G.R. (1997).** Pollution effecte of wastewater sludge application to sndy soils with particular reference to the behaviour of mercury.*Appl. Geochem.* 12, 321-325.
88. **Magyarosy,A ; Laidlaw R,D ; Killas, R, Echer,C ; Clarck.D.S, Keasling.J.D, (2002).** McLean.J, Bevridge TJ(2001). Chromate reduction by a pseudomonad isolated from a site contaminatide with chromated with chromate copper arsenate. *Appl Env*

Microbiol 67(3)

89. **Mandal TK, Baldrian P, Gabriel J, Nerud F, Zadrazil F. (1998).** Effect of mercury on the growth of wood-rotting basidiomycetes *Pleurotus ostreatus*, *Pycnoporus cinnabarinus* and *Serpula lacrymans*. *Chemosphere*, 36: 435.
90. **Mansfield SD, Saddler JN, Gübitz GM. (1998).** Characterization of endoglucanases from the brown-rot fungi *Gloeophyllum sepiarium* and *Gloeophyllum trabeum*. *Enzyme Microb Technol*,23:133-40.
91. **Mathieu, C. ; Pieltain, F. (1998).** Analyse physiques des sols. Techniques & Documentation. p 39-74.
92. **Matsui, C., Nozu, M., Kikumoto, T. & Matsuura, M. (1962).** Electron microscopy of fungus conidia after immersion in mercuric chloride solution. *Phytopathology* 52, 88-90.
93. **MCF (Ministère de la Coopération Française) (1974).** Memento de l'agronomie. Ed., INRA,Paris, p.1591
94. **Mehra R.K, Winge DR (1991).** Metalion resistance in fungi molecular mechanisms and their related expression. *J Cell Biochem* 45 :30-40.
95. **Miersch, J., Barlocher, F., Bruns, I. & Krauss, G.-J. (1997).** Effect of cadmium copper, and zinc on growth and thiol content of aquatic hyphomycetes. *Hydrobiologia* 346: 77-84
96. **Miller, S.M. (1999).** Bacterial detoxification of Hg (II) and organomercurials, *Essays Biochem* 34 : 17-30.
97. **Miura T, Muraoka S, Ogiso T. (1997).** Antioxidant activity of metallothionein compared with reduced glutathione. *Life Sci*,60:301-309.
98. **Purkayastha, R.P., Mitra, A.K., Bhattacharyya, B. (1994).** Uptake and toxicological effects of some heavy metals on *Pleurotus sajor-caju*. *Ectotoxicol. Environ.Safety*, 27, 7-13.
99. **Modak, J.M., Natarajan, K..A. (1995).** Biosorption of metals using non living biomass—a review. *Mineral and Metal Process*, 189-196.
100. **Modak, J.M., Natarajan, K..A., (1995).** Biosorption of metals using non living biomass-a review. *Mineral and Metal Process*, 189-196.
101. **Morrno-Jiménez, E. ; Gamara, R.; Carpena-Ruiz, R.O.; Millan, R.; Peñalosa, J.M. ; Asteban, E. (2006).** Mercury bioaccumulation and phytotoxicity in two wild



- plant species of Almaden area. *Chemosphere* 63, 1969-1973.
102. **Moser, H. C., and A.F. Voight. (1957).** Dismutation of the mercurous 152immer in dilute solutions. *J. Am. Chem. Soc.* 79: 1837 -1839.
103. **Mullen, L.D., Wolf, D.C., Ferris, F.G., Beveridge, T.J., Fleming, C.A., Bailey, G.W., (1989).** Removal of silver from photographic wastewater effluent using *Acinetobacler baumannii* BL54. *Applied Environmental Microbiology* 55, 3143-3149.
104. **Muraleedharan, T.R., Venkobachar, C., (1990).** Mechanism of Biosorption of copper (II) by *Ganoderma lucidium*. *Biotechnology & Bioengineering* 35, 320-325.
105. **Muzzarelli, R.A., Tanfari, F., (1982).** The chelating ability of chitinous material from *Aspergillus niger*, *Streplomyces*, *Mucor rouxii*, *Phycomyces blukeseunus* and *Choamephora curcurnitium* in Chitin and Chitiosan. S. Mirano, S. Tokura (Eds.), *Japanese Society of Chitin and Chitiosan*, pp. 183-186.
106. **Neeta, A.; Abhishek, T; (2006).** Fungi toxicity of the essential oil of *Citrus sinensis* on post-harvest pathogens. Nickel accumulation and nickel oxalate precipitation by *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol* 59 : 583-588.
107. **Owens, R. G. & Miller, L. P. (1958).** Intracellular distribution of metal ions and organic fungicides in fungus spores. *Contributions of the Boyce Thompson Institute* 19, 177-188.
108. **Palmans E, Mares G, Poppe J, Höfte M. (1995).** Biodegradation of xenobiotics by heavy metal resistant higher fungi. *Mod Fac Landbouww Univ Gent*,60 :2563.
109. **Papini M.P ; Majone M ; Rolle, E ; (2001).** Kaolinite sorption of Cd, Ni and Cu from Landfill leachates : Influence of leachate composition. *Water Sci Technol* 44 : 343-350.
110. **Passow, H., Rothstein, A. & Clarkson, T. W. (1961).** The general pharmacology of the heavy metals. *Pharmacological Reviews* 13, 185-224.
111. **Penninckx, M. J. & Elskens, M. T. (1993).** Mctaholisin and function of glutathione in microorganisms. *Advances in Microbial physiology* 34: 239-301.
112. **Permina E.A, Kazakov A.E, Kalinina O.V, Gelfand M.S. (2006)** .Comparative genomics of regulation of heavy metal resistance in eubacteria. *BMC Microbiol* 6:49.
113. **Pitts K.E, Summers, A.O. (2002).** The roles of thiols in the bacterial organomercurial lyase (MerB). *Biochemistry* 41:10287-10296.
114. **Pocsi I, Prade RA, Penninckx J. (2004).** Glutathione altruistic metabolite in fungi. *Adv Microbial Physiol* ; 49 : 1-76.

115. **Ramamoorthy, S., Cheng, T. C; Kushner, D.J. (1982).** Effect of microbial life stages on the fate of methylmercury in natural waters, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 29:167-173.
116. **Rapoport, R., Hanukoglu, I., Sklan, D. (1994).** A fluorimetric assay for hydrogen peroxide, suitable for NAD(P) H-dependent superoxide generating redox systems. *Analytical Biochemistry* 218, 309-313.
117. **Ross, i. S. & old, k. M. (1973 b).** thiol compounds and resistance of *pyrenophora avenae* to mercury. *Transactions of the British Mycological Society* 60, 301-310.
118. **Ross, I.S. (1975).** Some effect of heavy metals en fungol cells. *Trans. Br. :ycol. Socm* 64 52- 175-193.
119. **Rothstein, A. (1959).** Cell membrane as a site of action of heavy metals. *Federation Proceedings* 18, 1026-1035.
120. **Rowland, I. R., Grasso, P.; . Davis, M.J. (1975).** The methylation of mercuric chloride by human intestinal bacteria. *Experientia* 31: 1064- 1065
121. **Saglam, A ; yalcinkaya, y ; Denizli, A ; Arica, M.Y, Gene, Ö; Bektas, S; (2002).** Biosorption of mercury by carboxy methyl cellulose and immobilized *Phamerochaete Chryso sporium*. *Microbiol. J* ; 71, 73-81.
122. Sanglinguwan S, Yoshida N, Morinaga T, Murooka Y. Resistance to and uptake of heavy metals in mushrooms. *J Ferment Bioeng* 1993;75:112-4.
123. **Sayer J, Gadd. G.M. (1997).** Solubilization and transformation of insoluble inorganic metal compounds to insoluble metal oxalates by *Aspergillus niger*. *Mycol Res.*, 106:653-61.
124. **Schuster, E. (1991).** The behaviour of mercury in the soil with special emphasis on complexation and adsorption porcesses- A reviewof the literature. *Air, Soil Pollution* 56, 667-680.
125. **Silver, S.; . Hobman, J. L. (2007).** Mercury Microbiology: Resistance Systems, Environmental Aspects, Methylation, and Human Health. *Microbiol Monogr* (6) D. H. Nies, S. Silver: *Molecular Microbiology of Heavy Metals* DOI 10.1007/7171\_2006\_085/ Published online. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
126. **Singh, A. & Sherman, F. (1974).** Association of methionine requirement with methyl mercury resistant mutants of yeast. *Nature, London* 247, 227-229.
127. **Spanis, W.C., Munneke, D. E. & Solberg, R. A. (1962).** Biological breakdown of two organic mercurial fungicides. *Phytopathology* 52, 455-462.

128. **Steinnes, E (1997)**. Mercury. In: Alloway, B.J. (ed.) Heavy metals in soils, second edition. Blackie Academic and Professional, p.245-259.
129. **Stohs S.J., Bagchi D. (1995)**. Oxidative mechanisms in the toxicity of heavy metals. *Free. Radio. Biol. Med.*18: 321-36.
130. **STROHAL, P. and HULJEV, D.**, Investigation of mercury pollutant interaction with humic acids by means of radiotracers, In *Nuclear Techniques in Environmental Pollution*, International Atomic Energy Agency, Viena, 1971. p. 439 (cited from Alberts et al. 1974)
131. **Summers, A.O., and S .Silver. (1972)**. Mercury resistance in a plasmid – bearing strain of *Escherichia coli* .*J Bacteriol.* 112: 1228-1236.
132. **Tack, F.M.G.; Vanhaesebroeck, T.; Verloo M.G., Van Rompaey, K. ; Van Ranst, E. (2005)**. Mercury baseline levels in Flemish soils (Belgium) *Environmental Pollution* 134, 173–179.
133. **Takashi, T.; Morimichi, O.; Ryusuke, I; Hayao, S. (2003)**. Vertical variations in the concentration of mercury in soils around Sakurajima Volcano, Southern Kyushu, Japan. *Science of the Total Environment* 304, 221–230.
134. **Tezuka, T., and K .Tonomura. 1978**. Purification and properties of an enzyme catalyzing the splitting of carbon- mercury linkages from mercury – resistant *Pseudomonas K-62* *J. Biochem. (Tokyo)* 80: 79 -87.
135. **Tezuka, T., and K. Tonomura. (1976)**. Purification and proper-ties of an enzyme catalyzing the splitting of carbon-mercury linkages from mercury-resistant *Pseudomonas K-62* strain. *J. Biochem. (Tokyo)* 80:79-87.
136. **Tezuka, T., and K. Tonomura. (1978)**. Purification and proper-ties of a second enzyme catalyzing the splitting of carbon-mercury linkages from mercury-resistant *Pseudomonas K-62*. *J. Bacteriol.* 135:138-143.
137. **Tobin J. M., Cooper D. G. and Neufeld R. J. (1984)**. Uptake of metal ions by *Rhizopus arrhizus* biomass. *Applied Environmental Microbiology* 47, 821-824.
138. **Tomiyasu,, T Okada, M. ; Imura, R. ;Sakamoto, H. (2003)**. Vertical variations in the concentration of mercury in soils around Sakurajima Volcano, Southern Kyushi, Japan. *Science of the Total Environment* 284, 177–189.
139. **Tomsett, A.B. (1993)**. Genetics and molecular biology of metal tolerance in fungi. In: Jennings DH, editor. *Stress tolerance in fungi*. Marcel Dekker: New York;, p. 69-95.
140. **Townsley C. C.; Ross I.S. (1986)**. Copper uptake in *Aspergillus niger* during and in nongrowing mycelia suspensions. *Experimental Mycology* 10, 281-288.

141. **Trost, P.B. ; Bisque, R.E. (1970).** Distribution of mercury in residual soils. P 178-196. In Hartung, R. and Dinman, B.D. (ed.). Environmental mercury contamination. Ann Arbor Science, Ann Zrbor, MI.
142. **Volesky, B., (1990).** Biosorption of Heavy Metals. CRC Press, Boca Raton, F.L.
143. **Vonk, J.W. ; Kaars Sijpesteijn, A. (1973).** Studies on the methylation of mercuric chloride by pure cultures of bacteria and fungi. Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology and Serology 39, 505-513.
144. **-Wallace, .R.A. Flukerson.W.; Shults.W.D. Lyon.W.S.; (1979).** "Mercury in the environment the human element. Oak Ridge national laboratory -mp.rs 1971-1961 pp.
145. **Wang, D. ; Shi, X. ; Wei, S. (2003).** Accumulation and transformation of atmospheric mercury in soil. Science of the Total Environment 304, 209–214.
146. **Wase, J.; Foster, C., (1997).** In: Biosorbent for Metal Ions. Taylor and Francis, Ltd., London
147. **Webb, J. L. (1966).** Enzyme and metabolic inhibitors, vol. 2, pp. 729-985. New York: Academic Press.
148. **Weiss, A. A ., J. L .Schottel, D.L. Clark, R. G. Beller, and S. Silver.(1978) .** Mercury and organomercurial resistance with enteric, staphylococcal, and pseudomonad plasmids, p.121-124. In D. Schlessinger (ed), Microbiology -1978. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
149. **Weiss, A. A., J. L. Schottel, D. L. Clark, R. G. Beller, and Silver, S. (1978).** Mercury and organomercurial resistance with enteric, staphylococcal, and pseudomonad plasmids, p. 121-124. *In D. Schlessinger (ed.), Microbiology-1978.* American Society for Microbiology, Washington, D.C.
150. **Weiss, A. A., S. D. Murphy, and S. Silver. 1977.** Mercury and organomercurial resistances determined by plasmids in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 132:197-208.
151. **Weiss, A. A., S. D. Murphy, and S. Silver. 1977.** Mercury and organomercurial resistances determined by plasmids in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 132:197-208.
152. **WHO (World Health Organization) (1976).** Environmental health criteria 86, mercury-environmental aspects. Geneva.
153. **Wilson JR, Leang C, Morby AP, Hobman JL, Brown NL (2000).** MerF is a mercury transport protein: different structures but a common mechanism for mercuric

ion transporters? FEBS Lett 472:78-82.

154. **Winge, D. R., Sewell, A. K., Yu, W., Thorvaldsen, J. L & Farrell. H. (1998)** Metal ion stress in yeast. In Metal Ions in Gene Regulation (S. Silver & W. Walden, eds): 279-315. Chapman & Hall, New York.
155. **Wood, J.M., F.S. Kennedy , and C .G .Rosen. (1968)** Synthesis of methyl- mercury Compounds by extract of a methanogenic bacterium . Nature (London) 220: 173-174.
156. **Zak, J.C., Wildman, H.G., (2004).** Fungi in stressful environments. In : Mueller, G.M., Bills, G.F., Foster, M.S. (Eds.), Biodiversity of fungi. Inventory and Monitoring Methods. Elsevier Academic press, Amsterdam.