



جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة القادسية
كلية العلوم
قسم البيئة

تحليل الجينوم الكامل لبعض أنواع البكتريا المحللة لمبيدات الفسفور العضوية والمغزولة من التربة الملوثة في محافظة الديوانية

أطروحة
مقدمة إلى مجلس كلية العلوم - جامعة القادسية
وهي جزء من متطلبات نيل درجة دكتوراه فلسفة
في علوم البيئة

من قبل

ثائر عبد دعيشيش

بكالوريوس في علوم الحياة 2007
ماجستير في علوم الحياة-أحياء مجهرية 2011

إشراف

أ.د. حازم عبد والي

أ.د. آمال غازي مهدي

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿وَيَسْأَلُونَكَ عَنِ الرُّوحِ قُلِ الرُّوحُ مِنْ أَمْرِ رَبِّي وَمَا أُوتِيتُمْ مِنَ الْعِلْمِ إِلَّا قَلِيلًا﴾

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

سورة الإسراء

الآية : ٨٥

إقرار المشرفين

نشهد بأن إعداد هذه الأطروحة الموسومة بـ (تحليل الجينوم الكامل لبعض أنواع البكتريا المحللة لمبيدات الفسفور العضوية والمعزولة من التربة الملوثة في محافظة الديوانية) جرى تحت إشرافنا في كلية العلوم/ جامعة القادسية، وهي جزء من متطلبات نيل درجة دكتوراه فلسفة في علوم البيئة.

التوقيع:

الاسم: د. آمل غازي مهدي

المرتبة العلمية: أستاذ

التاريخ: 2026 / 8 /

التوقيع:

الاسم: د. حازم عبد والي

المرتبة العلمية: أستاذ

التاريخ: 2026 / 8 /

إقرار رئيس لجنة الدراسات العليا

بناءً على التوصيات المقدمة من قبل المشرفين، أشرح هذه الأطروحة للمناقشة.

التوقيع:

الاسم: د. حازم عبد والي

المرتبة العلمية: أستاذ

التاريخ: 2026 / 8 /

إقرار المقوم اللغوي

أشهد بأن إعداد الأطروحة الموسومة بـ (تحليل الجينوم الكامل لبعض أنواع البكتريا المحللة لمبيدات الفسفور العضوية والمعزولة من الترب الملوثة في محافظة الديوانية) تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وتصحيح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك أصبحت مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بالسلامة اللغوية.

التوقيع:

الاسم: د. حامد عبد الرضا جبار

المرتبة العلمية: مدرس

التاريخ: 2026 / 8 /

إقرار لجنة المناقشة

نشهد نحن أعضاء لجنة المناقشة أننا قد اطلعنا على هذه الأطروحة الموسومة بـ (تحليل الجينوم الكامل لبعض أنواع البكتريا المحللة لمبيدات الفسفور العضوية والمغزولة من الترب الملوثة في محافظة الديوانية) وناقشنا الطالب ثائر عبد دعيشيش في محتوياتها بتاريخ 3 / 9 / 2026، وهي جديرة بالقبول لنيل درجة دكتوراه فلسفة في علوم البيئة وبتقدير (امتياز).

رئيس اللجنة

التوقيع:

الاسم: د. حازم عزيز ناجي

المرتبة العلمية: أستاذ

جامعة الكوفة/ كلية العلوم

التاريخ: 2026 / 9 /

عضو اللجنة

التوقيع:

الاسم: د. ولاء ياسر لعمود

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

جامعة القادسية/ كلية العلوم

التاريخ: 2026 / 9 /

عضو اللجنة

التوقيع:

الاسم: د. ختام عباس مرهون

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

جامعة القادسية/ كلية العلوم

التاريخ: 2026 / 9 /

عضو اللجنة

التوقيع:

الاسم: د. محمد كاظم خوين

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

جامعة القادسية/ كلية العلوم

التاريخ: 2026 / 9 /

عضو اللجنة

التوقيع:

الاسم: د. لجين إبراهيم حسين

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

جامعة القادسية/ كلية العلوم

التاريخ: 2026 / 9 /

عضواً ومشرفاً

التوقيع:

الاسم: د. آمال غازي مهدي

المرتبة العلمية: أستاذ

جامعة القادسية/ كلية العلوم

التاريخ: 2026 / 9 /

عضواً ومشرفاً

التوقيع:

الاسم: د. حازم عبد والي

المرتبة العلمية: أستاذ

جامعة القادسية/ كلية العلوم

التاريخ: 2026 / 9 /

إقرار مجلس الكلية

المنعقدة بتاريخ / / 2026،

اجتمع مجلس كلية العلوم بجلسته

وقرر منحه شهادة الدكتوراه فلسفة في علوم البيئة.

أ.د. سلوان علي عبيد

عميد كلية العلوم

2026 / /

الإهداء

إلى من علمني حرفاً فملاكني عبداً معلّمي
عرفاناً وإمتناناً

إلى قبس أنار لي الدرب ورحل
ليبقى خالداً في نفسي إلى الأبد والدي
إلى الشفاه التي لم تكل بالدعاء لي والدي
براً وإحساناً

إلى رمز المودة والوفاء والصدق والمحبة أخوتي وأصدقائي
إخلاصاً وفاءً

إلى إمتدادي وفلذات كبدي أولادي
حباً وحناناً

إلى من شاركتني غربتي وحملت عني أتعابي زوجتي
فخراً وإعتزازاً

إلى كل يد إمتدت لي بالخير إلى كل من يسره نجاحي
إليهم جميعاً أهدي ثمرة جهدي المتواضع هذا



ثائر

شكر وتقدير

الحمد لله الذي علّم بالقلم، علم الإنسان ما لم يعلم، الحمد لله على ما أنعم به عليّ من فضله الخير الكثير والعلم الوفير، وأعانني على أنجاز هذا العمل، جعله الله خالصاً لوجهه الكريم، والصلاة والسلام على أشرف الأنبياء والمرسلين أبي القاسم محمد وعلى آله الطاهرين وصحبه المنتجبين ومن تبعهم إلى يوم الدين.

وأنا أكمل أطروحتي يطيب لي أن أقدم بأسمى معاني الشكر والعرفان لأستاذي الفاضل الأستاذ الدكتور آمال غازي مهدي والأستاذ الدكتور حازم عبد والي المشرفين على أطروحتي الذين كان لهما الفضل بعد الله في اختيار موضوع البحث وجهدهما المتواصل في المتابعة والإرشاد فجزّاهم الله عني الجزاء الأوفى.

كما يدعوني الواجب إلى أن أقدم بالشكر الوافر والتقدير الكبير إلى عمادة كلية العلوم / جامعة القادسية ممثلة بعميد الكلية الأستاذ الدكتور سلوان علي عبيد والي رئاسة قسم البيئية المتمثلة برئيس القسم الأستاذ الدكتور حازم عبد والي لما قدماه لي من رعاية ومساعدة، وكذلك أجد نفسي ملزماً بالشكر والتقدير لأخي وزميلي الأستاذ المساعد الدكتور حسين رياض محمود عرفاناً لما قدمه من عون طيلة مدة الدراسة، ولما بذله من جهد كبير في المعلوماتية الحيوية لتحليل نتائج الجانب الجزيئي من الأطروحة.

وفي الختام شكري وامتناني إلى عائلتي لاسيما (والدتي وزوجتي) لتقديرهم لي كل أشكال الدعم وتحملهم معي عناء الجهد طيلة مدة دراستي أثابهم الله خير الثواب كما أقدم بالشكر الوافر لكل من ساعدني في انجاز هذه الأطروحة ولم تسنح الفرصة لذكره.



ثائر

الإلهية

Summary

الخلاصة

تُعد المبيدات الفسفورية العضوية Organophosphorus Pesticides من أكثر الملوثات البيئية شيوعاً في الأراضي الزراعية، لما لها من تأثيرات سمية حادة على الكائنات الحية غير المستهدفة وثباتها البيئي. تهدف هذه الدراسة إلى انتقاء وتشخيص بكتيريا محلية من التربة الزراعية في محافظة الديوانية، قادرة على التحلل الحيوي لمبيد Chlorpyrifos و Malathion، وتقييم كفاءتها التحليلية تحت ظروف بيئية مختلفة، والكشف عن الأساس الجيني والإنزيمي لهذه القدرات باستخدام تقنيات متقدمة شملت تحليل الجينوم الكامل Whole Genome Sequencing (WGS).

تم جمع 18 عينة تربة لمناطق زراعية في ستة أفضية من محافظة الديوانية وهي: (مركز المدينة، السنية، الشامية، الحمزة الشرقي، عفك والدغارة)، تعرضت للمبيدات لأكثر من 5 سنوات، بواقع 3 عينات من ثلاث مناطق زراعية مختلفة من كل قضاء، للمدة من 1/4/2025 لغاية 1/8/2025. و تم عزل 11 عزلة بكتيرية من التربة باستخدام تقنية الاستزراع الأثرائى الانتقائي Selective enrichment culture technique على وسط الأملاح المعدنية Mineral Salts Medium. أظهرت العزلات توزيعاً جغرافياً متفاوتاً، إذ سُجل أعلى عدد من العزلات في قضاء عفك، حيث تم الحصول على (أربع عزلات)، يليه قضاء الشامية بـ (ثلاث عزلات). وسُجلت (عزلتان) في قضاء الحمزة الشرقي، في حين سُجلت (عزلة واحدة) في كل من قضاء الدغارة وقضاء السنية. أما في مركز مدينة الديوانية، فلم يُلاحظ أي نمو بكتيري في الوسط الانتقائي في العينات الثلاث التي جُمعت منه، ولذلك لم تُعزل أي عزلة بكتيرية من هذا القضاء.

أكدت نتائج التشخيص المظهري والمجهري والكميحيوي، إلى جانب نظام VITEK 2 أن العزلات تنتمي إلى أربعة أجناس رئيسة هي: *Bacillus* (عزلتان)، *Lysinibacillus* (ثلاث عزلات)، *Stenotrophomonas* (أربع عزلات)، و *Ochrobactrum* (عزلتان)، كما تم تأكيد الهوية الجينية للعزلات الأربعة الأكثر كفاءة *Bacillus subtilis*، *Lysinibacillus sphaericus*، *Stenotrophomonas maltophilia* و *Ochrobactrum sp.* عبر تحليل

تسلسل جين *16S rRNA*، كما تم إيداع تسلسلات BS1، LS1، SM1 و OA1 في قاعدة بيانات NCBI GenBank تحت أرقام الوصول (PZ489031، PZ489022، PZ489030 و PZ489026)، على التوالي. وأظهر تحليل الشجرة التطورية تجمعها في مجموعات أحادية النمط مع العزلات العالمية ذات الصلة.

أظهرت العزلات الأربعة كفاءة تحليل متفاوتة تجاه مبيد الـ Chlorpyrifos، فقد حققت العزلة BS1 *B. subtilis* أعلى نسبة تحليل بلغت (97.828%)، إذ انخفض تركيز المبيد المتبقي من القيمة الأولية 100 ملغم/ لتر ليصل إلى 0.110 ± 2.172 ملغم/ لتر عند اليوم العاشر، تلتها SM1 *S. maltophilia* بنسبة تحليل (95.998%) و *Ochrobactrum* sp. بنسبة (93.043%)، بينما كانت LS1 *L. sphaericus* أقلها كفاءة إذ بلغ التركيز المتبقي 0.181 ± 11.024 ملغم/ لتر عند اليوم العاشر وبنسبة تحليل بلغت (88.976%).

في المقابل، تغير ترتيب الكفاءة بشكل ملحوظ تجاه مبيد الـ Malathion، حيث تفوقت العزلة LS1 *L. sphaericus* بنسبة تحليل (94.141%) من تركيز المبيد الابتدائي 100 ملغم/ لتر بحلول اليوم العاشر، ولم يتبقى سوى 0.508 ± 5.859 ملغم/ لتر، تلتها BS1 *B. subtilis* بنسبة تحليل (92.666%)، ثم جاءت العزلة OA1 *Ochrobactrum* sp. بنسبة (87.910%)، بينما كانت SM1 *S. maltophilia* في المرتبة الأخيرة بأقل نسبة تحليل بلغت (84.547%) وتركيز متبقي 0.429 ± 15.453 ملغم/ لتر.

كما كشفت حركيات التحلل عن نمط مشترك لجميع العزلات ولكلا المبيدين تمثل في تسجيل أعلى نسب تحليل خلال اليومين الأوليين (40-55%)، لكنها استمرت بمعدلات تحليل تراكمية متصاعدة طوال العشرة أيام، بينما لم يُسجل في العينة الضابطة غير الحيوية سوى تحليل بسيط جداً لم يتجاوز (2%) بعد 10 أيام، مما يؤكد استقرار المبيد في غياب النشاط الحيوي.

تم تحديد الظروف البيئية المثلى للتحلل الحيوي، حيث كانت درجة الحرارة 30°م، والرقم الهيدروجيني 7، والتركيز الأولي 100 ملغم/ لتر هي الأكثر ملائمة لجميع العزلات. وأظهرت النتائج أن الانحراف عن هذه الظروف، سواء كانت بالانخفاض إلى 20°م أو pH 5 أو بالارتفاع إلى 40°م أو pH 9 أو زيادة التركيز إلى 200-400 ملغم/ لتر، أدى إلى انخفاض

معدلات التحلل في جميع العزلات الأربعة قيد الدراسة، مع استثناء ملحوظ تمثل في قدرة العزلة *L. sphaericus* على تحمل تركيز 200 ملغم/ لتر من الـ Malathion مع احتفاظها بكفاءة مرتفعة (94.667%) أعلى بقليل من كفاءة تحليلها (93.706%) عند التركيز 100 ملغم/ لتر.

أما على المستوى الجيني، فقد أظهرت نتائج الكشف باستخدام تقنية Polymerase chain reaction (PCR) وجود جين *Organophosphate degradation gene (opd)* في العزلتين *B. subtilis* و *S. maltophilia*، وهو ما قد يفسر كفاءتهما العالية في تحليل مبيدي الـ Chlorpyrifos و الـ Malathion، بينما غاب هذا الجين عن *L. sphaericus* و *Ochrobactrum sp.* كما غاب جين *Methyl parathion degradation gene (mpd)* عن جميع العزلات. دعمت نتائج تحليل تسلسل الجينوم الكامل WGS التفسير الجزيئي المحتمل للكفاءة التحليلية التي أظهرتها العزلتان *L. sphaericus* و *Ochrobactrum sp.*، وكشفت عن وجود مسارات إنزيمية مرشحة ومتعددة قد تسهم في تحليل مبيدات الفوسفور العضوي.

فقد أظهر تحليل تسلسل الجينوم للعزلة *Ochrobactrum sp.* وجود 7 جينات موزعة على ثلاث عائلات وظيفية: شملت عائلة إنزيمات التحلل المائي والإستريزات & Hydrolases Esterases أربعة جينات مرشحة تشفر بروتينات ذات وظائف متوقعة مرتبطة بـ (Arylesterase، Phosphodiesterase PdeA، Glycerophosphodiester phosphodiesterase و Esterase-like activity). كما تضمنت عائلة الفوسفاتيزات Phosphatases جينين مرشحين يشفران بروتينات ذات وظائف متوقعة مرتبطة بـ (Alkaline phosphatase و Metallophosphoesterase)، في حين تضمنت عائلة إنزيمات الأكسدة Oxidases جيناً مرشحاً يشفر Cytochrome P450. أما عزلة *L. sphaericus*، فقد كشف تحليل جينومها عن وجود 6 جينات موزعة على عائلتين وظيفيتين: شملت عائلة الـ Hydrolases & Esterases أربعة جينات مرشحة تشفر بروتينات ذات وظائف متوقعة مرتبطة بـ (Carboxylesterase، Esterase، Glycerophosphodiester phosphodiesterase و Putative phosphoesterase)، في حين تضمنت عائلة الـ Phosphatases جينين مرشحين يشفران بروتينات ذات وظائف متوقعة مرتبطة بـ (Alkaline phosphatase و Metallophosphoesterase). وأظهرت محاذاة التسلسلات المتعددة

Multiple sequence alignment (MSA) تطابقاً تاماً (100%) بين تسلسلات الأحماض الأمينية لهذه البروتينات والتسلسلات المرجعية في قاعدة بيانات GenBank، مما يدعم المحافظة على خصائصها التسلسلية ووظائفها المتوقعة.

أوضحت الخرائط الجينومية Genomic maps أن هذه الجينات لم تكن مجتمعة في عنقود جيني واحد Gene cluster بل موزعة على عدة مناطق من الكروموسوم (ثلاث مناطق في *Ochrobactrum* ومنطقتان في *L. sphaericus*)، مما يشير إلى توزيع جينومي متفرق قد يرتبط بتعدد المسارات الوظيفية. ويُعد غياب مسار الأكسدة (Cytochrome P450) في *L. sphaericus* تفسيراً مقنعاً لتفوق بكتريا *Ochrobactrum* sp. في تحليل مبيد الـ Chlorpyrifos بنسبة (93.043%) مقابل نسبة (88.976%) لبكتريا *L. sphaericus*، بينما يُعزى تفوق بكتريا *L. sphaericus* في تحليل مبيد الـ Malathion بنسبة (94.141%) مقابل (87.910%) لبكتريا *Ochrobactrum* sp. إلى احتوائها على إنزيمات Esterase و Carboxylesterase متخصصة في كسر الروابط الإستيرية. وبشكل عام، فإن اعتماد هذه العزلات على منظومة إنزيمية متعددة بدلاً من جين واحد يمنحها مزايا تطويرية وتطبيقية مهمة، أبرزها المرونة الأيضية Metabolic plasticity والتكرار الوظيفي، Functional redundancy، قد تمنحها القدرة على تحليل نطاق أوسع من المبيدات والعمل في ظروف بيئية مختلفة.

تؤكد هذه النتائج أن العزلات البكتيرية المحلية، ولاسيما *B. subtilis* BS1 و *L. sphaericus* LS1 و *S. maltophilia* SM1 و *Ochrobactrum* sp. OA1، تمتلك إمكانيات واعدة لتطبيقات المعالجة الحيوية Bioremediation لمعالجة التربة الملوثة بالـ Chlorpyrifos و الـ Malathion، وذلك بفضل تنوعها الجيني والإنزيمي وقدرتها على العمل في ظروف بيئية متباينة. كما أن اكتشاف المسارات الإنزيمية البديلة في العزلتين *L. sphaericus* LS1 و *Ochrobactrum* sp. OA1 اللتين تغفقران إلى جينات *opd* و *mpd* يمثل إسهاماً علمياً قيماً في فهم التنوع الجيني للبكتيريا المحللة للمبيدات، ويفتح آفاقاً جديدة للدراسات المستقبلية في مجال الهندسة الوراثية وتطوير خطاطات بكتيرية متخصصة للمعالجة الحيوية المتكاملة.

المحتويات

التسلسل	الموضوع
أ - د	الخلاصة
هـ - ش	قائمة المحتويات
1	الفصل الأول : المقدمة
	الفصل الثاني : استعراض المراجع
7	1.2. المبيدات: Pesticides
7	1.1.2. مفهوم المبيدات: Concept of Pesticides
8	2.1.2. الأهداف الرئيسية لاستخدام المبيدات: Primary objectives of pesticide use
8	1.2.1.2. الحماية الزراعية: Agricultural Protection
8	2.2.1.2. حماية الصحة العامة: Public Health Protection
9	3.2.1.2. مكافحة الآفات الصناعية والإنشائية: Industrial and Structural Pest Management
9	3.1.2. نبذة تاريخية عن استخدام المبيدات: A historical overview of the use of pesticides
10	1.3.1.2. العصور القديمة: المواد الطبيعية وغير العضوية
10	2.3.1.2. القرن التاسع عشر (1800-1900): ظهور المركبات غير العضوية
10	3.3.1.2. منتصف القرن العشرين: ثورة المبيدات الصناعية (1940-1960)
11	4.3.1.2. السبعينيات والثمانينيات: الفوسفات العضوية، والكربامات
11	5.3.1.2. من التسعينيات حتى الآن: المبيدات الحيوية، والإدارة المتكاملة للآفات
12	4.1.2. تصنيف المبيدات: Classification of Pesticides
13	1.4.1.2. التصنيف حسب الكائن المستهدف: Classification by Target Organism
14	2.4.1.2. تصنيف منظمة الصحة العالمية للسمية: WHO Toxicity Classification
14	3.4.1.2- التصنيف حسب التركيب الكيميائي: Chemical Structure

التسلسل	الموضوع
15	1.3.4.1.2. المبيدات غير العضوية: Inorganic Pesticides
15	2.3.4.1.2. المبيدات العضوية الصناعية: Synthetic Organic Pesticides
17	5.1.2. مبيدات الفسفور العضوية: Organophosphorus Pesticides (OPs)
17	1.5.1.2. التركيب الكيميائي العام للـ OPs: General Chemical Structure of OPs
18	2.5.1.2. تصنيف الـ OPs حسب التركيب الكيميائي: Classification of OPs by Chemical Structure
19	3.5.1.2. آلية عمل مبيدات الفوسفور العضوي: Mechanism of Action of OPs
22	4.5.1.2. المبيدات المستخدمة في هذه الدراسة: Pesticides used in this study
22	1.4.5.1.2. المالاثيون Malathion
24	2.4.5.1.2. الكلوربيريفوس Chlorpyrifos
27	5.5.1.2. الآثار البيئية والصحية للـ OPs: Environmental and Health Impacts of OPs
29	6.5.1.2. المصير البيئي للـ OPs: Environmental Fate of OPs
32	2.2. طرق معالجة مبيدات الفوسفور العضوية Treatment Methods for OPs
32	1.2.2. الطرق الفيزيائية والكيميائية للمعالجة: Physical and Chemical methods for Treatment
32	1.1.2.2. الامتزاز Adsorption
33	2.1.2.2. الأكسدة المتقدمة (AOPs) Advanced Oxidation Processes (AOPs)
33	3.1.2.2. التحلل المائي Hydrolysis
33	4.1.2.2. التحلل الضوئي Photolysis
34	5.1.2.2. الحرق Incineration
34	6.1.2.2. غسل التربة Soil Washing
34	7.1.2.2. عيوب المعالجة الفيزيائية والكيميائية: Disadvantages of Physical and Chemical Treatment
35	2.2.2. المعالجة الحيوية للمبيدات: Bioremediation of Pesticides

التسلسل	الموضوع
36	1.2.2.2 Concept and Importance of :مفهوم المعالجة الحيوية وأهميتها: Bioremediation
37	2.2.2.2 Advantages of Bioremediation :مزايا المعالجة الحيوية:
38	3.2.2.2 Challenges of Bioremediation :تحديات المعالجة الحيوية:
40	4.2.2.2 Bacterial Role in Biodegradation :دور البكتيريا في التحلل البيولوجي لـ OPs : of Ops
43	5.2.2.2 Mechanism of Biodegradation of OPs :آلية التحلل البيولوجي لـ OPs :
43	1.5.2.2.2 Hydrolysis :التحلل المائي:
44	2.5.2.2.2 Oxidation :الأكسدة:
45	3.5.2.2.2 Dealkylation :نزع الالكيل:
45	4.5.2.2.2 Co-metabolism :الاستقلاب المصاحب:
46	6.2.2.2 Genes and :الجينات والإنزيمات البكتيرية المشاركة في التحلل الحيوي لـ OPs : Enzymes Involved in OPs Biodegradation
48	7.2.2.2 Metabolic Pathways of OPs :المسارات الأيضية للتحلل الميكروبي لـ OPs : Biodegradation
50	1.7.2.2.2 Metabolic Pathway of Chlorpyrifos :المسار الأيضي للكلوربيريفوس:
52	2.7.2.2.2 Metabolic Pathway of Malathion :المسار الأيضي للمالاثيون:
54	3.2 Environmental Factors Affecting :العوامل البيئية المؤثرة على التحلل البيولوجي: Biodegradation
55	1.3.2 Physical Factors :العوامل الفيزيائية:
55	1.1.3.2 Temperature :درجة الحرارة:
55	2.1.3.2 Soil Moisture :رطوبة التربة:
56	3.1.3.2 Oxygen Availability :توافر الأوكسجين:
56	4.1.3.2 Soil Properties :خصائص التربة:
57	2.3.2 Chemical Factors :العوامل الكيميائية:

التسلسل	الموضوع
57	1.2.3.2. الرقم الهيدروجيني: pH
58	2.2.3.3. توافر المغذيات: Nutrient Availability
58	3.2.3.2. تركيز المبيدات ومخاليطها: Pesticide Concentration and Mixtures
59	3.3.2. العوامل البيولوجية: Biological Factors
59	1.3.3.2. تفاعلات المجتمعات الميكروبية Microbial Community Interactions
60	2.3.3.2. التدعيم الحيوي Bioaugmentation
الفصل الثالث : المواد و طرائق العمل	
61	1.3. الأجهزة والمواد
61	1.1.3. الأجهزة والمعدات: Instruments and Equipment
62	2.1.3. المواد الكيميائية: Chemical Substances
64	3.1.3. الأوساط الزرعية: Culture Media
64	4.1.3. المبيدات المستخدمة: Pesticides
65	5.1.3. العدد المستخدمة: Kits
65	6.1.3. البادئات: Primers
66	خطة الدراسة: Study plan
67	2.3. طرائق العمل Work methods
67	1.2.3. طرائق التعقيم: Sterilization methods
67	1.1.2.3. التعقيم بالحرارة الجافة
67	2.1.2.3. التعقيم بالحرارة الرطبة
67	3.1.2.3. التعقيم بالترشيح
67	2.2.3. تحضير المحاليل والكواشف: Preparation of solutions and reagents
67	1.2.2.3. المحاليل والداياري: Solutions and Buffers
67	1.1.2.2.3. المحلول الملحي الفسلجي: Normal Saline

التسلسل	الموضوع
68	2.1.2.2.3. محلول ثابت العكرة القياسي: Macfarland Standard
68	3.1.2.2.3. دارئ الفوسفات الملحي: Phosphate Buffer Saline (PBS)
68	4.1.2.2.3. المحلول الخزين لمبيد الكلوربيريفوس: Stock solution of Chlorpyrifos
69	5.1.2.2.3. المحلول الخزين لمبيد المالاتيون: Stock solution of Malathion
69	6.1.2.2.3. محلول حامض الهيدروكلوريك: Hydrochloric acid (0.1 M)
69	7.1.2.2.3. محلول هيدروكسيد الصوديوم: Sodium hydroxide (0.1 M)
69	8.1.2.2.3. محاليل استخلاص الـ DNA
70	9.1.2.2.3. محاليل الترحيل الكهربائي: Electrophoresis solutions
71	2.2.2.3. الكواشف: Reagents
71	1.2.2.2.3. كاشف الأوكسيداز: Oxidase Reagent
71	2.2.2.2.3. كاشف إنزيم الكاتليز: Catalase Reagent
71	3.2.2.2.3. كاشف كوفاكس: Kovac's Reagent
72	4.2.2.2.3. كاشف فوكس بروسكاور: Voges-Proskauer reagent
72	5.2.2.2.3. كاشف أحمر المثيل: Methyl Red Reagent
72	6.2.2.2.3. كاشف تمييع الجيلاتين: Gelatin liquefaction reagent
72	3.2.3. تحضير الأوساط الزرعية
72	1.3.2.3. الأوساط الزرعية الجاهزة
73	2.3.2.3. الأوساط الزرعية التركيبية
73	1.2.3.2.3. وسط أكار الدم: Blood Agar Medium
73	2.2.3.2.3. وسط لوريا السائل: Luria-Bertani Medium
73	3.2.3.2.3. وسط المثيل الأحمر - فوكس بروسكاور السائل: MR-VP broth medium
74	4.2.3.2.3. وسط اليوريا: Urea agar medium
74	5.2.3.2.3. وسط تمييع الجيلاتين: Gelatin liquefaction medium

التسلسل	الموضوع
74	6.2.3.2.3. وسط اختبار الحركة: Motility test medium
74	7.2.3.2.3. وسط الأملاح المعدنية السائل: Mineral salts medium(MSM)
75	4.2.3. منطقة الدراسة وجمع العينات: Study area and Collection of samples
76	5.2.3. انتقاء البكتيريا المحللة لمبيدات الفسفور العضوية: Selection of OPs-degrading bacteria
77	6.2.3. تشخيص البكتيريا: Identification of Bacteria
77	1.6.2.3. الصفات الزرعية والفحص المجهرى: Cultural Characteristics and Microscopic Examination
77	2.6.2.3. الاختبارات الكيموحيوية: Biochemical tests
77	1.2.6.2.3. اختبار إنزيم الأوكسيداز: Oxidase Test
78	2.2.6.2.3. اختبار إنتاج الكاتليز: Catalase Test
78	3.2.6.2.3. اختبار إنتاج الأندول: Indole Test
78	4.2.6.2.3. اختبار فوكس - بروسكاور وأحمر المثيل: Voges Proskauer and Methyl Red Test
79	5.2.6.2.2. اختبار استهلاك السترات: Citrate Utilization Test
79	6.2.6.2.3. اختبار إنتاج إنزيم اليوريز: Urease Test
79	7.2.6.2.3. اختبار تمييع الجيلاتين: Gelatin Liquefaction Test
79	8.2.6.2.3. اختبار الحركة: Motility Test
80	9.2.6.2.3. إنتاج الإنزيم الحال للدم: Detection of Hemolysin Production
80	3.6.2.3. تشخيص العزلات البكتيرية باستخدام جهاز الفايك: Identification of bacterial isolate by VITEK 2 compact System
81	1.3.6.2.3. إعداد العالق البكتيري: Bacterial suspension preparation
81	2.3.6.2.3. تحميل العالق البكتيري في البطاقات: Loading into VITEK Cards
82	3.3.6.2.3. ختم البطاقة وحضانها: Card Sealing and Incubation
82	4.3.6.2.3. النظام البصري وقراءة التفاعلات: Optical System and Reaction Reading

التسلسل	الموضوع
82	5.3.6.2.3. تحليل النتائج وتحديد الهوية: Result Analysis and Identification
82	6.3.6.2.3. مستويات تحديد الهوية: Identification levels
83	7.2.3. الدراسة الجزيئية: Molecular study
84	1.7.2.3. استخلاص الحمض النووي: DNA extraction
84	1.1.7.2.3. تحضير العينة: Samples preparation
85	2.1.7.2.3. تحلل الخلايا: Cell lysis
85	3.1.7.2.3. إزالة الحمض النووي الريبوزي RNA
85	4.1.7.2.3. ربط الحمض النووي DNA binding
85	5.1.7.2.3. غسل العمود Column washing
86	6.1.7.2.3. الإذابة Elution
86	2.7.2.3. فحص تركيز ونقاوة الحمض النووي المستخلص DNA purity
87	3.7.2.3. تفاعل البلمرة المتسلسل: Polymerase Chain Reaction (PCR)
87	1.3.7.2.3. تحضير مزيج التفاعل: Preparing the reaction mix
88	2.3.7.2.3. ظروف التضخيم: Amplification condition
88	4.7.2.3. الترحيل الكهربائي: Gel Electrophoresis
89	5.7.2.3. تحليل تسلسل جين 16S rRNA: 16S rRNA gene sequence analysis
90	5.7.2.3. الشجرة التطورية: The phylogenetic tree
91	6.7.2.3. تحليل الجينوم الكامل: Whole genome sequencing
91	1.6.7.2.3. تقديم العينات واستخلاص الحمض النووي: Sample Submission and DNA Extraction
91	2.6.7.2.3. تحضير المكتبات والتسلسل: Library Preparation and Sequencing
92	3.6.7.2.3. تجميع الجينوم والتعليق الوظيفي: Genome Assembly and Functional Annotation

التسلسل	الموضوع
93	8.2.3. Assessment of OPHs : تقييم التحلل البيولوجي لمبيدات الفسفور العضوية: biodegradation
93	1.8.2.3. Quantification of residual pesticide : تقدير التراكيز المتبقية للمبيدات: concentrations
93	2.8.2.3. Extraction of pesticide for analysis : استخلاص المبيد للتحليل:
94	3.8.2.3. Detection and : كشف وتقدير التركيز المتبقي للمبيد باستخدام HPLC quantification of pesticide residual concentration using HPLC
95	4.8.2.3. Standard curve of Malathion : المنحنى القياسي لمبيد الملاثيون:
97	5.8.2.3. Standard curve of Chlorpyrifos : المنحنى القياسي لمبيد الكلوربيريفوس:
98	9.2.3. Determine the optimal conditions of : تحديد الظروف المثلى للتحلل الحيوي: biodegradation
98	1.9.2.3. The effect of temperature : تأثير درجة الحرارة
99	2.9.2.3. The effect of pH : تأثير الرقم الهيدروجيني
99	3.9.2.3. Effect of pesticide concentration : تأثير تركيز المبيد
100	10.2.3. Storage and maintenance of isolates : حفظ وإدامة العزلات
100	1.10.2.3. Short term preservation : الحفظ قصير الأمد
100	2.10.2.3. Medium term preservation : الحفظ متوسط الأمد
100	3.10.2.3. Long term preservation : الحفظ طويل الأمد
101	11.2.3. Statistical analysis : التحليل الإحصائي
الفصل الرابع : النتائج والمناقشة	
102	1.4. Selection of OPs-degrading : انتخاب البكتيريا المحللة لمبيدات الفسفور العضوية: bacteria
104	1.1.4. Distribution of Bacterial Isolates : توزيع العزلات البكتيرية حسب مواقع الدراسة: According to Study Sites
107	2.4. Diagnosis of bacterial isolates : تشخيص العزلات البكتيرية:
107	1.2.4. Microscopic properties : الخصائص المظهرية و المجهرية والاختبارات البيوكيميائية: and biochemical tests

التسلسل	الموضوع
111	2.2.4. Molecular Diagnosis :16S rRNA باستخدام تسلسل جين 16S rRNA Gene Sequencing using 16S rRNA
111	1.2.2.4. الكشف عن جين 16S rRNA :Detection of the 16S rRNA gene
112	2.2.2.4. تحليل تسلسلات جين 16S rRNA وبناء الشجرة التطورية:
116	3.4. تقييم كفاءة التحلل:
116	1.3.4. التحلل الحيوي لمبيد الـ Chlorpyrifos:
119	2.3.4. التحلل الحيوي لمبيد الـ Malathion:
125	4.4. تحديد الظروف المثلى للتحلل الحيوي:
125	1.4.4. تأثير درجة الحرارة على كفاءة التحلل:
129	2.4.4. تأثير الرقم الهيدروجيني (pH) على كفاءة التحلل:
133	3.4.4. تأثير التركيز الأولي للمبيد على كفاءة التحلل:
137	5.4. الأساس الجيني والإنزيمي للتحلل الحيوي:
137	1.5.4. الكشف عن جيني <i>mpd</i> و <i>opd</i> :
141	3.5.4. تحليل الجينوم الكامل: Whole genome sequencing (WGS)
141	1.3.5.4. العزلة <i>Ochrobactrum</i> sp.
147	2.3.5.4. العزلة <i>L. sphaericus</i>
151	3.3.5.4. المقارنة بين العزلة <i>Ochrobactrum</i> sp. والعزلة <i>L. sphaericus</i>
154	6.4. الاستنتاجات
156	7.4. التوصيات
157	المصادر
179	الملاحق
A-D	الملخص باللغة الانكليزية

قائمة بمناوين البحوث

الرقم	العنوان	الصفحة
1-2	تصنيف المبيدات حسب الكائن المستهدف	13
2-2	تصنيف المبيدات وفقاً لتوصيات منظمة الصحة العالمية WHO	14
3-2	تصنيف الـ OPs حسب التركيب الكيميائي	19
4-2	الخصائص المقارنة للملاثيون والكلوربيريفوس	26
5-2	الآثار البيئية والصحية لمبيدات الفوسفور العضوية	29
6-2	مقارنة الطرق الفيزيائية والكيميائية والمعالجة الحيوية لمبيدات الفوسفور العضوية	39
7-2	بعض الأجناس البكتيرية المحللة للمبيدات الفوسفورية العضوية والإنزيمات المشاركة	41
8-2	الجينات والإنزيمات الرئيسية المشاركة في التحلل البيولوجي للـ OPs	47
1-3	الأجهزة والمعدات المستخدمة في الدراسة الحالية	61
2-3	المواد الكيميائية المستخدمة في الدراسة الحالية	62
3-3	الأوساط الزرعية الجاهزة المستخدمة في الدراسة الحالية	64
4-3	المبيدات المستخدمة في الدراسة الحالية	64
5-3	العدد المستخدمة في الدراسة الحالية	65
6-3	البادئات المستخدمة في الدراسة الحالية	65
7-3	مستويات تحديد الهوية بنظام VITEK 2	83
8-3	مكونات مريخ تفاعل البلمرة المتسلسل	87
9-3	ظروف تفاعل الـ PCR للجينات المستهدفة	88
1-4	العزلات البكتيرية المنتخبة بعد عملية الإثراء الانتقائي	102
2-4	توزيع العزلات البكتيرية المنتقاة حسب مواقع الدراسة	105
3-4	نتائج الاختبارات البايوكيميائية للبكتريا المحللة لمبيدات OPs	108
4-4	نتائج تشخيص العزلات البكتيرية باستخدام نظام VITEK 2	109
5-4	قيم تطابق BLAST، أرقام الوصول لأقرب العزلات العالمية مع عزلات الدراسة	112
6-4	التركيز المتبقي لمبيد الـ Chlorpyrifos خلال مدة حضان 10 أيام	117

الرقم	العنوان	الصفحة
7-4	التركيز المتبقي لمبيد الـ Malathion خلال مدة حضان 10 أيام	120
8-4	تأثير درجة الحرارة على كفاءة التحلل الحيوي لـ Chlorpyrifos	126
9-4	تأثير درجة الحرارة على كفاءة التحلل الحيوي لـ Malathion	127
10-4	تأثير الرقم الهيدروجيني على كفاءة التحلل الحيوي لـ Chlorpyrifos	130
11-4	تأثير الأس الهيدروجيني على كفاءة التحلل الحيوي لـ Malathion	131
12-4	تأثير التركيز الأولي لمبيد الـ Chlorpyrifos على كفاءة التحلل	133
13-4	تأثير التركيز الأولي لمبيد الـ Malathion على كفاءة التحلل	135
14-4	جينات التحلل ونواتجها الإنزيمية مصنفةً حسب العائلة الوظيفية لبكتريا <i>Ochrobactrum</i> sp.، حيث يشير (+) إلى الاتجاه الأمامي Forward و (-) إلى الاتجاه العكسي Reverse لشريط الحمض النووي	141
15-4	جينات التحلل ونواتجها الإنزيمية مصنفةً حسب العائلة الوظيفية لبكتريا <i>L. sphaericus</i> ، حيث يشير (+) إلى الاتجاه الأمامي Forward و (-) إلى الاتجاه العكسي Reverse لشريط الحمض النووي	147
16-4	مقارنة استراتيجيات التحلل للعزلتين <i>L. sphaericus</i> و <i>Ochrobactrum</i> sp.	151

قائمة بـمناوين الأشكال

الرقم	العنوان	الصفحة
1-2	التطور التاريخي لاستخدام المبيدات	9
2-2	تصنيف المبيدات حسب التركيب الكيميائي، السمية والكائن المستهدف	13
3 - 2	التركيب الكيميائي العام لمركبات الفسفور العضوية	17
4-2	آلية تثبيط إنزيم AChE بواسطة OPs	20
5-2	الصيغة التركيبية لمبيد المالاتيون	23
6-2	الصيغة التركيبية لمبيد الكلوربيريفوس	25
7-2	المصير البيئي لمبيدات الفسفور العضوية	30
8-2	المسار الأيضي العام للمبيدات الفوسفورية العضوية	49
9-2	المسار الأيضي لمبيد الـ Chlorpyrifos	50
10-2	المسار الأيضي لمبيد الـ Malathion	52
11-2	العوامل البيئية المؤثرة على التحلل الحيوي لـ OPs	54
1-3	المخطط العام لمسار العمل المختبري المتبع في الدراسة الحالية	66
2-3	منطقة الدراسة ومواقع اخذ عينات التربة من الأراضي الزراعية في محافظة الديوانية	75
3-3	الرسم التخطيطي لخطوات التشخيص الجزيئي والتسلسل والدراسة التطورية	83
4-3	طيف الامتصاص لمبيد المالاتيون القياسي بتركيز 100 ملغم/ لتر باستخدام جهاز HPLC	96
5-3	المنحي القياسي لـ Malathion ضمن مدى تركيز من 1-125 ملغم/ لتر.	96
6-3	طيف الامتصاص لمبيد الكلوربيريفوس بتركيز 100 ملغم/ لتر باستخدام جهاز HPLC	97
7-3	المنحي القياسي لمبيد الكلوربيريفوس (ملغم/ لتر) بواسطة جهاز HPLC	98
1-4	نتائج تحليل VITEK 2 للعزلة <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (SM1)	109

الرقم	العنوان	الصفحة
2-4	الترحيل الكهربائي على هلام الأغاروز (2%) لنواتج تضخيم جين <i>16S rRNA</i> (100) فولت، 70 ملي أمبير، 45 دقيقة) M: سلم الحمض النووي 100bp، 1: <i>B. subtilis</i> ، 2: <i>S. maltophilia</i> ، 3: <i>Ochrobactrum sp.</i> ، 4: <i>L. sphaericus</i> ، NC: سيطرة سالبة	111
3-4	صفحة تسجيل العزلة <i>Bacillus subtilis</i> BS1 في GenBank على موقع NCBI، موضحة رقم الانضمام PZ489030 ومعلومات التسلسل المسجلة	113
4-4	الشجرة الوراثية التطورية المبنية على تسلسلات جين <i>16S rRNA</i> . تم بناء الشجرة باستخدام طريقة الاحتمالية القصوى Maximum Likelihood، تم تقييم قوة العقد باستخدام 100 تكرار Bootstrap، تم إظهار قيم الدعم التي تزيد عن 70% فقط على الفروع. تم استخدام <i>Acinetobacter soli</i> PV960624.1 كمجموعة خارجة Outgroup. العزلات باللون الأزرق تمثل عزلات الدراسة الحالية	115
5-4	التغير الزمني لتركيز الـ Chlorpyrifos المتبقي لعزلات الدراسة ومجموعة السيطرة	118
6-4	التغير الزمني لتركيز الـ Malathion المتبقي بفعل التحلل الحيوي لعزلات الدراسة مقارنة مع مجموعة السيطرة	121
7-4	النسبة المئوية لتحلل مبيد الـ Chlorpyrifos حسب درجة حرارة الحضان	126
8-4	النسبة المئوية لتحلل مبيد الـ Malathion حسب درجة حرارة الحضان	128
9-4	النسبة المئوية لتحلل مبيد الـ Chlorpyrifos حسب الرقم الهيدروجيني pH	130
10-4	النسبة المئوية لتحلل مبيد الـ Malathion حسب الـ pH الهيدروجيني	131
11-4	النسبة المئوية لتحلل مبيد الـ Chlorpyrifos حسب التركيز الابتدائي للمبيد	134
12-4	النسبة المئوية لتحلل مبيد الـ Malathion حسب التركيز الابتدائي للمبيد	135
13-4	الترحيل الكهربائي على هلام الأغاروز (2%) لنواتج تضخيم جين <i>opd</i> (100 فولت، 70 ملي أمبير، 45 دقيقة) M: سلم الحمض النووي 100bp، 1: <i>B. subtilis</i> ، 2: <i>L. sphaericus</i> ، 3: <i>Ochrobactrum sp.</i> ، 4: <i>S. maltophilia</i> ، NC: سيطرة سالبة	138

الرقم	العنوان	الصفحة
14-4	الترحيل الكهربائي على هلام الأغاروز (2%) لنواتج تضخيم جين <i>mpd</i> (100 فولت، 70 ملي أمبير، 45 دقيقة) M: سلم الحمض النووي 100bp، 1: <i>B. subtilis</i> ، 2: <i>L. sphaericus</i> ، 3: <i>Ochrobactrum sp.</i> ، 4: <i>S. maltophilia</i> ، NC: سيطرة سالبة	138
15-4	Multiple sequence alignment لجين انزيم Esterase-like activity of phytase family protein (DQ488_RS02915) مع تسلسل الجين المرجعي المستخرج من GeneBank (WP_086470774.1). * تشير الى التطابق التام للاحماض الامينية بينهما. تم انشائه باستخدام CLUSTAL W	142
16-4	الخريطة الجينومية Genomic map لبكتريا <i>Ochrobactrum sp.</i> ، توضح الجينات ذات العلاقة بتحليل المبيدات ومواقعها على الجينوم. تم إنشاء هذه الخريطة بالاعتماد على منصة Proksee platform وسميت الجينات بأسمائها الوظيفية	143
17-4	Multiple sequence alignment لجين انزيم Carboxylesterase (الاسم الوظيفي LSPH26S_04977) مع تسلسل الجين المرجعي المستخرج من GeneBank (CAM5190762.1). * تشير الى التطابق التام للاحماض الامينية بينهما. تم انشائه باستخدام CLUSTAL W	148
18-4	الخارطة الجينومية Genomic map لبكتريا <i>L. sphaericus</i> موضحة الجينات ذات العلاقة بتحليل المبيدات ومواقعها على الجينوم. تم إنشاء هذه الخارطة بالاعتماد على منصة Proksee platform. سميت الجينات باسمائها الوظيفية	149

قائمة بمناويز الملحق

الرقم	العنوان	الصفحة
1	نتائج تشخيص عزلات الدراسة بنظام VITEK 2	179
2	صفحات تسجيل عزلات الدراسة في GenBank على موقع NCBI	184
3	طيف الامتصاص لمبيد الـ Malathion القياسي باستخدام جهاز HPLC	187
4	طيف الامتصاص لمبيد الـ Chlorpyrifos القياسي باستخدام جهاز HPLC	188
5	طيف الامتصاص باستخدام جهاز HPLC لمتبقيات ميدي الـ Chlorpyrifos و Malathion خلال 2-10 ايام من الحضانة عند 30 م°، pH 7 وتركيز 100 ملغم/ لتر	189

190	طيف الامتصاص باستخدام جهاز HPLC لمتبقيات ميبيد الـ Chlorpyrifos و Malathion باختلاف درجة الحرارة (20، 30 و 40) م°، بعد 10 ايام حضانة، pH 7 وتركيز 100 ملغم/ لتر.	6
191	طيف الامتصاص باستخدام جهاز HPLC لمتبقيات ميبيد الـ Chlorpyrifos و Malathion باختلاف pH (5، 7 و 9) م°، بعد 10 ايام حضانة، 30 م° و تركيز 100 ملغم/ لتر.	7
192	طيف الامتصاص باستخدام جهاز HPLC لمتبقيات ميبيد الـ Chlorpyrifos و Malathion باختلاف تركيز المبيد (100، 200 و 400) ملغم/ لتر، بعد 10 ايام حضانة، 30 م° و pH 7	8
193	نتائج اختبار Tow- Way ANOVA في برنامج SPSS لمتبقيات مبيد الـ Chlorpyrifos خلال مدة الحضانة + اختبار Tukey	9
194	نتائج اختبار Tow- Way ANOVA في برنامج SPSS لمتبقيات مبيد الـ Malathion خلال مدة الحضانة + اختبار Tukey	10
195	نتائج اختبار Tow- Way ANOVA في برنامج SPSS لمتبقيات مبيد الـ Chlorpyrifos حسب درجة الحرارة + اختبار Tukey	11
196	نتائج اختبار Tow- Way ANOVA في برنامج SPSS لمتبقيات مبيد الـ Malathion حسب درجة الحرارة + اختبار Tukey	12
197	نتائج اختبار Tow- Way ANOVA في برنامج SPSS لمتبقيات مبيد الـ Chlorpyrifos حسب الـ pH + اختبار Tukey	13
198	نتائج اختبار Tow- Way ANOVA في برنامج SPSS لمتبقيات مبيد الـ Malathion حسب الـ pH + اختبار Tukey	14
199	نتائج اختبار Tow- Way ANOVA في برنامج SPSS لمتبقيات مبيد الـ Chlorpyrifos حسب تركيز المبيد الابتدائي + اختبار Tukey	15
200	نتائج اختبار Tow- Way ANOVA في برنامج SPSS لمتبقيات مبيد Malathion حسب تركيز المبيد الابتدائي + اختبار Tukey	16
201	محاذاة التسلسل المتعدد MSA لتسلسل الأحماض الأمينية الخاصة بالجينات المكتشفة لبكتريا <i>Ochrobactrum sp.</i> مع التسلسلات المرجعية العالمية.	17
204	محاذاة التسلسل المتعدد MSA لتسلسل الأحماض الأمينية الخاصة بالجينات المكتشفة لبكتريا <i>L. sphaericus</i> مع التسلسلات المرجعية العالمية.	18

قائمة المصطلحات

المختصر	المصطلح الكامل
U.S. EPA	United States Environmental Protection Agency
WHO	World Health Organization
OPs	Organophosphorus pesticides
AChE	Acetylcholinesterase
Ach	Acetylcholine
<i>opd</i>	Organophosphate degrading gene
<i>mpd</i>	Methyl parathion degrading gene
WGS	Whole Genome Sequencing
PCR	Polymerase Chain Reaction
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
<i>16S rRNA</i>	16 Svedberg Ribosomal Ribonucleic Acid
FAO	Food and Agriculture Organization
DDT	Dichlorodiphenyltrichloroethane
BHC	Benzene hexachloride
Bt	Bacillus thuringiensis
IPM	Integrated Pest Management
DNA	Deoxy ribonucle acid
RNA	Ribonucleic acid
RNAi	RNA interference
dsRNA	Double-stranded RNA
OCs	Organochlorines pesticides
TCP	3,5,6-trichloro-2-pyridinol
NCBI	National Center for Biotechnology Information
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
ADHD	Attention deficit hyperactivity disorder
OPHs	organophosphorus hydrolases
OPH	organophosphate hydrolase
MPH	methyl parathion hydrolase
HGT	Horizontal Gene Transfer
MMA	Malathion Monoacid
MDA	Malathion Diacid
OMC	Organic Matter Content
AOPs	Advanced Oxidation Processes

الفصل الأول

المقدمة

INTRODUCTION

1. المقدمة Introduction

تُعرّف المبيدات Pesticides بأنها أي مادة أو خليط من المواد يُستخدم لمنع الآفات أو تدميرها أو طردها أو الحد من تأثيرها، كما يشمل هذا المصطلح المواد المستخدمة بوصفها منظمات لنمو النباتات Plant growth regulators، أو مزيلات للأوراق Defoliants، أو مواد مجففة للنباتات Desiccants (EPA, 2026). وتُعد المبيدات من أهم المدخلات المستخدمة في الزراعة الحديثة، إذ تسهم في حماية المحاصيل من الآفات التي تشمل الحشرات والأعشاب الضارة والفطريات والبكتيريا والقوارض، الأمر الذي يساعد على تقليل الخسائر الزراعية وتحسين كمية الإنتاج وجودته (Pathak *et al.*, 2022). ويعكس الانتشار الواسع لاستخدام هذه المركبات أهميتها في النظم الزراعية المعاصرة، إذ بلغ إجمالي استخدام المبيدات في الزراعة عالميًا عام 2024 نحو 3.92 مليون طن من المواد الفعالة Active ingredients، بزيادة قدرها 5% مقارنة بعام 2023، و18% مقارنة بعام 2014، وبما يزيد على الضعف مقارنة بعام 1990. كما بلغ متوسط استخدام المبيدات نحو 2.49 كغم من المواد الفعالة لكل هكتار من الأراضي الزراعية في العام نفسه (FAO, 2026).

على الرغم من المكاسب الإنتاجية الكبيرة التي توفرها المبيدات، فإن الاستخدام المكثف والواسع النطاق للمبيدات الكيميائية قد ارتبط بتداعيات بيئية وصحية نتيجة انتقال جزء من هذه المركبات إلى مكونات البيئة المختلفة، مما قد يؤدي إلى تلوث التربة والمياه والهواء (Pérez- Lucas *et al.*, 2019). كما قد تؤثر هذه المركبات في الكائنات الحية غير المستهدفة، بما في ذلك الكائنات المجهرية والنباتات والحشرات النافعة والكائنات المائية، الأمر الذي قد يهدد توازن النظم البيئية ويؤثر في بعض خدماتها الحيوية، ولاسيما عند استخدامها بصورة متكررة أو غير منضبطة (Tudi *et al.*, 2021; Raffa & Chiampo, 2021). وإضافةً إلى ذلك، يمكن أن يتعرض الإنسان للمبيدات من خلال الغذاء والماء والهواء، أو نتيجة التماس المباشر أثناء تصنيعها أو تداولها أو تطبيقها في الحقول. وتختلف التأثيرات الصحية الناتجة تبعًا لنوع المبيد ودرجة سميته والجرعة ومدة التعرض وطريقته (WHO, 2020; Shekhar *et al.*, 2024). وقد ارتبط التعرض المتكرر أو طويل الأمد للمبيدات بآثار صحية ضارة، من بينها بعض الاضطرابات العصبية

والهرمونية والإنجابية، في حين قد يؤدي التعرض الحاد لتركيزات مرتفعة إلى أعراض تسمم شديدة قد تهدد حياة الإنسان (Costa, 2018; Shekhar *et al.*, 2024).

تُعد المبيدات الفسفورية العضوية Organophosphorus pesticides (OPs) من المجموعات المهمة والواسعة الاستخدام في مكافحة عدد من الآفات الزراعية، كما تحظى باهتمام بيئي وصحي بسبب تأثيراتها المحتملة في الكائنات الحية غير المستهدفة. تعمل العديد من مركبات هذه المجموعة على تثبيط إنزيم أستيل كولين إستيراز (AChE) Acetylcholinesterase في الجهاز العصبي للآفات، مما يؤدي إلى تراكم الناقل العصبي أستيل كولين Acetylcholine (ACh) واضطراب عملية النقل العصبي (Casida, 2009; Stenersen, 2004). ومن بين هذه المركبات مييدا الـ Chlorpyrifos و الـ Malathion، اللذان استُخدما في عدد من التطبيقات الزراعية لمكافحة الآفات. وقد ارتبط الـ Chlorpyrifos بتأثيرات سمية عصبية وتنموية محتملة، في حين يُعد الـ Malathion أقل سمية نسبياً للثدييات، إلا أن استخدامه قد يمثل خطراً على بعض الكائنات المائية والحشرات النافعة بحسب التركيز وظروف التعرض (Eaton *et al.*, 2008; Gervais *et al.*, 2009; Jokanović *et al.*, 2023; Ore *et al.*, 2023). وقد أدت المخاوف المتعلقة بآثار هذه المركبات إلى مراجعة أو تقييد استخدامها في عدد من الدول، مع اختلاف الإجراءات التنظيمية باختلاف الدولة ونوع الاستخدام، ففي الولايات المتحدة، اتخذت وكالة حماية البيئة الأمريكية (EPA) United States Environmental Protection Agency إجراءات تنظيمية متعلقة باستخدام الـ Chlorpyrifos في الأغذية (EPA, 2024; Sami *et al.*, 2025). وبناءً على استمرار استخدام هذه المبيدات واحتمال وصولها إلى التربة والمياه، برزت الحاجة إلى تطوير طرائق فعالة وآمنة للحد من تراكمها ومعالجة البيئات الملوثة بها.

استُخدمت طرائق فيزيائية وكيميائية متعددة للحد من تلوث التربة بالمبيدات، إلا أن ملائمة هذه الطرائق قد تكون محدودة عند تطبيقها على الترب الزراعية، خصوصاً عندما تتطلب إزالة التربة أو غسلها أو استخدام كميات كبيرة من الطاقة والماء والمواد الكيميائية. كما قد تقتصر بعض هذه المعالجات على نقل الملوث أو تركيزه في وسط آخر بدل تفكيكه (Cycoń *et al.*, 2017; Rani & Dhanian, 2014)، في حين يمكن أن تؤدي بعض المعالجات الكيميائية إلى تكوين

نواتج ثانوية تستلزم مزيداً من المعالجة. وإضافةً إلى ارتفاع كلفة التشغيل، قد تؤثر هذه الطرائق في خصائص التربة أو في الكائنات الحية الدقيقة الموجودة فيها، مما حدّ من ملاءمتها بوصفها حلاً عاماً لمعالجة التربة الزراعية الملوثة (John & Shaik, 2015; Raffa & Chiampo, 2021). ومن هنا برزت المعالجة الحيوية Bioremediation بوصفها بديلاً واعداً وأكثر توافقاً مع البيئة، إذ تقوم على توظيف الكائنات الحية، ولا سيما الكائنات الحية الدقيقة Microorganisms مثل البكتيريا والفطريات، لتحويل الملوثات العضوية أو تفكيكها من خلال نشاطها الأيضي والإنزيمي (Singh & Walker, 2006; Anjum et al., 2022). وقد يؤدي هذا النشاط إلى تحويل المبيدات إلى مركبات أبسط وأقل سمية، مع إمكانية الوصول إلى نواتج نهائية بسيطة في بعض مسارات التحلل، مما يجعل المعالجة الحيوية نهجاً مناسباً لدراسة معالجة التربة الملوثة بالمبيدات، ولا سيما عند استخدام عزلات ميكروبية قادرة على التحلل الحيوي Biodegradation (Singh & Walker, 2006; Raffa & Chiampo, 2021).

تؤدي البكتيريا دوراً مهماً في التحلل الحيوي لمبيدات الفوسفور العضوي، وقد أثبتت دراسات عديدة قدرة سلالات بكتيرية مختلفة على تحليل هذه المبيدات وتحويلها إلى نواتج أيضية أبسط، بل وتمكنت بعض العزلات من إتمام تحلل المبيد ومتابعة تحويل نواتج تحلله ضمن مسارات أيضية متعددة (Singh & Walker, 2006; Karpouzas & Singh, 2006; Abraham & Silambarasan, 2016; Verma et al., 2021). وقد عُزلت سلالات تابعة لأجناس بكتيرية متعددة وأظهرت كفاءة في تحليل الـ Chlorpyrifos و الـ Malathion ومبيدات أخرى من المجموعة نفسها، من بينها أجناس *Bacillus*، *Lysinibacillus*، *Ochrobactrum* و *Stenotrophomonas* (El-Helow et al., 2013; Akbar & Sultan, 2016; Asamba et al., 2022; Das et al., 2024). وتتفاوت كفاءة هذه العزلات في التحلل الحيوي تبعاً لعوامل متعددة تشمل الظروف البيئية مثل درجة الحرارة، والرقم الهيدروجيني، وتركيز المبيد، وتوافر المغذيات، وكذلك التركيب الجيني للعزلة ونوعية الإنزيمات التي تنتجها (Kumar et al., 2022; Farhan et al., 2021; Gaonkar et al., 2019).

تمتلك بعض البكتيريا القدرة على تحليل مبيدات الفوسفور العضوي من خلال إنتاج إنزيمات متنوعة، من بينها إنزيمات التحلل المائي Hydrolases، والإستريزات Esterases، والفوسفاتيزات Phosphatases، وإنزيمات الأكسدة والاختزال Oxidoreductases. وقد تستهدف هذه الإنزيمات روابط كيميائية مختلفة في جزيئات المبيدات، مثل روابط الفوسفور-الأكسجين (P-O)، والفوسفور-الكبريت (P-S)، والروابط الإستيرية، مما يؤدي إلى تحويل المركب الأصلي إلى نواتج بسيطة أو نهائية مختلفة (Karpouzas & Singh, 2006; Wang & Sun, 2021). ومن الجينات المرشحة التي ارتبطت بتحلل بعض مركبات الفوسفور العضوي جين methyl parathion degrading وجين (opd) organophosphate degrading gene (Horne et al., 2002; Ali et al., 2012; Barman et al., 2014; Chino-Flores et al., 2012; Chu et al., 2006). وقد كشف عن هذه الجينات في العديد من الأجناس البكتيرية مثل *Stenotrophomonas*، *Bacillus*، *Flavobacterium*، *Pseudomonas* (Phillips et al., 1990; Yang et al., 2006; Iyer et al., 2018).

ومع ذلك، أشارت دراسات أخرى إلى أن بعض العزلات البكتيرية قد تعتمد على مسارات إنزيمية بديلة لا تشمل هذه الجينات التقليدية، مما يعكس تنوعاً جينياً واسعاً في آليات التحلل الحيوي بين السلالات البكتيرية المختلفة (Iyer et al., 2018; Jiang et al., 2019; Nayak et al., 2020). وقد أتاح تفاعل البوليميراز المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR) فحص وجود جينات مرشحة محددة في العزلات البكتيرية، في حين أتاح التقدم في تقنيات تسلسل الجينوم الكامل Whole Genome Sequencing (WGS) استكشاف المحتوى الجيني للعزلات والكشف عن المسارات الإنزيمية المرشحة التي قد لا تظهر عند الاقتصار على فحص جين واحد أو عدد محدود من الجينات. ويسهم الجمع بين الفحص الجيني والتحليل الجينومي وقياس كفاءة التحلل في توسيع فهم الأساس الجيني المحتمل لقدرة العزلات البكتيرية على التحلل الحيوي، ودعم اختيار العزلات الواعدة لمزيد من الدراسات التطبيقية (Castro-Gutiérrez et al., 2020; Dunon et al., 2018; Bhende et al., 2024).

1.1. الفجوة البحثية ومبررات الدراسة: Research Gap and Rationale of the Study

على الرغم من تزايد الدراسات التي تناولت التحلل الحيوي لمبيدات الفوسفور العضوي، ما تزال المعلومات المتاحة عن كفاءة العزلات البكتيرية المحلية المعزولة من الترب الزراعية العراقية، ولاسيما ترب محافظة الديوانية، محدودة. ويتعلق هذا النقص بصورة خاصة بقدرة هذه العزلات على تحليل الـ Chlorpyrifos و الـ Malathion ، واستجابتها للظروف البيئية المختلفة، والأساس الجيني المرتبط بهذه القدرة. كما أن الاعتماد على فحص عدد محدود من الجينات المرشحة قد لا يكشف جميع المسارات الجينية والإنزيمية المرتبطة بالتحلل الحيوي، الأمر الذي يبرز الحاجة إلى توظيف تقنيات أوسع، مثل تسلسل الجينوم الكامل WGS، إلى جانب قياس كفاءة التحلل (Iyer *et al.*, 2018; Nayak *et al.*, 2020; Bhende *et al.*, 2024). وتتبع أهمية التركيز على العزلات المحلية من احتمال اختلاف خصائص التربة والمجتمعات الميكروبية والظروف البيئية بين المناطق، مما قد ينعكس على قدرة العزلات وكفاءتها في تحليل المبيدات. ومن ثم، تبرر محدودية المعلومات المحلية الحاجة إلى دراسة العزلات البكتيرية المعزولة من ترب محافظة الديوانية، وتقييم كفاءتها في التحلل الحيوي واستجابتها للظروف التجريبية، فضلاً عن استكشاف المسارات الجينية والإنزيمية المرشحة المرتبطة بهذه القدرة.

2.1. أهمية الدراسة: Importance of the Study

تستمد الدراسة الحالية أهميتها من تناولها العزلات البكتيرية القادرة على التحلل الحيوي لمبيدات الفوسفور العضوي في محافظة الديوانية، والتي تتميز بنشاط زراعي واسع واستخدام المبيدات في عدد من المحاصيل الزراعية. وتتمثل الجدة الرئيسة للدراسة، حسب مراجعة الأدبيات التي أجراها الباحث، في عدم وجود دراسة سابقة تناولت الجانب الجزيئي للبكتيريا المحللة للمبيدات في محافظة الديوانية، أو ربطت بين التقييم الكمي لتحلل مبيدي الـ Chlorpyrifos و الـ Malathion والتوصيف الجزيئي والجينومي للعزلات البكتيرية. كما تختلف العزلات التي جرى الحصول عليها في الدراسة الحالية عن العزلات التي أبلغت عنها الدراسات العراقية المحدودة سابقاً، مما يوفر فرصة لتوسيع قاعدة العزلات البكتيرية المحلية ودراسة قدراتها التحليلية في بيئة

عراقية زراعية مختلفة. ومن خلال قياس تراكيز المبيدات المتبقية باستخدام كروماتوغرافيا سائلة عالية الأداء (HPLC) High-Performance Liquid Chromatography، إلى جانب التوصيف الميكروبي والجزيئي وتحليل تسلسل الجينوم الكامل WGS للعزلات المختارة، توفر الدراسة إطاراً متكاملاً لربط كفاءة التحلل الحيوي بالخصائص الجينية والمسارات الإنزيمية المرشحة. وبذلك تمثل هذه الدراسة أساساً علمياً وبيانات أولية يمكن أن تفيد في توجيه الدراسات المستقبلية الخاصة بالمعالجة الحيوية للمبيدات في محافظة الديوانية والمناطق الزراعية العراقية الأخرى.

3.1. أهداف الدراسة: Aims of the study

انطلاقاً من الخلفية العلمية، والفجوة البحثية، ومبررات الدراسة وأهميتها، هدفت هذه الدراسة إلى تحقيق الأهداف الآتية::

1. انتقاء وتشخيص البكتيريا القادرة على التحلل الحيوي لمبيدي الـ Chlorpyrifos و الـ Malathion من الترب الزراعية في محافظة الديوانية.
2. تقييم كفاءة العزلات البكتيرية في التحلل الحيوي لمبيدي الـ Chlorpyrifos و الـ Malathion، وتحديد الظروف التجريبية المثلى (درجة الحرارة، الرقم الهيدروجيني، التركيز الأولي للمبيد ومدة الحضانة)، لتحقيق أعلى كفاءة للتحلل الحيوي لدى العزلات المختارة.
3. تحديد العلاقات التطورية للعزلات المدروسة من خلال بناء الشجرة التطورية Phylogenetic tree اعتماداً على تسلسل جين *16S rRNA*.
4. الكشف عن الجينات المرشحة المرتبطة بالتحلل الحيوي لمبيدات الفوسفور العضوي، ولاسيما الجينين *opd* و *mpd*، باستخدام تقنية PCR في العزلات المنتقاة.
5. استكشاف الأساس الجيني المحتمل للتحلل الحيوي لمبيدي الـ Chlorpyrifos و الـ Malathion من خلال تحليل تسلسل الجينوم الكامل WGS للعزلات البكتيرية المختارة والكشف عن المسارات والإنزيمات المرشحة المرتبطة بهذه القدرة.

الفصل الثاني

استعراض المراجع

**LITERATURE
REVIEW**

Literature Review

2. استعراض المراجع:

1.2. المبيدات: Pesticides

1.1.2. مفهوم المبيدات: Concept of Pesticides

مصطلح Pesticide مشتق من الكلمة اللاتينية pestis التي تعني الطاعون أو الآفة، واللاحقة -cide من caedere التي تعني القتل (Ware & Whitacre, 2004). ويعني مصطلح Pesticide عموماً بأنه مادة أو خليط يُستخدم للوقاية من الكائنات الحية التي تُعد آفات، أو القضاء عليها، أو طردها، أو إدارتها بأي شكل آخر. ويُعدّ التعريف الأساس للمبيدات، والذي يُستشهد به على نطاق واسع في الكتابات التقنية المعاصرة (Ahmad, 2024). وقد اعتمدت هذا التعريف الهيئات التنظيمية، مثل وكالة حماية البيئة الأمريكية (EPA) ومنظمة الأغذية والزراعة للأمم المتحدة Food and Agriculture Organization (FAO)، إذ تُعرّف EPA المبيدات تعريفاً واسعاً بأنها "أي مادة أو خليط من المواد يُستخدم للوقاية من أي آفة أو القضاء عليها أو طردها أو التخفيف من آثارها"، بما في ذلك الحشرات والقوارض والفطريات والأعشاب الضارة والكائنات الحية الأخرى التي تُعد ضارة (EPA, 2025).

كما تُقدّم FAO تعريفاً أكثر شمولاً للمبيدات، حيث تصفها بأنها (أي مادة أو خليط من المواد يُستخدم للوقاية من أي آفة أو القضاء عليها أو مكافحتها، بما في ذلك نواقل الأمراض التي تُصيب الإنسان أو الحيوان، والأنواع غير المرغوب فيها من النباتات أو الحيوانات التي تُسبب ضرراً أثناء إنتاج أو معالجة أو تخزين أو نقل أو تسويق الأغذية أو السلع الزراعية أو الأخشاب ومنتجاتها أو أعلاف الحيوانات، أو التي تُعيق هذه العمليات بأي شكل من الأشكال). يؤكد هذا التعريف على عموم استعمال المبيدات خارج نطاق الإنتاج الزراعي (FAO, 2023). من الناحية الاصطلاحية، لا بد من التمييز بين Pesticide كفئة عامة وفئات فرعية محددة مثل مبيدات الحشرات Insecticides ومبيدات الأعشاب Herbicides ومبيدات الفطريات Fungicides وغيرها. كما ويُستخدم مصطلح منتج وقاية النبات plant protection product بشكل شائع في

السياقات التنظيمية الأوروبية، بينما يبقى مصطلح Pesticide هو السائد دولياً (Matthews, 2016).

2.1.2. الأهداف الرئيسية لاستخدام المبيدات: Primary objectives of pesticide use

يمكن تصنيف الأهداف الرئيسية لاستخدام المبيدات إلى ثلاث فئات:

1.2.1.2. الحماية الزراعية: Agricultural Protection

تحمي المبيدات المحاصيل من الأضرار التي تسببها الحشرات ومسببات الأمراض والأعشاب الضارة، مما يزيد الإنتاجية ويحسن جودة الغذاء. ومنع خسائر ما بعد الحصاد من خلال مكافحة آفات المنتجات المخزنة والكائنات الدقيقة المسببة للتلف. ويعكس الدافع الاقتصادي وراء استخدام المبيدات الحشرية العوائد المالية الكبيرة التي تتحقق من خلال حماية المحاصيل، إذ يستخدم المزارعون المبيدات لادراكهم أن خسائر المحاصيل الناتجة عن الآفات غير المكافحة تتجاوز عادةً تكاليف منتجات المبيدات، وعمالة الرش، والمعدات (Zhou et al., 2024).

2.2.1.2. حماية الصحة العامة: Public Health Protection

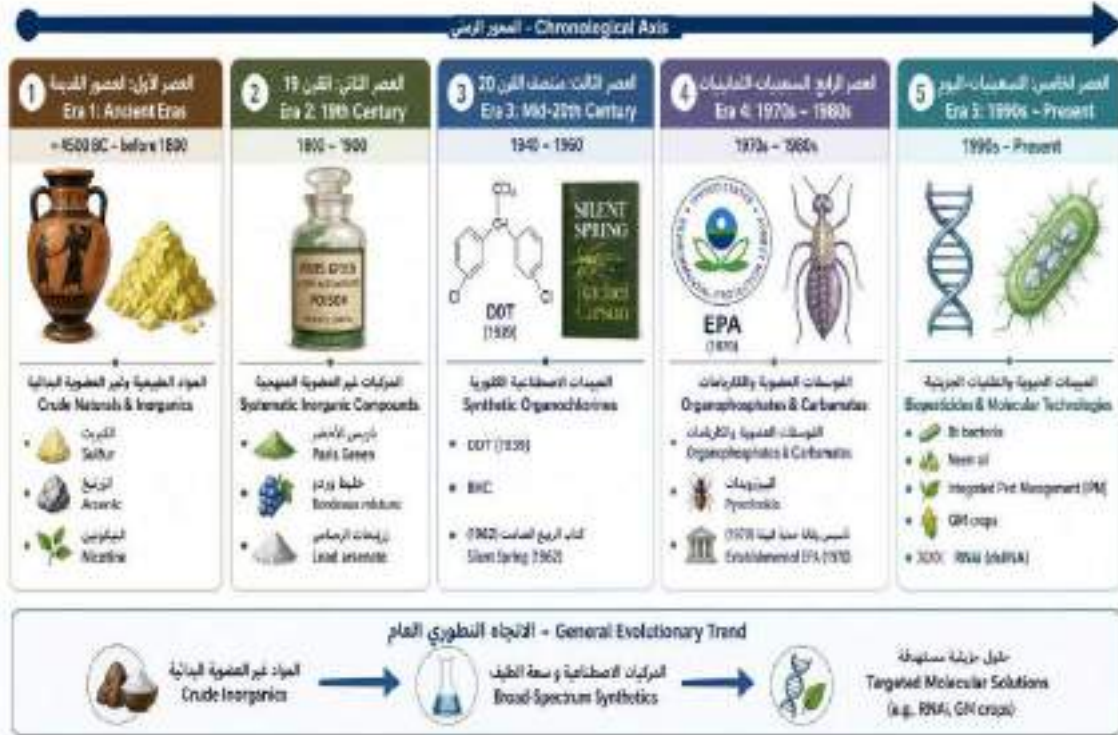
تلعب المبيدات دورًا حيويًا في مكافحة نواقل الأمراض التي تصيب الإنسان والحيوان، فقد ساهمت المبيدات الحشرية Insecticides التي تستهدف البعوض بشكل كبير في الحد من انتشار الملاريا Malaria وحمى الضنك Dengue وفيروس زيكا Zika virus في المناطق الموبوءة. كما تساعد مبيدات القوارض Rodenticides في مكافحة الجرذان التي تنقل فيروس هانتا Hantavirus وداء البريميات Leptospirosis والطاعون Plague. وتُعد المطهرات والمبيدات المضادة للميكروبات ضرورية في مرافق الرعاية الصحية للوقاية من العدوى المكتسبة داخل المستشفيات (Cai & Dimopoulos, 2024).

3.2.1.2. مكافحة الآفات الصناعية والإنشائية : Industrial and Structural Pest Management

إلى جانب الزراعة، تُستخدم المبيدات لحماية المنتجات المخزنة والأخشاب والمنسوجات والمباني من النمل الأبيض والخنافس والفطريات وغيرها من الآفات. كما تُستخدم في إدارة المسطحات الخضراء ونباتات الزينة، وملاعب الغولف، والحدائق العامة، والحدائق المنزلية (Shaizee *et al.*, 2025). في الوقت نفسه، تؤكد الدراسات بأن الفوائد لا تنفصل عن الآثار الخارجية: التعرض المهني، والتعرض الغذائي، وتأثيرات التنوع البيولوجي، وتلوث المياه والتربة (Ahmad, 2024). ولذا، تشمل الأهداف الحديثة بشكل متزايد الحد من المخاطر والتوافق مع الإدارة المتكاملة للآفات (Lamichhane, 2017).

3.1.2. نبذة تاريخية عن استخدام المبيدات : A historical overview of the use of pesticides

يمثل تاريخ استخدام المبيدات مرآة عاكسة لتطور الحضارة الإنسانية نفسها، إذ يعكس التقدم في فهم الكيمياء والأحياء والبيئة. فما كان يستخدم من مواد طبيعية بدائية تحول عبر آلاف السنين إلى تقنيات جزيئية دقيقة، في رحلة تمتد من سومر القديمة إلى المختبرات البيولوجية الجزيئية المعاصرة (شكل: 2-1). يمكن تتبع هذه الرحلة عبر خمس مراحل زمنية متميزة:



الشكل (2-1): التطور التاريخي لاستخدام المبيدات

1.3.1.2. العصور القديمة: المواد الطبيعية وغير العضوية

تعود أقدم السجلات الموثقة لاستخدام المبيدات إلى الحضارة السومرية حوالي عام 2500 ق. م.، حيث استخدم السومريون مركبات الكبريت لمكافحة الحشرات والعث، مما يعد أول تطبيق مسجل لمادة كيميائية في مكافحة الآفات (Saad et al., 2025). بينما استخدم الصينيون وصفات تعتمد على مركبات الزرنيخ حوالي عام 900 ميلادي، لحماية محاصيل الحنائق من الحشرات. ومع حلول القرن السابع عشر، ظهرت أولى المبيدات النباتية، حيث تم استخلاص النيكوتين Nicotine من التبغ واستخدامه كمبيد حشري فعال، وإن كان فهم آليات تأثيره يبقى محدوداً في تلك الحقبة (Sparks & Nauen, 2015). على الرغم من فعالية هذه المواد، إلا أنها كانت تُطبق بطرق بدائية، مع جهل تام بمخاطرها الصحية والبيئية طويلة الأمد.

2.3.1.2. القرن التاسع عشر (1800-1900): ظهور المركبات غير العضوية

شهد القرن التاسع عشر تحولاً هاماً مع الاستخدام المنهجي للمركبات غير العضوية في مكافحة الآفات. ومن أبرز التطورات استخدام مبيد باريس الأخضر Paris Green عام 1867 لمكافحة خنفساء البطاطا المدمرة في الولايات المتحدة (Sparks & Nauen, 2015). كما شهدت هذه الحقبة الزمنية ظهور خليط بوردو Bordeaux mixture، وهو مزيج من كبريتات النحاس والجير، اكتشفه Pierre Marie عام 1882، والذي أثبت فعاليته العالية ضد مرض البياض الزغبي Downy mildew في مزارع العنب. وأصبحت زرنيخات الرصاص Lead arsenate أيضاً مبيداً حشرياً واسع الانتشار خلال هذه الحقبة (Saad et al., 2025). وعلى الرغم من فعالية هذه المبيدات غير العضوية، إلا أنها كانت غالباً شديدة السمية للكائنات غير المستهدفة، فضلاً عن بقائها في البيئة لمدة طويلة.

3.3.1.2. منتصف القرن العشرين: ثورة المبيدات الصناعية (1940-1960)

شهد منتصف القرن العشرين بداية عصر المبيدات الصناعية، والذي يُشار إليه غالباً باسم ثورة المبيدات الصناعية. تميزت هذه الفترة باكتشاف وانتشار استخدام مركبات عضوية صناعية عالية الفعالية وواسعة النطاق. وكان من أبرز الأحداث اكتشاف

1939 Paul Müller على يد (DDT) Dichlorodiphenyltrichloroethane (Casida, 2009). أحدث الـ DDT ومركبات الكلور العضوية الأخرى، مثل Benzene hexachloride (BHC)، ثورة في مكافحة الآفات نظراً لثباتها وفعاليتها وساهمت بشكل كبير في تعزيز الإنتاجية الزراعية ولعبت دوراً حاسماً في مكافحة نواقل الأمراض الخطيرة كالمalaria والتيفوس، وأنقذت ملايين الأرواح (Hayes et al., 2017). ومع ذلك، أدى الاستخدام العشوائي والمفرط لهذه المواد إلى تراكمها في السلاسل الغذائية. وفي عام 1962، هزّ كتاب الربيع الصامت Rachel Carson لـ Silent Spring الضمير العالمي، موثقاً التأثيرات الكارثية لهذه المبيدات على الطيور والكائنات الحية، مما أشعل فتيل الحركة البيئية الحديثة وأدى إلى حظر الـ DDT في العديد من الدول (Carson, 2002).

4.3.1.2 السبعينيات والثمانينيات: الفوسفات العضوية، والكاربامات:

أدى الضغط الشعبي والعلمي الذي أثاره كتاب الربيع الصامت إلى مراجعة شاملة لسياسات المبيدات. تأسست وكالة حماية البيئة الأمريكية EPA في عام 1970، وبدأت بتطبيق أطر تنظيمية صارمة لتسجيل المبيدات ووضع حدود للبقايا المسموح بها (EPA, 2025). شهدت هذه الحقبة تحولاً استراتيجياً من مركبات الكلور العضوية طويلة الأمد إلى مركبات أقل ثباتاً في البيئة، لكنها غالباً ما كانت أكثر سمية، مثل الفوسفات العضوية Organophosphates والكاربامات Carbamates (Hayes et al., 2017). كما ظهر في هذا الوقت جيل جديد من البيرثرويدات الصناعية Pyrethroids، التي تميزت بفعالية عالية جداً بمعدلات استخدام منخفضة، إضافة إلى انخفاض سميتها النسبية للتديبات مقارنة بالفوسفات العضوية، مما جعلها خياراً مفضلاً في العديد من التطبيقات الزراعية والمنزلية (Sparks & Nauen, 2015).

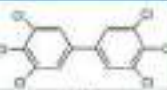
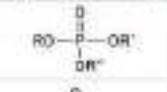
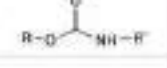
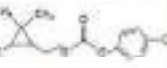
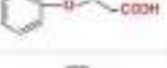
5.3.1.2 من التسعينيات حتى الآن: المبيدات الحيوية، والإدارة المتكاملة للآفات

منذ تسعينيات القرن الماضي وحتى اليوم، شهدت صناعة المبيدات تحولاً جذرياً، مدفوعةً بالمخاوف البيئية، ومقاومة الآفات، والنقد في مجال التقنية الحيوية. وتتميز هذه الفترة بالتركيز المتزايد على المبيدات الحيوية Biopesticides، المشتقة من مواد طبيعية كالحوانات والنباتات والبكتيريا. ومن الأمثلة على ذلك بكتيريا *Bacillus thuringiensis* (Bt) لمكافحة الحشرات،

وزيت النيم Neem oil كمبيد حشري نباتي واسع النطاق (Ayilara *et al.*, 2023). وقد حظي مفهوم الإدارة المتكاملة للآفات (IPM) Integrated Pest Management بقبول واسع، داعياً إلى إتباع نهج شامل يجمع بين الأدوات البيولوجية والفيزيائية والكيميائية لإدارة أعداد الآفات بطريقة تقلل من المخاطر الاقتصادية والصحية والبيئية (Fenibo & Matambo, 2025). ويهدف تطوير منتجات منخفضة المخاطر، بما في ذلك بعض النيونيكوتينويدات Neonicotinoids (على الرغم من الجدل الذي أثير لاحقاً بسبب تأثيرها على الملقحات مثل النحل)، إلى توفير مكافحة فعالة للآفات مع تقليل الأثر البيئي. كما سهّلت التكنولوجيا الحيوية الحديثة تطوير مواد وقائية مدمجة في النباتات، ومحاصيل معدلة وراثياً تُنتج سموماً بكتيرية أو تمنح مقاومة لمبيدات الأعشاب، ونهجاً معدلاً وراثياً لإدارة الآفات، والتي مثّلت نماذج جديدة تتجاوز المبيدات الكيميائية الاصطناعية التقليدية (Soto-Barajas *et al.*, 2025). مثل تقنية التداخل للرنا الريبوزي RNA interference (RNAi) التي تعتمد على تسلسل محدد من RNA لتنشيط التعبير الجيني عبر محفزات من الرنا ثنائي السلسلة (Double-stranded RNA (dsRNA)، وباستغلال هذا المسار التنظيمي الطبيعي، تستطيع تقنية RNAi استهداف جينات الحشرات الأساسية بدقة عالية، مما يؤدي إلى إعاقة نموها، أو انخفاض الخصوبة لديها، أو حتى نفوقها (Kumaraswamy & Huang, 2026).

4.1.2. تصنيف المبيدات: Classification of Pesticides

تُشكل المبيدات مجموعة متنوعة - كيميائياً ووظيفياً - من المركبات، ويُعد تصنيفها أساساً لفهم خصائصها واستخداماتها وآثارها المحتملة. توجد أنظمة تصنيف متعددة، يُقدم كل منها منظوراً مختلفاً لتصنيف هذه المواد. تؤكد الدراسات أن المبيدات تُصنف عادةً بحسب تركيبها الكيميائي، والآفة المستهدفة التي تُكافحها، وسميتها ودرجة خطورتها على الإنسان والبيئة (الشكل 2-2)، مع وجود تصنيفات إضافية تعتمد على آلية عملها والمنشأ (Tudi *et al.*, 2021; Pathak *et al.*, 2022).

حسب الكائن المستهدف BY TARGET ORGANISM	حسب خطورة السمية BY WHO TOXICITY HAZARD	حسب التركيب الكيميائي BY CHEMICAL STRUCTURE
 مبيدات حشرية Insecticides	 الفئة Ia (شديدة الخطورة جداً) Class Ia (Extremely Hazardous)	 مركبات الكلور العضوية Organochlorines
 مبيدات أعشاب Herbicides	 الفئة Ib (شديدة الخطورة) Class Ib (Highly Hazardous)	 مركبات الفسفور العضوية Organophosphates
 مبيدات فطريات Fungicides	 الفئة II (متوسطة الخطورة) Class II (Moderately Hazardous)	 الكربامات Carbamates
 مبيدات قوارض Rodenticides	 الفئة III (قليلة الخطورة) Class III (Slightly Hazardous)	 بيرثرويدات Pyrethroids
 مبيدات ديدان Nematicides	 الفئة I (غير مرجح خطورتها) Class I (Unlikely Hazard)	 النيونيكوتينويدات Neonicotinoids
 مبيدات قراد Acaricides		 التريازينات Triazines
 مبيدات رخويات Molluscicides		 أملاح الفينوكسي الكربوكسيت Phenoxycarboxylic Acids
 أخرى Others		 أخرى Others

الشكل (2-2): تصنيف المبيدات حسب التركيب الكيميائي، السمية والكائن المستهدف

1.4.1.2. التصنيف حسب الكائن المستهدف: Classification by Target Organism

يُعد التصنيف حسب الآفة المستهدفة Target Pest من أكثر التصنيفات شيوعاً واستخداماً، حيث تُقسّم المبيدات وفقاً لنوع الكائن الحي الذي تُكافحه (Robson, 2011). وتُعد مبيدات الحشرات، والأعشاب، والفطريات الأكثر استخداماً على مستوى العالم (Saad *et al.*, 2025). ويوضح الجدول (1-2) بعض المجموعات الرئيسية:

جدول (1-2): تصنيف المبيدات حسب الكائن المستهدف

نوع المبيد	الهدف	الأمثلة
مبيدات حشرية Insecticides	الحشرات بجميع مراحل نموها	Chlorpyrifos, Malathion
مبيدات أعشاب Herbicides	النباتات غير المرغوب فيها	Glyphosate, Atrazine
مبيدات فطرية Fungicides	الفطريات المسببة للأمراض النباتية	Mancozeb, Chlorothalonil
مبيدات قوارض Rodenticides	القوارض	Warfarin, Bromadiolone
مبيدات نيماتودا Nematicides	الديدان الخيطية	Aldicarb, Fenamiphos
مبيدات جراثيم Bactericides / Virucides	البكتيريا والفيروسات	Streptomycin, Oxytetracycline
مبيدات قراديات Acaricides / Miticides	الحلم والقراد	Dicofol, Fenazoquin

2.4.1.2. تصنيف منظمة الصحة العالمية: WHO Classification

تُصنف منظمة الصحة العالمية (WHO) World Health Organization المبيدات حسب درجة خطورتها Hazard إلى خمس فئات بناءً على قيم الجرعة المميتة النصفية Lethal Dose, 50% (LD₅₀) عن طريق الفم أو الجلد للفئران (WHO, 2020). تمثل قيمة LD50 جرعة المادة اللازمة لقتل 50% من مجموعة الاختبار، ويعتمد هذا التصنيف على نطاق واسع من قبل الهيئات التنظيمية والمنظمات الدولية وصناعة المبيدات الحشرية لتقييم المخاطر والإبلاغ عنها واتخاذ القرارات التنظيمية بشأنها (FAO, 2025).

جدول (2-2): تصنيف المبيدات وفقاً لتوصيات منظمة الصحة العالمية (WHO, 2020)

الفئة	مستوى السمية	LD ₅₀ عن طريق الفم (ملغم/كغم من وزن الجسم)	LD ₅₀ عن طريق الجلد (ملغم/كغم من وزن الجسم)	امثلة
Ia	شديد الخطورة Extremely hazardous	5 >	10 >	Parathion, aldicarb
Ib	عالية الخطورة Highly hazardous	50 - 5	100 - 10	Chlorpyrifos, Carbofuran
II	متوسط الخطورة Moderately hazardous	500 - 50	1000 - 100	Malathion, Chlorothalonil
III	قليل الخطورة Slightly hazardous	2000 - 500	4000 - 1000	Pyrethrum, Glyphosate
U	غير محتمل الخطورة Unlikely hazard	2000 <	4000 <	Spinosad, <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt)

3.4.1.2- التصنيف حسب التركيب الكيميائي: Chemical Structure

يُعدّ التركيب الكيميائي للمبيد أساساً رئيساً لتصنيفه، إذ يُحدد خصائصه الفيزيائية والكيميائية، وثباته، وبقاؤه في البيئة، وفي نهاية المطاف، نشاطه البيولوجي وسميته (Garud et al., 2024). وتُصنّف المبيدات عموماً إلى مجموعتين رئيسيتين:

1.3.4.1.2 Inorganic Pesticides : **المبيدات غير العضوية**

تشمل مركبات بسيطة لا تحتوي على الكربون في تركيبها الأساسي، مثل مركبات الكبريت المستخدمة كمبيدات فطرية، ومركبات النحاس مثل خليط بورديو Bordeaux mixture، ومركبات الزرنيخ والزرنيق (Sparling, 2017). وقد حلت المبيدات العضوية محل معظم المبيدات غير العضوية بسبب فعاليتها العالية وتنوع استخداماتها.

2.3.4.1.2 Synthetic Organic Pesticides : **المبيدات العضوية الصناعية**

تشمل هذه المجموعة المركبات العضوية التي تحتوي على الكربون في تركيبها، وتنقسم إلى فئات رئيسية عدة:

A. المركبات العضوية الكلورية: Organochlorines (OCs)

كانت هذه المركبات من أوائل المبيدات العضوية الصناعية، ومن أمثلتها ثنائي كلورو ثنائي فينيل ثلاثي كلورو الإيثان Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT). تتميز هذه المركبات بثباتها العالي، وبقائها في البيئة، وقدرتها على التراكم الحيوي. وعلى الرغم من فعاليتها، إلا أن طول مدة بقائها في البيئة وآثارها الضارة أديا إلى حظرها على نطاق واسع في العديد من البلدان (Garud *et al.*, 2024; Sánchez-Bayo, 2012).

B. المركبات العضوية الفوسفاتية: Organophosphates (OPs)

طُوِّرت هذه المركبات كبدايل لمركبات الـ OCs، إذ تحتوي على ذرة فوسفور مركزية مرتبطة بمجموعات مختلفة، وهي عموماً أقل ثباتاً في البيئة، ولكنها غالباً ما تكون أكثر سمية للثدييات، حيث تعمل كمثبطات لإنزيم الأسيتيل كولينستيراز (AChE) acetylcholinesterase، من أشهرها: الكلوربيريفوس Chlorpyrifos، والمالاثيون Malathion، والديازينون Diazinon (Saad *et al.*, 2025; Bhende *et al.*, 2022).

C. الكربامات: Carbamates

تشبه مركبات الـ OPs في آلية عملها كمثبطات لإنزيم AChE، وهي مشتقة من حمض الكرباميك Carbamic Acid. وتتميز عموماً بأنها أقل ثباتاً وأقل سمية من مركبات OPs، ومن أشهرها مبيد الكارباريل Carbaryl والميثوميل Methomyl (Singh & Robson, 2011; Walker, 2006).

D. البيرثرويدات: Pyrethroids

وهي نظائر صناعية للبيرثريينات الطبيعية الموجودة في أزهار الأقحوان، وتُعرف بتأثيرها السريع في القضاء على الحشرات وسميتها المنخفضة نسبياً للثدييات. وتعمل هذه المركبات عن طريق تعطيل الجهاز العصبي للحشرات، من أشهرها البيرميثرين Permethrin، والدلتامثرين Deltamethrin (Sánchez-Bayo, 2012).

E. مركبات أخرى: Other compounds

تشمل الفئات الكيميائية المهمة الأخرى النيونيكوتينويدات Neonicotinoids والتريازينات Triazines، ولكل منها تركيب كيميائي واستخدامات محددة. فالنيونيكوتينويدات، هي مبيدات حشرية جهازية تحاكي النيكوتين وتؤثر على الجهاز العصبي المركزي للحشرات (Sánchez-Bayo, 2012). أما التريازينات، فهي مبيدات أعشاب جهازية، تُستخدم للسيطرة على الحشائش عريضة الأوراق والأعشاب الضارة عن طريق تثبيط عملية البناء الضوئي Photosynthesis (Dayan et al., 2019).

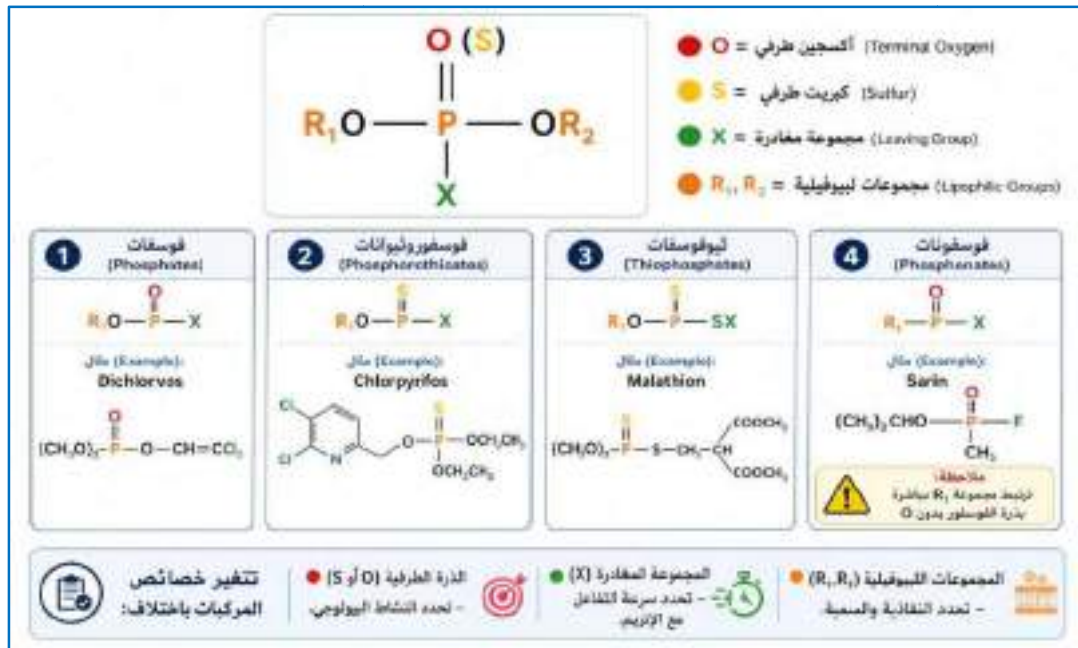
وتمثل المبيدات الحيوية Biopesticides فئة متنامية من المبيدات المشتقة من مصادر طبيعية، مثل الحيوانات، والنباتات، والبكتيريا، وبعض المعادن. وهي تُعد بديلاً أكثر أماناً وصديقاً للبيئة مقارنة بالمبيدات الكيميائية الصناعية (Garud et al., 2024; Khursheed et al., 2022). إلا أنها قد تكون أقل فعالية من المبيدات الكيميائية في الظروف الحقلية، ومدة صلاحيتها قصيرة مما يجعلها تتطلب ظروف تخزين خاصة، وتكلفة إنتاجها مرتفعة وقد تستغرق وقتاً أطول لإظهار تأثيرها مقارنة بالمبيدات الكيميائية (Hamrouni et al., 2025).

5.1.2. مبيدات الفسفور العضوية: Organophosphorus Pesticides (OPs)

تُعد مبيدات الفوسفور العضوية (OPs) من أكثر مجموعات المبيدات الحشرية استخداماً على مستوى العالم، حيث تمثل نحو 30-40% من سوق المبيدات الحشرية العالمية، وتستعمل على نطاق واسع في الكثير من المحاصيل الزراعية مثل القطن، والذرة، وفول الصويا، والخضروات. وتعود هذه الشعبية إلى فعاليتها العالية، وتكلفتها المنخفضة نسبياً، وقابليتها للتحلل الحيوي Biodegradable مقارنةً بمبيدات الكلور العضوي OCs شديدة الثبات (Saad *et al.*, 2025; Krishnan *et al.*, 2025). وقد تم تصنيع أول مركبات الـ OPs في منتصف القرن التاسع عشر، ولكن خصائصها السمية لم تُكتشف إلا في ثلاثينيات القرن العشرين، حين تم تطوير غازات الأعصاب الفوسفورية مثل (Sarin و Tabun) خلال الحرب العالمية الثانية، مما مهد الطريق لتطوير المبيدات الحشرية الفوسفورية لاحقاً (Costa, 2018; Petroianu, 2014).

1.5.1.2. التركيب الكيميائي العام للـ OPs: General Chemical Structure of OPs

تتميز OPs بوجود ذرة فوسفور مركزية في تركيبها الجزيئي، مرتبطة بمجموعات متنوعة تحدد خصائصها الكيميائية والسمية (Gupta, 2015; Robson, 2011). وتشتمل الصيغة العامة لهذه المركبات على ثلاثة مكونات أساسية (الشكل: 2-3).



الشكل (2-3): التركيب الكيميائي العام لمركبات الفسفور العضوية

- **مجموعات ليبوفيلية Lipophilic groups:** وهما مجموعتان عضويتان، غالباً ما تكونان من الألكوكسيل (Alkoxy, -OR) أو الألكيل (Alkyl, -R) أو الألكيلثيو (Alkylthio, -SR). وتلعب هاتان المجموعتان دوراً في نفاذية المركب عبر الأغشية الحيوية وتحديد درجة سميته (Singh & Walker, 2006).
- **مجموعة مغادرة Leaving group:** وهي مجموعة ترتبط بذرة الفوسفور برابطة غير مستقرة، تنفصل عند تفاعل المركب مع الإنزيم المستهدف. وتشمل الأمثلة الشائعة الهاليدات (مثل الفلور أو الكلور)، والسيانيد، ومجموعة النيتروفينيل (مثل حمض بارا-نيتروفينول) (Gupta, 2015).
- **الذرة الطرفية Terminal atom:** وهي إما ذرة أوكسجين أو ذرة كبريت مرتبطة برابطة مزدوجة مع الفوسفور (P=S, P=O). وتُعرف المركبات التي تحوي P=O باسم الأوكسونات Oxons، وهي نشطة بيولوجياً بشكل مباشر، بينما المركبات التي تحوي P=S تُعرف باسم الثيوانات Thioates، وتحتاج إلى تحويل إنزيمي Oxidation إلى الأوكسونات النشطة Active Oxons (Singh & Walker, 2006).

2.5.1.2. تصنيف الـ OPs حسب التركيب الكيميائي: Classification of OPs by Chemical Structure

يعتمد تصنيف مركبات الـ OPs على ثلاثة متغيرات كيميائية رئيسية تحدد خصائصها السمية والبيئية: الذرة الطرفية (الأكسجين O أو الكبريت S)، المجموعة المغادرة (X)، والمجموعات الليبوفيلية (R_1, R_2) (Robson, 2011). ويوضح الشكل (2-3) البنية العامة لهذه المركبات مع إيضاح هذه المتغيرات.

تعكس هذه المتغيرات الكيميائية تبايناً واضحاً في السلوك البيئي والسمية لهذه المبيدات. فالفوسفات مثل الـ Dichlorvos نشطة بيولوجياً مباشرة، مما يجعلها سريعة التأثير ولكنها غير مستقرة في البيئة (Gupta, 2015). في المقابل، تحتاج الفوسفوروثيوانات كالـ Chlorpyrifos إلى تنشيط استقلابي إلى الشكل الأوكسوني P=O، مما يمنحها انتقائية أعلى تجاه الحشرات مقارنة بالثدييات، نظراً لاختلاف كفاءة أنظمة الأكسدة بين الكائنات المختلفة (Singh & Walker, 2006; Bhende et al., 2022). أما الفوسفوروديثيوانات مثل Malathion فتمتاز بوجود

رابطين من الكبريت، مما يجعلها قابلة للتحلل السريع بواسطة إنزيمات Carboxylesterases في أنسجة الثدييات، بينما تفتقر الحشرات إلى هذه القدرة، مما يمنحها هامش أمان أعلى (Singh & Walker, 2006). وتختلف الفوسفونات عن الفوسفات بوجود رابطة مباشرة بين الكربون والفوسفور P-C بدلاً من الرابطة عبر الأكسجين P-O-C، مما يجعلها أكثر ثباتاً تجاه التحلل المائي والإنزيمي (Gupta, 2015). ويلخص الجدول (2-3) المزايا التفريقية لكل فئة.

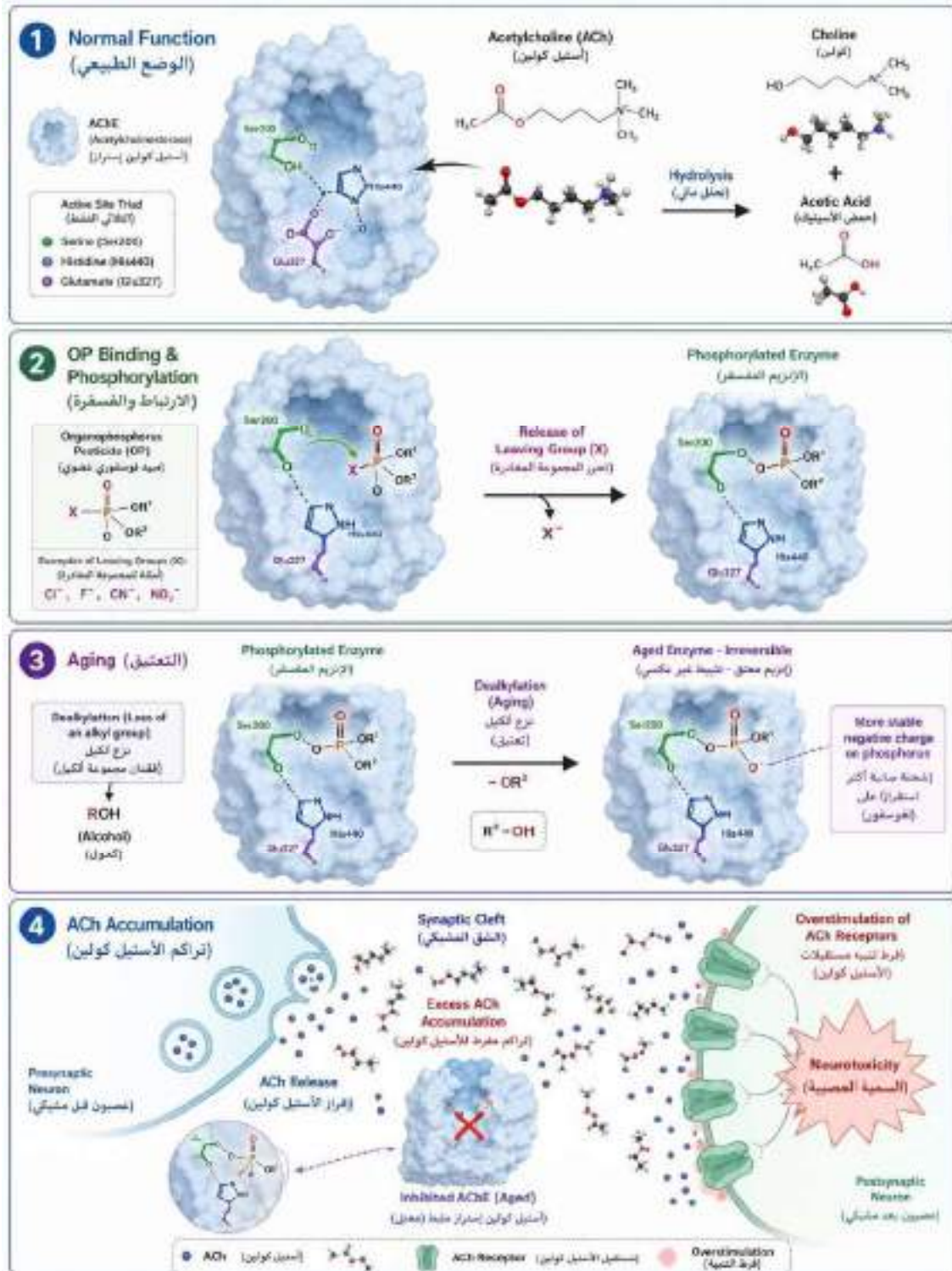
جدول (2-3): تصنيف الـ OPs حسب التركيب الكيميائي

الفئة Class	الذرة الطرفية Terminal Atom	النشاط البيولوجي Biological Activity	الميزة التفريقية Feature Key	مثال Example
فوسفات Phosphates	O (P=O)	نشط مباشرة Directly active	سريع التأثير، غير مستقر في البيئة Short-lived	Dichlorvos
فوسفوروثيونات Phosphorothioates	S (P=S)	يحتاج تنشيطاً (أكسدة) Requires activation	انتقائية أعلى للحشرات Higher insect selectivity	Chlorpyrifos, Parathion
فوسفوروديثيونات Phosphorodithioates	S (P=S) + S-	يحتاج تنشيطاً Requires activation	يتحلل بسرعة في الثدييات Rapidly detoxified in mammals	Malathion
فوسفونات Phosphonates	O (P=O) مع رابطة P-C	نشط مباشرة Directly active	أكثر ثباتاً في البيئة More environmentally persistent	Sarin, Soman

3.5.1.2 آلية عمل مبيدات الفوسفور العضوي: Mechanism of Action of OPs

تعتمد السمية العصبية لـ OPs على قدرتها على تثبيط إنزيم Acetylcholinesterase (AChE)، وهو الإنزيم المسؤول عن إنهاء النقل العصبي في الوصلات العصبية العضلية neuromuscular junctions أو المشابك العصبية nerve synapses ولاسيما المشابك الكولينية Cholinergic Synapses عن طريق تحلل الناقل العصبي Acetylcholine (ACh)

إلى كولين Choline و حمض الخليك Acetic acid (Eaton *et al.*, 2008; Gupta, 2015). ويوضح الشكل (2-4) مراحل تثبيط إنزيم AChE، بدءاً من ارتباط المبيد بالإنزيم وصولاً إلى تراكم الـ ACh وتأثيراته السمية.



الشكل (2-4): آلية تثبيط إنزيم AChE بواسطة OPs

A. الارتباط والتكوين الأولي للإنزيم-المبيد (Enzyme-Inhibitor Complex)

يتميز إنزيم AChE بموقع نشط Active Site يحتوي على ثالثوت تحفيزي Catalytic Triad يتكون من ثلاث بقايا أحماض أمينية رئيسة هي: السيرين Serine، والهستيدين Histidine، والجلوتامات Glutamate. وتلعب هذه البقايا دوراً متكاملاً في تحفيز التفاعل؛ إذ يقوم الهستيدين بسحب بروتون من مجموعة الهيدروكسيل (OH^-) في بقايا السيرين، مما يزيد من قدرتها على الهجوم النووي. وفي الوقت نفسه، يعمل الجلوتامات على تثبيت شحنة الهستيدين وتوجيه التفاعل نحو المسار الصحيح (Saad *et al.*, 2025; Singh & Walker, 2006).

عند دخول جزيء المبيد الفوسفوري، يرتبط بالموقع النشط للإنزيم عبر تفاعل استبدال محب للنواة Nucleophilic Substitution. حيث تقوم مجموعة الهيدروكسيل المنشطة من بقايا السيرين بمهاجمة ذرة الفوسفور المركزية في جزيء المبيد، مما يؤدي إلى انفصال المجموعة المغادرة Leaving Group-X وتكوين مركب وسطي غير مستقر بين الإنزيم والمبيد Enzyme-OP complex (Gupta, 2015; Kosimov *et al.*, 2025).

B. المرحلة الثانية: الفسفرة Phosphorylation

ينتقل المركب الوسيط بسرعة إلى تكوين رابطة فوسفورية مستقرة نسبياً بين ذرة الفوسفور في جزيء المبيد وذرة الأوكسجين في بقايا السيرين، في عملية تعرف بالـ Phosphorylation. وتؤدي هذه العملية إلى تثبيط الإنزيم بشكل شبه دائم، حيث تتراوح مدة ارتباط الفوسفور بالإنزيم من ساعات إلى أيام، وقد تطول في بعض الحالات لتصل إلى أسابيع (Saad *et al.*, 2025; Robson, 2011). وتعتمد سرعة هذه العملية على بنية المبيد، فالأوكسونات Oxons التي تحتوي على P=O تكون أسرع في الارتباط والفسفرة من الثيوانات Thioates التي تحتوي على P=S (Singh & Walker, 2006).

C. المرحلة الثالثة: التعتيق Aging

إذا لم تحدث إزالة للفسفرة Dephosphorylation خلال مدة زمنية محددة، تحدث عملية التعتيق Aging، وهي تفاعل كيميائي يؤدي إلى فقدان إحدى المجموعات الألكيلية

Dealkylation من جزيء المبيد المرتبط بالإنزيم، مما ينتج عنه رابطة فوسفورية أكثر استقراراً ولا رجعة فيها Irreversible Inhibition. وتتراوح فترة التعتيق بين دقائق إلى ساعات حسب نوع المبيد؛ فبعض المركبات (مثل السارين) تتعتق بسرعة خلال دقائق، بينما تستغرق أخرى (مثل الكلوربيريفوس) ساعات حتى تتعتق (Gupta, 2015; Eaton *et al.*, 2008).

D. المرحلة الرابعة: تراكم الـ ACh

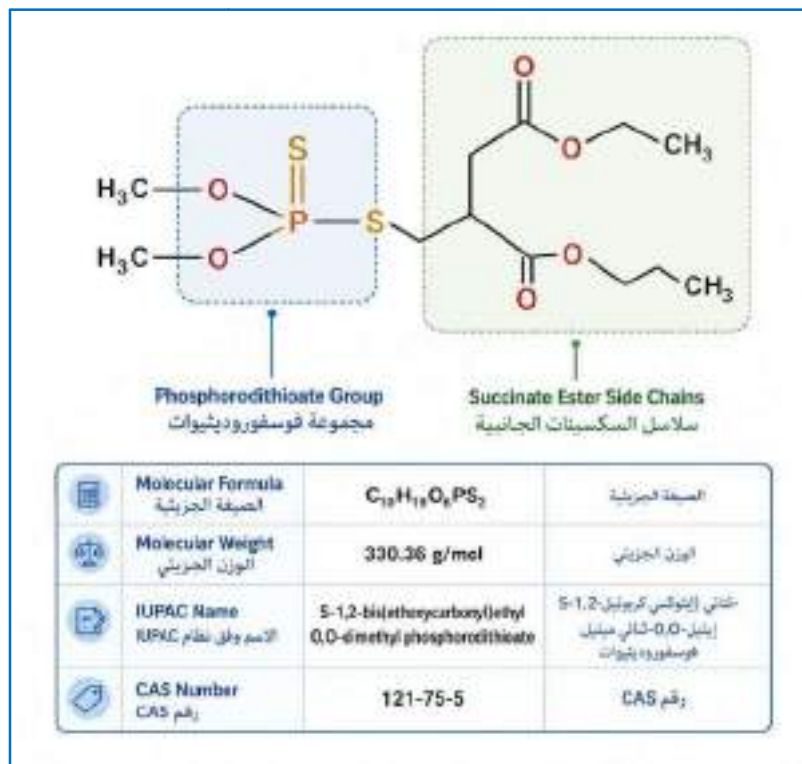
نتيجة لتثبيط إنزيم AChE، يتراكم الناقل العصبي ACh في الشق المشبكي Synaptic Cleft، مما يؤدي إلى استمرار تحفيز المستقبلات الكولينية Cholinergic Receptors في كل من الجهاز العصبي المركزي والمحيطي، وظهور الأعراض السمية (Saad *et al.*, 2025). وتشمل هذه الأعراض: زيادة الإفرازات اللعابية والعرقية، والدوار، والغثيان، وتشنج العضلات، وصعوبة التنفس، والارتباك، وتغيرات في معدل ضربات القلب، وقد تؤدي الجرعات العالية إلى الغيبوبة والوفاة بسبب الفشل التنفسي (Kosimov *et al.*, 2025).

4.5.1.2. المبيدات المستخدمة في هذه الدراسة : Pesticides used in this study

1.4.5.1.2. المالاتيون Malathion

يُعد المالاتيون (S-1,2-bis(ethoxycarbonyl)ethyl O,O-dimethyl phosphorodithioate) واحداً من أوائل المبيدات الفوسفورية العضوية التي صُممت خصيصاً لتكون أقل سمية على الثدييات، وهو ما جعله أيقونة في مجال مكافحة المتكاملة للآفات (Saad *et al.*, 2025). تم تطويره في أوائل خمسينيات القرن العشرين على يد الكيميائي الأمريكي Jack T. Casaday في مختبرات شركة American Cyanamid، حيث كان الهدف الأساس هو إنتاج مبيد فعال ضد الحشرات ولكن بآلية تسمح بتحلله السريع في أجسام الحيوانات ذوات الدم الحار (Gervais *et al.*, 2009). وقد تحقق ذلك فعلياً بفضل التركيب الكيميائي الفريد لـ Malathion، الذي يحتوي على مجموعتي إستر كربوكسيل Carboxyl ester تجعلانه عرضة للتحلل بواسطة إنزيمات الكربوكسيل إستراز Carboxylesterases الموجودة بكثرة في الكبد

والبلازما لدى الثدييات، بينما تقتقر الحشرات إلى هذه القدرة (Hodgson , 2004; Buratti & Testai, 2006).



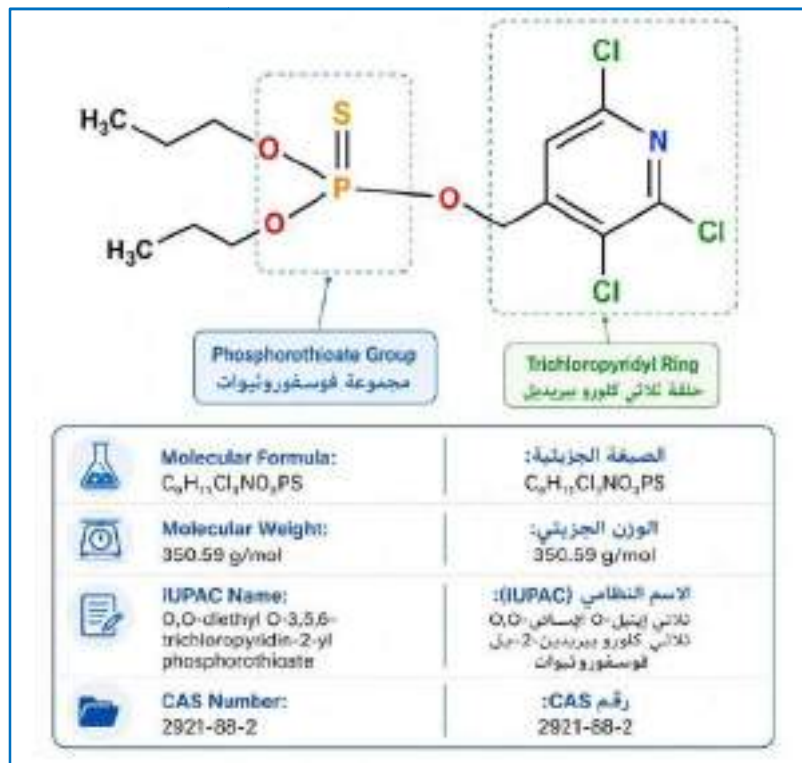
الشكل (2-5): الصيغة التركيبية لمبيد الملاثيون

سرعان ما انتشر استخدام الـ Malathion في الزراعة لمكافحة مجموعة واسعة من الآفات الحشرية الماصة والقارضة التي تصيب الفواكه، والخضروات، والحبوب، ونباتات الزينة (Saad *et al.*, 2025). كما احتل مكاناً مهماً في برامج الصحة العامة، حيث استُخدم بنجاح في مكافحة البعوض الناقل للأمراض مثل الملاريا وحمى الضنك، وكذلك في الطب البيطري لعلاج الجرب والقمل في الحيوانات الأليفة والماشية (Gervais *et al.*, 2009). وعلى الرغم من تصنيف منظمة الصحة العالمية له ضمن الفئة II (متوسط الخطورة) (WHO, 2020)، إلا أن تناوله بجرعات عالية قد يؤدي إلى أعراض تسمم حادة، خاصة أن تنشيطه الحيوي Bioactivation بواسطة إنزيمات السيتوكروم P450 يحوله إلى المالاوكسون Malaoxon، وهو المستقلب النشط الذي يثبط إنزيم AChE بشكل لا رجعة فيه (Buratti & Testai, 2006).

يتميز الـ Malathion بفترة نصف عمر قصيرة في البيئة تتراوح بين 0.5-17 يوماً في التربة، و1.65-17.4 يوماً في الماء (Gervais et al., 2009)، مما يقلل من تراكمه في النظم البيئية، لكنه يظل شديد السمية للنحل والكائنات المائية (Krieger, 2010). وقد أدى الاستخدام الواسع لـ Malathion إلى ظهور سلالات بكتيرية قادرة على استخدامه كمصدر للكربون والفوسفور، مما جعله نموذجاً دراسياً مهماً في أبحاث المعالجة الحيوية. وقد تم عزل وتوصيف العديد من البكتيريا المحللة لـ Malathion مثل *Pseudomonas putida*، *Bacillus cereus*، *Acinetobacter johnsonii*، *Ochrobactrum* sp. و *Rosellomorea* sp. (Singh & Walker, 2006; Jiang et al., 2019; Singh et al., 2012).

2.4.5.1.2 الكلوربيريفوس Chlorpyrifos

على النقيض من الـ Malathion ، مثل الكلوربيريفوس O,O-diethyl O-3,5,6-trichloropyridin-2-yl phosphorothioate نقلة نوعية في مجال المبيدات الفوسفورية بفضل قوته الاستثنائية ضد آفات التربة والحشرات واسعة الانتشار. طوّره شركة Dow Chemical Company في منتصف الستينيات (Krieger, 2010)، وسرعان ما أصبح أحد أكثر المبيدات الحشرية مبيعاً في العالم، حيث استُخدم في أكثر من 100 محصول زراعي، بما في ذلك القطن، والذرة، وفول الصويا، والخضروات، بالإضافة إلى مكافحة النمل الأبيض في المباني (Saad et al., 2025; Nandhini et al., 2021). ويتميز بوجود حلقة بيريدين مكلورة (trichloropyridin-2-yl) تجعله شديد الثبات نسبياً، وقليل الذوبان في الماء (0.002 غ/لتر)، مما يزيد من بقائه في التربة وتراكمه في الكائنات غير المستهدفة (Eaton et al., 2008).



الشكل (2-6): الصيغة التركيبية لمبيد الكلوربيريفوس

صنف الـ Chlorpyrifos حسب منظمة الصحة العالمية ضمن الفئة Ib (عالي الخطورة) (WHO, 2020). وعلى عكس الـ Malathion، يفتقر الـ Chlorpyrifos إلى المجموعات الإستيرية التي تسهل تحلله في الثدييات، مما يجعله أكثر سمية وأطول بقاءً في الأنسجة الدهنية (Nandhini *et al.*, 2021). آلية سميته تعتمد على تحوله الحيوي إلى الكلوربيريفوس-أوكسون Chlorpyrifos-oxon بواسطة إنزيمات السيتوكروم P450، وهو مركب نشط يثبط AChE بشكل قوي ودائم (Eaton *et al.*, 2008). وقد أدت المخاوف المتزايدة حول سميته العصبية، خاصة على الأطفال والعمال الزراعيين، إلى حظر أو تقييد استخدامه في العديد من الدول، بما في ذلك الاتحاد الأوروبي والولايات المتحدة (Ghorab *et al.*, 2026). ومع ذلك، لا يزال مستخدماً في العديد من البلدان، مما يجعله ملوثاً بيئياً منتشراً في التربة والمياه الجوفية (Kiran *et al.*, 2025).

استعراض المراجع الفصل الثاني

يمتد عمر النصف لـ Chlorpyrifos في التربة من 7 إلى 120 يوماً، وفي الماء من 16 إلى 73 يوماً، مما يجعله أكثر استمرارية من الملاثيون (Nandhini *et al.*, 2021). ويُعد الـ 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP) المستقلب الرئيس لتحلله، وهو مركب أكثر استقراراً وله سمية بيئية خاصة به (Kumar *et al.*, 2023). وقد تم عزل العديد من السلالات البكتيرية القادرة على تحليل الـ Chlorpyrifos، مثل *Bacillus spp.*، *Pseudomonas spp.*، *Ochrobactrum sp.*، *Stenotrophomonas sp.* و *Lysinibacillus sp.* (Abraham & Silambarasan, 2016; Asamba *et al.*, 2022; Adams *et al.*, 2024). ويمثل التحلل المائي للرابطة الفوسفورية بواسطة إنزيمات الفوسفوتريستراز Phosphotriesterases الخطوة الرئيسة في مسار التحلل الحيوي، مما يجعله هدفاً مهماً للدراسات الجينية والأنزيمية.

جدول (2-4): الخصائص المقارنة للملاثيون والكلوربيريفوس

الخاصية	Malathion	Chlorpyrifos
الصيغة الكيميائية	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS
الوزن الجزيئي (غم/مول)	330.36	350.59
الفئة الكيميائية	Phosphorodithioate	Phosphorothioate
الحالة الفيزيائية	سائل عديم اللون	مادة صلبة بلورية بيضاء
نقطة الانصهار (م°)	2.9	41.5
الكثافة (غم/سم ³)	1.23	1.4 ~
قابلية الذوبان في الماء عند 25 م° (كغم/لتر)	145 (يذوب بشكل معتدل)	1.4 (منخفضة جداً)
فئة خطر حسب منظمة الصحة العالمية	متوسط الخطورة (II)	شديد الخطورة (Ib)
آلية التأثير الأساسية	تنشيط AChE	تنشيط AChE
آلية الانتقائية/الحماية في الثدييات	تحلل سريع بواسطة Carboxylesterases	ضعف الحماية، تنشيط مباشر وقوي AChE لـ
المستقلب الرئيسي	Malathion monoacid/diacid	3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP)
عمر النصف في التربة (يوم)	17 - 0.5	120 - 7
عمر النصف في الماء (يوم)	17.4 - 1.65	73 - 16
السمية البيئية	شديد السمية للنحل والكانثات المائية	شديد السمية للكانثات المائية والفقاريات الأرضية

5.5.1.2. الآثار البيئية والصحية للـ OPs : Environmental and Health Impacts of OPs

تشكل مبيدات الـ OPs تحدياً بيئياً وصحياً متزايداً على المستوى العالمي، نظراً لاستخدامها الواسع في الزراعة ومكافحة الآفات، وقدرتها على الانتشار في جميع النظم البيئية (Mali *et al.*, 2023). فعلى الرغم من فعاليتها العالية ضد الحشرات، إلا أن الجزء الأكبر من هذه المركبات لا يصل إلى الآفات المستهدفة، بل ينتشر في التربة، والمياه السطحية والجوفية، والهواء، ليصل في النهاية إلى الكائنات غير المستهدفة، بما في ذلك الإنسان (Ore *et al.*, 2023). وقد أشارت الدراسات إلى أن بعض مركبات الـ OPs، مثل الـ Chlorpyrifos، يمكن أن تبقى في البيئة لمدة طويلة، لاسيما في التربة والرواسب، مما يزيد من احتمالية تراكمها الحيوي Bioaccumulation وتضخمها الحيوي Biomagnification في السلاسل الغذائية (Kumar *et al.*, 2023; Tzilivakis *et al.*, 2026).

لا تقتصر الآثار البيئية للـ OPs على تلوث التربة والماء فحسب، بل تمتد آثارها لتشمل تأثيرات سمية حادة ومزمنة على الكائنات غير المستهدفة، وخاصة الملقحات والكائنات المائية. فالنحل، على سبيل المثال، شديد الحساسية لهذه المركبات، حيث تؤدي الجرعات المنخفضة إلى اضطرابات في التعلم والتذكر، وفقدان القدرة على العودة إلى الخلية، مما يساهم في ظاهرة انهيار المستعمرات Colony Collapse Disorder (Tzilivakis *et al.*, 2026; Fouad, 2026). كما أن الكائنات المائية، مثل الأسماك واللافقاريات، تتأثر بشدة بجريان المبيدات من الحقول إلى المسطحات المائية؛ إذ تسبب الـ OPs تثبيط إنزيم AChE في الأسماك، مما يؤدي إلى اضطرابات حركية، وفشل تنفسي، ونفوق جماعي (Karthick Rajan *et al.*, 2024). كما تؤثر هذه المبيدات في الطيور التي تتغذى على الحبوب أو الحشرات الملوثة، مسببة تسمماً عصبياً واضطرابات في التكاثر (Tzilivakis *et al.*, 2026).

كما تمتد التأثيرات البيئية للـ OPs إلى المجتمعات الميكروبية في التربة، والتي تشكل العمود الفقري للدورات الحيوية Biogeochemical cycles. وقد أظهرت الدراسات أن التعرض

لا Chlorpyrifos يثبط النشاط الميكروبي، ويغير بنية المجتمعات البكتيرية والفطرية، مما يؤثر سلباً على خصوبة التربة وتحلل المواد العضوية (Cheng *et al.*, 2023; Hou *et al.*, 2023). كما لوحظ أن هذه المبيدات تقلل من تنوع الميكروبات المفيدة، مثل بكتيريا تثبيت النيتروجين *Azotobacter*، *Rhizobium* وتحلل الفوسفات *Phosphate-solubilizing bacteria*، مما ينعكس على نمو النباتات وإنتاجيتها (Jaiswal *et al.*, 2024). ومع ذلك، أشارت بعض الدراسات إلى أن المجتمعات الميكروبية يمكن أن تتكيف مع التلوث عبر تعزيز نمو سلالات مقاومة أو قدرة على تحليل المبيدات، ولكن هذا التكيف يأتي على حساب فقدان التنوع الوظيفي للتربة (Maharana *et al.*, 2025).

أما على صحة الإنسان، فتتمثل الـ OPs خطراً صحياً كبيراً عبر التعرض المهني (العمال الزراعيون، فنيو مكافحة) أو التعرض البيئي (استهلاك الأغذية والمياه الملوثة، واستنشاق الهواء الملوث) (Shekhar *et al.*, 2024; Bayoumi, 2022). وتتمثل الآلية الأساسية للسمية في تثبيط إنزيم AChE، مما يؤدي إلى تراكم الأسيتيل كولين وظهور متلازمة كولينية حادة تشمل تشنجات عضلية، وغثيان، وإفرازات مفرطة، وفي الحالات الشديدة شلل تنفسي وغيوبة (Gupta, 2015). لكن التأثيرات لا تقتصر على الحالة الحادة؛ إذ ارتبط التعرض المزمن للجرعات المنخفضة بالعديد من الأمراض العصبية، مثل مرض باركنسون *Parkinson's disease*، الزهايمر *Alzheimer's disease*، واضطراب نقص الانتباه وفرط النشاط *Attention deficit hyperactivity disorder (ADHD)* (Jokanović *et al.*, 2023). كما أشارت دراسات حديثة إلى أن الـ OPs يمكن أن تسبب اضطرابات للغدد الصماء، مؤثرة على الهرمونات الجنسية وهرمونات النمو، ومرتبطة بزيادة خطر الإصابة بالسرطان، واضطرابات الغدة الدرقية، وتأخر النمو لدى الأطفال (Soleman *et al.*, 2024). وتتمثل الفئات الأكثر عرضة للخطر بالأطفال، والنساء الحوامل، والعمال الزراعيين الذين يتعرضون لهذه المركبات بشكل منتظم (Prathiksha *et al.*, 2023).

جدول (2-5): الآثار البيئية والصحية لمبيدات الفوسفور العضوية

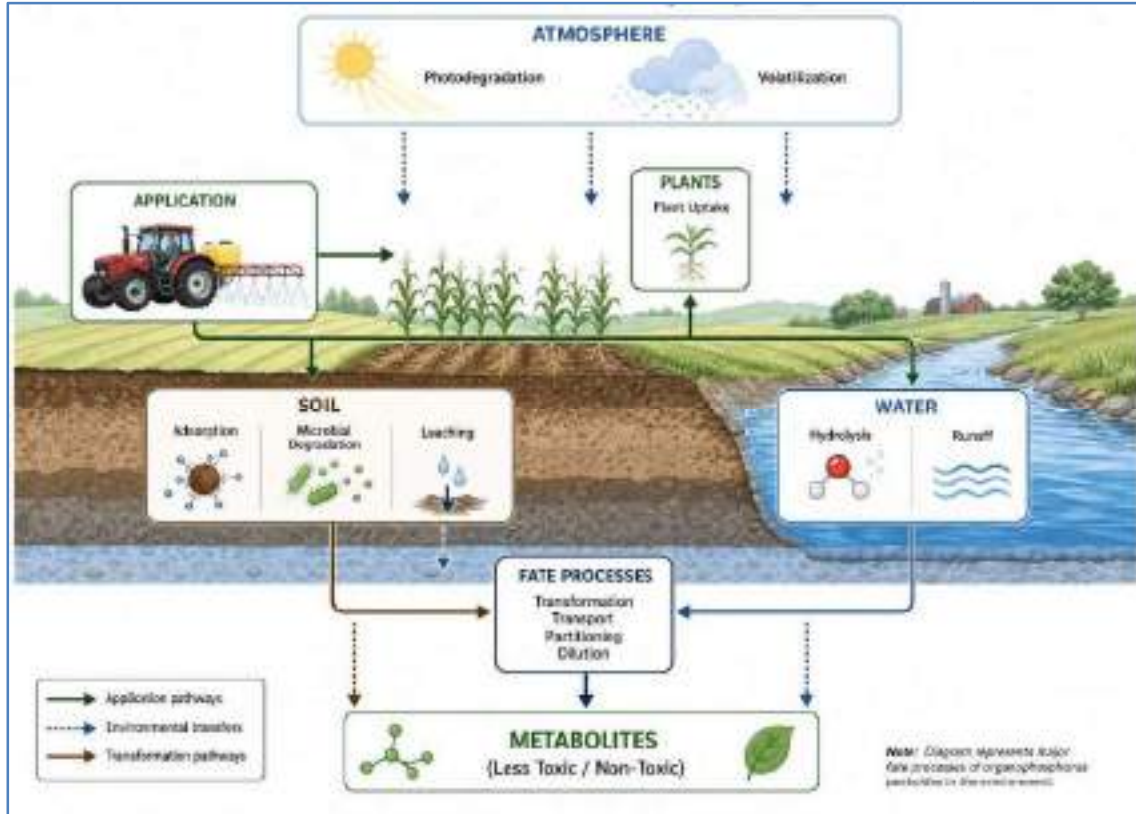
فئة التأثير	نوع التأثير	المراجع
تلوث التربة	تراكم بقايا مبيدات الفوسفور العضوية؛ اضطراب المجتمعات الميكروبية في التربة؛ ضعف الدورات الجيوكيميائية الحيوية	Ghorab <i>et al.</i> , (2026); Rodríguez <i>et al.</i> , (2020)
تلوث المياه	بقايا مبيدات الفوسفور العضوية في المياه السطحية والجوفية؛ سمية للكائنات المائية؛ احتمال تلوث مياه الشرب	Mali <i>et al.</i> , (2023); Karthick Rajan <i>et al.</i> , 2024
تلوث الهواء	بقايا مبيدات الفوسفور العضوية في الهواء من خلال الانجراف الرذاذي والتطاير؛ مخاطر التعرض التنفسي	Kosimov <i>et al.</i> , (2025)
التأثيرات على الكائنات الحية الدقيقة في التربة	انخفاض الكتلة الحيوية الميكروبية؛ تغير بنية المجتمع؛ تثبيط تثبيت النيتروجين، والنترت، والتحلل	Ghorab <i>et al.</i> , (2026)
التأثيرات على الحياة المائية	نفوق الأسماك؛ اضطراب السلاسل الغذائية المائية؛ تأثيرات على التكاثر والنمو	Mali <i>et al.</i> , (2023)
التأثيرات على الطيور والتدييات	النفوق؛ انخفاض التكاثر؛ تغيرات سلوكية؛ كبت المناعة	Cheng <i>et al.</i> , (2025)
التأثيرات على الحشرات النافعة	انخفاض أعداد الملقحات؛ اضطراب مكافحة البيولوجية	Saad <i>et al.</i> , (2025)
صحة الإنسان - التأثيرات الحادة	الأزمة الكولينية؛ نقبض الحدة؛ اللعاب؛ الارتجاف العضلي؛ الضائقة التنفسية؛ الغيبوبة؛ الموت	Saad <i>et al.</i> , (2025); Cheng <i>et al.</i> , (2025)
صحة الإنسان - التأثيرات المزمنة	الاضطرابات النمائية العصبية؛ الضعف الإدراكي؛ الاختلالات الهرمونية؛ السمية الإنجابية؛ السمية المناعية؛ التسرطن	Cheng <i>et al.</i> , (2025); Mali <i>et al.</i> , (2023)

6.5.1.2. المصير البيئي للـ OPs: Environmental Fate of OPs

يتحدد المصير البيئي لمبيدات الفوسفور العضوية من خلال تفاعل معقد بين العمليات الفيزيائية والكيميائية والبيولوجية التي تحكم توزيعها، وتحولها، وثباتها في البيئة (Karthick Rajan *et al.*, 2024; Kosimov *et al.*, 2025). يعد فهم هذه العمليات ضرورياً لتقييم المخاطر البيئية التي تشكلها مبيدات الفوسفور العضوية ولتطوير استراتيجيات معالجة فعالة. ويوضح الشكل (2-7) المسارات الرئيسة للمصير البيئي لمبيدات الفوسفور العضوي في المكونات البيئية المختلفة.

في الغلاف الجوي، تتعرض الـ OPs للتحلل الضوئي Photodegradation بفعل أشعة الشمس، حيث تمتص جزيئات المبيد الطاقة الضوئية وتتحلل إلى مركبات أبسط (Bhende *et al.*, 2022). كما يمكن أن تنتقل هذه المركبات عبر الهواء بواسطة الانجراف الرذاذي Spray drift أثناء الرش، أو التطاير Volatilization من التربة والنباتات، خاصة في درجات الحرارة المرتفعة (Saad *et al.*, 2025). وتختلف قابلية الـ OPs للتطاير باختلاف ضغط بخارها،

فمبيدات مثل الديكلورفوس Dichlorvos ذات ضغط بخار مرتفع تتطاير بسرعة، بينما مركبات مثل الـ Chlorpyrifos ذات ضغط بخار منخفض تبقى في التربة لمدة أطول (Kumar *et al.*, 2023). وتشير الدراسات إلى أن التطاير يمكن أن يكون مساراً مهماً لفقدان المبيدات من التربة، خاصة في المناطق الحارة والجافة (Ore *et al.*, 2023).



الشكل (2-7): المصير البيئي لمبيدات الفسفور العضوية

في التربة، تخضع الـ OPs لعملية الامتزاز Adsorption على جزيئات التربة والرواسب، خاصة التربة الغنية بالمواد العضوية والطينية (Bhende *et al.*, 2022). وتقلل عملية الامتزاز من توفر المبيدات للتحلل الميكروبي، وتطيل مدة بقائها في البيئة (Singh & Walker, 2006). كما يمكن أن تنتقل الـ OPs من التربة إلى المياه الجوفية عبر التسرب Leaching، خاصة في التربة الرملية أو في ظل هطول أمطار غزيرة (Saad *et al.*, 2025). وتتأثر قابلية المبيدات للتسرب بذوبانيتها في الماء ومعامل الامتزاز، فالمركبات قليلة الذوبان في الماء (مثل الـ Malathion) تكون أقل عرضة للتسرب من المركبات الأكثر ذوباناً (مثل الـ Chlorpyrifos) (Tzilivakis *et al.*, 2026). وقد تم رصد بقايا الـ OPs في المياه الجوفية في العديد من

المناطق الزراعية حول العالم، مما يثير مخاوف بشأن تلوث مياه الشرب (Mali *et al.*, 2023;) (Sadia *et al.*, 2023).

في المسطحات المائية، تخضع الـ OPs لعملية التحلل المائي Hydrolysis، حيث تتفاعل مع جزيئات الماء لتتحلل إلى مركبات أبسط (Bhende *et al.*, 2022). وتتأثر سرعة التحلل المائي بشدة بدرجة الحموضة (pH)؛ إذ يزداد التحلل في الأوساط القلوية ($\text{pH} > 8$) بشكل ملحوظ، بينما يتباطأ بشكل كبير في الأوساط الحامضية (Singh & Walker, 2006). وقد أظهرت الدراسات أن فترة نصف العمر للتحلل المائي لـ Chlorpyrifos قد تصل إلى 10 أيام في الظروف المختبرية، ولكنها قد تمتد إلى عام كامل في درجات حرارة منخفضة 5°م و pH 6 (Børgensen *et al.*, 2015). كما تنتقل الـ OPs إلى المسطحات المائية عبر الجريان السطحي Runoff من الحقول الزراعية، خاصة بعد هطول الأمطار أو الري الغزير، مما يؤدي إلى تلوث الأنهار والبحيرات والمياه الساحلية (Ore *et al.*, 2023; Karthick Rajan *et al.*, 2024). وقد سُجلت تراكيز عالية من الـ OPs في المسطحات المائية القريبة من المناطق الزراعية الكثيفة، مما يشكل تهديداً للكائنات المائية وصحة الإنسان (Mali *et al.*, 2023; Makamure *et al.*,) (2023).

يُعد التحلل الحيوي Biodegradation الآلية الأساسية والأكثر فعالية في تحلل الـ OPs في البيئة، حيث تقوم الكائنات الحية الدقيقة (البكتيريا والفطريات) باستخدام هذه المركبات كمصدر للكربون أو الفوسفور، وتحويلها إلى مركبات أبسط وأقل سمية (Ghorab *et al.*,) (2026). وتُعد عملية التحلل الحيوي أسرع بحوالي 10 مرات من التحلل الكيميائي، وأسرع بحوالي 100 مرة من التحلل الضوئي، في الظروف المثلى (25-35°م) و (pH 6-8) (Børgensen *et al.*, 2015). وتعتمد سرعة ومدى التحلل الميكروبي على التركيب الكيميائي لمركب الفوسفور العضوي، وتكوين ونشاط المجتمع الميكروبي، والظروف البيئية (Rani & Dhanial, 2014).

تنتج عن عمليات التحلل المختلفة منتجات تحلل Metabolites، بعضها قد يكون أكثر سمية أو استقراراً من المركب الأم. وأهم هذه المنتجات هو 3,5,6-trichoro-2-pyridinol (TCP)، الناتج الرئيس عن تحلل الـ Chlorpyrifos، والذي يتميز بثبات عالٍ في البيئة وسمية

مماثلة للمركب الأم (Kumar *et al.*, 2023; Kiran *et al.*, 2025). كما ينتج عن تحلل الـ Malathion مركبات مثل mono- and di-malathionic acid، dimethyl thiophosphate و dimethyl dithiophosphate (Saad *et al.*, 2025). وتُعد منتجات التحلل هذه مؤشرات مهمة على حدوث التحلل الحيوي، ولكنها قد تشكل مخاطر بيئية وصحية إضافية، لا سيما في حال تراكمها في التربة أو المياه (Basapuram *et al.*, 2026).

2.2. طرق معالجة مبيدات الفوسفور العضوية Treatment Methods for OPs

يستلزم تلوث الأوساط البيئية بمبيدات الفوسفور العضوية تطوير وتنفيذ طرق معالجة فعالة لإزالتها أو إزالة سميتها. تم استكشاف طرق معالجة مختلفة، بما في ذلك الطرق الفيزيائية، الكيميائية والطرق البيولوجية (Nandhini *et al.*, 2021; Saad *et al.*, 2025).

1.2.2. الطرق الفيزيائية والكيميائية للمعالجة: Physical and Chemical methods for Treatment

تعتمد الطرق الفيزيائية والكيميائية على عمليات فصل أو تحويل كيميائي لإزالة مبيدات OPs من البيئة الملوثة، وتشمل مجموعة متنوعة من التقنيات التي تهدف إلى تقليل تركيز الملوثات أو تحويلها إلى مركبات أقل سمية، ومن أبرز هذه الطرق:

1.1.2.2. الامتزاز Adsorption

تُستخدم المواد المازة مثل الكربون المنشط، الطين، والزيوليت Zeolite لإزالة الـ OPs من المحاليل المائية، وذلك من خلال ارتباط جزيئات المبيد بسطح المادة المازة (Zhou *et al.*, 2024; Allawi & AL-Mukhtar, 2024). وتتوقف كفاءة الامتزاز على عوامل متعددة منها مساحة السطح، مسامية المادة المازة، ودرجة الحرارة والرقم الهيدروجيني للوسط (Kumar *et al.*, 2025; Negi *et al.*, 2023). وقد أثبت الكربون المنشط فعاليته في امتزاز الـ OPs، ولكنه لا يدمرها، مما يتطلب معالجة لاحقة للممتز المحمل (Zhou *et al.*, 2024; Saad *et al.*, 2025).

2.1.2.2. الأكسدة المتقدمة (AOPs) Advanced Oxidation Processes

تُعد عمليات AOPs من أكثر التقنيات الواعدة لمعالجة الـ OPs، حيث تعتمد على توليد جذور الهيدروكسيل (OH) عالية التفاعل التي تهاجم جزيئات المبيد وتحللها إلى مركبات أبسط (Zhou *et al.*, 2024; Wang *et al.*, 2025). وتشمل هذه العمليات طرقاً مثل الأكسدة الكهروكيميائية Electrochemical Oxidation، والتحفيز الضوئي Photocatalysis (Allawi & AL-Mukhtar, 2024). وقد أظهرت الدراسات أن عمليات الأكسدة المتقدمة قادرة على تحقيق معدلات إزالة عالية تصل إلى أكثر من 90% من الملوثات العضوية في مياه الصرف الصحي (Wang *et al.*, 2025; Zhou *et al.*, 2024). وعلى الرغم من فعاليتها، يمكن أن تكون عمليات AOPs مكلفة وكثيفة الاستهلاك للطاقة (Nandhini *et al.*, 2021).

3.1.2.2. التحلل المائي Hydrolysis

يعتمد على تفاعل جزيئات المبيد مع جزيئات الماء، ويحدث بشكل تلقائي في البيئة المائية، ويمكن تسريعه عن طريق التحكم في درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني (Zhou *et al.*, 2024). ويُعد التحلل المائي مساراً مهماً لتحلل العديد من مركبات الفوسفور العضوي في البيئة المائية (Allawi & AL-Mukhtar, 2024). على الرغم من فعاليته لبعض مبيدات الفوسفور العضوية، قد يتطلب التحلل المائي الكيميائي ظروفاً متطرفة من الأس الهيدروجيني ويولد كميات كبيرة من النفايات الكيميائية (Singh & Walker, 2006).

4.1.2.2. التحلل الضوئي Photolysis

يحدث نتيجة تعرض المبيد للأشعة فوق البنفسجية، مما يؤدي إلى تكسير الروابط الكيميائية (Zhou *et al.*, 2024). ويمكن تعزيز هذه العملية باستخدام محفزات ضوئية مثل ثنائي أكسيد التيتانيوم TiO_2 (Allawi & AL-Mukhtar, 2024).

5.1.2.2. الحرق Incineration

تتضمن هذه الطريقة إحراق المواد الملوثة بـ OPs بدرجة حرارة عالية، مما يؤدي إلى التدمير الحراري لمركبات الفوسفور العضوية، وعلى الرغم من فعاليتها في التدمير الكامل للمبيدات، إلا أنها مكلفة، ومستهلكة للطاقة، ويمكن أن تولد نواتج احتراق سامة مثل الديوكسينات Dioxins و الفيورانات Furans (Saad et al., 2025).

6.1.2.2. غسل التربة Soil Washing

تعتمد هذه التقنية على استخلاص الـ OPs من التربة الملوثة باستخدام الماء أو المحاليل الكيميائية، يليه معالجة المحلول المستخلص (Zhou et al., 2024). ورغم فعاليتها في إزالة الملوثات، إلا أنها تواجه تحديات مثل صعوبة تطبيقها في التربة ذات النفاذية المنخفضة أو المحتوى العالي من الطين، بالإضافة إلى الحاجة إلى معالجة إضافية للمحاليل المستخلصة والمياه المستخدمة (Saad et al., 2025).

7.1.2.2. عيوب المعالجة الفيزيائية والكيميائية: Disadvantages of Physical and Chemical Treatment

على الرغم من فعالية الطرق الفيزيائية والكيميائية، إلا أنها تواجه مشاكل أو عيوب جوهرية تحد من تطبيقها على نطاق واسع، واهم هذه المشاكل أو العيوب:

- **التكلفة الاقتصادية المرتفعة:** تتطلب هذه التقنيات استثمارات كبيرة في المعدات، والمواد الكيميائية، والطاقة، مما يجعلها غير مجدية اقتصادياً في كثير من التطبيقات (Wang et al., 2025). فعمليات مثل الأكسدة المتقدمة والترشيح الغشائي تستهلك طاقة عالية، كما أن تكاليف المواد المازة والمحفزات قد تكون باهظة.
- **التلوث الثانوي Secondary Pollution:** تؤدي بعض هذه العمليات إلى توليد ملوثات جديدة أو مخلفات خطرة تحتاج إلى معالجة إضافية. فعلى سبيل المثال، تنتج عمليات الأكسدة المتقدمة أملاحاً خطرة ومياه صرف تحتوي على مواد عضوية زائدة تتطلب معالجة لاحقة (Saad et al., 2025). كما أن الامتزاز على الكربون المنشط لا يؤدي

إلى تدمير الملوث، بل ينقلها من وسط إلى آخر، مما ينتج عنه نفايات صلبة ملوثة تحتاج إلى التخلص منها بطرق آمنة (Zhou et al., 2024).

- **عدم الاكتمال وعدم الفعالية تجاه بعض الملوثات:** لا تؤدي عمليات الأكسدة المتقدمة في كثير من الأحيان إلى تمعدن كامل Mineralization للملوثات، بل تنتج نواتج تحلل وسيطة قد تكون أكثر سمية من المركب الأصلي (Wang et al., 2025). كما أن بعض الطرق، مثل الامتزاز، غير فعالة في إزالة الملوثات ذات الوزن الجزيئي المنخفض أو في تيارات المياه ذات المحتوى الصلب المرتفع (ElkarrachE et al., 2023; Prani et al., 2026). وتتأثر كفاءة هذه العمليات بشدة بالظروف البيئية مثل الرقم الهيدروجيني، ووجود الأيونات غير العضوية، والمواد العضوية الطبيعية، مما يحد من تطبيقها العملي (Zhou et al., 2024).
- **صعوبة التطبيق في الموقع (In-situ):** معظم هذه التقنيات، وخاصة عمليات الأكسدة المتقدمة والترشيح، تتطلب نقل التربة أو المياه الملوثة إلى مواقع المعالجة، مما يزيد من التكلفة والتعقيد اللوجستي، ويحد من إمكانية تطبيقها في المواقع الملوثة بشكل واسع (Zhou et al., 2024).
- **اضطراب بنية التربة ووظيفتها:** يمكن للمعالجات الفيزيوكيميائية القائمة على التربة، مثل غسل التربة والمعالجة الحرارية، أن تعطل بنية التربة، وتقلل من خصوبة التربة، وتضر بالكائنات الحية في التربة (Ghorab et al., 2026).

2.2.2. المعالجة الحيوية للمبيدات: Bioremediation of Pesticides

تُشكل مبيدات الفسفور العضوية OPs تهديداً بيئياً متزايداً، نظراً لانتشارها الواسع في التربة والمياه والهواء، وقدرتها على التراكم في النظم البيئية (Mali et al., 2023). وفي مواجهة القيود التي تفرضها الطرق الفيزيائية والكيميائية التقليدية (ارتفاع التكلفة، التلوث الثانوي، وصعوبة التطبيق في الموقع)، برزت المعالجة الحيوية Bioremediation كبديل واعد يعتمد على استخدام الكائنات الحية الدقيقة (بكتيريا، فطريات، طحالب) أو إنزيماتها لتحويل الملوثات العضوية إلى مركبات أقل سمية، أو إلى ثاني أكسيد الكربون والماء (Kosimov et al., 2025; Kiran et al., 2025). وتشمل استراتيجيات المعالجة الحيوية التدعيم الحيوي Bioaugmentation، أي

إضافة سلالات ميكروبية مدعمة ذات قدرات تحلل عالية إلى البيئة الملوثة، والتشيط الحيوي Biostimulation، الذي يهدف إلى تحسين الظروف البيئية (كإضافة المغذيات أو الأكسجين) لتحفيز نمو الميكروبات الأصلية القادرة على التحلل (Kosimov *et al.*, 2025; Cruz *et al.*, 2026). ويهدف هذا القسم إلى استعراض مفهوم المعالجة الحيوية، ومزاياها، والتحديات التي تواجه تطبيقها، مع تقديم مقارنة شاملة مع الطرق التقليدية.

1.2.2.2 مفهوم المعالجة الحيوية وأهميتها: Concept and Importance of Bioremediation

تُعرّف المعالجة الحيوية بأنها استخدام الكائنات الحية الدقيقة، أو الإنزيمات المستخلصة منها، لتحويل الملوثات إلى مركبات أقل سمية أو إلى مركبات غير ضارة (Martínez-Burgos *et al.*, 2025; Kosimov *et al.*, 2024). وترتبط هذه العملية بعدة مفاهيم أساسية:

- **التحلل الحيوي Biodegradation**: هو تفكيك الملوثات العضوية بواسطة الكائنات الحية الدقيقة عبر تفاعلات أنزيمية، مما يؤدي إلى تحويلها إلى مركبات أبسط (Varghese *et al.*, 2025).
- **التمعدن Mineralization**: هو التحلل الكامل للملوثات العضوية إلى مركبات غير عضوية بسيطة مثل ثاني أكسيد الكربون، والماء، والأملاح المعدنية، وذلك عندما تستخدم الكائنات الحية الدقيقة الملوث كمصدر وحيد للكربون والطاقة (Martínez-Burgos *et al.*, 2024).
- **الاستقلاب المصاحب Co-metabolism**: هو تحلل الملوثات بشكل غير مقصود أثناء استقلاب الكائنات الحية الدقيقة لركائز أخرى، حيث يتم تحويل الملوث إلى مركبات أقل سمية دون أن يكون مصدراً للطاقة أو الكربون (Kosimov *et al.*, 2025).

تكمن أهمية المعالجة الحيوية في قدرتها على معالجة الملوثات العضوية الثابتة (مثل المبيدات) في التربة والمياه، دون الحاجة إلى نقلها، وبأقل تأثير سلبي على البيئة (Cycoń *et al.*, 2017). وتستند هذه العملية إلى إنتاج الكائنات الحية الدقيقة لأنزيمات متخصصة، مثل organophosphorus hydrolases (OPHs) و phosphatases، التي تقوم بتكسير الروابط

الكيميائية في جزيئات المبيدات (Kosimov *et al.*, 2025; Singh & Walker, 2006). ويُعد التحلل المائي للروابط الفوسفورية (P-O, P-S) الآلية الرئيسية في تحلل مركبات الفوسفور العضوي بواسطة البكتيريا والفطريات (Bhende *et al.*, 2022).

2.2.2.2. مزايا المعالجة الحيوية : Advantages of Bioremediation

تتميز المعالجة الحيوية بعدة مزايا جوهرية، تجعلها خياراً مفضلاً مقارنة بالطرق التقليدية:

- **الفعالية من حيث التكلفة Cost-Effectiveness:** تعتبر المعالجة الحيوية أقل تكلفة بكثير من الطرق الفيزيائية والكيميائية، حيث لا تتطلب استثمارات كبيرة في المعدات أو المواد الكيميائية أو استهلاك الطاقة، وتشير التقديرات إلى توفير يتراوح بين 65-85% مقارنة بالطرق التقليدية (Kiran *et al.*, 2025).
- **التوافق البيئي Environmental Compatibility:** تعتمد المعالجة الحيوية على عمليات طبيعية، ولا تنتج نواتج ثانوية سامة، ولا تسبب تلوثاً إضافياً للبيئة، على عكس الطرق الكيميائية التي قد تولد ملوثات جديدة (Aljabri, 2025; Martínez-Burgos *et al.*, 2024).
- **التمعدن الكامل Complete Mineralization:** يمكن للمعالجة الحيوية أن تؤدي إلى تمعدن كامل للملوثات العضوية إلى مركبات غير ضارة (CO_2 و H_2O)، وليس مجرد نقلها من وسط إلى آخر (كما في الامتزاز) أو تحويلها إلى نواتج وسيطة قد تكون أكثر سمية (كما في بعض عمليات الأكسدة المتقدمة) (Kosimov *et al.*, 2025; Martínez-Burgos *et al.*, 2024).
- **إمكانية التطبيق في الموقع In-situ Application:** يمكن تطبيق المعالجة الحيوية مباشرة في التربة أو المياه الملوثة دون الحاجة إلى نقلها إلى مواقع معالجة خارجية، مما يقلل من التكلفة والتعقيد اللوجستي، ويحد من التعرض البشري للملوثات (Kiran *et al.*, 2025).

- **الاستدامة Sustainability:** تعتمد المعالجة الحيوية على موارد طبيعية متجددة (الكائنات الحية الدقيقة)، ولا تستنزف الموارد غير المتجددة، وتتوافق مع مبادئ التنمية المستدامة (Kuppan *et al.*, 2024).
- **تعدد الاستخدامات Versatility:** يمكن استخدام المعالجة الحيوية لمعالجة مجموعة واسعة من الملوثات العضوية، بما في ذلك المبيدات، والهيدروكربونات النفطية، والمركبات المكلورة، في ظروف بيئية متنوعة (Jaiswal *et al.*, 2024).
- **القبول العام Public Acceptance:** تحظى المعالجة الحيوية بقبول عام أكبر مقارنة بالطرق الكيميائية والفيزيائية، لأنها تعتمد على عمليات طبيعية ولا تثير مخاوف بشأن إنتاج ملوثات جديدة أو التأثير السلبي على الصحة العامة (Aljabri, 2025).

3.2.2.2. تحديات المعالجة الحيوية : Challenges of Bioremediation

على الرغم من المزايا العديدة للمعالجة الحيوية، فإن تطبيقها على نطاق واسع يواجه تحديات جوهرية، منها:

- **بطء المعدلات Slow Rates:** غالباً ما تكون معدلات التحلل الحيوي أبطأ من الطرق الفيزيائية والكيميائية، خاصة في الظروف البيئية غير المثلى، مما يطيل فترة المعالجة (Jaiswal *et al.*, 2024).
- **الحساسية للظروف البيئية:** تتأثر كفاءة المعالجة الحيوية بشدة بالعوامل البيئية مثل درجة الحرارة، والرغم الهيدروجيني، وتوفر الأكسجين، والمواد المغذية، ورطوبة التربة (Bhende *et al.*, 2022).
- **صعوبة التطبيق في التربة الملوثة بمخاليط معقدة:** في البيئات الملوثة بمخاليط من المبيدات أو الملوثات الأخرى، قد تتنافس الميكروبات على الركائز، أو قد تثبط بعض الملوثات نشاطها، مما يقلل من كفاءة التحلل (Aljabri, 2025).
- **احتمالية تراكم نواتج أضرار سامة:** قد يؤدي التحلل غير الكامل للمبيدات إلى تراكم نواتج وسيطة قد تكون أكثر سمية من المركب الأم، مثل TCP الناتج عن تحلل الكلوربيريفوس (Kumar *et al.*, 2023).

- الحاجة إلى فترة تكيف **Adaptation Period**: قد تحتاج المجتمعات الميكروبية الأصلية إلى فترة تكيف لتطوير القدرة على تحليل المبيدات، خاصة في البيئات غير الملوثة سابقاً (Jaiswal *et al.*, 2024).
- محدودية الفعالية في الظروف الحقلية: تختلف الظروف الحقلية اختلافاً كبيراً عن الظروف المختبرية المثلى، مما يحد من فعالية المعالجة الحيوية على نطاق واسع (Aljabri, 2025).

جدول (2-6): مقارنة الطرق الفيزيائية والكيميائية والمعالجة الحيوية لمبيدات الفوسفور العضوية

المعيار	المعالجة الحيوية Bioremediation	الطرق الفيزيائية والكيميائية	المراجع
التكلفة Cost	منخفضة (توفير 65-85%)	مرتفعة جداً (استثمارات كبيرة في المعدات والطاقة)	Kiran <i>et al.</i> , 2025 Wang <i>et al.</i> , 2025
التأثير البيئي Environmental Impact	صديقة للبيئة، لا تنتج نواتج ثانوية سامة	قد تنتج نواتج ثانوية سامة (الديوكسينات، الفيبورانات، الأملاح الخطرة)	Aljabri, 2025 Saad <i>et al.</i> , 2025
التطبيق في الموقع In-situ Application	ممكنة، قابلة للتطبيق مباشرة في التربة والمياه الملوثة	صعبة، تتطلب نقل الملوثات إلى مواقع المعالجة	Kiran <i>et al.</i> , 2025 Zhou <i>et al.</i> , 2024
معدل المعالجة Treatment Rate	بطيء نسبياً (أيام إلى أسابيع)	سريع (ساعات إلى أيام)	Aljabri, 2025 Qattan, 2025
التمعدن الكامل Mineralization	ممكنة، تؤدي إلى تحويل الملوث إلى H_2O و CO_2	غالباً ما تكون غير مكتملة، وتنتج نواتج وسيطة قد تكون أكثر سمية	Kosimov <i>et al.</i> , 2025 Wang <i>et al.</i> , 2025
الاستدامة Sustainability	مستدامة، تعتمد على موارد طبيعية متجددة	غير مستدامة، تستهلك موارد غير متجددة وطاقة عالية	Kuppan <i>et al.</i> , 2024 Kiran <i>et al.</i> , 2025
تعدد الاستخدامات Versatility	يمكن تطبيقها على مجموعة واسعة من الملوثات العضوية	فعالية محدودة تجاه بعض الملوثات، خاصة منخفضة الوزن الجزيئي	Prani <i>et al.</i> , 2026 Martínez-Burgos <i>et al.</i> , 2024
النفايات الثانوية Secondary Waste	الحد الأدنى من النفايات، منتجات التحلل طبيعية وغير ضارة	تولد نفايات صلبة وسائلة وغازية خطرة تحتاج إلى معالجة إضافية	Wang <i>et al.</i> , 2025 Varghese <i>et al.</i> , 2025

4.2.2.2. دور البكتيريا في التحلل البيولوجي للـ OPs: Bacterial Role in Biodegradation of Ops

تُعد البكتيريا المحللة للـ OPs من أكثر الكائنات الحية الدقيقة فعالية في إزالة هذه الملوثات من البيئة، وذلك بفضل قدرتها على استخدامها كمصدر وحيد للكربون والفوسفور، أو من خلال عمليات الاستقلاب المصاحب co-metabolism (Singh & Kosimov *et al.*, 2025; Walker, 2006). وقد تم عزل وتوصيف العديد من الأنواع البكتيرية من بيئات ملوثة مختلفة، مثل التربة الزراعية، والرواسب المائية، ومياه الصرف الصحي، حيث أظهرت كفاءات تحلل تتراوح بين 40% و 99% اعتماداً على الظروف البيئية ونوع المبيد والسلالة البكتيرية المستخدمة (Bhende *et al.*, 2022; Kumar *et al.*, 2023). وتمثل هذه البكتيريا أداة حيوية في استراتيجيات المعالجة الحيوية bioremediation، سواء من خلال التدعيم الحيوي bioaugmentation بإضافة سلالات مدعمة، أو التنشيط الحيوي biostimulation لتحفيز البكتيريا الأصلية في البيئة الملوثة.

تشير الدراسات إلى أن القدرة على تحليل الـ OPs موزعة على نطاق واسع بين الأجناس البكتيرية المختلفة. من أبرز هذه الأجناس: *Bacillus*، *Pseudomonas*، *Acinetobacter*، *Lysinibacillus*، *Ochrobactrum*، *Stenotrophomonas*، *Agrobacterium*، *Rhizobium*، *Rhodococcus* و *Arthrobacter* (Singh & Walker, 2006; Kosimov *et al.*, 2025). وقد أظهرت الأبحاث أن هذه البكتيريا قادرة على تحليل مجموعة واسعة من المبيدات الفوسفورية، بما في ذلك الكلوربيريفوس والمالاتيون والباراثيون والبروفينوفوس والكوينالفوس (الجدول: 2-7) (Jaiswal *et al.*, 2024; Martínez-Burgos *et al.*, 2024).

الجدول (2-7): بعض الأجناس البكتيرية المحللة للمبيدات الفوسفورية العضوية والإنزيمات المشاركة

المرجع (Reference)	الإنزيمات الرئيسية (Key enzymes)	المبيدات الفوسفورية العضوية المتحللة	الجنس البكتيري (Bacterial genus)
Singh & Walker, 2006; Jaiswal <i>et al.</i> , 2024	فوسفاتيز OPH، MPH (phosphatases)	كلوربيريفوس، باراثيون، مالاثيون، بروفينوفوس	<i>Pseudomonas</i>
Kumar <i>et al.</i> , 2023; Kosimov <i>et al.</i> , 2025	كربوكسيل إستيراز OPH، (carboxylesterases)، فوسفاتيز	كلوربيريفوس، مالاثيون، كومافوس، بروفينوفوس	<i>Bacillus</i>
Jaiswal <i>et al.</i> , 2024; Martínez-Burgos <i>et al.</i> , 2024	هيدرولاز OPH، (hydrolases)	كلوربيريفوس، مالاثيون، بروفينوفوس	<i>Stenotrophomonas</i>
Kosimov <i>et al.</i> , 2025; Singh & Walker, 2006	فوسفاتيز OPH،	كلوربيريفوس، كلوربيريفوس-ميثيل	<i>Ochrobactrum</i>
Kumar <i>et al.</i> , 2023	هيدرولاز، فوسفاتيز	كلوربيريفوس، مالاثيون	<i>Lysinibacillus</i>
Singh & Walker, 2006	فوسفاتيز OPH،	كلوربيريفوس، باراثيون	<i>Acinetobacter</i>
Jaiswal <i>et al.</i> , 2024	OpdA	باراثيون، كلوربيريفوس	<i>Agrobacterium</i>
Kosimov <i>et al.</i> , 2025	هيدرولاز، فوسفاتيز	مالاثيون، باراثيون	<i>Rhodococcus</i>

تعتمد البكتيريا المحللة للمبيدات الفوسفورية العضوية على مجموعة متنوعة من الآليات الأنزيمية التي تمكنها من تفكيك هذه المركبات السامة. وتشمل هذه الآليات التحلل المائي hydrolysis للروابط الفوسفورية، والأكسدة oxidation، والاختزال reduction، ونزع المجموعات الألكيلية dealkylation، وتكسير الحلقات العطرية ring cleavage (Singh & Walker, 2006; Bhende *et al.*, 2022). وتُعد عملية التحلل المائي بمساعدة إنزيمات الهيدرولاز المتخصصة، مثل OPH والفوسفاتيز، الآلية الأكثر شيوعاً وفعالية، حيث تقوم بتفكيك الروابط الفوسفورية في جزيء المبيد وتحويله إلى مركبات أقل سمية (Kosimov *et al.*, 2025; Jaiswal *et al.*, 2024).

وتشفّر هذه الإنزيمات بواسطة جينات محددة، مثل جين *opd* الذي يشفر إنزيم هيدرولاز الفوسفور العضوي، وجين *mpd* الذي يشفر إنزيم هيدرولاز باراثيون الميثيل (methyl parathion hydrolase)، وجين *opdA* الذي يشفر إنزيم OpdA في بكتيريا

Agrobacterium، وجين *ophB* الذي يشفر إنزيم OPHB (Singh & Walker, 2006;) (Jaiswal et al., 2024). ويمكن أن توجد هذه الجينات على البلازميدات أو plasmids أو الكروموسومات، وقد تنتقل بين البكتيريا عبر آليات النقل الجيني الأفقي horizontal gene transfer، مما يعزز انتشار هذه القدرة في المجتمعات الميكروبية (Kosimov et al., 2025).

غالباً ما تعمل البكتيريا في البيئات الطبيعية على شكل تجمعات بكتيرية متعاونة تسمى بالتآزر البكتيري bacterial consortia، حيث يكمل كل نوع مسار التحلل الذي بدأه الآخر، مما يؤدي إلى زيادة كفاءة إزالة المبيدات مقارنة بالعزلات المفردة (Qattan, 2025; Aljabri, 2025). وقد أظهرت الدراسات أن استخدام تجمعات بكتيرية متعددة الأنواع يمكن أن يحقق معدلات تحلل أعلى بشكل ملحوظ، وذلك لأن كل نوع بكتيري يساهم بإنزيمات مختلفة تكسر الروابط الكيميائية في جزيء المبيد بشكل متكامل، مما يؤدي إلى تمعدن كامل complete mineralization للملوثات (Martínez-Burgos et al., 2024; Varghese et al., 2025). على سبيل المثال، أظهرت دراسة أن تجمعاً بكتيرياً يضم أنواعاً من *Pseudomonas*، *Bacillus* و *Stenotrophomonas* تمكن من تحليل الكلوربيريفوس بشكل كامل خلال 10 أيام، بينما لم تتجاوز كفاءة العزلات المفردة 70% في نفس الظروف (Kosimov et al., 2025). وتوضح هذه النتائج أن التعاون البكتيري يمثل عاملاً حاسماً في تعزيز كفاءة المعالجة الحيوية، خاصة في البيئات الملوثة بمخاليط معقدة من المبيدات.

يمثل التدعيم الحيوي bioaugmentation، أي إضافة سلالات بكتيرية مدعمة ذات قدرات تحلل عالية إلى البيئات الملوثة، أحد التطبيقات العملية المهمة لدور البكتيريا في المعالجة الحيوية (Cycoń et al., 2017; Kiran et al., 2025). وقد أثبتت العديد من الدراسات فعالية هذه الاستراتيجية في تسريع عملية إزالة المبيدات الفوسفورية العضوية من التربة والمياه الملوثة (Aljabri, 2025; Qattan, 2025). على سبيل المثال، أظهرت دراسة أن إضافة عزلة من *Ochrobactrum intermedium* إلى تربة ملوثة بالكلوربيريفوس أدى إلى زيادة معدل التحلل بنسبة 40% مقارنة بالمعالجات غير المدعمة (Kosimov et al., 2025). كما أظهرت أبحاث أخرى أن استخدام عزلات بكتيرية محلية معزولة من نفس البيئة الملوثة يعزز من فرص نجاح

التدعيم الحيوي، لأن هذه البكتيريا تكون قد تكيفت بالفعل مع الظروف البيئية المحلية (Kiran *et al.*, 2025; Varghese *et al.*, 2025). وتتجلى أهمية هذه الاستراتيجية في أنها توفر حلاً مستداماً وفعالاً من حيث التكلفة لمعالجة المواقع الملوثة، خاصة في المناطق الزراعية التي تعاني من تراكم المبيدات.

5.2.2.2. آلية التحلل البيولوجي للـ OPs : Mechanism of Biodegradation of OPs

تعتمد البكتيريا المحللة للمبيدات الفوسفورية العضوية على مجموعة من الآليات الكيميائية الحيوية المتخصصة التي تمكنها من تفكيك هذه المركبات السامة وتحويلها إلى نواتج أقل سمية أو إلى مركبات قابلة للتمعدن الكامل (Singh & Walker, 2006; Bhende *et al.*, 2022). وتختلف هذه الآليات باختلاف نوع البكتيريا ونوع المبيد والظروف البيئية المحيطة، إلا أنها تشترك في مبادئ عامة تقوم على كسر الروابط الكيميائية الرئيسية في جزيء المبيد، خاصة الروابط الفوسفورية phosphoester bonds التي تمثل الموقع الأساسي للهجوم الإنزيمي (Kosimov *et al.*, 2025; Jaiswal *et al.*, 2024). وتُعد هذه الآليات الأساس الذي تقوم عليه استراتيجيات المعالجة الحيوية، حيث يتم توظيف القدرات الأيضية الطبيعية للبكتيريا في إزالة الملوثات من البيئة.

1.5.2.2.2. التحلل المائي: Hydrolysis

يُعد التحلل المائي الآلية الأكثر شيوعاً وفعالية في تحلل الـ OPs بواسطة البكتيريا. وتعتمد هذه الآلية على هجوم محب للنواة nucleophilic attack بواسطة جزيء الماء على ذرة الفوسفور المركزية في جزيء المبيد، مما يؤدي إلى تكسير الرابطة بين الفوسفور والمجموعة المغادرة leaving group، سواء كانت الرابطة (P–O، P–S، أو P–N) (Singh & Walker, 2006; Bhende *et al.*, 2022). ويتم تحفيز هذا التفاعل بواسطة إنزيمات الهيدرولاز hydrolase المتخصصة، وأهمها إنزيم organophosphate hydrolase (OPH) الذي يشفر بواسطة جين *mpd*، وإنزيم methyl parathion hydrolase (MPH) الذي يشفر بواسطة جين *mpd*.

بالإضافة إلى إنزيمات phosphatases و carboxylesterases (Kosimov *et al.*, 2025; Jaiswal *et al.*, 2024). وتؤدي هذه الإنزيمات إلى كسر الرابطة الفوسفورية وإطلاق المجموعة المغادرة، مما ينتج عنه مركبات وسيطة أقل سمية، مثل diethyl phosphate و dimethyl thiophosphate، والتي يمكن أن تخضع لمزيد من التحلل بواسطة إنزيمات أخرى (Singh & Walker, 2006). وتمثل هذه الآلية المسار الرئيسي لإزالة سمية المبيدات في معظم البكتيريا المحللة، وهي الأساس الذي تقوم عليه العديد من استراتيجيات المعالجة الحيوية.

2.5.2.2. الأكسدة: Oxidation

تُمثل الأكسدة آلية مهمة أخرى في تحلل الـ OPs، وتلعب دوراً محورياً في تنشيط بعض المبيدات أو إزالة سميتها. وتعتمد هذه الآلية على إنزيمات الأكسدة، خاصة إنزيمات سيتوكروم P450 (cytochrome P450 monooxygenases)، التي تقوم بإضافة ذرة أوكسجين إلى جزيء المبيد (Singh & Walker, 2006; Bhende *et al.*, 2022). وتتمثل أهم تطبيقات هذه الآلية في تحويل مركبات الثيوانات thioates التي تحتوي على رابطة P=S إلى مركبات الأوكسون Oxons التي تحتوي على رابطة P=O، في عملية تعرف بنزع الكبريت التأكسدي oxidative desulfuration (Kosimov *et al.*, 2025; Jaiswal *et al.*, 2024).

ومن الجدير بالذكر أن هذه العملية تؤدي إلى زيادة السمية في بعض الحالات، لأن الـ Oxons تكون أكثر فعالية في تثبيط إنزيم AChE من المركبات الأم (Singh & Walker, 2006). ومع ذلك، يمكن أن تخضع الـ Oxons الناتجة لمزيد من التحلل بواسطة إنزيمات الهيدرولاز، مما يؤدي في النهاية إلى إزالة السمية. كما أن بعض البكتيريا تمتلك إنزيمات أكسدة إضافية تقوم بتكسير الحلقات العطرية أو المجموعات الجانبية في جزيء المبيد، مما يسهل عملية التمعدن الكامل (Bhende *et al.*, 2022).

3.5.2.2.2. نزع الألكيل: Dealkylation

يُعد نزع الألكيل آلية أخرى تساهم في تحلل الـ OPs، وتتمثل في إزالة المجموعات الألكيلية مثل المثيل أو الاثيل (CH_3 أو CH_2CH_3) المرتبطة بذرة الفوسفور أو بذرة الأوكسجين في جزيء المبيد (Singh & Walker, 2006; Kosimov *et al.*, 2025). وتُحفز هذه العملية بواسطة إنزيمات الأكسدة، خاصة إنزيمات السيتوكروم P450، التي تقوم بأكسدة المجموعات الألكيلية وتحويلها إلى مجموعات هيدروكسيلية، مما يؤدي إلى ضعف الرابطة بين الكربون والأوكسجين وانفصال المجموعة الألكيلية (Bhende *et al.*, 2022). ويؤدي نزع الألكيل إلى تكوين نواتج أقل سمية، مثل حمض diethyl phosphate أو حمض dimethyl phosphate، والتي يمكن أن تخضع لمزيد من التحلل بواسطة إنزيمات أخرى (Singh & Walker, 2006). وتختلف كفاءة هذه الآلية باختلاف نوع المبيد وتركيبه الكيميائي، حيث تكون أكثر فعالية في المبيدات التي تحتوي على مجموعات ألكيلية قصيرة السلسلة (Kosimov *et al.*, 2025). وتُعد هذه الآلية مساراً مهماً لإزالة السمية في بعض أنواع البكتيريا، خاصة تلك التي تفتقر إلى إنزيمات الهيدرولاز الفعالة، حيث تعمل كآلية تكميلية تساهم في تحلل المبيدات بشكل متكامل (Jaiswal *et al.*, 2024).

4.5.2.2.2. الاستقلاب المصاحب: Co-metabolism

تقوم البكتيريا في هذه الآلية بتحليل المبيدات بشكل غير مقصود أثناء استقلابها لركائز أخرى primary substrates توفر لها الطاقة والكربون اللازمين للنمو (Singh & Walker, 2006; Kosimov *et al.*, 2025). وفي هذه العملية، لا تستخدم البكتيريا المبيد كمصدر للطاقة أو الكربون، بل يتم تحويله إلى نواتج أقل سمية بفعل إنزيمات غير محددة non-specific enzymes تنتجها البكتيريا لاستقلاب الركيزة الأساسية (Bhende *et al.*, 2022). وتُعد هذه الآلية شائعة في العديد من البكتيريا الهوائية التي تنمو على مصادر كربونية بسيطة، مثل الجلوكوز أو الأسيتات، حيث تنتج إنزيمات هيدرولاز أو أكسدة تعمل على المبيدات بشكل عرضي

(Jaiswal *et al.*, 2024). وقد أظهرت الدراسات أن إضافة مصادر كربونية إضافية يمكن أن تعزز كفاءة التحلل الحيوي للمبيدات عبر تحفيز نمو البكتيريا وزيادة إنتاج الإنزيمات غير المحددة (Kosimov *et al.*, 2025). ومع ذلك، يمكن أن يؤدي وجود الركائز الأساسية إلى تثبيط تحلل المبيدات في بعض الحالات، بسبب تفضيل البكتيريا لاستقلاب الركيزة الأساسية على حساب المبيد catabolite repression، مما يستدعي دراسة دقيقة للظروف المثلى لكل نظام بيئي (Singh & Walker, 2006). وتمثل هذه الآلية تحدياً في تطبيقات المعالجة الحيوية، حيث يجب موازنة تحفيز نمو البكتيريا مع الحفاظ على كفاءة تحلل المبيدات المستهدفة.

6.2.2.2. الجينات والإنزيمات البكتيرية المشاركة في التحلل الحيوي للـ OPs:

Genes and Enzymes Involved in OPs Biodegradation

تُعد الجينات والإنزيمات الجزيئات الأساسية التي تقوم عليها عملية التحلل الحيوي للـ OPs، فالجينات هي المخزون الوراثي الذي يحمل التعليمات اللازمة لتخليق الإنزيمات، والإنزيمات هي الأدوات الوظيفية التي تنفذ التفاعلات الكيميائية لتفكيك المبيدات (Singh & Walker, 2006; Bhende *et al.*, 2022). وتعمل هذه العناصر معاً في نظام مترابط: فالجينات تُنسخ إلى رنا رسول mRNA ثم تُترجم إلى بروتينات إنزيمية تقوم بتحليل الروابط الفوسفورية في جزيء المبيد (Kosimov *et al.*, 2025). وتتميز الجينات المسؤولة عن الهدم بوجودها غالباً على البلازميدات أو العناصر الوراثية المتنقلة، مما يسهل انتقالها بين الأجناس البكتيرية المختلفة عبر النقل الجيني الأفقي (HGT) Horizontal Gene Transfer، ويعزز انتشار القدرة على التحلل في المجتمعات الميكروبية (Jaiswal *et al.*, 2024; Sharma & Pandit, 2023). وقد ساهم التعرف على هذه الجينات والإنزيمات في فهم عميق للأسس الجزيئية للتحلل الحيوي، وفتح آفاقاً واسعة لتطبيقات الهندسة الوراثية وتطوير سلالات بكتيرية ذات كفاءة محسنة (Raj & Kumar, 2022). ويُلخص الجدول (2-8) أبرز الجينات والإنزيمات الرئيسية المشاركة في تحلل الـ OPs، مع ربط كل جين بالإنزيم الذي يشفره، ومصدره البكتيري، ووظيفته.

جدول (2-8): الجينات والإنزيمات الرئيسية المشاركة في التحلل البيولوجي لـ OPs

المرجع (Reference)	الوظيفة الرئيسية (Primary) (Function)	المصدر البكتيري (Bacterial) (Source)	الإنزيم المُشفّر (Encoded) (Enzyme)	الجين Gene
Singh & Walker, 2006; Bhende <i>et al.</i> , 2022	تحلل الروابط الفوسفورية (P-O, P-S) عبر التحلل المائي	<i>Pseudomonas diminuta</i> , <i>Flavobacterium</i> sp., <i>Brevundimonas diminuta</i>	Organophosphorus Hydrolase (OPH)	<i>opd</i>
Singh & Walker, 2006; Jaiswal <i>et al.</i> , 2024	تحلل رابطة P-O-Aryl في باراثيون الميثيل	<i>Plesiomonas</i> sp. M6, <i>Burkholderia</i> sp., <i>Pseudaminobacter</i> sp.	Methyl Parathion Hydrolase (MPH)	<i>mpd</i>
Jaiswal <i>et al.</i> , 2024; Sharma & Pandit, 2023	تحلل الروابط الفوسفورية بالية مشابهة لـ OPH ولكن ببنية معدنية مختلفة	<i>Agrobacterium radiobacter</i> P230	Phosphotriesterase (PTE) / OpdA	<i>opdA</i>
Singh & Walker, 2006; Bhende <i>et al.</i> , 2022	تحلل روابط P-O و P-S في الكلوربيريفوس والباراثيون	<i>Pseudomonas</i> sp. BF1-3	Organophosphorus Hydrolase B (OPHB)	<i>ophB</i>
Raj & Kumar, 2022; Kosimov <i>et al.</i> , 2025	تحلل الروابط الفوسفورية ثنائية الإستر	<i>Sphingomonas</i> spp., <i>Sphingobium</i> spp.	Phosphodiesterase	<i>pdp</i>
Singh & Walker, 2006; Sharma & Pandit, 2023	تحلل مجموعة واسعة من المركبات الفوسفورية العضوية	<i>Pseudomonas</i> spp., <i>Brevundimonas</i> spp.	Organophosphorus Hydrolase (OPH)	<i>oph</i>
Kosimov <i>et al.</i> , 2025; Raj & Kumar, 2022	تحلل روابط الإستر الكربوكسيلية في المالاتيون والمبيدات الأخرى	<i>Bacillus</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp.	Carboxylesterases	<i>carE</i>

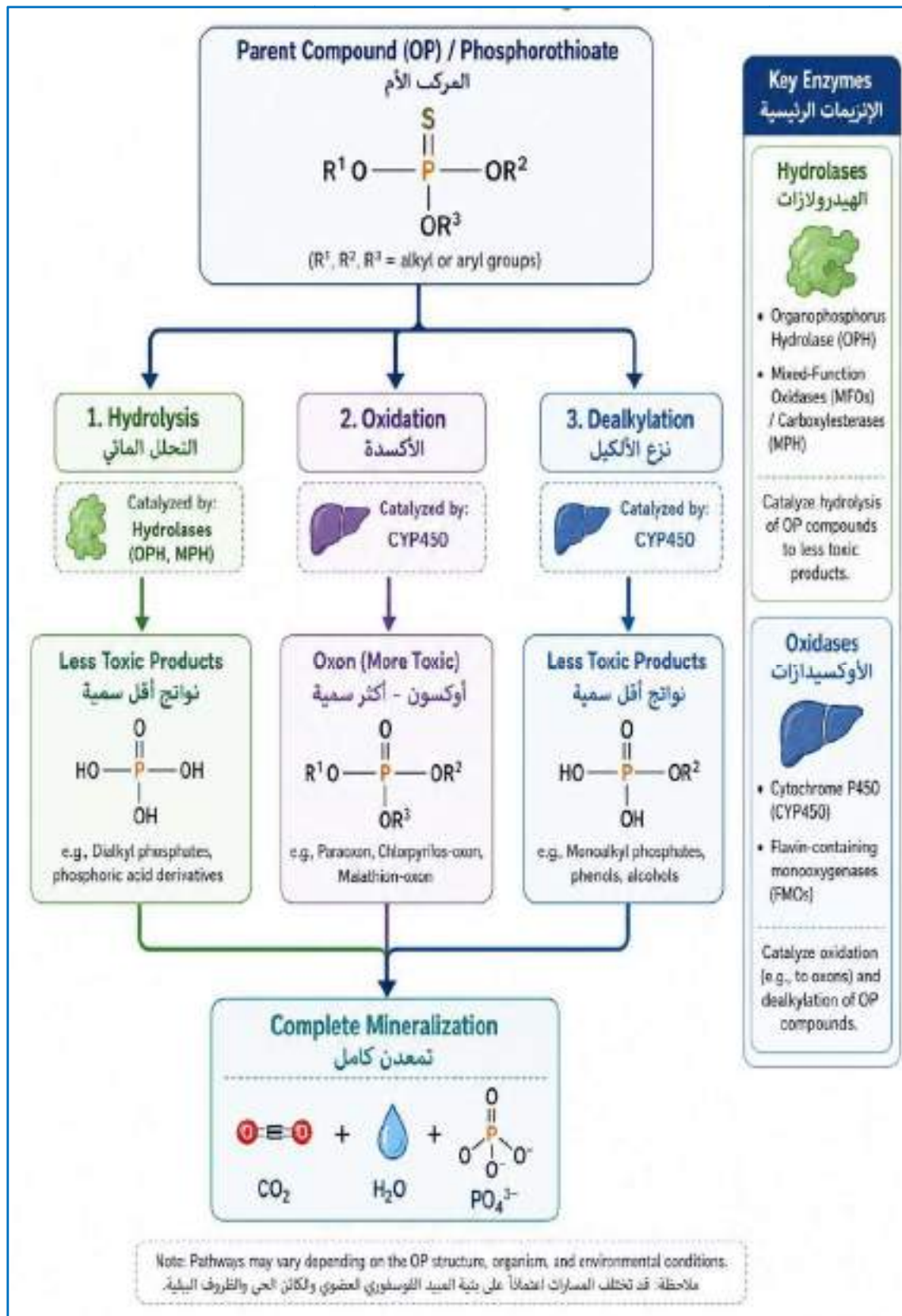
تُمثل الجينات والإنزيمات المحللة أدوات حيوية في تقييم القدرة الذاتية للتربة على التحلل الحيوي، حيث يمكن استخدام تقنيات تفاعل البوليميراز المتسلسل الكمي (qPCR) لتقدير وفرة هذه الجينات في العينات البيئية، مما يوفر مؤشراً حيوياً لقدرة التربة على إزالة المبيدات الفوسفورية (Raj & Kumar, 2022; Kosimov *et al.*, 2025). كما تشكل هذه الجينات أساساً لتطوير سلالات بكتيرية مهندسة وراثياً ذات كفاءة محسنة في تحليل المبيدات، من خلال تقنيات الاستنساخ الجيني والتعبير المفرط في سلالات مضيفة قوية النمو (Sharma & Pandit, 2023). وقد تم بالفعل تطوير سلالات مهندسة من بكتيريا *Escherichia coli* و *Pseudomonas putida*

تحمل الجينات *opd* و *mpd*، وأظهرت قدرة على تحليل مجموعة واسعة من المبيدات الفوسفورية بكفاءة تفوق السلالات البرية (Bhende *et al.*, 2022). كما أن تقنيات الهندسة البروتينية ساهمت في تحسين خصائص الإنزيمات المشفرة، مثل زيادة ثباتيتها الحرارية وتوسيع نطاق الركائز، مما يفتح آفاقاً جديدة لتطبيقات المعالجة الحيوية في ظروف بيئية متنوعة (Sharma & Pandit, 2023).

7.2.2.2. المسارات الأيضية للتحلل الميكروبي لـ OPs: Metabolic Pathways of OPs Biodegradation

تخضع المبيدات الفوسفورية العضوية بعد دخولها إلى الخلايا البكتيرية لسلسلة من التحولات الأيضية المتسلسلة التي تؤدي في النهاية إلى تحللها الكامل أو الجزئي. وتعتمد هذه المسارات الأيضية على مبادئ عامة تشمل التحلل المائي hydrolysis للروابط الفوسفورية، والأكسدة oxidation لنزع الكبريت أو تنشيط المركبات، ونزع الألكيل dealkylation لإزالة المجموعات العضوية، والاستقلاب المصاحب co-metabolism الذي يحدث أثناء استقلاب ركائز أخرى (Singh & Walker, 2006; Bhende *et al.*, 2022). وتُعد هذه المسارات انعكاساً عملياً للآليات العامة التي نوقشت سابقاً في (الفقرة: 5.2.2.2)، حيث تتجلى في تحولات كيميائية محددة تؤدي إلى تكوين مركبات وسيطة ونواتج نهائية (Kosimov *et al.*, 2025).

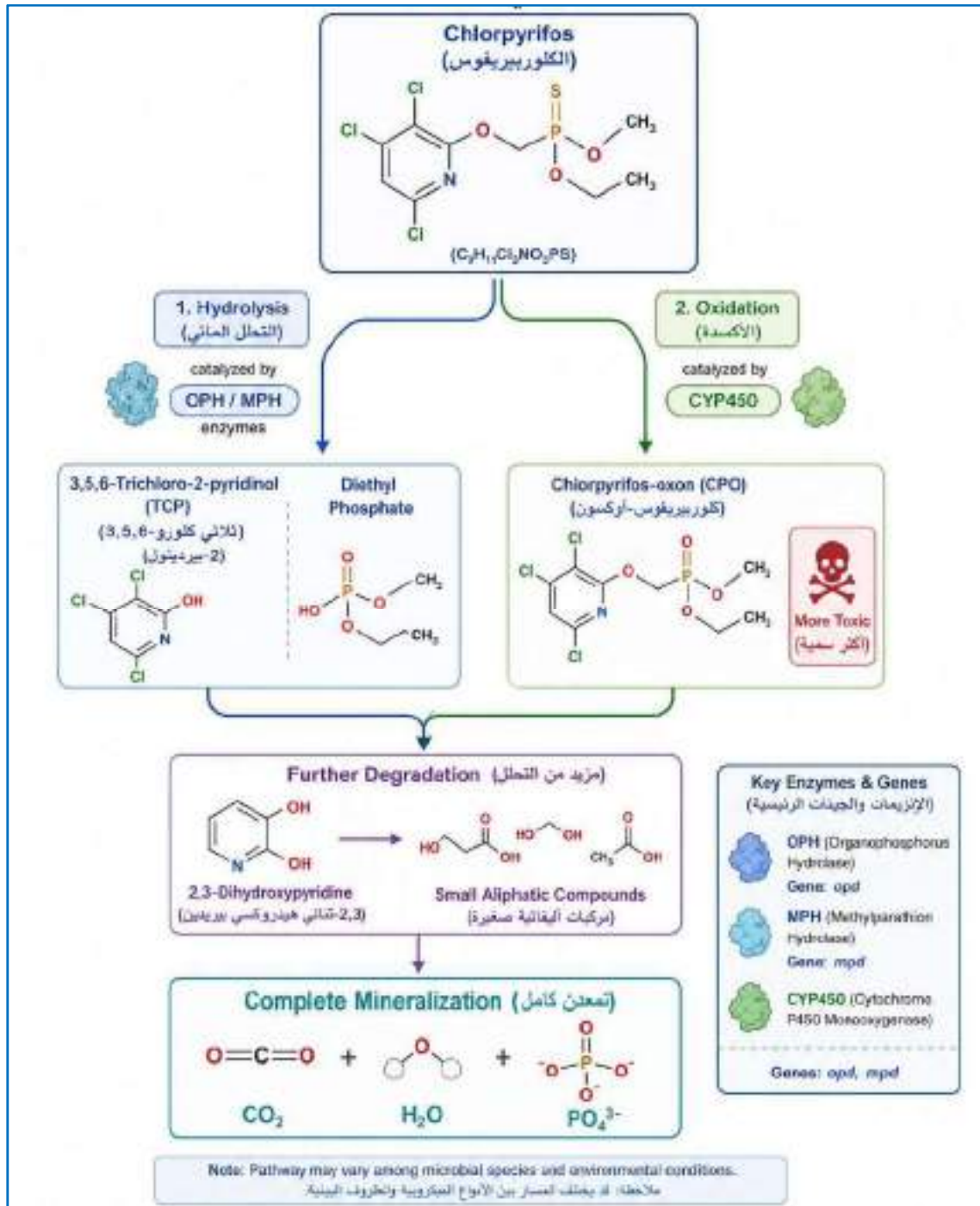
ويوضح الشكل (2-8) المسار الأيضي العام للمبيدات الفوسفورية العضوية، الذي يبدأ بالمركب الأم parent compound ويتفرع عبر ثلاثة مسارات رئيسية: التحلل المائي (الذي يؤدي إلى نواتج أقل سمية)، والأكسدة (التي قد تزيد السمية مؤقتاً عبر تكوين الأوكسونات)، ونزع الألكيل (الذي ينتج أيضاً نواتج أقل سمية)، وتتلاقى هذه المسارات في النهاية نحو التمدن الكامل إلى ثنائي أكسيد الكربون والماء والفوسفات (Bhende *et al.*, 2022; Jaiswal *et al.*, 2024).



الشكل (2-8): المسار الأيضي العام للمبيدات الفوسفورية العضوية

1.7.2.2.2. المسار الأيضي للكلوربيريفوس: Metabolic Pathway of Chlorpyrifos

يتعرض الـ Chlorpyrifos للتحلل في البيئة والكائنات الحية من خلال مسارات أيضية متعددة، أبرزها التحلل المائي Hydrolysis والأكسدة Oxidation، والتي تؤدي في النهاية إلى التمعدين الكامل Complete Mineralization (Ghorab *et al.*, 2026). (الشكل: 2-9)



الشكل (2-9): المسار الأيضي لمبيد الـ Chlorpyrifos

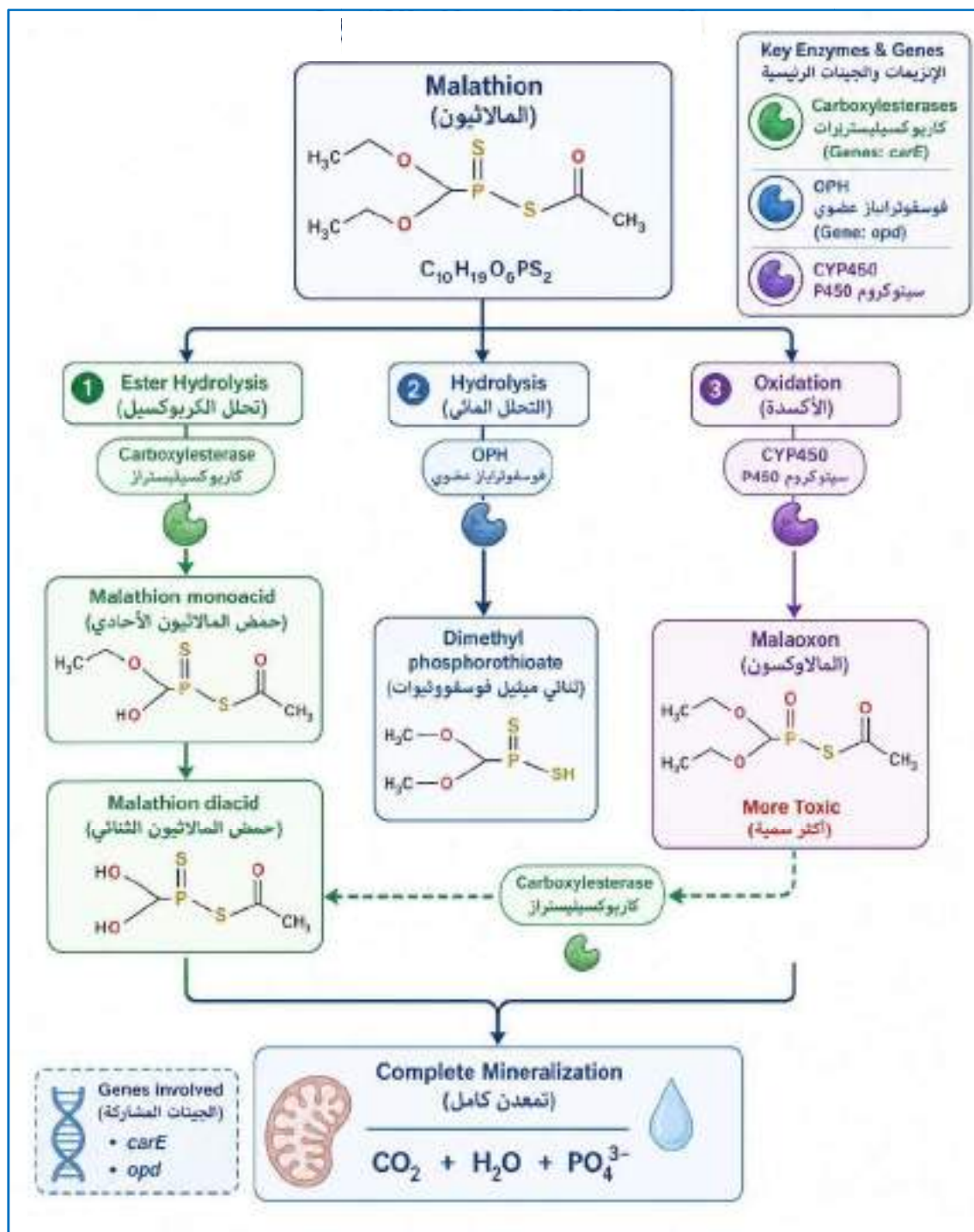
بعد التحلل المائي الخطوة الأولى والأكثر أهمية في المسار الأيضي لـ Chlorpyrifos، حيث يتم كسر الرابطة الإستيرية ester bond بين ذرة الفوسفور وحلقة البيريدين (Huang *et al.*, 2021). ينتج عن هذه العملية مركبين رئيسيين هما: **3,5,6-trichloro-2-pyridinol** (TCP) وهو المستقلب الرئيسي لـ Chlorpyrifos وأحد المركبات ذات الأهمية البيئية والسمية (Farhan *et al.*, 2021; Bhende *et al.*, 2022). يتميز TCP بخصائص مضادة للميكروبات antimicrobial properties وقد يثبط المجتمعات الميكروبية المحلية، مما يقلل من قدرة البيئة على تحلل الـ Chlorpyrifos (Huang *et al.*, 2021). وثنائي إيثيل الفوسفات **Diethyl Phosphate**، وهو مستقلب غير سام نسبياً ويتم تحلله لاحقاً إلى مركبات أبسط (Huang *et al.*, 2021). تُحفز عملية التحلل المائي بواسطة مجموعة من الإنزيمات الهيدرولازية Hydrolases، مثل إنزيمات Organophosphorus Hydrolase (OPH) و Methyl Parathion Hydrolase (MPH) (Jaiswal *et al.*, 2024). تحتوي المواقع النشطة لهذه الإنزيمات على بقايا السيرين (serine residues) التي تبدأ التفاعل التحفيزي عن طريق هجوم نيوكليوفيلي على ذرة الفوسفور في الـ Chlorpyrifos (Huang *et al.*, 2021).

بالإضافة إلى التحلل المائي، يمكن أن يتعرض الـ Chlorpyrifos لعملية الأكسدة، والتي تُحفز بشكل أساسي بواسطة إنزيمات Cytochrome P450 (CYP450) (Kalenik *et al.*, 2026). مما تؤدي إلى تكوين مستقلب أكثر سمية يعرف بالـ Chlorpyrifos-oxon (CPO) وهو المسؤول المباشر عن تثبيط الـ AChE (Farhan *et al.*, 2021; Kalenik *et al.*, 2026).

تخضع المستقلبات الناتجة TCP و CPO لمزيد من التحلل، يتم كسر حلقة البيريدين في TCP لتكوين مركبات أبسط مثل 2,3- dihydroxypyridine ثم إلى مركبات أليفاتية صغيرة، في النهاية، يتم تمعدن هذه المركبات بالكامل Complete Mineralization إلى ثاني أكسيد الكربون CO₂، ماء H₂O و أيونات الفوسفات PO₄³⁻، وهي نواتج غير سامة (Ghorab *et al.*, 2026; Huang *et al.*, 2021).

2.7.2.2.2. المسار الأيضي للمالاثيون: Metabolic Pathway of Malathion

يخضع الـ Malathion للتحلل الميكروبي عبر ثلاث مسارات أيضية: التحلل المائي للكربوكسيل Ester Hydrolysis، التحلل المائي Hydrolysis، والأكسدة (Oxidation)، والتي تؤدي هذه في النهاية إلى تمعدن كامل للمركب (Verma *et al.*, 2021). (الشكل: 2-10)



الشكل (2-10): المسار الأيضي لمبيد الـ Malathion

يعد الـ Ester Hydrolysis المسار الرئيسي لإزالة سمية الـ Malathion في العديد من الكائنات الحية (Pan *et al.*, 2024). تُحفز هذه العملية بواسطة إنزيمات Carboxylesterases, CarE والتي تقوم بكسر الروابط الإستيرية في سلاسل السكسينات الجانبية (Eawag-BBD, 2011; Sharma & Pandit, 2023). ينتج عن هذا التحلل مركبات أقل سمية مثل حمض Malathion Monoacid (MMA) والذي يتكون عند كسر رابطة إستر واحدة، وحمض Malathion Diacid (MDA) الذي يتكون عند كسر كلتا رابطتي الإستر (Verma *et al.*, 2021). وتُعد هذه المستقلبات أقل سمية بكثير من الـ Malathion الأصلي، مما يجعل تحلل الكربوكسيل آلية دفاع مهمة ضد سمية المبيد (Pan *et al.*, 2024).

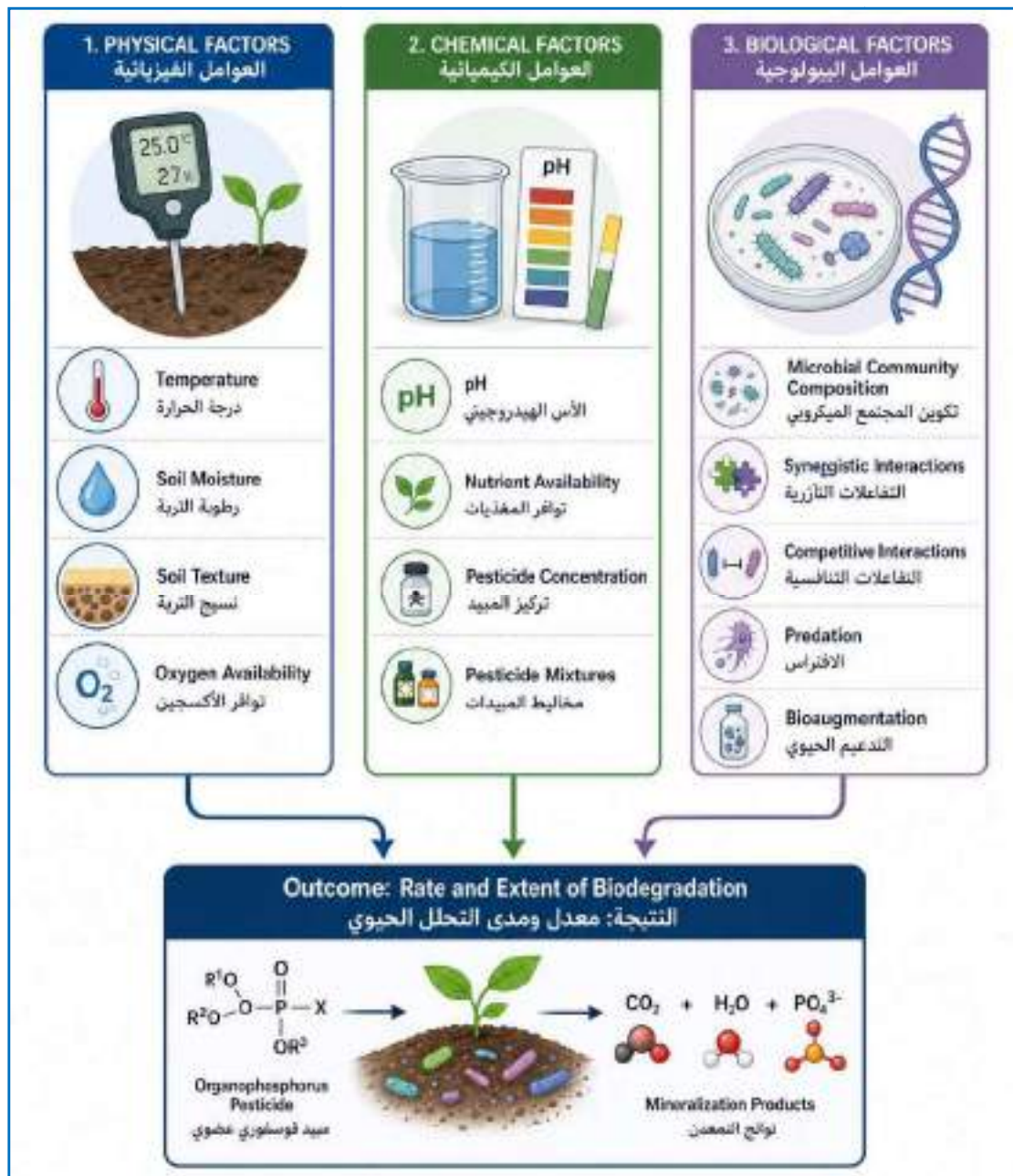
تُعد الأكسدة مساراً أيضاً آخر لـ Malathion، وتُحفز بشكل أساسي بواسطة إنزيمات السيتوكروم CYP450 (Kalenik *et al.*, 2026). في هذه العملية، يتم تحويل مجموعة (P=S) في المالاثيون إلى (P=O)، مما ينتج عنه مستقلب يُعرف باسم Malaoxon (Pan *et al.*, 2024). ويُعد المالاوكسون أكثر سمية بكثير من المالاثيون الأصلي، وهو المستقلب المسؤول بشكل مباشر عن تثبيط إنزيم AChE (Basapuram *et al.*, 2026). لذلك، تُعد الأكسدة مساراً لتنشيط السمية Toxicity Activation (Kalenik *et al.*, 2026).

يمكن أن يتعرض المالاثيون والمالاوكسون أيضاً للتحلل المائي بواسطة إنزيمات OPH التي تقوم بكسر الرابطة بين الفوسفور والكبريت أو الأكسجين، مما يؤدي إلى تكوين مستقلبات مثل Dimethyl Phosphate و Dimethyl Phosphorothioate، وهما نواتج نهائية أقل سمية (Verma *et al.*, 2021; Jaiswal *et al.*, 2024). تساهم هذه العملية في إزالة سمية المركب وتقليل تركيزه في البيئة (Ghorab *et al.*, 2026).

تخضع المستقلبات الناتجة عن المسارات الثلاثة المذكورة أعلاه (MMA, MDA, Malaoxon, Dimethyl Phosphorothioate) لمزيد من التحلل. يتم تكسيرها إلى مركبات أبسط من خلال عمليات أيضية إضافية، وفي النهاية يتم تمعدنها بالكامل Complete Mineralization إلى ثاني أكسيد الكربون CO₂، ماء H₂O أيونات الفوسفات PO₄³⁻ (Kalenik *et al.*, 2026).

3.2. العوامل البيئية المؤثرة على التحلل البيولوجي: Environmental Factors Affecting Biodegradation

تُعد العوامل البيئية من العناصر الحاسمة في تحديد كفاءة وسرعة التحلل الحيوي للمبيدات في البيئات الطبيعية. فهي تتحكم في النشاط الأيضي للبكتيريا المحللة، وتوافر الركائز، واستقرار الإنزيمات، وتفاعلات المجتمعات الميكروبية (Ore *et al.*, 2023; Cycoń, 2026). ويمكن تقسيم هذه العوامل إلى ثلاث فئات رئيسية: فيزيائية، كيميائية وبيولوجية (الشكل: 2-11).



الشكل (2-11): العوامل البيئية المؤثرة على التحلل الحيوي لـ OPs

1.3.2. العوامل الفيزيائية: Physical Factors

1.1.3.2. درجة الحرارة: Temperature

تعد درجة الحرارة من أهم العوامل الفيزيائية المؤثرة في التحلل الحيوي، حيث تتحكم في حركية التفاعلات الأنزيمية ومعدلات النمو البكتيري (Rumi *et al.*, 2024). إذ تؤثر درجة الحرارة على النشاط الأيضي للإنزيمات الميكروبية المسؤولة عن تكسير هذه المبيدات، حيث تزداد معدلات التحلل عادةً مع ارتفاع درجة الحرارة ضمن نطاق معين (Huang *et al.*, 2021). حتى تصل إلى المستوى الأمثل الذي تتراوح فيه معظم البكتيريا المحللة بين 25-37 م° (Rumi *et al.*, 2024). ومع ذلك، فإن درجات الحرارة المرتفعة جداً (أكثر من 40 م°) قد تؤدي إلى مسخ الإنزيمات Enzyme Denaturation وتثبيط نشاط الكائنات الحية الدقيقة، بينما تؤدي درجات الحرارة المنخفضة إلى إبطاء كبير في معدلات التفاعلات الأيضية، مما يقلل من كفاءة التحلل الحيوي (Raj & Kumar, 2022; Sharma & Pandit, 2023). لذلك، فإن الحفاظ على درجة حرارة مثلى أو قريبة منها يعد ضرورياً لتعزيز فعالية عمليات التحلل الحيوي في المواقع الملوثة (Kumar *et al.*, 2022). وتختلف درجات الحرارة المثلى باختلاف السلالات البكتيرية؛ فبعضها يتكيف مع درجات حرارة مرتفعة (محبة للحرارة-thermophilic)، بينما تعمل أنواع أخرى بكفاءة في درجات حرارة معتدلة (متوسطة الحرارة-mesophilic) (Jaiswal *et al.*, 2024).

2.1.3.2. رطوبة التربة: Soil Moisture

تُعد رطوبة التربة عاملاً أساسياً لاستمرار الحياة الميكروبية في التربة، حيث توفر الماء اللازم لجميع العمليات الخلوية، بما في ذلك نقل المغذيات، والتفاعلات الأنزيمية، والتخلص من الفضلات (Ore *et al.*, 2023; Kosimov *et al.*, 2025). وتشير الدراسات إلى أن المستوى الأمثل للرطوبة لمعظم البكتيريا المحللة يتراوح بين 60-80% من السعة الحقلية للتربة Water-Holding Capacity، حيث توفر هذه النسبة غشاءً مائياً مستمراً حول جزيئات التربة، مما يسهل انتشار المبيدات والمغذيات والأوكسجين نحو الخلايا الميكروبية (Bhende *et al.*, 2022; Rumi *et al.*, 2024). وفي ظروف الجفاف، تنخفض الرطوبة إلى مستويات تقيد النشاط الأيضي، وتحد من انتشار الركائز، مما يؤدي إلى إبطاء التحلل الحيوي بشكل كبير (Sharma &

(Pandit, 2023). وعلى النقيض، تؤدي ظروف التشبع بالماء water logging إلى استنزاف الأوكسجين وخلق بيئات لاهوائية Anaerobic Conditions، مما قد يغير مسارات التحلل ويقلل من كفاءتها (Cycoń, 2026; Kosimov et al., 2025). وبالتالي، فإن إدارة رطوبة التربة بشكل فعال أمر بالغ الأهمية لتحسين كفاءة التحلل الحيوي (Farhan et al., 2021).

3.1.3.2. توافر الأوكسجين: Oxygen Availability

يُعد الأوكسجين عاملاً حاسماً في تحديد المسارات الأيضية التي تستخدمها البكتيريا لتحليل الـ OPs. حيث أن معظم المسارات الأيضية التي تكسر هذه المركبات هي عمليات هوائية (Cycoń, 2026). يعمل الأوكسجين كمستقبل نهائي للإلكترونات في سلسلة نقل الإلكترون، مما يوفر الطاقة اللازمة لتخليق الإنزيمات والحفاظ على الوظائف الخلوية (Singh & Walker, 2006; Bhende et al., 2022). كما أن العديد من الإنزيمات المشاركة في التحلل، لاسيما إنزيمات الأكسدة مثل السيتوكروم P450، تعتمد بشكل صارم على الأوكسجين لتأدية وظيفتها (Kosimov et al., 2025). وبالتالي، فإن الظروف الهوائية تعزز عموماً التحلل السريع والكامل للمبيدات، بينما تؤدي الظروف اللاهوائية إلى استخدام مستقبلات إلكترون بديلة (مثل النترات أو الكبريتات)، مما قد يبطئ معدلات التحلل ويؤدي إلى تراكم نواتج وسيطة (Raj & Kumar, 2022; Sharma & Pandit, 2023). ومع ذلك، فقد أظهر قسم من الدراسات قدرة بعض البكتيريا اللاهوائية على تحليل بعض المبيدات الفوسفورية عبر مسارات اختزالية، ولكن بمعدلات أقل كفاءة (Jaiswal et al., 2024). لذلك، فإن التهوية الجيدة للتربة أو توفير الأوكسجين في الأنظمة المائية يعد أمراً أساسياً لتعزيز نشاط الكائنات الحية الدقيقة المحللة وضمان التحلل الكامل للـ OPs (Kumar et al., 2022; Ore et al., 2023).

4.1.3.2. خصائص التربة: Soil Properties

تؤثر خصائص التربة Soil Properties بشكل كبير على مصير الـ OPs ومعدلات تحللها الحيوي (Ore et al., 2023). إذ تلعب عوامل مثل نسيج التربة Soil Texture، ومحتواها من المادة العضوية Organic Matter Content (OMC)، وقدرتها على التبادل

الكاتيوني Cation Exchange Capacity دوراً حاسماً في تحديد مدى امتزاز المبيدات Adsorption وتوافرها الحيوي Bioavailability للكائنات الحية الدقيقة (Huang *et al.*, 2021; Bhende *et al.*, 2022). فالتربة ذات المحتوى العالي من الطين Clay والمادة العضوية تميل إلى امتزاز الـ OPS بقوة، مما يقلل من تركيزها في المحلول الأرضي ويحد من وصولها إلى الكائنات الحية الدقيقة، وبالتالي يبطئ من معدل التحلل الحيوي (Ore *et al.*, 2023; Sharma & Pandit, 2023). على النقيض، التربة الرملية ذات المحتوى المنخفض من المادة العضوية قد تسمح بترشيح Leaching أسرع للمبيدات، ولكنها قد لا توفر بيئة مثالية لنمو المجتمعات الميكروبية المحللة (Farhan *et al.*, 2021). بالإضافة إلى ذلك، تؤثر مسامية التربة Soil Porosity على التهوية وتوافر الأوكسجين، مما ينعكس على نشاط الكائنات الحية الدقيقة (Cycoń, 2026).

2.3.2 العوامل الكيميائية: Chemical Factors

1.2.3.2 الرقم الهيدروجيني: pH

يُعد الرقم الهيدروجيني للتربة من أكثر العوامل الكيميائية تأثيراً في التحلل الحيوي، حيث يؤثر على نشاط الإنزيمات، وذوبانية المبيدات، وتوافرها الحيوي، وتكوين المجتمعات الميكروبية (Bhende *et al.*, 2022). تظهر معظم إنزيمات الهيدرولاز البكتيرية، مثل OPH و MPH، نشاطاً مثالياً في الظروف المتعادلة إلى القلوية قليلاً (pH 7-9)، بينما تنخفض فعاليتها بشكل كبير في الأوساط الحامضية (Kosimov *et al.*, 2025). كما أن الرقم الهيدروجيني يؤثر على تأين جزيئات المبيد، مما يغير من قابليتها للامتزاز على جزيئات التربة وتوافرها للامتصاص الميكروبي (Sharma & Pandit, 2023). الظروف الحمضية (pH > 6) غالباً ما تثبط نشاط هذه الإنزيمات وتقلل من معدل التحلل الحيوي، بينما قد تؤدي الظروف القلوية المرتفعة جداً إلى تحلل كيميائي غير حيوي Abiotic Hydrolysis للمبيدات (Ore *et al.*, 2023). لذلك، فإن التحكم في الرقم الهيدروجيني أو تعديله يمكن أن يكون استراتيجية فعالة لتعزيز التحلل الحيوي (Kumar *et al.*, 2022).

2.2.3.3. توافر المغذيات: Nutrient Availability

تحتاج الكائنات الحية الدقيقة إلى مصادر كربون Carbon Source وطاقة، بالإضافة إلى مغذيات كبرى مثل النيتروجين، الفوسفور، الكبريت ومغذيات صغرى Micronutrients لتركيبة مكوناتها الخلوية وأنزيماتها (Ore et al., 2023; Bhende et al., 2022). ففي البيئات الفقيرة بالمغذيات، ينخفض النشاط الأيضي للبكتيريا، وتقل معدلات تخليق الإنزيمات، مما يحد من كفاءة التحلل الحيوي (Ore et al., 2023; Bhende et al., 2022). وتشير الدراسات إلى أن إضافة مصادر كربونية إضافية (مثل الجلوكوز أو الأسيتات) يمكن أن تحفز النمو البكتيري وتزيد من إنتاج الإنزيمات غير المحددة التي تساهم في الاستقلاب المصاحب (Kosimov et al., 2025; Raj & Kumar, 2022). كما يمكن أن يؤدي تعديل نسبة الكربون إلى النيتروجين إلى تحسين كفاءة التحلل الحيوي بشكل كبير (Kumar et al., 2022). وتُعرف عملية إضافة المغذيات لتعزيز النشاط الميكروبي باسم التحفيز الحيوي Biostimulation، وهي استراتيجية شائعة لزيادة معدلات التحلل الحيوي في المواقع الملوثة (Cycoń, 2026).

ومع ذلك، يجب الحذر من ظاهرة التثبيط بفعل الكاتابوليت catabolite repression، حيث قد تؤدي المصادر الكربونية سهلة الاستخدام إلى تثبيط التعبير عن الجينات المحللة، مما يقلل من كفاءة تحلل المبيدات (Sharma & Pandit, 2023). ويعد توفر الفوسفور عاملاً مهماً بشكل خاص، إذ أن بعض البكتيريا تستخدم الـ OPs كمصدر وحيد للفوسفور، مما يحفز تخليق الإنزيمات المحللة (Jaiswal et al., 2024).

3.2.3.2. تركيز المبيدات ومخاليطها: Pesticide Concentration and Mixtures

يؤثر تركيز المبيدات في التربة على كل من سمية الملوث ونشاط الإنزيمات المحللة. فعند التركيزات المنخفضة إلى المتوسطة، قد تعمل المبيدات كمحفزات inducers للتعبير عن الجينات المحللة، مما يعزز عملية التحلل (Farhan et al., 2021). ولكن عند التركيزات العالية، يمكن

أن تصبح المبيدات سامة للبكتيريا، مما يؤدي إلى تثبيط نشاطها الأيضي أو حتى موتها، وهي ظاهرة تُعرف باسم تثبيط الركيزة Substrate Inhibition (Ore *et al.*, 2023). وفي الأراضي الزراعية، نادراً ما توجد المبيدات بشكل منفرد؛ إذ غالباً ما تستخدم كمخاليط مع مبيدات أخرى. وبوجود هذه المخاليط يمكن أن يؤدي إلى تأثيرات معقدة على التحلل الحيوي (Cycoń, 2026). قد تحدث تأثيرات تآزرية Synergistic Effects حيث يعزز أحد المبيدات تحلل الآخر، أو تأثيرات تضادية Antagonistic Effects حيث يثبط أحد المبيدات تحلل الآخر، مما يؤثر على كفاءة التحلل الحيوي بطرق مختلفة (Sharma & Pandit, 2023; Kumar *et al.*, 2022). فهم هذه التفاعلات أمر بالغ الأهمية عند تقييم استراتيجيات التلوث الحيوي في البيئات الملوثة بمخاليط من المبيدات.

3.3.2. العوامل البيولوجية: Biological Factors

1.3.3.2. تفاعلات المجتمعات الميكروبية: Microbial Community Interactions

نادراً ما تقوم سلالة ميكروبية واحدة بتحليل الـ OPs بشكل كامل في الطبيعة؛ بدلاً من ذلك، غالباً ما تتطلب العملية مجتمعاً ميكروبياً معقداً يعمل بشكل تآزري Synergistically (Pickering *et al.*, 2024). في التجمعات البكتيرية، يمكن أن يحدث تبادل أيضي metabolic cross-feeding، حيث يقوم نوع بتحويل المبيد إلى مستقلب وسيط، ثم يقوم نوع آخر بإكمال عملية التمدن، مما يعزز الكفاءة الكلية للتحلل (Kosimov *et al.*, 2025; Raj & Kumar, 2022). وتُظهر الدراسات أن التجمعات البكتيرية المتعددة الأنواع غالباً ما تحقق معدلات تحلل أعلى من العزلات المفردة، بسبب توزيع المهام الأيضية وتقليل التأثيرات السمية (Sharma & Pandit, 2023). ومع ذلك، يمكن أن تحدث أيضاً تفاعلات تنافسية Competitive Interactions بين الكائنات الحية الدقيقة على الموارد أو المواقع، مما قد يقلل من كفاءة التحلل (Cycoń, 2026). كما يمكن أن يؤثر الافتراس Predation من قبل الـ Protozoa على أعداد الكائنات الحية الدقيقة المحللة، مما يؤثر على معدل التحلل الحيوي

(Pickering *et al.*, 2024). فهم هذه التفاعلات المعقدة ضروري لتحسين استراتيجيات إزالة التلوث الحيوي.

2.3.3.2. التدعيم الحيوي: Bioaugmentation

يُعد التدعيم الحيوي استراتيجية عملية تهدف إلى تحسين كفاءة التحلل الحيوي عن طريق إضافة سلالات بكتيرية مدعمة ذات قدرات تحلل عالية إلى البيئات الملوثة. وقد أظهرت الدراسات أن هذه الاستراتيجية يمكن أن تسرع عملية إزالة المبيدات الفوسفورية العضوية من التربة والمياه الملوثة (Cycoń, 2026; Kiran *et al.*, 2025). ويعتمد نجاح التدعيم الحيوي على عوامل متعددة، منها قدرة السلالات المضافة على المنافسة مع البكتيريا الأصلية، وتكيفها مع الظروف البيئية المحلية، وقدرتها على البقاء والنشاط في البيئة المستهدفة (Kosimov *et al.*, 2025; Raj & Kumar, 2022). وقد أظهرت الأبحاث أن استخدام عزلات بكتيرية محلية معزولة من نفس البيئة الملوثة يعزز فرص نجاح التدعيم الحيوي، لأن هذه البكتيريا تكون قد تكيفت بالفعل مع الظروف البيئية المحلية (Sharma & Pandit, 2023; Jaiswal *et al.*, 2024). وتشير الدراسات الحديثة إلى أن دمج التدعيم الحيوي مع التنشيط الحيوي biostimulation - أي تحسين الظروف البيئية (كإضافة المغذيات أو الأكسجين) - يمكن أن يحقق أعلى معدلات تحلل، من خلال توفير الظروف المثلى لنمو البكتيريا المدعمة والأصلية معاً (Bhende *et al.*, 2022; Kiran *et al.*, 2025). على الرغم من الإمكانيات الواعدة للتدعيم الحيوي إلا أنه يواجه تحديات تتعلق بضمان استمرارية الكائنات الحية الدقيقة المدخلة وفعاليتها تحت الظروف البيئية المتغيرة (Farhan *et al.*, 2021). ومع ذلك، فإنه يظل أداة قوية في ترسانة استراتيجيات إزالة التلوث الحيوي لا OPs (Kumar *et al.*, 2022).

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

***MATERIALS AND
METHODS***

Materials and Methods

3. المواد وطرائق العمل:

1.3. الأجهزة والمواد:

1.1.3. الأجهزة والمعدات: Instruments and Equipment

استعمل عدد من الأجهزة والمعدات في الدراسة الحالية وكما موضح في الجدول (3-1):

جدول (3-1): الأجهزة والمعدات المستخدمة في الدراسة الحالية.

ت	اسم الجهاز	الشركة المصنعة والمنشأ
1	أطباق بتري	Petri dish
2	أطراف ماصة بأحجام مختلفة	Pipette tips
3	أعواد خشبية معقمة	Wooden sticks
4	أنابيب إندروف بأحجام مختلفة	Eppendorf tubes
5	ثلاجة	Refrigerator
6	جهاز الترحيل الكهربائي	Gel electrophoresis
7	جهاز التقطير	Distillator
8	جهاز الدورات الحرارية	Thermal cycler
9	جهاز المطياف النانوي	Nano Spectrophotometer
10	جهاز طرد مركزي	Centrifuge
11	جهاز طرد مركزي صغير	Minicentrifuge
12	جهاز طرد مركزي عالي السرعة	High speed centrifuge
13	حاضنة	Incubator
14	حاضنة هزاز	Shaking incubator
15	حمام مائي	Water bath
16	دوارق بأحجام مختلفة	Flasks
17	شرائح زجاجية	Slides
18	صفحة ساخنة	Hot Plate
19	غرفة ابخرة	Hood
20	فرن كهربائي	Electric Oven
21	كاميرا رقمية	Camera Digital

المواد و طرائق العمل الفصل الثالث

ت	اسم الجهاز	الشركة المصنعة والمنشأ
22	كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء	Shimadzu (Japan)
23	مازج دوار	Goanlab (China)
24	ماصات دقيقة	Goanlab (China)
25	مجهر ضوئي	Boeco (Germany)
26	مجهر القدرة الكهربائية	Buchler (USA)
27	مرشحات غشائية دقيقة	Sartorius (Germany)
28	مصدر الأشعة فوق البنفسجية	UVP (USA)
29	مقياس الأس الهيدروجيني	Martini (USA)
30	موصدة	LabTech (Korea)
31	ميزان كهربائي حساس	Goanlab (China)
32	ميكروويف	Gosonic (China)
33	ناقل زرعي	Himedia (India)

2.1.3. المواد الكيميائية: Chemical Substances

استخدمت مجموعة من المواد الكيميائية في الدراسة الحالية، الجدول (2-3):

جدول (2-3): المواد الكيميائية المستخدمة في الدراسة الحالية.

ت	اسم المادة	الشركة المصنعة
1	أكار - أكار	Biosharp (China)
2	أكاروز	Biosharp (China)
3	أسيئات الإيثيل	BDH (England)
4	اسيتونيتريل	BDH (England)
5	ألفا - نفثول	Ajax (Australia)
6	بيروكسيد الهيدروجين	Ajax (Australia)
7	تريبتون	BDH (England)
8	ترس حامضي	Promega (USA)
9	ترس قاعدي	Promega (USA)
10	جيلاتين	BDH (England)
11	حامض البورك	Promega (USA)
12	حامض الخليك الثلجي	BDH (England)

المواد و طرائق العمل الفصل الثالث

ت	اسم المادة	الشركة المصنعة
13	حامض الكبريتيك	Sulfuric acid (H ₂ SO ₄) BDH (England)
14	حامض الهيدروكلوريك	Hydrochloric acid (HCl) BDH (England)
15	ثنائي مثيل امينوبنزالدهايد	Para-dimethyl amino benzaldehyde SRL (India)
16	زايلين سيانول	Xylene cyanol BDH (England)
17	صبغة أحمر المثل	Methyl red (C ₁₅ H ₁₅ N ₃ NaO ₂) BDH (England)
18	صبغة بروموفينول الزرقاء	Bromophenol blue (C ₁₉ H ₁₀ Br ₄ O ₅ S) BDH (England)
19	صبغة بروميد الأثيديوم	Ethidium bromide (C ₂₁ H ₂₀ BrN ₃) BDH (England)
20	فوسفات البوتاسيوم أحادية الهيدروجين	Dipotassium phosphate (K ₂ HPO ₄) BDH (England)
21	فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين	Monopotassium phosphate (KH ₂ PO ₄) BDH (England)
22	فوسفات الصوديوم أحادية الهيدروجين	Disodium phosphate (Na ₂ HPO ₄) BDH (England)
23	فوسفات الصوديوم ثنائية الهيدروجين	Monosodium phosphate (NaH ₂ PO ₄) BDH (England)
24	كبريتات الحديد	Ferrous sulfate (FeSO ₄) BDH (England)
25	كبريتات المغنيسيوم	magnesium sulfate (MgSO ₄ ·7H ₂ O) BDH (England)
26	كحول أثيلي	Ethyl alcohol (C ₂ H ₆ O) BDH (England)
27	كحول أيزوبروبيلي	Isopropyl alcohol (C ₃ H ₈ O) BDH (England)
28	كلوريد الباريوم	Barium chloride (BaCl ₂) BDH (England)
29	كلوريد البوتاسيوم	Potassium chloride (KCl) BDH (England)
30	كلوريد الزئبق	Mercuric Chloride (HgCl ₂) BDH (England)
31	كلوريد الصوديوم	Sodium chloride (NaCl) BDH (England)
32	كلوريد الكالسيوم	Calcium Chloride (CaCl ₂) BDH (England)
33	كلوكوز	Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆) BDH (England)
34	كليسول	Glycerol (C ₃ H ₈ O ₃) BDH (England)
35	ماء مقطر منزوع الايونات	ddH ₂ O – Nuclease free water Geneaid (Taiwan)
36	مستخلص الخميرة	Yeast extract BDH (England)
37	نترات الامونيوم	Ammonium nitrate (NH ₄ NO ₃) BDH (England)
36	هيدروكسيد البوتاسيوم	Potassium hydroxide (KOH) BDH (England)
37	هيدروكسيد الصوديوم	Sodium hydroxide (NaOH) BDH (England)
38	يوريا	Urea (CH ₄ N ₂ O) BDH (England)
39	Ethylenediaminetetraacetic acid disodium (EDTA-Na ₂)	BDH (England)
40	dimethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (DMPD)	BDH (England)

3.1.3. الأوساط الزرعية: Culture Media

تم استعمال الأوساط الزرعية الموضحة في الجدول (3-3):

جدول (3-3): الأوساط الزرعية الجاهزة المستخدمة في الدراسة الحالية.

ت	اسم الوسط	الشركة المصنعة	الغرض من الاستخدام
1	وسط أكار الماكونكي MaConky agar medium	Himedia (India)	تتمية البكتريا المخمرة لسكر اللاكتوز
2	وسط ماء الببتون Peptone water broth	Himedia (India)	فحص الاندول
3	قاعدة اكار الدم Blood agar base medium	Himedia (India)	تتمية البكتريا لغرض التشخيص
4	وسط المرق المغذي Nutrient broth medium	Himedia (India)	حفظ العزلات وإدامتها
5	وسط الأكار المغذي Nutrient agar medium	Himedia (India)	تتمية البكتريا لغرض التشخيص
6	وسط سترات سايمون Simmon citrate medium	Oxoid (England)	فحص استهلاك السترات
7	وسط اكار اليوريا Urea agar base medium	Oxoid (England)	للتحري عن إنتاج أنزيم اليوريز
8	وسط أكار نقيع القلب والدماغ Brain heart infusion agar	Oxoid (England)	تتمية البكتريا لغرض دراسة بعض خواصها
9	مرق نقيع القلب والدماغ Brain Heart infusion broth	Oxoid (England)	تتمية البكتريا لغرض دراسة بعض خواصها

4.1.3. المبيدات المستخدمة: Pesticides

استخدم مبيدي الـ Chlorpyrifos و الـ Malathion من الدرجة المعيارية والتجارية وكما موضح درجة نقاوتها بالجدول (3-4):

جدول (3-4): المبيدات المستخدمة في الدراسة الحالية.

ت	اسم المبيد	الصيغة الكيميائية	التركيز	الشركة المجهزة
1	مالاثيون Malathion	$C_{10}H_{19}O_6PS_2$	%57	Industrial Estate (india)
2	الكوربيريفوس Chlorpyrifos	$C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$	%58	Rinchen Industrial(china)
3	Malathion	analytical standard	98.2%	Sigma-Aldrich (USA)
4	Chlorpyrifos	analytical standard	98.5%	Sigma-Aldrich (USA)

5.1.3. العدد المستخدمة: Kits

استخدمت في الدراسة الحالية العدد الجاهزة المبينة في الجدول (3-5):

جدول (3-5): العدد المستخدمة في الدراسة الحالية.

ت	اسم العدة	الشركة المجهزة
1	صبغة كرام Gram stain kit	Syrbio (France)
2	Vitek 2 GN Test Kit Reagent Card 21341	Biomerieux (USA)
3	Vitek 2 GP Test Kit Reagent Card 21342	Biomerieux (USA)
4	عدة استخلاص الحمض النووي من البكتيريا Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit	Geneaid (Taiwan)
5	عدة فحص PCR 2.5x Reaction Mix	Syntol (Russia)

6.1.3. البادئات: Primers

استخدمت البادئات المجهزة من شركة Microgen الكورية والمبينة بالجدول (3-6):

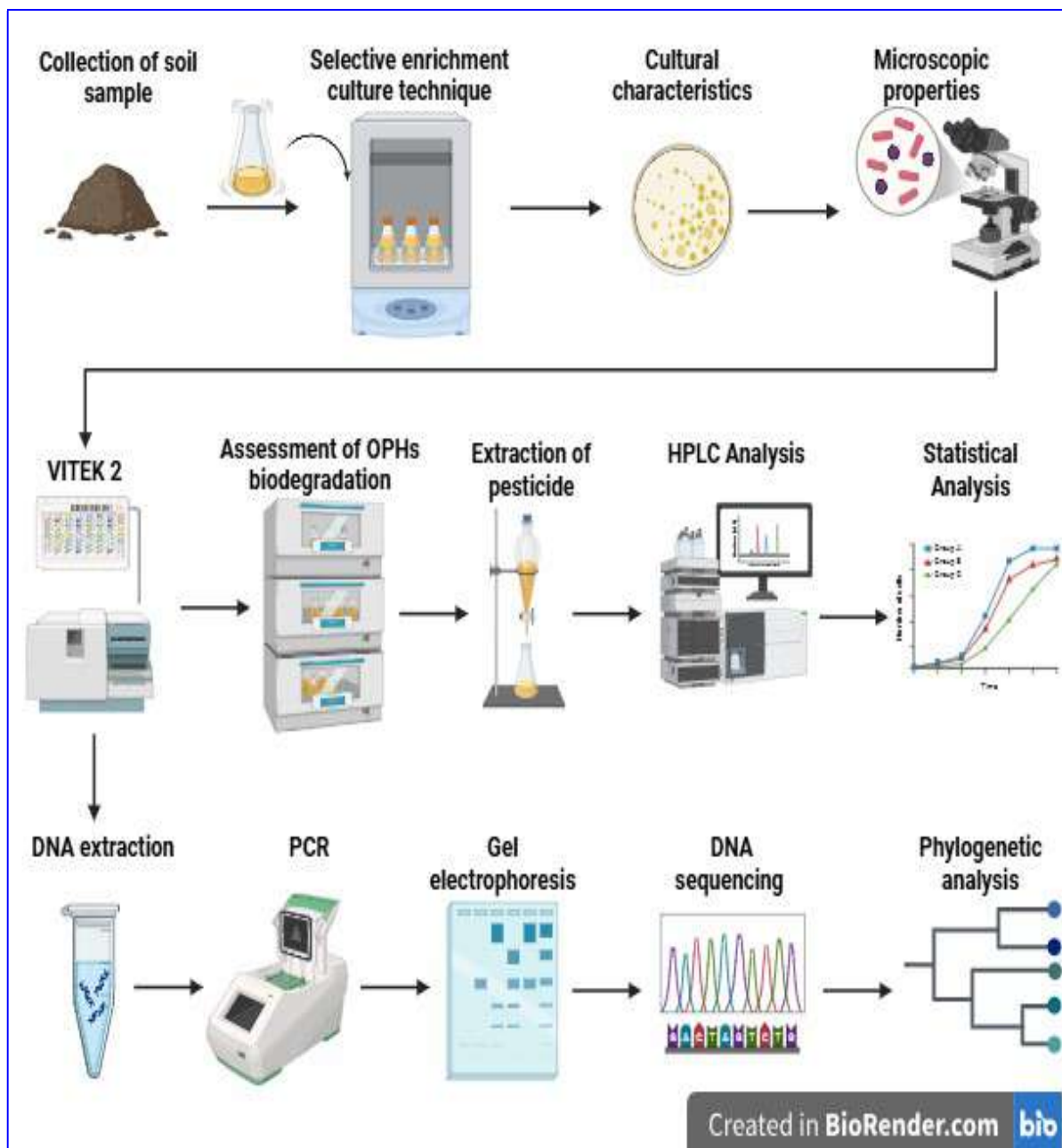
جدول (3-6): البادئات المستخدمة في الدراسة الحالية.

ت	الجين المستهدف	القواعد النتروجينية (5' → 3')	حجم الناتج المتوقع	المصدر
1	16S rRNA	357F: 5'-CTACGGGGGGCAGCAG-3'	441	Mori et al. 2014
		806R: 5' GGACTACCGGGGTATCT-3'		
2	opd	F: 5'-CGCGTCCTATCACAATCTC-3'	580	Sprenger et al. 2003
		R: 5'-TCAGTATCATCGCTGTGACC-3'		
3	mpd	F: 5'-AGCAGGTCGACGAGATCTAC-3'	574	Ali et al. 2012
		R: 5'-TTGACGACCGAGTAGTTCAC-3'		

خطة الدراسة: Study plan

أجريت التجارب جميعها في مختبرات قسم البيئة/ كلية العلوم/ جامعة القاسية وفق المخطط

العام لمسار العمل المختبري الموضح في الشكل (1-3).



الشكل (1-3): المخطط العام لمسار العمل المختبري المتبع في الدراسة الحالية

2.3. طرائق العمل : Work methods

1.2.3. طرائق التعقيم : Sterilization methods

1.1.2.3. التعقيم بالحرارة الجافة:

عقمت جميع الزجاجيات والأدوات التي تحتاج إلى التعقيم الجاف بالفرن الكهربائي Oven في درجة حرارة 180م لمدة ساعتين.

2.1.2.3. التعقيم بالحرارة الرطبة:

عقمت الأوساط الزرعية المستخدمة في هذه الدراسة بجهاز الموصدة Autoclave في درجة حرارة 121م وتحت ضغط 1 جو ولمدة 15 دقيقة.

3.1.2.3. التعقيم بالترشيح:

تم تعقيم المواد والمحاليل التي تتأثر بالحرارة باستعمال مرشحات دقيقة Millipore Filters بقطر 0.22 مايكرومتر (Benson, 2002).

2.2.3. تحضير المحاليل والكواشف : Preparation of solutions and reagents

حضرت مجموعة من المحاليل والكواشف المختلفة في هذه الدراسة اعتماداً على ما جاء في Benson (2002) و Alexander وجماعته (2004) وعلى النحو التالي:

1.2.2.3. المحاليل واللدوازيء: Solutions and Buffers

1.1.2.2.3. المحلول الملحي الفسلجي: Normal Saline

حضر بإذابة 0.85 غم من كلوريد الصوديوم في 90 مليلتر ماء مقطر ثم أكمل الحجم إلى 100 مليلتر. ثم عقم بالموصدة، وحفظ بدرجة حرارة 4م لحين الاستعمال.

2.1.2.2.3. Macfarland Standard: محلول ثابت العكرة القياسي:

حضر هذا المحلول بمزج محلولين وكما يلي:

* **محلول A:** حضر بإذابة 1.175 غم من كلوريد الباريوم في 90 مليلتر من الماء المقطر المعقم ثم أكمل الحجم إلى 100 مليلتر.

* **محلول B:** أضيف 1 مليلتر من حامض الكبريتيك المركز إلى 90 مليلتر من الماء المقطر المعقم وأكمل الحجم إلى 100 مليلتر.

أضيف 0.5 مليلتر من محلول (A) إلى 99.5 مليلتر من محلول (B) ، للحصول على عدد تقريبي من الخلايا البكتيرية بمقدار $10^8 \times 1.5$ خلية/ مليلتر، وحفظ المحلول في قنينة زجاجية معقمة ذات غطاء محكم لمنع التبخر في درجة حرارة الغرفة وفي الظلام.

3.1.2.2.3. Phosphate Buffer Saline (PBS): داريء الفوسفات الملحي:

حُضر هذا الداريء بإذابة 0.144 غم من فوسفات البوتاسيوم ثنائي الهيدروجين KH_2PO_4 و 0.79 غم من فوسفات الصوديوم أحادي الهيدروجين Na_2HPO_4 و 9 غم من كلوريد الصوديوم NaCl في 800 مليلتر من الماء المقطر وعدل الأس الهيدروجيني إلى 7.4 وأكمل الحجم إلى اللتر وعقم بالموصدة.

4.1.2.2.3. Stock solution of Chlorpyrifos : المحلول الخزين لمبيد الكلوربيريفوس:

حُضر هذا المحلول بإضافة (1.72) مليلتر من مبيد الكلوربيريفوس الأصلي (58%) وأضيف إليه 900 مليلتر ماء مقطر معقم وأكمل الحجم إلى 1000 مليلتر للحصول على محلول خزين بتركيز (1000 ملغم/ لتر)، عُم بالترشيح باستخدام مرشحات غشائية Millipore filter بقطر 0.22 مايكرومتر، ووضع في زجاجة معتمة ومعقمة ومحكمة الغلق وحفظ عند درجة حرارة 4 م°، لحين الاستعمال.

5.1.2.2.3. **المحلول الخزين لمبيد المالاتيون**: Stock solution of Malathion

حُضر المحلول باضافة (1.754) مليلتر من مبيد المالاتيون الأصلي (57%) وأضيف إليه 900 مل ماء مقطر معقم وأكمل الحجم إلى 1000 مليلتر للحصول على محلول خزين بتركيز (1000 ملغم/ لتر)، عُم بالترشيح باستخدام مرشحات غشائية Millipore filter بقطر 0.22 مايكرومتر، ووضع في زجاجة معتمة ومعقمة ومحكمة الغلق وحفظ عند درجة حرارة 4 م، لحين الاستعمال.

6.1.2.2.3. **محلول حامض الهيدروكلوريك**: Hydrochloric acid (0.1 M)

تم تحضيره بإضافة 1 مليلتر من حامض الهيدروكلوريك HCl (10 M) إلى 80 مل من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى 100 مليلتر ماء مقطر. استخدم المحلول في ضبط الأس الهيدروجيني للأوساط الزرعية والدوائى المحضرة.

7.1.2.2.3. **محلول هيدروكسيد الصوديوم**: Sodium hydroxide (0.1 M)

تم تحضيره بإذابة 0.4 غم من هيدروكسيد الصوديوم NaOH في 90 مليلتر من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى 100 مليلتر ماء مقطر. استخدم المحلول في ضبط الأس الهيدروجيني للأوساط الزرعية والدوائى المحضرة.

8.1.2.2.3. **محاليل استخلاص الـ DNA**

حُضرت المحاليل التالية حسب تعليمات الشركة المصنعة المرفقة مع العدة Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit وكما يلي:

A. محلول انزيم بروتينيز K: Proteinase K

حُضر بإذابة 10 ملغم من الإنزيم في 1 مليلتر من الماء المقطر منزوع الايونات deionized distilled water ddH₂O للحصول على تركيز نهائي 10 ملغم/ مليلتر، ثم مُزج

المواد و طرائق العمل الفصل الثالث

المحلول بالمزج الدوار Vortex لإذابة الانزيم تماما. بعدها نُبذ بجهاز الطرد المركزي لبضع ثوانٍ لتجميع الخليط، وحفظ بدرجة حرارة 4° م لحين الاستعمال.

B. محلول Gram⁺ Buffer + Lysozyme

حُضر أنياً عند الاستعمال بتركيز نهائي 4 ملغم/ مليلتر بإذابة 4 ملغم من الإنزيم في 1 مليلتر من داريء Gram⁺ Buffer المجهز من الشركة .

C. داريء الغسل: Wash Buffer

حُضر بإضافة 100 مل من الايثانول المطلق Ebsolute ethanol إلى محلول الغسيل المجهز من الشركة ورج المحلول لبضع ثوانٍ لغرض التجانس، ثم أغلقت القنينة بإحكام لتجنب تبخر الايثانول.

9.1.2.2.3 محاليل الترحيل الكهربائي: Electrophoresis solutions

حُضرت المحاليل التالية على وفق ما جاء به Green و Sambrook (2012) وكما يلي:

A. داريء TBE (Tris base-Boric acid-EDTA)

حُضر محلول خزين 10X بإذابة 108 غم من Tris-base و 55 غم من حامض البوريك و 7.5 غم من Na₂.EDTA في 1 لتر ماء مقطر وضُبط الأس الهيدروجيني إلى 8، بعد ذلك عُقم بالموصدة وحفظ في درجة حرارة 4° م لحين الاستعمال.

B. داريء التحميل: Loading buffer

حُضر بإذابة 0.25 غم Bromophenol blue ، و 0.25 غم Xylene cyanol و 15 مل Glycerol في 100 مل ماء مقطر، وحُفظ في درجة حرارة 4° م لحين الاستعمال.

C. صبغة بروميد الأثيديوم: Ethidium bromide dye

حُضر محلول خزين بتركيز 10 ملغم/ مليلتر، بإذابة 1 غم من الصبغة في 100 مل الماء المقطر المعقم. وحُفظ محلول الصبغة في الظلام بدرجة حرارة 4° م.

2.2.2.3. الكواشف: Reagents

حُضرت الكواشف التالية على وفق ما جاء به Benson (2002) واستخدمت لغرض تشخيص البكتريا وكما يلي:

1.2.2.2.3. كاشف الأوكسيداز: Oxidase Reagent

حُضر بإذابة 1 غم من مادة dimethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride في 90 مليلتر من الماء المقطر المعقم ثم أُكمل الحجم إلى 100 مليلتر. يُحضر أنياً عند الاستعمال.

2.2.2.2.3. كاشف إنزيم الكاتليز: Catalase Reagent

حُضر بتركيز 3% من بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 واستعمل في الكشف عن قدرة العزلات البكتيرية على إنتاج إنزيم الكاتليز.

3.2.2.2.3. كاشف كوفاكس: Kovac's Reagent

حُضر بإذابة 5 غم من Para-dimethylamine-benzaldehyde في 75 مليلتر من الكحول الإيزوبروبيلي باستخدام حمام مائي ثم أُكمل الحجم إلى 100 مليلتر بحامض HCl المركز ببطيء ليصبح لون الكاشف أصفر باهت. ثم حُفظ في قنينة معتمدة في الثلاجة ، واستخدم في اختبار الأندول.

4.2.2.2.3. **كاشف فوكس بروسكاور: Voges-Proskauer reagent**

حُضر على وفق ما أورده Collee وجماعته (1996)، وتضمن تحضير محولين هما:

* **محلول A** : أُذيب 5 غم من مادة ألفا- نفثول في 90 مليلتر من الكحول الأيثلي 99% ثم أُكمل الحجم بالكحول إلى 100 مليلتر.

* **محلول B** : أُذيب 40 غم من هيدروكسيد البوتاسيوم في 90 مليلتر من الماء المقطر ثم أُكمل الحجم إلى 100 مليلتر بإضافة الماء المقطر.

5.2.2.2.3. **كاشف أحمر المثيل: Methyl Red Reagent**

حُضر بإذابة 0.1 غم من المثيل الأحمر في 250 مليلتر من الكحول الأيثلي بتركيز 95% ثم أُكمل الحجم إلى 500 مليلتر بإضافة الماء المقطر.

6.2.2.2.3. **كاشف تميم الجيلاتين: Gelatin liquefaction reagent**

حُضر بالاعتماد على ما جاء به Collee وجماعته (1996) ، وذلك بإذابة 15 غم من مادة كلوريد الزئبق $HgCl_2$ في 20 مليلتر من حامض الهيدروكلوريك المركز HCl ، ثم أُضيف إلى المحلول 100 مليلتر من الماء المقطر.

3.2.3. **تحضير الأوساط الزرعية: Preparation of Culture Media**

1.3.2.3. **الأوساط الزرعية الجاهزة:**

حضرت الأوساط الزرعية المستخدمة في هذه الدراسة (فقرة: 3.1.3) حسب تعليمات الشركة المصنعة والمثبتة على العبوة وبعد أن ضبط الأس الهيدروجيني عقلت بجهاز الموصدة Autoclave عند درجة حرارة 121 م° وتحت ضغط 1 جو ولمدة 15 دقيقة، حُضنت الأوساط الزرعية بعد صبها في الأطباق أو الأنابيب حسب متطلبات التجربة في درجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة للتأكد من عدم تلوثها.

2.3.2.3. الأوساط الزرعية التركيبية:

تم تحضير الأوساط التالية بالاعتماد على ما أورده Atlas (2004) وكما يأتي:

1.2.3.2.3. وسط أكار الدم: Blood Agar Medium

حُضر أكار الدم الأساس حسب تعليمات الشركة المصنعة، حيث عُقم بالموصدة بعدها تُترك ليبرد إلى درجة حرارة 45-50 م°، ثم أُضيف إليه الدم بنسبة (5%) ، ومُزج جيداً وتركت الاطباق بعد تصلبها في الحاضنة إلى اليوم التالي للتأكد من خلوها من التلوث. استخدم الوسط لتنمية وعزل البكتريا وكذلك للكشف عن قدرة العزلات على إنتاج الإنزيم الحال للدم Haemolysin .

2.2.3.2.3. وسط لوريا السائل: Luria-Bertani Medium

حُضر بإذابة 15 غم من التربتون، و 5 غم من مستخلص الخميرة و 10 غم من كلوريد الصوديوم في 950 مليلتر من الماء المقطر. غُذّل الأس الهيدروجيني إلى 7 بإضافة قطرات من HCl أو إضافة قطرات من هيدروكسيد الصوديوم NaOH . أكمل الحجم إلى واحد لتر ثم عُقم بالموصدة. استخدم هذا الوسط لتنمية البكتريا المراد استخلاص الـ DNA منها.

3.2.3.2.3. وسط الميثيل الأحمر – فوكس بروسكاور السائل: MR-VP broth medium

حُضر الوسط بإذابة 5 غم بيتون ، و 5 غم فوسفات البوتاسيوم أحادي الهيدروجين K_2HPO_4 في الماء المقطر. غُذّل الأس الهيدروجيني إلى 7.6 ثم أكمل الحجم إلى 950 مليلتر ثم عُقم بالموصدة . وبعد تبريده أُضيف إليه 50 مليلتر من محلول 10% كلوكوز معقم بالترشيح. ثم صُبَّ في أنابيب معقمة بواقع 5 مليلتر لكل أنبوب. واستخدم الوسط لغرض اختبار قابلية البكتريا على تخمير سكر الكلوكوز و تكوين الأسيتون.

4.2.3.2.3. وسط اليوريا: Urea agar medium

حُضر الوسط بإذابة 2.5 غم من أكار اليوريا الأساس في 95 مليلتر من الماء المقطر، عقم الخليط بالموصدة بعدها ترك ليبرد إلى درجة حرارة 45-50 م ثم أُضيف إليه 5 مليلتر من محلول اليوريا 40%، مُزج جيداً ووزع في أنابيب بمقدار 5 مليلتر، وبشكل مائل. استخدم الوسط للتحري عن إنتاج إنزيم اليوريز.

5.2.3.2.3. وسط تمييع الجيلاتين: Gelatin liquefaction medium

حُضر بأذابة 1.5 غم من K_2HPO_4 ، و 0.5 غم من KH_2PO_4 ، و 4 غم من الجيلاتين، و 0.05 غم من سكر الكلوكوز و 28 غم من وسط الأكار المغذي في واحد لتر من الماء المقطر، ضبط الأس الهيدروجيني إلى 7، عقم الخليط بالموصدة لمدة 15 دقيقة ثم صُب في أطباق معقمة، استعمل هذا الوسط في الكشف عن قابلية البكتريا على إنتاج إنزيم Gelatinase .

6.2.3.2.3. وسط اختبار الحركة: Motility test medium

استخدم لهذا الغرض وسط Nutrient broth ذو القوام نصف الصلب Semisolid، إذ حُضر بإضافة مادة الأكار، وبنسبة 0.3-0.5% إلى وسط المرق المغذي Nutrient broth قبل التعقيم.

7.2.3.2.3. وسط الأملاح المعدنية السائل: Mineral salts medium (MSM)

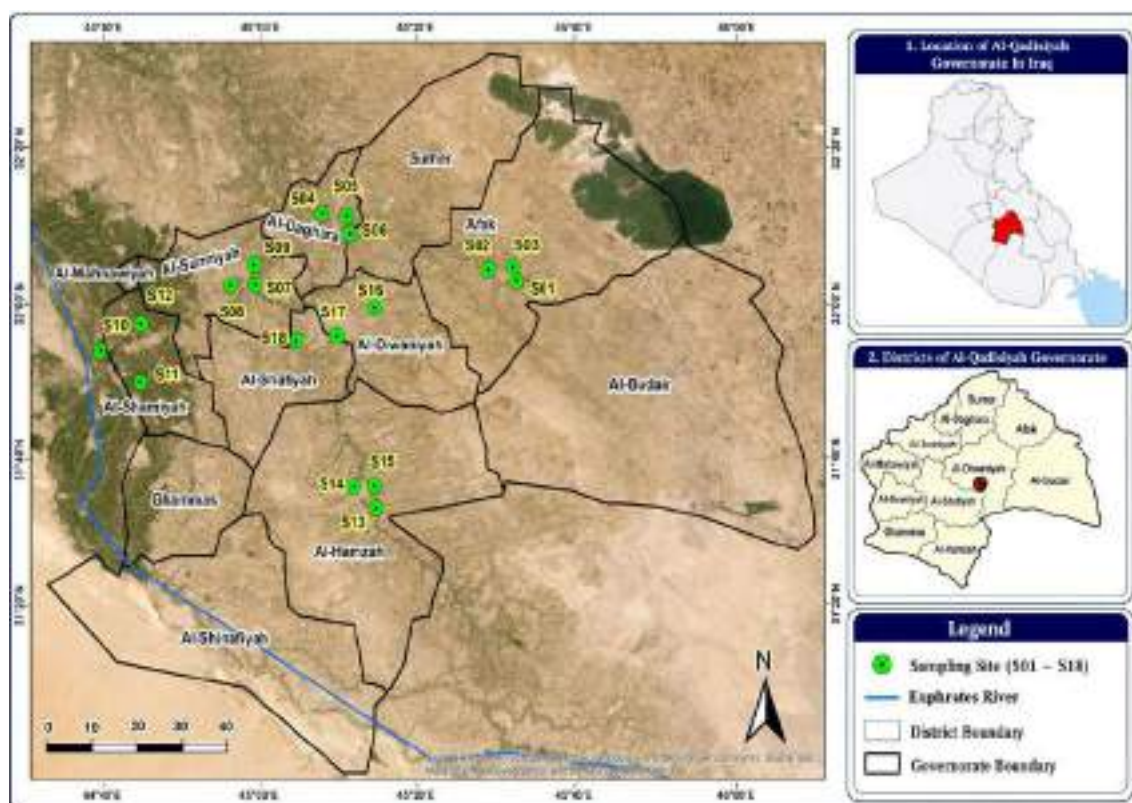
حُضر هذا الوسط بالاعتماد على ما جاء في دراسة Adams وجماعته (2024)، بإذابة 1.5 غم من K_2HPO_4 ، و 0.5 غم من KH_2PO_4 ، و 0.5 غم من $(NH_4)_2SO_4$ ، و 0.5 غم من NaCl، و 0.2 غم من $MgSO_4$ ، و 0.05 من $CaCl_2$ ، في 900 مليلتر من الماء المقطر، ثم عدل الأس الهيدروجيني إلى 7 وأكمل الحجم إلى 1000 مليلتر وعقم بالموصدة عند درجة حرارة 121م وتحت ضغط 1 جو ولمدة 15 دقيقة، وفي حالة استخدام الوسط بالحالة الصلبة

المواد و طرائق العمل الفصل الثالث

أضيف إليه الأكار بنسبة 3%. استخدم هذا الوسط في تجارب التحلل الحيوي للمبيدات قيد الدراسة.

4.2.3. منطقة الدراسة وجمع العينات: Study area and Collection of samples

أُجريت الدراسة في محافظة الديوانية، الواقعة في وسط جنوب العراق بين خطي عرض $31^{\circ}20'00''$ شمالاً و $32^{\circ}20'00''$ شمالاً، وخطي طول $44^{\circ}40'00''$ شرقاً و $45^{\circ}40'00''$ شرقاً (الشكل 2-3). تتميز المنطقة بمناخ صحراوي جاف وحار، بمتوسط درجة حرارة سنوية 25 درجة مئوية، ومتوسط هطول أمطار سنوي يبلغ حوالي 47.7 ملم (انظر مركز الأرصاد الجوية الزراعية العراقية (<https://agromet.gov.iq>)).



الشكل (2-3): منطقة الدراسة ومواقع اخذ عينات التربة من الأراضي الزراعية في محافظة الديوانية.

جمعت العينات للمدة من 1/ 4 / 2025 لغاية 1/ 8 / 2025، اشتملت الدراسة على 18 عينة تربة من مناطق زراعية لستة أقضية في محافظة الديوانية هي: (مركز المدينة، والسنية، والشامية، والحمزة الشرقي، وعفك والدغارة) (الشكل 2-3)، التي تعرضت للمبيدات لأكثر من 5

المواد و طرائق العمل الفصل الثالث

سنوات (استند تاريخ استخدام المبيدات إلى المعلومات التي قدمها المزارعون خلال الزيارات الميدانية)، وبواقع 3 عينات من ثلاث مناطق زراعية مختلفة من كل قضاء. أُخذت عينات التربة باستخدام مثقاب معقم auger من الطبقة السطحية (عمق 0-15 سم) بعد إزالة الطبقة العلوية بعمق 3 سم، جُمعت كل عينة بأخذ 10-15 عينة فرعية عشوائية من الحقل وخلطها للحصول على عينة مركبة وزنها 1 كغم. وُضعت عينات التربة في أكياس بولي إيثيلين polyethylene معقمة، وعُلمت بتاريخ وموقع العينة، ثم نُقلت إلى المختبر وحُفظت في درجة حرارة 4 م° لإجراء الاختبارات اللاحقة عليها.

5.2.3. انتقاء البكتيريا المحللة لمبيدات الفسفور العضوية: Selection of OPs-degrading bacteria

تم عزل البكتيريا القادرة على استخدام الـ Chlorpyrifos و Malathion كمصدر وحيد للكربون باستخدام تقنية الاستزراع الانتقائي Selective enrichment culture technique ، بإتباع البروتوكول الذي وصفه Adams وجماعته (2024) مع بعض التعديلات الطفيفة، تم تحضير وسط الأملاح المعدني MSM وفق (الفقرة: 7.2.3.2.3)، برد الوسط إلى (45-50 م°) وأضيف إليه مبيد الـ Chlorpyrifos و Malathion بتركيز نهائي للمادة الفعالة 100 ملغم/لتر وفق معادلة التخفيف $(C_1V_1=C_2V_2)$ ،

خُطت 10 غم من عينة التربة مع 90 مل ماء مقطر معقم، حيث مزجت جيدا ثم نُقل 10 مل منها إلى دورق إرلنماير Erlenmeyer flask سعة 250 مل يحتوي على 100 مل من وسط MSM مُدعم بـ 100 ملغم/لتر لكل من الـ Chlorpyrifos و Malathion كمصدر وحيد للكربون، ثم حُضنت الدوارق بالظلام في حاضنة هزاة Shaking incubator عند درجة حرارة 30 م°، ورقم هيدروجيني 7 وسرعة دوران 150 rpm لمدة 7 أيام. بعد ذلك، تم نقل 10 مل من مزرعة الإثراء Enrichment culture إلى وسط MSM طازج يحتوي على نفس تركيز الـ Chlorpyrifos و Malathion ، وتكررت العملية ثلاث مرات. بعد الإثراء النهائي، حُففت عينات من مزرعة الإثراء النهائية تخفيفاً متسلسلاً ونُشرت على أطباق أجار MSM تحتوي على 100 ملغم/لتر لكل من الـ Chlorpyrifos و Malathion كمصدر وحيد للكربون. تم اختيار

المواد و طرائق العمل الفصل الثالث

المستعمرات Colonies المرئية التي ظهرت بعد 1-3 أيام من الحضانة عند درجة حرارة 30 م° وتتقيتها عن طريق الاستزراع الفرعي subculture المتكرر، والحفاظ عليها في وسط مائل Luria-Bertani (LB) عند 4 م°.

6.2.3. Identification of Bacteria: **تشخيص البكتريا:**

شُخصت العزلات البكتيرية اعتماداً على ما أورده كل من Mahon و Lehman (2019)، و Procop و جماعته (2017)، وعلى النحو التالي:

1.6.2.3. **الصفات الزرعية والفحص المجهرى:** Cultural Characteristics and Microscopic Examination

أُجري التشخيص الأولي للعزلات بالاعتماد على الصفات المظهرية المتضمنة شكل ولون وقوام المستعمرات النامية على وسط أكار الماكونكي، أكار الدم والأكار المغذي. وأُخضعت العزلات إلى الفحص المجهرى إذ تمّ تحضير مسحات من هذه المستعمرات بعد إعادة تنقيتها على وسط أكار الماكونكي وأكار الدم وصبغت بصبغة غرام وفحصت تحت العدسة الزيتية للتمييز بين الخلايا الموجبة والسالبة للصبغة وشكل البكتريا وطرق تجمعها.

2.6.2.3. **الاختبارات الكيموحيوية:** Biochemical tests

أُجريت عدد من الاختبارات الكيموحيوية التالية لتشخيص البكتريا:

1.2.6.2.3. **اختبار إنزيم الأوكسيدز:** Oxidase Test

نُقلت مستعمرات بكتيرية بعمر 18-24 ساعة بواسطة عود خشبي إلى ورقة ترشيح مرطبة بكاشف إنزيم الأوكسيدز (فقرة: 1.2.2.2.3)، يعد تغير اللون إلى البنفسجي الغامق بعد مرور 30 ثانية دليلاً على إيجابية الفحص.

2.2.6.2.3. Catalase Test: اختبار إنتاج الكاتليز:

تمّ مزج مزارع بكتيرية بعمر 18-24 ساعة مع قطرة من بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 (فقرة: 2.2.2.2.3) على شريحة زجاجية نظيفة، وبعد ظهور الفقاعات الهوائية دلالة على إيجابية الفحص بإنتاج إنزيم الكاتليز الذي يعمل على تحلل مركب الـ H_2O_2 إلى ماء وغاز الأوكسجين.

3.2.6.2.3. Indole Test: اختبار إنتاج الأندول:

لُحِق وسط ماء الببتون بمستعمرات للعزلات البكتيرية وحُضِن بدرجة حرارة 37° م ولمدة 24 ساعة ثم أُضيف إليه 0.5 مليلتر من كاشف كوفاكس Kovacs reagent (فقرة: 3.2.2.2.3)، ومُزج جيداً. تم الاستدلال على النتيجة الموجبة للتفاعل من خلال تكون حلقة حمراء في طبقة الكحول الأيزوميلي Isoamyl alcohol العليا نتيجة لتحلل الحامض الأميني التربتوفان وتحوله إلى الإندول.

4.2.6.2.3. Voges Proskauer and Methyl Red Test: اختبار فوكس – بروسكاور وأحمر المثيل:

لُحِق وسط MR-VP (فقرة: 3.2.3.2.3) بالبكتريا وبواقع مكررين لكل عزلة بكتيرية. حُضِنَت الانابيب بدرجة حرارة 37° م ولمدة 24-48 ساعة وبعد اكتمال مدة الحضانة أُضيف لأحد المكررات 3 مليلتر من محلول الفا - نفثول و 1 مليلتر من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم (فقرة: 4.2.2.2.3) ومُزجت جيداً لمدة 3-5 دقائق. تعد النتيجة موجبة عند ظهور اللون الأحمر الوردى الذي يدل على تكوين المركب المتعادل Acetyl-Methyl Carbinol او المركب Butylene Glycol واختزالهما الى مركب Diacetyl.

أما المكرر الثاني للعزلة البكتيرية فقد أُضيف إليه 0.5 مليلتر من كاشف المثيل الأحمر (فقرة: 5.2.2.2.3). وبعد ظهور اللون الأحمر الغامق دليلاً على قابلية البكتريا لإنتاج بعض الأحماض العضوية من سكر الكلوكوز التي تسهم في خفض الدالة الحامضية للوسط إلى 4.5 أو أقل، أما ظهور اللون الأصفر فيعد دليلاً على النتيجة السالبة للتفاعل.

5.2.6.2.2. Citrate Utilization Test: اختبار استهلاك السترات:

لغرض اختبار قدرة البكتريا المعزولة على استخدام السترات كمصدر وحيد للكربون والطاقة تم تلقيح وسط السترات المائل بالبكتريا وحُضِن بدرجة حرارة 37° م ولمدة (24-48) ساعة، ويُعد تغير لون البروموثايمول من اللون الأخضر إلى اللون الأزرق نتيجة زيادة الأس الهيدروجيني دليلاً على إيجابية التفاعل.

6.2.6.2.3. Urease Test: اختبار إنتاج إنزيم اليوريز:

لُحِق وسط اليوريا (فقرة: 4.2.3.2.3) بطريقة الطعن والتخطيط ثم حُضِن الوسط الذي تم تلقيحه بدرجة 37° م ولمدة (24-48) ساعة. ويعد تغير لون الوسط إلى اللون الوردي دلالة على إيجابية الفحص، إذ يؤكد تحلل اليوريا بإنتاج إنزيم اليوريز من قبل البكتريا وإنتاج الأمونيا مما أدى إلى رفع الأس الهيدروجيني للوسط وبالتالي تغير لون كاشف الفينول الأحمر.

7.2.6.2.3. Gelatin Liquefaction Test: اختبار تميع الجيلاتين:

تم تلقيح أطباق الوسط الزرعي الحاوي على الجيلاتين (فقرة 5.2.3.2.3) بالعزلات البكتيرية ثم حُضِنَت الأطباق لمدة 24 ساعة في درجة حرارة 37° م. بعدها غُمِر النمو البكتيري بكاشف اختبار الجيلاتين (فقرة: 6.2.2.2.3). ويمثل ظهور منطقة شفافة حول المستعمرات البكتيرية دليلاً على إيجابية الفحص.

8.2.6.2.3. Motility Test: اختبار الحركة:

تم تلقيح أنابيب الاختبار الحاوية على وسط الأكار المغذي نصف الصلب Semi solid agar (فقرة: 6.2.3.2.3) بالبكتريا بطريقة الطعن ثم حُضِنَت الأنابيب لمدة 24-48 ساعة في درجة حرارة 37° م. تم ملاحظة النمو بانتشار البكتريا من منطقة التلقيح وهذا يعني أن البكتريا لها قابلية الحركة وهذا دليل على إيجابية الاختبار أما عدم انتشار البكتريا حول منطقة الطعن فيدل على أن البكتريا غير متحركة.

9.2.6.2.3. إنتاج الإنزيم الحال للدم: Detection of Hemolysin Production

تم التحري عن قابلية البكتريا المعزولة على إنتاج إنزيم الهيمولايسين وتحديد قابلية هذا الإنزيم على تحليل الدم البشري وكما يلي:

1. تُبذ مقدار 5 مليلتر من عينة الدم باستخدام أنابيب نبذ بلاستيكية معقمة ومزودة بمانع التخثر للتخلص من البلازما والحصول على راسب خلايا الدم الحمراء.

2. غُسلت الخلايا مرتين متتاليتين بالمحلول الملحي الفسلجي المعقم، وتم ترسيب الخلايا بالنبذ المركزي بعد كل غسلة.

3. أُضيفت نسبة 5% من الراسب إلى وسط أكار الدم الأساس المعقم بعد تبريده إلى درجة حرارة 45-50 م° ، ثم وزع في أطباق زجاجية معقمة وحُضن بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة للتأكد من خلوه من التلوث.

4. زُرعت العزلات البكتيرية بطريقة التخطيط على الوسط الزرعي المحضر وحُضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة. يعد ظهور منطقة تحلل واضحة حول المستعمرة النامية دلالة على التحلل من نوع بيتا β -hemolytic، أما ظهور لون اخضر حول المستعمرة فيعد دلالة على ان التحلل من نوع الفا α -hemolytic، وفي حال عدم حصول التحلل فإنه من النوع كما γ -hemolytic.

3.6.2.3. تشخيص العزلات البكتيرية باستخدام جهاز الفايك: Identification of bacterial isolate by VITEK 2 compact System

تم استخدام جهاز VITEK 2 (Biomerinex, USA) في مختبر الاحياء المجهرية في مستشفى الديوانية التعليمي، يعتمد نظام VITEK 2 على بطاقات بلاستيكية صغيرة Reagent Cards تحتوي على 64 بئرًا well، كل بئر يحتوي على ركيزة كيموحيوية مجففة أو مضاد حيوي. يتم تلقح هذه الآبار بعالق بكتيري موحّد التركيز. يقوم الجهاز بعد ذلك بحضن البطاقات

المواد و طرائق العمل الفصل الثالث

وقراءة التغيرات اللونية أو العكورة الناتجة عن التفاعلات الأيضية للبكتيريا على فترات زمنية منتظمة. يتم تحليل هذه البيانات بواسطة برنامج حاسوبي متقدم يقارن الأنماط الناتجة بقاعدة بيانات واسعة لتحديد هوية البكتيريا وخصائص حساسيتها. وتم إجراء الفحص اعتماداً على ما جاء في (Pincus, 2013).

1.3.6.2.3 إعداد العالق البكتيري: Bacterial suspension preparation

1. تحضير أنبوب بلاستيكي معقم.
2. وضع 3 مل من المحلول الملحي المعقم (0.45% أو 0.5% كلوريد الصوديوم) في الأنبوب .
3. باستخدام عروة تلقيح معقمة، تم جمع عدد كافٍ من المستعمرات البكتيرية النقية من طبق الزرع (بعمر 18-24 ساعة) ونقلها إلى الأنبوب المحتوي على المحلول الملحي.
4. تم مزج المستعمرات جيداً مع المحلول الملحي حتى يتكون عالق بكتيري متجانس.
5. تم قياس عكورة العالق البكتيري باستخدام جهاز DensiCHEK. وتم تعديل العكورة حتى وصولها إلى مدى (OD=0.50-0.60) من خلال إضافة المزيد من البكتيريا إذا كان التعكر منخفضاً، أو إضافة المزيد من المحلول الملحي إذا كان التعكر مرتفعاً.

2.3.6.2.3 تحميل العالق البكتيري في البطاقات: Loading into VITEK Cards

1. تم وضع الأنبوب المحتوي على العالق البكتيري وبطاقة VITEK2 في الحامل المخصص لهما في الجهاز.
2. تم توصيل البطاقة بالأنبوب بواسطة قناة توصيل دقيقة (Micro-channel).
3. تم ادخال رمز البطاقة (Barcode) إلى نظام VITEK 2 باستخدام الماسح الضوئي، وتم إدخال أي معلومات إضافية مطلوبة عن العينة.
4. وضع الحامل في حجرة التفريغ (Vacuum Chamber) بالجهاز. تقوم عملية التفريغ بسحب العالق البكتيري من الأنبوب وإرساله إلى جميع الآبار الموجودة في البطاقة، مما يضمن تلقيحاً متساوياً.

3.3.6.2.3. ختم البطاقة وحضانة: Card Sealing and Incubation

بعد اكتمال عملية التلقيح (والتي استغرقت بضع دقائق)، قام الجهاز تلقائيًا بقطع قناة التوصيل وختم البطاقة بإحكام لمنعها من أي تسرب أو تلوث. ثم نقلت البطاقة المختومة إلى حاضنة الجهاز Carousel Incubator وحضنت عند درجة حرارة 35.5 م°.

4.3.6.2.3. النظام البصري وقراءة التفاعلات: Optical System and Reaction Reading

يعمل النظام البصري في جهاز VITEK 2 على قراءة التفاعلات الكيموحيوية داخل كل بئر في البطاقة بشكل مستمر (كل 15 دقيقة) . إذ يتم الكشف عن التغيرات اللونية وتغيرات العكورة الناتجة عن نمو البكتيريا باستخدام حزم ضوئية متعددة الأطوال الموجية، وتحليلها وترجمتها إلى بيانات رقمية، باستخدام خوارزميات متقدمة لمعالجة البيانات، بما في ذلك التخلص من القراءات الخاطئة المحتملة الناتجة عن فقاعات الهواء أو الشوائب.

5.3.6.2.3. تحليل النتائج وتحديد الهوية: Result Analysis and Identification

بعد مدة حضانة تراوحت ما بين 2 إلى 18 ساعة (تعتمد على نوع البكتيريا والبطاقة المستخدمة)، تم جمع سجل بيانات التفاعلات، إذ قام برنامج VITEK 2 بمقارنة نمط التفاعلات الكيموحيوية للعينة مع قاعدة بياناته المرجعية الواسعة التي تحتوي على آلاف الأنماط لأنواع بكتيرية مختلفة. وقدم الجهاز نتيجة تحديد الهوية مع نسبة احتمالية (Probability %) ومستوى ثقة (Confidence Level) يعكس مدى تطابق النمط مع الأنواع الموجودة في قاعدة البيانات. وظهرت جميع هذه النتائج على الكمبيوتر وطُبعت.

6.3.6.2.3. مستويات تحديد الهوية: Identification levels

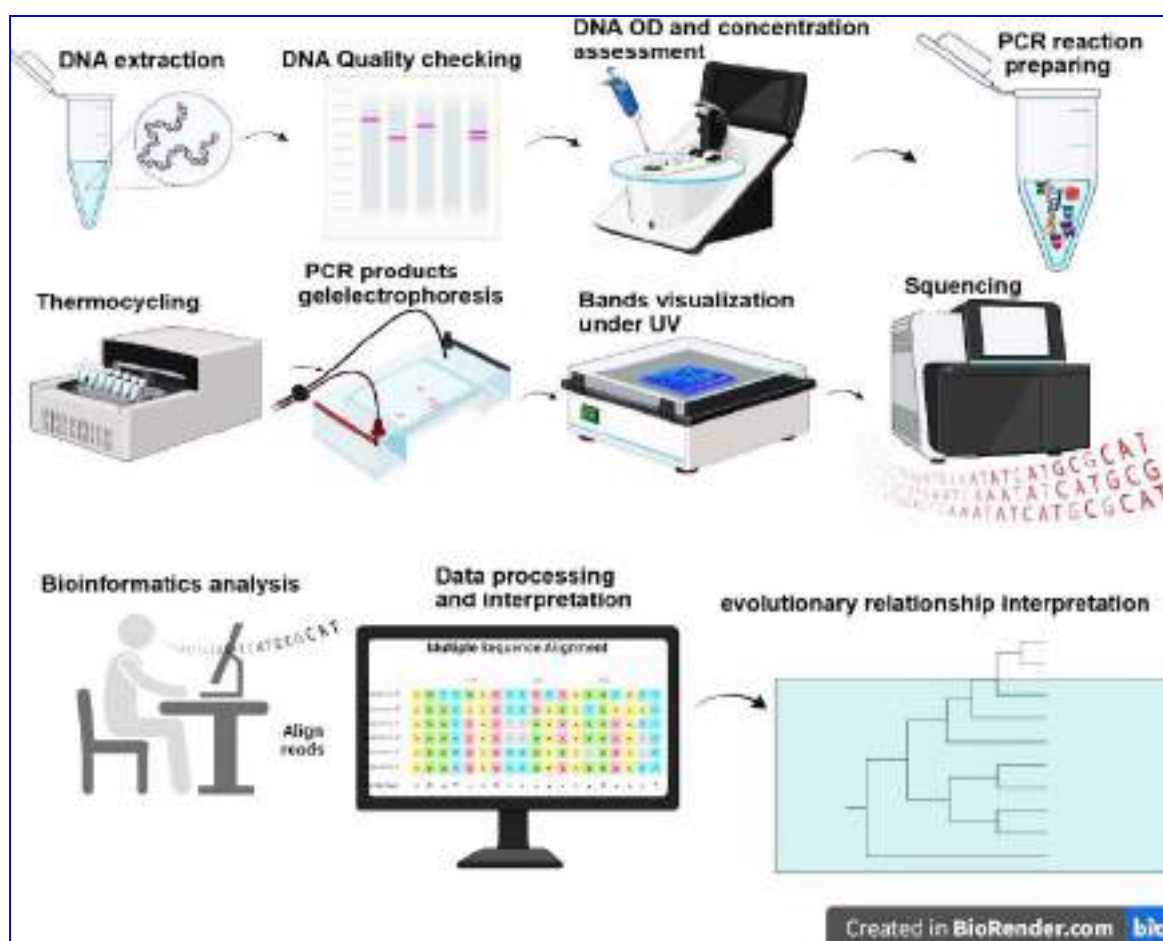
يُقارن البرنامج نمط التفاعلات الناتجة بالخصائص التصنيفية المخزنة في قاعدة بيانات الجهاز، ويعطي نسبة احتمالية ومستوى ثقة للكائن المُشخَّص وفق الجدول (3-7):

جدول (3-7): مستويات تحديد الهوية بنظام VITEK 2

الاحتمالية % Probability %	معرف رسالة مستوى الثقة ID Message confidence level
96-99	Excellent
93-95	Very good
89-92	Good
85-88	Acceptable
N/a	Unidentified

7.2.3. الدراسة الجزيئية: Molecular study

أُجريت الدراسة الجزيئية وفق مسار العمل الموضح في الشكل (3-3):



الشكل (3-3): الرسم التخطيطي لخطوات التشخيص الجزيئي والتسلسل والدراسة التطورية

1.7.2.3. استخلاص الحمض النووي: DNA extraction

تم استخلاص الحمض النووي من العزلات البكتيرية قيد الدراسة حسب تعليمات الشركة المصنعة المرفقة مع عدة الاستخلاص Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit وعلى النحو التالي:

1.1.7.2.3. تحضير العينة: Samples preparation

A. البكتريا السالبة لصبغة كرام:

1. رسب 1.5 مليلتر من عالق البكتريا بعمر 24 ساعة بجهاز المنبذة بسرعة 13000 دورة/دقيقة ولمدة دقيقة واحدة.
2. أهمل الراشح وأضيف للراسب 180 مايكروليتر من داريء GT Buffer ، وُجَّ المزيج بالمزج الدوار vortex بشكل جيد لمدة 3 ثوان، وأضيف للمزيج 20 مايكروليتر من Proteinase K ومزج لبضع ثوانٍ بال vortex و نُقلت الأنابيب إلى حمام مائي بدرجة حرارة 60 م° لمدة 10 دقائق. وتم تقليبها كل 3 دقائق.

B. البكتريا الموجبة لصبغة كرام:

1. رسب 1.5 مليلتر من عالق البكتريا بعمر 24 ساعة بجهاز المنبذة بسرعة 13000 دورة/دقيقة ولمدة 1 دقيقة واحدة.
2. أهمل الراشح وأضيف للراسب 200 مايكروليتر من داريء Gram⁺ Buffer+Lysozyme، وُجَّ المزيج جيدا، وحضنت الأنابيب بدرجة حرارة 37 م° لمدة 30 دقيقة، مع تقليبها كل 10 دقائق.
3. أضيف للمزيج 20 مايكروليتر من Proteinase K ومزج لبضع ثوانٍ بال vortex و نُقلت الأنابيب إلى حمام مائي بدرجة حرارة 60 م° لمدة 10 دقائق. وتم تقليبها كل 3 دقائق.

2.1.7.2.3. تحليل الخلايا: Cell lysis

1. أُضيف للمزيج 200 مايكروليتر من GB Buffer ومزجت الانابيب لمدة 10 دقائق بالـ vortex
2. نُقلت الانابيب إلى حمام مائي بدرجة حرارة 70 م° لمدة 10 دقائق. مع التقليب كل 3 دقائق، حتى يصبح المزيج رائقاً.
3. تم تهيئة الحمام المائي بدرجة 70 م° وتم وضع دارئ Elution Buffer لحين استخدامه في الخطوة الاخيرة من الاستخلاص.

3.1.7.2.3. ازالة الحمض النووي الريبوزي RNA

- بعد حضن الانابيب عند درجة حرارة 70 م°، أُضيف 5 ميكروليتر من إنزيم RNase A (بتركيز 50 ملغم/ مل) إلى المزيج الرائق وُرج بقوة ثم حُضّن في درجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق.

4.1.7.2.3. ربط الحمض النووي DNA binding

1. أُضيف للمزيج 200 مايكروليتر من الكحول المطلق absolute ethanol، ومزجت الانابيب بقوة.
2. وضع عمود GD في انبوبة تجميع سعة 2 مل ونقل مزيج العينة برفق الى عمود GD، بعد ذلك نُبذت الانابيب بسرعة 13000 دورة/دقيقة ولمدة دقيقتين.
3. تم التخلص من انابيب التجميع ونُقل عمود GD إلى انبوبة تجميع جديدة.

5.1.7.2.3. غسل العمود Column washing

1. أُضيف الى عمود GD، 400 مايكروليتر من W1 Buffer ونُبذت الانابيب بسرعة 13000 دورة/دقيقة ولمدة 30 ثانية.
2. تم التخلص من أنابيب التجميع ونُقل عمود GD إلى أنبوبة تجميع جديدة.

المواد و طرائق العمل الفصل الثالث

3. أُضيف إلى عمود GD، 600 مايكروليتر من Wash Buffer (الفقرة: C. 8.1.2.2.3)

وُنُبذت الانابيب بسرعة 13000 دورة/دقيقة ولمدة 30 ثانية.

4. نُقل عمود GD الى انبوبة تجميع جديدة. ونبذت الانابيب بسرعة 13000 دورة/دقيقة

ولمدة 3 دقائق، لتجفيف العمود.

6.1.7.2.3. الاذابة Elution

1. وضع عمود GD المجفف في انبوبة ابندروف microcentrifuge tube سعة 1.5

مل، ثم اضيف 100 مايكروليتر من دارى Elution Buffer المسخن مسبقا بدرجة

حرارة 70 م°، ثم تركت الانابيب لمدة 3 دقائق بدرجة حرارة الغرفة للسماح بامتصاص

محلول الاذابة.

2. نبذت الانابيب بسرعة 13000 دورة/دقيقة ولمدة 3 دقائق، بعدها أُهمل عمود GD

وغلقت انبوبة ابندروف الحاوية على الـ DNA المستخلص وعلمت وحفظت بدرجة حرارة

-20 م° لحين الاستخدام.

2.7.2.3. فحص تركيز ونقاوة الحمض النووي المستخلص DNA purity

تم الكشف عن الحمض النووي DNA المستخلص من خلال استخدام جهاز

Nanodrop الخاص بالكشف وقياس تركيز الاحماض النووية (DNA and RNA)، اذ يتم

تحديد تركيز الحمض النووي DNA بوحدات (ng/ml) وقياس نقاوته من خلال قراءة

الامتصاصية بطول موجي يتراوح بين 260-280 نانو ميتر وتم استعمال الجهاز على النحو

التالي:

1. بعد تشغيل جهاز Nanodrop تم اختيار برنامج قياس الحمض النووي نوع DNA.

المواد و طرائق العمل الفصل الثالث

2. تصفير ركيزة المقياس مرتين باستخدام ورق نشاف خاص بالجهاز وذلك بوضع 1 مايكروليتر من (ddH₂O) باستخدام ميكروباييت معقمة على سطح ركيزة المقياس وإجراء التصفير ثم القيام بتنظيف الركيزة لقياس العينات.
3. الضغط على زر ok لبدء عملية قياس تركيز الـ DNA وذلك باستخدام 1 ميكروليتر من كل عينة من عينات الـ DNA المستخلص ومن ثم يتم تنظيف ركيزة المقياس للجهاز مرة أخرى لقياس العينة التالية.
4. تحديد نقاوة عينات الحامض المستخلص بقراءة الامتصاصية لجهاز Nanodrop، إذ يعد الحمض النووي DNA المستخلص نقياً عندما تكون نسبة الامتصاصية هي (1.8).

3.7.2.3. تفاعل البلمرة المتسلسل: Polymerase Chain Reaction (PCR)

1.3.7.2.3. تحضير مزيج التفاعل: Preparing the reaction mix

تم تحضير مزيج تفاعل البلمرة المتسلسل باستخدام عدة 2.5x Reaction Mix حسب تعليمات الشركة المصنعة، وكما مبين في الجدول (3-8)، وبعد إكمال الإضافات في أنابيب الـ PCR، مزجت العينات لمدة 10 ثواني باستخدام المازج بعناية .

جدول (3-8) مكونات مزيج تفاعل البلمرة المتسلسل

ت	المكونات	الحجم (μl)
1	2.5x Reaction Mix	10
2	MgCl ₂ , 25 mM	0.5
3	Forward Primer (10 pmol/μl)	1
4	Reverse Primer (10 pmol/μl)	1
5	DNA Template	2
6	dd H ₂ O nuclease free water	10.5
الحجم الكلي للعينة		25

2.3.7.2.3. Amplification condition: ظروف التضخيم:

استخدم جهاز التدوير الحراري Thermocycler لغرض تضخيم تسلسلات الجينات المستهدفة في الدراسة، وقد تم ضبط ظروف التفاعل لكل جين وفق الجدول (3-9).

جدول (3-9) ظروف تفاعل الـ PCR للجينات المستهدفة

المرحلة Step	الجين	درجة الحرارة °C	المدة Duration	عدد الدورات Cycles
Initial Denaturation	جميع الجينات	95°C	5 minutes	1
Denaturation		95°C	30 seconds	30
Annealing	16S rRNA	61.8°C	30 seconds	
	opd	58°C	30 seconds	
	mpd	60°C	30 seconds	
Extension	16S rRNA	72°C	45 seconds	
	opd	72°C	60 seconds	
	mpd	72°C	60 seconds	
Final Extension	جميع الجينات	72°C	7 minutes	1
Hold		4°C	--	--

4.7.2.3. الترحيل الكهربائي: Gel Electrophoresis

أُجري الترحيل الكهربائي لـ DNA في هلام الأكاروز على وفق ما ورد في Green و Sambrook (2019) وكما يلي:

1. حُضر هلام الأكاروز بإذابة (1 غم لنواتج الـ DNA و 2 غم لنواتج الـ PCR) في 100 مليلتر من داريء TBE buffer (1X) (فقرة: A. 9.1.2.2.3)، سُخن الأكاروز إلى درجة الغليان وبعدها تم تبريده إلى درجة 45-50° م ثم أُضيفت صبغة Ethidium

المواد و طرائق العمل الفصل الثالث

5 bromide مايكروليتر محلول الصبغة الخزين (فقرة: C. 9.1.2.2.3) لكل 100 مل من دارئ الترحيل للحصول على تركيز نهائي مقداره 0.5 مايكروغرام/ مليلتر.

2. حُضر قالب الترحيل Tray الاكاروز بإحاطة حافته بشريط لاصق وبشكل جيد لمنع تسرب الهلام الذائب بعد صبّه ثم ثبت مشط تكوين الحفر Comb في أحد طرفي القالب، وصبّ هلام الاكاروز في القالب وترك ليتصلب لمدة 30 دقيقة، ثم رفع مشط تكوين الحفر من الأكاروز المتصلب بعناية ورفع الشريط اللاصق ثم ثبت القالب على مسنده في وحدة الترحيل الكهربائي Cell unit، بعدها غطي هلام الأكاروز بارتفاع 1 ملليمتر بدارئ TBE (1X).

3. استخدم سلم القياس 100 DNA ladder لقياس ناتج PCR.

4. حضر الـ DNA المراد تحميله على الهلام بأخذ 5 مايكروليتر منه وأضيف إليه 1 مايكروليتر من دارئ التحميل Loading buffer (فقرة: B. 9.1.2.2.3)، ثم حمل كل نموذج في حفرة من حفر الهلام، بعدها رحلت النماذج كهربائياً تحت فرق جهد مقداره 100 فولت/ سم وتيار مقداره 70 ملي أمبير لمدة 2 دقيقة لـ DNA و 45 دقيقة لنواتج PCR.

5. فُحص الهلام بوساطة مصدر للأشعة فوق البنفسجية UV Transilluminator عند طول موجي 336 نانوميتر. صور بعدها الهلام باستخدام كاميرا رقمية.

5.7.2.3. تحليل تسلسل جين *16S rRNA* : *16S rRNA* gene sequence analysis

بعد التأكد من نواتج تضخيم جين *16S rRNA* بالحجم المطلوب في العزلات البكتيرية قيد الدراسة من خلال الترحيل الكهربائي، تم ارسال نواتج التضخيم الى شركة Pishgam Biotech الايرانية لإجراء تسلسل سانجر Sanger sequencing، بعد الحصول على ملفات FASTA لتسلسلات جين *16S rRNA* من الشركة، تم تحليلها باستخدام برنامج UGENE، حيث استُخدم في التسلسل كلا البادئين الأمامي والخلفي (Forward و Reverse).

المواد و طرائق العمل الفصل الثالث

تم تقليم المناطق الطرفية منخفضة الجودة لاستبعاد مواقع ارتباط بادئات تفاعل PCR، ثم دمجت التسلسلات المتقابلة (Forward و Reverse) لتكوين تسلسل واحد ممثل لجين *16S rRNA* باستخدام أدوات تجميع القراءات، وحُوّلت التسلسلات المُجمّعة إلى صيغة ملف FASTA، ثم أُجريت عمليات بحث عن تشابه التسلسل باستخدام خوارزمية BLAST مقابل قاعدة بيانات المركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية (NCBI) The National Center for Biotechnology Information لجين *16S rRNA* لتحديد الجنس/النوع. تم إيداع تسلسلات جين *16S rRNA* الناتجة في هذه الدراسة في بنك الجينات (GenBank) تحت أرقام الوصول Accession Number مميزة.

5.7.2.3. الشجرة التطورية: The phylogenetic tree

تم إجراء التحليل الوراثي الجزيئي لتحديد العلاقات التطورية بين العزلات المدروسة بناءً على تسلسل جين *16S rRNA*. تم الحصول على تسلسلات جين *16S rRNA* للعزلات من قاعدة بيانات GenBank التابعة للـ NCBI لضمان تجذير دقيق للشجرة الوراثية، تم اختيار تسلسل *Acinetobacter soli* (Accession number: PV960624) كمجموعة خارجية Outgroup بناءً على موقعها التصنيفي المعروف. بعد جمع التسلسلات، تم إجراء محاذاة متعددة باستخدام برنامج MAFFT (الإصدار: 7.409) (Katoh & Standley, 2013). تم بناء الشجرة الوراثية باستخدام منهجية الاحتمالية القصوى Maximum Likelihood في برنامج RAxML (الإصدار: 8.2.12)، مع تطبيق نموذج التطور GTRGAMMA الذي يُعد مناسباً لتسلسلات الحمض النووي (Stamatakis, 2014). لتقييم موثوقية فروع الشجرة، تم إجراء اختبار Bootstrap السريع مع 100 تكرار (Felsenstein, 1985). أخيراً، تم تصدير الشجرة النهائية بصيغة Newick وتنسيقها وعرضها باستخدام أداة iTOL (Interactive Tree Of Life v6)، مع إظهار قيم Bootstrap ومقياس الرسم والأسماء العلمية الكاملة وأرقام الوصول (Letunic & Bork, 2021).

6.7.2.3. تحليل الجينوم الكامل: Whole genome sequencing

1.6.7.2.3. تقديم العينات واستخلاص الحمض النووي: Sample Submission and DNA Extraction

تم تحضير مزارع بكتيرية نقية للعتلتين *Ochrobactrum* sp. و *L. sphaericus* اللتان فشل تقنفة الـ PCR فف الكشف عن جفني *mpd* و *opd* ففهما، لفللل الجفنوم الكامل Whole genome sequencing (WGS). فف زُرعت العزلات البكتفرفة على وسط الاكار المغذف Nutrient agar، وغلقت الأنابفب بشرفط شمعي لاصق Parafilm وتم شحنها مباسرة إلى منصة Illumina فف ألمافا لإجراء تسلسل الجفنوم الكامل WGS (Illumina, 2026). عند وصولها إلى المنشأة، تم استخلاص وتقففة الحمض النووي الجفنومي genomic DNA من الكتلة الففوة البكتفرفة باسلفلام بروتوكولات الاستخلاص عاففة الإنتاجفة الموحدة والمعتمدة للبكتفرا فف المنشأة. تم تقفم كمة وسلامة الحمض النووي الجفنومي المستخلص باسلفلام مقفاس الفلورة Qubit (fluorometrically Qubit) (Thermo Fisher Scientific, 2015) لضمان الامتثال لمعافر مراقبة الجودة المطلوبة لفلل مكلتبات library preparation. تم تعديل كمة الحمض النووي المدخلة لتكون ضمن النطاق الأمثل (100-500 نانوغرام) حسب الفوصفات الخاصة بمجموعة Illumina DNA Prep kit (Illumina, 2026).

2.6.7.2.3. فللر المكلتبات والتسلسل: Library Preparation and Sequencing

تم بناء مكلتبات التسلسل Sequencing libraries فف المنشأة باسلفلام مجموعة Illumina DNA Prep kit وففاً لفلفمات الشركة المصنعة (Illumina, 2026). فضمن سفر العمل الفزئة الإنزفمفة للحمض النووي الجفنومي Enzymatic fragmentation of gDNA، فلها ربط محولات الفهرسة Indexing adapters بقطع الحمض النووي. بعد ذلك، تم تضخم المكلتبات المُجهزة وتنظفها وتجمفعا لإجراء التسلسل المتعدد Multiplexing. بعدها تم إجراء

المواد و طرائق العمل الفصل الثالث

التسلسل عالي الإنتاجية High-throughput sequencing على منصة Illumina HiSeq 6000 مما أدى إلى توليد قراءات مزدوجة الأطراف Paired-end reads بطول (2 × 150 bp) لضمان تغطية عالية العمق للجينوم. تم إنشاء ملفات FASTQ باستخدام برنامج Local Run Manager (LRM) بإتباع إجراءات التحليل الأولي القياسية لشركة Illumina, (Illumina, 2026).

3.6.7.2.3. تجميع الجينوم والتعليق الوظيفي: Genome Assembly and Functional Annotation

تمت معالجة بيانات التسلسل الخام FASTQ باستخدام مسار معالجة معلوماتية حيوية قياسي Standard bioinformatics pipeline. وأُجريت مراقبة الجودة الأولية باستخدام برنامج FastQC (الإصدار 0.11.9) لتقييم جودة القراءات (Andrews, 2010)، تلاها تقييم المحولات Adapter trimming وتصفية القراءات منخفضة الجودة (Q-score < 30) باستخدام برنامج Trimmomatic (الإصدار 0.39) (Bolger *et al.*, 2014). وأُجري تجميع أولي من الصفر De novo assembly للقراءات النظيفة باستخدام مُجمّع الجينوم SPAdes (الإصدار 3.15.0) (Bankevich *et al.*, 2012).

تم تقييم جودة الجينومات المجمعة (من حيث الاتصال والاكتمال) باستخدام أداة QUAST (Gurevich *et al.*, 2013)، وتم إجراء التعليق الوظيفي Functional annotation للقطع المجمعة Contigs باستخدام مسار عمل Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) التابع للمركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية NCBI (Tatusova *et al.*, 2016)، وبرنامج SnpEff (الإصدار 5.2) لتحديد المتغيرات والتنبؤ بتأثيرها (Cingolani *et al.*, 2012). كما أُجري بحث مستهدف عن جينات تحلل مبيدات الفسفور العضوية عن طريق مطابقة القراءات مع تسلسلات جينية مرجعية لتحديد وجود الجينات ونطاق تغطيتها coverage (Iyer *et al.*, 2013).

8.2.3. تقييم التحلل الحيوي لمبيدات الفسفور العضوية: Assessment of OPHs biodegradation

1.8.2.3. تقدير التراكيز المتبقية للمبيدات Quantification of residual pesticide concentrations

تم تقدير التركيز المتبقي للمبيد بتحضير وسط MSM السائل (فقرة: 1.2.3.2.3) درجة حموضة 7 pH، في دوارق حجمية سعة 250 مل تحتوي على مبيد Malathion واخرى تحتوي Chlorpyrifos بتركيز نهائي للمادة الفعالة 100 ملغم/ لتر. تمت زراعة الخلايا البكتيرية مسبقاً في مرق LB عند درجة حرارة 30 م° لمدة 24 ساعة، ثم حُصدت بالطرد المركزي عند 6000 دورة في الدقيقة لمدة 5 دقائق، وغُسِلت ثلاث مرات بدارئ الفوسفات الملحي، وأُعيد تعليقها لتصل كثافتها النهائية إلى (10^8 CFU/ml). تم تلقيح 1 مل من العالق البكتيري في 100 مل من وسط MSM المحتوي على المبيد. استُخدمت دوارق حجمية غير مُلحقة Uninoculated control كمجموعة سيطرة. كررت جميع المعالجات ثلاث مرات. حُضنت الدوارق في الظلام عند درجة حرارة 30 م° في حاضنة هزازة بسرعة 150 دورة في الدقيقة لمدة 10 أيام. جُمعت العينات كل يومين لتحليل بقايا المبيدين (Karpouzas & Walker, 2000).

2.8.2.3. استخلاص المبيد للتحليل: Extraction of pesticide for analysis

جُمعت 10 مل من كل دورق تجريبي في الأيام 2 و4 و6 و8 و10 من فترة الحضانة. حُضعت كل عينة للطرد المركزي بسرعة 6000 دورة في الدقيقة لمدة 5 دقائق، تم استخلاص المبيدات من الراشح باستخدام الاستخلاص السائل-السائل liquid-liquid extraction بواسطة أسيتات الإثيل Ethyl acetate (1:1، حجم/حجم) مرتين. رُمي الطور المائي، وجُمع الطور العضوي وجُفف فوق كبريتات الصوديوم اللامائية لإزالة الرطوبة المتبقية. بُخر الطور العضوي حتى الجفاف باستخدام مبخر دوار Rotary evaporator عند 40 م°. ثم أُذيبت البقايا في الميثانول Methanol ورُشحت بمرشحات غشائية Millipore filter بقطر 0.45 مايكرومتر، وتم تخزين العينة في 4 م° لحين تحليلها بواسطة HPLC (Mol et al., 2007).

3.8.2.3. كشف وتقدير التركيز المتبقي للمبيد باستخدام HPLC: Detection and quantification of pesticide residual concentration using HPLC

تم تحليل عينات الاستخلاص باستخدام جهاز HPLC لقياس التركيز المتبقي للمبيد بالاعتماد على ما ورد في Jung وزملائه (2016)، وفق ظروف التشغيل التالية:

Stationary phase: Eclipse XDB-C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 µm), and a UV detector set to 290 nm.

Mobile phase: Methanol-water mixture (90:10, v/v)

Injection Volume: 20 µL

Flow rate: 1.0 mL/ min.

Column Temp: 25°C.

Retention Time – Rt: (Chlorpyrifos= 7.35 min, Malathion = 8.83 min)

أُجري التقدير الكمي باستخدام منحنى معايرة قياسي Standard Calibration Curve، لكل مبيد، حُضِر باستخدام مادة قياسية تحليلية من المبيد، وتم قياس تركيز المبيد المتبقي لكل عينة بالاعتماد على معادلة الانحدار التي تم استخراجها من خلال المنحنى القياسي (فقرة: 4.8.2.3 و فقرة: 5.8.2.3)، أُجريت جميع القياسات بثلاثة مكررات.

حُدِدت كفاءة استرجاع المبيد المستخلص باستخدام إجراء الإضافة إلى المصفوفة Matrix-Spiking Procedure، استناداً إلى مبادئ ضبط الجودة العامة التي وصفتها المفوضية الأوروبية (European Commission, 2021). واستُخدم وسط الأملاح المعدنية MSM الخالي من المبيد وغير الملح بالبكتيريا بوصفه مصفوفة فارغة Blank Matrix. أُضيف المبيد إلى MSM بتركيزات بلغت 10 و 50 و 100 ملغم/لتر قبل إجراء عملية الاستخلاص. وحُللت ثلاث عينات مستقلة عند كل تركيز، باستخدام إجراء الاستخلاص نفسه المطبق على العينات التجريبية. وحسب معدل الاسترجاع Recovery Rate وفق المعادلة:

$$R = (C_{\text{measured}} / C_{\text{added}}) \times 100$$

حيث: R = معدل الاسترجاع (أو النسبة المئوية للاسترجاع)
 C_{measured} = تركيز المبيد المقاس بالـ HPLC بعد عملية الاستخلاص.
 C_{added} = تركيز المبيد الأولي المضاف للوسط قبل عملية الاستخلاص.

تم الحصول على معامل استرجاع كلي لمكررات التراكيز المستخدمة (10، 50، 100)،
 ولكل مبيد الـ Chlorpyrifos و Malathion، بلغت (0.9697 و 0.9683) وعلى التوالي.
 واستُخدمت قيمة معامل الاسترجاع هذه لتصحيح تراكيز المبيد المتبقية، وفق المعادلة الآتية:

$$C_{\text{corrected}} = C_{\text{measured}} / R$$

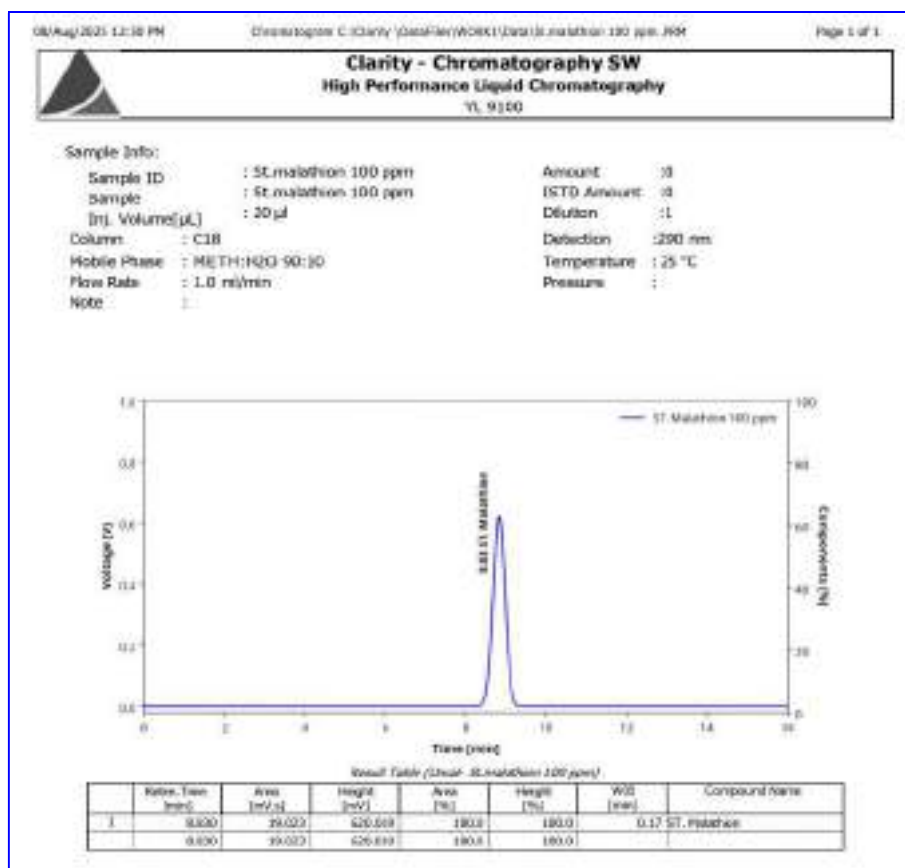
حيث:
 $C_{\text{corrected}}$ = التركيز المتبقي المصحح للمبيد.
 C_{measured} = تركيز المبيد المتبقي المقاس بجهاز الـ HPLC من العينة قبل إجراء التصحيح.
 R = معدل الاسترجاع (أو معامل الاسترجاع)

4.8.2.3. المنحني القياسي لمبيد الملاثيون: Standard curve of Malathion

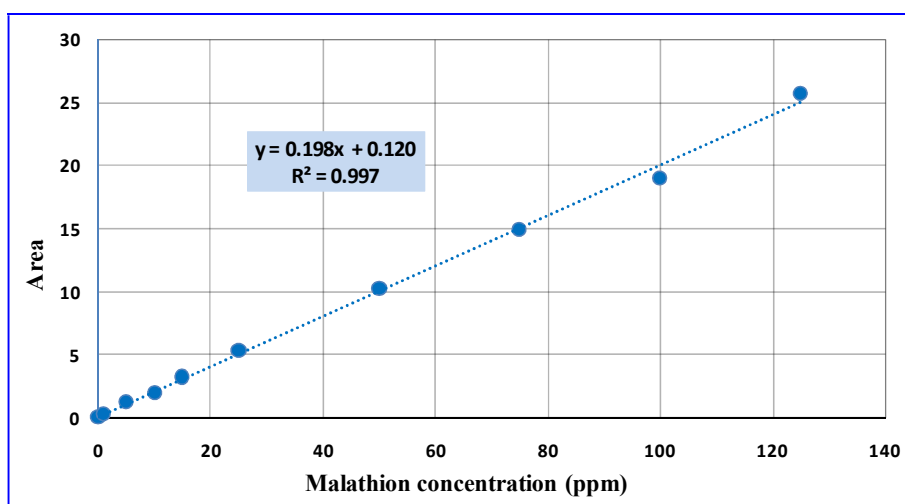
تم استخدام الـ Malathion من الدرجة التحليلية (نقاء 98.2%) ضمن مدى تركيز من
 1-125 ملغم/ لتر، وتم قراءة امتصاصية كل تركيز في جهاز HPLC (الشكلين: 3-4 و 3-5)،
 وقد نتجت معادلة الانحدار التالية:

$$Y = 0.198 X + 0.120$$

حيث:
 Y = مساحة القمة [mV.s] المقاسة بجهاز الـ HPLC.
 X = تركيز المبيد المتبقي Pesticide concentration



الشكل (3-4): طيف الامتصاص للـ Malathion القياسي بتركيز 100 ملغم/ لتر باستخدام جهاز HPLC، يوضح وقت الاحتباس 8.83 دقيقة.



الشكل (3-5): المنحي القياسي للـ Malathion ضمن مدى تركيز من 1-125 ملغم/ لتر.

يمثل R^2 معامل الارتباط بين المساحة والتركيز وكلما كانت قيمته اقرب إلى 1 كانت العلاقة تامة، تشير قيمة R^2 (0.997) إلى أن خط الانحدار مناسب تماما مع البيانات.

5.8.2.3. المنحنى القياسي لمبيد الكلوربيريفوس: Standard curve of Chlorpyrifos

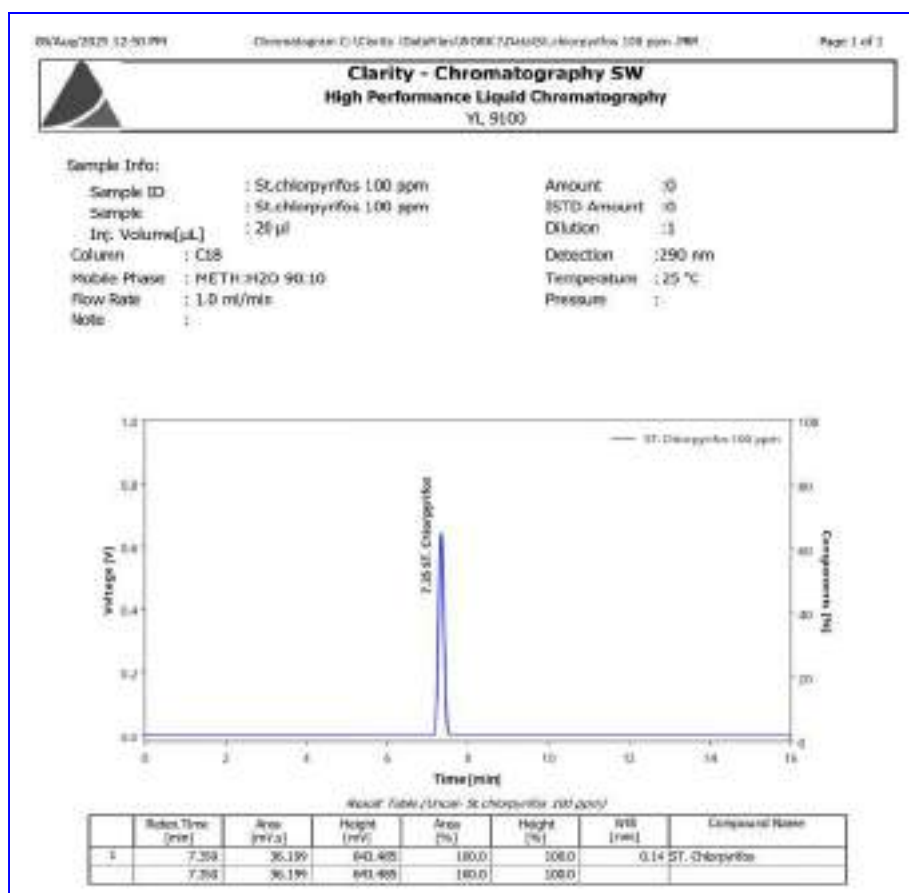
تم استخدام الـ Chlorpyrifos من الدرجة التحليلية (نقاء 98.5%) ضمن مدى تركيز من 1-125 ملغم/ لتر، وتم قراءة امتصاصية كل تركيز في جهاز HPLC الشكل (3-6) و (3-7)، وقد نتجت معادلة الانحدار التالية:

$$Y = 0.379 X - 0.295$$

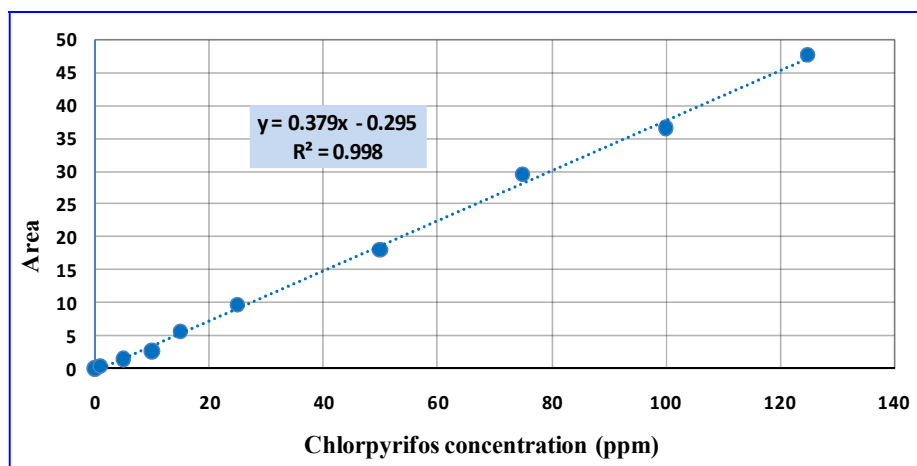
حيث:

Y = مساحة القمة [mV.s] المقاسة بجهاز الـ HPLC.

X = تركيز المبيد المتبقي Pesticide concentration



الشكل (3-6): طيف الامتصاص لـ Chlorpyrifos القياسي بتركيز 100 ملغم/ لتر باستخدام جهاز HPLC، يوضح وقت الاحتباس 7.35 دقيقة.



الشكل (7-3): المنحي القياسي للـ Chlorpyrifos ضمن مدى تركيز من 1-125 ملغم/ لتر.

9.2.3. تحديد الظروف المثلى للتحلل الحيوي: Determine the optimal conditions of biodegradation

تمت دراسة بعض العوامل المؤثرة على عملية تحلل المبيدات مثل درجة الحرارة، ودرجة الحموضة ، فترة التعرض وتركيز المبيد.

1.9.2.3. تأثير درجة الحرارة The effect of temperature

تم تقييم تأثير ثلاث درجات حرارة مختلفة (20، 30، 40°م) على كفاءة التحلل الحيوي لمبيد الـ Chlorpyrifos و Malathion وكما يلي:

1. تحضير الوسط: تم تحضير وسط MSM السائل (فقرة: 7.2.3.2.3) بتركيز نهائي 100 ملغم/لتر لكل من مبيد الـ Chlorpyrifos و Malathion عند رقم هيدروجيني ثابت (pH 7)، ووزعت في دوائر حجمية سعة 250 مل.

2. تحضير العالق البكتيري: تمت زراعة الخلايا البكتيرية مسبقاً في مرق LB عند درجة حرارة 30 م لمدة 24 ساعة، ثم حُصدت بالطرد المركزي عند 6000 دورة في الدقيقة لمدة 5 دقائق، وغُسلت ثلاث مرات بدارئ الفوسفات الملحي PBS، وأعيد تعليقها لتصل كثافتها النهائية إلى 10^8 (CFU/ml).

المواد و طرائق العمل الفصل الثالث

3. **التلقيح والحضن:** لُقحت الدوارق الحجمية سعة 250 مل الحاوية على 100 مل من الوسط بـ 1 مل من العالق البكتيري بكثافة نهائية (10^8 CFU/ml)، استخدمت دوارق حجمية غير مُلحقة كمجموعة سيطرة. وزعت العينات على ثلاث مجموعات وحضنت في حاضنة هزازة بسرعة 150 دورة/دقيقة لمدة 10 أيام. عند ثلاث درجات حرارة مختلفة (20، 30، و40)، مع الحفاظ على ظروف الظلام التام.

4. **جمع العينات وتحليلها:** جُمعت العينات بعد 10 أيام لتحليل بقايا المبيدين باستخدام تقنية الـ HPLC. وحسبت النسبة المئوية للتحلل لكل مبيد عند كل درجة حرارة. نفذت التجربة في ثلاث مكررات (KaviKarunya & Reetha, 2012).

2.9.2.3. تأثير الرقم الهيدروجيني The effect of pH

لغرض تقييم تأثير الرقم الهيدروجيني على كفاءة التحلل الحيوي لمبيدي الـ Chlorpyrifos و Malathion، تم تحضير وسط MSM السائل (فقرة: 7.2.3.2.3) بتركيز نهائي 100 ملغم/لتر لكل من مبيدي الـ Chlorpyrifos و Malathion، ووزع في دوارق حجمية سعة 250 مل. تم ضبط الرقم الهيدروجيني للوسط عند ثلاث قيم pH مختلفة (5، 7 و9)، ولُقحت الدوارق الحاوية على 100 مل من الوسط بـ 1 مل من العالق البكتيري بكثافة نهائية (10^8 CFU/ml). ثم وزعت الدوارق على ثلاث مجموعات حسب قيمة الـ pH وحضنت بدرجة حرارة 30 م في حاضنة هزازة بسرعة 150 دورة/دقيقة لمدة 10 أيام. مع الحفاظ على ظروف الظلام التام. أجريت جميع المعاملات بثلاث مكررات، وجُمعت العينات بعد 10 أيام لتحليل بقايا المبيدين، وتم تقدير النسبة المئوية للتحلل الحيوي مقارنة بمجموعة السيطرة عند كل قيمة pH (KaviKarunya & Reetha, 2012).

3.9.2.3. تأثير تركيز المبيد Effect of pesticide concentration

بهدف تقييم تأثير تركيز المبيد الابتدائي على كفاءة التحلل الحيوي تم تحضير سلسلة من أوساط MSM السائلة تحتوي على تراكيز متزايدة لكل من المبيدين (100، 200، 400) ملغم/لتر. ضبط الرقم الهيدروجيني عند 7، ووزع في دوارق حجمية سعة 250 مل. لُقحت الدوارق

المواد و طرائق العمل الفصل الثالث

الحاوية على 100 مل من الوسط بـ 1 مل من العالق البكتيري بكثافة نهائية (10^8 CFU/ml). وزعت الدوايق الى أربع مجموعات حسب التركيز وحضنت بدرجة حرارة 30 م° في حاضنة هزازة بسرعة 150 دورة/دقيقة لمدة 10 أيام. مع الحفاظ على ظروف الظلام التام. اجريت جميع المعاملات بثلاث مكررات، وُجِعت العينات بعد 10 ايام لتحليل بقايا المبيدين وحسبت النسبة المئوية للتحلل مقارنة بمجموعة السيطرة عند كل تركيز (KaviKarunya & Reetha, 2012).

10.2.3. حفظ وإدامة العزلات Storage and maintenance of isolates

تم حفظ وصيانة العزلات البكتيرية اعتمادا على ما ورد في (Sharma *et al.*, 2017) وكما يلي:

1.10.2.3. الحفظ قصير الأمد Short term preservation

لُفح وسط الأكار المغذي بالعزلات البكتيرية وحضنت عند درجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة ثم أحيطت الأطباق بشريط شمعي لاصق Parafilm لمنع جفاف الوسط الغذائي ومنع التلوث المحتمل أثناء فترة التخزين، جمعت الأطباق داخل أكياس بلاستيكية معلمة بوضوح ببيانات العزلة وتاريخ التخزين، وحفظت في الثلاجة عند درجة حرارة 4 م° لمدة شهر واحد.

2.10.2.3. الحفظ متوسط الأمد Medium term preservation

لُفح وسط الأكار المغذي المائل بالعزلات المراد حفظها ثم حضن عند درجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة، ولحماية الأنابيب من الجفاف والتلوث العرضي أثناء التخزين، تم إحكام إغلاق سدادات الأنابيب بشريط Parafilm وحفظت في الثلاجة عند درجة حرارة 4 م° ولمدة تتراوح بين 1-4 أشهر.

3.10.2.3. الحفظ طويل الأمد Long term preservation

لُفحت أنابيب حاوية على 10 ملليلتر من المرق المغذي بمقدار 0.1 ملليلتر من مزروع بكتيري عمره 4 ساعات لضمان دخول البكتيريا في مرحلة النمو السريع واللوغاريتمي، إذ حضنت

المواد و طرائق العمل الفصل الثالث

الأنابيب عند درجة حرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة للوصول إلى كثافة خلوية عالية، بعدها أخذ 1 ملليلتر من النمو البكتيري ونقل إلى أنابيب بلاستيكية معقمة ومقاومة للتجميد Cryovials حاوية على 1 ملليلتر من الـ Glycerol المعقم 40% مما ينتج عنه تركيز نهائي لـ Glycerol في الخليط يبلغ 20%، تم خلط المحتويات جيداً لضمان التوزيع المتجانس ثم حفظت عند درجة حرارة -20 م° ولمدة 6 أشهر.

11.2.3. التحليل الإحصائي Statistical analysis

أُجريت التحليلات الإحصائية باستخدام برنامج IBM SPSS Statistics (الإصدار 28). نُفذت جميع التجارب بثلاث مكررات (n=3). حُللت النتائج وعُرضت كمتوسط $\pm$ انحراف معياري (SD) وكنسب مئوية (%). استخدم تحليل التباين ثنائي الاتجاه Two-Way ANOVA Analysis of Variance عند مستوى احتمالية ($p \leq 0.05$)، لمقارنة التغيرات الحاصلة بمتغيرات المبيدين تبعاً لمتغيرات الدراسة، كما استخدم اختبار Tukey للمقارنات المتعددة ومعرفة مصدر التباين، استناداً لما جاء في Montgomery (2020). كما تم إنشاء جميع الأشكال والمخططات في الدراسة الحالية بالاعتماد على ما ورد في المصادر باستخدام برنامج BioRender (<https://www.biorender.com>).

الفصل الرابع
النتائج والمناقشة

RESULTS
and
DISCUSSION

4. النتائج والمناقشة: Results and Discussion

1.4. انتخاب البكتيريا المحللة لمبيدات الفسفور العضوية: Selection of OPs-degrading bacteria

أظهرت النتائج الموضحة في الجدول (1-4) تبايناً واضحاً في قدرة العزلات البكتيرية المنتقاة (11 عزلة) على النمو في وسط أكار الأملاح المعدنية MSM المدعم بالمبيدين (بتركيز نهائي للمادة الفعالة 100 ملغم/لتر لكل مبيد) ، وذلك خلال مدة حضانة مختلفة (24، 48، و 72 ساعة).

جدول (1-4): العزلات البكتيرية المنتخبة بعد عملية الاثراء الانتقائي

ت	رمز العزلة	اسم العزلة	النمو على اكار MSM (ساعة)		
			72	48	24
1	BS1	<i>Bacillus subtilis</i>	+++	+++	++
2	BS2	<i>Bacillus sp.</i>	++	+	--
3	LS1	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	+++	++	+
4	LS2	<i>Lysinibacillus sp.</i>	++	+	--
5	LS3	<i>Lysinibacillus sp.</i>	+	--	--
6	SM1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	+++	++	+
7	SM2	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	++	+	--
8	SM3	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	++	+	--
9	SM4	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	++	+	--
10	OA1	<i>Ochrobactrum sp.</i>	+++	++	+
11	OA2	<i>Ochrobactrum sp.</i>	++	+	--

-- لا يوجد نمو، + نمو ضعيف ، ++ نمو جيد ، +++ نمو كثيف

أشارت النتائج إلى أن العزلة (*Bacillus subtilis* (BS1 كانت الأسرع في الظهور، إذ سجلت نمواً جيداً (++) من حيث عدد المستعمرات وحجمها، خلال أول 24 ساعة كما سجلت

العزلات (*Stenotrophomonas maltophilia* (SM1)، *Ochrobactrum* sp. (OA1) و *Lysinibacillus sphaericus* (LS1) نمواً ضعيفاً (+) خلال أول 24 ساعة، وتطور هذا النمو للعزلات الأربعة ليصبح كثيفاً (+++) عند ساعات الحضانة 48 و 72 ساعة.

في المقابل، أظهرت العزلات (*Bacillus* sp. (BS1)، *Lysinibacillus* sp. (LS2)، *Stenotrophomonas* sp. (SM2)، *Stenotrophomonas* sp. (SM3) و *Ochrobactrum* sp. (OA2) نمواً بطيئاً، حيث تأخر نموها في الـ 24 ساعة الأولى (--)، ثم أظهرت نمواً ضعيفاً (+) خلال 48 ساعة، ومن ثم تحسّن تدريجياً ليصل إلى نمو جيد (++) عند الـ 72 ساعة. كما لوحظ أن العزلة *Lysinibacillus* sp. (LS3) كانت الأبطأ، إذ لم يُسجَل لها أي نمو خلال الـ 48 ساعة الأولى، بل ظهر لها نمو ضعيف (+) بعد 72 ساعة من الحضانة.

لقد أظهرت النتائج (الجدول 4-1) تبايناً في الكفاءة الحيوية للعزلات البكتيرية المعزولة من التربة الزراعية عند التعرض لتركيز ثابت من المبيدات الفوسفورية العضوية. وقد يعد النمو السريع للعزلات الأربعة (BS1، SM1، OA1 و LS1) مؤشراً أولياً على قدرتها على التمثيل الغذائي للمبيدات، وقد يعزى ذلك إلى احتمالية امتلاكها لأنظمة إنزيمية أولية، أو إلى كفاءة عالية في نقل الركيزة عبر الغشاء، أو إلى تحملها العالي للمركبات السامة، وهي صفات تم توثيقها في دراسات سابقة لأجناس *Bacillus*، *Stenotrophomonas* و *Ochrobactrum* في سياق التحلل الحيوي (El-Helow et al., 2013; Dubey & Fulekar, 2012; Abraham & Silambarasan, 2016; Das et al., 2024). إلا أنه من المهم التأكيد هنا إلى أن هذا النمو السريع لا يُعد دليلاً قاطعاً على كفاءة التحلل، بل هو مجرد انتخاب أولي، إذ قد لا ترتبط سرعة النمو دائماً بدرجة الهدم الفعلية للمبيد (Gaonkar et al., 2019).

أما بالنسبة للعزلات بطيئة النمو (BS2، SM2، SM3، SM4، OA2، LS2 و LS3) فيمكن تفسير تأخر نموها بعدة عوامل بيئية وفيزيولوجية، لعل أبرزها اختلاف معدل الانقسام الخلوي بين السلالات، حيث تحتاج بعض الأجناس مثل *Lysinibacillus* وبعض سلالات *Stenotrophomonas* إلى مدة تأقلم أطول Extended Lag phase عند نقلها من أوساط

غنية (مثل LB) إلى أوساط انتقائية فقيرة بالعناصر مثل MSM (Bhende *et al.*, 2022;) (Kosimov *et al.*, 2024). كما قد يعود السبب إلى أن بعض هذه العزلات تتبع مساراً أيضاً مختلفاً يتطلب تحفيزاً تدريجياً للإنزيمات، أو قد يكون تأثيرها بالسمية الأولية للمبيد أو نواتج هدمه الوسيطة أكبر من غيرها، وهو ما تم الإشارة إليه في دراسات سابقة عند استخدام تركيزات مرتفعة من المبيدات (Singh *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2022).

من الجدير بالذكر أن ضعف النمو في الـ 24-48 ساعة الأولى لا يشير إطلاقاً إلى أن هذه العزلات البطيئة النمو غير محللة للمبيدات عند إجراء اختبارات التحلل الكمية، فقد أظهرت بعض الدراسات أن بعض السلالات بطيئة النمو تحقق نسب تحلل جيدة بعد فترة حضانة أطول، نظراً لقدرتها على إنتاج إنزيمات هدمية مستقرة أو لامتلاكها جينات مثل *opdA* و *ophB* التي تُعبر عنها بمعدلات متأخرة ولكن بفعالية نوعية عالية (Ali *et al.*, 2012; Chino-Flores *et al.*, 2018; Iyer *et al.*, 2018).

وبناءً على هذه النتائج، فقد تم انتخاب العزلات الأربعة الأكثر كفاءة في النمو (BS1, SM1, OA1, LS1) لإجراء الاختبارات الكمية اللاحقة لتقدير كفاءة التحلل الحيوي والجينات المسؤولة، تمهيداً لتقييم إمكانية تطبيقها في استراتيجيات المعالجة الحيوية Biodegradation للترب الملوثة بالمبيدات الفسفورية العضوية، كما أوصت بذلك الدراسات الحديثة (Cycoń, 2026; Kosimov *et al.*, 2024; Ghorab *et al.*, 2026).

1.1.4. توزيع العزلات البكتيرية حسب مواقع الدراسة : Distribution of Bacterial Isolates According to Study Sites

أظهرت النتائج الموضحة في الجدول (4-2) توزيعاً غير متجانس للعزلات البكتيرية المنقاة عبر المواقع المدروسة. فقد تركز أكبر عدد من العزلات في قضاء عفك، حيث تم الحصول على 4 عزلات هي *B. subtilis*، *S. maltophilia*، *Lysinibacillus* sp. و *Stenotrophomonas* sp. وجاء في المرتبة الثانية قضاء الشامية بـ 3 عزلات هي *L. sphaericus* و عزلتين من بكتريا *Stenotrophomonas* sp.

في المقابل، سجل قضاء الحمزة الشرقي عزلتين هما *Bacillus* sp. و *Ochrabacterium* sp.، بينما سجل كل من قضاء الدغارة و قضاء السنية عزلة واحدة فقط هما *Ochrabacterium* sp. و *Lysinibacillus* sp. على التوالي. أما مركز مدينة الديوانية (المواقع S16، S17، S18) وبعض المواقع داخل الأفضية (S4، S6، S8، S9، S10 و S13) فلم يُسجل فيها أي نمو بكتيري في وسط الانتقاء، وبالتالي لم يُعزل منها أي من العزلات المدروسة.

جدول (4-2): توزيع العزلات البكتيرية المنتقاة حسب مواقع الدراسة

المنطقة	الموقع	عدد العزلات	اسم العزلة
عفك	S1	2	<i>Bacillus subtilis</i> (BS1) <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (SM1)
	S2	1	<i>Lysinibacillus</i> sp. (LS2)
	S3	1	<i>Stenotrophomonas</i> sp. (SM2)
الدغارة	S4	0	---
	S5	1	<i>Ochrabacterium</i> sp. (OA2)
	S6	0	---
السنية	S7	1	<i>Lysinibacillus</i> sp. (LS3)
	S8	0	---
	S9	0	---
الشامية	S10	0	---
	S11	2	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> (LS1) <i>Stenotrophomonas</i> sp. (SM3)
	S12	1	<i>Stenotrophomonas</i> sp. (SM4)
الحمزة الشرقي	S13	0	---
	S14	1	<i>Bacillus</i> sp. (BS2)
	S15	1	<i>Ochrabacterium</i> sp. (OA1)
الديوانية	S16	0	---
	S17	0	---
	S18	0	---

يُظهر التوزيع الجغرافي للعزلات البكتيرية المنتقاة تبايناً واضحاً في الكثافة والتنوع عبر المواقع المدروسة، وهي ظاهرة تعكس تأثير عدة عوامل بيئية وزراعية مترابطة. إن تركُّز أكبر عدد من العزلات في قضاء عفك (4 عزلات) وقضاء الشامية (3 عزلات) قد يُعزى إلى عدة أسباب محتملة. أولاً، قد يشير ذلك إلى كثافة الاستخدام الزراعي للمبيدات الفوسفورية العضوية في هذه

المناطق، مما يخلق ضغطاً انتقائياً مستمراً أدى إلى ازدهار المجتمعات البكتيرية القادرة على التكيف مع هذه الملوثات (Aislabie & Lloyd-Jones, 1995; Singh & Walker, 2006). وقد تكون هذه المناطق ذات تأريخ أطول أو أكثر كثافة في التطبيق بالمبيدات مقارنة بغيرها، مما يُعزز التنوع الحيوي للعزلات المحللة (Cycon *et al.*, 2017). ثانياً، قد تعكس هذه النتائج تبايناً في الخصائص الفيزيوكيميائية للتربة بين المواقع، مثل الرقم الهيدروجيني (pH)، والمحتوى العضوي، ونسيج التربة، والرطوبة، والتي تؤثر بشكل مباشر على توافر المبيد للتحلل الحيوي وعلى نشاط الكائنات الحية الدقيقة. فقد أشارت دراسة Singh وجماعته (2003) إلى أن الرقم الهيدروجيني للتربة يُعد عاملاً حاسماً في تحديد كفاءة التحلل الحيوي لـ Chlorpyrifos، إذ تفضل معظم البكتيريا المحللة أوساطاً متعادلة إلى قلوية قليلاً، وهو ما قد يختلف بين مناطق الدراسة. كما أن خصائص التربة مثل نسبة المادة العضوية تؤثر في امتزاز المبيدات وتقليل توفرها الحيوي (Børgesen *et al.*, 2015; Tiryaki & Temur, 2010).

أما فيما يخص غياب أي عزلات من مركز مدينة الديوانية والمواقع الأخرى فيمكن تفسيره باحتمالات عدة. أولها، أن هذه المناطق قد لا تكون تعرضت لنفس نوع المبيدات المستخدمة في الدراسة (Chlorpyrifos و Malathion) بنفس التركيز أو التواتر، أو أنها استخدمت مبيدات من مجموعات كيميائية أخرى (مثل البيروثرويدات أو الكاربامات)، مما يعني أن الضغط الانتقائي للبكتيريا المحللة للمركبات الفوسفورية لم يكن قوياً بما يكفي (Bhatt *et al.*, 2019; Huang *et al.*, 2018). ثانياً، أن الظروف البيئية في هذه المواقع (كالملوحة، أو القلوية العالية، أو نقص المغذيات الأساسية) قد تكون غير ملائمة لنمو هذه الأجناس البكتيرية، حتى في وجود المبيد كمصدر وحيد للكربون في المختبر (Kumar *et al.*, 2022). ثالثاً، وهو الأكثر ترجيحاً، أن البكتيريا الموجودة في تلك الترب كانت بحاجة إلى فترة إثراء أطول أو ظروف حضانة مختلفة (مثل درجة حرارة أو تهوية) لتظهر في وسط الانتقاء، وهو ما يفسر سبب عدم ظهورها ضمن العزلات الـ 11 المنتقاة (Adams *et al.*, 2024; Kosimov *et al.*, 2024).

من ناحية أخرى، يُظهر الجدول تنوعاً في الأجناس البكتيرية المعزولة من مناطق مختلفة، إذ ضُمَّت العزلات أجناس *Bacillus*، *Stenotrophomonas*، *Ochrobactrum*، و

Lysinibacillus، وهذا التنوع يُعد مؤشراً إيجابياً على ثراء التربة الزراعية في المنطقة بمجتمعات ميكروبية قادرة على التكيف مع الملوثات العضوية، وهي سمة تم توثيقها في العديد من النظم البيئية الزراعية حول العالم (Iyer et al., 2018; Jiang et al., 2019). كما إن وجود أكثر من جنس بكتيري في نفس الموقع (مثل الموقع S1 الذي جمع *Bacillus* و *Stenotrophomonas*) قد يوحي بوجود علاقات تآزرية محتملة بين هذه الكائنات في البيئة الطبيعية، مما قد يُعزز من كفاءة التحلل الحيوي بشكل جماعي (Efremenko et al., 2022; John et al., 2016).

وتجدر الإشارة هنا إلى أن هذا التوزيع المكاني يُعد نتاجاً لعملية انتقاء معلمي باستخدام وسط MSM، وهو لا يعكس بالضرورة الوفرة النسبية الحقيقية لهذه الأجناس في التربة الأصلية، إذ قد تكون بعض البكتيريا سريعة النمو في المختبر ولكنها أقل وفرة في الطبيعة، بينما قد تكون بكتيريا أخرى بطيئة النمو في المختبر (ولم تظهر في هذا الدراسة) هي المهيمنة فعلياً في البيئة (Castro-Gutiérrez et al., 2020). ولذا، فإن هذه النتائج تمثل غربة أولية وليست مسحاً شاملاً للمجتمع الميكروبي بأكمله. كما إن اختلاف التوزيع بين المناطق يطرح تساؤلات بحثية مثيرة قد تُستكمل في دراسات مستقبلية، مثل تحليل الخصائص الفيزيوكيميائية للتربة في كل موقع وربطها بوفرة العزلات، أو استخدام تقنيات الـ Metagenomic لاستكشاف التنوع الحقيقي للجينات المحللة في هذه الترب (Dunon et al., 2018; Nayak et al., 2020).

2.4. تشخيص العزلات البكتيرية: Diagnosis of bacterial isolates

1.2.4. الخصائص المظهرية والمجهريّة والاختبارات البيوكيميائية: Microscopic properties and biochemical tests

تم تشخيص العزلات البكتيرية المنتقاة بالاعتماد على الصفات المظهرية، والفحص المجهرى، ومجموعة من الاختبارات الكيموحيوية الأساسية، وفق الإجراءات القياسية الموصوفة في المراجع المعتمدة (Mahon & Lehman, 2019; Procop et al., 2017). وقد عرضت النتائج مفصلة في الجدول (3-4).

جدول (3-4): نتائج الاختبارات الكيموحيوية للبكتريا المحللة لمبيدات OPs

ت	العزلات البكتيرية الاختبارات	<i>Bacillus</i> sp. (n=2)	<i>Lysinibacillus</i> sp.(n=3)	<i>Stenotrophomonas</i> sp. (n=4)	<i>Ochrobacterium</i> sp.(n=2)
1	صبغة غرام Gram staining	+	+	-	-
2	شكل الخلية Cell shape	Rods	Rods	Rods	Rods
3	اختبار الكاتاليز Catalase	+	+	+	+
4	اختبار الأوكسيديز Oxidase	d	+	-	+
5	اختبار اليوريز Urease	-	+	d	+
6	تميع الجيلاتين Gelatin hydrolysis	+	+	+	-
7	اختبار الحركة Motility	+	+	+	+
8	تحلل الدم	β	γ	γ	γ
9	Indol	-	-	-	-
10	Methyl Red	-	-	-	-
11	Voges-Proskauer	+	-	-	-
12	Citrate	+	-	d	+

يشير الرمز + : النتيجة الموجبة d : النتيجة متغيرة + أو β : تحلل الدم الكامل
- : النتيجة السالبة R : عصوية γ : لا يوجد تحلل

أشارت النتائج إلى تشخيص خمس عزلات موجبة لصبغة غرام، توزعت كالتالي: عزلتان تابعتان للجنس *Bacillus* (BS1, BS2)، و ثلاث عزلات تابعة للجنس *Lysinibacillus* (LS1، LS2 و LS3)، كما تم تشخيص ست عزلات سالبة لصبغة غرام، كانت أربعة منها تابعة للجنس *Stenotrophomonas* (SM1، SM2، SM3 و SM4) وعزلتان تابعتان للجنس *Ochrobactrum* (OA1 و OA2).

تم تأكيد التشخيص الأولي، بإخضاع العزلات للتحليل باستخدام نظام VITEK 2، وهو نظام آلي يعتمد على بطاقات التعريف الميكروبي Identification cards التي تحتوي على ركائز كيموحيوية متعددة. أظهرت نتائج (جدول 4-4)، (الشكل 4-1) و (الملحق 1) تطابقاً عالياً مع التشخيص المظهري، حيث تراوحت نسب الثقة Confidence level بين 86-99%،

النتائج والمناقشة الفصل الرابع

وتراوحت مستويات التقييم بين "مقبول" Acceptable و "ممتاز" Excellent. وقد أكد النظام تشخيص العزلات وفق التوزيع المذكور أعلاه، مع تسجيل أعلى نسبة ثقة (99%) للعزلة *S. maltophilia* (SM1)، وادني نسبة ثقة كانت (86%) للعزلة *Lysinibacillus* sp. (LS2).

جدول (4-4): نتائج تشخيص العزلات البكتيرية باستخدام نظام VITEK 2

رمز العزلة	العزلة البكتيرية	مستوى الثقة	القيمة الاحتمالية
BS1	<i>Bacillus subtilis</i>	% 94	Very good
BS2	<i>Bacillus subtilis</i>	% 91	Good
LS1	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	% 91	Very good
LF1	<i>Lysinibacillus</i> sp.	% 90	Good
LF2	<i>Lysinibacillus</i> sp.	% 86	Acceptable
SM1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	% 99	Excellent
SM2	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	% 95	Very good
SM3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	% 95	Very good
SP1	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	% 90	Good
OA1	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	% 93	Very good
OA2	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	% 91	Good

bioMérieux Customer:

Microbiology Chart Report

Printed February 16, 2026 9:19:14 AM CST

Patient Name: iliaz, abd

Patient ID: 202614217

Location:

Physician:

Lab ID: 202614217

Isolate Number: 1

Organism Quantity:

Selected Organism : *Stenotrophomonas maltophilia*

Source:

Collected:

Comments:

Identification Information

Analysis Time: 5.12 hours

Status: Final

Selected Organism

99% Probability

Stenotrophomonas maltophilia

Barcode:

6008201170391001

ID Analysis Messages

Biochemical Details

2	APPA	+	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCIL	-	9	BGAAL	-
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLp	-	13	dGLU	+	14	GGT	+	15	OPF	+
17	BGLU	(+)	18	dMAL	-	19	dMAN	-	20	dMNE	+	21	BXYL	+	22	BALap	+
23	ProA	+	26	LIP	+	27	PLE	+	29	TyrA	+	31	URE	+	32	dSOR	+
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	-	36	CIT	-	37	MNT	+	39	SKG	-
40	ILATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	+	44	ACAL	-	45	PHOS	+
46	GlyA	-	47	ODC	-	48	LDC	-	51	BH5a	-	56	CMT	-	57	BGLR	-
58	D129R	-	59	GGAA	-	61	MLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

الشكل (4-1): نتائج تحليل VITEK 2 للعزلة *Stenotrophomonas maltophilia* (SM1)

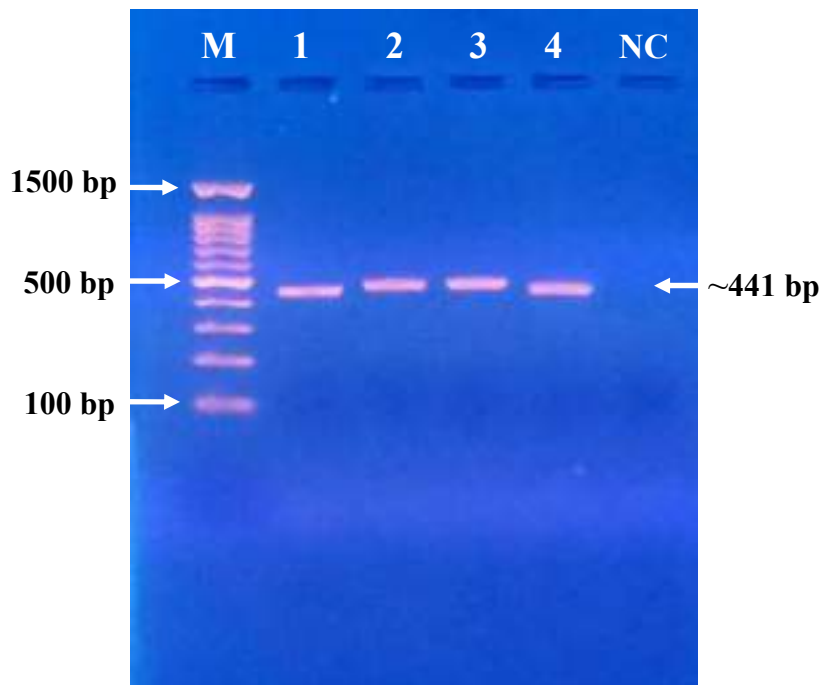
يتوافق تواجد العزلات البكتيرية المنتقاة في هذه الدراسة مع العديد من الدراسات السابقة التي أكدت على شيوع هذه الأجناس في التربة الزراعية، خاصة تلك المعرضة للضغوط الانتقائية للمبيدات. فقد أشارت دراسة Ishag وزملائه (2016) إلى عزل *B. subtilis* من تربة زراعية ذات تاريخ طويل في استخدام المبيدات في السودان، كان لها القدرة على تحلل مبيدي الـ Chlorpyrifos و Malathion بنسبة 89% و 80% على التوالي خلال 30 يوماً. كما عزل Adams وزملاؤه (2024) العزلة *Bacillus* sp. UPMB10 من تربة زراعية في نيجيريا وأظهرت كفاءة تحليل استثنائية لمبيد الـ Chlorpyrifos بلغت 99% خلال 48 ساعة. أما بالنسبة لجنس *Lysinibacillus*، فقد أشارت دراسة Asamba وزملائه (2022) إلى عزل *Lysinibacillus* sp. HBUM206408 من تربة مزارع ألبان ملوثة الـ Chlorpyrifos في كينيا، وسجلت نسبة تحليل بلغت 87.16% خلال 16 يوماً. كما استطاع Marei وزملاؤه (2018) عزل بكتريا *Lysinibacillus sphaericus* YMM من مياه الصرف الزراعي لمدينة البحيرة في مصر، ذات كفاءة عالية في تحليل مبيد الـ Malathion بنسبة وصلت إلى 98.974% خلال 24 ساعة.

وفيما يتعلق بجنس *Stenotrophomonas*، فقد عزل Estrada-Gamboa وزملاؤه (2023) العزلة *S. maltophilia* من تربة زراعية في كوستريكا باستخدام الـ Chlorpyrifos كمصدر وحيد للكربون. كما عزلت دراسة Harshitha وزملائه (2024) العزلة *S. maltophilia* CAB5 من حقل زراعي ملوث بشدة بمبيد Monocrotophos في الهند، وأظهرت قدرتها على تحمل تركيزات عالية من المبيد تصل إلى 1000 جزء في المليون. كما قام Tang وزملاؤه (2026) بعزل بكتريا *S. pavanii* من تربة زراعية في الصين حققت نسبة تحليل 85.8% لمبيد الـ Malathion. أما جنس *Ochrobactrum*، فقد أظهرت دراسة Alba وزملائها (2022) قدرة العزلة *O. anthropi* CD3 المعزولة من تربة زراعية كانت معالجة بمبيد الـ Chlorpyrifos في اسبانيا، على إزالة كاملة لأربعة مبيدات هي Diuron، Linuron، و Chlorotoluron و Fluometuron. كما عزل Verma وزملاؤه (2021) بكتريا *Ochrobactrum* sp. M1D من عينة تربة من بساتين الخوخ في الهند، قادرة على تحليل 100% من الـ Malathion بتركيز 100 ملغم/ لتر في وسط ملحي بسيط عند درجة حرارة 20 م° و pH 7 خلال 12 يوماً.

2.2.4. التشخيص الجزيئي باستخدام تسلسل جين 16S rRNA : Molecular Diagnosis using 16S rRNA Gene Sequencing

1.2.2.4 الكشف عن جين 16S rRNA : Detection of the 16S rRNA gene

لتأكيد الهوية الجينية للعزلات البكتيرية المنتقاة، تم استخلاص الحمض النووي الريبوزي منقوص الأكسجين DNA من العزلات الأربعة الأكثر كفاءة (*Bacillus subtilis* (BS1)، *Ochrobactrum* sp. (OA1)، *Lysinibacillus sphaericus* (LS1) و *Stenotrophomonas maltophilia* (SM1)، وإجراء تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR) باستخدام بادئات عامة Universal primers تستهدف تضخيم جزء من جين 16S rRNA، وهو الجين المعياري المستعمل في التصنيف البكتيري. وأظهرت نتائج الترحيل الكهربائي (الشكل 4-2) وجود حزم واضحة ومحددة عند حجم (~441) زوج قاعدي ولجميع العزلات الأربعة، بينما خلت عينة السيطرة السالبة (NC) negative control من أي حزمة، مما يؤكد نجاح عملية التضخيم وخلو الكواشف من أي تلوث جيني.



الشكل (4-2): الترحيل الكهربائي على هلام الأغاروز (2%) لنواتج تضخيم جين 16S rRNA (100 فولت، 70 ملي أمبير، 45 دقيقة) M: سلم الحمض النووي 100bp، 1: *B. subtilis*، 2: *S. maltophilia*، 3: *Ochrobactrum* sp.، 4: *L. sphaericus*، NC: سيطرة سالبة.

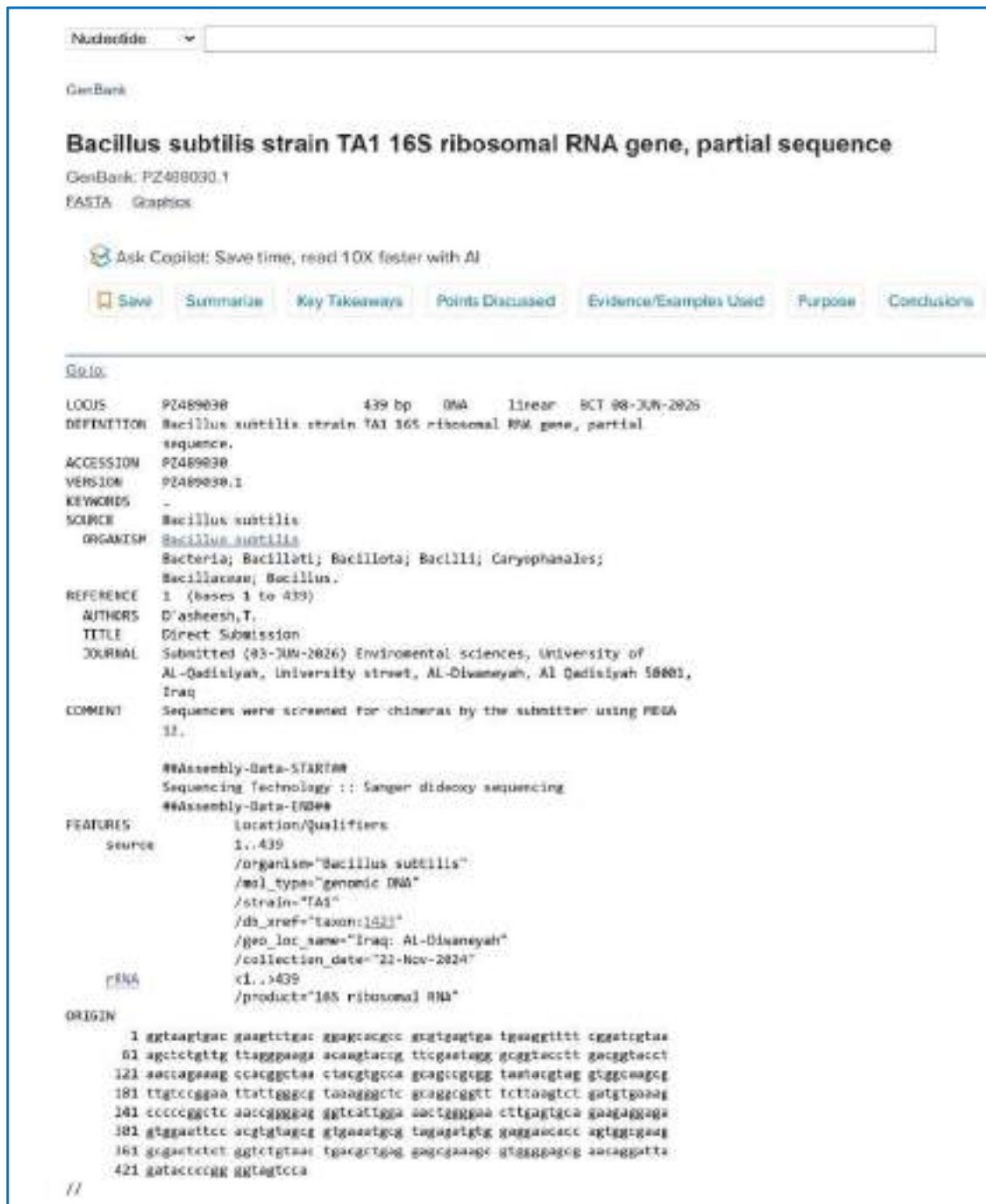
2.2.2.4. تحليل تسلسلات جين *16S rRNA* وبناء الشجرة التطورية:

أظهرت نتائج تحليل التسلسلات Sequencing reads المتحصل عليها من تقنية سانجر Sanger sequencing لنواتج تضخيم جين *16S rRNA* للعزلات الأربعة قيد الدراسة، ومقارنتها مع التسلسلات المسجلة في بنك الجينات العالمي NCBI GenBank باستخدام أداة BLAST، تطابقاً عالياً بين عزلات الدراسة والعزلات العالمية، حيث تراوحت النسبة المئوية للتماثل Percent Identity بين 99.12% و 100%، مع تغطية استعلام Query Coverage كاملة (100%) لثلاث عزلات *L. sphaericus*، *S. maltophilia* و *Ochrobactrum sp.*، في حين كانت 98% للعزلة *B. subtilis* بقيمة توقع E value صفرية (0.0) لجميع العزلات، مما يؤكد دقة المطابقة (جدول 4-5).

جدول (4-5): قيم تطابق BLAST وأرقام الوصول لأقرب العزلات العالمية مع عزلات الدراسة.

رقم الانضمام للعزلة NCBI في الأقرب	طول التسلسل Access Length	% للتماثل Percent Identity	قيمة التوقع E- value	تغطية التسلسل الاستعلامي Query Coverage	الدرجة الكلية Total Score	أقصى درجة Max Score	رقم الانضمام (Accession) لعزلات الدراسة الحالية
<i>B. subtilis</i> OP363232	439	99.53%	0.0	98%	780	780	<i>B. subtilis</i> PZ489030
<i>L. sphaericus</i> KF453777	458	99.12%	0.0	100%	821	821	<i>L. sphaericus</i> PZ489022
<i>S. maltophilia</i> PX206033	444	100%	0.0	100%	821	821	<i>S. maltophilia</i> PZ489031
<i>Ochrobactrum sp.</i> EF028273	431	99.77%	0.0	100%	789	789	<i>Ochrobactrum sp.</i> PZ489026

تم إيداع التسلسلات الجينية لجميع العزلات الأربعة في بنك الجينات العالمي NCBI GenBank، وقد تم منح العزلات الأربعة *B. subtilis*، *L. sphaericus*، *S. maltophilia* و *Ochrobactrum sp.* أرقام الانضمام Accession number التالية: (PZ489030)، (PZ489022، PZ489031 و PZ489026)، وعلى التوالي (جدول: 4-5). ويوضح الشكل (3-4) صفحة العزلة *B. subtilis* BS1 على موقع NCBI، والتي تتضمن معلومات التسلسل ورقم الانضمام PZ489030، بينما توجد صفحات باقي العزلات في الملحق (2).

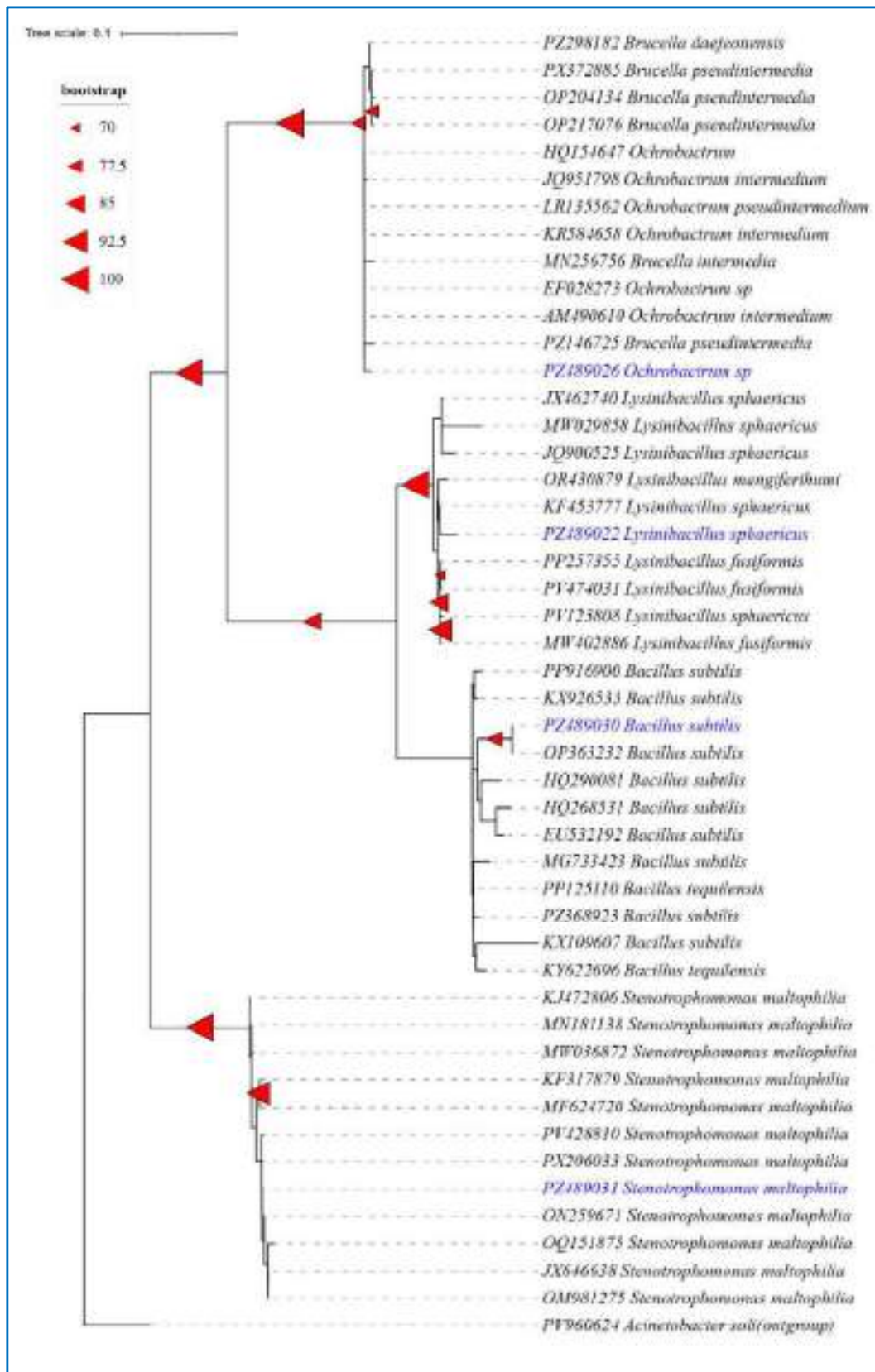


الشكل (3-4): صفحة تسجيل العزلة *Bacillus subtilis* BSI في GenBank على موقع NCBI، موضحة رقم الانضمام PZ489030 ومعلومات التسلسل المسجلة.

يُعد تحليل تسلسل جين *16S rRNA* المعيار الذهبي Gold standard في التصنيف البكتيري الحديث (Scholz *et al.*, 2008; Mori *et al.*, 2014). وقد أكدت نتائج تحليل BLAST هوية العزلات المدروسة، حيث تجاوزت نسبة التماثل لجميع العزلات 99%، وهي النسبة المعتمدة عالمياً لتأكيد الانتماء إلى النوع (Stackebrandt & Ebers, 2006). إن تطابق تسلسلات عزلات الدراسة الحالية مع عزلات عالمية مسجلة في بنوك الجينات يؤكد دقة التشخيص

الجزئي. وتتفق هذه النتائج مع العديد من الدراسات السابقة التي استخدمت تسلسل جين *16S rRNA* لتشخيص العزلات المحللة للمبيدات من التربة الزراعية (El-Helow *et al.*, 2013; Asamba *et al.*, 2022; Abraham & Silambarasan, 2016). كما أن إيداع التسلسلات في بنك الجينات العالمي تحت أرقام انضمام مميزة يُعد إسهاماً علمياً قيماً، يتيح للباحثين الآخرين الوصول إلى هذه التسلسلات ومقارنتها مع عزلاتهم، مما يعزز من قيمة البحث ويسهم في إثراء قاعدة البيانات العالمية للجينات البكتيرية (Castro-Gutiérrez *et al.*, 2020; Iyer *et al.*, 2018). كما أن توفر هذه التسلسلات في قاعدة بيانات NCBI سيسهل العمل على الدراسات المستقبلية التي تهدف إلى استخدام هذه العزلات في المزيد من أبحاث المعالجة الحيوية في المنطقة.

وضع التحليل التطوري (الشكل 4-4)، الذي تم بناؤه باستخدام طريقة الاحتمالية القصوى Maximum Likelihood مع 100 تكرار Bootstrap، عزلتنا الأربع في فروع متميزة تُطابق أجناس *Bacillus*، *Lysinibacillus*، *Stenotrophomonas* و *Ochrobactrum*. إذ تجمعت عزلة *Bacillus subtilis* (PZ489030) بشكل وثيق مع العديد من السلالات المرجعية لـ *Bacillus subtilis*، كما تم تجميع العزلة *Lysinibacillus sphaericus* (PZ489022) ضمن فرع متميز مع سلالات *Lysinibacillus sphaericus* و *Lysinibacillus fusiformis*. وأظهرت عزلة *Stenotrophomonas maltophilia* (PZ489031) فرعاً مميزاً يحتوي على العديد من التسلسلات المرجعية لـ *Stenotrophomonas maltophilia*. أخيراً، تم تجميع *Ochrobactrum* sp. (PZ489026) داخل فرع يضم كلاً من أنواع *Ochrobactrum* و *Brucella*، مما يعكس التقارب التطوري الوثيق بين هذين الجنسيتين. وقد ساعدت المجموعة الخارجية Outgroup المستخدمة في هذه الدراسة، وهي بكتيريا *Acinetobacter soli* (رقم الانضمام: PV960624.1)، في تأصيل الشجرة التطورية وتحديد اتجاه التفرعات. وأظهرت الشجرة تجمع العزلات المدروسة مع التسلسلات المرجعية ذات الصلة في مجموعات أحادية النمط Monophyletic Clades، مع قيم دعم إحصائي Bootstrap لهذه المجموعات بين 70-100%، مما يدعم على مستوى الجنس.



الشكل (4-4): الشجرة الوراثية التطورية المبنية على تسلسلات جين *16S rRNA*. تم بناء الشجرة باستخدام طريقة الاحتمالية القصوى Maximum Likelihood، تم تقييم قوة العقد باستخدام 100 تكرار Bootstrap، تم إظهار قيم الدعم التي تزيد عن 70% فقط على الفروع. تم استخدام *PV960624.1 Acinetobacter soli* كمجموعة خارجة Outgroup. العزلات باللون الأزرق تمثل عزلات الدراسة الحالية.

أظهر التحليل التطوري بوضوح أن كل عزلة من عزلات الدراسة تنتمي إلى فرع منفصل يتوافق مع جنسها الخاص: *Bacillus*، *Lysinibacillus*، *Ochrobactrum*، و *Stenotrophomonas*. وكانت قيم الدعم الإحصائي bootstrap لهذه المجموعات عالية، مما يعزز الثقة في تحديد الجنس. ومن الجدير بالذكر أن عزلة *Ochrobactrum* sp. (PZ489026) لدينا تقع ضمن فرع حيوي يضم أيضاً أنواعاً من جنس *Brucella*. وهذا ليس أمراً مستغرباً، إذ من المعروف أن هذين الجنسيتين يتشاركان درجة عالية من التشابه في تسلسل جين *16S rRNA* (Scholz et al., 2008). إضافةً إلى ذلك، فإن ضبط درجة حرارة التلدين لتفاعل الـ PCR عند 61.8 م° يضمن خصوصية التضخيم، وهو أمر بالغ الأهمية لمنع تكوّن تسلسلات هجينة في إعادة بناء العلاقات التطورية (Harringer & Alfrieder, 2021).

وبناءً على التشخيص المظهري، والمجهري، والكيموحيوي، ونظام VITEK2 و التسلسل الجزيئي لجين *16S rRNA* وتحليل BLAST، والتحليل التطوري تم تحديد هذه العزلات مبدئياً على أنها *B. subtilis* (مرتبطة ارتباطاً وثيقاً بـ *B. subtilis*؛ رقم الوصول OP363232)، *S. maltophilia* (مرتبطة ارتباطاً وثيقاً بـ *S. maltophilia*؛ رقم الوصول PX206033)، *L. sphaericus* (مرتبطة ارتباطاً وثيقاً بـ *L. sphaericus*؛ رقم الوصول KF453777)، و *Ochrobactrum* sp. (مرتبطة ارتباطاً وثيقاً بـ *Ochrobactrum* sp.؛ رقم الوصول EF028273).

3.4. تقييم كفاءة التحلل:

1.3.4. التحلل الحيوي لمبيد الـ Chlorpyrifos:

بينت النتائج (جدول 4-6) أن بكتيريا *B. subtilis* كانت الأعلى كفاءة في التحلل الحيوي لمبيد الـ Chlorpyrifos، إذ انخفض تركيز المبيد المتبقي تدريجياً من القيمة الأولية (100 ملغم/ لتر) ليصل إلى 0.110 ± 2.172 ملغم/لتر عند اليوم العاشر، محققةً بذلك أعلى نسبة تحلل بلغت 97.828%. كما أظهرت بكتيريا *S. maltophilia* و *Ochrobactrum* sp. نسب تحلل بلغت

النتائج والمناقشة الفصل الرابع

(95.998% و 93.043%) على التوالي، بينما سجلت بكتريا *L. sphaericus* اقل معدل تحلل إذ بلغ التركيز المتبقي 0.181 ± 11.024 ملغم/لتر عند اليوم العاشر وبنسبة تحلل بلغت (88.976%). احتفظت العينة الضابطة (بدون بكتريا) بـ 98.509 ملغم/ لتر من تركيز الـ Chlorpyrifos الأولي بعد 10 أيام، مما يدل على أن التحلل غير الحيوي abiotic degradation في ظل الظروف التجريبية ضئيل للغاية. وقد أكدت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق ذات دلالة إحصائية بين العزلات البكتيرية وبين الأيام عند مستوى معنوية ($p \leq 0.05$) ملحق (9).

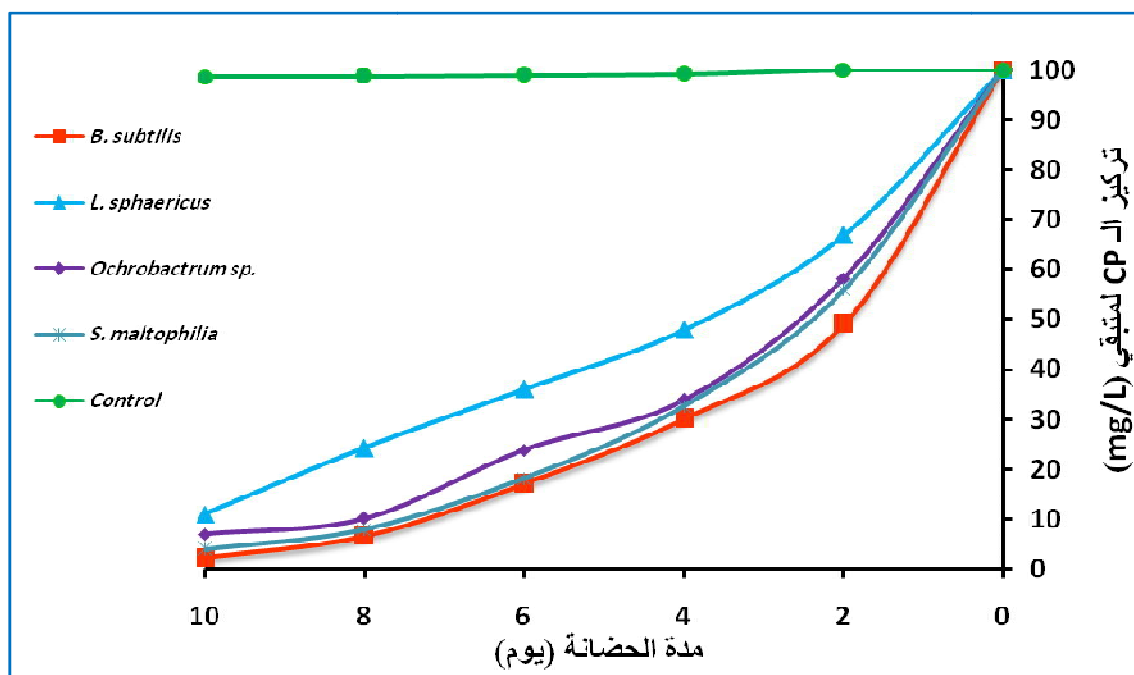
جدول (4-6): التركيز المتبقي لمبيد الـ Chlorpyrifos خلال مدة حضن 10 أيام

المعدل	اليوم 10 S.D±mg/L التركيز (% للتحلل)	اليوم 8 S.D±mg/L التركيز (% للتحلل)	اليوم 6 S.D±mg/L التركيز (% للتحلل)	اليوم 4 S.D±mg/L التركيز (% للتحلل)	اليوم 2 S.D±mg/L التركيز (% للتحلل)	مدة الحضن نوع البكتريا
17.612 ± 21.003^a (%78.997)	0.110 ± 2.172 (%97.828)	0.401 ± 6.622 (%93.378)	0.331 ± 17.086 (%82.914)	0.545 ± 30.053 (%69.947)	0.370 ± 49.081 (%50.919)	<i>B. subtilis</i>
19.910 ± 37.210^b (%62.790)	0.181 ± 11.024 (%88.976)	0.272 ± 24.246 (%75.754)	0.134 ± 35.980 (%64.020)	0.198 ± 47.931 (%52.069)	0.147 ± 66.869 (%33.131)	<i>L. sphaericus</i>
19.190 ± 26.605^c (% 73.395)	0.382 ± 6.957 (% 93.043)	0.195 ± 10.120 (% 89.880)	0.355 ± 23.855 (% 76.145)	0.361 ± 33.863 (%66.137)	0.317 ± 58.230 (%41.770)	<i>Ochrobactrum sp.</i>
19.558 ± 23.715^d (%76.285)	0.282 ± 4.002 (%95.998)	0.230 ± 7.956 (%92.044)	0.362 ± 18.133 (%81.867)	0.672 ± 32.544 (%67.456)	0.251 ± 55.941 (%44.059)	<i>S. maltophilia</i>
0.523 ± 99.053^e (% 0.947)	0.009 ± 98.509 (% 1.491)	0.066 ± 98.725 (% 1.275)	0.016 ± 98.916 (% 1.084)	0.054 ± 99.149 (% 0.851)	0.006 ± 99.969 (% 0.031)	Control
33.841 ± 41.517 (%58.483)	38.412 ± 24.533^e (%75.467)	36.400 ± 29.534^d (%70.466)	31.884 ± 38.794^c (%61.206)	26.893 ± 48.708^b (%51.292)	18.532 ± 66.018^a (%33.982)	المعدل

* S.D = الانحراف المعياري Standard Deviation
- المعدلات التي لها نفس الحرف لا يوجد بينها فروق معنوية عند مستوى دلالة (≥ 0.05) وفقاً لاختبار Tukey.

كشفت حركات التحلل (الشكل 4-5) إن معدلات التحلل كانت أسرع ما يمكن خلال اليومين الأولين، إذ بلغت نسبة التحلل (40-50%) لبكتريا *B. subtilis*، *S. maltophilia* و *Ochrobactrum sp.* في المقابل، كانت معدلات التحلل أبطأ مع بكتريا *L. sphaericus*، إذ لم تحلل سوى (33.131%) من المبيد خلال اليومين الأولين، لكنها استمرت في التحلل بثبات خلال الأيام الثمانية المتبقية. عموماً، أظهرت جميع العزلات البكتيرية معدلات تحلل تراكمية

متصاعدة طوال العشرة أيام، بينما لم تُلاحظ سوى تغييرات طفيفة في المجموعة الضابطة غير الحية.



الشكل (4-5): التغير الزمني لتركيز الـ Chlorpyrifos المتبقي لعزلات الدراسة ومجموعة السيطرة

تُظهر النتائج (جدول 4-6) (الشكل 4-5) التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة تقوياً ملحوظاً للعزلات البكتيرية المنتقاة في تحليل الـ Chlorpyrifos، حيث تراوحت نسب التحلل بين (88.976%-97.828%) خلال 10 أيام من الحضانه. فبالنسبة للعزلة *Bacillus subtilis* التي سجلت أعلى نسبة تحلل (97.828%)، نجد أن هذه النتيجة تتفق مع ما أشار إليه El-Helow وآخرون (2013) أن سلالة *Bacillus subtilis* Y242 المعزولة من التربة تتميز بكفاءة تحلل بيولوجي عالية لمبيد الـ Chlorpyrifos. وقد تمكنت هذه السلالة من تحطيم 95.12% من تركيز المبيد البالغ 150 ملغم/ لتر في وسط سائل خلال 48 ساعة فقط، ولكنها تتفوق بشكل ملحوظ على ما سجله Lakshmi وآخرون (2008)، إذ بلغت نسبة التحلل لعزلتهم *Bacillus subtilis* D119 (84%) بعد 20 يوماً. وفي المقابل، نلاحظ أن نسب التحلل التي سجلتها العزلة *L. sphaericus* قيد الدراسة (88.976%)، كانت متقنة مع ما أوجده Asamba

وآخرون (2022) من قدرة عزلتهم *Lysinibacillus* sp. HBUM206408 على تحلل المبيد الـ Chlorpyrifos بنسبة (87.16%) خلال 16 يوماً.

أما قابلية العزلة *S. maltophilia* على تحليل (95.998%) من مبيد الـ Chlorpyrifos في الدراسة الحالية، فهي تتفق مع ما لاحظته Asamba وزملاؤه (2022) من قدرة *S. maltophilia* على تحقيق تحلل الـ Chlorpyrifos، ولكنها تفوقت على ما توصلوا إليه من نسبة تحلل (82.04%) خلال 16 يوماً، كما اتفقت مع ما أشار إليه Bhende وآخرون (2024) من أن عزلتهم *Stenotrophomonas maltophilia* RNC7 حلت (77.1%) من المبيد خلال 5 أيام، وفيما يتعلق بالعزلة *Ochrobactrum* sp. قيد الدراسة والتي استطاعت تحليل (93.043%) من مبيد الـ Chlorpyrifos، نجد أنها تتفوق على ما أشار إليه Akbar و Sultan (2016)، إذ حققت عزلتهم *Ochrobactrum* sp. FCp1 نسبة تحلل (78.6%) خلال 10 أيام.

2.3.4. التحلل الحيوي لمبيد الـ Malathion:

فيما يخص كفاءة العزلات المنتقاة في تحليل مبيد الـ Malathion، فقد أظهرت النتائج في الجدول (4-7) تبايناً ملحوظاً في ترتيب الكفاءة مقارنة بما سُجل مع الـ Chlorpyrifos، حيث أظهرت بكتيريا *L. sphaericus* أعلى معدل تحلل للمبيد، إذ حلت (94.141%) من الـ Malathion الابتدائي 100 ملغم/لتر بحلول اليوم العاشر، ولم يتبق سوى 0.508 ± 5.859 ملغم/لتر. كما حلت العزلتان *B. subtilis* و *Ochrobactrum* sp. (92.666%، 87.910%) من المبيد وعلى التوالي، وجاءت العزلة *S. maltophilia* في المرتبة الأخيرة بأقل نسبة تحلل بلغت (84.547%) وتركيز متبقي 0.429 ± 15.453 ملغم/لتر. وكما هو متوقع، كانت المجموعة الضابطة غير الحيوية مستقرة طوال فترة الحضانة، ولم يتجاوز التحلل غير الحيوي (1.823%) بعد 10 أيام. وقد أكدت نتائج التحليل الإحصائي على وجود فروق ذات دلالة إحصائية بين العزلات البكتيرية وبين الأيام عند مستوى معنوية ($p \leq 0.05$) ملحق (10).

جدول (4-7): التركيز المتبقي لمبيد الـ Malathion خلال مدة حضن 10 أيام

المعدل	اليوم 10 S.D±mg/L التركيز (% للتحلل)	اليوم 8 S.D±mg/L التركيز (% للتحلل)	اليوم 6 S.D±mg/L التركيز (% للتحلل)	اليوم 4 S.D±mg/L التركيز (% للتحلل)	اليوم 2 S.D±mg/L التركيز (% للتحلل)	مدة الحضن نوع البكتريا
15.651±25.843 ^a (% 74.157)	0.306±7.334 (% 92.666)	0.609±16.442 (% 83.558)	1.022±20.757 (% 79.243)	0.604±33.970 (% 66.030)	0.820±50.713 (% 49.287)	<i>B. subtilis</i>
14.392±22.149 ^b (% 77.851)	0.508±5.859 (% 94.141)	0.981±12.453 (% 87.547)	0.636±18.099 (% 81.901)	0.751±28.869 (% 71.131)	0.956±45.463 (% 54.537)	<i>L. sphaericus</i>
14.650±30.310 ^c (% 69.690)	0.350±12.090 (% 87.910)	1.184±21.606 (% 78.394)	0.225±27.855 (% 72.145)	0.275±36.200 (% 63.800)	0.422±53.801 (% 46.199)	<i>Ochrobactrum sp.</i>
17.585±39.119 ^d (% 60.881)	0.429±15.453 (% 84.547)	0.301±28.178 (% 71.822)	0.444±37.285 (% 62.715)	0.444±50.430 (% 49.570)	0.341±64.249 (% 35.751)	<i>S. maltophilia</i>
0.534±98.801 ^e (% 1.199)	0.049±98.177 (% 1.823)	0.209±98.440 (% 1.560)	0.197±98.723 (% 1.277)	0.042±99.071 (% 0.929)	0.248±99.596 (% 0.404)	Control
31.612±43.245 (%56.755)	36.605±27.783 ^e (%72.217)	33.072±35.424 ^d (%64.576)	30.890±40.544 ^c (%59.456)	26.602±49.708 ^b (%50.292)	20.098±62.765 ^a (%37.235)	المعدل

* S.D = الانحراف المعياري Standard Deviation
- المعدلات التي لها نفس الحرف لا يوجد بينها فروق معنوية عند مستوى دلالة (≥ 0.05) وفقاً لاختبار Tukey.

يوضح الجدول (4-7) و الشكل (4-6) أن معظم التحلل حدث خلال 48 ساعة من

التحضير، مع تباطؤ تدريجي بعد ذلك وهو مماثل للنمط الحركي لتحلل مبيد الـ Chlorpyrifos.

أظهرت العزلات *L. sphaericus*، *B. subtilis* و *Ochrobactrum sp.* تحللاً سريعاً، حيث

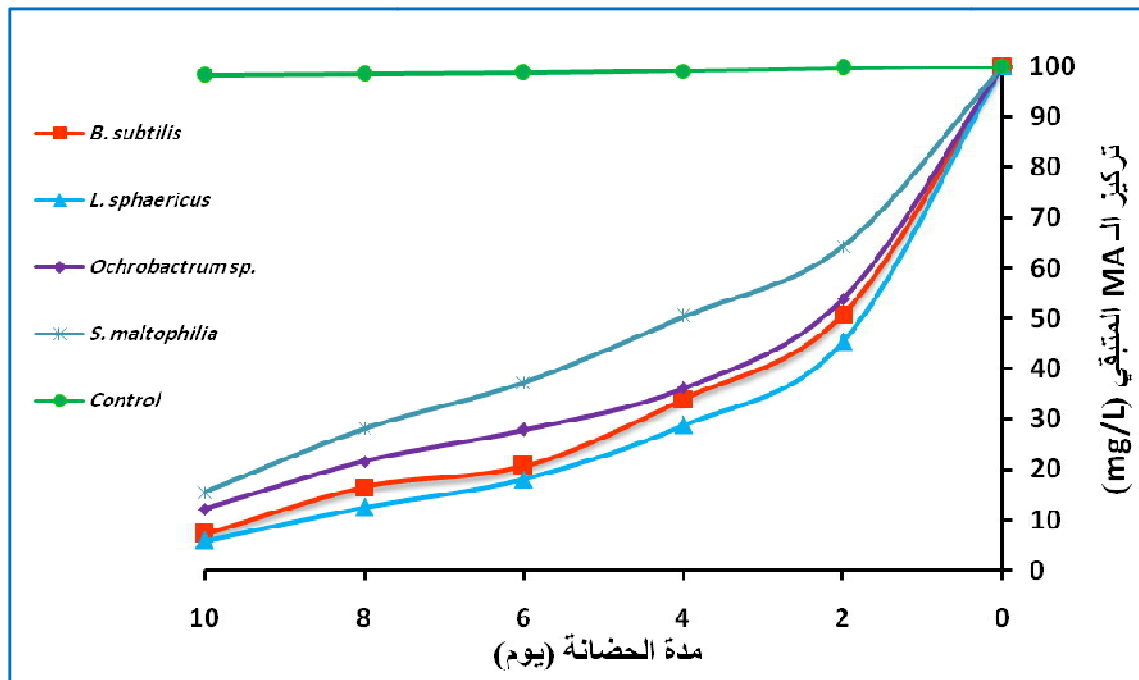
حققت تحلل بنسبة (54.537%، 49.287% و 46.199%) على التوالي، بينما اظهرت العزلة *S.*

maltophilia معدل تحلل ابتدائي أبطأ، إذ حلت الـ Malathion بنسبة (35.751%) خلال أول

48 ساعة. لكنها استمرت في التحلل المتصاعد طوال مدة العشرة أيام. في حين لم يُسجل بالعينة

الضابطة سوى تحلل بسيط جداً بلغ (1.823%) بعد 10 أيام، مما يؤكد استقرار المبيد في غياب

النشاط الحيوي.



الشكل (4-6): التغير الزمني لتركيز الـ Malathion المتبقي بفعل التحلل الحيوي لعزلات الدراسة مقارنة مع مجموعة السيطرة

تُظهر النتائج (جدول 4-7) و (الشكل 4-6) أن عزلات الدراسة كانت ذات كفاءة ملحوظة في تحلل مبيد الـ Malathion، إذ تراوحت نسب التحلل بين (84.547%-94.141%) خلال 10 أيام من الحضانه. فبالنسبة للعزلة *L. sphaericus* التي سجلت أعلى نسبة تحلل (94.141%)، اتفقت النتيجة مع ما سجله Marei وزملاؤه (2019) من أن عزلتهم *L. sphaericus* YMM حققت نسبة تحلل بلغت (98.974%) لـ Malathion خلال 24 ساعة فقط، مما قد يشير إلى أن كلا العزلتين تمتلكان كفاءة إنزيمية عالية، وإن كانت العزلة *L. sphaericus* YMM أسرع بكثير في تحقيق هذه النسبة. وفي المقابل، تفوقت عزلتهم *L. sphaericus* في هذه الدراسة بشكل كبير على ما وجدته Singh وزملاؤه (2012)، حيث حققت عزلتهم *Lysinibacillus sp.* KB1 نسبة تحلل بلغت (20%) فقط، أما فيما يتعلق بالعزلة *B. subtilis* (92.666%)، فهي أعلى مما سجله Ishag وزملاؤه (2016) من قدرة بكتيريا *B. subtilis* على تحقيق تحلل لـ Malathion بنسبة (80%) خلال 30 يوماً. وبالنسبة لعزلات السالبة لصبغة غرام المنتقاة في الدراسة الحالية، فنجد أن العزلة *Ochrobactrum sp.* (87.910%) كانت أقل من نسبة التحلل (100%) التي وجدها Verma وزملاؤه (2021)

لعزلتهم *Ochrobactrum* sp. بينما العزلة *S. maltophilia* التي سجلت نسبة تحلل (84.54%) في الدراسة الحالية لمبيد الـ Malathion، فقد كانت اقل مما سجله Hernández وجماعته (2021) لعزلتهم *S. maltophilia* التي بلغت نسبتها (98.23%) في دراسة أجريت على التربة.

يمكن إرجاع هذا التباين الملحوظ بين نتائج هذه الدراسة وبين تلك النتائج التي أشارت إليها الدراسات السابقة إلى عوامل رئيسة محتملة مترابطة. أولاً، الاختلاف في الظروف التجريبية والبيئة الأصلية للعزلات، إذ تؤثر درجة الحرارة، والرقم الهيدروجيني، والتركيز الأولي للمبيد بشكل حاسم في النشاط الإنزيمي ومعدل النمو (Farhan et al., 2021; Kumar et al., 2022). كما أن العزلات المعزولة من تربة ذات تاريخ طويل في التعرض للمبيدات (كما في هذه الدراسة) تكون أكثر كفاءة بسبب الضغط الانتقائي المستمر الذي يعزز انتشار الجينات المسؤولة عن التحلل (Castro-Gutiérrez et al., 2020; Dunon et al., 2018)، ثانياً، التباين في التركيب الجيني ومستوى التعبير الإنزيمي، إذ تختلف السلالات في امتلاكها لجينات تحلل مثل *opd*، *ophB*، أو *mpd*، وفي قدرتها على التعبير عنها بشكل بنائي أو محفز، مما يؤثر في سرعة ودرجة التحلل (Ali et al., 2012; Barman et al., 2014; Chino-Flores et al., 2012). ثالثاً، اختلاف قدرة العزلات على إزالة سمية النواتج الوسيطة مثل 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP) الناتج من تحلل مبيد الـ Chlorpyrifos و Malaoxon الناتج من تحلل مبيد Malathion، إذ قد تؤدي قدرتها على تفكيك هذه النواتج إلى تجنب التثبيط المبكر للإنزيمات واستمرار التحلل (Singh et al., 2003; Abraham & Silambarasan, 2016; Bhende et al., 2022). رابعاً، اختلاف المنهجية التحليلية وطبيعة الوسط التجريبي (سائل مقابل تربة)، حيث تؤثر دقة طرق التقدير (GC-MS، HPLC، UV-Vis) وعمليات الاستخلاص، وكذلك ظاهرة الامتزاز في التربة، على النسب المئوية المسجلة للتحلل (Zalat et al., 2014; Børgesen et al., 2015).

على الرغم من خضوع جميع العزلات الأربعة المنتقاة في الدراسة الحالية للظروف التجريبية نفسها من حيث تركيز المبيد، ودرجة الحرارة، والرقم الهيدروجيني، وسرعة الدوران، ومدة الحضانة، إلا أن نسب التحلل تراوحت ما بين (88.976%-97.828%) لمبيد الـ Chlorpyrifos و (84.547%-94.141%) لمبيد الـ Malathion. ويعود هذا التباين الواضح في الكفاءة إلى عوامل جوهرية متأصلة في كل سلالة، لعل أبرزها:

أولاً: الاختلاف في المحتوى الجيني والتعبير الإنزيمي. إذ تختلف العزلات في امتلاكها للجينات المسؤولة عن التحلل مثل *opd*، *ophB*، و *mpd*، وكذلك في عدد نسخ هذه الجينات أو وجود طفرات تعزز أو تثبط نشاطها (Ali et al., 2012; Barman et al., 2014). إضافة إلى ذلك، قد تتباين السلالات في مستوى التعبير عن هذه الجينات، فبعضها يُعبّر عن الإنزيمات بشكل بنائي Constitutive مما يسمح ببداية التحلل فوراً، بينما تحتاج أخرى إلى تحفيز Induction بوجود المبيد، مما يؤخر بدء النشاط (Chino-Flores et al., 2012).

ثانياً: تباين حركية الإنزيمات ونوعيتها. حتى في حال امتلاك جميع العزلات للجينات نفسها، قد تختلف الإنزيمات المنتجة في تقاربها (K_m) وسرعتها القصوى (V_{max}) تجاه مبيد الـ Chlorpyrifos و Malathion (إذ يُعبّر ثابت Michaelis-Menten (K_m) عن تركيز الركيزة اللازم لبلوغ نصف السرعة القصوى للإنزيم، فكلما انخفضت قيمة K_m دل ذلك على تقارب أعلى بين الإنزيم والمبيد، بينما تُشير السرعة القصوى (V_{max}) إلى أقصى معدل للتفاعل يمكن للإنزيم تحقيقه عند تشبع الركيزة). وبالتالي، قد تكون الإنزيمات في العزلات عالية الكفاءة ذات تقارب أعلى للركيزة (K_m منخفض) وسرعة قصوى أعلى، بينما تكون في العزلات منخفضة الكفاءة أقل تقارباً وأبطأ سرعة، مما ينعكس مباشرة على نسبة التحلل النهائية (Singh & Walker, 2006; Karpouzas & Singh, 2006).

ثالثاً: اختلاف نفاذية المبيد عبر الغشاء الخلوي. إذ تختلف بنية الجدار الخلوي بين الأجناس، خاصة بين البكتيريا الموجبة لصبغة كرام (مثل *Bacillus* و *Lysinibacillus*) والبكتيريا السالبة لصبغة كرام (مثل *Stenotrophomonas* و *Ochrobactrum*)، حيث يحتوي

النتائج والمناقشة الفصل الرابع

الغشاء الخارجي للسالبة على بروتينات ناقلة وقنوات قد تسهل أو تعيق دخول المبيد إلى الخلية (Gilani *et al.*, 2016). هذا الاختلاف في النفاذية قد يفسر جزئياً تباين الكفاءة حتى بين العزلات التي تنتمي إلى الأجناس نفسها.

رابعاً: اختلاف القدرة على إزالة سمية النواتج الوسيطة والتي قد تتراكم وتنشط الإنزيمات أو توقف النمو. إذ تمتلك العزلات عالية الكفاءة أنظمة إضافية (إنزيمات أكسدة أو اختزال أو نواقل فعالة) لتفكيك هذه النواتج بشكل أسرع، بينما تعاني العزلات الأقل كفاءة من تراكمها وتنشيط نشاطها (Abraham & Silambarasan, 2016; Bhende *et al.*, 2022; Singh *et al.*, 2003).

خامساً: اختلاف معدل النمو والكتلة الحيوية. إذ تختلف سرعة انقسام الخلايا بين السلالات، فالعزلات سريعة النمو تصل إلى كثافة خلوية أعلى في وقت أقصر، مما يزيد من كمية الإنزيمات المنتجة وبالتالي يسرع من وتيرة التحلل. في المقابل، تحتاج العزلات بطيئة النمو إلى وقت أطول لبناء كتلة حيوية كافية لإتمام التحلل، وهو ما يفسر انخفاض نسبها النهائية خلال المدة الزمنية نفسها (Kosimov *et al.*, 2024; Gaonkar *et al.*, 2019).

كشف التحليل الحركي (الشكلان 4-5 و 4-6) نمطاً مشتركاً لجميع العزلات المدروسة في تحليل كلا المبيدين، تمثل في تسجيل أعلى معدلات التحلل التراكمية خلال اليومين الأولين (40-55% للعزلات الأكثر كفاءة)، يليه تباطؤ تدريجي حتى الوصول إلى نسب تشبع عند اليوم العاشر. يمكن تفسير هذا النمط بآليات رئيسية: أولاً: اعتماد معدل التحلل على تركيز الركيزة. في البداية، يكون تركيز المبيد مرتفعاً مما يسمح بحدوث أقصى نشاط إنزيمي، ولكن مع استنزاف الركيزة تدريجياً، يصبح التركيز هو العامل المحدد للمعدل وفقاً لحركية الدرجة الأولى، وهو النمط الأكثر شيوعاً في دراسات التحلل الحيوي للمبيدات (Gaonkar *et al.*, 2019; Farhan *et al.*, 2021). ثانياً: تراكم النواتج الأيضية الوسيطة السامة. مثل TCP، و Malathion diacid أو Malaoxon، والتي قد تثبط الإنزيمات أو توقف النمو عند تراكمها، خاصة في العزلات التي تفتقر إلى أنظمة فعالة لإزالة سميتها (Singh *et al.*, 2003; Abraham & Silambarasan, 2016; Verma *et al.*, 2021). وقد لوحظ هذا التأثير بشكل أكثر وضوحاً في تحليل الـ

Malathion مع بعض العزلات مثل *S. maltophilia*، مما قد يشير إلى أن نواتج هدم الـ Malathion تكون أكثر تنبيهاً لتلك العزلات خاصة. ثالثاً: تناقص الكثافة الخلوية ودخول الخلايا في مرحلة الركود. مع استهلاك المبيد كمصدر وحيد للكربون، تبدأ الخلايا بالدخول في مرحلة الركود أو الموت بسبب نقص المغذيات أو تغير الرقم الهيدروجيني للوسط، مما يقلل من النشاط الأيضي العام (Kosimov et al., 2024; Bhende et al., 2022). وقد أكدت مجموعة السيطرة أن التغيرات المسجلة تعود إلى النشاط الحيوي وليس إلى عوامل فيزيائية أو كيميائية تلقائية.

4.4. تحديد الظروف المثلى لتحلل الحيوي:

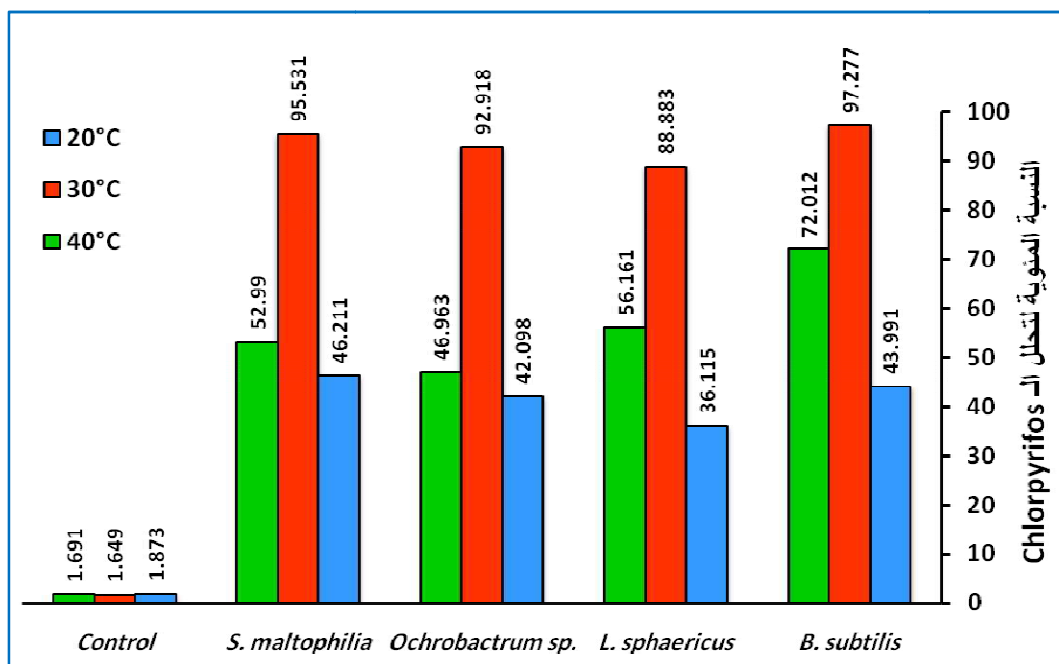
1.4.4. تأثير درجة الحرارة على كفاءة التحلل:

أظهرت النتائج (جدول 4-8، شكل 4-7) تأثيراً واضحاً لدرجة الحرارة على كفاءة التحلل الحيوي لـ Chlorpyrifos، حيث تراوحت نسب التحلل بين (36.115%-97.277%) تبعاً لدرجة الحرارة ونوع العزلة. إذ حققت جميع العزلات أعلى نسب تحلل عند درجة حرارة 30 م°، تراوحت بين (88.883%) للعزلة *L. sphaericus* و (97.277%) للعزلة *B. subtilis*. في المقابل، كانت نسب التحلل عند 20 م° أقل بكثير وتراوحت بين (36.115% و 46.211%)، بينما تباينت النتائج عند 40 م° بشكل ملحوظ بين العزلات، فبينما انخفضت كفاءة معظم العزلات مقارنة بـ 30 م°، إلا أن العزلة *Ochrobactrum sp.* سجلت نسبة تحلل منخفضة جداً (46.963%)، في حين حافظت العزلة *B. subtilis* بكفاءة تحلل جيدة بلغت (72.012%)، كما احتفظت مجموعة السيطرة بتركيز شبه ثابت (98 ملغم/لتر) عند جميع درجات الحرارة، مما يؤكد أن التحلل غير الحيوي كان ضئيلاً للغاية. أظهرت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق ذات دلالة إحصائية بين العزلات البكتيرية وبين درجات الحرارة عند مستوى معنوية ($p \leq 0.05$) الملحق (11).

جدول (4-8): تأثير درجة الحرارة على كفاءة التحلل الحيوي لمبيد الـ Chlorpyrifos

المعدل	40°C S.D ± mg/L التركيز (% للتحلل)	30°C S.D ± mg/L التركيز (% للتحلل)	20°C S.D ± mg/L التركيز (% للتحلل)	درجة الحرارة نوع البكتريا
23.085±28.907 ^a (% 71.093)	0.336±27.988 (% 72.012)	0.126±2.723 (% 97.277)	0.169±56.009 (% 43.991)	<i>B. subtilis</i>
23.070±39.614 ^b (% 60.386)	0.451±43.839 (% 56.161)	0.171±11.117 (% 88.883)	0.259±63.885 (% 36.115)	<i>L. sphaericus</i>
24.287±39.340 ^b (% 60.660)	0.195±53.037 (% 46.963)	0.537±7.082 (% 92.918)	0.268±57.902 (% 42.098)	<i>Ochrobactrum sp.</i>
23.155±35.089 ^c (% 64.911)	0.483±47.010 (% 52.990)	0.506±4.469 (% 95.531)	0.386±53.789 (% 46.211)	<i>S. maltophilia</i>
0.160±98.262 ^d (% 1.738)	0.157±98.309 (% 1.691)	0.185±98.351 (% 1.649)	0.023±98.127 (% 1.873)	Control
32.457±48.242 (%51.758)	24.466±54.037 ^c (%45.963)	38.207±24.748 ^b (%75.252)	17.017±65.942 ^a (%34.058)	المعدل

* S.D = الانحراف المعياري Standard Deviation
- المعدلات التي لها نفس الحرف لا يوجد بينها فروق معنوية عند مستوى دلالة (≥ 0.05) وفقاً لاختبار Tukey.



الشكل (4-7): النسبة المئوية لتحلل مبيد الـ Chlorpyrifos حسب درجة حرارة الحضانة

وفيما يتعلق بمبيد الـ Malathion، فقد أظهر الجدول (4-9) والشكل (4-8) نمطاً مشابهاً لتأثير درجة الحرارة على تحلل مبيد الـ Chlorpyrifos، مع بعض الاختلافات في شدة الاستجابة، إذ تراوحت نسب التحلل بين (43.913%-94.402%) بحسب درجة الحرارة ونوع

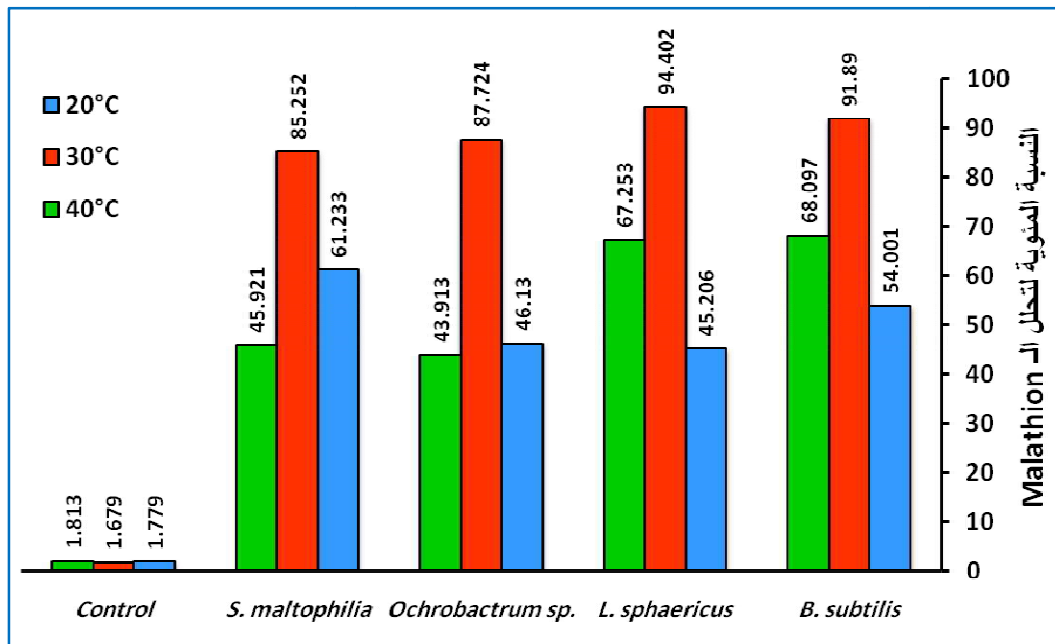
النتائج والمناقشة الفصل الرابع

العزلة. سجلت جميع العزلات أقصى كفاءة لها عند 30 م°، حيث تراوحت النسب المئوية للتحلل بين (85.252%) للعزلة *S. maltophilia* و (94.402%) للعزلة *L. sphaericus*. في حين انخفضت نسب التحلل بصورة ملحوظة عند درجة حرارة 20 م°، مقارنة بـ 30 م°، حيث تراوحت بين (45.206%-61.233%) للعزلة *L. sphaericus* و العزلة *S. maltophilia* على التوالي. كما لوحظ تباين واضح في استجابة العزلات عند 40 م°، فبينما حافظت بعض العزلات مثل *B. subtilis* و *L. sphaericus* على كفاءة مقبولة (68.097% و 67.253%) على التوالي، في حين انخفضت نسب تحلل كل من *Ochrobactrum sp.* و *S. maltophilia* بشكل كبير لتسجلا نسبة (43.913% و 45.921%) على التوالي. في المقابل، كما ظل تركيز الـ Malathion في مجموعة السيطرة ثابتاً تقريباً (~98 ملغم/لتر) عند درجات الحرارة جميعها، مما يؤكد على محدودية التحلل غير الحيوي. وقد كشفت نتائج التحليل الإحصائي عن وجود فروق إحصائية عالية الدلالة بين العزلات البكتيرية وبين درجات الحرارة عند مستوى معنوية ($p \leq 0.05$) الملحق (12).

جدول (4-9): تأثير درجة الحرارة على كفاءة التحلل الحيوي لمبيد الـ Malathion

المعدل	40°C S.D ± mg/L التركيز (% للتحلل)	30°C S.D ± mg/L التركيز (% للتحلل)	20°C S.D ± mg/L التركيز (% للتحلل)	درجة الحرارة نوع البكتيريا
16.589±28.671 ^a (% 71.329)	0.198±31.903 (% 68.097)	0.691±8.110 (% 91.890)	0.230±45.999 (% 54.001)	<i>B. subtilis</i>
21.344±31.046 ^b (% 68.954)	0.332±32.747 (% 67.253)	0.342±5.598 (% 94.402)	0.622±54.794 (% 45.206)	<i>L. sphaericus</i>
21.378±40.745 ^c (% 59.255)	0.685±56.087 (% 43.913)	0.416±12.276 (% 87.724)	0.452±53.870 (% 46.130)	<i>Ochrobactrum sp.</i>
17.174±35.865 ^d (% 64.135)	0.403±54.079 (% 45.921)	0.408±14.748 (% 85.252)	0.550±38.767 (% 61.233)	<i>S. maltophilia</i>
0.126±98.243 ^e (% 1.757)	0.028±98.187 (% 1.813)	0.214±98.321 (% 1.679)	0.046±98.221 (% 1.779)	Control
30.997±46.914 (%53.086)	24.909±54.601 ^c (%45.399)	36.643±27.811 ^b (%72.189)	21.510±58.330 ^a (%41.670)	المعدل

* S.D = الانحراف المعياري Standard Deviation
- المعدلات التي لها نفس الحرف لا يوجد بينها فروق معنوية عند مستوى دلالة (≥ 0.05) وفقاً لاختبار Tukey.



الشكل (4-8): النسبة المئوية لتحلل مبيد الـ Malathion حسب درجة حرارة الحضانة

تُعد درجة الحرارة عاملاً بيئياً حاسماً في النشاط الأيضي للبكتيريا، إذ تؤثر على سرعة التفاعلات الأنزيمية ومعدل النمو الخلوي. فقد أظهرت النتائج أن درجة 30°م كانت هي الدرجة الأمثل لجميع العزلات المدروسة في تحليل كلا المبيدين، وهو ما يتفق مع الكثير من الدراسات السابقة التي أكدت أن المدى الحراري (25-35°م) يُعد الأنسب لتحلل الحوي للمبيدات الفوسفورية العضوية، بما فيها الـ Chlorpyrifos و Malathion (Adams *et al.*, 2024; Das *et al.*, 2026; El-Sesy *et al.*, 2026; Lagiso *et al.*, 2024). وقد يعزى ذلك إلى أن هذا المدى الحراري يُعد الأنسب لنشاط الإنزيمات المحللة ولنمو معظم البكتيريا المعزولة من التربة الزراعية في المناطق المعتدلة، حيث يحقق التوازن الأمثل بين سرعة التفاعلات الأيضية واستقرار البروتينات (Kumar *et al.*, 2022; Farhan *et al.*, 2021).

أما الانخفاض الملحوظ في كفاءة التحلل عند 20°م، فقد يُعزى إلى تباطؤ العمليات الأيضية نتيجة لانخفاض الطاقة الحركية للجزيئات، مما يقلل من تصادم الإنزيمات مع الركيزة ويُضعف من كفاءة النقل عبر الغشاء الخلوي (Gaonkar *et al.*, 2019; Singh *et al.*, 2003). وقد أشارت دراسة Kosimov وزملائه (2024) إلى أن بعض العزلات البكتيرية قد

تحتاج إلى درجات حرارة أعلى من 20 م° لتتسبب أنزيماتها المحللة بشكل كامل، وهو ما يفسر الأداء المتواضع لجميع العزلات عند هذه الدرجة.

أما بالنسبة للتأثير المتفاوت عند 40م°، فقد لوحظ هذا النمط في كلا المبيدين، فيمكن تفسيره بكون هذه الدرجة قريبة من الحد الأعلى لتحمل معظم البكتيريا المعزولة من التربة الزراعية في المناطق المعتدلة، إذ أن درجات الحرارة المرتفعة قد تؤدي إلى بدء تمسخ Denaturation البروتينات والإنزيمات، لاسيما تلك التي تكون غير المستقرة حرارياً، مما يقلل من كفاءتها أو يعطل نشاطها تماماً (Bhende et al., 2022; Singh & Walker, 2006). وقد لوحظ أن بعض العزلات مثل *B. subtilis* و *L. Sphaericus* كانت أكثر تحملاً للحرارة النسبية، مما يشير إلى احتفاظها بنشاط إنزيمي جيد عند درجة حرارة 40 م°، بينما تأثرت العزلة *Ochrobactrum sp.* و *S. maltophilia* بشكل كبير، مما قد يعكس اختلافاً في طبيعة بروتيناتها ودرجة حرارتها المثلى للنشاط، وهو ما تم توثيقه في دراسات سابقة أشارت إلى أن درجات الحرارة المرتفعة قد تكون مثبطة لبعض الأجناس أكثر من غيرها (Karpouzas & Singh, 2006; Iyer et al., 2018).

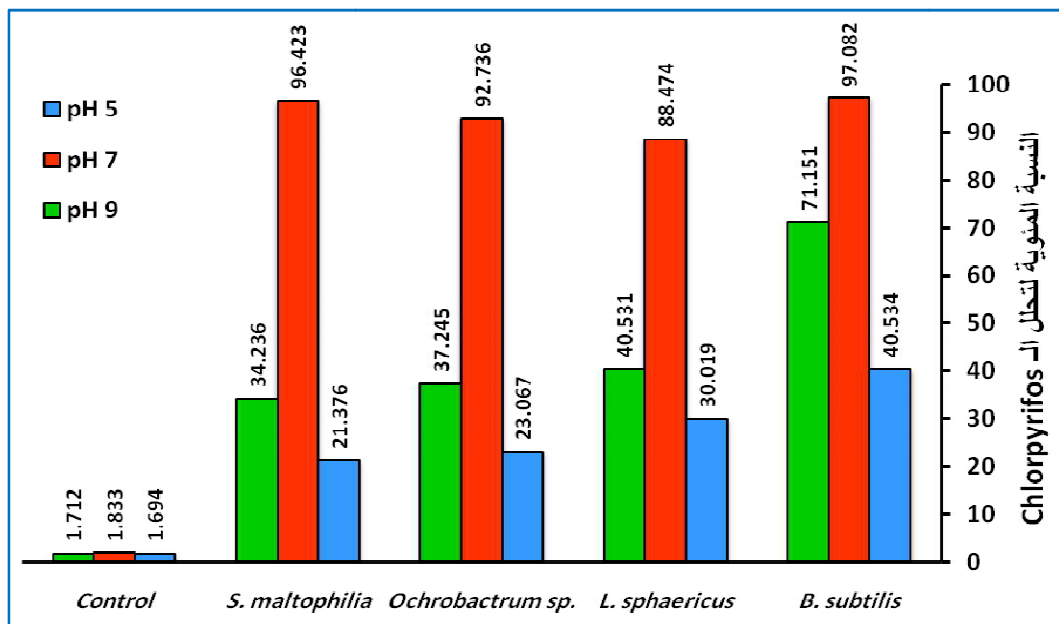
2.4.4. تأثير الرقم الهيدروجيني (pH) على كفاءة التحلل :

تبين النتائج (جدول 4-10، شكل 4-9) إن كفاءة التحلل الحيوي للـ Chlorpyrifos اعتمدت بشكل كبير على قيمة الرقم الهيدروجيني، حيث تراوحت نسب التحلل بين (19.816%-97.082%). وكانت pH 7 القيمة المثلى لجميع العزلات، محققة أعلى نسب تحلل تراوحت بين (88.474%) للعزلة *L. sphaericus* و (97.082%) للعزلة *B. subtilis*. في المقابل، تراجعت الكفاءة بشكل حاد عند pH 5، إذ لم تتجاوز النسبة (40.534%) لأكثر العزلات كفاءة، بينما عند pH 9 تباينت استجابة العزلات، حيث تراوحت بين (34.236%) للعزلة *S. maltophilia* و (71.151%) للعزلة *B. subtilis*. وأكدت مجموعة السيطرة (~98 ملغم/لتر) أن التحلل غير الحيوي كان محدوداً للغاية عند جميع قيم pH. وبينت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق إحصائية عالية الدلالة بين العزلات البكتيرية وبين الرقم الهيدروجيني عند مستوى معنوية ($p \leq 0.05$) الملحق (13).

جدول (4-10): تأثير الرقم الهيدروجيني على كفاءة التحلل الحيوي لمبيد الـ Chlorpyrifos

المعدل	pH 9 S.D ± mg/L التركيز (% للتحلل)	pH 7 S.D ± mg/L التركيز (% للتحلل)	pH 5 S.D ± mg/L التركيز (% للتحلل)	الـ pH نوع البكتريا
24.516±30.411 ^a (% 69.589)	0.265±28.849 (% 71.151)	0.191±2.918 (% 97.082)	0.606±59.466 (% 40.534)	<i>B. subtilis</i>
26.989±46.992 ^b (% 53.008)	0.610±59.469 (% 40.531)	0.207±11.526 (% 88.474)	0.387±69.981 (% 30.019)	<i>L. sphaericus</i>
31.888±48.984 ^c (% 51.016)	0.355±62.755 (% 37.245)	0.267±7.264 (% 92.736)	0.402±76.933 (% 23.067)	<i>Ochrobactrum sp.</i>
34.761±49.322 ^c (% 50.678)	0.414±65.764 (% 34.236)	0.307±3.577 (% 96.423)	0.764±78.624 (% 21.376)	<i>S. maltophilia</i>
0.141±98.254 ^d (% 1.746)	0.183±98.288 (% 1.712)	0.073±98.167 (% 1.833)	0.152±98.306 (% 1.694)	Control
34.347±54.793 (%45.207)	22.830±63.025 ^c (%36.975)	38.161±24.690 ^b (%75.310)	13.204±76.662 ^a (%23.338)	المعدل

* S.D = الانحراف المعياري Standard Deviation
- المعدلات التي لها نفس الحرف لا يوجد بينها فروق معنوية عند مستوى دلالة (≥ 0.05) وفقاً لاختبار Tukey.



الشكل (4-9): النسبة المئوية لتحلل مبيد الـ Chlorpyrifos حسب الرقم الهيدروجيني pH

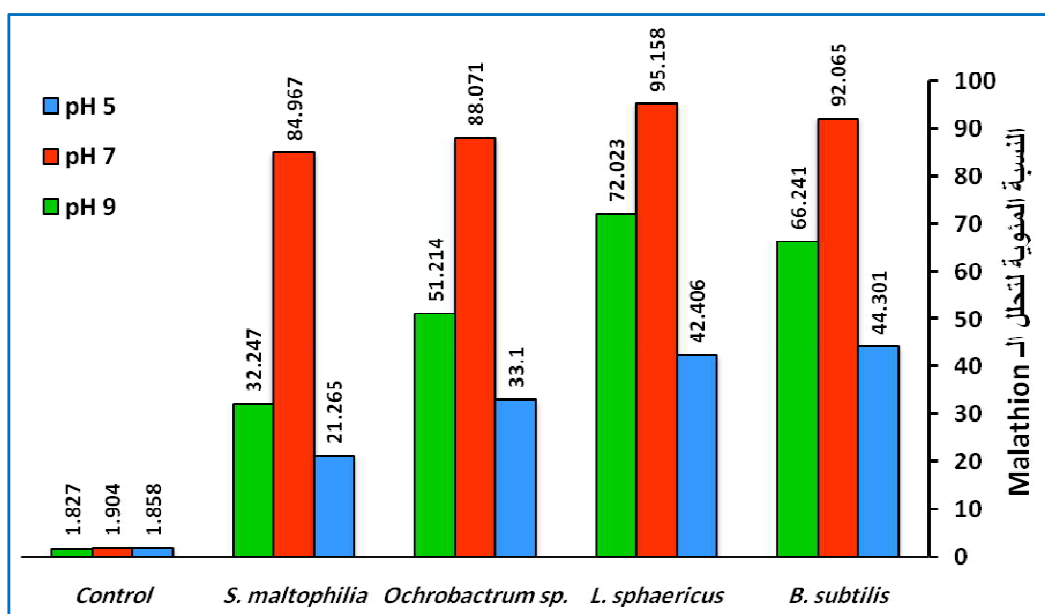
أما بالنسبة لمبيد الـ Malathion (جدول 4-11، شكل 4-10)، فقد أظهرت النتائج نمطاً مشابهاً لتأثير الرقم الهيدروجيني على تحلل مبيد الـ Chlorpyrifos، حيث تراوحت نسب التحلل بين (21.265% - 95.158%) تبعاً لقيمة pH ونوع العزلة. وكان pH 7 هو المستوى الأمثل لجميع العزلات، محققاً أعلى نسب تحلل تراوحت بين (88.071%) للعزلة *Ochrobactrum sp.* و (95.158%) للعزلة *L. sphaericus*. وعند pH 5، انخفضت النسب بشكل كبير

(%44.301-19.870). بينما عند pH 9 فقد تباين الأداء، إذ سجلت العزلة *L. sphaericus* و *B. subtilis* كفاءة تحليل جيدة (72.023% و 66.241%)، على التوالي، بينما كانت العزلة *Ochrobactrum sp.* هي الأقل كفاءة بنسبة تحليل (32.247%). كما ظلت مجموعة السيطرة مستقرة في قيم pH جميعها (تركيز ~98 ملغم/لتر). وقد كشفت نتائج التحليل الإحصائي عن وجود فروق إحصائية عالية الدلالة بين العزلات البكتيرية وبين الرقم الهيدروجيني عند مستوى معنوية ($p \leq 0.05$) الملحق (14).

جدول (4-11): تأثير الأس الهيدروجيني على كفاءة التحلل الحيوي لمبيد الـ Malathion

المعدل	pH 9 S.D ± mg/L التركيز (% للتحلل)	pH 7 S.D ± mg/L التركيز (% للتحلل)	pH 5 S.D ± mg/L التركيز (% للتحلل)	نوع البكتيريا pH الـ
20.708±32.464 ^a (% 67.536)	0.439±33.759 (% 66.241)	0.227±7.935 (% 92.065)	0.504±55.699 (% 44.301)	<i>B. subtilis</i>
22.901±30.138 ^b (% 69.862)	0.127±27.977 (% 72.023)	0.073±4.842 (% 95.158)	0.452±57.594 (% 42.406)	<i>L. sphaericus</i>
24.262±42.538 ^c (% 57.462)	0.288±48.786 (% 51.214)	0.219±11.929 (% 88.071)	0.434±66.900 (% 33.100)	<i>Ochrobactrum sp.</i>
29.494±53.840 ^d (% 46.160)	0.330±67.753 (% 32.247)	0.398±15.033 (% 84.967)	0.480±78.735 (% 21.265)	<i>S. maltophilia</i>
0.059±98.137 ^e (% 1.863)	0.070±98.173 (% 1.827)	0.033±98.096 (% 1.904)	0.060±98.142 (% 1.858)	Control
32.686±51.424 (%48.576)	26.376±55.290 ^c (%44.710)	36.678±27.567 ^b (%72.433)	16.214±71.414 ^a (%28.586)	المعدل

S.D = الانحراف المعياري Standard Deviation
- المعدلات التي لها نفس الحرف لا يوجد بينها فروق معنوية عند مستوى دلالة (≥ 0.05) وفقاً لاختبار Tukey.



الشكل (4-10): النسبة المئوية لتحلل مبيد الـ Malathion حسب الأس الهيدروجيني pH

يُعد الرقم الهيدروجيني للوسط المحيط عاملاً حاسماً في تحديد كفاءة التحلل الحيوي، وذلك لتأثيره المباشر في الموقع النشط Active site للإنزيمات المحللة وفي فسيولوجيا الخلية البكتيرية بشكل عام. وقد أظهرت النتائج أن الوسط المتعادل (pH 7) كان الأكثر ملاءمة لعملية التحلل الحيوي لكل من الـ Chlorpyrifos و Malathion، وهو ما يتوافق مع العديد من الدراسات السابقة التي أكدت أن معظم البكتيريا المعزولة من التربة الزراعية تفضل الظروف المحايدة إلى القلوية قليلاً (El-Helow *et al.*, 2013; Farhan *et al.*, 2021; Kosimov *et al.*, 2024; Chishti & Arshad, 2013). ويعود ذلك إلى أن إنزيمات التحلل الحيوي - وهي بروتينات في الأساس - تحتفظ ببنيتها الثلاثية Tertiary structure الطبيعية عند قيم pH المتعادلة، مما يضمن بقاء الموقع النشط في تهئية فراغية مناسبة لارتباط الركيزة Substrate binding وإتمام التفاعل التحفيزي بكفاءة (Singh & Walker, 2006; Karpouzas & Singh, 2006).

في المقابل، يُعزى الانخفاض الحاد في نسب التحلل عند الرقم الهيدروجيني الحمضي (pH 5) إلى زيادة تركيز أيونات الهيدروجين (H^+) في الوسط، مما يؤدي إلى تغير الحالة الأيونية Ionization state للسلاسل الجانبية للأحماض الأمينية الحيوية في الموقع النشط. هذا التغير في الشحنات الكهربائية يحدث اختلالاً في التوازن الكهروستاتيكي Electrostatic balance، مما يُضعف قدرة الإنزيم على الارتباط بالركيزة ويقلل من سرعته القصوى (V_{max}). إضافة إلى ذلك، تؤثر البيئة الحمضية سلباً في استقرار الغشاء البلازمي للخلية، مما يُعيق نقل المبيد من الوسط الخارجي إلى داخل الخلية (Gilani *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2003; Gaonkar *et al.*, 2019).

أما بالنسبة للانخفاض الملحوظ عند الرقم الهيدروجيني القاعدي (pH 9)، فيُعزى إلى أن البيئة القاعدية تؤدي إلى نزع بروتونات Deprotonation المجموعات الوظيفية في الموقع النشط، مما يحدث تنافراً كهروستاتيكياً Electrostatic repulsion بين بقايا الأحماض الأمينية المتجاورة. هذا التنافر يُضعف الروابط الهيدروجينية والأيونية المسؤولة عن استقرار البنية الثلاثية للإنزيم، مما قد يؤدي إلى انهيار جزئي في شكله الفراغي وفقدان نشاطه التحفيزي (Bhende *et al.*, 2022; Singh & Walker, 2006). وقد لوحظ أن بعض العزلات مثل *B. subtilis* (في الـ Chlorpyrifos و *L. sphaericus* (في الـ Malathion) كانت أكثر تحملاً للوسط القاعدي مقارنة بغيرها، مما قد يشير إلى امتلاكها لأنظمة استتباب الحموضة pH homeostasis داخل

الخلية تحافظ على درجة حموضة السيتوبلازم ضمن المدى الملائم للنشاط الإنزيمي، أو إلى احتوائها على إنزيمات ذات بنية بروتينية أكثر صلابة واستقراراً في الظروف القاعدية (Karpouzas & Singh, 2006; Iyer *et al.*, 2018; Kosimov *et al.*, 2024).

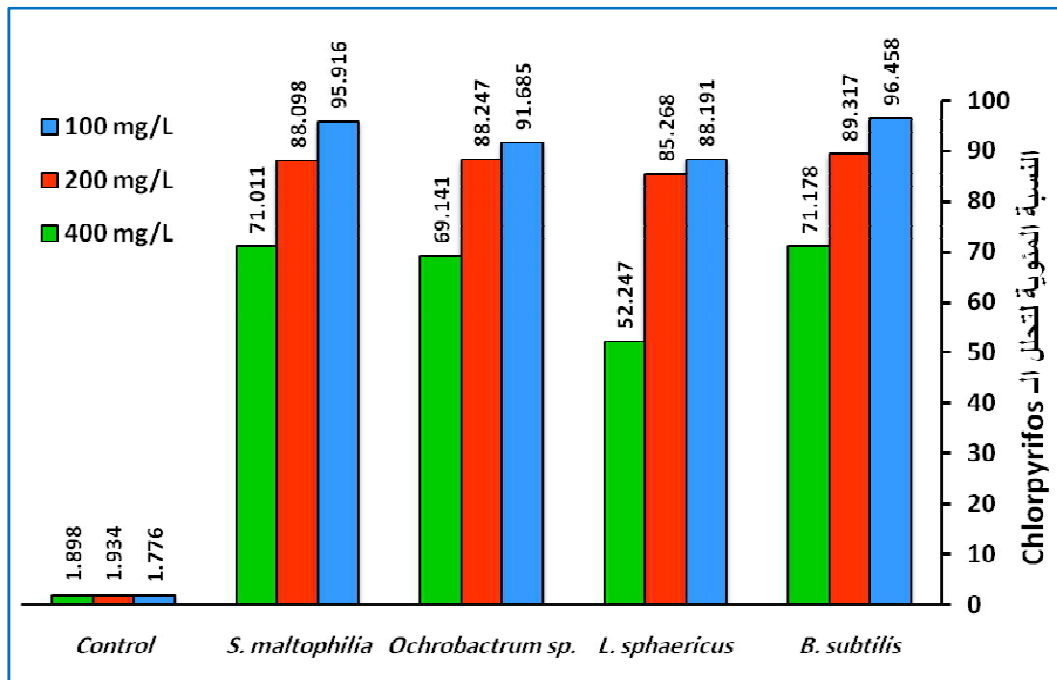
3.4.4. تأثير التركيز الأولي للمبيد على كفاءة التحلل :

أظهرت النتائج (جدول 4-12، شكل 4-11) تأثيراً واضحاً للتركيز الأولي للـ Chlorpyrifos على كفاءة التحلل الحيوي، حيث تراوحت نسب التحلل بين (51.309% - 96.458%) تبعاً لتركيز المبيد ونوع العزلة. فقد حققت العزلات جميعاً أعلى نسب تحلل عند التركيز 100 ملغم/ لتر، تراوحت بين (88.191%) للعزلة *L. sphaericus* و (96.458%) للعزلة *B. subtilis*. ومع زيادة التركيز إلى 200 ملغم/لتر، انخفضت نسب التحلل بشكل طفيف، لتتراوح بين (85.268%) للعزلة *L. sphaericus* و (89.317%) للعزلة *B. subtilis*. أما عند التركيز 400 ملغم/ لتر، فقد انخفضت الكفاءة بشكل ملحوظ، حيث تراوحت بين (52.247%) للعزلة *L. sphaericus* و (71.178%) للعزلة *B. subtilis*. وأكدت مجموعة السيطرة (~98 ملغم/لتر) استقرار المبيد في غياب النشاط الحيوي عند جميع التراكيز. كما أظهرت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق ذات دلالة إحصائية بين العزلات البكتيرية وبين تركيز المبيد عند مستوى معنوية ($p \leq 0.05$) الملحق (15).

جدول (4-12): تأثير التركيز الأولي لمبيد الـ Chlorpyrifos على كفاءة التحلل

المعدل	400 mg/L S.D ± mg/L التركيز (% للتحلل)	200 mg/L S.D ± mg/L التركيز (% للتحلل)	100 mg/L S.D ± mg/L التركيز (% للتحلل)	تركيز المبيد نوع البكتيريا
11.295±14.349 ^a (% 85.651)	0.709±28.822 (% 71.178)	0.431±10.683 (% 89.317)	0.272±3.542 (% 96.458)	<i>B. subtilis</i>
17.293±24.765 ^b (% 75.235)	0.546±47.753 (% 52.247)	0.503±14.732 (% 85.268)	0.388±11.809 (% 88.191)	<i>L. sphaericus</i>
10.524±16.976 ^c (% 83.024)	0.308±30.859 (% 69.141)	0.424±11.753 (% 88.247)	0.467±8.315 (% 91.685)	<i>Ochrobactrum sp.</i>
11.037±14.992 ^d (% 85.008)	0.340±28.989 (% 71.011)	0.495±11.902 (% 88.098)	0.438±4.084 (% 95.916)	<i>S. maltophilia</i>
0.088±98.131 ^e (% 1.869)	0.034±98.102 (% 1.898)	0.064±98.066 (% 1.934)	0.073±98.224 (% 1.776)	Control
34.506±33.842 (%66.158)	27.495±46.905 ^c (%53.095)	35.553±29.427 ^b (%70.573)	37.926±25.195 ^a (%74.805)	المعدل

* S.D = الانحراف المعياري Standard Deviation
- المعدلات التي لها نفس الحرف لا يوجد بينها فروق معنوية عند مستوى دلالة (≥ 0.05) وفقاً لاختبار Tukey.



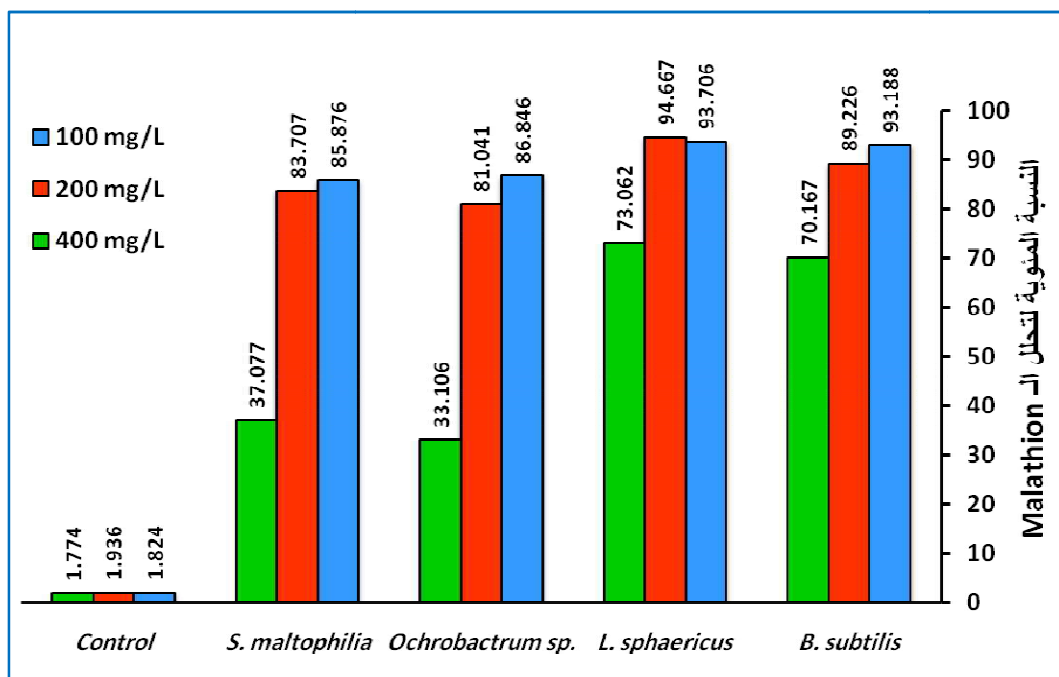
الشكل (4-11): النسبة المئوية لتحلل مبيد الـ Chlorpyrifos حسب التركيز الابتدائي للمبيد

أظهرت نتائج تأثير التركيز الأولي لمبيد الـ Malathion (جدول 4-13، شكل 4-12) نمطاً مشابهاً، مع استثناء ملحوظ، حيث تراوحت نسب التحلل بين (21.842% - 94.667%). وكان التركيز 100 ملغم/لتر هو الأمثل لمعظم العزلات، محققاً أعلى نسب تحلل تراوحت بين (86.846%) للعزلة *Ochrobactrum sp.* و (93.706%) للعزلة *L. sphaericus*. وعند التركيز 200 ملغم/لتر، انخفضت نسب التحلل لدى العزلات *S. maltophilia*، *B. subtilis* و *Ochrobactrum sp.* (89.226%، 83.707% و 81.041%) على التوالي، مع بقاء العزلة *L. sphaericus* محتفظة بكفاءة عالية (94.667%)، متفوقةً بذلك بشكل طفيف على كفاءتها عند 100 ملغم/لتر. أما عند 400 ملغم/لتر، فقد تراجع الكفاءة بشكل حاد لدى جميع العزلات، حيث تراوحت بين (33.106%) للعزلة *Ochrobactrum sp.* و (73.062%) للعزلة *L. sphaericus*. واستقرت مجموعة السيطرة عند جميع التراكيز (98 ملغم/لتر). وقد أكدت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق إحصائية عالية الدلالة بين العزلات البكتيرية وبين تركيز المبيد عند مستوى معنوية ($p \leq 0.05$) الملحق (16).

جدول (4-13): تأثير التركيز الأولي لمبيد الـ Malathion على كفاءة التحلل

المعدل	400 mg/L S.D ± mg/L التركيز (% للتحلل)	200 mg/L S.D ± mg/L التركيز (% للتحلل)	100 mg/L S.D ± mg/L التركيز (% للتحلل)	تركيز المبيد نوع البكتريا
10.666±15.806 ^a (% 84.194)	0.378±29.833 (% 70.167)	0.375±10.774 (% 89.226)	0.524±6.812 (% 93.188)	<i>B. subtilis</i>
10.577±12.855 ^b (% 87.145)	0.592±26.938 (% 73.062)	0.365±5.333 (% 94.667)	0.301±6.294 (% 93.706)	<i>L. sphaericus</i>
25.545±33.002 ^c (% 66.998)	0.416±66.894 (% 33.106)	0.279±18.959 (% 81.041)	0.379±13.154 (% 86.846)	<i>Ochrobactrum sp.</i>
23.879±31.113 ^d (% 68.887)	0.385±62.923 (% 37.077)	0.296±16.293 (% 83.707)	0.487±14.124 (% 85.876)	<i>S. maltophilia</i>
0.099±98.156 ^e (% 1.844)	0.102±98.226 (% 1.774)	0.074±98.064 (% 1.936)	0.048±98.176 (% 1.824)	Control
35.332±38.186 (%61.814)	27.288±56.963 ^c (%43.037)	35.620±29.885 ^b (%70.115)	36.619±27.712 ^a (%72.288)	المعدل

* S.D = الانحراف المعياري Standard Deviation
- المعدلات التي لها نفس الحرف لا يوجد بينها فروق معنوية عند مستوى دلالة (≥ 0.05) وفقاً لاختبار Tukey.



الشكل (4-12): النسبة المئوية لتحلل مبيد الـ Malathion حسب التركيز الابتدائي للمبيد

يُعد تركيز المبيد الأولي في الوسط عاملاً حاسماً في تحديد كفاءة التحلل الحيوي، إذ يرتبط ارتباطاً وثيقاً بعلاقة الإنزيم بالركيزة وفقاً لحركية ميكائيليس-مينتن Michaelis-Menten kinetics. وقد أظهرت النتائج أن التراكيز المنخفضة (100 ملغم/لتر) كانت الأنسب لمعظم

العزلات، وهو ما يتوافق مع العديد من الدراسات السابقة التي أوصت بتركيزات تتراوح بين 50-100 ملغم/لتر لتحقيق أقصى كفاءة للتحلل الحيوي (El-Helow *et al.*, 2013; Farhan *et al.*, 2021; Kosimov *et al.*, 2024; Kumar *et al.*, 2022). ويعود ذلك إلى أن التركيز المنخفض للمبيد يضمن بقاء الإنزيمات في حالة غير مشبعة Non-saturated، مما يسمح بارتباط الركيزة بالموقع النشط Active site بكفاءة عالية، ويضمن أيضاً عدم تراكم نواتج وسيطة سامة قد تثبط النشاط الخلوي (Singh & Walker, 2006).

في المقابل، يُعزى الانخفاض التدريجي في نسب التحلل مع زيادة التركيز إلى ظاهرة تثبيط الركيزة Substrate inhibition، وهي ظاهرة إنزيمية شائعة تحدث عندما تتجاوز تركيزات الركيزة الحد الأمثل، حيث تؤدي زيادة تركيز المبيد إلى ارتباط جزيئات إضافية من الركيزة بمواقع أخرى على الإنزيم (غير الموقع النشط)، مما يُغير من شكله الفراغي ويُقلل من كفاءته التحفيزية (Karpouzas & Singh, 2006; Bhende *et al.*, 2022). كما أن التراكيز العالية من المبيدات الفوسفورية العضوية قد تكون سامة للخلايا البكتيرية Cytotoxicity، إذ تؤثر سلباً في استقرار الغشاء البلازمي وتتداخل مع مسارات التمثيل الغذائي الأساسية مما يؤدي إلى إبطاء النمو وتقليل الكتلة الحيوية النشطة المسؤولة عن التحلل (Gaonkar *et al.*, 2019; Singh *et al.*, 2003).

أما بالنسبة للأداء الاستثنائي للعزلة *L. sphaericus* مع الـ Malathion عند 200 ملغم/لتر، فيمكن تفسيره بعدة عوامل. أولاً، قد تكون هذه العزلة تمتلك إنزيمات ذات تقارب عالٍ High affinity للمبيد، مما يسمح لها بالعمل بكفاءة حتى عند تراكيز أعلى من الركيزة، أي أن قيمة ثابت ميكائيليس (Km) لديها منخفضة نسبياً، مما يعني أن نصف السرعة القصوى تُبلغ عند تركيز أقل من الركيزة، وبالتالي فإن زيادة التركيز لا تؤدي إلى تثبيط سريع (Singh & Walker, 2006). ثانياً، قد تمتلك العزلة أنظمة نقل فعالة Efficient transport systems تسمح لها بإدخال كميات أكبر من المبيد إلى الخلية، أو أنظمة إزالة سمية Detoxification متطورة تمنع تراكم النواتج الوسيطة السامة، مما يسمح لها بمواصلة التحلل حتى عند التراكيز العالية (Abraham & Silambarasan, 2016; Bhende *et al.*, 2022). ثالثاً، قد يعود هذا الأداء

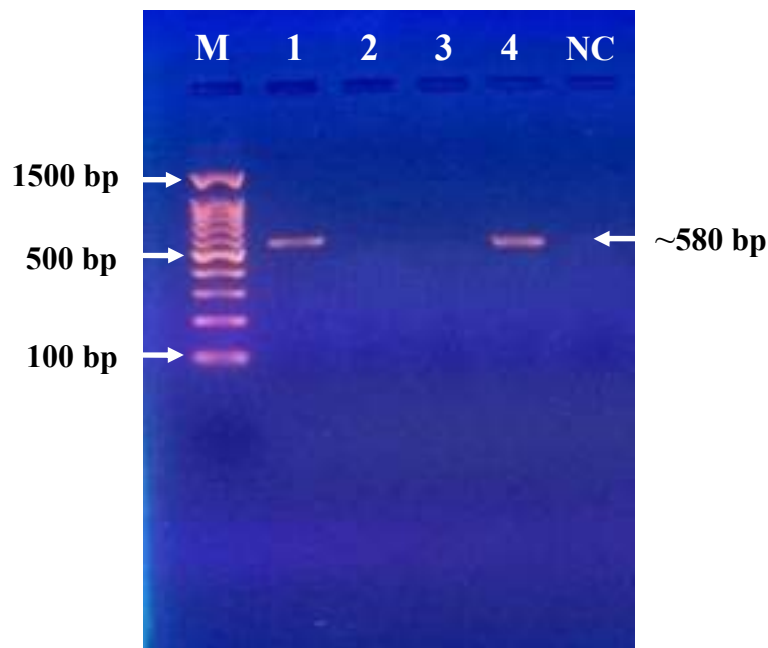
إلى أن العزلة *L. sphaericus* قد طورت، بفعل الضغط الانتقائي في بيئتها الأصلية، إنزيمات ذات نوعية ركيزية واسعة Broad substrate specificity أو إنزيمات مقاومة للتثبيط بالركيزة، وهي سمة تم توثيقها في بعض السلالات البكتيرية القادرة على تحمل تراكيز عالية من المبيدات الفوسفورية العضوية (Iyer et al., 2018; Karpouzas & Singh, 2006). وقد لوحظ أن هذا الأداء المتفرد لم يتكرر مع الـ Chlorpyrifos، مما يشير إلى تخصصية الركيزة Substrate specificity في استجابة العزلة للمبيدين المختلفين، وهو ما يعكس اختلافاً في طبيعة الإنزيمات المحللة لكل مبيد. أما بالنسبة للانخفاض في الكفاءة عند 400 ملغم/لتر لدى جميع العزلات، فيُعزى إلى وصول التركيز إلى مستوى سام Toxic threshold يتجاوز قدرة الخلايا على التحمل، مما يؤدي إلى تثبيط النمو وتعطيل العمليات الأيضية الأساسية (Kumar et al., 2022).

5.4. الأساس الجيني والإنزيمي لتحلل الحيوي:

1.5.4. الكشف عن جيني *opd* و *mpd*:

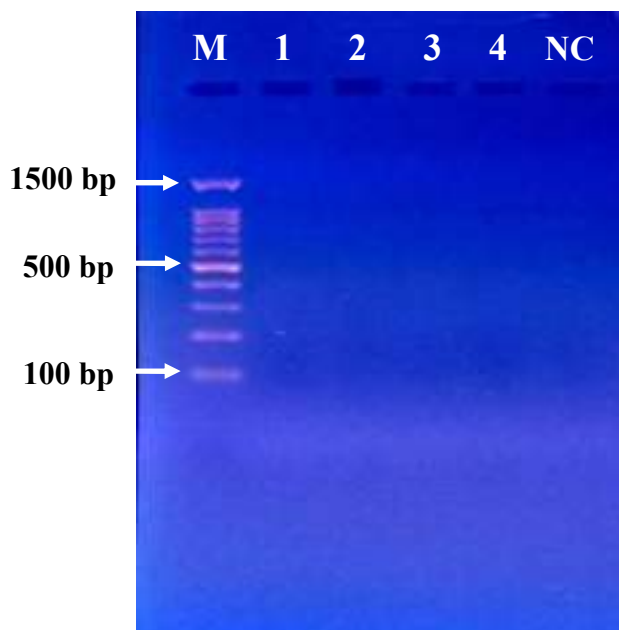
للكشف عن الأساس الجيني لقدرة عزلات الدراسة على التحلل الحيوي، تم إجراء تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) باستخدام بادئات خاصة (الفقرة: 6.1.3) تستهدف جين *opd* Organophosphate degradation gene وأخرى تستهدف جين *Methyl parathion degradation gene* (*mpd*) في العزلات الأربعة *B. subtilis* BS1، *L. sphaericus* LS1، *Ochrobactrum* sp. OA1، و *S. maltophilia* SM1.

أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي (الشكل 4-13) نجاح عملية التضخيم وظهور حزم واضحة عند الحجم المتوقع (~580 bp) لجين *opd* في العزلتين *B. subtilis* و *S. maltophilia* فقط، في المقابل، لم تُكشف أي حزم عند الحجم المتوقع في العزلتين *L. sphaericus* و *Ochrobactrum* sp. في ظل الظروف التجريبية المستخدمة، على الرغم من تحسين ظروف التفاعل. بينما خلت عينة السيطرة السالبة NC من أي حزمة، مما يؤكد خلو العينات من أي تلوث جيني.



الشكل (4-13): الترحيل الكهربائي على هلام الأغاروز (2%) لنواتج تضخيم جين *opd* (100 فولت، 70 ملي أمبير، 45 دقيقة) M: سلم الحمض النووي 100bp، 1: *B. subtilis*، 2: *L. sphaericus*، 3: *Ochrobactrum sp.*، 4: *S. maltophilia*، NC: سيطرة سالبة.

بينما أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي لنواتج تضخيم جين *mpd* فشل عملية التضخيم (الشكل 4-14) وعدم ظهور أي حزم عند الحجم المتوقع (~574 bp) في جميع العزلات الأربعة حتى بعد بتعديل ظروف تفاعل الـ PCR، كما أكد خلو مسار العينة السالبة NC من الحزم عدم تعرض العينات لأي تلوث.



الشكل (4-14): الترحيل الكهربائي على هلام الأغاروز (2%) لنواتج تضخيم جين *mpd* (100 فولت، 70 ملي أمبير، 45 دقيقة) M: سلم الحمض النووي 100bp، 1: *B. subtilis*، 2: *L. sphaericus*، 3: *Ochrobactrum sp.*، 4: *S. maltophilia*، NC: سيطرة سالبة.

يتوافق اكتشاف جين *opd* في العزلتين *B. subtilis* و *S. maltophilia* مع كفاءتهما العالية في تحليل مبيد الـ Chlorpyrifos. إذ يُشَقَّر هذا الجين إنزيم Organophosphorus hydrolase (OPH)، وهو إنزيم رئيسي يقوم بتفكيك الروابط الفوسفورية (P-S, P-O, P-F, P-) في العديد من مبيدات الفوسفات العضوية بما فيها مبيد الـ Chlorpyrifos و الـ Malathion مما يؤدي إلى بدء تحليلها الحيوي (Schofield & DiNovo, 2010; Kumar et al., 2019). حيث يتوافق ذلك مع ما أشار اليه Horne وزملاؤه (2002) و Ali وزملاؤه (2012) من أن جين *opd* هو المسؤول الأساسي عن تحليل الـ Chlorpyrifos في العديد من الأجناس البكتيرية. وقد اكدت العديد من الدراسات وجود جين *opd* في سلالات بكتيرية مختلفة تُحلل مركبات الفوسفات العضوية، بما في ذلك *B. subtilis* و *S. maltophilia* (Shoman et al., 2022; Bhende et al., 2024). تدعم نتائج الدراسة الحالية الأبحاث السابقة التي تشير إلى وجود جين *opd* في هذه السلالات، مما يوحي بأن *opd* قد يُساهم بالفعل في النشاط العالي لإزالة مركبات الفوسفات العضوية الذي لوحظ في هاتين العزلتين.

ومن المثير للاهتمام، أن العزلتين *L. sphaericus* و *Ochrobactrum* sp. تمكنتا من تحليل مبيد الـ Chlorpyrifos بنسبة كبيرة (88.976% و 93.043%) على التوالي، على الرغم من عدم وجود أي نواتج تضخيم قابلة للكشف لجين *opd* في ظل ظروف تفاعل الـ PCR المستخدمة. كما ان جميع العزلات الأربعة تمكنت من تحليل مبيد الـ Malathion بكفاءة عالية جداً رغم فشل عملية التضخيم لجين *mpd*. قد يكون هناك عدة أسباب محتملة. أحدها أن الاختلافات في تسلسل الجينات بين السلالات البكتيرية قد أعاقَت ارتباط بادئات *opd* بشكل فعال، مما أدى إلى نتائج سلبية خاطئة في تفاعل الـ PCR (Horne et al., 2002). أو قد تحمل هذه السلالات جينات هيدرولاز OPH أخرى، مثل جينات (*ophA*, *ophB*, *ophC*، أو *opdA*) والتي يمكن أن تسهل تحليل الـ Chlorpyrifos من خلال آليات تحفيزية مختلفة (Jiang et al., 2019; Pashirova et al., 2024; Srivastava et al., 2026). من الممكن أيضًا أن تكون مسارات تحليل غير المعتمدة على الهيدرولاز، مثل cytochrome P450 oxidation أو مسارات

التمثيل الغذائي المشترك co-metabolic pathways نشطة في هذه السلالات (Karbozas & Singh, 2006).

وبالنسبة لغياب تضخيم جين *mpd* في جميع العزلات، فقد يعود إلى أن هذا الجين أقل شيوعاً في العزلات المعزولة من التربة الزراعية مقارنة بجين *opd*، أو أن العزلات المدروسة تتبع مسارات أيضاً مختلفة لتحليل الـ Malathion لا تعتمد على إنزيم *mpd* (Yang et al., 2006)، فقد يتحلل الـ Malathion عبر مسارات إنزيمية أخرى مثل Carboxylesterase أو الفوسفاتاز القلوي Alkaline phosphatase أو Esterases وهي إنزيمات قد تكون موجودة في هذه العزلات رغم عدم كشف الجينات المدروسة (Singh et al., 2013; Verma et al., 2021). وقد تدعم هذه الفرضية الكفاءة الملحوظة للعزلة *L. sphaericus* (88.976% لا Chlorpyrifos و 94.141% لا Malathion)، و *Ochrobactrum* sp. (93.043% و 87.910%) لمبيد الـ Chlorpyrifos والـ Malathion على التوالي، والتي تحققت رغم غياب جيني *opd* و *mpd*، مما يرجح احتمال وجود آليات جينية بديلة للتحلل الحيوي في هذه العزلات (Iyer et al., 2018; Jiang et al., 2019). مع ذلك، تبقى هذه الفرضيات تخمينية وتتطلب التحقق من خلال تقنيات مثل تسلسل الجينوم الكامل (WGS) whole-genome sequencing أو quantitative PCR (qPCR) أو تقنيات أخرى لتأكيد نشاط الإنزيم.

وتعزز هذه النتائج الفرضية القائلة بأن كفاءة التحلل الحيوي للمبيدات الفوسفورية العضوية لا تعتمد على جين واحد، بل على تكامل مجموعة من الجينات الهدمية والأنظمة الأنزيمية المختلفة التي تتفاعل لتوفير القدرة على استخدام المبيدات كمصدر وحيد للكربون والطاقة (Iyer et al., 2018; Karpouzas & Singh, 2006). كما أن التباين في توزيع جين *opd* بين العزلات، رغم خضوعها لنفس الظروف التجريبية، يعكس اختلافاً في التركيب الجيني بين السلالات، وهو ما قد يعود إلى اختلاف مصدر العزلات وتاريخ تعرضها للضغوط الانتقائية في بيئتها الأصلية، (Castro-Gutiérrez et al., 2020; Dunon et al., 2018). خصوصاً أن العزلتين *S. maltophilia* و *B. subtilis* تم عزلهما من نفس الموقع الجغرافي S1 لمدينة عفاك.

2.5.4. تحليل الجينوم الكامل : Whole genome sequencing (WGS)

للكشف عن المسارات الجينية البديلة التي تعتمد عليها العزلات البكتيرية السالبة تجاه جيني *mpd* و *opd* (والذين لم يتم تضخيمهما باستخدام تقنية PCR) في تحليل مبيدات الفوسفات العضوية، تم إجراء تحليل الجينوم الكامل WGS لكل من العزلتين *Ochrobactrum sp.* و *L. sphaericus*. بهدف تأكيد النتائج السلبية لفحص PCR وتوضيح التركيب الجيني البديل المسؤول عن الكفاءة التحليلية العالية التي أظهرتها هاتان العزلتان في التحلل الحيوي لمبيد الـ Chlorpyrifos والـ Malathion.

1.2.5.4. العزلة *Ochrobactrum sp.*

أظهرت نتائج تحليل الجينوم الكامل لعزلة *Ochrobactrum sp.* غياباً تاماً لكل من جين *mpd* و *opd*، وهو ما جاء ليؤكد بدقة تامة النتائج السلبية التي تم الحصول عليها مسبقاً من خلال تقنية الـ PCR. وبدلاً من ذلك، كشف التحليل الجينومي عن وجود مجموعة متكاملة مكون من 7 جينات بديلة مسؤولة عن تحليل مبيدات الفوسفات العضوية. ويوضح الجدول (4-14) هذه الجينات المكتشفة مصنفةً حسب العائلة الإنزيمية الوظيفية، مع نواتجها الإنزيمية ومواقعها واتجاهاتها على الجينوم.

الجدول (4-14): جينات التحلل ونواتجها الإنزيمية مصنفةً حسب العائلة الوظيفية لبكتريا *Ochrobactrum sp.*، حيث يشير (+) إلى الاتجاه الأمامي Forward و (-) إلى الاتجاه العكسي Reverse لشريط الحمض النووي.

الشريط Strand	الموقع على الجينوم Location	النتائج الإنزيمية Product	الرمز المرجعي للبروتين Protein ID	الاسم الوظيفي للجين Locus tag	العائلة الوظيفية
-	422144..422863	Arylesterase	WP_006465813.1	DQW88_RS11750	Hydrolases & Esterases
+	882443..885286	Phosphodiesterase PdeA	WP_085982942.1	DQW88_RS13955	
+	1625226..1625951	Glycerophosphodiester phosphodiesterase	WP_063882179.1	MQXW88_RS17575	
+	457332..458696	Esterase-like activity of phytase family protein	WP_086470774.1	DQ488_RS02915	
-	1800427-1801971	alkaline phosphatase family protein	WP_138725346.1	DQW88_RS18505	Phosphatases
+	209572..210423	Metallophosphoesterase	WP_006471468.1	DQ488_RS01865	
+	479544-480935	cytochrome P450	WP_006470919.1	DQW88_RS11985	Oxidases

النتائج والمناقشة الفصل الرابع

لإثبات هوية هذه الجينات المكتشفة وفعاليتها الوظيفية المتوقعة، تم إجراء محاذاة للتسلسل المتعدد Multiple sequence alignment لتسلسلات البروتينات المشتقة من هذه الجينات لمقارنة تسلسلات الأحماض الأمينية للبروتينات المشفرة بواسطة هذه الجينات مع التسلسلات المرجعية المسجلة في بنك الجينات العالمي. وكما يوضح الشكل (4-15) الخاص بإنزيم Esterase-like activity of phytase family protein (DQ488_RS02915) كنموذج، فقد أظهرت المحاذاة تطابقاً تاماً بنسبة 100% في تسلسل الأحماض الأمينية مع البروتين المرجعي، وقد تكرر هذا التطابق التام في تسلسل الأحماض الأمينية الخاصة بالجينات المكتشفة الستة المتبقية مع التسلسلات المرجعية العالمية (ملحق 17)، إذ يشمل هذا التطابق التام الموقع النشط Active site والمناطق المحفوظة Conserved domains المسؤولة عن التحفيز الإنزيمي، مما يؤكد احتفاظ هذه الإنزيمات بكامل كفاءتها الوظيفية وقدرتها على تحليل المبيدات والمركبات العضوية المعقدة.

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment	
WP_086470774.1 DQ488_RS02915	MISRLVASTMLAGAVLAFHASAEKAFPATLKAWAILPANTIIAAPEDAAEHLKTSKGF MISRLVASTMLAGAVLAFHASAEKAFPATLKAWAILPANTIIAAPEDAAEHLKTSKGF *****
WP_086470774.1 DQ488_RS02915	TTADRKRAEGIGTVEGKDGVRKTGLSVFPDGPVQGFSGIKTHEDGSFWSLSDNGFGSKL TTADRKRAEGIGTVEGKDGVRKTGLSVFPDGPVQGFSGIKTHEDGSFWSLSDNGFGSKL *****
WP_086470774.1 DQ488_RS02915	NSPDAMLMLHMKFDMDKGTVERVKTFLSDPDRKAPFPIVMEGAEKRYLTGADFVESI NSPDAMLMLHMKFDMDKGTVERVKTFLSDPDRKAPFPIVMEGAEKRYLTGADFVESI *****
WP_086470774.1 DQ488_RS02915	QPVADGFMYGEEFGPFLKFDTDGKLTDFVPTFVGEKEIVSPDNPKLALPAMPKSLKLPAY QPVADGFMYGEEFGPFLKFDTDGKLTDFVPTFVGEKEIVSPDNPKLALPAMPKSLKLPAY *****
WP_086470774.1 DQ488_RS02915	NLKRSGGFEGLAWSKDGTLYGLLEGPLFVDGAPEKTESGKTGLRVIEFSVADKKMTGRS NLKRSGGFEGLAWSKDGTLYGLLEGPLFVDGAPEKTESGKTGLRVIEFSVADKKMTGRS *****
WP_086470774.1 DQ488_RS02915	WLYPLAEGGEAIGDFNMLDETTALVIERDNGVGTADKACADPKKQADCFDVPKVKRIY WLYPLAEGGEAIGDFNMLDETTALVIERDNGVGTADKACADPKKQADCFDVPKVKRIY *****
WP_086470774.1 DQ488_RS02915	KIAFDOSNVGKDVVKIGYIDLLAIADPENKRRQGGREGIYDMPFLTIEINDRVDETHIVV KIAFDOSNVGKDVVKIGYIDLLAIADPENKRRQGGREGIYDMPFLTIEINDRVDETHIVV *****
WP_086470774.1 DQ488_RS02915	GNDWNLFPFSAGRALDKVDQNEFVLLEVGEFLKAE GNDWNLFPFSAGRALDKVDQNEFVLLEVGEFLKAE *****

الشكل (4-15): محاذاة التسلسل المتعدد لجين إنزيم Esterase-like activity of phytase family protein (DQ488_RS02915) مع تسلسل الجين المرجعي المستخرج من GeneBank (WP_086470774.1). * تشير إلى التطابق التام للأحماض الأمينية بينهما. تم انشاؤه باستخدام CLUSTAL W.

هذا الجين التقليدي، مما يعكس تنوعاً جينياً مميزاً بين العزلات البكتيرية حتى ضمن البيئة نفسها (Castro-Gutiérrez *et al.*, 2020; Dunon *et al.*, 2018). وهذا ما يفسر بوضوح سبب فشل تضخيم جين *opd* باستخدام البادئات الخاصة به في هذه العزلة، على الرغم من كفاءتها العالية في تحليل الـ Chlorpyrifos (93.043%) والـ Malathion (87.910%). كما تتفق هذه النتيجة مع دراسة Nayak وزملائه (2020) التي أثبتت أن عزلة *Ochrobactrum sp.* CPD-03 تعتمد بشكل رئيس على إنزيمات بديلة لتحلل الـ Chlorpyrifos دون الحاجة لجين *opd*.

بالنسبة لجينات العائلة Hydrolases & Esterases، يعد أبرز اكتشافات الجينوم هو وجود جين (DQW88_RS11750) مشفر لإنزيم Arylesterase، والذي يعد أحد أهم البدائل الإنزيمية لجين *opd* في هذه العزلة. فقد أثبتت دراسة Nayak وزملائه (2020) أن عزلة *Ochrobactrum sp.* CPD-03 تعتمد بشكل رئيسي على إنزيم Arylesterase (EC 3.1.1.2) لتحلل الـ Chlorpyrifos بنسبة تتراوح بين 85-88% في غضون 48 ساعة، دون الحاجة لجين *opd*. إن التطابق التام (100%) الذي أظهرته محاذاة التسلسلات MSA بين إنزيم Arylesterase في عزلاتنا والتسلسل المرجعي في GenBank يؤكد احتفاظ هذا الإنزيم بكامل نشاطه التحفيزي، مما يجعله المرشح الأقوى لتفسير الكفاءة العالية للعزلة في تحليل الـ Chlorpyrifos (Karpouzas & Singh, 2006; Singh & Walker, 2006).

كما يمثل الجين (DQW88_RS13955) المشفر لإنزيم Phosphodiesterase *PdeA* اكتشافاً جينومياً مهماً في هذه الدراسة، إذ يتميز هذا الإنزيم بنشاط تحفيزي مزدوج؛ فهو قادر على كسر كل من الروابط Phosphomonoester و Phosphodiester في آن واحد (Bhatt *et al.*, 2021). إن وجود هذا الجين في عزلة *Ochrobactrum sp.* يمثل أهمية علمية خاصة، إذ سبق أن أشارت الدراسات إلى أن جين *pdeA* مرتبط بالعناصر الوراثية المتنقلة Transposable elements، مما يشير إلى إمكانية نقله الجيني الأفقي Horizontal Gene Transfer بين السلالات البكتيرية (Tehara & Keasling, 2003). كما أدرجت مراجعة

Singh و Walker (2006) هذا الإنزيم ضمن قائمة الإنزيمات الرئيسية المسؤولة عن تحليل مبيدات الفوسفات العضوية في البيئة.

يمثل الجين المشفر لبروتين يحمل نشاطاً شبيهاً بالإستريز Esterase-like activity (DQW88_RS02915) مكوناً مهماً في المنظومة التحليلية لهذه السلالة. أكدت دراسة Bhatt وآخرون (2021) أن الإستريزات تنتمي إلى أكبر عائلة من إنزيمات الهيدرولازات، وقد أُبلغ بشكل متكرر عن مشاركتها المباشرة في تحليل مبيدات الفوسفات العضوية والكرامات والمركبات الكلورية العضوية. كما أوضحت دراسة Kumar وجماعته (2019) أن عزل إنزيمات الإستريز وتوصيفها يمثل أحد أهم المسارات لتحقيق التحلل الفعال لـ Malathion، إذ تعمل هذه الإنزيمات على كسر الروابط الاسترية في تركيب الـ Malathion منتجةً حمض Malathionic acid كمنتج أولي غير سام. وإن اكتشاف هذا الجين في عزلة *Ochrobactrum sp.* يفسر بشكل مباشر قدرتها على استخدام الـ Malathion كمصدر للكربون والطاقة، مما يدعم النتائج الوظيفية السابقة التي أظهرت تحلاً بنسبة 87.910%.

يُعد الجين (DQW88_RS17575) المشفر لإنزيم Glycerophosphodiester phosphodiesterase (GDPD) اكتشافاً بالغ الأهمية في سياق تحليل مبيدات الفوسفات العضوية. تشير الأدبيات العلمية الحديثة إلى أن هذه الإنزيمات تلعب دوراً جوهرياً في تحليل إسترات الفوسفات العضوية Organophosphate esters (OPEs) التي تشكل نواتج التحلل الأولية للعديد من المبيدات الخطيرة. على سبيل المثال، أثبتت دراسة Ren وآخرون (2021) قدرة إنزيم GDPD المعزول من *Bacillus altitudinis* W3 على تحليل Diphenyl phosphate (DHP) وهو المستقلب الرئيس للكثير من مبيدات الفوسفات العضوية. وبالمثل، أظهرت دراسة Daumann وزملائه (2014) أن إنزيم GpdQ من *Enterobacter aerogenes* يمتلك قدرة ملحوظة على تحييد سمية OPEs عن طريق التحلل المائي. وإن اكتشاف هذا الجين في عزلة *Ochrobactrum sp.* يدعم الفرضية القائلة بأن هذه السلالة تمتلك مساراً متكاملاً لتحلل المبيدات لا يتوقف عند الخطوة الأولى (كسر الرابطة الرئيسية)، بل يتعداها إلى تحطيم نواتج التحلل الوسيطة إلى مركبات أقل سمية.

وفيما يتعلق بانزيمات عائلة Phosphatases فإن إنزيمات Alkaline phosphatase و Metallophosphoesterase تؤدي دوراً محورياً في كسر الروابط الفوسفاتية والكربوكسيلية في جزيء الـ Malathion (Kumar *et al.*, 2019; Chu *et al.*, 2018). إذ تنتمي إنزيمات الفوسفاتيز القلوي Alkaline phosphatase إلى عائلة إنزيمات الهيدرولازات الفوسفاتية phosphate hydrolase التي تحفز إزالة مجموعات الفوسفات من الركائز (Sharma *et al.*, 2014). تلعب هذه الإنزيمات دوراً حاسماً في تحلل الـ Malathion عن طريق كسر الروابط الفوسفاتية والكربوكسيلية في تركيبته. كما ينتمي إنزيم Metallophosphoesterase إلى عائلة الإنزيمات الفلزية Metalloenzymes التي تمتلك نشاطاً تحليلياً واسع النطاق ومتميزاً ضد مبيدات الفوسفات العضوية (Singh *et al.*, 2013; Verma *et al.*, 2021). وفي دراسة جينومية مقارنة أجراها Iyer وآخرون (2018) على ست سلالات بكتيرية محللة للفوسفات العضوية، وجدوا أن السلالات التي لا تمتلك جين *opd* (مثل *Ochrobactrum anthropi* FRAF13) تعتمد بشكل كامل على بروتينات مشابهة لـ *OPHC2* (والتي تشمل إنزيمات metallophosphoesterases) لتحليل المبيدات. إن وجود كلا الإنزيمين في جينوم *Ochrobactrum* sp.، إلى جانب إنزيم Esterase-like activity of phytase، يفسر الكفاءة العالية للعزلة في تحليل الـ Malathion (87.910%) على الرغم رغم غياب جين *mpd*، الذي يُعد الجين التقليدي المسؤول عن تحليل الـ Malathion في بعض الأجناس الأخرى مثل *Stenotrophomonas* و *Pseudomonas* (Yang *et al.*, 2006).

ساهم اكتشاف جين (DQW88_RS11985) المشفر Cytochrome P450 في توسيع فهمنا لآليات التحلل في هذه العزلة. ينتمي هذا الإنزيم إلى عائلة oxidase ويعمل كـ monooxygenase حيث يضيف ذرة أكسجين إلى الركائز. مما يضيف هذا الإنزيم مسار التحلل المؤكسد Oxidative degradation pathway إلى المسارات التحليلية المائية Hydrolytic pathways التي توفرها الإنزيمات الأخرى (مثل Arylesterase و Esterases). هذا التكامل بين التحلل المائي والأكسدة يعزز بشكل كبير من كفاءة تحلل مبيد الـ Malathion و Chlorpyrifos.

2.2.5.4. العزلة *L. sphaericus*

أكد تحليل الـ WGS للعزلة *L. sphaericus* LS1 غياب جيني *mpd* و *opd*، بما يتفق مع نتائج الـ PCR. وكشف التحليل الجينومي عن وجود ستة جينات مرشحة موزعة على عائلتين وظيفيتين هما (Hydrolases & Esterases و Phosphatases). ويعرض الجدول (4-15) تفاصيل هذه الجينات ومواقعها واتجاهاتها.

الجدول (4-15): جينات التحلل ونواتجها الإنزيمية مصنفةً حسب العائلة الوظيفية لبكتريا *L. sphaericus*، حيث يشير (+) إلى الاتجاه الأمامي Forward و (-) إلى الاتجاه العكسي Reverse لشريط الحمض النووي.

العائلة الوظيفية	الاسم الوظيفي للجين Locus tag	الرمز المرجعي للبروتين Protein ID	الناتج الإنزيمي Product	الموقع على الجينوم Location	الشريط Strand
Hydrolases & Esterases	LSPH26S_04977	CAM5190762.1	Carboxylesterase	28551-29303	+
	LSPH26S_00513	CAM5181705.1	Esterase	270267-270986	+
	LSPH26S_00366	CAM5180533.1	Glycerophosphodiester phosphodiesterase	124019-124774	+
	LSPH26S_00514	CAM5181713.1	Putative phosphoesterase	271070-271585	+
Phosphatases	LSPH26S_04423	CAM5215454.1	Metallophosphoesterase	164021-164818	-
	LSPH26S_00761	CAM1518891.1	Alkaline phosphatase	50068-50289	+

أُجريت محاذاة متعددة لتسلسلات البروتينات المتوقعة في *L. sphaericus* لمقارنة تسلسلات الأحماض الأمينية للبروتينات المشفرة بواسطة هذه الجينات مع التسلسلات المرجعية المسجلة في بنك الجينات العالمي GenBank. ويعرض الشكل (4-17) انزيم Carboxylesterase المرتبط بالجين (LSPH26S_04977) بوصفه نموذجًا. وأظهرت المحاذاة تطابقًا بنسبة 100% مع التسلسل المرجعي (CAM5190762.1) في تسلسل الأحماض الأمينية، وتكررت النتيجة نفسها للجينات الخمسة الأخرى وفق البيانات الواردة في الملحق (18). تدعم

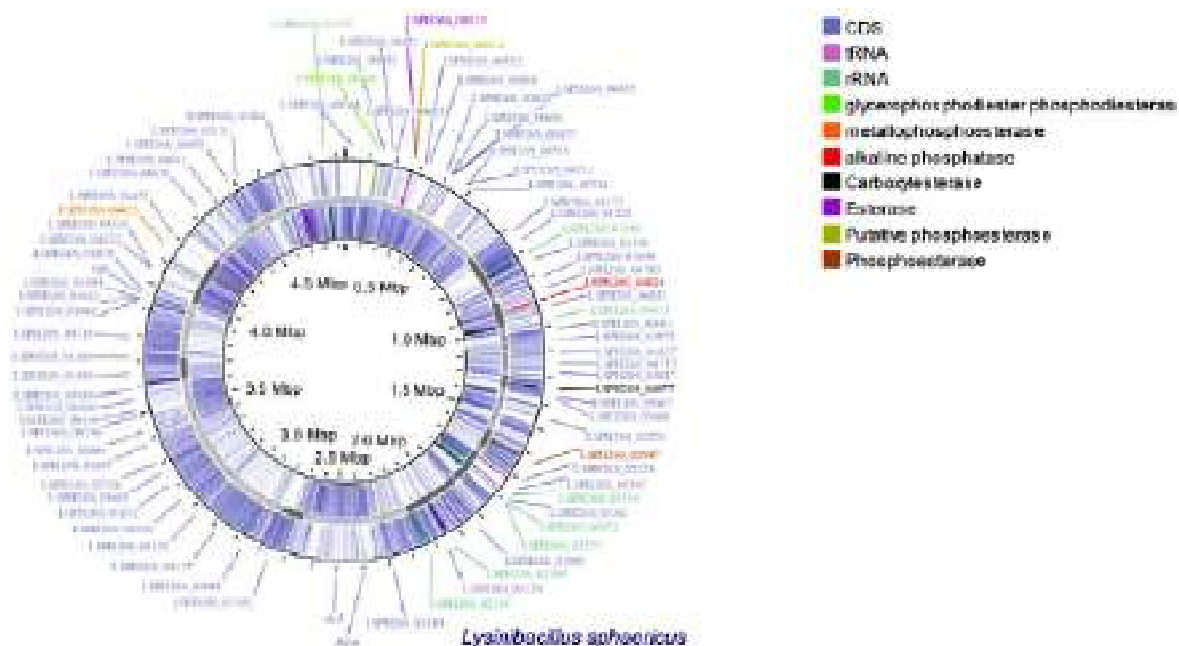
النتائج والمناقشة الفصل الرابع

هذه النتيجة حفظ التسلسل والمناطق الوظيفية المتوقعة، مما يؤكد احتفاظ هذه الإنزيمات بكامل كفاءتها الوظيفية وقدرتها على تحليل المبيدات والمركبات العضوية المعقدة.



الشكل (4-17): محاذاة التسلسل المتعدد لجين انزيم Carboxylesterase (الاسم الوظيفي LSPH26S_04977) مع تسلسل الجين المرجعي المستخرج من GeneBank (CAM5190762.1). * تشير الى التطابق التام للاحماض الامينية بينهما . تم انشائه باستخدام CLUSTAL W .

تظهر الخريطة الجينومية (الشكل 4-18) التنظيم الهيكلي للجينوم وتوزيع الجينات المرتبطة بالتحلل الحيوي للعزلة *L. sphaericus*، وبلغ حجم الجينوم نحو 4.5 مليون زوج قاعدي (Mbp). تظهر الخريطة توزيع الجينات المرشحة للتحلل الحيوي (المشار إليها بألوان مميزة) على منطقتين رئيسيتين تقريباً، تمتدان من 0 - 1.5 Mbp ومن 3.5 - 4.5 Mbp. ويشير ذلك إلى عدم اجتماعها في عنقود جيني واحد. مما يعكس تنوعاً في التنظيم الجيني والوظيفي. كما توضح توزيع تسلسلات التشفير CDSs، وجينات الرنا الناقل tRNA، وجينات الرنا الريبوسومي rRNA.



الشكل (4-18) الخارطة الجينومية Genomic map لبكتريا *L. sphaericus* موضحة الجينات ذات العلاقة بتحلل المبيدات ومواقعها على الجينوم . تم انشاء هذه الخارطة بالاعتماد على منصة Proksee platform. سميت الجينات باسمائها الوظيفية.

أكد تحليل الجينوم الكامل لعزلة *L. sphaericus* مرة أخرى الغياب التام لجيني *opd* و *mpd*، ليضيف دليلاً قاطعاً إلى نتائج PCR السلبية. وهذا النمط من الغياب ليس طارئاً، بل يعكس ظاهرة أوسع في العزلات البكتيرية المعزولة من بيئات زراعية معرضة للمبيدات لفترات طويلة؛ حيث تُظهر الدراسات أن التكيف مع الضغوط الانتقائية قد يؤدي إلى الاحتفاظ بمسارات إنزيمية بديلة بدلاً من الجينات الكلاسيكية (Dunon et al., 2018). وقد اختلف النمط الجينومي في *L. sphaericus* عن العزلة *Ochrobactrum* sp. من حيث تركيز الجينات المرشحة في عائلتي Hydrolases & Esterases و Phosphatases، دون الكشف عن جين مرشح من عائلة Cytochrome P450. وعليه، يمكن وصف استراتيجية *L. sphaericus* بأنها منظومة تحلل مائي وفوسفاتي مرشحة، في مقابل التنوع المائي والفوسفاتي والأكسدي المرشح في *Ochrobactrum* sp.

في ما يتعلق بأنزيمات العائلة Hydrolases و Esterases جاء في صدارة الجينات البديلة المكتشفة الجين (LSPH26S_04977) المشفر لإنزيم Carboxylesterase، وهو إنزيم ذو دور محوري في تفكيك الروابط الإسترية في المبيدات. وقد سبق أن أشارت أدبيات علمية عدة

إلى أن Carboxylesterase يمثل إنزيمًا رئيسيًا في تحلل المالاتيون، من خلال تحويله إلى حمض المالاتيونيك والمركبات الثنائية الحمضية، وهي نواتج أقل سمية وأكثر سهولة في الأيض (Singh *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2019). والتطابق التام في تسلسل الأحماض الأمينية بين إنزيم الدراسة الحالية ونظيره المرجعي في GenBank يؤكد أنه يحتفظ بقدرته التحفيزية الكاملة، وهو ما يفسر بوضوح قدرة العزلة *L. sphaericus* على بلوغ نسبة تحلل استثنائية للمالاتيون (94.141%)، متجاوزة بذلك عزلة *Ochrobactrum* sp. التي تقتصر لهذا الإنزيم المحدد. وإلى جانب Carboxylesterase، رُصد جين آخر (LSPH26S_00513) يشفر إنزيم Esterase، الذي ينتمي إلى العائلة ذاتها، ويُعزز من قدرة العزلة على التعامل مع مجموعة أوسع من الروابط الإستيرية. وقد أشارت دراسات مثل Bhatt وآخرون (2021) و Jiang وآخرون (2019) إلى أن تعدد جينات الإستيريز في الجينوم البكتيري يُعزز المرونة التحليلية ويمنح البكتيريا أفضلية تنافسية في البيئات الملوثة بمزيج من المبيدات.

كما تم تحديد جين (LSPH26S_00366) المشفر لإنزيم Glycerophosphodiester (phosphodiesterase (GDPD)، وهو إنزيم يؤدي دوراً حيوياً في تحليل إسترات الفوسفات العضوية (OPEs)، وخاصةً المستقلبات الثانوية مثل ثنائي فينيل الفوسفات (Ren *et al.*, 2021). وهذا يشير إلى أن العزلة لا تقتصر على كسر الرابطة الأساسية في المبيد، بل تمتلك القدرة على مواصلة التحلل إلى مستويات أعمق من إزالة السموم، وهي ميزة مهمة في تطبيقات المعالجة الحيوية الكاملة (Iyer *et al.*, 2018). أما الجين (LSPH26S_00514) المشفر لإنزيم Putative phosphoesterase، فرغم كونه افتراضياً، إلا أن تطابقه التام مع المرجع يرجح كونه إنزيمًا فاعلاً في كسر الروابط الفوسفاتية. وقد أشارت دراسة Walker و Singh (2006) إلى أن phosphoesterase يمكن أن تمثل بديلاً وظيفياً مهماً عن الهيدرولازات التقليدية، خاصة في السلالات التي تقتصر إلى جينات *opd*.

أما العائلة الثانية، فجاءت ممثلة بإنزيمي (LSPH26S_04423) Metallophosphoesterase و (LSPH26S_04824) Alkaline phosphatase، وكلاهما ينتمي إلى عائلة الفوسفاتيز الفلزية وغير الفلزية، ويؤديان دوراً مكملًا في شق الروابط الفوسفاتية والكربوكسيلية في جزيء المالاتيون (Kumar *et al.*, 2019; Chu *et al.*, 2018). وقد أظهرت

دراسة Iyer وآخرون (2018) أن السلالات الخالية من *opd* غالباً ما تعتمد على إنزيمات من هذا النوع لتحقيق تحلل فعال.

3.2.5.4. المقارنة بين العزلة *Ochrobactrum* sp. والعزلة *L. sphaericus*

تكشف المقارنة بين التركيب الجيني للعزلتين عن اختلاف استراتيجي واضح في آليات التحلل الحيوي، مع تفاوت ملحوظ في الكفاءة حسب نوع المبيد (الجدول: 4-16):

جدول (4-16): مقارنة استراتيجيات التحلل للعزلتين *L. sphaericus* و *Ochrobactrum* sp.

المؤشر	<i>Ochrobactrum</i> sp.	<i>L. sphaericus</i>
<i>mpd</i> و <i>opd</i>	غير مكتشفين بواسطة PCR و WGS	غير مكتشفين بواسطة PCR و WGS
عدد الجينات المرشحة	7	6
العائلات الوظيفية	Hydrolases/Esterases Phosphatases Oxidoreductase	Hydrolases/Esterases Phosphatases
السمة المميزة	Arylesterase و PdeA و Cytochrome P450	Carboxylesterase و Esterase و غياب Cytochrome P450
النمط الوظيفي المحتمل	تنوع مائي وفوسفاتي وأكسدي	تخصص مائي وفوسفاتي
نسبة تحلل الـ Chlorpyrifos	93.043%	88.976%
نسبة تحلل الـ Malathion	87.910%	94.141%

قد يعزى تفوق عزلة *Ochrobactrum* sp. في تحلل الكلوربيريفوس إلى امتلاكها لإنزيمين متخصصين بشكل فريد لهذا المبيد تحديداً:

أولاً: إنزيم Arylesterase: يحتوي الـ Chlorpyrifos على حلقة أروماتية كلورية (3,5,6- trichloro-2-pyridinol) مرتبطة بالجزء الفوسفوري عبر رابطة أسترية أروماتية. إن إنزيم Arylesterase متخصص بشكل كبير في كسر الروابط الأسترية الأروماتية (Aryl ester bonds)، مما يجعله مثالياً لتحليل الـ Chlorpyrifos تحديداً. وقد أثبتت دراسة Nayak وآخرين (2020) أن عزلة *Ochrobactrum* sp. CPD-03 تعتمد بشكل رئيسي على إنزيم Arylesterase لتحليل الـ Chlorpyrifos والتي حققت بنسبة 85-88%. ثانياً: إنزيم PdeA

بنشاطه المزدوج: يتميز إنزيم PdeA بقدرته على كسر كل من الروابط الفوسفو-أحادية الأستر و الفوسفو-ثنائية الأستر في آن واحد. هذا النشاط المزدوج يوفر للسلالة مرونة أكبر في التعامل مع تركيب الـ Chlorpyrifos المعقد الذي يحتوي على روابط فوسفورية متعددة الأنواع (Tehara & Keasling, 2003)، مما قد يفسر كفاءته العالية. ثالثاً: وجود إنزيم من عائلة الأكسيداتازات (Cytochrome P450) في *Ochrobactrum* sp. وغيابه في *L. sphaericus*. إذ أن وجود مسار أكسدي يُعزز من تحلل المركبات العطرية المعقدة (Bhende et al., 2022).

في المقابل، قد يعزى تفوق *L. sphaericus* في تحلل الـ Malathion إلى امتلاكها لإنزيم Carboxylesterase بتطابق تام 100% مع التسلسل المرجعي، وهو الإنزيم الأمثل لكسر الروابط الاسترية في تركيب الـ Malathion الذي يحتوي على مجموعتي إستر كربوكسيلية Carboxylic ester groups بالإضافة إلى الرابطة الفوسفورية. كما أن الاستراتيجية المائية المكثفة (6 جينات مائية) توفر كثافة إنزيمية أعلى مقارنة بعزلة *Ochrobactrum* sp. التي تمتلك (4 جينات مائية) مما يفسر سرعتها وكفاءتها العالية في تحلل الملاثيون (Kumar et al., 2019; Marei et al., 2019). وهذا الفرق في التنوع الإنزيمي يعكس تكيّفاً بيئياً مختلفاً بين العزلتين، رغم تشابه ظروف العزل، وهو ما تمت مناقشته في إطار التنوع الجيني الناتج عن الضغط الانتقائي في التربة الزراعية (Dunon et al., 2018; Castro-Gutiérrez et al., 2020).

تؤكد نتائج تحليل الجينوم الكامل أن العزلتين *Ochrobactrum* sp. و *L. sphaericus*. تمتلكان منظومة أنزيمية متنوعة، والتي تفسر كفاءتهما العالية في تحلل الـ Chlorpyrifos (93.043% و 88.976%) و الـ Malathion (87.910% و 94.141%)، وعلى التوالي. على الرغم من غياب جينات *mpd* و *opd* التقليدية. ويمنح امتلاك هذه المنظومة الإنزيمية المتعددة والمتنوعة (بدلاً من الاعتماد على جين واحد مثل *opd* أو *mpd*) العزلة هاتين العزلتين عدة مزايا تطويرية وتطبيقية مهمة. أولاً، القدرة على تحلل نطاق أوسع من المبيدات، إذ أن وجود إنزيمات ذات آليات تحفيزية مختلفة (هيدرولازية، فوسفاتيزية، وأكسدية) يُمكن العزلة من التعامل مع مجموعة متنوعة من المركبات الفوسفورية العضوية وليس فقط الـ Chlorpyrifos و Malathion (Iyer et al., 2018; Jiang et al., 2019). ثانياً، قد يمنح تعدد المسارات

الإنزيمية العزلات قدرة أكبر على الاستمرار في تحليل المبيد، حيث أن وجود مسارات بديلة يعني أنه حتى في حال تعطل أحد المسارات، تظل المسارات الأخرى قادرة على مواصلة عملية التحلل (Castro-Gutiérrez *et al.*, 2020). ثالثاً، القدرة على العمل في ظروف بيئية مختلفة، حيث قد ينشط مسار إنزيمي معين دون الآخر تبعاً للظروف المحيطة مثل درجة الحرارة، والرقم الهيدروجيني، وتركيز المبيد (Karpouzas & Singh, 2006). وتدعم هذه الفرضية حقيقة أن هذه البكتريا عُزلت من تربة زراعية تعرضت للمبيدات لأكثر من خمس سنوات، مما يشير إلى أن الضغط الانتقائي المستمر هو ما أدى إلى تطور هذه المنظومة الجينية المتكاملة، وهي ظاهرة تم توثيقها في دراسات سابقة (Dunon *et al.*, 2018; Castro-Gutiérrez *et al.*, 2020). مما يجعلها مرشحتين واعدتين لمزيد من تقييم تطبيقات المعالجة الحيوية Bioremediation لتنظيف التربة والمياه الجوفية الملوثة بمزيج من المبيدات الفوسفورية العضوية.

الاستنتاجات و التوصيات

***CONCLUSIONS
and
RECOMMENDATION***

6.4. الاستنتاجات: Conclusions

1. أثبتت الدراسة نجاح الأنواع البكتيرية المحلية في التكيف والنمو على وسط MSM المحتوي على مبيدي الـ Chlorpyrifos و Malathion، مما يؤكد وجود نشاط ميكروبي حيوي في التربة قادر على تحليل هذه الملوثات.
2. أظهر التوزيع الجغرافي تفاوتاً في أعداد العزلات البكتيرية (أعلاها في عفاك، وأدناها في السنية والدغارة، وانعدامها في الديوانية)، مما يعكس اختلاف تاريخ وكثافة استخدام المبيدات بين هذه المناطق.
3. أكد التشخيص المظهري والمجهري والكيموحيوي ونظام VITEK 2 والجزيئي انتماء العزلات الأكثر كفاءة إلى أربعة أنواع هي: *Bacillus subtilis*، *Lysinibacillus sphaericus* و *Ochrobactrum sp.* و *Stenotrophomonas maltophilia*.
4. تباين ترتيب كفاءة العزلات الأربع في تحلل مبيدي الـ Chlorpyrifos و Malathion، مع فروق إحصائية واضحة، مما يشير إلى تخصصية ركيزية واختلاف في القدرات الوظيفية و الإنزيمية لدى هذه البكتيريا تجاه كل مبيد.
5. اتسمت حركات التحلل بمرحلة أولى سريعة أعقبها تباطؤ تدريجي استمر 10 أيام، ويعزى ذلك على الأرجح إلى انخفاض تركيز المبيد المتاح للتحلل مع الزمن.
6. تم تحديد (30°م، pH 7 و 100 ملغم/لتر) كقيم مثلى لدرجة الحرارة والرقم الهيدروجيني والتركيز الأولي للمبيد لتحلل كلا المبيدين، في حين انخفضت الكفاءة عند الانحراف عن هذه الظروف، وللعزلات جميعاً. باستثناء العزلة *L. sphaericus* التي حققت كفاءة أعلى مع تركيز 200 ملغم/لتر من الـ Malathion.
7. كشف الفحص الجيني عن وجود جين *opd* في عزلتي *B. subtilis* و *S. maltophilia* فقط، وغياب جين *mpd* في جميع العزلات، مما يشير إلى وجود مسارات تحليلية بديلة، ويدعو لإجراء تحليل WGS.
8. أكد تحليل الجينوم الكامل WGS غياب *opd* و *mpd* في *L. sphaericus* و *Ochrobactrum sp.* وكشف عن منظومة إنزيمية بديلة مسؤولة على الأرجح عن التحلل الحيوي.

9. كشف تحليل WGS عن امتلاك العزلة *Ochrobactrum* sp. ثلاث عائلات انزيمية (Oxidases ، Phosphatases ، Hydrolases & Esterases)، وامتلاك العزلة *L. sphaericus* عائلتين انزيميتين (Hydrolases & Esterases و Phosphatases)، مع وجود carboxylase، مما يفسر تنوع المسارات التحليلية و يرجح كفاءتهما العالية نسبيا في تحلل مبيدي الـ Chlorpyrifos و الـ Malathion..
10. أكد تحليل محاذاة التسلسلات المتعددة MSA تطابقاً تاماً بين تسلسلات البروتينات المشفرة وتسلسلاتها المرجعية في GenBank، مما يدعم احتفاظ هذه الإنزيمات بكفاءتها الوظيفية، بما في ذلك المواقع النشطة والمناطق المحفوظة.
11. أظهرت الخرائط الجينومية أن الجينات المرشحة المرتبطة بالتحلل موزعة في مناطق متعددة من الكروموسوم، بدلاً من عنقود جيني واحد. مما يعكس تنظيمًا جينومياً متفرقاً وتعددًا محتملاً في مسارات التحلل الحيوي.
12. تعد العزلات قيد الدراسة مرشحات واعدة في تطبيقات المعالجة الحيوية bioremediation للتربة الملوثة بالمبيدات نظراً لكفاءتها العالية في تحلل مبيدي الـ Chlorpyrifos و الـ Malathion والتنوع في المسارات والانزيمات المرتبطة بالتحلل الحيوي.

7.4. التوصيات: Recommendations

1. التحقق من التعبير الجيني والنشاط الإنزيمي للجينات المرشحة باستخدام (Quantitative PCR أو RNA-seq) واختبارات النشاط الإنزيمي المناسبة، لتحديد مدى مساهمتها الفعلية في تحلل الـ Chlorpyrifos و Malathion. ودراسة التغير الزمني في تعبيرها خلال عملية التحلل.
2. تحديد النواتج الوسيطة والنهائية لتحلل الـ Chlorpyrifos و الـ Malathion باستخدام التقنيات التحليلية المناسبة، وإجراء اختبارات سمية للتأكد من انخفاض خطورة النواتج وعدم تحول المبيدات إلى مركبات وسيطة أكثر ضرراً.
3. عزل وتنقية الإنزيمات المرشحة، مثل Arylesterase و Carboxylesterase، وتوصيف نشاطها الكيميائي الحيوي، بما في ذلك تحديد ثابتي Km و Vmax ودراسة تأثير درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني والمثبطات في نشاطها.
4. اختبار كفاءة العزلات المختارة على نطاق الحقل (مصغر أو حقيقي) لتقييم أداء العزلات في التربة الطبيعية، مع دراسة ثباتها وتنافسها مع المجتمعات الميكروبية الأصلية وتأثير الرطوبة ووجود الملوثات الأخرى في كفاءة التحلل.
5. تقييم كفاءة استخدام عزلات بكتيرية تعود لأنواع مختلفة في تحلل الـ Chlorpyrifos و الـ Malathion، مقارنةً باستخدام عزلات منفردة، ودراسة التآزر أو التضاد بينها.
6. اختبار عزلات لأنواع بكتيرية مختلفة في مفاعلات حيوية Bioreactors على نطاق شبه صناعي، بهدف تحسين ظروف المعالجة ودراسة ثبات العزلات واستمرار نشاطها خلال فترات التشغيل الطويلة.
7. تحليل المناطق الجينية الواقعة قبل الجينات وبعدها Upstream and Downstream Regions للكشف عن المحفزات Promoters والعوامل المنظمة للنسخ Transcriptional Regulators المرتبطة بتنظيم التعبير عن الجينات المرشحة.
8. إجراء تحليلات Metagenomics لعينات التربة الأصلية لتحديد انتشار الجينات المرتبطة بالتحلل الحيوي ووفرته النسبية داخل المجتمعات الميكروبية في الترب الزراعية.

المصادر

REFERENCES

References :المصادر

- Abraham J and Silambarasan S. (2016).** Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by a novel bacterium *Ochrobactrum* sp. JAS2: A proposal of its metabolic pathway. *Pestic. Biochem. Physiol.* 126, 13–21.
- Adams NH, Umar R, Ishaya S, Nweke OD, and Ilyasu NS, et al. (2024).** Chlorpyrifos degradation by *Bacillus* sp. strain UPMB10 isolated from polluted environment: Analysis and characterization of the metabolite by GC-MS. *Case Stud. Chem. Environ. Eng.* 9, 100608.
- Ahmad, M. F., Ahmad, F. A., Alsayegh, A. A., Zeyaullah, M., AlShahrani, A. M., Muzammil, K., Saati, A. A., Wahab, S., Elbendary, E. Y., Kambal, N., Abdelrahman, M. H., and Hussain, S. (2024).** Pesticides impacts on human health and the environment with their mechanisms of action and possible countermeasures. *Heliyon*, 10(7), e29128.
- Aislabe, J., & Lloyd-Jones, G. (1995).** A review of bacterial degradation of pesticides. *Australian Journal of Soil Research*, 33(6), 925–942.
- Akbar S and Sultan S. (2016).** Soil bacteria showing a potential of chlorpyrifos degradation and plant growth enhancement. *Braz. J. Microbiol.* 47, 563–570.
- Alba, L. M., Esmeralda, M., & Jaime, V. (2022).** Enhanced Biodegradation of Phenylurea Herbicides by *Ochrobactrum anthropi* CD3 Assessment of Its Feasibility in Diuron-Contaminated Soils. *International journal of environmental research and public health*, 19(3), 1365.
- Alexander, S.K., Strete, D. and Niles, M.J. (2004).** Laboratory exercises in organismal and molecular microbiology. The mcgraw – Hill companies. USA.

- Ali M, Naqvi TA, Kanwal M, Rasheed F, and Hameed A, et al. (2012).** Detection of the organophosphate degrading gene *opdA* in the newly isolated bacterial strain *Bacillus pumilus* W1. *Ann. Microbiol.* 62, 233–239.
- Aljabri, M. (2025).** Recent advances in pesticide bioremediation: integrating microbial, phytoremediation, and biotechnological strategies - a comprehensive review. *Environmental Pollutants & Bioavailability*, 37(1), 2554173.
- Allawi, M. H., & AL-Mukhtar, R. S. (2024).** Review and comparison for organophosphorus pesticide elimination processes. *AIP Conference Proceedings*, 3009(1), 030108.
- Andrews, S. (2010).** *FastQC*: A quality control tool for high throughput sequence data [Computer software]. Babraham Bioinformatics, Babraham Institute.
- Anjum, N., Ridwan, Q., Rashid, S., Akhter, F., & Hanif, M. (2022).** Microbial degradation of organophosphorus pesticides. In *Bioremediation and Phytoremediation Technologies in Sustainable Soil Management* (Vol. 4, pp. 159–185). Apple Academic Press.
- Asamba MN, Mugendi EN, Oshule PS, Essuman S, and Chimbevo LM, et al. (2022).** Molecular characterization of chlorpyrifos degrading bacteria isolated from contaminated dairy farm soils in Nakuru County, Kenya. *Heliyon* 8, e09176.
- Atlas, R. M. (2004).** *Handbook of Microbiological Media*. 3^{ed} ed. CRC Press LLC. USA.
- Ayilara, M. S., Adeleke, B. S., Akinola, S. A., Fayose, C. A., Adeyemi, U. T., Gbadegesin, L. A., Omole, R. K., Johnson, R. M., Uthman, Q. O., & Babalola, O. O. (2023).** Biopesticides as a promising alternative to synthetic pesticides: A case for microbial pesticides, phytopesticides, and nanobiopesticides. *Frontiers in microbiology*, 14, 1040901.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S.,**

- Prjibelski, A. D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A., & Pevzner, P. A. (2012).** SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology*, 19(5), 455–477.
- Barman DN, Haque MA, Islam SM, Yun HD, and Kim MK. (2014).** Cloning and expression of ophB gene encoding organophosphorus hydrolase from endophytic *Pseudomonas* sp. BF1-3 degrades organophosphorus pesticide chlorpyrifos. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 108, 135–141.
- Basapuram, G., Duttagupta, S., & Dutta, A. (2026).** Malathion biodegradation and biotransformation in water and sediment systems: Bacterial pathways, environmental drivers, ecological impacts, and bioremediation strategies. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 42, 520.
- Bayoumi, A. E. (2022).** Deleterious effects of banned chemical pesticides on human health in developing countries. In M. L. Larramendy & S. Soloneski (Eds.), *Pesticides - Updates on Toxicity, Efficacy and Risk Assessment*. IntechOpen.
- Benson, H. J. (2002).** Microbiological Applications Laboratory Manual in General Microbiology. 8th ed. The McGraw–Hill Companies. USA .
- Bhatt, P., Huang, Y., Zhan, H., & Chen, S. (2019).** Insight into microbial applications for the biodegradation of pyrethroid insecticides. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1778.
- Bhatt, P., Zhou, X., Huang, Y., Zhang, W., & Chen, S. (2021).** Characterization of the role of esterases in the biodegradation of organophosphate, carbamate, and pyrethroid pesticides. *Journal of hazardous materials*, 411, 125026.
- Bhende RS, Jhariya U, Srivastava S, Bombaywala S, and Das S, et al. (2022).** Environmental distribution, metabolic fate, and degradation mechanism of chlorpyrifos: Recent and future perspectives. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 194, 2301–2335.

- Bhende RS, Bombaywala S, and Dafale NA. (2024).** Unleashing potential of *Pseudomonas aeruginosa* RNC3 and *Stenotrophomonas maltophilia* RNC7 for chlorpyrifos biodegradation by genome analysis and kinetic studies. *J. Hazard. Mater.* 461, 132668.
- Robson, M. G. (2011).** Pesticides. In D. V. McQueen (Ed.), *Oxford bibliographies in public health*. Oxford University Press.
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014).** Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* (Oxford, England), 30(15), 2114–2120.
- Børgensen, C. D., Fomsgaard, I. S., Plauborg, F., Schelde, K. and Spliid, N. H. (2015).** Fate of pesticides in agricultural soils. DCA - Danish Centre for Food and Agriculture, Blichers Allé 20.
- Buratti, F. M., & Testai, E. (2006).** Malathion detoxification by human hepatic carboxylesterases and its inhibition by isomalathion and other pesticides. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 19(6), 406–414.
- Cai, P., & Dimopoulos, G. (2024).** Microbial biopesticides: A one health perspective on benefits and risks. *One health*, 20, 100962.
- Carson, R. (2002).** *Silent Spring*. A mariner book Houghton Mifflin Company, 40th Anniversary edition, Boston, New York.
- Casida J. E. (2009).** Pest toxicology: the primary mechanisms of pesticide action. *Chemical research in toxicology*, 22(4), 609–619.
- Castro-Gutiérrez, V., Fuller, E. N., Thomas, J. C., Sinclair, C. J., Johnson, S., Helgason, T., & Moir, J. W. B. (2020).** Genomic basis for pesticide degradation revealed by selection, isolation and characterisation of a library of metaldehyde-degrading strains from soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 142, 107702.
- Cheng, C., Liu, W., Hou, K., Zhang, J., Du, Z., Li, B., & Zhu, L. (2023).** Ecological safety evaluation of chlorpyrifos on agricultural soil: Effects on soil microbes. *Applied Soil Ecology*, 189, 104954.

- Cheng, Y., Lv, Y., Zhao, X., Lu, Y., Jiao, T., Ma, T., & Fu, Y. (2025).** Multidimensional toxicity of organophosphate pesticides and mitigation strategies for agricultural sustainability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 73(29), 18047–18062.
- Chino-Flores, C., Dantán-González, E., Vázquez-Ramos, A., Tinoco-Valencia, R., Díaz-Méndez, R., Sánchez-Salinas, E., Castrejón-Godínez, M. L., Ramos-Quintana, F., & Ortiz-Hernández, M. L. (2012).** Isolation of the *opdE* gene that encodes for a new hydrolase of *Enterobacter* sp. capable of degrading organophosphorus pesticides. *Biodegradation*, 23(3), 387–397.
- Chishti, Z., & Arshad, M. (2013).** Growth linked biodegradation of chlorpyrifos by *Agrobacterium* and *Enterobacter* spp. *International Journal of Agriculture and Biology*, 15(1), 19–26.
- Chu, X. Y., Wu, N. F., Deng, M. J., Tian, J., Yao, B., & Fan, Y. L. (2006).** Expression of organophosphorus hydrolase OPHC2 in *Pichia pastoris*: Purification and characterization. *Protein Expression and Purification*, 49(1), 9–14.
- Chu, Y.-H., Li, Y., Wang, Y.-T., Li, B., & Zhang, Y.-H. (2018).** Investigation of interaction modes involved in alkaline phosphatase and organophosphorus pesticides via molecular simulations. *Food Chemistry*, 254, 80–86.
- Cingolani, P., Platts, A., Wang, L. L., Coon, M., Nguyen, T., Wang, L., Land, S. J., Lu, X., & Ruden, D. M. (2012).** A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w¹¹¹⁸; iso-2; iso-3. *Fly*, 6(2), 80–92.
- Collee, J.G., Fraser, A.G., Marmion, B.P. and Simmons, A. (1996)** Mackie and MacCartney Practical Medical Microbiology. 14th Edition, Churchill Livingstone, New York.
- Costa, L. G. (2018).** Organophosphorus compounds at 80: Some old and new issues. *Toxicological Sciences*, 162(1), 24–35.

- Cruz VH, Simionatto HH, Ribeiro ER, Frias YA, Valério TS and Lopes PRM. (2026).** Multifunctional biological approaches for enhanced pesticide removal in agroecosystems: a path toward soil remediation. *Front. Agron.* 7: 1686748.
- Cycoń M, Mrozik A, and Piotrowska-Seget Z. (2017).** Bioaugmentation as a strategy for the remediation of pesticide-polluted soil: A review. *Chemosphere* 172, 52–71.
- Cycoń M. (2026).** Bioaugmentation as microbiome engineering: a framework for evaluating functional performance, persistence, and safety. *Front Microbiol.* 2026 17:1835468.
- Das R, Saikia K, Sarma PP, Devi R, and Thakur D. (2024).** Evaluating the potential of *Bacillus* isolates for chlorpyrifos degradation and their role in tea growth promotion and suppression of pathogens. *Curr. Microbiol.* 81, 332.
- Daumann, L. J., Larrabee, J. A., Ollis, D., Schenk, G., & Gahan, L. R. (2014).** Immobilization of the enzyme GpdQ on magnetite nanoparticles for organophosphate pesticide bioremediation. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 131, 1–7.
- Dayan, F.E., Barker, A.L., Bough, R., Ortiz, M.F., Takano, H.K., & Duke, S.O. (2019).** Herbicide Mechanisms of Action and Resistance. *Comprehensive Biotechnology.* 4, 36-48.
- Dubey KK and Fulekar MH. (2012).** Chlorpyrifos bioremediation in Pennisetum rhizosphere by a novel potential degrader *Stenotrophomonas maltophilia* MHF ENV20. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 1715–1725.
- Dunon, V., Bers, K., Lavigne, R., Top, E. M., & Springael, D. (2018).** Targeted metagenomics demonstrates the ecological role of IS1071 in bacterial community adaptation to pesticide degradation. *Environmental Microbiology*, 20(11), 4091–4111.
- Eaton DL, Daroff RB, Autrup H, Bridges J, and Buffler P, et al. (2008).** Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. *Crit. Rev. Toxicol.* 38, 1–125.

- Eawag-BBD. (2011).** Malathion pathway map. EAWAG Biocatalysis/Biodegradation Database.
- Efremenko, E., Stepanov, N., Maslova, O., Senko, O., Aslanli, A., & Lyagin, I. (2022).** "Unity and struggle of opposites" as a basis for the functioning of synthetic bacterial immobilized consortium that continuously degrades organophosphorus pesticides. *Microorganisms*, 10(7), 1394.
- El-Helow, E. R., Badawy, M. E. I., Mabrouk, M. E. M., Mohamed, E. A. H., & El-Beshlawy, Y. M. (2013).** Biodegradation of chlorpyrifos by a newly isolated *Bacillus subtilis* strain, Y242. *Bioremediation Journal*, 17(2), 113–123.
- Elkarrach, K., Merzouk, B., & Ziat, M. (2023).** Treatment of tannery effluent by adsorption onto fly ash released from thermal power stations: Characterisation, optimization, kinetics, and isotherms. *Heliyon*, 9(1), e12687.
- El-Sesy, M. E., Ewida, A. Y., Liu, L., Liu, H., Chen, Y., & Zhao, Y. (2026).** Biodegradation of Malathion and Chlorpyrifos by *Pseudomonas Putida* for Water Purification: Optimization and Application. *Int J Environ Res* 20, 69.
- EPA, United States Environmental Protection Agency. (2024).** Chlorpyrifos; tolerance revocations; notice of data availability and request for comment. *Fed Regist.* 89: 8075–8077.
- EPA, United States Environmental Protection Agency. (2025).** Basic Information about Pesticide Ingredients. <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/basic-information-about-pesticide-ingredients>,
- EPA, United States Environmental Protection Agency. (2026).** Pesticide Registration Manual. <https://www.epa.gov/pesticide-registration/pesticide-registration-manual>
- Estrada-Gamboa, J., Umaña-Castro, R., Sancho-Blanco, C., & Orozco-Aceves, M. (2023).** Isolation, identification, and characterization of bacterial strains with potential for degradation of the pesticides chlorothalonil and chlorpyrifos. *Uniciencia*, 37(1), 1–16.

- European Commission. (2021).** Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed (Document No. SANTE/11312/2021). Directorate-General for Health and Food Safety.
- FAO, Food and Agriculture Organization. (2023).** The State of Food and Agriculture 2023. Revealing the true cost of food to transform agrifood systems. Rome. <https://doi.org/10.4060/cc7724en>
- FAO, Food and Agriculture Organization. (2025).** Pesticide details. In FAO Pesticide Database. Retrieved from <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/pesticides/en/>
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2026).** Pesticides use and trade – 1990–2024 (FAOSTAT Analytical Briefs No. 131). FAO.
- Farhan, M., Ahmad, M., Kanwal, A., Butt, Z. A., Khan, Q. F., Raza, S. A., Qayyum, H. and Wahid, A. (2021).** Biodegradation of chlorpyrifos using isolates from contaminated agricultural soil, its kinetic studies. *Sci Rep* 11, 10320.
- Felsenstein J. (1985).** Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783–791.
- Fenibo EO and Matambo T. (2025).** Biopesticides for sustainable agriculture: feasible options for adopting cost-effective strategies. *Front. Sustain. Food Syst.* 9:1657000.
- Fouad, M. R. (2026).** The impact of pesticides on honey bees: A review. *Sociobiology*, 73(1), 12098.
- Gaonkar, O., Nambi, I. M., & Suresh Kumar, G. (2019).** Biodegradation kinetics of dichlorvos and chlorpyrifos by enriched bacterial cultures from an agricultural soil. *Bioremediation Journal*, 23(4), 259–276.
- Garud, A., Pawar, S., Patil, M. S., Kale, S. R., & Patil, S. (2024).** A Scientific Review of Pesticides: Classification, Toxicity, Health

- Effects, Sustainability, and Environmental Impact. *Cureus*, 16(8), e67945.
- Gervais, J. A.; Luukinen, B.; Buhl, K.; Stone, D. (2009).** Malathion Technical Fact Sheet; National Pesticide Information Center, Oregon State University Extension Services.
- Ghorab, M. A., Khalil, M. S., El-Sayyad, G. S., Nada, H. G., Elfadil, D., El-Sherif, D. M., Gaballah, M. S., Elgarahy, A. M., Abouelnasr, H. S., Saleh, D. M., Liu, M., & Chen, S. (2026).** Microbial degradation of organophosphorus pesticides: mechanisms, environmental impacts, and future perspectives. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 42(6), 1–20.
- Gilani, R. A., Rafique, M., Rehman, A., Munis, M. F., Rehman, S. U., & Chaudhary, H. J. (2016).** Biodegradation of chlorpyrifos by bacterial genus *Pseudomonas*. *Journal of Basic Microbiology*, 56(2), 105–119.
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2012).** *Molecular cloning: A laboratory manual* (4th ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2019).** Agarose gel electrophoresis. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(1), pdb.prot100404.
- Gupta, R. C. (2015).** *Handbook of toxicology of chemical warfare agents* (2nd ed.). Academic Press.
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013).** QUASt: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 29(8), 1072–1075.
- Hamrouni, R., Regus, F., Farnet Da Silva, A. M., Orsiere, T., Boudenne, J. L., Laffont-Schwob, I., ... Dupuy, N. (2025).** Current status and future trends of microbial and nematode-based biopesticides for biocontrol of crop pathogens. *Critical Reviews in Biotechnology*, 45(2), 333–352.
- Harringer M and Alfreider A. (2021).** Primer evaluation and development of a droplet digital PCR protocol

- targeting amoA genes for the quantification of comammox in lakes. Sci. Rep. 11, 2982.
- Harshitha, C. P., Narendra Kumar, H. K., Chandra Mohana, N., & Satish, S. (2024).** Biodegradation of monocrotophos by *Stenotrophomonas maltophilia* and its potential in vitro plant growth promoting activities. *The Microbe*, 4, 100101.
- Hayes, TB and Hansen, M. (2017).** From silent spring to silent night: Agrochemicals and the anthropocene. *Elem Sci Anth*, 5: 57.
- Hernández Castellanos, J. L., Cuervo González, R., Montañez Soto, J. L., Hernández Castellanos, N. D., Pérez Vargas, M. A., Cruz Hernández, A., & Chaires Martínez, L. (2021).** Biodegradation of organophosphate and organochlorine pesticides by *Candida tropicalis* and *Stenotrophomonas maltophilia* in soil microcosms. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 37, 1–12.
- Hodgson, E. (2004).** A textbook of modern toxicology (3rd ed.). Wiley-Interscience.
- Horne I, Sutherland TD, Harcourt RL, Russell RJ, and Oakeshott JG. (2002).** Identification of an opd (organophosphate degradation) gene in an *Agrobacterium* isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3371–3376.
- Hou, K., Cheng, C., Shi, B., Liu, W., Du, Z., Li, B., Wang, J., & Wang, J. (2023).** New insights into the effects of chlorpyrifos on soil microbes: Carbon and nitrogen cycle related microbes in wheat/maize rotation agricultural field. *Environmental Pollution*, 318, 120908.
- Huang, Y., Xiao, L., Li, F., Xiao, M., Lin, D., Long, X., & Wu, Z. (2018).** Microbial degradation of pesticide residues and an emphasis on the degradation of cypermethrin and 3-phenoxy benzoic acid: A review. *Molecules*, 23(9), 2313.
- Huang, Y., Zhang, W., Pang, S., Chen, J., Bhatt, P., Mishra, S., & Chen, S. (2021).** Insights into the microbial degradation and catalytic mechanisms of chlorpyrifos. *Environmental Research*, 194, 110660.

- Illumina, Inc. (2026).** Illumina DNA Prep reference guide (Document No. 1000000025416). Illumina.
- Ishag AE, Abdelbagi AO, Hammad AM, Elsheikh EA, and Elsaid OE, et al. (2016).** Biodegradation of chlorpyrifos, malathion, and dimethoate by three strains of bacteria isolated from pesticide-polluted soils in Sudan. *J. Agric. Food Chem.* 64, 8491–8498.
- Iyer, R., Iken, B., & Damania, A. (2013).** A comparison of organophosphate degradation genes and bioremediation applications. *Environmental Microbiology Reports*, 5(6), 787–798.
- Iyer, R., Iken, B., Damania, A. et al. (2018).** Whole genome analysis of six organophosphate-degrading rhizobacteria reveals putative agrochemical degradation enzymes with broad substrate specificity. *Environ Sci Pollut Res* 25, 13660–13675.
- Jaiswal, D.K., Krishna, R., Singh, S., Belwal, T., Verma, J.P., Yadav, J. (2021).** Toxicity of Organophosphate Pesticide on Soil Microorganism: Risk Assessments Strategies. In: Singh, K.P., Jahagirdar, S., Sarma, B.K. (eds) *Emerging Trends in Plant Pathology*. Springer, Singapore.
- Jaiswal, S., Singh, B., Dhingra, I., Joshi, A., & Kodgire, P. (2024).** Bioremediation and bioscavenging for elimination of organophosphorus threats: An approach using enzymatic advancements. *Environmental Research*, 252(Pt 2), 118888.
- Jiang, B., Zhang, N., Xing, Y., Lian, L., Chen, Y., Zhang, D., Li, G., Sun, G., & Song, Y. (2019).** Microbial degradation of organophosphorus pesticides: Novel degraders, kinetics, functional genes, and genotoxicity assessment. *Environmental Science and Pollution Research International*, 26(21), 21668–21681.
- John EM and Shaik JM. (2015).** Chlorpyrifos: Pollution and remediation. *Environ. Chem. Lett.* 13, 269–291.

- John, E. M., Sreekumar, J., & Jisha, M. S. (2016).** Optimization of chlorpyrifos degradation by assembled bacterial consortium using response surface methodology. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 25(6), 668–682.
- Jokanović, M., Oleksak, P., & Kuca, K. (2023).** Multiple neurological effects associated with exposure to organophosphorus pesticides in man. *Toxicology*, 484, 153407.
- Kalenik, S., Zaczek, A., and Rodacka, A. (2026).** Chlorpyrifos and Chlorpyrifos-Oxon: A Widening Spectrum of Toxicity. *International Journal of Molecular Sciences*, 27(9), 3909.
- Karpouzas DG and Singh BK. (2006).** Microbial degradation of organophosphorus xenobiotics: Metabolic pathways and molecular basis. *Adv. Microb. Physiol.* 51, 119–185.
- Karpouzas, D. G., & Walker, A. (2000).** Factors influencing the ability of *Pseudomonas putida* strains epI and II to degrade the organophosphate ethoprophos. *Journal of Applied Microbiology*, *89*(1), 40–48.
- Karthick Rajan, D., Mohan, K., Rajarajeswaran, J., Divya, D., Thanigaivel, S., & Zhang, S. (2024).** Toxic effects of organophosphate pesticide monocrotophos in aquatic organisms: A review of challenges, regulations and future perspectives. *Environmental research*, 244, 117947. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.117947>
- Katoh K and Standley DM. (2013).** MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30, 772–780.
- KaviKarunya, S., & Reetha, D. (2012).** Biological degradation of chlorpyrifos and monocrotophos by bacterial isolates. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, *3*(3), 685–691.
- Khursheed, A., Rather, M. A., Jain, V., Wani, A. R., Rasool, S., Nazir, R., Malik, N. A., & Majid, S. A. (2022).** Plant based natural products as potential ecofriendly and safer biopesticides: A

comprehensive overview of their advantages over conventional pesticides, limitations and regulatory aspects. Microbial pathogenesis, 173(Pt A), 105854.

Kiran M, Sindhu R, Raju NS, and Supreeth M. (2025). Recent advances in biological removal of chlorpyrifos from the environment. Int. J. Environ. Res. 19, 187.

Kosimov, D., Ergashev, R., Mavjudova, A., & Kuziev, S. (2025). Organophosphorus Pesticide Degradation by Microorganisms: A Review. Frontiers in bioscience (Elite edition), 17(3), 38805.

Kosimov, D., Zaynitdinova, L., Mavjudova, A., Muminov, M., & Shukurov, O. (2024). Isolation, identification and use of the bacterial strain Ochrobactrum intermedium PDB-3 for the degradation of the pesticide chlorpyrifos. Microbiology and Biotechnology Letters, 52(1), 44–55.

Krieger, R. (2010). Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology, Third Edition. Academic Press.

Kumar G, Lal S, Soni SK, Maurya SK, Shukla PK, Chaudhary P, Bhattacharjee AK, Garg N. (2022). Mechanism and kinetics of chlorpyrifos co-metabolism by using environment restoring microbes isolated from rhizosphere of horticultural crops under subtropics. Front Microbiol. 13, 891870.

Kumar, P., Arshad, M., Gacem, A., Soni, S., Singh, S., Kumar, M., Yadav, V. K., Tariq, M., Kumar, R., Shah, D., Wanale, S. G., Al Mesfer, M. K. M., Bhutto, J. K., & Yadav, K. K. (2023). Insight into the environmental fate, hazard, detection, and sustainable degradation technologies of chlorpyrifos-an organophosphate pesticide. Environmental Science and Pollution Research, 30(50), 108347–108369.

Kumar, S. S., Ghosh, P., Malyan, S. K., Sharma, J., & Kumar, V. (2019). A comprehensive review on enzymatic degradation of the organophosphate pesticide malathion in the environment. Journal of Environmental Science and Health, Part C, 37(4), 288–329.

- Kumaraswamy, S. and Huang, Y. (2026).** Plant resistance: scientific basis and latest research progress. *Front. Plant Sci.* 17:1789793.
- Kuppan, N., Padman, M., Mahadeva, M., Srinivasan, S., & Devarajan, R. (2024).** A comprehensive review of sustainable bioremediation techniques: Eco friendly solutions for waste and pollution management. *Waste Management Bulletin*, 2(3), 154–171.
- Lamichhane, J. R. (2017).** Pesticide use and risk reduction in European farming systems with IPM: An introduction to the special issue. *Crop Prot*, 97, 1-6.
- Lagiso, T. L., Woldesemayat, A. A., & Gemta, Z. B. (2026).** Biodegradation of chlorpyrifos by the newly isolated *Escherichia fergusonii* and *Clostridium bifermentans*: Identification and growth optimization for bioremediation. *Scientific Reports*, 16, 16768.
- Lakshmi, C. V., Kumar, M., & Khanna, S. (2008).** Biotransformation of chlorpyrifos and bioremediation of contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62(2), 204–209.
- Letunic I and Bork P. (2021).** Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res.* 49, W293–W296.
- Maharana, B., Mahalle, S., Bhende, R., & Dafale, N. A. (2025).** Repercussions of prolonged pesticide use on natural soil microbiome dynamics using metagenomics approach. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 197(1), 73–93.
- Mahon, C. R., & Lehman, D. C. (2019).** Textbook of diagnostic microbiology (6th ed.). Elsevier.
- Makamure, S., Mudau, L. S., Morodi, T. J., & Mokoena, M. M. (2023).** A systematic review on pesticide residue contamination of groundwater coupled with human health risk assessment in Africa. *Pan-African Journal of Health and Environmental Science*, 2(2), 70–93.

- Mali, H., Shah, C., Raghunandan, B. H., Prajapati, A. S., Patel, D. H., Trivedi, U., & Subramanian, R. B. (2023).** Organophosphate pesticides an emerging environmental contaminant: Pollution, toxicity, bioremediation progress, and remaining challenges. *Journal of Environmental Sciences*, 127, 234–250.
- Marei, G. I. Kh., Mohammed, Y. M. M., Rabea, E. I., & Badawy, M. E. I. (2018).** Isolation, characterisation and efficacy of the bacterial strain *Lysinibacillus sphaericus* YMM in biodegradation of malathion insecticide in liquid media. *International Journal of Environmental Studies*, 76(4), 616–633.
- Marei, G. I. Kh., Mohammed, Y. M. M., Rabea, E. I., & Badawy, M. E. I. (2019).** Isolation, characterisation and efficacy of the bacterial strain *Lysinibacillus sphaericus* YMM in biodegradation of malathion insecticide in liquid media. *International Journal of Environmental Studies*, 76(4), 616–633.
- Martínez-Burgos, W. J., Porto de Souza Vandenberghe, L., Murawski de Mello, A. F., de Carvalho, J. C., Valladares-Diestra, K. K., Manzoki, M. C., Scapini, T., Pozzan, R., Liew, R. K., Thomaz-Soccol, V., & Soccol, C. R. (2024).** Bioremediation strategies against pesticides: An overview of current knowledge and innovations. *Chemosphere*, 364, 142867.
- Matthews, G. A. (2016).** Pesticides: Health, safety and the environment (2nd ed.). Wiley-Blackwell.
- Mol HGJ, Rooseboom A, van Dam R, Roding M, and Arondes K, et al. (2007).** Modification and re-validation of the ethyl acetate-based multi-residue method for pesticides in produce. *Anal. Bioanal. Chem.* 389, 1715–1754.
- Montgomery, D. C. (2020).** Design and analysis of experiments (10th ed.). John Wiley & Sons.
- Mori H, Maruyama F, Kato H, Toyoda A, and Dozono A, et al. (2014).** Design and experimental application of a novel non-degenerate universal primer set that amplifies prokaryotic

- 16S rRNA genes with a low possibility to amplify eukaryotic rRNA genes. DNA Res. 21, 217–227.
- Nandhini, A. R., Harshiny, M., & Gummadi, S. N. (2021).** Chlorpyrifos in environment and food: a critical review of detection methods and degradation pathways. Environmental science. Processes & impacts, 23(9), 1255–1277.
- Nayak, T., Panda, A.N., Kumari, K. et al. (2020).** Comparative Genomics of a Paddy Field Bacterial Isolate *Ochrobactrum* sp. CPD-03: Analysis of Chlorpyrifos Degradation Potential. Indian J Microbiol 60, 325–333.
- Ore, O. T., Adeola, A. O., Bayode, A. A., Adedipe, D. T., & Nomngongo, P. N. (2023).** Organophosphate pesticide residues in environmental and biological matrices: Occurrence, distribution and potential remedial approaches. Environmental Chemistry and Ecotoxicology, 5, 9-23.
- Pathak, V. M., Verma, V. K., Rawat, B. S., Kaur, B., Babu, N., Sharma, A., Dewali, S., Yadav, M., Kumari, R., Singh, S., Mohapatra, A., Pandey, V., Rana, N., & Cunill, J. M. (2022).** Current status of pesticide effects on environment, human health and it's eco-friendly management as bioremediation: A comprehensive review. Frontiers in microbiology, 13, 962619.
- Pan, Q., Li, Y., Zhang, J., Hu, T., Hou, Y., & Tang, S. (2024).** Mechanisms of oxidative response during biodegradation of malathion by *S. oneidensis* MR-1. Environmental science and pollution research international, 31(11), 16832–16845.
- Pashirova, T., Salah-Tazdaït, R., Tazdaït, D., & Masson, P. (2024).** Applications of microbial organophosphate-degrading enzymes to detoxification of organophosphorous compounds for medical countermeasures against poisoning and environmental remediation. International Journal of Molecular Sciences, 25(14), 7822.
- Pérez-Lucas, G., Vela, N., El Aatik, A., & Navarro, S. (2019).** Environmental Risk of Groundwater Pollution by Pesticide

Leaching through the Soil Profile. In Pesticides - Use and Misuse and Their Impact in the Environment. IntechOpen.

Petroianu G. A. (2010). History of organophosphate synthesis: the very early days. *Die Pharmazie*, 65(4), 306–311.

Phillips JP, Xin JH, Kirby K, Milne CP, and Krell P, et al. (1990). Transfer and expression of an organophosphate insecticide-degrading gene from *Pseudomonas* in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 8155–8159.

Pickering, L., Castro-Gutierrez, V., Holden, B., Haley, J., Jarvis, P., Campo, P., & Hassard, F. (2024). How bioaugmentation for pesticide removal influences the microbial community in biologically active sand filters. *Chemosphere*, 363, 142956.

Pincus, D.H. (2013). Microbial identification using the biomerieuxVITEK® 2 system. In: Miller, M.J. *Encyclopedia of rapid microbiological methods volume 4*. DHI Publishing, LL River Grove, IL, USA.

Prani, M., Cantoni, B., de Ridder, D.J., Antonelli, M., Jouke E. Dykstra, J. & van der Wal, A. (2026). Which natural organic matter components limit PFAS removal by activated carbon? *Chemical Engineering Journal*, 520, 178076.

Prathiksha, J., Narasimhamurthy, R. K., Dsouza, H. S., & Mumbreakar, K. D. (2023). Organophosphate pesticide-induced toxicity through DNA damage and DNA repair mechanisms. *Molecular biology reports*, 50(6), 5465–5479.

Procop, G. W., Church, D. L., Hall, G. S., Janda, W. M., Koneman, E. W., Schreckenberger, P. C., & Woods, G. L. (2017). Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology (7th ed.). Wolters Kluwer Health.

Qattan, S. Y. A. (2025). Harnessing bacterial consortia for effective bioremediation: Targeted removal of heavy metals, hydrocarbons, and persistent pollutants. *Environmental Sciences Europe*, 37, 85.

- Raffa, C. M., & Chiampo, F. (2021).** Bioremediation of Agricultural Soils Polluted with Pesticides: A Review. *Bioengineering*, 8(7), 92.
- Raj, A., & Kumar, A. (2022).** Recent advances in assessment methods and mechanism of microbe-mediated chlorpyrifos remediation. *Environmental Research*, 214(Pt 4), 114011.
- Rani K and Dhanial G. (2014).** Bioremediation and biodegradation of pesticide from contaminated soil and water – A novel approach. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 3, 23–33.
- Ren, R., Zhai, L., Tian, Q., Meng, D., Guan, Z., Cai, Y., & Liao, X. (2021).** Identification of a novel glycerophosphodiester phosphodiesterase from *Bacillus altitudinis* W3 and its application in degradation of diphenyl phosphate. *3 Biotech*, 11(4), 186.
- Rodríguez, A., Castrejón-Godínez, M. L., Salazar-Bustamante, E., Gama-Martínez, Y., Sánchez-Salinas, E., Mussali-Galante, P., Tovar-Sánchez, E., & Ortiz-Hernández, M. L. (2020).** Omics approaches to pesticide biodegradation. *Current Microbiology*, 77(4), 545–563.
- Rumi, S.S., Liyanage, S. & Abidi, N. (2024).** Soil burial-induced degradation of cellulose films in a moisture-controlled environment. *Sci Rep* 14, 6921.
- Saad H, Elfeky SA, El-Gamel NEA, and Abo Dena AS. (2025).** Organophosphate pesticides: A review on classification, synthesis, toxicity, remediation and analysis. *RSC Adv.* 15, 40802–40822.
- Sadia, M., Mohsin, M., Rehman, M. S. U., Iqbal, Z., Rehman, A., & Naheed, N. (2023).** Organophosphate pesticides use and contamination in groundwater of Pakistan: A review. *The Nucleus*, 60(1), 98–107.
- Sami SA, Akter B, Nirob MNH, Jahan I, and Lokman M, et al. (2025).** A comprehensive review on environmental dynamics of chlorpyrifos: Fate, toxicity, remediation, and regulatory aspects. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 308, 119484.

- Sánchez-Bayo, F. (2012).** Insecticides mode of action in relation to their toxicity to non-target organisms. *Journal of Environmental and Analytical Toxicology*, S4, 1–11.
- Schofield, D. A., & DiNovo, A. A. (2010).** Generation of a mutagenized organophosphorus hydrolase for the biodegradation of the organophosphate pesticides malathion and demeton-S. *Journal of Applied Microbiology*, 109(2), 548–557.
- Scholz HC, Al Dahouk S, Tomaso H, Neubauer H, and Witte A, et al. (2008).** Genetic diversity and phylogenetic relationships of bacteria belonging to the *Ochrobactrum*–*Brucella* group by *recA* and 16S rRNA gene-based comparative sequence analysis. *Syst. Appl. Microbiol.* 31, 1–16.
- Shaizee., Siddiqui, A., Ahmad, S., and Afaq, U. (2025).** Innovations in Biopesticides: The Role of Plant-Based Biopesticides in Sustainable Agriculture. *Journal of Biopesticides*. 18(1):18-35.
- Sharma, A. K., & Pandit, J. (2023).** Advanced bioremediation strategies for organophosphorus compounds. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 51(4), 374–389.
- Sharma, S. K., Kumar, R., Vaishnav, A., Sharma, P. K., Singh, U. B., & Sharma, A. K. (2017).** Microbial cultures: Maintenance, preservation and registration. In A. Varma, A. K. Sharma, & S. K. Sharma (Eds.), *Modern tools and techniques to understand microbes* (pp. 335–367). Springer International Publishing.
- Sharma, U., Pal, D., & Prasad, R. (2014).** Alkaline phosphatase: An overview. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 29(3), 269–278.
- Shekhar, C., Khosya, R., Thakur, K., Mahajan, D., Kumar, R., Kumar, S., & Sharma, A. K. (2024).** A systematic review of pesticide exposure, associated risks, and long-term human health impacts. *Toxicology reports*, 13, 101840.
- Shoman R, Aggag S, and Yacout M. (2022).** Biodegradation of chlorpyrifos by some bacterial strains and screening their degraded genes. *J. Agric. Chem. Biotechnol.* 13, 1–7.

- Singh BK and Walker A. (2006).** Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 428–471.
- Singh, B., Kaur, J., & Singh, K. (2012).** Transformation of malathion by *Lysinibacillus* sp. isolated from soil. *Biotechnology Letters*, 34(5), 863–867.'
- Singh, B., Kaur, J., & Singh, K. (2013).** Microbial degradation of an organophosphate pesticide, malathion. *Critical Reviews in Microbiology*, 40(2), 1–9.
- Soleman, S. R., Jeem, Y. A., Faruqi, M. F. B. A., Kasyiva, M., Widyasari, V., Kuswati, K., Djunet, N. A., Rizkawati, M., & Handayani, E. S. (2024).** Effect of pesticide exposure on stunting incidence: a systematic review and meta-analysis. *Clinical and experimental pediatrics*, 67(10), 510–518.
- Soto-Barajas, M.C., Archundia, D., Martínez, O.G., López, E., Almazan, J., & Prado, B. (2025).** Current and Future Perspectives on Biopesticides Analysis in Soil. *Journal of Natural Pesticide Research*. 12, 100120.
- Sparks, T. C., and Nauen, R. (2015).** IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pesticide biochemistry and physiology*, 121, 122–128.
- Sparling, D. W. (2017).** Basics of ecotoxicology. (1st Ed). CRC Press.
- Srivastava, S., Mir, R. A., Hussain, S. J., Mitra, S., Srivastava, S., Kumar, P., & Kaur, H. (2026).** Microbial engineering for pesticide degradation: current insights and future directions for sustainable agriculture. *Frontiers in microbiology*, 17, 1751932.
- Stackebrandt, E., & Ebers, J. (2006).** Taxonomic parameters revisited: Tarnished gold standards. *Microbiology Today*, 33, 152–155.
- Stamatakis A. (2014).** RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30, 1312–1313.

- Stenersen, J.H. (2004).** Chemical Pesticides: Mode of Action and Toxicology.
- Tang, X., Waheed, M., Xu, Q., Liu, X., Xie, R., Geng, A., & Zhu, D. (2026).** Screening of organophosphorus pesticide-degrading bacteria and a ratio-optimized consortium for efficient phoxim and malathion removal with pathway inference. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 214, 106419.
- Tatusova, T., DiCuccio, M., Badretdin, A., Chetvernin, V., Nawrocki, E. P., Zaslavsky, L., Lomsadze, A., Pruitt, K. D., Borodovsky, M., & Ostell, J. (2016).** NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Research*, 44(14), 6614–6624.
- Tehara, S. K., & Keasling, J. D. (2003).** Gene cloning, purification, and characterization of a phosphodiesterase from *Delftia acidovorans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), 504–508.
- Thermo Fisher Scientific. (2015).** Qubit fluorometric quantitation [Brochure]. Thermo Fisher Scientific.
- Tiryaki, O., & Temur, C. (2010).** The fate of pesticide in the environment. *Journal of Biological and Environmental Sciences*, 4(10), 29–38.
- Tudi, M., Daniel Ruan, H., Wang, L., Lyu, J., Sadler, R., Connell, D., Chu, C., & Phung, D. T. (2021).** Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(3), 1112.
- Tzilivakis, J., Lewis, K. A., Green, A., & Warner, D. J. (2026).** A decade of growth and impact of the Pesticide Properties Database (PPDB). *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 32(4). 1–26.
- Varghese, D. M., Rubiyatno, Lie, M., Kristanti, R. A., Ruti, A. A., Nadifah, G., Hossain, F. M. A., Jannat, M. A. H., Chairattanawat, C., & Direstiyani, L. C. (2025).** The role of microorganisms in the degradation of pesticides: A sustainable

- approach to soil remediation. *Tropical Aquatic and Soil Pollution*, 5(1), 34–52.
- Verma S, Singh D, Chatterjee S. (2021).** Malathion biodegradation by a psychrotolerant bacteria *Ochrobactrum* sp. M1D and metabolic pathway analysis. *Lett Appl Microbiol.* Sep;73(3):326-335.
- Wang, L. and Sun, Y. (2021).** Engineering organophosphate hydrolase for enhanced biocatalytic performance: A review. *Biochemical Engineering Journal* 168:107945.
- Wang, Y., Wang, L., & Li, Y. (2025).** Organophosphorus pesticides management strategies: Prohibition and restriction multi-category multi-class models, environmental transformation risks, and special attention list. *Toxics*, 13(1), 16.
- Ware, G. W., & Whitacre, D. M. (2004).** The pesticide book (6th ed.). MeisterPro Information Resources.
- WHO, World Health Organization. (2020).** The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification, 2019 edition. World Health Organization.
- Yang C, Liu N, Guo X, and Qiao C. (2006).** Cloning of mpd gene from a chlorpyrifos-degrading bacterium and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. *FEMS Microbiol. Lett.* 265, 118–125.
- Zalat OA, Elsayed MA, Fayed MS, and Abd El Megid MK. (2014).** Validation of UV spectrophotometric and HPLC methods for quantitative determination of chlorpyrifos. *Int. Lett. Chem. Phys. Astron.* 2, 58–63.
- Zhou, X., Wang, C., Huang, M., Zhang, J., Cheng, B., Zheng, Y., Chen, S., Xiang, M., Li, Y., Bedia, J., Belver, C., & Li, H. (2024).** A review of the present methods used to remediate soil and water contaminated with organophosphate esters and developmental directions. *Journal of Hazardous Materials*, 475, 134834.

الملاحق

APPENDICES

ملحق (1): نتائج تشخيص عزلات الدراسة بنظام VITEK2

bioMérieux Customer:		Microbiology Chart Report		Printed February 16, 2026 9:39:18 AM CST													
Patient Name: thar, abd				Patient ID: 202614215													
Location:				Physician:													
Lab ID: 202614215				Isolate Number: 2													
Organism Quantity:																	
Selected Organism : <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>																	
Source(s):				Collected:													
Comments:																	
Identification Information		Analysis Time: 4.58 hours		Status: Final													
Selected Organism		95% Probability		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>													
		Biounumber:		1002103003744020													
ID Analysis Messages																	
Biochemical Details																	
2	APPA	+	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	-
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	-	14	GGT	+	15	OFF	-
17	BGLU	+	18	dMAL	-	19	dMAN	-	20	dMNE	-	21	BXYL	-	22	BALap	-
23	PraA	+	26	LIP	+	27	PLE	-	29	TyrA	-	31	URE	-	32	dsOR	-
33	SAC	-	34	dTAU	-	35	dTRE	-	36	CTI	+	37	MNT	+	39	3KO	-
40	ILATk	+	41	AGLU	+	42	SUCT	+	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	+
46	GlyA	-	47	ODC	-	48	LDC	+	53	IHIBa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	OGAA	+	61	IMLTa	-	62	ELIM	-	64	ILATu	-			

bioMérieux Customer:		Microbiology Chart Report		Printed February 16, 2026 9:39:17 AM CST	
Patient Name: thom, abd		Patient ID: 202614213		Physician:	
Location:		Isolate Number: 3			
Lab ID: 202614213					
Organism Quantity:					
Selected Organism : <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>					
Source:				Collected:	
Comments:					
Identification Information		Analysis Time: 4.60 hours		Status: Final	
Selected Organism		92% Probability		Stenotrophomonas maltophilia	
		Biomechanics:		1002105003744020	
ID Analysis Messages					
Biochemical Details					
2	APP	+	3	ADO	-
10	H2S	-	11	BNAG	-
17	BGLU	+	18	BMAL	-
23	PstA	+	26	LIP	+
33	SAC	-	34	ATAG	-
40	ILATk	+	41	AGLU	+
46	GlyA	-	47	ODC	-
58	OTDR	-	59	OGAA	+
6	PyrA	-	7	IARL	-
13	dGLU	-	14	GGT	+
20	dMNE	-	21	BXYL	-
29	TyrA	-	31	URE	-
36	CIT	+	37	MNT	+
43	NAGA	-	44	AGAL	-
53	IHIBa	-	56	CMT	-
62	ELIM	-	64	ILATu	-
12	AGLTp	-	19	IMAN	-
27	PLE	-	35	ITRE	-
38	SUCT	+	42	SUCT	+
48	LDC	+	53	IHIBa	-
61	IMLTa	-	62	ELIM	-
15	OFF	-	22	BALap	-
32	dSOR	-	39	SKO	-
45	PHOS	+	57	BGUR	-

bioMérieux Customer:		Microbiology Chart Report		Printed February 16, 2026 9:59:18 AM CST	
Patient Name: thae, abd				Patient ID: 202614214	
Location:				Physician:	
Lab ID: 202614214				Isolate Number: 4	
Organism Quantity:					
Selected Organism : <i>Stenotrophomonas</i> sp.					
Source:			Collected:		
Comments:					
Identification Information		Analysis Time: 5.82 hours		Status: Final	
Selected Organism		99% Probability		<i>Stenotrophomonas</i> sp.	
		Biounumber:		7002201170101001	
ID Analysis Messages					
Biochemical Details					
2	APPA	+	3	ADO	-
10	H2S	-	11	BNAG	-
17	BGLU	-	18	dMAL	-
23	ProA	+	26	LIP	+
33	SAC	-	34	dTAG	-
40	ILATk	+	41	AGLU	+
46	GlyA	-	47	ODC	-
58	O129R	-	59	GGAA	+
4	PyrA	-	5	IARL	-
12	AGLp	-	13	dGLU	-
19	dMAN	-	20	dMNE	-
27	PLE	-	29	TyrA	-
35	dTRE	-	36	CIT	+
42	SUCT	+	43	NAGA	-
48	LDC	-	53	IHISa	-
61	IMLTa	-	62	ELLM	-
7	dCEL	-	9	BGAL	-
14	GGT	+	15	OFF	-
21	BXYL	-	22	BALap	-
31	URE	-	32	dSOR	-
37	MNT	+	39	5KG	-
44	AGAL	-	45	PHOS	+
56	CMT	-	57	BGUR	-

bioMérieux Customer:		Microbiology Chart Report		Printed February 16, 2026 9:59:18 AM CST	
Patient Name: thae, abd				Patient ID: 20261423	
Location:				Physician:	
Lab ID: 20261423				Isolate Number: 1	
Organism Quantity:					
Selected Organism : <i>Ochrobactrum anthropi</i>					
Source:			Collected:		
Comments:					
Identification Information		Analysis Time: 5.83 hours		Status: Final	
Selected Organism		93% Probability		<i>Ochrobactrum anthropi</i>	
		Biounumber:		600C01120501001	
ID Analysis Messages					
Biochemical Details					
2	APPA	-	3	ADO	+
10	H2S	-	11	BNAG	-
17	BGLU	-	18	dMAL	+
23	ProA	+	26	LIP	-
33	SAC	-	34	dTAG	+
40	ILATk	+	41	AGLU	-
46	GlyA	+	47	ODC	-
58	O129R	-	59	GGAA	-
4	PyrA	+	5	IARL	-
12	AGLp	-	13	dGLU	-
19	dMAN	-	20	dMNE	-
27	PLE	-	29	TyrA	+
35	dTRE	(-)	36	CIT	-
42	SUCT	+	43	NAGA	-
48	LDC	-	53	IHISa	-
61	IMLTa	-	62	ELLM	+
7	dCEL	-	9	BGAL	-
14	GGT	-	15	OFF	-
21	BXYL	-	22	BALap	-
31	URE	+	32	dSOR	-
37	MNT	-	39	5KG	-
44	AGAL	-	45	PHOS	-
56	CMT	-	57	BGUR	-

bioMérieux Customer:		Microbiology Chart Report		Printed February 16, 2026 9:39:11 AM CST	
Patient Name: thae, abd				Patient ID: 20261421	
Location:				Physician:	
Lab ID: 20261421				Isolate Number: 2	
Organism Quantity:					
Selected Organism : <i>Ochrobactrum anthropi</i>					
Source:				Collected:	
Comments:					
Identification Information		Analysis Time: 4.87 hours		Status: Final	
Selected Organism		91% Probability		<i>Ochrobactrum anthropi</i>	
ID Analysis Messages		Bionumber:		60000055 3050 1001	
Biochemical Details					
2	APPA	-	3	ADO	+
10	H2S	-	11	BNAG	-
17	BGLU	-	18	dMAL	-
23	ProA	+	26	LIP	-
33	SAC	+	34	dTAG	+
40	ILATk	+	41	AGLU	(-)
46	GlyA	+	47	ODC	-
58	G129R	-	59	CGAA	-
4	PyrA	+	5	IARL	-
12	AGLTp	-	13	dGLU	-
19	dMAN	-	20	dMNE	-
27	PLE	+	29	TycA	+
35	CTT	-	37	MNT	-
43	NAGA	-	44	AGAL	-
53	IHISa	-	56	CMT	-
62	EELM	+	64	ILATa	-
7	dCEL	-	9	BGAL	-
14	GGT	-	15	OFF	-
21	BXYL	-	22	BAlap	-
31	URE	-	32	dSOR	+
39	5KG	-	45	PHOS	-
57	BGUR	-			

bioMérieux Customer:		Microbiology Chart Report		Printed February 16, 2026 9:39:19 AM CST	
Patient Name: thae, abd				Patient ID: 202614218	
Location:				Physician:	
Lab ID: 202614218				Isolate Number: 1	
Organism Quantity:					
Selected Organism : <i>Bacillus subtilis</i>					
Source:				Collected:	
Comments:					
Identification Information		Analysis Time: 13.80 hours		Status: Final	
Selected Organism		94% Probability		<i>Bacillus subtilis</i>	
ID Analysis Messages		Bionumber:		010402112021031	
Biochemical Details					
1	BXYL	+	3	LysA	-
9	BGAL	+	10	PyrA	+
15	APPA	-	18	CDEx	-
25	ELLM	-	26	MdX	-
32	dMNE	+	34	dMLZ	-
43	BMAN	+	44	PBC	-
50	INU	+	53	dGLU	+
60	OLD	+	61	ESC	+
4	AspA	-	5	LeuA	+
11	AGAL	+	12	AlaA	+
19	dGAL	-	21	GLYG	-
27	AMAN	-	29	MTE	-
35	NAG	-	37	PLE	+
45	PVATE	+	46	AGLU	+
54	dRIB	+	56	PSCNa	-
62	TTZ	+	63	POLYB	+
7	PheA	+	8	ProA	-
13	TycA	+	14	BNAG	-
22	INO	+	24	MdG	+
30	GlyA	+	31	dMAN	+
39	IRHA	-	41	BGLU	+
47	dTAG	-	48	dTRE	+
58	NaCL 6.5%	+	59	KAN	+

bioMérieux Customer:		Microbiology Chart Report		Printed February 16, 2026 9:39:20 AM CST	
Patient Name: thae, abd				Patient ID: 202614224	
Location:				Physician:	
Lab ID: 202614224				Isolate Number: 2	
Organism Quantity:					
Selected Organism : <i>Bacillus subtilis</i>					
Source:			Collected:		
Comments:					
Identification Information		Analysis Time:		13.91 hours	
		Status:		Final	
Selected Organism		91% Probability		<i>Bacillus subtilis</i>	
		Bionumber:		520410754165531	
ID Analysis Messages					
Biochemical Details					
1	BXYL	+	3	LysA	-
9	BGAL	+	10	PyrA	+
15	ADPA	-	18	CDEN	-
23	ELLM	-	26	MdX	-
32	dMNE	+	34	dMLZ	-
43	BMAN	+	44	PBC	(-)
50	INU	+	53	dGLU	+
60	OLD	+	61	ESC	+
4	AspA	-	5	LeuA	+
11	AGAL	+	12	AlaA	+
19	dGAL	-	20	GLY/G	-
27	AMAN	-	29	MTE	-
36	NAG	-	37	PLE	+
45	PVATE	+	46	AGLU	+
54	IRIB	+	55	PSCNa	-
62	TTZ	+	63	POLYB	+
7	PheA	+	8	ProA	-
13	TyrA	+	14	BNAG	(-)
22	INO	+	24	MdG	+
30	GlyA	+	31	dMAN	+
39	IRHA	-	41	BGLU	+
47	dTAG	-	48	dTRE	+
58	NaCL 6.5%	+	59	KAN	+

bioMérieux Customer:		Microbiology Chart Report		Printed February 16, 2026 9:39:30 AM CST	
Patient Name: thae, abd				Patient ID: 202614226	
Location:				Physician:	
Lab ID: 202614226				Isolate Number: 1	
Organism Quantity:					
Selected Organism : <i>Lysinibacillus sphaericus</i>					
Source:			Collected:		
Comments:					
Identification Information		Analysis Time:		12.73 hours	
		Status:		Final	
Selected Organism		91% Probability		<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	
		Bionumber:		170403601763431	
ID Analysis Messages					
Biochemical Details					
1	BXYL	+	3	LysA	-
9	BGAL	+	10	PyrA	+
15	ADPA	+	18	CDEN	-
23	ELLM	-	26	MdX	-
32	dMNE	+	34	dMLZ	-
43	BMAN	-	44	PBC	+
50	INU	+	53	dGLU	+
60	OLD	+	61	ESC	+
4	AspA	-	5	LeuA	+
11	AGAL	-	12	AlaA	+
19	dGAL	+	20	GLY/G	-
27	AMAN	-	29	MTE	-
36	NAG	-	37	PLE	+
45	PVATE	+	46	AGLU	+
54	IRIB	+	55	PSCNa	-
62	TTZ	+	63	POLYB	+
7	PheA	+	8	ProA	-
13	TyrA	-	14	BNAG	-
22	INO	-	24	MdG	+
30	GlyA	+	31	dMAN	+
39	IRHA	-	41	BGLU	+
47	dTAG	-	48	dTRE	+
58	NaCL 6.5%	+	59	KAN	+

bioMérieux Customer:		Microbiology Chart Report		Printed February 16, 2026 9:39:21 AM CST													
Patient Name: hase, abd Location:				Patient ID: 202614228													
Lab ID: 202614228				Physician:													
				Isolate Number: 2													
Organism Quantity:																	
Selected Organism : <i>Lysinibacillus</i> sp.																	
Source:			Collected:														
Comments:																	
Identification Information		Analysis Time: 12.88 hours		Status: Final													
Selected Organism		00% Probability		<i>Lysinibacillus</i> sp.													
		Bionumber:		010022110121030													
ID Analysis Messages																	
Biochemical Details																	
1	BXYL	+	3	LysA	-	4	AspA	-	5	LeuA	+	7	PhcA	-	8	ProA	-
9	BGAL	+	10	PyrA	+	11	AGAL	-	12	AlaA	+	13	TyrA	-	14	BNAG	+
15	APPA	+	18	CDEX	-	19	4GAL	+	21	GLYG	-	22	INO	-	24	MdG	+
25	ELLM	-	26	MdX	-	27	AMAN	-	29	MTE	-	30	GlyA	+	31	dMAN	+
32	dMNE	+	34	dMLZ	-	36	NAG	-	37	PLE	+	39	IRHA	-	41	BGLU	+
43	BMAN	-	44	PBC	+	45	PVATE	+	46	AGLU	+	47	dTAG	-	48	dTRE	+
50	INU	+	53	dGLU	+	54	IRIB	-	56	PSCNa	-	58	NaCL 6.5%	+	59	KAN	+
60	OLD	+	61	ESC	+	62	TTZ	+	63	POLYB	-						

bioMérieux Customer:		Microbiology Chart Report		Printed February 16, 2026 9:39:21 AM CST													
Patient Name: hase, abd Location:				Patient ID: 202614230													
Lab ID: 202614230				Physician:													
				Isolate Number: 3													
Organism Quantity:																	
Selected Organism : <i>Lysinibacillus</i> sp.																	
Source:			Collected:														
Comments:																	
Identification Information		Analysis Time: 12.82 hours		Status: Final													
Selected Organism		06% Probability		<i>Lysinibacillus</i> sp.													
		Bionumber:		070402325731231													
ID Analysis Messages																	
Biochemical Details																	
1	BXYL	+	3	LysA	-	4	AspA	-	5	LeuA	+	7	PhcA	-	8	ProA	-
9	BGAL	+	10	PyrA	+	11	AGAL	-	12	AlaA	+	13	TyrA	-	14	BNAG	-
15	APPA	+	18	CDEX	-	19	4GAL	+	21	GLYG	-	22	INO	-	24	MdG	+
25	ELLM	-	26	MdX	-	27	AMAN	-	29	MTE	-	30	GlyA	+	31	dMAN	+
32	dMNE	+	34	dMLZ	-	36	NAG	+	37	PLE	+	39	IRHA	-	41	BGLU	+
43	BMAN	-	44	PBC	+	45	PVATE	+	46	AGLU	+	47	dTAG	-	48	dTRE	+
50	INU	+	53	dGLU	+	54	IRIB	-	56	PSCNa	-	58	NaCL 6.5%	+	59	KAN	+
60	OLD	+	61	ESC	+	62	TTZ	+	63	POLYB	+						

ملحق (2): صفحات تسجيل عزلات الدراسة في GenBank على موقع NCBI، موضحةً رقم الانضمام

ومعلومات التسلسل المسجلة:

A: العزلة *L. sphaericus*

B: العزلة *S. maltophilia*

C: العزلة *Ochrobactrum* sp.



National Library of Medicine
 National Center for Biotechnology Information

A

Nucleotide

Nucleotide

Advanced

Lysinibacillus sphaericus strain TA1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: PZ485822.1

[FASTA](#) [GenInfo](#)

DATA

LOCUS PZ485822 458 bp DNA linear BCT 08-JUN-2006

DEFINITION Lysinibacillus sphaericus strain TA1 16S ribosomal rRNA gene, partial sequence.

ACCESSION PZ485822

VERSION PZ485822.1

KEYWORDS

SOURCE Lysinibacillus sphaericus

ORGANISM Lysinibacillus sphaericus

Bacteria; Bacillales; Bacillales; Bacilli; Caryophanales; Bacillaceae; Lysinibacillus..

REFERENCE 1 (bases 1 to 458)

AUTHORS D'Amico, T.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (05-JUN-2006) Environmental Sciences, University of Al-Qadisiyah, University street, Al-Hamamiah, Al Qadisiyah 58001, Iraq

COMMENT Sequences were screened for clones by the submitter using MEGA 3.2.

Sequence Data: STAFF

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

Sequence Data: INOUE

FEATURES

Location/Qualifiers

1..458

/organism="Lysinibacillus sphaericus"

/mol_type="genomic DNA"

/strain="TA1"

/db_xref="taxon:1211"

/seq_id="TA1"

/collection_date="22-Oct-2006"

1..458

/product="16S ribosomal RNA"

ORIGIN

1 tcttggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg

61 gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg

121 gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg

181 gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg

241 gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg

301 gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg

361 gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg

421 gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg

//



National Library of Medicine
 National Center for Biotechnology Information

C

Nucleotide

Nucleotide

Advanced

Ochrobactrum sp. strain TA1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: P248992.1
FASTA GenBank

GO ID:

LOCUS: P248992 431 bp DNA Linear 01-NOV-2000

DEFINITION: Ochrobactrum sp. strain TA1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

ACCESSION: P248992

VERSION: P248992.1

KEYWORDS:

SOURCE: Ochrobactrum sp.

ORGANISM: *Ochrobactrum* sp.
Bacteria; Pseudomonadati; Pseudomonadota; Alphaproteobacteria;
Hyphomicrobiales; Brucellaceae; Brucella/Ochrobactrum group;
Ochrobactrum.

REFERENCE: 1 (bases 1 to 431)

AUTHORS: D'achemb, J.

TITLE: Direct Sequencing

JOURNAL: Submitted (03-JUN-2020) Environmental sciences; University of
Al-Qadisiyah, university street, Al-Diwariyah, Al-Qadisiyah 56001,
Iraq

COMMENT: Sequences were screened for chimeras by the submitter using MEGA
12.

FEATURES:

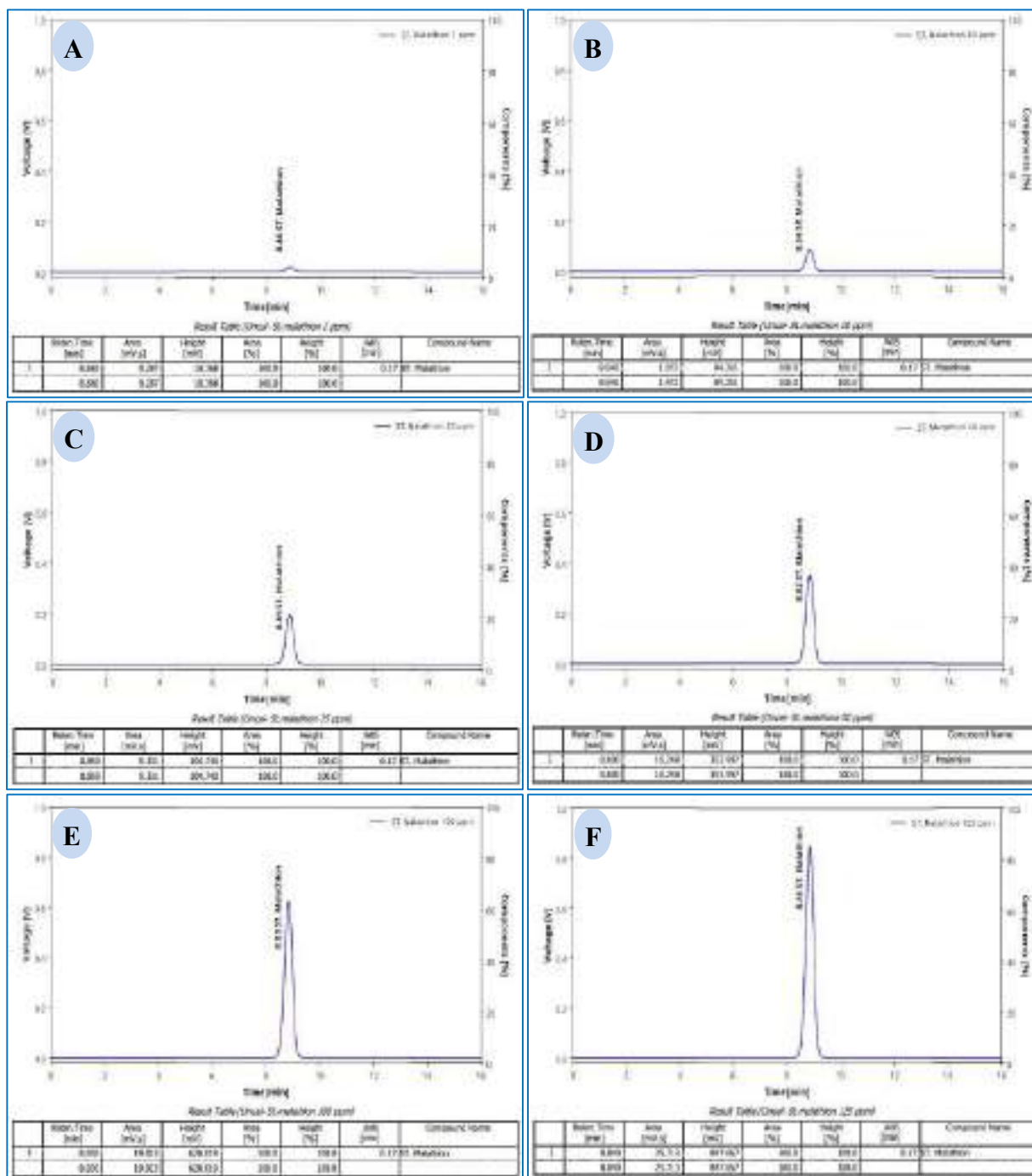
source
 location/qualifiers
 1..431
 /organism="Ochrobactrum sp."
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="TA1"
 /db_xref="taxon:51110"
 /geo_loc_name="Iraq: Al-Diwariyah"
 /collection_date="21-Nov-2000"
 1..431
 /product="16S ribosomal RNA"

ORIGIN

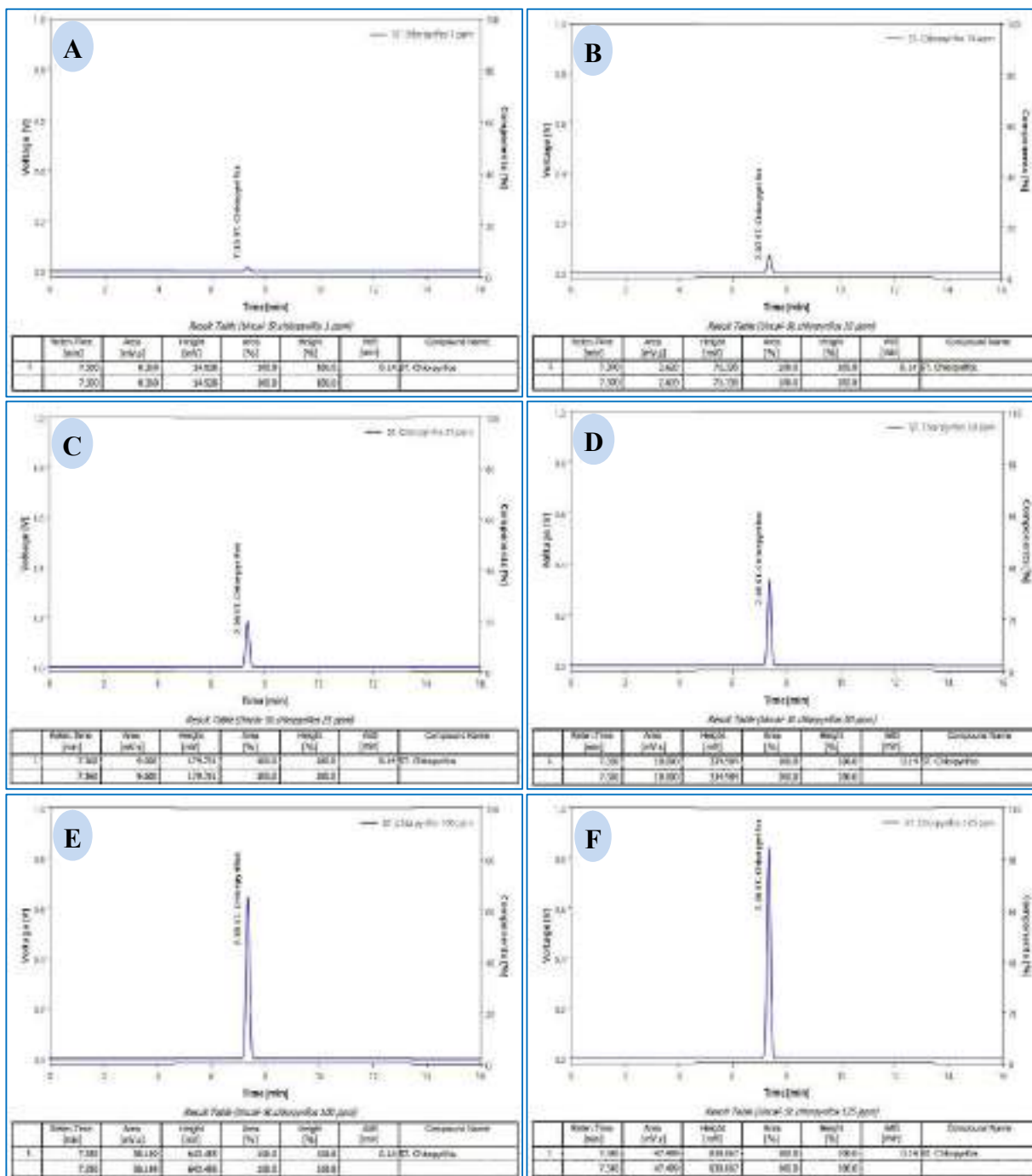
```

1  tttacggggg ggggctgag ggaattatg aroctgggc cagctctgt tcegtatgt
61  cagcggatg atgaggccc taggttga agcttttc accgtgag ataatpccg
121  taacggaga agagccccc gctaatctg tccagcag cgggtata tgaaggggt
181  tagcttgtt cggatttat ggggtaaig cgcagtag cgggtata agtcaagggt
241  gaattccgg gctcaacc cggactgc ttgtactg ttgtttga gcatggaga
301  ggtggtgga atcctgagt tagagtgga atctgagt atcggaga accctgtg
361  agaggggga taatgggac ataatgaig atgagtgga aagctggg ggaagggg
421  gattgatac :
//
            
```

ملحق (3) طيف الامتصاص لمبيد الـ Malathion القياسي باستخدام جهاز HPLC، (A: 1 ملغم/لتر، B: 25 ملغم/لتر، C: 50 ملغم/لتر، D: 100 ملغم/لتر، E: 125 ملغم/لتر، F: 10 ملغم/لتر).



ملحق (4) طيف الامتصاص لمبيد الـ Chlorpyrifos القياسي باستخدام جهاز HPLC، (A: 1 ملغم/لتر، B: 10 ملغم/لتر، C: 25 ملغم/لتر، D: 50 ملغم/لتر، E: 100 ملغم/لتر، F: 125 ملغم/لتر).



ملحق (5) طيف الامتصاص باستخدام جهاز HPLC لمتبقيات مبيدي الـ Chlorpyrifos و Malathion

خلال 2- 10 ايام من الحضانة عند 30 م°، pH 7 وتركيز 100 ملغم/لتر:

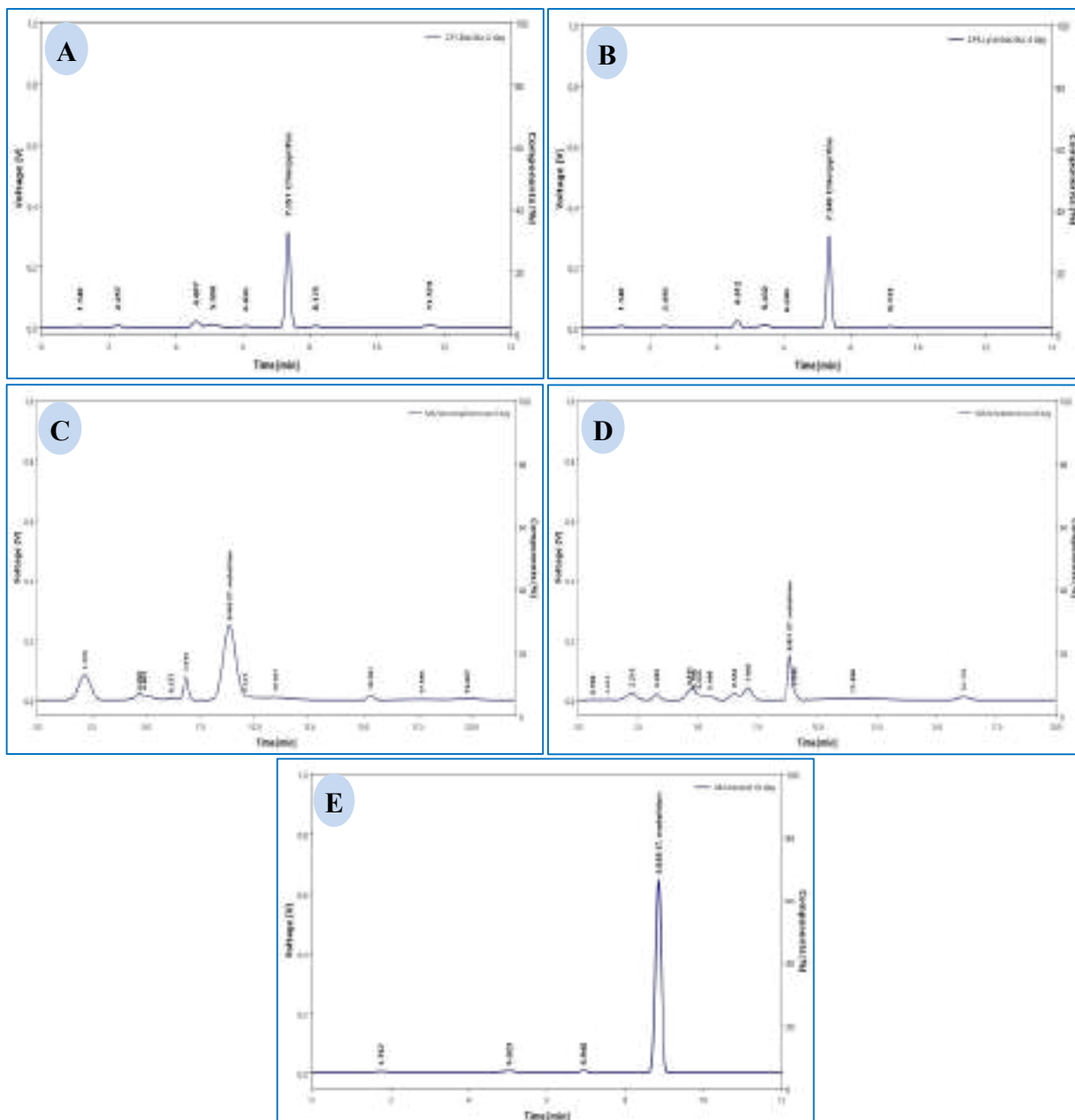
A: متبقيات الـ CP المتحلل بواسطة *B. subtilis* بعد 2 يوم،

B: متبقيات الـ CP المتحلل بواسطة *L. sphaericus* بعد 4 يوم،

C: متبقيات الـ MA المتحلل بواسطة *S. maltophilia* بعد 6 يوم،،

D: متبقيات الـ MA المتحلل بواسطة *Ochrobactrum* sp. بعد 8 يوم،،

E: متبقيات الـ MA لعينة السيطرة بعد 10 يوم،



ملحق (6) طيف الامتصاص باستخدام جهاز HPLC لمتبقيات مبيدي الـ Chlorpyrifos و Malathion

باختلاف درجة الحرارة (20، 30 و 40 م°)، بعد 10 ايام حضانة، pH 7 وتركيز 100 ملغم/ لتر:

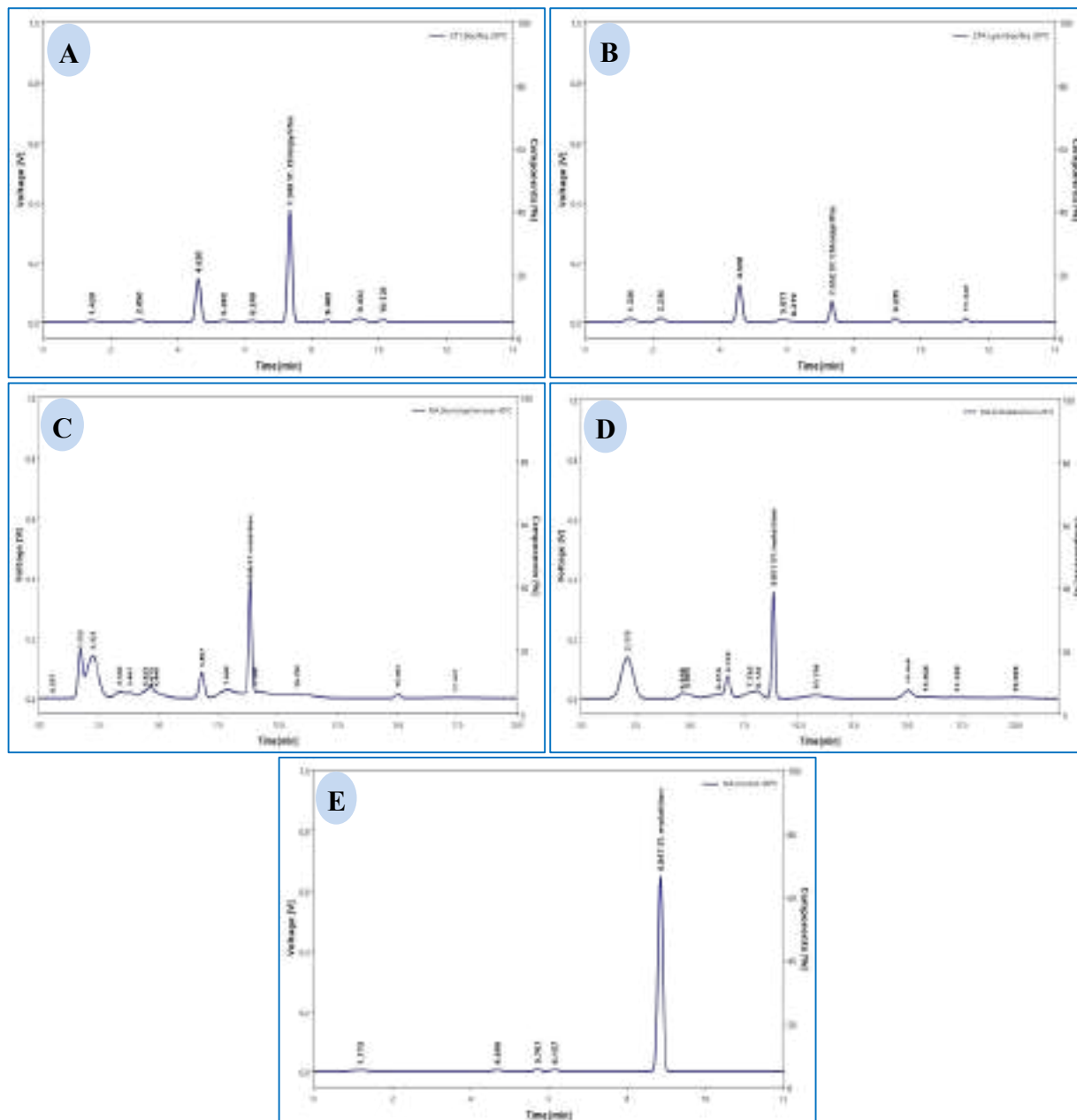
A: متبقيات الـ CP المتحلل بواسطة *B. subtilis* عند 20 م°،

B: متبقيات الـ CP المتحلل بواسطة *L. sphaericus* عند 30 م°،

C: متبقيات الـ MA المتحلل بواسطة *S. maltophilia* عند 40 م°،

D: متبقيات الـ MA المتحلل بواسطة *Ochrobactrum* sp. عند 20 م°،

E: متبقيات الـ MA لعينة السيطرة عند 30 م°.



ملحق (7) طيف الامتصاص باستخدام جهاز HPLC لمتبقيات مبيدات الـ Chlorpyrifos و Malathion

باختلاف pH (5، 7 و 9) م، بعد 10 ايام حضانة، 30 م و تركيز 100 ملغم/لتر:

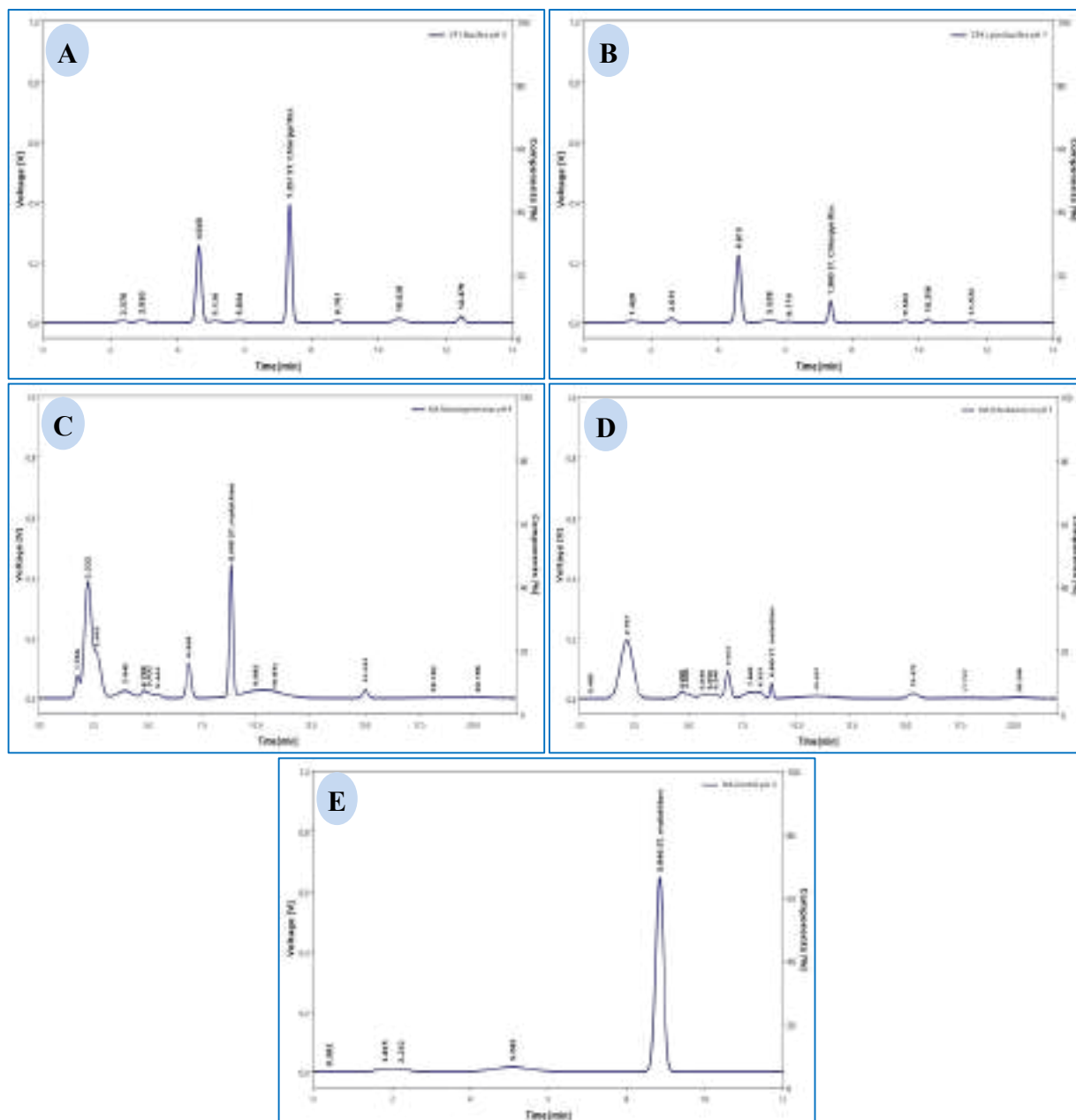
A: متبقيات الـ CP المتحلل بواسطة *B. subtilis* عند pH 5،

B: متبقيات الـ CP المتحلل بواسطة *L. sphaericus* عند pH 7،

C: متبقيات الـ MA المتحلل بواسطة *S. maltophilia* عند pH 9،

D: متبقيات الـ MA المتحلل بواسطة *Ochrobactrum* sp. عند pH 7،

E: متبقيات الـ MA لعينة السيطرة عند pH 5.



ملحق (8) طيف الامتصاص باستخدام جهاز HPLC لمتبقيات مبيدات الـ Chlorpyrifos و Malathion

باختلاف تركيز المبيد (100، 200 و 400) ملغم/لتر، بعد 10 ايام حضانة، 30 م و pH 7:

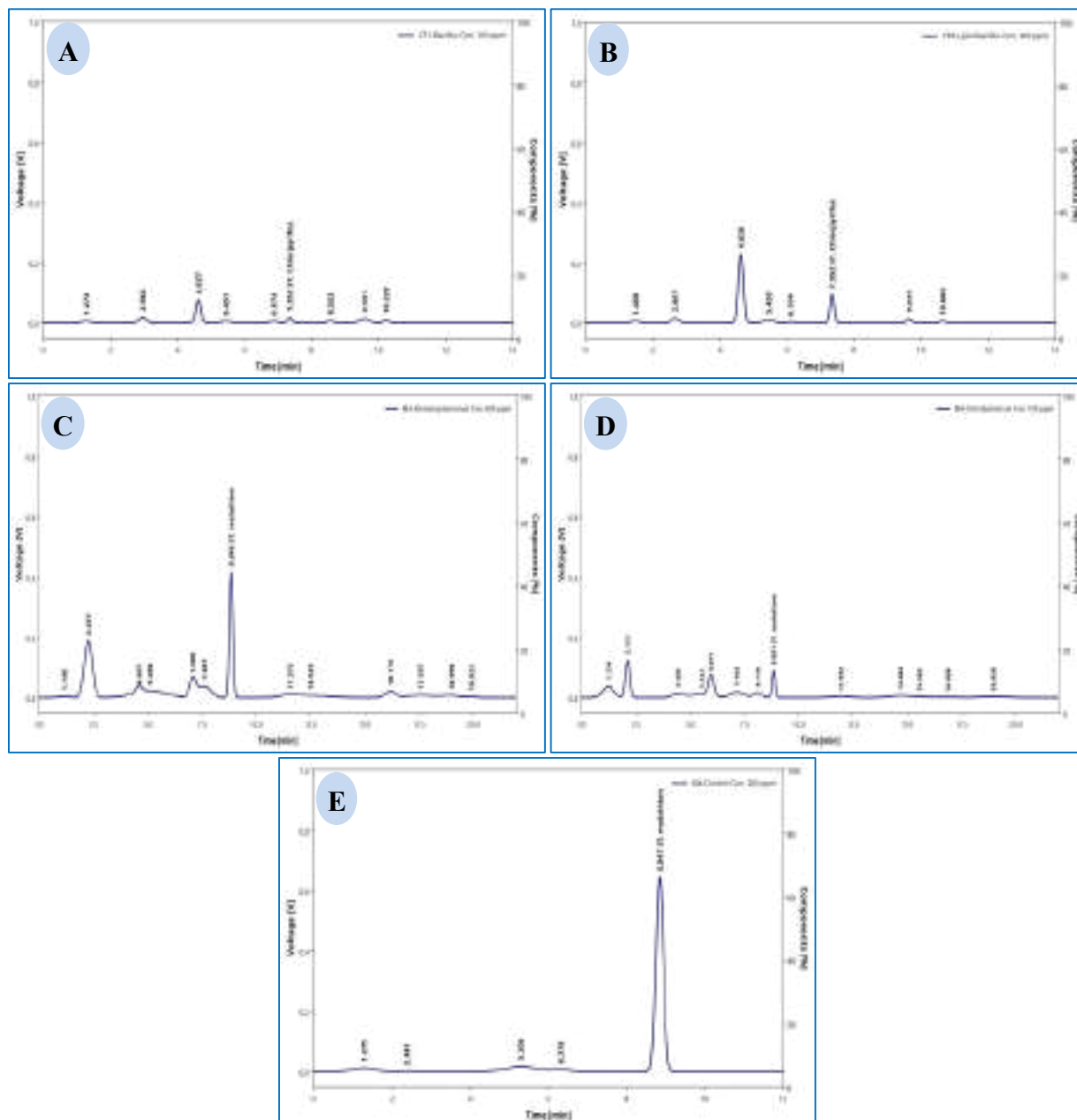
A: متبقيات ال CP المتحلل بواسطة *B. subtilis* من تركيز 100 ملغم/ لتر،

B: متبقيات الـ CP المتحلل بواسطة *L. sphaericus* من تركيز 200 ملغم/ لتر ،

C: متبقيات الـ MA المتحلل بواسطة *S. maltophilia* من تركيز 400 ملغم/ لتر ،

D: متبقيات الـ MA المتحلل بواسطة *Ochrobactrum* sp. من تركيز 100 ملغم/لتر،

E: متبقيات الـ MA لعينة السيطرة من تركيز 200 ملغم/ لتر.



ملحق (9): نتائج اختبار Tow- Way ANOVA في برنامج SPSS لمتبقيات مبيد الـ Chlorpyrifos

خلال مدة الحضانة + اختبار Tukey

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: CP residue Con. mg/L					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	84739.294 ^a	24	3530.804	39599.045	.000
Intercept	129276.340	1	129276.340	1449873.645	.000
Isolate	64336.554	4	16084.138	180388.526	.000
Time	16372.224	4	4093.056	45904.874	.000
Isolate * Time	4030.516	16	251.907	2825.217	.000
Error	4.458	50	.089		
Total	214020.093	75			
Corrected Total	84743.752	74			

a. R Squared = 1.000 (Adjusted R Squared = 1.000)

CP residue Con. mg/L						
Tukey HSD ^{a,b}						
Isolate	N	Subset				
		1	2	3	4	5
B. subtilis	15	21.00267				
S. maltophilia	15		23.71533			
Ochrabacterium sp.	15			26.60487		
L. sphaericus	15				37.21007	
Control	15					99.05347
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = .089.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.
b. Alpha = .05.

CP residue Con. mg/L						
Tukey HSD ^{a,b}						
Time	N	Subset				
		1	2	3	4	5
10 day	15	24.53293				
8 day	15		29.53353			
6 day	15			38.79407		
4 day	15				48.70793	
2 day	15					66.01793
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = .089.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.
b. Alpha = .05.

ملحق (10): نتائج اختبار Tow- Way ANOVA في برنامج SPSS لمتبقيات مبيد الـ Malathion خلال

مدة الحضانة + اختبار Tukey

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: MA residue Con. mg/L					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	73931.033 ^a	24	3080.460	9153.392	.000
Intercept	140256.638	1	140256.638	416763.781	.000
Isolate	60281.030	4	15070.258	44780.323	.000
Time	10955.068	4	2738.767	8138.074	.000
Isolate * Time	2694.934	16	168.433	500.489	.000
Error	16.827	50	.337		
Total	214204.498	75			
Corrected Total	73947.860	74			

a. R Squared = 1.000 (Adjusted R Squared = 1.000)

MA residue Con. mg/L						
Tukey HSD ^{a,b}						
Isolate	N	Subset				
		1	2	3	4	5
L. sphaericus	15	22.14860				
B. subtilis	15		25.84300			
Ochrabacterium sp.	15			30.31040		
S. maltophilia	15				39.11913	
Control	15					98.80147
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = .337.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.
b. Alpha = .05.

MA residue Con. mg/L						
Tukey HSD ^{a,b}						
Time	N	Subset				
		1	2	3	4	5
10 day	15	27.78253				
8 day	15		35.42373			
6 day	15			40.54387		
4 day	15				49.70793	
2 day	15					62.76453
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = .337.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.
b. Alpha = .05.

ملحق (11): نتائج اختبار Tow- Way ANOVA في برنامج SPSS لمتبقيات مييد الـ Chlorpyrifos

حسب درجة الحرارة + اختبار Tukey

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: CP residue Con. mg/L					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	46349.597 ^a	14	3310.685	31977.831	.000
Intercept	104730.102	1	104730.102	1011585.527	.000
Isolate	28823.112	4	7205.778	69600.437	.000
Temperature	13482.486	2	6741.243	65113.502	.000
Isolate * Temperature	4043.999	8	505.500	4882.611	.000
Error	3.106	30	.104		
Total	151082.804	45			
Corrected Total	46352.703	44			

a. R Squared = 1.000 (Adjusted R Squared = 1.000)

CP residue Con. mg/L					
Tukey HSD ^{a,b}					
Isolate	N	Subset			
		1	2	3	4
B. subtilis	9	28.90678			
S. maltophilia	9		35.08922		
Ochrabacterium sp.	9			39.34011	
L. sphaericus	9			39.61389	
Control	9				98.26233
Sig.		1.000	1.000	.390	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = .104.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.
b. Alpha = .05.

CP residue Con. mg/L				
Tukey HSD ^{a,b}				
Temperature	N	Subset		
		1	2	3
30°C	15	24.74840		
40°C	15		54.03653	
20°C	15			65.94247
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = .104.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.
b. Alpha = .05.

ملحق (12): نتائج اختبار Tow- Way ANOVA في برنامج SPSS لمتبقيات مبيد الـ Malathion

حسب درجة الحرارة + اختبار Tukey

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: MA residue Con. mg/L					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	42271.600 ^a	14	3019.400	16710.034	.000
Intercept	99041.459	1	99041.459	548117.571	.000
Isolate	30414.986	4	7603.746	42080.832	.000
Temperature	8315.392	2	4157.696	23009.618	.000
Isolate * Temperature	3541.223	8	442.653	2449.740	.000
Error	5.421	30	.181		
Total	141318.480	45			
Corrected Total	42277.021	44			

a. R Squared = 1.000 (Adjusted R Squared = 1.000)

MA residue Con. mg/L						
Tukey HSD ^{a,b}						
Isolate	N	Subset				
		1	2	3	4	5
B. subtilis	9	28.67089				
L. sphaericus	9		31.04622			
S. maltophilia	9			35.86489		
Ochrabacterium sp.	9				40.74456	
Control	9					98.24333
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = .181.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.
b. Alpha = .05.

MA residue Con. mg/L				
Tukey HSD ^{a,b}				
Temperature	N	Subset		
		1	2	3
30°C	15	27.81067		
40°C	15		54.60087	
20°C	15			58.33040
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = .181.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.
b. Alpha = .05.

ملحق (13): نتائج اختبار Tow- Way ANOVA في برنامج SPSS لمتبقيات مييد الـ Chlorpyrifos

حسب الـ pH + اختبار Tukey

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: CP residue Con. mg/L					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	51903.201 ^a	14	3707.371	24090.757	.000
Intercept	135099.867	1	135099.867	877888.288	.000
pH	21782.947	2	10891.473	70773.548	.000
Isolate	23470.801	4	5867.700	38128.723	.000
pH * Isolate	6649.453	8	831.182	5401.076	.000
Error	4.617	30	.154		
Total	187007.685	45			
Corrected Total	51907.818	44			

a. R Squared = 1.000 (Adjusted R Squared = 1.000)

CP residue Con. mg/L					
Tukey HSD ^{a,b}					
Isolate	N	Subset			
		1	2	3	4
B. subtilis	9	30.41100			
L. sphaericus	9		46.99189		
Ochrabacterium sp.	9			48.98411	
S. maltophilia	9			49.32167	
Control	9				98.25389
Sig.		1.000	1.000	.378	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = .154.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.
b. Alpha = .05.

CP residue Con. mg/L				
Tukey HSD ^{a,b}				
pH	N	Subset		
		1	2	3
7	15	24.69033		
9	15		63.02507	
5	15			76.66213
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = .154.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.
b. Alpha = .05.

ملحق (14): نتائج اختبار Tow- Way ANOVA في برنامج SPSS لمتبقيات مبيد الـ Malathion

حسب الـ pH + اختبار Tukey

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: MA residue Con. mg/L					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	47006.811 ^a	14	3357.629	32467.179	.000
Intercept	118997.193	1	118997.193	1150663.970	.000
pH	14755.651	2	7377.826	71341.162	.000
Isolate	27715.479	4	6928.870	66999.905	.000
pH * Isolate	4535.681	8	566.960	5482.319	.000
Error	3.102	30	.103		
Total	166007.106	45			
Corrected Total	47009.913	44			

a. R Squared = 1.000 (Adjusted R Squared = 1.000)

MA residue Con. mg/L						
Tukey HSD ^{a,b}						
Isolate	N	Subset				
		1	2	3	4	5
L. sphaericus	9	30.13778				
B. subtilis	9		32.46444			
Ochrabacterium sp.	9			42.53822		
S. maltophilia	9				53.84000	
Control	9					98.13733
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = .103.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.
b. Alpha = .05.

MA residue Con. mg/L				
Tukey HSD ^{a,b}				
pH	N	Subset		
		1	2	3
7	15	27.56693		
9	15		55.28953	
5	15			71.41420
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = .103.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.
b. Alpha = .05.

ملحق (15): نتائج اختبار Tow- Way ANOVA في برنامج SPSS لمتبقيات مييد الـ Chlorpyrifos

حسب تركيز المييد الابتدائي + اختبار Tukey

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: CP residue Con. mg/L					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	52385.431 ^a	14	3741.817	22290.092	.000
Intercept	51538.659	1	51538.659	307017.049	.000
Isolate	47116.964	4	11779.241	70169.227	.000
Initial_con	3973.597	2	1986.799	11835.409	.000
Isolate * Initial_con	1294.869	8	161.859	964.196	.000
Error	5.036	30	.168		
Total	103929.126	45			
Corrected Total	52390.467	44			

a. R Squared = 1.000 (Adjusted R Squared = 1.000)

CP residue Con. mg/L						
Tukey HSD ^{a,b}						
Isolate	N	Subset				
		1	2	3	4	5
B. subtilis	9	14.34889				
S. maltophilia	9		14.99167			
Ochrabacterium sp.	9			16.97567		
L. sphaericus	9				24.76478	
Control	9					98.13067
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = .168.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.
b. Alpha = .05.

CP residue Con. mg/L				
Tukey HSD ^{a,b}				
Initial con. mg/L	N	Subset		
		1	2	3
100 mg/L	15	25.19480		
200 mg/L	15		29.42720	
400 mg/L	15			46.90500
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = .168.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.
b. Alpha = .05.

ملحق (16): نتائج اختبار Tow- Way ANOVA في برنامج SPSS لمتبقيات مبيد Malathion حسب

تركيز المبيد الابتدائي + اختبار Tukey

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: MA residue Con. mg/L					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	54924.780 ^a	14	3923.199	29156.074	.000
Intercept	65619.281	1	65619.281	487663.465	.000
Isolate	43341.902	4	10835.475	80526.111	.000
Initial_con	7967.905	2	3983.952	29607.579	.000
Isolate * Initial_con	3614.974	8	451.872	3358.180	.000
Error	4.037	30	.135		
Total	120548.097	45			
Corrected Total	54928.817	44			

a. R Squared = 1.000 (Adjusted R Squared = 1.000)

MA residue Con. mg/L						
Tukey HSD ^{a,b}						
Isolate	N	Subset				
		1	2	3	4	5
L. sphaericus	9	12.85500				
B. subtilis	9		15.80633			
S. maltophilia	9			31.11322		
Ochrabacterium sp.	9				33.00211	
Control	9					98.15567
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = .135.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.
b. Alpha = .05.

MA residue Con. mg/L				
Tukey HSD ^{a,b}				
Initial con. mg/L	N	Subset		
		1	2	3
100 mg/L	15	27.71193		
200 mg/L	15		29.88453	
400 mg/L	15			56.96293
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = .135.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.
b. Alpha = .05.

ملحق (17) محاذاة التسلسل المتعدد MSA لتسلسل الأحماض الأمينية الخاصة بالجينات المكتشفة لبكتريا *Ochrobactrum* sp. مع التسلسلات المرجعية العالمية.

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment	
WP_085982942.1 DQW88_RS13955	MVVLAVSVIQASATEPIKTIISKEDTALDLSRAVEIKLRNKGESVQVSTAPGPGGIVRIEVQ MVVLAVSVIQASATEPIKTIISKEDTALDLSRAVEIKLRNKGESVQVSTAPGPGGIVRIEVQ *****
WP_085982942.1 DQW88_RS13955	ADDYSKASGDWAAAFSTAIVPTDEQIDRLIYVAPHFRLWGSQVWIPDLGSPRIASTIPSEGFA ADDYSKASGDWAAAFSTAIVPTDEQIDRLIYVAPHFRLWGSQVWIPDLGSPRIASTIPSEGFA *****
WP_085982942.1 DQW88_RS13955	LDRQPSADADVFRITLMPGSVITFVAELSSVMLPQLYLWEPFAYKQDAVNSYTLVRGILLG LDRQPSADADVFRITLMPGSVITFVAELSSVMLPQLYLWEPFAYKQDAVNSYTLVRGILLG *****
WP_085982942.1 DQW88_RS13955	ISGLLALFLTLPVWVKGTSLFPATAALAHAVLVICYVDFGFHNKLWEITPQNEQIHRWGT ISGLLALFLTLPVWVKGTSLFPATAALAHAVLVICYVDFGFHNKLWEITPQNEQIHRWGT *****
WP_085982942.1 DQW88_RS13955	EVALAASLVIFLFTYLMILWRNHDFSYGAVTWVLGLLALGAVAFPPPVVASGTARISLAL EVALAASLVIFLFTYLMILWRNHDFSYGAVTWVLGLLALGAVAFPPPVVASGTARISLAL *****
WP_085982942.1 DQW88_RS13955	TVLSGVAIIGYLAVKGYDRAVMILIPAWLLTLENLLGAMHTVSGRLDMDIVQPALGGGLVL TVLSGVAIIGYLAVKGYDRAVMILIPAWLLTLENLLGAMHTVSGRLDMDIVQPALGGGLVL *****
WP_085982942.1 DQW88_RS13955	IVLLIGFTVWQHAFAGGALQQGLLSDMERRQALAVIGAGDTVMQNDVPRDRWYTTPDINWY IVLLIGFTVWQHAFAGGALQQGLLSDMERRQALAVIGAGDTVMQNDVPRDRWYTTPDINWY *****
WP_085982942.1 DQW88_RS13955	LGNTAWSLQGPVRNMLPAMHADDORFRFSTLDAILENRRGRIGQIFRLRAWQGHVHAMAYAL LGNTAWSLQGPVRNMLPAMHADDORFRFSTLDAILENRRGRIGQIFRLRAWQGHVHAMAYAL *****
WP_085982942.1 DQW88_RS13955	RARPVIGSDGEVVRCVGLTVMVTEQKKAERLLHDAVHDNLTLGLPINRELFDLRLSNWWTN RARPVIGSDGEVVRCVGLTVMVTEQKKAERLLHDAVHDNLTLGLPINRELFDLRLSNWWTN *****
WP_085982942.1 DQW88_RS13955	ARGESMLHPTVFIIIDIRFKQNDLSLGSAGDTILLTISRRLARLMKPQDTLSRLSSDQF ARGESMLHPTVFIIIDIRFKQNDLSLGSAGDTILLTISRRLARLMKPQDTLSRLSSDQF *****
WP_085982942.1 DQW88_RS13955	GLLLASESDPGRIASFAEALRQAVRAPAIYAKREIVLTSSVGLTTWTKTATTAEDEFVKDA GLLLASESDPGRIASFAEALRQAVRAPAIYAKREIVLTSSVGLTTWTKTATTAEDEFVKDA *****
WP_085982942.1 DQW88_RS13955	ELAHYQAKRFGGDRIEPFRPAFAIGSDKLQLESDLRRALERDEISLVYQPIVKLOEGTI ELAHYQAKRFGGDRIEPFRPAFAIGSDKLQLESDLRRALERDEISLVYQPIVKLOEGTI *****
WP_085982942.1 DQW88_RS13955	AGFEALNRMEHPRRGATSPSEFIPAIENSGLLTQLGLFAYQRAAEDLFAWQEFPKLDLF AGFEALNRMEHPRRGATSPSEFIPAIENSGLLTQLGLFAYQRAAEDLFAWQEFPKLDLF *****
WP_085982942.1 DQW88_RS13955	VSVMLSSQQLIRQQLIMDVRVSLSRHILNPGSLKLELTESVLMHPEQSTHVLARLKAWG VSVMLSSQQLIRQQLIMDVRVSLSRHILNPGSLKLELTESVLMHPEQSTHVLARLKAWG *****
WP_085982942.1 DQW88_RS13955	IGLSLDGFGTGYSSLAVLTRFPDIKIDRSFVKGDQPKQKATLLRSIVSWAHDGLAVVT IGLSLDGFGTGYSSLAVLTRFPDIKIDRSFVKGDQPKQKATLLRSIVSWAHDGLAVVT *****

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

WP_063882179.1      MTSIDMIKKRPVAIRGUHDLMKERNVEMTLSAFEAAAKAGFAIECDVHLTRDGGVVVFHDD
MQXN88_RS17575      MTSIDMIKKRPVAIRGUHDLMKERNVEMTLSAFEAAAKAGFAIECDVHLTRDGGVVVFHDD
*****

WP_063882179.1      ELKRLAGREGYTSDLTLAEA.TALKVGGTADHVPTLRQWLDLVDSRVPLVIELKGIEGKDD
MQXN88_RS17575      ELKRLAGREGYTSDLTLAEA.TALKVGGTADHVPTLRQWLDLVDSRVPLVIELKGIEGKDD
*****

WP_063882179.1      GLVAAVAKELASYKGEAAWVSFDHNLIRRFAADAPGIPGGLTAEGTRTEDFFERHFSNLAH
MQXN88_RS17575      GLVAAVAKELASYKGEAAWVSFDHNLIRRFAADAPGIPGGLTAEGTRTEDFFERHFSNLAH
*****

WP_063882179.1      GISFVSYVNVHLPHPFVTFVQKXLHWPPYISWTVRDREYMQKHSDLNVDQITFEGFDPRALL
MQXN88_RS17575      GISFVSYVNVHLPHPFVTFVQKXLHWPPYISWTVRDREYMQKHSDLNVDQITFEGFDPRALL
*****

WP_063882179.1      A
MQXN88_RS17575      A
*
```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

WP_006470919.1      MEIANVSDRSGPFVPPAPRPREKPVGRFEMMRVYKNPLELWGEPSYNERWISVSWFGMK
DQW88_RS11985      MEIANVSDRSGPFVPPAPRPREKPVGRFEMMRVYKNPLELWGEPSYNERWISVSWFGMK
*****

WP_006470919.1      TIIANDPGLIRHVLVDNAANYPMSAIRQRVLRPLLRDGLLTAEGQVWKRSRKAMAPVFTP
DQW88_RS11985      TIIANDPGLIRHVLVDNAANYPMSAIRQRVLRPLLRDGLLTAEGQVWKRSRKAMAPVFTP
*****

WP_006470919.1      RHIGGFAETMRDRSLRFAERYKTPGTITDVAHDMTLLTYDILAEITLFSGEIAGDPNDFAH
DQW88_RS11985      RHIGGFAETMRDRSLRFAERYKTPGTITDVAHDMTLLTYDILAEITLFSGEIAGDPNDFAH
*****

WP_006470919.1      QIDRLFETMGRVDPFDLLGLPDWLPRFTRLRGQQSLGFFRELVSNTIALRKARMDRGEDV
DQW88_RS11985      QIDRLFETMGRVDPFDLLGLPDWLPRFTRLRGQQSLGFFRELVSNTIALRKARMDRGEDV
*****

WP_006470919.1      PSDFLTLLRAEGPDGLSRSEIEDNIITFIGAGHETTARALGWTLYLLAKAPRERERIET
DQW88_RS11985      PSDFLTLLRAEGPDGLSRSEIEDNIITFIGAGHETTARALGWTLYLLAKAPRERERIET
*****

WP_006470919.1      EIDGFFARGGRDLPQDWLTSLPFTRAAFEAMRLYPPAPSIINREAADDTYDOLKIPKG
DQW88_RS11985      EIDGFFARGGRDLPQDWLTSLPFTRAAFEAMRLYPPAPSIINREAADDTYDOLKIPKG
*****

WP_006470919.1      ATVLVMPWVIHRHRLYNDQPDAFMPERFMPENRERLDRFQYLPFGAGPRVCIGASFALQE
DQW88_RS11985      ATVLVMPWVIHRHRLYNDQPDAFMPERFMPENRERLDRFQYLPFGAGPRVCIGASFALQE
*****

WP_006470919.1      AVIALAVLLDGRRFDVLETTTPWPVQKLTTPQGGGLPMKVLKR
DQW88_RS11985      AVIALAVLLDGRRFDVLETTTPWPVQKLTTPQGGGLPMKVLKR
*****
```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

WP_006471468.1  MSRFSLQISDTHLSPRTDHFRENNRLLAEPLESDHDFIVHTGQVTLDGIRYDEQYALC
DQ488_RS01865   MSRFSLQISDTHLSPRTDHFRENNRLLAEPLESDHDFIVHTGQVTLDGIRYDEQYALC
*****

WP_006471468.1  RDFFKESGKTIHFLAGKWDVGQWPNLSKPESENGSAIAARYARFADYFGADRWVIDQGK
DQ488_RS01865   RDFFKESGKTIHFLAGKWDVGQWPNLSKPESENGSAIAARYARFADYFGADRWVIDQGK
*****

WP_006471468.1  WRIIGISSNLLGSQLPQEAQVDWIDQQTSSQDRYLAVFSHQPIVIDNWDSTELTWTTV
DQ488_RS01865   WRIIGISSNLLGSQLPQEAQVDWIDQQTSSQDRYLAVFSHQPIVIDNWDSTELTWTTV
*****

WP_006471468.1  DPKGVGRILEGLINHPKRLRIASGHLHQQRSSKRGMVHLEWGSSIAFTTTEELVPEWGGTR
DQ488_RS01865   DPKGVGRILEGLINHPKRLRIASGHLHQQRSSKRGMVHLEWGSSIAFTTTEELVPEWGGTR
*****

WP_006471468.1  EVGVYEHFSDDGRVESKVLKHDGFANDHLEDMIKVYVPLISG
DQ488_RS01865   EVGVYEHFSDDGRVESKVLKHDGFANDHLEDMIKVYVPLISG
*****

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

WP_138725346.1  MTRKNVLLIVVDQWRADFIPHLMRAEGREPFLKTPNLDRLCREGLTFRNHVTTCPVCGPA
DQW88_RS18505   MTRKNVLLIVVDQWRADFIPHLMRAEGREPFLKTPNLDRLCREGLTFRNHVTTCPVCGPA
*****

WP_138725346.1  RASLLTGLYLMNHRVQNTVPLDQRHLNLGKALRAIGYDPALIGYTTTTDPRTTSARDP
DQW88_RS18505   RASLLTGLYLMNHRVQNTVPLDQRHLNLGKALRAIGYDPALIGYTTTTDPRTTSARDP
*****

WP_138725346.1  RFTVLGDINDGFRSFGAFEPNMDGYFGMVAQNGFELPENREDINLPEGEHSVPGATDKPS
DQW88_RS18505   RFTVLGDINDGFRSFGAFEPNMDGYFGMVAQNGFELPENREDINLPEGEHSVPGATDKPS
*****

WP_138725346.1  RIPKEFSOSTFFTERALTYLKGRDGKPFHLGLYYRPHPPFVASAPYHAMYKAEDMPAPT
DQW88_RS18505   RIPKEFSOSTFFTERALTYLKGRDGKPFHLGLYYRPHPPFVASAPYHAMYKAEDMPAPT
*****

WP_138725346.1  RAENPDAAEAQHPLMKHYIDHIRRGSFFHGAEGSGATLDEGEIRQMRATYCGLITEIDDC
DQW88_RS18505   RAENPDAAEAQHPLMKHYIDHIRRGSFFHGAEGSGATLDEGEIRQMRATYCGLITEIDDC
*****

WP_138725346.1  LGKVFAYLDETQWDOTLIIFTSDHGEQLGDHLLGKIGYNAESFRIPLVIKDAGQNRHA
DQW88_RS18505   LGKVFAYLDETQWDOTLIIFTSDHGEQLGDHLLGKIGYNAESFRIPLVIKDAGQNRHA
*****

WP_138725346.1  GQIEEGFSESIDVMPTILEWLGGETPRACDGRSLLPFLAEGKPADWRTELHYEFDPRDVF
DQW88_RS18505   GQIEEGFSESIDVMPTILEWLGGETPRACDGRSLLPFLAEGKPADWRTELHYEFDPRDVF
*****

WP_138725346.1  YDQPQNSVQLSQWDCSLCVIEDENYKYVHFAALPPLFFDLKADPHEFNLAGDPAYAAALV
DQW88_RS18505   YDQPQNSVQLSQWDCSLCVIEDENYKYVHFAALPPLFFDLKADPHEFNLAGDPAYAAALV
*****

WP_138725346.1  RQYAKVLSWRLSHADRTLTHYRSSPQGLTTRNH
DQW88_RS18505   RQYAKVLSWRLSHADRTLTHYRSSPQGLTTRNH
*****

```

CLUSTAL W 2.0 multiple sequence alignment		
WP_006465813.1_MULTISPECIES:_arylesterase	MRFKLSIPAMLPFAVMSFMAAGPIATAQAEPTGLEDAIPTEQLSQIRIVEFGDSLMMGYLLPSMAA	70
DQM88_RS11750_arylesterase	MRFKLSIPAMLPFAVMSFMAAGPIATAQAEPTGLEDAIPTEQLSQIRIVEFGDSLMMGYLLPSMAA	70

WP_006465813.1_MULTISPECIES:_arylesterase	FPQQLKALNDKQNEVSIENAGVSGDITTTGGLSRIDNSVPGTDLVILELGANDALRGIEPDITEKNLDE	140
DQM88_RS11750_arylesterase	FPQQLKALNDKQNEVSIENAGVSGDITTTGGLSRIDNSVPGTDLVILELGANDALRGIEPDITEKNLDE	140

WP_006465813.1_MULTISPECIES:_arylesterase	MLARKQKRGISVILAGMAPFNNGKDFAAEFMPYPKLAQKYGPLYPFPLDGVATKDLLLEDGMHPNE	210
DQM88_RS11750_arylesterase	MLARKQKRGISVILAGMAPFNNGKDFAAEFMPYPKLAQKYGPLYPFPLDGVATKDLLLEDGMHPNE	210

WP_006465813.1_MULTISPECIES:_arylesterase	KGVETMYSNFMPTIEKSLTNMQNKGTSGG	239
DQM88_RS11750_arylesterase	KGVETMYSNFMPTIEKSLTNMQNKGTSGG	239

ملحق (18) محاذاة التسلسل المتعدد MSA لتسلسل الأحماض الأمينية الخاصة بالجينات المكتشفة لبكتريا *L. sphaericus* مع التسلسلات المرجعية العالمية.

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment		
CAMS181705.1	MDKGTVQQLMFYSEALQEEIQLYIYVPAARYSPLYKYNILIASDGKDYFQLGGTIKLADEL	
LSPH265_00513	MDKGTVQQLMFYSEALQEEIQLYIYVPAARYSPLYKYNILIASDGKDYFQLGGTIKLADEL	

CAMS181705.1	IDOYEIENLIIAFVYPYKDIKDRRTKYIPSGEQHEAYLRFLAHELVPYLD AEYATYQWGM	
LSPH265_00513	IDOYEIENLIIAFVYPYKDIKDRRTKYIPSGEQHEAYLRFLAHELVPYLD AEYATYQWGM	

CAMS181705.1	RGVIGDSNAATASLMAALKYPSTFGKVLQSPYVDEDVLIKAVEQFKDPGAIISYHIVGKM	
LSPH265_00513	RGVIGDSNAATASLMAALKYPSTFGKVLQSPYVDEDVLIKAVEQFKDPGAIISYHIVGKM	

CAMS181705.1	EDKVV TMDKTVKDFLTPNRQLHNLMLSKGFSTFYEEFDGNHTIKYKKPDLRRALIENFN	
LSPH265_00513	EDKVV TMDKTVKDFLTPNRQLHNLMLSKGFSTFYEEFDGNHTIKYKKPDLRRALIENFN	

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment	
CAM5180533.1 LSPH265_00366	MILRNRLKLLAFEKSAQLGVDGFEIDIRLTKDEEIVFH DATVDR TTEGYGAVSEMTLEE MILRNRLKLLAFEKSAQLGVDGFEIDIRLTKDEEIVFH DATVDR TTEGYGAVSEMTLEE *****
CAM5180533.1 LSPH265_00366	INALNHGYQFENLAGEYPYRDTKVQVVTRELLESYPNMLINIDIKDAPDTYEGSLMPSK INALNHGYQFENLAGEYPYRDTKVQVVTRELLESYPNMLINIDIKDAPDTYEGSLMPSK *****
CAM5180533.1 LSPH265_00366	LWRLIEELGVENRVVVTsfyGEQIDRFNLYAQNQVALGAGESDVRKAFASFSQFGHLYH LWRLIEELGVENRVVVTsfyGEQIDRFNLYAQNQVALGAGESDVRKAFASFSQFGHLYH *****
CAM5180533.1 LSPH265_00366	PKVDVFQIPPKSGVVSLSDPKFIQFLNNLNPVHYVITINDLVTMNKLIHNGAKGIITDRP PKVDVFQIPPKSGVVSLSDPKFIQFLNNLNPVHYVITINDLVTMNKLIHNGAKGIITDRP *****
CAM5180533.1 LSPH265_00366	DIAVELLVQHD DIAVELLVQHD *****

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment	
CAM5181713.1 LSPH265_00514	MKYGIVAFFPSKKLQQLAMTYRKRYDPHYAKIIPHMTLKDSFDATEDDIQSIYKQLDQIAA MKYGIVAFFPSKKLQQLAMTYRKRYDPHYAKIIPHMTLKDSFDATEDDIQSIYKQLDQIAA *****
CAM5181713.1 LSPH265_00514	KHAPLNIMHSRTSSFFPTTMAIYFRTEPTEQLQAFHRVLEEIPFGDSKHVFVPHITIAQ KHAPLNIMHSRTSSFFPTTMAIYFRTEPTEQLQAFHRVLEEIPFGDSKHVFVPHITIAQ *****
CAM5181713.1 LSPH265_00514	KNTDSEHDQIFGQLRMTGVDEHDSIDRIHLLYQLEDGSMITYETFRLTGAE KNTDSEHDQIFGQLRMTGVDEHDSIDRIHLLYQLEDGSMITYETFRLTGAE *****

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

CAM5215454.1      MKVIFIGDIVGSIGRDAVEKYLPPRIKKFSPDVVVIANGENAAAGGITRNIYNDLLQMGV
LSPH265_04423     MKVIFIGDIVGSIGRDAVEKYLPPRIKKFSPDVVVIANGENAAAGGITRNIYNDLLQMGV
*****

CAM5215454.1      DVITMGNHTWDNKDIFDFIDDADYLIRPANFSSEAPGKGWVQIAKNGVTLSVINLHGRVF
LSPH265_04423     DVITMGNHTWDNKDIFDFIDDADYLIRPANFSSEAPGKGWVQIAKNGVTLSVINLHGRVF
*****

CAM5215454.1      LPPHEDPFAMAEQLIEEARKTSPLVFVDFHAEATSEKIALGNHLDGKASAVVGTHTHVQT
LSPH265_04423     LPPHEDPFAMAEQLIEEARKTSPLVFVDFHAEATSEKIALGNHLDGKASAVVGTHTHVQT
*****

CAM5215454.1      ADARIYPNGTAYITDVGMTGPYDEILGNTKESVIYKFQTNMPSRFEVPPKKGRDVLGFFV
LSPH265_04423     ADARIYPNGTAYITDVGMTGPYDEILGNTKESVIYKFQTNMPSRFEVPPKKGRDVLGFFV
*****

CAM5215454.1      EIDDKTGKALRCERIYINEDYPFQA
LSPH265_04423     EIDDKTGKALRCERIYINEDYPFQA
*****

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

CAM1518891.1      GFTLGSKVHRYALDLDPDLLNSPSKRQVPVSPVAAWGDLNHQADLGYRR
LSPH265_00761     GFTLGSKVHRYALDLDPDLLNSPSKRQVPVSPVAAWGDLNHQADLGYRR
*****

CAM1518891.1      GISGTSSGS
LSPH265_00761     GISGTSSGS
*****

```

Summary

Organophosphorus pesticides are among the most common environmental contaminants in agricultural soils due to their acute toxic effects on non-target organisms and their environmental persistence. This study aimed to select and characterize indigenous bacteria from agricultural soil in Al-Diwaniyah Governorate that are capable of biodegrading Chlorpyrifos and Malathion, evaluate their biodegradation efficiency under different environmental conditions, and investigate the genetic and enzymatic basis of these capabilities using advanced techniques, including whole-genome sequencing (WGS).

Eighteen soil samples were collected from agricultural areas in six districts of Al-Diwaniyah Governorate: (Al-Diwaniyah City Center, Al-Saniyah, Al-Shamiya, Al-Hamza Al-Sharqi, Afak, and Al-Daghara). The sampled areas had been exposed to pesticides for more than five years. Three samples were collected from three different agricultural areas within each district during the period from April 1, 2025, to August 1, 2025. A total of 11 bacterial isolates were recovered from the soil using the selective enrichment culture technique in Mineral Salts Medium (MSM). The isolates showed a variable geographical distribution, with the highest number recorded in Afak District, from which (four isolates) were obtained, followed by Al-Shamiya District, with (three isolates). Al-Hamza Al-Sharqi District yielded (two isolates), whereas (one isolate) was obtained from each of Al-Daghara and Al-Saniyah districts. In contrast, no bacterial growth was observed in the selective medium for any of the three samples collected from Al-Diwaniyah City Center; consequently, no bacterial isolates included in the study were recovered from this district.

The results of the morphological, microscopic, and biochemical characterization, together with the VITEK 2 system, confirmed that the isolates belonged to four major genera: *Bacillus* (two isolates), *Lysinibacillus* (three isolates), *Stenotrophomonas* (four isolates), and *Ochrobactrum* (two isolates). The genetic identity of the four most efficient isolates—*Bacillus subtilis* BS1, *Lysinibacillus sphaericus* LS1, *Stenotrophomonas maltophilia* SM1, and *Ochrobactrum* sp. OA1—was further confirmed through analysis of the *16S rRNA* gene sequence. The

sequences of BS1, LS1, SM1, and OA1 were deposited in the NCBI GenBank database under accession numbers (PZ489030, PZ489022, PZ489031, and PZ489026), respectively. Phylogenetic-tree analysis showed that the isolates clustered into monophyletic clades with closely related isolates from around the world.

The four isolates exhibited varying biodegradation efficiencies toward Chlorpyrifos. *B. subtilis* BS1 achieved the highest degradation rate (97.828%), reducing the residual pesticide concentration from the initial concentration of 100 mg/L to 2.172 ± 0.110 mg/L on the tenth day. This was followed by *S. maltophilia* SM1, with a degradation rate of 95.998%, and *Ochrobactrum* sp. OA1, with a degradation rate of 93.043%. In contrast, *L. sphaericus* LS1 showed the lowest efficiency, with a residual concentration of 11.024 ± 0.181 mg/L on the tenth day and a degradation rate of 88.976%.

The efficiency ranking changed markedly when Malathion was used. *L. sphaericus* LS1 showed the highest degradation rate, reaching 94.141% of the initial Malathion concentration of 100 mg/L by the tenth day, with only 5.859 ± 0.508 mg/L remaining. It was followed by *B. subtilis* BS1, with a degradation rate of 92.666%, and then *Ochrobactrum* sp. OA1, with a degradation rate of 87.910%. *S. maltophilia* SM1 showed the lowest efficiency, with a degradation rate of 84.547% and a residual concentration of 15.453 ± 0.429 mg/L. The biodegradation kinetics also revealed a common pattern among all isolates and for both pesticides, characterized by the highest degradation rates during the first two days (40–55%). Nevertheless, the isolates continued to show progressively increasing cumulative degradation throughout the ten-day incubation period. In contrast, the abiotic control showed only minimal degradation, not exceeding 2% after 10 days, confirming the stability of the pesticides in the absence of biological activity.

The optimum environmental conditions for biodegradation were determined to be a temperature of 30°C, a pH of 7, and an initial pesticide concentration of 100 mg/L, which were the most suitable conditions for all four isolates. Deviations from these conditions—either by decreasing the temperature to 20°C or the pH to 5, increasing the

temperature to 40°C or the pH to 9, or increasing the pesticide concentration to 200–400 mg/L—resulted in reduced biodegradation rates in all four isolates under study. A notable exception was observed for *L. sphaericus* LS1, which tolerated a Malathion concentration of 200 mg/L while maintaining a high degradation efficiency of 94.667%, slightly higher than its degradation efficiency of 93.706% at the concentration of 100 mg/L.

At the genetic level, detection using the polymerase chain reaction (PCR) technique revealed the presence of the organophosphate-degrading gene (*opd*) in the two isolates, *B. subtilis* BS1 and *S. maltophilia* SM1, which may explain their high efficiency in degrading Chlorpyrifos and Malathion. In contrast, this gene was absent from *L. sphaericus* LS1 and *Ochrobactrum* sp. OA1, while the methyl-parathion-degrading gene (*mpd*) was absent from all isolates. The results of whole-genome sequencing (WGS) supported a potential molecular explanation for the biodegradation efficiency exhibited by *L. sphaericus* LS1 and *Ochrobactrum* sp. OA1 and revealed the presence of multiple candidate enzymatic pathways that may contribute to the degradation of organophosphorus pesticides.

WGS analysis of *Ochrobactrum* sp. OA1 revealed seven genes distributed across three functional families. The hydrolase and esterase family included four candidate genes encoding proteins with predicted functions related to arylesterase, phosphodiesterase PdeA, glycerophosphodiester phosphodiesterase, and esterase-like activity. The phosphatase family included two candidate genes encoding proteins with predicted functions related to alkaline phosphatase and metallophosphoesterase, whereas the oxidase family included one candidate gene encoding cytochrome P450. In *L. sphaericus* LS1, WGS analysis revealed six genes distributed across two functional families. The hydrolase and esterase family included four candidate genes encoding proteins with predicted functions related to carboxylesterase, esterase, glycerophosphodiester phosphodiesterase, and putative phosphoesterase. The phosphatase family included two candidate genes encoding proteins with predicted functions related to alkaline phosphatase and metallophosphoesterase. Multiple sequence alignment (MSA) showed complete identity (100%) between the amino acid

sequences of these proteins and the corresponding reference sequences in the GenBank database, supporting the conservation of their sequence characteristics and predicted functions.

The genomic maps showed that these genes were not grouped within a single gene cluster; rather, they were distributed across several regions of the chromosomes, including three regions in *Ochrobactrum* sp. OA1 and two regions in *L. sphaericus* LS1. This distribution indicates a dispersed genomic organization that may be associated with the presence of multiple functional pathways. The absence of the cytochrome P450 oxidation pathway in *L. sphaericus* LS1 provides a convincing explanation for the superior performance of *Ochrobactrum* sp. OA1 in Chlorpyrifos degradation, which reached 93.043% compared with 88.976% for *L. sphaericus* LS1. In contrast, the higher efficiency of *L. sphaericus* LS1 in Malathion degradation, which reached 94.141% compared with 87.910% for *Ochrobactrum* sp. OA1, may be attributed to the presence of esterase and carboxylesterase enzymes that are specialized in cleaving ester bonds. Overall, the dependence of these isolates on a diverse and multifunctional enzymatic system, rather than on a single gene, may provide important evolutionary and applied advantages, particularly metabolic plasticity and functional diversity, including the potential to degrade a broader range of pesticides and remain active under different environmental conditions.

These findings confirm that the local bacterial isolates, particularly *Bacillus subtilis* BS1, *Lysinibacillus sphaericus* LS1, *Stenotrophomonas maltophilia* SM1, and *Ochrobactrum* sp. OA1, possess promising potential for bioremediation applications in the treatment of soils contaminated with Chlorpyrifos and Malathion, owing to their genetic and enzymatic diversity and their ability to function under varying environmental conditions. Moreover, the discovery of alternative enzymatic pathways in *L. sphaericus* LS1 and *Ochrobactrum* sp. OA1, which lack the *opd* and *mpd* genes, represents a valuable scientific contribution to understanding the genetic diversity of pesticide-degrading bacteria and opens new avenues for future research in genetic engineering and the development of specialized bacterial consortia for integrated bioremediation.

Republic of Iraq
Ministry of Higher Education
and Scientific Research
University of Al-Qadisiyah
College of Sciences
Department of Ecology



Whole Genome Sequencing Analysis of Some Bacterial Species Degrading Organophosphorus Pesticides Isolated From Contaminated Soils in Al-Diwaniyah Governorate

A Thesis

**Submitted to the Council of the College of Sciences, University of
Al-Qadisiyah in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Doctor of Philosophy in Ecology**

By

Thair Abid Dasheesh

B.Sc. in Biology, 2007

M.Sc. in Biology-Microbiology, 2011

Supervised by

Professor

Dr. Aamal Ghazi Mahdi

Professor

Dr. Hazim Abed Walli

September, 2026 A.C

Rabi al-Awwal, 1448 A.H