قابلية الفطرين *Saprolegina & Achlya* على التحلل البايولوجي لمبيد الحشرات الديازينون

***لمياء صبيح عبدالله الركابي / كلية التربية /جامعة القادسية**

د. ماجد كاظم الشبلي / كلية التربية / جامعة القادسية

***جزء من رسالة ماجستير للباحثة الاولى**

الملخص

هدفت الدراسة الحالية الى التحري عن قابلية الفطرين *Achlya & Saprolegnia* على التحلل البيولوجي لمبيد الديازينون وهو مبيد حشري يستخدم على نطاق واسع في رش الأراضي الزراعية للتخلص من الحشرات وقد تم عزل الفطرين من مياه نهر الديوانية وتم دراسة قدرتهما في تحليل المبيد ،استخدمت تراكيز مختلفة من المبيد هي (20,40,60,80) جزء بالمليون ولفترات زمنية مختلفة تراوحت بين (2،4،6،8) يوم وتم تقدير كمية المبيد المتبقي باستعمال جهاز HPLC كما تم دراسة تاثير عوامل أخرى منها الكتلة الحية للفطرين و درجة الحرارة والأس الهيدروجيني وقد أثبتت النتائج قدرة الفطر *Saprolagnia* العالية في تحليل المبيد والتي تفوقت على قدرة الفطر *Achlya* و أشارت النتائج إلى أنه بزيادة الكتلة الحية تزداد قدرة الفطر خصوصا عند 1600 mg اذ كانت أكثر قدرة على تحليل المبيد أما درجة الحرارة فان درجة 30 م هي الدرجة المثلى لتحليل المبيد فيما كان القيمة الامثل لل pH هي عند 7 والتي اعطت افضل النتائج.

المقدمة

ان استعمال المبيدات الحشرية هي أكثر الطرق التي استعملت لمكافحة الحشرات وحماية المحاصيل الزراعية فهي تستخدم على نطاق واسع في جميع أنحاء العالم لحماية المحاصيل الزراعية والسيطرة على الحشرات الضارة والأمراض المنقولة بالناقل آو العائل الوسيط وبعد حظر المركبات الكلور العضوية DDT أصبح الاستعمال الأساسي للبيريثرويد والمبيدات الحشرية الفسفورية العضوية (1) وهي مواد كيميائية لها القدرة على منع أو قتل الحشرات (2) وبمرور الوقت قد أصبحت لدى الحشرات مقاومة عالية ضد المبيدات الحالية المصممة ضد الحشرات (3) لقد دعت الحاجة إلى تصميم مبيدات حشرية ذات فعالية وتعمل بعدة آليات ضد الحشرة وفي نفس الوقت تكون ذات تأثيرات طفيفة على البيئة آذ آن المبيدات من الملوثات البيئية التي توجد بكثرة في مياه الشرب والمياه السطحية والهواء والغذاء الامر الذي سبب قلق عالمي متزايد حول أضرار التعرض إلى الملوثات البيئية .

يعد الديازينون من مبيدات الآفات العضوية الفوسفاتية الأكثر استخدام على نطاق واسع (4) ومازال هذا المبيد يستخدم حاليا ويعد إحد أهم المركبات العضوية الفسفورية غير متجانسة الحلقة

وتكـــون الحلقيـــة سداســـية ،تركيبـــة الكيميـــائي 2-isopropyl-6-methyl-4-hydroxypyrimidin (C12H21N2O3PS)، يتحلـل الـديازينون بدرجـة حـرارة 120 درجـة سـيليزية ويكـون مسـتقر بدرجـة حموضـة 7.0 (5) ويعـد الهكسـان والأسـيتون مـن المـذيبات المسـتخدمة مـع الكواشـف التحليليـة للكشـف عـن الـديازينون ويمكـن آن يسـتمر وجـوده فـي البيئـة مـدة 6 اشـهر (6) أو 180 يـوم و يكـون الـديازينون قليـل الـذوبان فـي المـاء وذات اثـر متبقـي طويـل المفعـول أي ليتكسـر نسـبيا لـذلك يسـتخدم علـى هيئـة مستحلب وفي وجود الماء يتحول إلى مادة عالية السمية مؤديا إلى حدوث حالات من التسمم(7) .

إن الآثـار الجانبيـة للمبيـد علـى ألإنسـان والحيـوان موجـودة إذ إن جرعـات قليلـة تـؤدي إلـى حـدوث حـالات تسـمم وكـذلك أورام سـرطانية خاصـة فـي مـخ الأطفـال وقـد يصـل المبيـد الـى الانسـان عـن طريـق الاستنشـاق والملابـس الملوثـة إثنـاء الـرش كـذلك مـن الاطعمـة والميـاه الملوثـة وقـد عثـر علـى بقايـا الـديازينون بنسـبة عاليـة فـي المنـاطق الحضـرية فـي بقايـا النفايـات السـائلة مـن ميـاه مجـاري ومحطـات معالجـة الصـرف الصـحي (8) وتقـوم الإحيـاء المهجريـة المتواجـدة فـي التربـة بتحليـل المبيـدات إلـى غـاز ثانيـا اوكسـيد الكربـون وعنصـر معـدني وتعتمـد عمليـة التحليـل بشـكل أساسـي علـى تركيـب المبيـد نفسـه بالإضـافة إلـى عوامـل أخـرى خارجيـة مـن درجـة حـرارة والـرقم الهيـدروجيني و الرطوبـة وغيرهـا مـن العوامـل الأخـرى وعلـى العمـوم فـان إي ظـرف يـدعم نمـو وتكـاثر الكائنـات المهجريـة سـيزيد مـن معـدل التحلل(8,9) .

ذكر (10) ان بعض أنواع الإحياء المهجرية تتميز بقدرتها العالية على القيام بعمليات التحلل الحيوي ومن المعروف آن المبيدات ومنتجاتها الايضية تمتاز بالبقاء لفترة طويلة في التربة ومن المستحيل آن تكون نسبة انخفاضها في التربة نتيجة تحللها ذاتيا بل بسبب التحلل المايكرو بيولوجي حيث تكون التربة غنية بالإحياء المهجرية الدقيقة التي تساعد على إزالة تلك المبيدات من التربة وهي طريق مثلى لإزالة المبيدات ،وتعد الفطريات هي الأكثر نشاطا على تحليل المبيدات بسبب قدرتها الإنزيمية العالية (11) .

اشار (12) الى أن المبيدات الزراعية مواد شائعة الاستعمال لتفادي الآفات الزراعية وزيادة الإنتاج على الرغم من التأثيرات السلبية وغير المرغوب بها على البيئة وصحة الإنسان حيث تعتبر من الملوثات السامة للمياه إذا ما وصلت إلى المسطحات المائية بالبزل أو مياه الأمطار أو بالرمي المباشر إلى الأنهار خصوصا القريبة من الأراضي الزراعية اي ان تلوث المياه يكون اما بطريقة الرش المباشر والرش غير المباشر بواسطة الطائرات وغسل الهواء المحمل بالمبيد بواسطة الإمطار او انجراف السيول المارة بالتربة الملوثة بالمبيدات.

بسبب اهمية موضوع حماية البيئة ولغرض تخليص البيئة من المبيد ديازينون المتبقي بعد الاستخدام بطرق صديقة للبيئة جاءت هذه الدراسة والتي شملت :-

1 – عزل وتشخيص الفطرين *Saprolegnia & Achlya* .

2 – اختبار قدرة الفطرين على التحلل البيولوجي للمبيد ديازينون .

3 - التحري عن الظروف المثلى التي يعمل عندها الفطرين *Saprolegnia & Achlya* في تحليل المبيد .

المواد وطرق العمل

- جمع عينات المياه

تـم جمـع العينـات مـن ميـاه نهـر الديوانيـة بتـاريخ 1/12/2011 أخـذت عينـات ميـاه مـن أمـاكن مختلفـة وأعمـاق مختلفـة لغـرض عـزل الفطـرين *Achlya & Saprolegnia* ، اثنـاء جمـع العينـات تـم قيـاس درجـة الحـرارة و PH ،بعـدها وضـعت العينـات فـي قنينـة زجاجيـة معتمـة ومعقمـة سعة (2) لتر محكمة الغلق ثم نقلت إلى المختبر لإجراء تجربة العزل .

- عزل الفطريات

اسـتخدمت طريقـة الطعـوم Baitting لعـزل الفطريـات مـن المـاء وذلـك باسـتخدام بـذور السمسـم Sesamum indecum المعقمـة بدرجـة 150 مْ ومـدة 20 دقيقـة باسـتخدام الموصـدة . إذ وزعـت عينـات المـاء بعـد رجهـا جيـدا فـي أطبـاق بتـري معقمـة قطرهـا (10) سـم حاويـة علـى بـذرة معقمـة بواقـع (٣) مكـررات لكـل عينـة وللـتخلص مـن التلـوث البكتيـري أضـيف لكـل طبـق (1.5-2) مـل مـن Chloramphenicol والمحضـر بإذابـة (250) ملغـم مـن المضـاد فـي (250) مـل مـاء مقطـر معقـم. وبعـد ذلـك حضـنت الأطبـاق فـي الحاضـنة بدرجـة (25) مْ وفحصـت بعـد 24 سـاعة بوسـاطة المجهـر الضـوئي لمراقبـة نمـو الخيـوط الفطريـة غيـر المقسـمة علـى البـذور كـل (24) سـاعة لمـدة أسـبوع .وعملـت مـزارع نقيـة بعـد اسـتطالة الخيـوط الفطريـة غيـر المقسـمة وذلـك بقطـع خـيط فطـري واحـد أو مجموعـة خيـوط بوسـاطة شـفرة حـادة معقمـة وإبـرتين زجـاجتين معقمتـين بعـدها تـم غسـل هـذهِ الخيـوط جيـدا بوضـعها فـي طبـق بتـري يحتـوي علـى مـاء مقطـر معقـم ، وبعـدها نقلـت هـذه الخيـوط تحـت ظـروف تعقيم جيـدة إلـى الوسـط ألزرعـي الصـلب المحضـر مـن أكـار مسـحوق الـذرة أو السـابرود أكـار (13,14)وتـم تشخيص الفطريات بالاعتماد على الصفات الزرعية والمجهرية الواردة في (15)(16)(17) .

- المبيد المستخدم

تم استخدام مبيد الديازينون 2- Isopropyl - 6 --Methyl- 4 -Hydroxypyrimidin (C12H21N2O3PS) وهو من المبيدات الحشرية المستخدمة لمكافحة الحشرات المجنحة والزاحفة (كالصرصر و البعوض و النمل) وهو مبيد حشري جهازي سام يحتوي اللتر الواحد منه على 600 غم ديازينون(مادة فعالة) وتم الحصول عليه من مديرية زراعة الديوانية على شكل سائل مركز في عبوات محكمة الغلق وهو من المبيدات الشائعة الاستعمال في جميع انحاء العالم و متعارف عليه عند المزارعين لغرض القضاء على الافات التي تتلف المحاصيل الزراعية وهو من المواد الكيميائية الملوثة للبيئة ويهدد الصحة العامة عندما يكون تركيزه في المياه عالي .

- دور الفطريين *Saprolegnia & Achlya* في تحلل المبيد ديازينون

تمت دراسة دور الفطرين في تحليل مبيد الديازينون بعمل تراكيز مختلفة من المبيد وهي (20،40 ، 60 80) جزء بالمليون او مايسمى (ppm) داخل دوارق زجاجية ذات حجم 250 مل ثم لقحت هذه الدوارق بقرص

من الفطر Saprolegnia sp لكل دورق المقارنة بدون تلقيح وقد أعيدت العملية مع الفطر الثاني Achlya sp بعدها حضنت جميع الدوارق الزجاجية بحاضنة بدرجة 25 مْ ثم تركت لمدة ثمانية ايام إذ كانت النتائج تسجل كل يومين من الحضن عن طريق ترشيحها باستعمال Millipore filter بأوراق ترشيح 0.45 مايكرون للتخلص من الشوائب ويتم القياس بواسطة جهاز الكروماتوكرافي عالي الكفاءة High performance liquid chromatography (HPLC)

- تأثير الكتلة الحية

هدفت هذه التجربة إلى التحري عن تأثير اختلاف الكتلة الحية في كفاءة الفطريين في تحليل المبيد ديازينون وقد تم ذلك بنفس الطريقة المذكورة في أعلاه لكن هنا استخدم تركيز واحد من المبيد هو 60 جزء بالمليون وقد استخدمت كتل حية مختلفة من كل فطر وهي (200,400,800,1600) ملغم.

- تأثير PH

هدفت هذه التجربة إلى التحري عن تأثير اختلاف قيم الاس الهيدروجيني في كفاءة الفطرين في تحليل المبيد ديازينون وقد تم ذلك بنفس الطريقة المذكورة في اعلاه لكن هنا استخدم تركيز واحد من المبيد هو 60 جزء بالمليون وقد استخدمت قيم pH مختلفة هي (6,6.5,7,7.5,8).

- تأثير درجة الحرارة

هدفت هذه التجربة إلى التحري عن تأثير اختلاف درجة الحرارة في كفاءة الفطرين في تحليل المبيد ديازينون وقد تم ذلك بنفس الطريقة المذكورة في اعلاه لكن هنا استخدم تركيز واحد من المبيد هو 60 جزء بالمليون وقد استخدمت درجات حرارة مختلفة هي(10,20,30,40) درجة مئوية.

النتائج والمناقشة

- **دور الفطرين *Saprolegnia & Achlya* في تحليل المبيد ديازينون**

  - الفطر *Saprolegnia* sp.

يبين الجدول (1) دور الفطر Saprolegnia في التحلل البيولوجي لمبيد الديازينون يلاحظ إن أفضل النتائج كانت عند التركيز 20 جزء بالمليون اذ كانت نسبة التحلل بعد ثمانية أيام من الحضن % 73.5 فيما جاء التركيز80جزء بالمليون بالمرتبة الثانية بنسبة تحلل بلغت 54% تلاهما التركيزيين 40 و 60 جزء بالمليون بنسبة تحلل بلغت 48 % و 37.1 % على التوالي وهذا يتفق مع (18) الذي ذكر بان هنالك كفاءة عالية لدى الفطريات المائية في تحليل الملوثات العضوية في المياه، ان قدرة الفطريات في تحليل المبيدات راجع الى جهازها الانزيمي الكفوء والى ايضها وطبيعة تغذيتها وفسلجتها الخلوية (19).

الجدول (1) دور فطر السابرولكينيا في تحليل مبيد الديازينون

تركيز المبيد	المبيد المتبقي بعد				نسبة التحلل %
ppm	يومين	اربعة ايام	ستة ايام	ثمانية ايام	
20	15.7	13.8	12.3	11.9	59.5
40	28.1	26.0	23.8	19.5	48
60	31.7	28.9	26.3	22.3	37.1
80	43.4	43.2	43.2	43.1	54

ويتم حساب التحلل من المعادلة ادناه :

$$\text{نسبة التحلل \%} = \frac{\text{التركيز المتحلل}}{\text{التركيز الكلي}} \times 100$$

● الفطر .sp *Achlya*

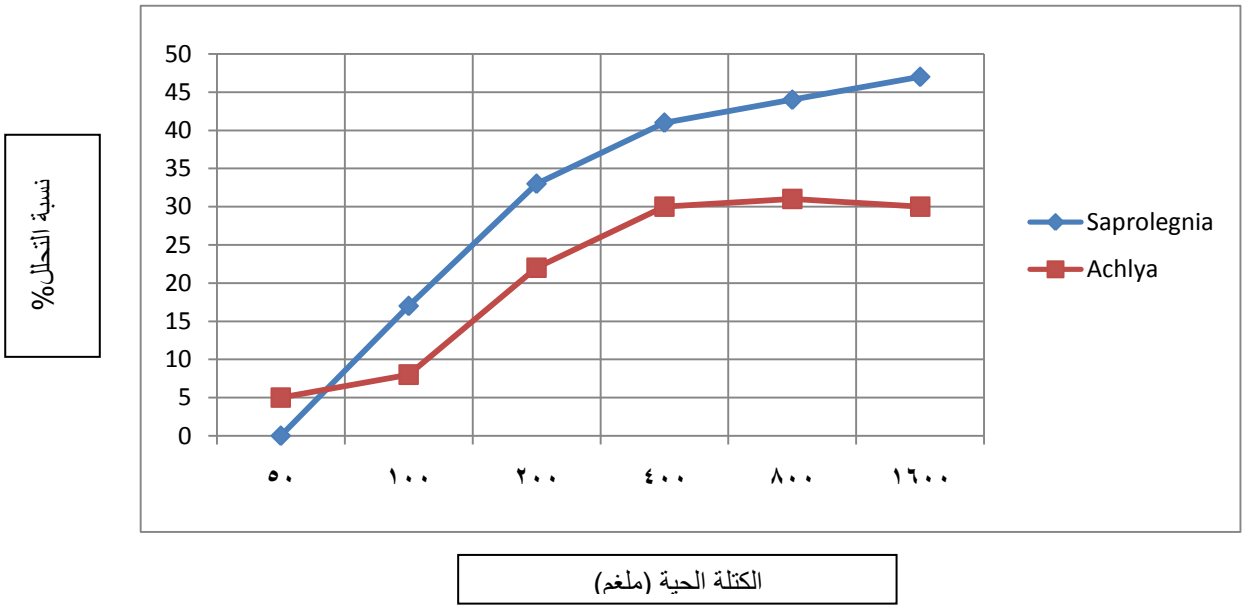
يبين الجدول رقم (2) دور الفطر الاكليا في التحلل البيولوجي لمبيد الديازينون اذ اظهر قدرة في تحلل المبيد وهذه القدرة تتناسب طرديا مع زيادة مدة الحضن وقد كانت اعلى نسبة تحلل عند التركيز 20 جزء بالمليون اذ كانت نسبة التحلل 55.2% تلاها التركيز 40 و80 و 60 جزء بالمليون بنسب تحلل بلغت 51, 1. 50, 17.2 % مما يدل على ان هذا الفطر له القدرة على افراز الانزيمات المحللة والتي يزداد تركيزها بمرور الوقت.

الجدول (2) دور فطر الاكليا في تحليل مبيد الديازينون

تركيز المبيد	المبيد المتبقي بعد				نسبة التحلل %
ppm	يومين	اربعة ايام	ستة ايام	ثمانية ايام	
20	13.8	13.8	13.1	11	55.2
40	29.4	28.2	25.3	24.2	51.1
60	33.8	32.4	27.9	25.6	17.2
80	46.1	45.7	45.5	40.3	50

●تأثير الكتلة الحية للفطرين المستخدمين في تحليل المبيد

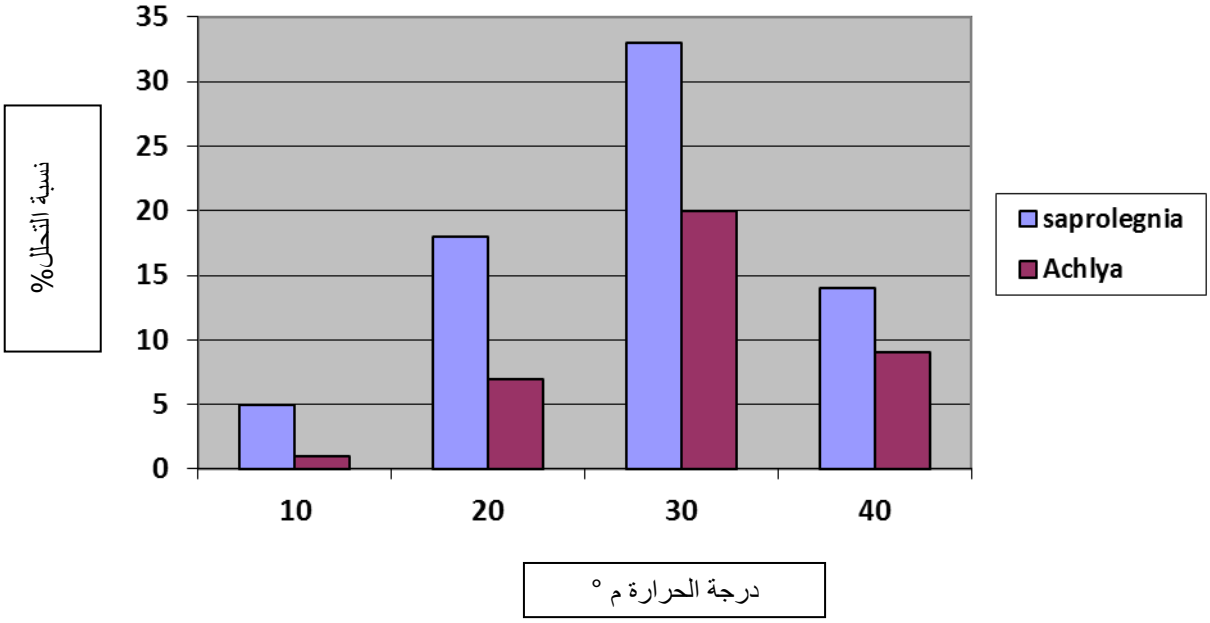
يظهر الشكل رقم (1) تأثير اختلاف الكتلة الحية للفطريين *Saprolegnia & Achlya* في نسبة تحلل مبيد الديازينون إذ يلاحظ من الشكل أدناه بأن نسبة التحلل تزداد بزيادة الكتلة الحية إذ كانت النسبة (1.2و5) % للفطريين *Saprolegnia & Achlya* على التوالي عند الكتلة 50 ملغم ثم تزايدت النسبة بشكل طردي مع زيادة الكتلة وصولا(47 و 30) % عند الكتلة 1600 ملغم للفطريين أعلاه على التوالي وتشير الدراسات إلى إن زيادة الكتلة الحية للفطر يترتب عليها زيادة في اعداد الخلايا وبالتالي زيادة كمية الانزيمات التي تساهم في تحلل المبيد وبالتالي تزداد الكفاءة (20,21) .



شكل رقم (1) تأثير الكتلة الحية (ملغم) في كفاءة الفطرين Achlya & Saprolegnia في تحليل مبيد الديازينون

● التفاوت في درجة الحرارة ودورها في تحليل المبيد

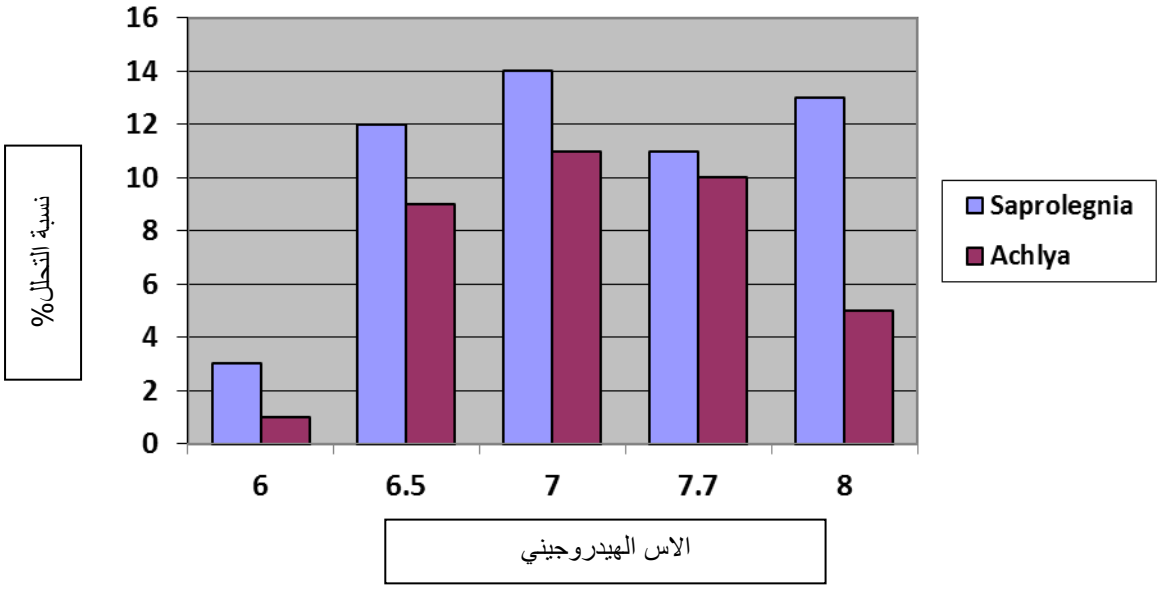
لقد أشارت نتائج الدراسة إلى اختلاف تأثير درجة الحرارة في تأثيرها على نسبة تحلل المبيد ديازينون اذ لوحظ بان أفضل درجة حرارة هي عند30 درجة مئوية إذ وصلت نسبة التحلل إلى أقصاها فبالنسبة للفطر سابرو لكنيا كانت نسبة التحلل 36% فيما كانت عند الفطر أكليا النسبة 20% يلاحظ بان نسبة التحلل تزداد بزيادة درجة الحرارة وصولا إلى درجة 30درجة مئوية بعدها تنخفض نسبة التحلل بزيادة درجة الحرارة ، تتماشى هذه النتائج مع ما ذكره (22) بان الظروف التي تدعم نمو وتكاثر الفطر تعتبر افضل درجة لقدرة الفطر على تحليل الملوثات العضوية.



شكل رقم (2) تأثير درجة الحرارة في كفاءة الفطرين Achlya & Saprolegnia في تحليل مبيد الديازينون

- التغاير في الاس الهيدروجيني

لقد أظهرت نتائج الدراسة المبينة في الشكل ٣ بان أفضل قيمة للأس الهيدروجيني هي عند 7 إذ كانت نسبة التحلل 14 و 11 للفطريين سابرولكنيا واكليا على التواليو ان هذه القيمة من الاس الهيدروجيني تدعم نشاط الانزيمات المحللة مقارنة بالقيم الاخرى من الاس الهيدروجيني (23) .



شكل رقم (3) تأثير الاس الهيدروجيني في كفاءة الفطرين Achlya & Saprolegnia في تحليل مبيد الديازينون .

المصادر

1-Ursel ,H. ; Jürgen, A, and Hans, D.(2004).Current internal exposure to pesticides in children and adolescents in Germany: urinary levels of metabolites of pyrethroid and organophosphorus insecticides. Volume 77, (1) 67-72.

2- Waxman ,M.F. (1998)Agrochemical and Pesticide Safety Handbook Lewis Publishers, Boca Raton, Boston, London, New York, Washington.

3- Plimmer, J.R.; Gammon, D.W. and Ragsdale , N.N. (2003) Encyclopedia of Agrochemicals John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey.

4- Rahimi ,A. F.; Rahiminejadm, M.; Shahtaheri ,S.J.; Ganjali ,M.R.and Globabaei , F. (2009).Degradation of herbicide in water environment. Iran.J. Environ.Health Sci.Eng. ,Vol .6, No. 2,pp.97-106.

5- Asakura.Y, Nishida.T, Koda.S.(2008)Effect of ultrasonic frequenc Y and liquid height on sonochemical efficiency of large – scale sonochemical reactors ultrason sonsnchem.15:244-250.

6- Shayeghi, M.; ehghani, M.H.; and Mahvr,A.H..(2010). Role of chemical ,Biological and Physical methods in break down of pesticides in fresh water.Enviro.Jou.(9)28-36.

7-Ganbert, U.S.(2003)Environmental Protection Agency(EPA). Final List of Recommendations For Chemicals in the National Survey For Pesticides. Chem.Rep9(34):988.

8 – المحيسن،صالح ؛مطرود، عبد النبي عبدالامير و فياض،محمد عامر(2011). دور الاحياء المجهرية في تخليص التربة من المبيدات المتبقية . مجلة ابحاث البصرة (للتعليمات) عدد 87 الجزء الرابع .

9- قاسم،غياث محمد ومضر،عبد الستار علي،1989. علم الاحياء التربة المجهرية .وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ،جامعة الموصل.

10- العادل،خالد محمد وعبد،مولود كامل؛1979. المبيدات الكيميائية في وقاية النباتات.دار الكتاب للطباعة والنشر ، جامعة الموصل.

11- Irin, A. F. and Svetlana, K. S.(2010). Overcoming of Soil Contamination with Pesticides in Forest Nurseries Using the Activity of Microanisms pestic. Fitomed .(Beograd), 25(2), 2010,177-182.

12- **السعيدي،حسين علي.(2002).** علم البيئة والتلوث- وزارة التعليم العالي والبحث العلمي- جامعة بغداد.

13- Al-Rekabi, S. A.; Naeem, R. A. and Butty, K. N. (1996). Specificity of Baits in isolation Saprolegniaceae. Al-Mustansiriyah J. Sci., 7 (1): 20-22.

14- Booth.C.(1971) methods in microbiology,vol.4.2nd ed Acead.press,New York.,64pp.

15-الرحمة،عبدالله بن ناصر،2005.اساسيات علم الفطريات .المملكة العربية السعودية – جامعة الملك سعود- كلية العلوم - قسم النباتات والاحياء الدقيقة.

16- الموسوي،هدى رحيم،2010. عزل وتشخيص الفطريات المتواجدة في نهر الديوانية وإمكانية استخدامها كمؤشرات للتلوث الإحيائي في مياه النهر،رسالة ماجستير- كلية التربية –جامعة القادسية .

17- Sparrow, F. K. (1960). Aquatic Phycomycetes. 2nd ed. Univ. of Mich. Press, Ann. Arober, Mich., 1187pp

18 - حسن،خالد فالح؛ عبد الحسين،سعدي كاظم،2010. التحليل البيولوجي لبعض المواد العضوية في المياه الملوثة باستخدام الفطريات، دائرة تكنولوجيا معالجة المياه ، وزارة العلوم والتكنولوجيا،مجلد(2) عدد(3).

19- Kremer, S. and Anke, H. (2005). Fungi in Bioremediation. In Fungal Biotechnology. Anke, T. ed., Chapman Hall, Weinheim. 276-290.

20- Smejkal, C. W.; Vallaeys, T.; Seymour, F. A.; Burton, S. K. and Lappin-Scott, H. M. (2001). Characterization of (R\S)-mecoprop [2-(2-methyl-4-chlorophenoxy) propionic acid] degrading Alealigenes sp. CS1 and Ralstonia sp. CS2 isolated from agricultural soils Environ Microbiol. 3: 288-293.

21- Leo,M.L. and Hameer,S.F.(2010).Handbook of pesticides methods of pesticide residuse analysis .CPC.press.Tylor and frances group. Boca Raton.London.

22- Abd Naser, H. S. and Sani, I. (2008). Organochlorine pestisid residues in the Major rivers of Southern Thailand. Malaysian. J. analytical sciences. 12(2): 280-284.

23- Hamilton,D. and Crossely,S.(2004).Pesticide residue in food and drinking water human exposure and risks.John willy and Sons Ltd.

The ability of fungi Achlya & Saprolegnia in Biological Degradation for insecticide Diazinon

Lamyaa Sabeeh Abdullah Alrikabi

Al-Qadisiya University /College of Education /Department of Biology

D. Majid Kadhim Aboud

Al-Qadisiya University /College of Education /Department of Biology

summary

The study aimed to investigate the role of tow fungi *Saprolegnia* sp. & *Achlya* sp. biological degradation of the insecticide Diazenon which widely used for spraying crops to get protect from insects. Tow fungi were isolated from water of the river Diwaniyah and study their ability in degradation of diazenon , inspected the used different pesticide concetrations is (20,40,60,80) part per million and different periods of time ranging between (2, 4, 6, 8) on the estimate of the quantity of pesticide remaining by using the HPLC study was also impact factors other of living biomass of the tow fungi biomass and the temperature and pH has proved the results the ability of lesser fungus *Saprolagnia* high in degradation of pesticide , which surpassed the ability of *Achlya* and pointed results to the biomass increase live increase the fungus ability of degradation , especially when 1600 mg , was more than the capacity of the degradation of pesticide either temperature, degree of 30 c° is optimal to degrade pesticide in the optimal value for the pH is at 7 , which gave the best results.