جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ميسان – كلية العلوم
قسم علوم الحياة

خصائص الفطريات المعزولة وقدرتها الأنزيمية في تحطيم مركبات النفط الخام في محافظة ميسان

رسالة مقدمة إلى مجلس كلية العلوم – جامعة ميسان ، وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علوم الحياة

من الطالب

احمد راضي موسى
بكالوريوس تربية علوم الحياة 2004

باشراف

أ.د.علي عبد الواحد قاسم

ذوالقعدة 1443

حزيران 2021

بسم الله الرحمن الرحيم

(فأما الزبد فيذهب جفاء وأما ما ينفع الناس

فيمكث في الأرض كذلك يضرب الله الأمثال)

صدق الله العلي العظيم

من سورة الرعد الآية 17

توصية الأستاذ المشرف

أقر أن إتمام هذه الرسالة المقدمة من قبل الطالب احمد راضي موسى والموسومة (خصائص الفطريات المعزولة وقدرتها الأنزيمية في تحطيم مركبات النفط الخام في محافظة ميسان) جرى تحت أشرافي في قسم علوم الحياة –كلية العلوم –جامعة ميسان كجزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علوم الحياة .

التوقيع :

أسم المشرف: أ.د. علي عبد الواحد قاسم

اللقب العلي : أستاذ

التاريخ : / / 2021

توصية رئيس القسم

بناءً على التوصية المقدمة من قبل الأستاذ المشرف أحيل هذه الرسالة إلى لجن المناقشة لدراستها وبيان الراي فيها

التوقيع :

أسم رئيس القسم :أ.م. د. ميثم عبد الكاظم

اللقب العلمي : أستاذ مساعد

التاريخ : / / 2021

المقومون

المقوم اللغوي:

قومت الرسالة لغويا من قبل (أ. د مولود محمد زايد) جامعة ميسان – كلية التربية

المقوم العلمي:

قومت الرسالة علميا من قبل كلاً من :

(أ. د محمد جبير حناوي) جامعة واسط - كلية العلوم (أ .د عبد الأمير سمير سعدون) جامعة القادسية – كلية العلوم

مصادقة عمادة كلية العلوم

بناءَ على الصلاحيات المخولة لدينا نصادق على ما جاء في قرار لجنة المناقشة

التوقيع:

الاسم : أ.م. د. صبيح جاسم كاطع

العنوان : جامعة ميسان – كلية العلوم

التاريخ: / / 2021

إقرار لجنة المناقشة

نحن أعضاء لجنة المناقشة الموقعين في أدناه ، نشهد أننا قرأنا رسالة الماجستير الموسومة (خصائص الفطريات المعزولة وقدرتها الانزيمية في تحطيم مركبات النفط الخام في محافظة ميسان) والتي تقدم بها الطالب (احمد راضي موسى) وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علوم الحياة (الفطريات) وبعد أجراء المناقشة وجدت اللجنة أن الرسالة جديرة لنيل الشهادة المذكورة وبتقدير (امتياز) .

رايس اللجنة

أ.د جواد كاظم عبود الجنابي

التوقيع:

اللقب العلمي: أستاذ

الاختصاص : فطريات

التاريخ :

عضو اللجنة

أ.د غسان مهدي داغر

التوقيع :

اللقب العلمي :استاذ

الاختصاص : فطريات

التاريخ :

عضو اللجنة

أ.م.د. مهند خلف محمد امين

التوقيع :

اللقب العلمي :أستاذ مساعد

الاختصاص :فطريات

التاريخ :

عضو اللجنة والمشرف

أ.د علي عبد الواحد قاسم

التوقيع :

اللقب العلمي : أستاذ

الاختصاص : فطريات

التاريخ :

الإهداء

إلى صاحب الفضل الأول والأخير والهادي إلى سواء السبيل...... الله عزة وجل

إلى معلم البشرية و من قاد عقولها إلى بر الأمان....... محمدا (ص)

إلى من كان دعاؤهما سر نجاحي...... أبي وأمي

إلى قلبي وروحي ..... زوجتي وأطفالي

إلى سندي واعتزازي....... أخوتي

إلى فاعليَّ الخير وقدوتي في الحياة.... أبو زهير وأبو ثائر

إلى رفيق دربي وصديق العمر...... علي سالم

إلى كل طالب علمٍ سعى بعلمه ليستفيد غيرة منه

احمد راضي

الشكر والتقدير

قال تعالى (ومن يشكر فإنما يشكر لنفسه) (لقمان 12)

وقال الرسول (من لم يشكر الناس لم يشكر الله)

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على أشرف الخلق والمرسلين محمداً وعلى إله وصحبة المنتجبين ، بعد أن وفقني الله على أكمال رسالتي لا يسعني ألا أن أتقدم بالشكر والتقدير إلى كل من ساهم معي في أنجاز هذا العمل وأخص بالذكر أولا أستاذي ومشرفي الدكتور علي عبد الواحد لأشرافه واقتراحه لمشروع رسالتي ودعمه العلمي والمعنوي لي طوال فترة البحث فجزاه الله خيرا ووفقه لما يحب ويرضى .

وأتقدم بالشكر والتقدير إلى عمادة كلية العلوم لما قدمته من تسهيلات لطلبة الدراسات العليا ، ووافر الشكر والتقدير إلى رئاسة قسم علوم الحياة وعلى رأسها الدكتور ميثم عبد الكاظم والست شيماء ربيع والى جميع أساتذة ومدرسي وموظفي القسم

وشكري وتقديري إلى كل إفراد أسرتي لوقوفهم بجانبي طيلة فترة دراستي ، وأتقدم بالشكر والتقدير إلى كل من ساندني وساهم من قريب أو من بعيد في مساعدتي وأخص بالذكر المدرسين مهند مهدي وفراس صبيح .

الخلاصة

يعد التلوث النفطي من اشد أنواع التلوث خطورة على جميع الأنظمة البيئية وخاصة التربة لكونها الحوض النهائي لتلك الملوثات ولكونه يحتوي على العديد من المركبات السامة لذلك يعتبر ضار للكائنات الحية ،وقد هدفت هذه الدراسة إلى عزل الفطريات المتواجدة في التربة الملوثة بالنفط الخام ودراسة فعاليتها الإنزيمية ودورها في تحلل النفط باستخدام عدة أوساط زرعيه منها وسط Potato Dextrose Agar ، Malt Extract Agar ، Mineral Salt Medium ، وعُزلت الفطريات من التربة بطريقة الزرع المباشر Direct Culture .

أجريت الدراسة في مختبر قسم علوم الحياة - كلية العلوم – جامعة ميسان ، تم جمع 120 عينه من التربة الملوثة بالنفط الخام شرق محافظة ميسان خلال الفترة من شهر أيلول 2020 ولغاية شهر نيسان 2021 حيث كانت التربة ملوثه على مدى عقود من الزمن .

تم خلال الدراسة المسحية للفطريات من عزل وتشخيص 27 نوعاً من التربة الملوثة بالنفط الخام كانت تعود أغلبها للفطريات الكيسية Ascomycota (الطور اللاجنسي) وبنسبة بلغت 88.88%، وثلاثة أنواع تعود للفطريات اللاقحية Zygomycota بنسبة بلغت 11.11 % ، ، بلغ المجموع الكلي لعدد العزلات خلال الدراسة 235 عزلة ، أظهرالفطر *Aspergillus niger* أعلى نسبه ظهور فكانت 42.5 % وتردد بلغ 21.70 % تلاه الفطر *Alternaria alternata* بنسبة ظهور بلغت 39.16 % وتردد 20 % ، تلاهما الفطر *Rhizopus oryzea* بنسبة ظهور بلغت 17.5% وتردد 8.93 % . وأظهرت الدراسة بأن هنالك 8 أنواع أعطت نسبة ظهور 0.83 % وتردد 0.42 % .

شخصت خلال الدراسة ثمانية أنواع لأول مرة من التربة الملوثة بالنفط الخام في العراق هي *Alternaria tenuissima* و*Bipolaris australiensis* و *Curvularia lunata* و *Nigrospora oryzae* و*R. oryzae* و *Stachybotrys chartarum* و*Syncephalastrum racemosum* و *Ulocladium botrytis* .

وأظهرت نتائج التحليل الفيزيائي للتربة قيما كانت ملائمة نسبياً لنمو الفطريات المذكورة فكان الأس الهيدروجيني يتراوح بين 6.4 - 7.3 وتراوحت قيم التوصيلية الكهربائية بين 190.4 - 41.1 مليموز/سم فيما تراوح المحتوى المائي بين 62 % -88 %.

خلال دراسة قابلية الفطريات المعزولة على إفراز الإنزيمات اختيرت منها 10 أنواع لإفراز خمس أنزيمات هي Lipase Protease ,Phytase, Laccase, Xylanase ، وقد أظهرت جميع الانواع الفطرية المختبرة قابلية على إفراز أنزيم Lipase عدا فطر واحد تلاه أنزيم Xylanase أظهرت 8 أنواع فطرية قدرة على إفرازه ووجد بأن 7 أنواع تمكنت من أفراز إنزيم

Protease و تباينت الأنواع الفطرية في إفرازها لأنزيمي Laccase و Phytase ، وأظهرت نتائج الدراسة أن الأنواع التي استطاعت أن تفرز جميع الإنزيمات هي *A.niger, A.tenuissima, Cladosporium cladosoprioides* .

عند دراسة قابلية الفطريات على تحلل النفط الخام اختيرت منها 8 أنواع ووجد بأنها كانت قادرة على تحليل النفط الخام خلال فترتي حضانة 7 أيام و 30 يوم ولكن بمعدلات متباينة قليلا حيث أظهر جميع الأنواع قابلية عالية على تحليل النفط الخام تراوحت بين 70%-75% في حين أظهر الفطر *A.terreus* قابلية ضعيفة على تحلل النفط الخام حيث تراوحت بين 30-25% % خلال فترتي الحضانة .وأظهرت الدراسة بأن هنالك تبايناً بين الأنواع في قابليتها على تكوين كتلة حيوية من الغزل الفطري.

وقد استنتج من خلال الدراسة بأن بعض الفطريات لها القدرة على استيطان التربة الملوثة بالنفط الخام وكانت تملك فعالية إنزيمية لها دور في تحلل النفط الخام.

المحتويات

الصفحة	العنوان	التسلسل
	الفصل الاول : المقدمة	
3-1	Introduction المقدمة	1-1
3	الهدف من الدراسة	2-1
	الفصل الثاني : استعراض المراجع	
7-4	نبذه عن فطريات التربة الملوثة بالنفط	1-2
8	الفعالية الانزيمية لفطريات التربة الملوثة بالنفط	2-2
9-8	أنزيمات Ligninolytic	1-2-2
12-9	أنزيمات التحلل المائيHydrolytic Enzymes	2-2-2
12	التركيب الكيميائي للنفط الخام	3-2
13-12	المركبات الهايدروكاربونية	1-3-2
13	المركبات غير الهايدروكاربونية	2-3-2
14-13	مركبات معدنية عضوية	3-3-2
15-14	تلوث التربة بالنفط الخام وتاثيراته على الكائنات الحية	4-2
15	معالجة التربة الملوثة بالنفط	5-2
16-15	المعالجة البايلوجية Bioremediation	1-5-2
16	طرق المعالجة البايلوجية	1-1-5-2
18-16	المعالجة الفطرية Mycoremediation	1-1-1-5-2
18	طرق أخرى للمعالجة	2-1-1-5-2
20-18	العوامل المؤثرة في المعالجة البايلوجية	6-2
	الفصل الثالث: المواد وطرق العمل	
21	المواد	1-3
22-21	الاجهزة والمعدات Equipment and Instruments	1-1-3
22-21	المواد الكيميائية Chemical Materiale	2-1-3

23	الأوساط الزرعية	3-1-3
23	طرق العمل Methodes	2-3
24-23	جمع العينات Sample Collection	1-2-3
24	تحضير الأوساط الزرعية	2-2-3
25	وسط اكار البطاطا والدكستروز PDA	1-2-2-3
25	وسط MalteExtracte Agar	2-2-2-3
25	وسط الاملاح المعدنية Mineral Salt Media	3-2-2-3
26	وسط الكشف عن أنزيم Lipase	4-2-2-3
26	وسط الكشف عن أنزيم Protease	5-2-2-3
26	وسط الكشف عن انزيم Laccase	6-2-2-3
27	وسط الكشف عن أنويم Phytase	7-2-2-3
27-26	وسط الكشف عن أنزيم Xylanase	8-2-2-3
27	التعقيم Sterilization	3-2-3
27	التحليل الفيزيائي Physical Analysis	4-2-3
27	قياس الأس الهيدروجيني Ph	1-4-2-3
28	قياس المحوى المائي Water Conten	2-4-2-3
28	قياس التوصيلية الكهربائية Electrical Conductivity	3-4-2-3
28	عزل وتنمية الفطريات	5-2-3
29	فحص وتشخيص الفطريات	6-2-3
29	تحضير المزارع النقية والفحص المظهري	1-6-2-3
29	الفحص المجهري للفطريات	2-6-2-3
29	حفظ المزارع النقية للفطريات	7-2-3
30	الصبغات والكواشف المستخدمة	8-2-3
30	Lactophenol , Lactophenole Cotton Blue	1-8-2-3
30	صبغة Congo Red	2-8-2-3
30	التصبيغ المزدوج	3-8-2-3
31-30	النسبة المئوية لتردد وظهور الفطريات	9-2-3
31	دراسة الفعالية الانزيمية للفطريات المعزولة من التربة الملوثة	10-2-3
31	أنزيم Lipase	1-10-2-3

2-10-2-3	أنزيم Protease	32
3-10-2-3	أنزيم Laccase	32
4-10-2-3	انزيم Phytase	32
5-10-2-3	أنزيم Xylanase	33
11-2-3	دراسة قابلية بعض الفطريات على تحلل النفط	33
1-11-2-3	أختبار قابلية الفطريات على تحلل النفط خلال 7 أيام	33
2-11-2-3	أختبار قابلية الفطريات على تحلل النفط خلال 30 يوم	34-33
الفصل الرابع: النتائج والمناقشة		
1-4	التوصيف المظهري لبعض الفطريات المعزولة من التربة الملوثة بالنفط	53-35
2-4	التحليل الفيزيائي للتربة الملوثة بالنفط الخام	55-53
1-2-4	الاس الهيدروجيني	53
2-2-4	المحتوى المائي	54
3-2-4	التوصيلية الكهربائية	55
3-4	الدراسة المسحية للفطريات المعزولة من التربة الملوثة بالنفط الخام	61-55
4-4	قابلية بعض الفطريات المعزولة على أنتاج الإنزيمات	69-61
5-4	قابلية بعض الفطريات على تحلل النفط الخام	77-69
الاستناجات والتوصيات		
الاستنتاجات		78
التوصيات		78
المصادر العربية		79
المصادر الانكليزية		108–80

قائمة الجداول

رقم الجدول	عنوان الجدول	الصفحة
1-3	الاجهزة والمعدات المختبرية المستخدمة	22-21
2-3	المواد الكيميائية المستخدمة	23-22
3-3	الاوساط المستخدمة في التجارب	23
4-3	الأنواع الفطرية المختبرة لدراسة الإنزيمات	31
5-3	الأنواع الفطرية المختبرة لدراسة قابليتها على تحلل النفط	34
1-4	التحليل الفيزيائي للتربة	55
2-4	تردد وظهور الفطريات المعزولة من التربة الملوثة بالنفط	58-57
3-4	قابلية الفطريات المعزولة على انتاج الإنزيمات	62
4-4	قابلية الفطريات المعزولة على تحلل النفط الخام خلال 7و 30 يوم	70
5-4	الوزن الطري والجاف للكتلة الحية للفطريات المحللة للنفط الخام بعد 30 يوم	71

قائمة الإشكال

رقم الشكل	عنوان الشكل	الصفحة
1-3	تربة ملوثة بالنفط	24
1-4	التراكيب التكاثرية للفطر *A.alternata*، A : 1- مناطق أرتباط الكونيدات (السهم)2-أنبوب الانبات (السهم) B : الكلاميدوسبور	35
2-4	التراكيب التكاثرية للفطر : *A.citri* , A الكونيدات (السهم يشير إلى أنبوب الانبات)B : الابواغ الكلاميدية	36
3-4	التراكيب التكاثرية للفطر *A.tenuissima*، A: الكونيدات-1الحواجز (السهم) 2- العنق (السهم) B: الكلاميدوسبور(السهم)	37
4-4	الفطر *A.fumigatus*، A: الحويصلة، B: الحامل الكونيدي Conidiophore	38
5-4	الفطر *A.nidulans* ، *A*: الحويصلة والحامل الكونيدي ، B : خلايا Hulle ، C : Cleistothecia	39
6-4	التراكيب التكاثرية للفطر *B.australiensis*، A:الحامل الكونيدي (يشير السهم) B: الكونيدات والحامل الكونيدي (السهم يشير إلى التعرجات)	40
7-4	تراكيب الفطر *B. Sacchari* ، A: الكونيدات الأسطوانية (السهم) B: الحامل الكونيدي (السهم) .	42
8-4	A .1-*C. cladosporioids*: خلايا Shield 2 -:الكونيدات : Bالخيوط الفطرية	43
9-4	كونيديا الفطر *C.lunata* ،A: الكونيدات وترتيبها على الحامل الكونيدي (السهم). B:أنحناءالكونيدات (السهم)	44
10-4	الفطر *Exerohilumholmii*، A : الكونيدات1- النقير الكونيدي (السهم) 2 - الخلايا (السهم) 3- الحواجز الداكنة (السهم) ، B : ترتيب الكونيدات على الحامل الكونيدي .	45
11-4	الفطر *F.solani* ، A : الكونيدات ، B : الابواغ الكلاميدية	46
12-4	الفطر.*M. plumbeus*، A: الحامل الكونيدي والأبواغ ، B : الخيوط الفطرية	47
13-4	تراكيب الفطر *N.oryzae* ،A: الكونيدات 1-الكونيدات الناضجة (السهم) 2-الكونيدات الفتية (السهم) ، B: الخيوط الفطرية	48
14-5	الفطر *R. oryzae*، A : الحافظة الاسبوريةوالاسبورات 1- الحافظة الأسبورية (السهم) 2 - الأبواغ (السهم)، B: اشباه الجذور Rhizoid	49
15-4	الفطر *S. chartarum* ، A: الكونيدات1- الكونيدات الفتية (السهم) 2- الكونيدات الناضجة (السهم) B: الحامل الكونيدي	50

51	تراكيب الفطر *S.herbaryum* A: الكونيدات1- الفتية (السهم) 2-الناضجة (السهم) B: الأبواغ الكلاميدية	16-4
52	الفطر *S.racemosum* A: الحافظة الاسبورية ،B : Sporangiophore (السهم يشير إلى تفرعات الحامل)	17-4
53	الفطر A : *U.botrytis*الكونيدات1-الكونيدات غير الناضجة (السهم) ،2- الكونيدات الناضجة (السهم) , B : ترتيب الكونيدات على الحامل الكونيدي	18-4
67	افراز أنزيم Lipase بواسطة الفطريات A*U.botrytis* :و B : *A. Niger*	19-4
67	أفراز أنزيم Xylanase بواسطة الفطريات *.C*, B : A : *cladosporioides A. chlamydospora*	20-4
68	أفراز أنزيم Protease بواسطة الفطريات A:*A. niger*و B: *U.botrytis*	21-4
68	أفراز أنزيم Laccase بواسطة الفطريات A : *.A* *tenuissima*B:*A.niger*	22-4
69	أفراز أنزيم Phytase بواسطة الفطريات A :A.nigerو B :*A.tenuissima*	23-4
72	قابلية الفطريات على تحليل النفط الخام خلال 7 أيام	24-4
73	قابلية الفطريات على تحلل النفط بعد مرور 30 يوم حضانة	25-4
74	الخيوط الفطرية النامية على وسط الأملاح المعدنية MSM خلال 30 يوم	26-4

قائمة المختصرات

المختصر	المعنى
GYEPR	Glucose Yeast Extract Pepton Agar
MEA	MalteExtracte Agar
MSM	Mineral Salt Media
MAM	Minimal Agar Medium
PAM	Peptone Aga Medium
PSM	Phytase Screening Medium
PDA	Potato Dextrose Agar

الفصل الاول

المقدمة

Introduction

1-1:المقدمة Introduction

الفطريات Fungi كائنات حية غير ذاتية التغذية لأنها لا تحتوي على الكلوروفيل تعيش إما مترممه على المواد العضوية أو متطفلة على الكائنات الحية ، محاطة بجدران خلوية ، حاوية على نواة حقيقية واحدة أو أكثر، جسمها الخضري مكون من خيوط فطرية تدعى Hyphae وعندما تتجمع تكون غزل فطري Mycelium ، تتكاثر بطريقتين ألالاجنسية حيث تستطيع أن تنتج الكثير من الوحدات التكاثرية مثل الأبواغ والكونيدات ، وبالطريقة الجنسية وتنتج أبواغ جنسية منها اللاقحية والكيسية والبازيدية (Hawksworth, 2012) .

الفطريات كائنات واسعة الانتشار في الطبيعة وتضم مجاميع فطرية مختلفة من ناحية التغذية والتكاثر والانتشار في البيئات المختلفة وامتلاكها إستراتيجيات عديدة (Kirk *et al*., 2008)، فقد تتواجد في البيئات المائية وهي كثيرا ما تشبه فطريات التربة وأن نسبة الفطريات المائية قليلة جدا بالمقارنة مع ما موجود في التربة، وتوفر هذه البيئة كل ما تحتاجه للنمو من المصادر الحية وغير الحية (Rateb and Edel, 2011).

أما الفطريات الموجودة في التربة فهي متنوعة وتمتلك العديد من التكيفات التي مكنتها من الانتشار والبقاء وخاصة أذا كانت الظروف صعبة ، اغلب هذه الفطريات رمية المعيشة إضافة إلى الأنواع المتطفلة والمتعايشة ، وقد تتواجد بالحالة اللأجنسية أما أذا وجدت الحالة الجنسية لها فهي تكون ضمن مجموعة الفطريات الكيسية أو الفطريات البازيدية ، وتشكل الفطريات اللأجنسية والكيسية مع بعضهما أكبر مجموعة منتشرة في التربة. وهناك الفطريات اللأقحية ولكن انتشارها يكون بصورة اقل ويقدر العلماء عدد الفطريات الموجودة على سطح الكرة الأرضية بحوالي مليون ونصف (Hawksworth, 2012; Sato *et al*., 2012).

تتعرض التربة للعديد من الملوثات ومن أهمها الاستخدام المفرط لمبيدات الآفات ومخلفات الأنشطة الصناعية والمواد الكيميائية والمعادن الثقيلة والنفط الخام وأن عدم التخلص منها بطرق فعالة يؤدي إلى تراكمها (Chen *et al*., 2020) . يعتبر التلوث بالنفط الخام من أكثر الملوثات ضررا على التربة والذي يحدث عن طريق التسريبات والأنسكابات التي تحدث أثناء الحفر والاستخراج والنقل والخزن والتكرير والتصدير بسبب التكسر والتصدع في أنابيب النقل والخزن والتي تحدث بشكل متكرر (Prasad and Katiyar, 2012). يتركب النفط الخام من عدد كبير من المركبات الهايدروكاربونية وغير الهايدروكاربونية ذات التأثير السمي ، ومن بين تلك

المركبات التي تلعب دورا بارزا في التلوث هي المركبات ألأروماتيه ، وهناك المئات من هذه المركبات والتي تختلف في تركيبها الكيميائي ، فوجود هذه المركبات في التربة بأي شكل من الأشكال يؤدي إلى تلوثها وأحداث أضرار جسيمه في النظام البيئي (Ki *et al.*,2013) ، يؤثر وجود هذه الملوثات على التربة وعلى كل أشكال الحياة فيها ، حيث يؤثر على حجم دقائقها ومساميتها ويؤدي إلى تغير ملحوظ في الخواص الفيزيائية والكيميائية لها والحد من نمو الأحياء المجهرية فيها ، ويؤثر على نمو وتطور النبات أيضا(Vazquez, 2012) .

أصبح من الضروري أزاله هذه الملوثات من التربة أو الحد من انتشارها أو تحويلها إلى مواد اقل سمية بحيث لا تشكل خطرا ،وهناك عدة طرق مستخدمة منها الطرق ألفيزيائيه Physical Remediation والطرق الكيميائية Chemical Remediation ولكن تعُد أغلب هذه الطرق مكلفة وغير فعالة وأنها لا تؤدي إلى أزاله الملوثات بالكامل ويمكن أن تنتج العديد من المخلفات السامه (Li *et al.*, 2017). تعتبر المعالجة البايولوجية Bioremediation واحد من أهم الطرق المستخدمة في إزالة تلك الملوثات عن طريق الكائنات المجهرية ، وتعتبر هذه الطريقة مقبولة من حيث الفعالية والتكلفة وكونها صديقة للبيئة ولا تنتج مخلفات سامة وبذلك تكون طرق بديلة للطرق الفيزيائية والكيميائية (Thapa, and Ghimire, 2012).

تعتبر المعالجة البايلوجية بأستحدام الفطريات Mycoremediation واحده من أهم طرق المعالجة البايلوجية حيث تقوم الفطريات الموجودة في التربة الملوثة بالنفط الخام بأدوار في تلك البيئات وتعمل على تكسير العديد من الملوثات ومنها المركبات النفطية حيث تفككها إلى نواتجها النهائية وهي الماء وثاني أكسيد الكربون (Fariba, 2012) . يأتي دور الفطريات في عملية تحطيم وتحليل تلك الملوثات من خلال النشاط ألأنزيمي لها حيث تمتلك نظاماً معقداً من ألأنزيمات الخارج خلوية Extracellular Enzymes تحول تلك الملوثات ألضارة إلى مواد أخرى اقل ضرراً على التربة والكائنات الحية الموجودة فيها ومن بين أهم تلك ألأنزيمات Lipase protease, phytase Xylanase Laccase (Radhika *et al.*, 2016). هنالك العيد من العوامل التي تؤثر على المعالجة البايلوجية منها نوع وعدد الكائنات الدقيقة المتواجدة في التربة والمغذيات وتركيز الملوثات وكذلك العوامل البيئية كدرجة الحرارة والرطوبة ومحتوى الأوكسجين والأس الهيدروجيني(Avishai *et al.*, 2017) .

هدف البحث

على الصعيد العالمي هناك العديد من البيئات الملوثة بالنفط وخاصة التربة لكونها الحوض النهائي لتلك الملوثات وتربة العراق من أهم تلك الأماكن وذلك لكونه يحتل مكانة متقدمة في أنتاج النفط وبالتالي يمكن أن تتلوث التربة بالنفط الخام ومحافظة ميسا ن واحدا من تلك المناطق حيث تلوثت تربتها وعلى مدى سنوات عدة ، وتم أجراء دراسات عديدة لعزل وتشخيص الفطريات من الترب الملوثة بالنفط على مستوى العراق والعالم. فقد أستطاع AL-Dossary *et al*. (2019) من عزل فطريات تابعة للجنس*Aspergillus* من التربة الملوثة بالنفط في محافظة البصرة ، وتمكن الطائي وجماعته (2016) من عزل وتشخيص 5 أنواع فطرية تعود لثلاثة أجناس من الترب والمياه الملوثة بالنفط في المناطق القريبة من مصفى النجف ، ولعدم وجود دراسات في هذا الجانب وعلى مستوى محافظة ميسان فأن هذه الدراسة تعد الأولى من نوعها .

هدفت الدراسة إلى :

1- عزل وتشخيص الفطريات من التربة الملوثة بالنفط الخام.

2-الكشف عن قابلية بعض الفطريات المعزولة على أنتاج انزيمات phytase, lipase ,laccase, xylanase ,protase على الأوساط الصلبة .

3-اختبار قابلية بعض الفطريات المعزولة على تحلل النفط الخام.

الفصل الثانـي

أستعراض المراجع

Literature Review

1-2 : نبذه عن فطريات التربة

تعد التربة الموطن الرئيسي للكثير من الإحياء المجهرية وخصوصاً الفطريات والتي تعد من أكثر مجاميع حقيقية النواة وفره وتنوعاً في التربة لقدرتها على أنتاج العديد من الوحدات التكاثرية والتي تستطيع الانتقال بوسائل عدة (Aimeur, 2016)، تتواجد الفطريات في كل أنواع التربة تقريبا فقد تتواجد في التربة الزراعية وفي الغابات وفي التربة الصحراوية الجافة وغيرها وتهيمن على باقي الكتلة الميكروبية الموجودة فيها ، ووجد أن البعض من هذه الفطريات يشكل علاقات تكافلية مع النباتات في التربة (Joenrgense and Wichernc, 2008) .

إنّ عدد ألأنواع الفطرية في التربة غير معروف بشكل دقيق ويقدر العلماء بأن عدد الفطريات الكلي 1.5مليون يعتقد أنها موجودة على سطح اليابسة وعددها المشخص في التربة 170000 نوع فطري (Hawksworth, 2012) . إضافة إلى التربة فقد تتواجد الفطريات في بيئات أخرى وخاصة البيئة المائية فقد تتواجد في المياه المالحة وتتميز بقدرتها العالية على التحمل والتكيف مع الملوحة العالية ومنها ما يتواجد في المياه العذبة وهناك ما يعيش في البيئات المالحة والعذبة معاً (Hyde *et al*., 2000) ، توفر هذه البيئة أوساطا مختلفة للنمو ومتمثلة بالعديد من المصادر الحية الحيوانية والنباتية وكذلك المصادر غير الحية مثل بقايا النباتات والحيوانات وقد تتواجد بشكل متطفل أو متعايش أو مترمم ، ويقدر عددها في هذه البيئة بين3047 نوع فطري منها 1527 تعود للفطريات الكيسية (Jones *et al*., 2017) .وقد عُزلت الكثير منها في تلك البيئات فقد ذكر Amend *et al*. (2019) بأنه تم عزل وتشخيص 1000 نوع فطري متواجد في البيئة البحرية كانت اغلبها تابعة إلى مجموعة الفطريات الكيسية والبازيدية.

تتغذى فطريات التربة على المواد العضوية وغير العضوية وعن طريق ما يدعى التغذية الامتصاصية Absorptive Nutrition ، حيث تشكل الفطريات وعن طريق الخيوط الفطرية شبكة واسعة تعزز عمليات البحث عن المغذيات وتطلق هذه الشبكة الإنزيمات التي تعمل على تكسير وتحليل الجزيئات المعقدة وتحويلها إلى مواد ابسط يسهل امتصاصها من خلال جدران وأغشية الخلايا(Kantharaj *et al*., 2017) .

تملك فطريات التربة بشكل عام أمكانية عالية على التكيف مع الظروف القاسية فمثلا تستطيع النمو في درجة حرارة 50 مْ وأكثر وتوصف بأنها متحملة للحرارة وليسَ محبة لها حيث بإمكانها البقاء في سكون (Karuss *et al*., 2011) ، قد تنتج بعض الفطريات تراكيب مقاومة مثل

الأبواغ الكلاميدية Chlamydospores والاجسام الحجرية Sclerotia والابواغ الساكنة التي بإمكانها البقاء سنوات في حالة غير نشطة وهذا يمكنها من البقاء على قيد الحياة فيما أذا كانت الظروف غير ملائمة (Lavelle and Spain, 2005) . تمتلك بعض الفطريات العديد من الوسائل فقد وجد عند انخفاض الأس الهيدروجين فأن بعض الخلايا ألخضريه سوف تأخذ أشكالاً مثل الكروي أو يصبح الغزل الفطري منتفخ كما في بعض أنواع جنس *Alternaria* و *Fusarium* أذ تساعد هذه التغيرات في النمو على تحمل الظروف القاسية التي تسببها تغيرات الأس الهيدروجيني (Sohlberg *et al*., 2015 ;Wurzbacher *et al*., 2011).

تستطيع فطريات التربة أيضاً أن تنتج وحدات تكاثرية مقاومة تتميز بسمك جدران خلاياها وإنتاجها للصبغات المقاومة مثل صبغة الميلانين وبالتالي أصبح من السهل انتشارها وبقاؤها في التربة ذات الظروف الصعبة (Sheifert *et al*., 2011 ; Ruibal *et al*. 2009) .

تتعرض التربة إلى الكثير من الملوثات منها استخدام مبيدات الحشرات والإعشاب وكذلك النفايات والمخلفات الصناعية السامة والمحتوية على العديد من المركبات الضارة، ولكن أخطر تلك الملوثات على التربة هو النفط الخام (Marchand *et al*., 2017) . تتلوث التربة بالنفط الخام عن طريق التسرب من الخزانات والأنسكابات التي تحدث خلال عمليات الإنتاج والتكرير والنقل والخزن والتصدير والحوادث العرضية حيث يؤدي ذلك إلى أضرار كبيرة في التربة (Alberto *et al*., 2017).

تقوم الأحياء المجهرية المستوطنة في التربة بإصلاح ذاتي لها من خلال عمليات التحلل الحيوي وبالتالي تقوم بإعادة التوازن للتربة ، لكن هذه العمليات يمكن أن تتأثر بشكل كبير أذا تجاوزت تلك الملوثات قدرة التربة في المحافظة على توازنها (Commission of EurpeanCommuities 2006; Shah, 2016).

تلعب الفطريات الموجودة في التربة الملوثة بالنفط الخام دور أساسي في تحلل تلك الملوثات وإزالتها، حيث تستخدم الكربون الموجود في تلك الملوثات كمصدر غذائي للطاقة والنمو(Hidayat and Tachibana, 2012). وتعد مفيدة لتلك البيئة لأنها تساهم في أزاله تلك الملوثات لكونها تمتلك نظام أنزيمي فعال يتمثل بالعديد من الإنزيمات الخارج والداخل خلوية ، حيث ظهر في السنوات الأخيرة دور مذهل للفطريات في معالجة الملوثات المعقدة وتحويلها إلى منتجات أبسط وذات أوزان جزيئية أقل أو إلى مركبات مثل الأحماض الدهنية وثنائي اوكسيد

الكربون ، حيث أن العديد من المواد السامة في النفط الخام قد تتحول بواسطة الفطريات إلى مثل تلك المنتجات ويعزز هذا الدور هو قدرة الخيوط الفطرية على النمو الكثيف وفي كل الاتجاهات مما يجعلها بتماس مباشر مع النفط الخام (Chen, 2013).

تختلف فطريات التربة عن باقي الإحياء المجهرية الاخرى في قدرتها على تحلل وتكسير النفط الخام فقد وجد Blasi (2016) بأنها تقوم بتكسير مكونات النفط الخام ذات الأوزان الجزيئية العالية وبشكل أكثر كفاءة من الأحياء ألمجهريه الاخرى.

وجد العلماء بأن الفطريات ليست الوحيدة القادرة على النمو في التربة الملوثة بالنفط بل أن الخمائر لها القدرة كذلك ومنها الخمائر السوداء Black yeasts تملك قدرة على التكيف مع الظروف القاسية مثل التغذية السيئة والبيئات الملوثة وغالباً ما يتم عزلها من البيئات الغنية بالمركبات الاروماتية مثل التربة الملوثة بالنفط الخام (Dehoog, 2014 ; Zhao *et al.*, 2010) . وقد وجد Csutak *et al.* (2010) أن من بين الخمائر التي لها القدرة على النمو في أوساط ملوثة بالنفط *Candida* و *Rhodotorula* و *Sporobolomyces* و *Debaryomyces* و *Pichia* و *Yarrawia*.

هناك العديد من الدراسات على المستوى العالمي والإقليمي و المحلي تمكنت من عزل فطريات من التربة الملوثة بالنفط الخام ومن هذه الدراسات:

أستطاع Odili *et al.*(2006) من عزل فطريات من التربة الملوثة بالنفط في نيجيريا هي *A. niger* و *Aspergillus flavus* و *Chrysosporium* spp. و *Fusarium* spp. . في أيران تمكنت Mohsenzadeh (2012) من عزل الفطريات *Mucor racemosus* و *Ulocladium atarum* و *Fusarium soloni* و *Curvularia lunata* و *Alternaria alternata* و *Penicillium natatum* و *A.flaveus* من التربة الملوثة بالنفط . تمكن Islam (2017) من عزل 20 نوعاً فطرياً تابعة إلى 9 أجناس من التربة الملوثة بالنفط الخام في الهند كان من بينها *Asprgillus* و *Mucor* و *Fusarium* و *Cladosporium* و *Gliocladium* و *Rhizopus* و *Penicillium* . وأستطاعت Elham *et al* .(2017) من تشخيص العديد من الفطريات في إيران محافظة خوززستان كان ممن بينها *A. terreus* و *A.nidulans* و *A.flavus* و *C. lunata* .

تمكن Spini *et al.* (2018) من تشخيص أنواع فطرية عديدة في ايطاليا منها *Fusarium oxysporum* و*A.versicolor* و *Penicillium catenatum* و*C.cladosporioides*

عزل Hashem (2007) فطريات من التربة الملوثة بالنفط في السعودية منطقة الدمام منها *A. Alternata* و *A.flavus* و *U.atrum* و *P.natatum* و *F.solani* و *M.racemosus* . وأستطاع Binsadiq (2012) من عزل الفطريات *F. solani* و *C. lunata* و *A.flavus* من الترب الملوثة بالنفط الخام وكانت هذه الفطريات قادرة على تحلل النفط الخام واستخدام مكوناته كمغذيات لها وتمكن Moustafa (2016) أيضا في السعودية من عزل فطريات من التربة الملوثة بالنفط منها *A .niger* و *Fusarium oxysporum* و *A.flavus* .

قام أبو الغيث (2020) بعزل فطريات من التربة الملوثة بالنفط الخام في ليبيا وهي *Rhizopus* spp. و *Aspergillums fumigatus* و *A. niger* و *A. flavus* و*Aspergillus nidulans* حيث أظهرت أنواع جنس *Aspergillus* تفوق معنوي على أنواع *Rhizopus*

أستطاع Flayyih and Jawharia (2014) من عزل الفطريات *A.niger* و *A.fumigatus* و *F.solani* من التربة الملوثة بالنفط الخام ، تمكنت حبة وآخرون (2015) من الحصول على عزلات فطرية من عينات التربة الملوثة في محافظة بغداد وهي *Bipolaris hawaiiensis* و *Emericella nidulans* و *Fusarium palliodoroseum* و *paecilomyces variotii*. قام Nashmael and Nareen (2016) بعزل مجموعة من الفطريات من التربة الملوثة بالنفط في العراق محافظة أربيل منها الخمائر والفطريات مثل و. *Rhodotorula* spp و *Penicillium* spp. و *A. niger* و *A. terreus* . وتمكنت الفريجي (2016) من عزل الفطريات من المناطق القريبة من مصفى البصرة والتي كانت ملوثة بالنفط الخام منها *A. Alternata* و *A. flavus* و *A.niger* و *A. terreus* و *A. versicolor* و *Mucor* spp. و *Penicillium sp.* . تمكن Adnan *et al.*(2018) من عزل سلالتين فطريتين تابعة للجنس *Penicillium* من حقل الرميلة النفطي ، وأستطاع Jasim and Alhusainy (2018) من عزل الفطر *A. fumigatus* أضافة إلى بعض الخمائر من الترب الملوثة بالنفط الخام .

أستطاع AL-Dossary *et al.* (2019) من عزل فطريات تابعة للجنس *Aspergillus* spp. من التربة الملوثة بالنفط في محافظة البصرة منها *A. fumigatus* و*A.versicolor*.،

2-2:الفعالية الأنزيمية للفطريات التربة الملوثة بالنفط Enzymes Activation for Soil Fungi

تعتبر الأحياء المجهرية مصادر مهمة لإنتاج الإنزيمات المحللة للمواد الهايدروكاربونية وخصوصا البكتريا والفطريات وهناك الكثير من التطبيقات يمكن من خلالها استخدام الفطريات ومن خلال نشاطها الأنزيمي منها استخدامها في المعالجة الحيوية للتربة الملوثة بالنفط الخام (Madigan *et al*., 2010). حيث تستخدم الفطريات نظامها الأنزيمي في تحفيز تفاعلات ألمعالجة البايلوجية من أجل تخفيف أو تحويل أو إزالة ألملوثات ألضارة باستخدام ألعمليات البايلوجية كوسائل فعالة من حيث التكلفة وصديقة للبيئة في تنظيف التربة ألملوثة ، حيث تعتبر فعالية الإنزيمات مفتاح وخطوة رئيسية لمعالجة التربة الملوثة بالنفط الخام والمركبات الكيميائية الاخرى (Yang *et al*., 2016) ، حيث تستخدم الأنزيمات في تحطيم النفط الخام من خلال ألتمثيل الغذائي المتسلسل لتلك المركبات (Broderick, 1999) .

تنتج الفطريات نوعين من الأنزيمات هي Intracellular Enzyems ويطلق على الفطريات المنتجة لها بالفطريات غير محللة للكنين Non-Ligninolytic Fungi ، أما النوع الثاني هي Extracellular Enzymes ويطلق على الفطريات المنتجة لها بالفطريات المحللة للكنين Ligninolytic Fungi (Durairaj *et al*., 2016).

تعزى قابلية الفطريات على تحليل وتكسير الكثير من الملوثات إلى تخليق عدد غير محدد من الإنزيمات الخارجية المشاركة في تحلل اللكنين والسيليلوز والتي لها القدرة أيضاً على تحطيم الجزيئات ذات الوزن الجزيئي العالي والمركبات المعقدة والأكثر مقاومة للتحلل بما في ذلك مكونات النفط وخاصة المركبات العطرية (AL- Nasrawi, 2012) .

تعتبرانزيمات Lignocellulolytic أنزيمات خارج خلوية منتجة من الفطريات وتعمل على تحلل اللكنين والسليلوز وهي تقسم إلى :

2-2-1-: أنزيمات Ligninolytic

تعتبر هذه المجموعة مهمة جدا حيث تعمل على تحلل وتحطيم للكنين وعلى نطاق واسع وبنفس الوقت يكون لها دور في تحلل مكونات النفط ، ففي دراسة أجراها Jove *et al*. (2015) بمقارنة كفاءة ثلاث فطريات محللة للكنين ومثلها غير محللة في أزالة Anthracene وهو مركب اروماتي ووجد بأن الفطريات المحللة للكنين كانت ذات كفاءة عالية جداً في تحليلة بالمقارنة مع الفطريات الاخرى. وجد Novotny *et al* (2004) أن الكثير من الفطريات المنتجة لأنزيمات Ligninolytic كان لها دور في تحطيم Pyrene و Anthracene التي تعتبر من المركبات الأروماتية في التربة الملوثة بالنفط الخام.

يعتبر أنزيم اللاكيز Laccase واحدا من أهم الإنزيمات المحللة للكنين وهو بروتين سكري وزنة الجزيئي 60-70 كيلو دالتون ويلعب دور مهم في تحلل النفط الخام وخاصة المركبات الحلقية (Balaji *et al*., 2014; Baldrian, 2006) . يعتبر Bertrand أول من لاحظ وجود هذا الإنزيم في الفطريات عام 1896 ومنذ ذلك الحين تلقى مزيداً من الاهتمام لدوره في تحطيم الكثير من الملوثات المتمردة (Desai and Nityanand, 2011) .

هناك العديد من الفطريات المنتجة لهذا الإنزيم فقد وجد Barr and Aust (1994) أن من بين تلك الفطريات هي فطريات العفن الأبيض ، وتعتبر الفطريات *F.oxysporum* و*Aspergillus* spp. و *Acremonium* spp. و *Trichoderma* spp. من فطريات التربة المنتجة لهذا الانزيم والتي لها قدرة كبيرة على تحطيم المركبات الأروماتية متعددة الحلقات (Silva *et al*., 2009) .

2-2-2-: أنزيمات التحلل المائي Hydrolytic Enzymes

هي مجموعة كبيرة من الأنزيمات الخارج خلوية المنتجة من البكتريا والفطريات منها Xylanase و Phytase و Lipase و Protase و Cellulase (Mauti, 2016) .تعتبر فعالة في معالجة التربة الملوثة بالهايدروكاربونات النفطية بشكل مباشر أو غير مباشر(Bonugli-Suntos *et al*. 2015).

يعتبر أنزيم Lipase واحداً من أهم هذه الأنزيمات والذي تنتجه مجموعة من الكائنات الدقيقة ، وأظهرت الكثير من الدراسات بأن أنتاج أنزيم Lipase مرتبط ارتباطاً وثيقاً بالعديد من

الملوثات الموجودة في ألتربة حيث وجد أن لهذا الإنزيم دوراً مهماً في في خفض تركيز المواد الهايدروكاربونية في التربة (Riffaldi *et al*., 2006). ويعمل هذا الأنزيم أيضا على التحلل المائي للدهون الثلاثية Triacylglycerois ويقوم بتحويلها إلى أحماض دهنيه حرة -Free Faty Acid وGlycerol) (Sharma *et al*., 2011).

تمكن Colen *et al.* (2006) من عزل 59 عزله فطرية منتجه لهذا الإنزيم ومن بينها تم تحديد الاجناس*Trichoderm* و *Fusarium* و*Cladosporium* و*Penicillium* و*Aspergillus* و*Mortierella* وتم وصفها بأنها فطريات محلله للنفط في التربة .

وقد وجد(2016) Mauti أن الإنزيم المنتج من *A.niger* كان له دور في تحلل المركبات العطرية والموجودة في التربة الملوثة بالنفط ، وأشار Flayyih and Jawharia (2014) أن الإنزيم المنتج من الفطرين *A.niger* و*A.terreus* كان له دور في المعالجه البايلوجية ، وقد وجد Chuks *et al.* (2008) بأن الوسط المستخدم في تنمية الفطر*A.terreus* والذي يحتوي على الهايدروكاربونات النفطية ومادة Tween 80 كان محفزا لأفراز الإنزيم .أضافة إلى ذلك فأن الانزيم المنتج من الاجناس *Fusarium, Aspergillus* والمعزولة من التربة الملوثة بالنفط أستخدم كمؤشر على تحلل النفط (Pokorny *et al*., 1994) .

يعتبر أنزيم Protease من أنزيمات التحلل المائي الخارج خلوية المنتجة بواسطة العديد من الكائنات الحية من أهمها الأحياء المجهرية وخصوصاً من الفطريات ، يعمل هذا الإنزيم على تحلل البروتينات إلى وحدات أصغر من ألأحماض الأمينيه التي تحتوي على النتروجين وذلك من أجل الامتصاص اللاحق لها من قبل الخلايا ويتم ذلك عن طريق كسر الروابط الببتيدية (Sabotic and Kos, 2012).

يعتبر النتروجين من العناصر الأساسية التي تحتاجه الفطريات ويأتي ثانيا بعد الكربون من حيث احتياجاتها ، ولتعزيز عملية التحلل في البيئات الملوثة فان ذلك يتطلب تحفيزاً للكائنات المحللة يأتي ذلك من خلال وجود العناصر الغذائية ، لذا يمكن أن تكون المغذيات من العوامل المحددة للمعالجة (Zeng *et al*., 2016) ، من خلال دورها في النمو وزيادة الكتلة الحيوية للفطريات في التربة وكلما زادت الكتلة الحيوية زادت عمليات التحلل (Mohsenzada, 2012) ، حيث يؤثر عدم كفاية المغذيات على تباطيء التحلل البايلوجي وبما أن التربة تحتوي على العديد من المواد المحتوية على البروتينات كالبذور والاوراق والبقايا النباتية الاخرى ، أضافة

إلى ذلك يحتوي النفط الخام على عدد عديد من المركبات التي يوجد النتروجين في تركيبها (Cai *et al*., 2016) ، فأفراز هذا الإنزيم يعمل على تحلل تلك المواد واطلاق النتروجين (Evans and Furlong, 2003) وبالتالي أصبح لهذا الإنزيم دور في المعالجة الحيوية للنفط الخام .

يشمل Protease مجموعة كبيرة من الإنزيمات المحللة، ويتألف النظام الإنزيمي من عائلة كبيرة من الإنزيمات مقسمة استنادا الى موضع كسر الرابطة الببتيدية إلى نوعين هما Exopeptidase وEndopeptidase .

هناك العديد من الأجناس الفطرية المنتجة لهذا الإنزيم منها *Aspergillus* spp. و *Penicillium* spp. و *Rhizopus* spp. و *Mucor* spp. (Wu *et al*., 2006) , ووجد أن الفطريات *A. niger* و *A.flavus* و *Aspergillus oryzae* منتجات رئيسية لهذا الإنزيم (Kranthi *et al*., 2012)، ووجد أيضا أن أنواع من جنس *Penicillium* spp. تمكنت من أنتاج الإنزيم منها *P. citrinum* و *P.camemberti* (Ikram and Mukhtar, 2007) .

تعتبر أنصاف السيليلوز Hemicellulose بوليمرات طبيعية مكونه من السكريات المتعددة حيث توجد مع السيليلوز واللكنين في جدران الكثير من البقايا النباتية في التربة ويتكون معظم تلك البوليمرات من Xylan و Arabinausو Galactans ويعتبرXylan اكثرها وفرة وتعقيداً من الناحية الكيميائية وهو متعدد السكريات مكون من وحدات Xylo Pyranosyl المرتبطه مع بعضها البعض بواسطة روابط كلايكوسيدية (Agbor *et al*., 2011).

أن تحطيم Xylan يتطلب عمل العديد من الإنزيمات لتحويله إلى سكريات بسيطة تستهلك من قبل الفطريات وتعتبر من المتطلبات الغذائية التي تحتاجها للنمو وبالتالي تعزز المعالجة البايلوجية للنفط ، واحد من أهم تلك الإنزيمات هو Xylanase ويعتبر من أنزيمات التحلل المائي الخارج خلوية يعمل على تحلل العمود الفقري للXylan وان النظام الأنزيمي له يتكون من الأنزيمات: B- -1,4 endoxylanase المسؤول عن التحلل المائي للروابط الكلايكوسيدية في السلسلة الرئيسية وB-D-Xylosidase والتي تعمل على كسر الروابط الكلايكوسيدية في السلاسل الجانبية (Polizeli *et al*., 2005) .

وقد أشارت العديد من الدراسات إلى أن أنزيم Xylanase ينتج من مصادر عديدة منها البكتريا والفطريات، تستطيع الأجناس الفطرية مثل *Aspergillus* spp. و *Fusarium* spp. و

Penicillium spp. أن تنتج هذا الإنزيم ضمن حدود من الأس الهيدروجيني تتراوح بين 5-8 (Mandal, 2015). كما ويعد النوعين *A.niger* و*A.terreus* منتجات رئيسية لهذا الإنزيم (Salvachua *et al*., 2011; Jahromi *et al*., 2011) .

يعتبر أنزيم Phytase نوعاً أخر من أنزيمات التحلل المائي الخارج خلوية والتي لها القدرة على تحلل المركبات الحاوية على الفسفور ، حيث يوجد ثلث الفسفور في التربة مخزن على شكل Phytin والمعروفة بأسم Phytic acid ويقوم هذا الإنزيم بتحليله وإطلاق الفسفور المخزن (Singh *et al*., 2012 ; Soni and Koman, 2009). ويعد الفسفور عنصراً أساسياً لجميع الإحياء المجهرية في التربة ويأتي بعد الكربون والنتروجين وله دور في المعالجة الحيوية للنفط الخام وبشكل غير مباشر لأن الفطريات تحتاج للفسفور لغرض نمو وزيادة الكتلة الحيوية والذي بدورة يؤدي إلى زيادة التلامس بينها وبين مكونات النفط الخام فيؤدي ذلك إلى تسريع المعالجة الحيوية للنفط الخام (Coulon *et al*., 2012). إضافة إلى ذلك أن هذه ألإحياء تحتاج الفسفور للكثير من العمليات وخاصة في بناء الإنزيمات المهمة في المعالجة (Wu *et al* ., 2017) .

تعد البكتريا والفطريات منتجات جيدة لهذا الإنزيم ، وقد تمكن (Ekundayo and Osuni, 2013) من عزل الفطريات *A.niger* و *A.flaves* و *A. fumigatus* و *Trichoderm viride* و*Neurospora crassa* من التربة الملوثة بالنفط ثم أختبر قدرتها على أنتاج هذا الأنزيم فقد وجد أن أعلى نشاط للأنزيم كان بواسطة *A.flavus* وأقل نشاط بواسطة الفطر *N. crassa*.

2-3- التركيب الكيميائي للنفط الخام

النفط الخام هومادة سائلة كثيفة لونه بين الأسود إلى الأخضر تركيبه يختلف باختلاف الأنواع (Dobian, 2016) ، ويعتبر النفط مزيجاً من مركبات هايدروكاربونية وأخرى غير هايدروكاربونيه والعديد من العناصر الكيميائية ولكن الشائع والمميز فيه انه مكون من عنصري الكربون والهيدروجين حيث يرتبط الكربون مع عناصر أخرى ليكون مركبات بسيطة أو معقدة وتتراوح نسبه الكربون في النفط الخام بين 84-87% أما الهيدروجين 11-14% والأوكسجين والنتروجين 0-1% والكبريت 0-6% (Speight, 2017).

2-3-1: المركبات الهيدروكاربونية:

تشكل نسبة (55 % - 99 %) من إجمالي تركيب النفط الخام(Li *et al*., 2014) ومن هذه المركبات :

1- Naphthenes ويطلق عليها الالكانات الحلقية Cycle alkane وتعتبر مركبات مشبعة ذات حلقة مغلقة ومثالها الهكسان.

2- Paraffin ويطلق عليها الالكانات Alkane و تكون على شكل سلاسل وهي أيضاً مركبات مشبعة مثالها الميثان الذي يكون غازاً والبرافين يكون صلباً .

3- Olefins ويطلق عليها Alkenes وهي مركبات مشبعة أيضاً مثالها الاثلين .

4- المركبات الاسفلتية والتي تكون ذات وزن جزيئي عالي غير معروفة التركيب بدقة.

5- Acetylenes ويطلق عليها Alkynes ومثالها الاستيلين.

6- الهايدروكاربونات العطرية متعددة الحلقاتPoly Cyclic Aromatic Hydrocarbon (PAHs) والتي تكون أكثر المواد تعقيداً في النفط الخام وتتكون من حلقات مرتبطة مع بعضها ألبعض ، وتعتبر الالكانات ذات السلاسل الطويلة مركبات قابلة على التحلل وبدرجة أقل بالنسبة للالكانات الحلقية أما المركبات الاروماتية متعددة الحلقات فهي أكثر الهايدروكاربونات النفطية تمرداً وخطورة لكونها لا تتحلل بسهولة (Haritash and Kaushik, 2009).

2-3-2:المركبات غير الهايدروكاربونية:

تكون نسبة وجود هذه المركبات في النفط الخام ضئيلة جداً ومنها المركبات الكبريتية والتي أذا زادت نسبة وجودها عن 5% يعتبر النفط الخام غير مرغوب فيه ويكون ذو رائحة كريهة (Worton *et al*., 2015) أما المركبات الأوكسجينية فهي أكثر تعقيداً من سابقتها إضافة إلى وجود المركبات النتروجينية وبنسب قليلة (Murygina *et al*., 2016) .

2-3-3: مركبات معدنية عضوية:

موجودة بنسب ضئيلة جداً ولكن على الرغم من قلتها تعتبر سامه مثل مركبات النيكل والفانديوم وغيرها (Mullins, 2008).

يحتوي النفط الخام على أكثر من 30 مركباً أروماتياً ومئات من المركبات كالبارفينات والنفثالينيات والمركبات الكبريتية والنتروجينية والفينولية (Dariush *et al*., 2007)

أما من ناحية الوزن الجزيئي للهايدروكاربونات الموجودة في النفط الخام فقد قام Michel (2006) بتقسيم النفط إلى ثلاث مجموعات هي:

1- مجموعة واطئة الوزن الجزيئي والتي تشمل المركبات الهايدروكاربونية التي تحوي 10 ذرات كربون مثل الالكانات.

2-مجموعة متوسطة الوزن الجزيئي والتي تشمل المركبات المكونة من 10-22 ذرة كاربون والتي مثالها المركبات العطرية ثنائية الحلقية .

3- مجموعة عالية الوزن الجزيئي المكونة من اكثر من 22 ذرة كاربون ومثالها المركبات العطرية عديدة الحلقات والمركبات الاسفلتية .

2-4: تلوث التربة بالنفط الخام وتأثيراته على الكائنات الحية

تؤدي التسربات والحوادث العرضية التي تحدث خلال المراحل المختلفة من التعامل مع النفط الخام من خلال التنقيب والإنتاج و التكرير والنقل و الخزن والاستيراد والتصديرمن الدول المنتجة إلى الدول المستهلكة واستخدامه لأغراض أنتاج الطاقة والصناعة إلى تلوث البيئة ، وأن وصول هذه المركبات النفطية يكون له العديد التأثيرات السلبية على مختلف البيئات وخاصة في التربة (AL-Nasrawi *et al*., 2012 ; Alberto *et al*., 2017) ، ففي العراق حقول النفط موزعة على نطاق واسع جداً من المناطق وخصوصاً المناطق الجنوبية وتكون متصلة مع بعضها بواسطة شبكة كبيرة من ألأنابيب والتي غالباً ما تتعرض إلى الكثير من الحوادث تؤدي إلى تسرب كميات من النفط الخام إلى التربة (AL-Husaeny, 2014) .

تعتبر المركبات الهايدروكاربونية الموجودة التربة الملوثة بالنفط الخام سامة للتربة والكائنات الحية الاخرى حيث تؤدي هذه الملوثات إلى أحداث إضراراً كبيرة للتربة من خلال التسبب بما يدعى بعقم التربة وتغيرات في الخواص الفيزيائية والكيميائية للتربة وأيضاً محتواها المايكروبي

وتأخر نمو النبات فيها (Ikuesan *et al*., 2017) وتؤدي أيضاً إلى انخفاض إنتاجيه المحاصيل الزراعية وبالتالي تؤثر سلباً على الحياة الاقتصادية والاجتماعية (Chorom *et al*., 2010). تختلف سمية هذه المركبات الموجودة في النفط الخام اعتمادا على تركيزها وتركيبها الكيميائي (Odire *et al*., 2009). تم الكشف عن وجود العديد من هذه المركبات وخاصة المركبات الحلقية في الحبوب والخبز والخضار والفواكه والأسماك وذلك لقدرتها الكبيرة على التراكم في الأنسجة الحيوانية والنباتية مما قد تسبب الطفرات والوفاة (Olabemiw *et al*., 2011).

أن تراكم هذه الملوثات وخاصة الهايدروكاربونية له الكثير من ألآثار السلبية ويمكن أن تتسبب بمشاكل صحية على الإنسان حيث يمكن أن تصل أليه عن طريق السلسلة الغذائية وينتج عنها أضرار وأمراض مختلفة منها سرطان الدم والرئة وأمراض الجلد ومن أكثر تلك المركبات هي المركبات الاروماتية والتي من مسببات السرطان وهذا ما أكدت علية الوكالة الدولية لبحوث السرطان International Agency For Research Cancer (IARC) والتي أشارت بأن هناك (16) مركباً أروماتياً حلقي مدرجة كأكثر المركبات تاثيراً (Sunita, 2017) .

2-5: معالجة التربة الملوثة بالنفط الخام

التطور الهائل في صناعة النفط الخام والتسربات التي تحدث في أنابيب النقل والأنسكابات العرضية الاخرى كل ذلك يؤدي إلى تلوث التربة بمكونات النفط الخام الاخرى الموجودة فيه والتي تكون ضارة لهذا النظام البيئي والكائنات الحية لذلك يجب إزالة هذه الملوثات من التربة ، هناك ثلاث طرق معتمدة لمعالجة ألتربه الملوثة منها المعالجة الفيزيائية Physical Remediation والمعالجة الكيميائية Chemical Remedation والمعالجة البايلوجية Bioremediation والتي تعتبر الأفضل من هذه الطرق:

2-5-1: المعالجة البايلوجية Bioremediation

أن استخدام الطرق الفيزيائية والكيميائية لمعالجة التربة الملوثة بالنفط الخام يمكن أن تؤدي إلى قتل الكائنات المايكروبية أثناء ألمعالجه مما تؤدي إلى الضرر في احد أهم مكونات النظام البيئي في التربة لذلك يتم اللجوء إلى تقنيات تزيل الملوثات دون تأثير وتكون أكثر فعالية وكفاءة (Azubuike *et al*,. 2016)

المعالجة البايلوجية Bioremediation تعني استخدام الكائنات الحية الدقيقة في تحويل الملوثات الضارة إلى مواد أخرى غير ضارة أو اقل خطورة وهي من طرق المعالجة الصديقة للبيئة وغير مكلفة في معالجة البيئات الملوثة سوا كانت الإحياء المستخدمة بشكل مفرد أم مجتمعة حيث تم وصف العديد من الكائنات الحية ومنها البكتريا والفطريات والطحالب والنباتات (Varjoni and Upasani, 2013)، وتعتمد المعالجة البايلوجية أساساً على الأنزيمات التي تنتج من هذه الكائنات والتي لها دور في تحطيم تلك الملوثات ، وان المعالجة لا يمكن أن تكون فعالة ألا عندما تكون الظروف البيئية ملائمة لنمو تلك الكائنات (leung, 2004) ، حيث تستطيع هذه الكائنات من أستقلاب العديد من الملوثات باستخدامها الكاربون الموجود في تلك المركبات كمصدر للطاقة وتحول الملوثات إلى الكثير من المنتجات منها ثاني أوكسيد الكاربون (Acevedo *et al*., 2011 ; Wang *et al*., 2009).

وغالباً ما يترافق مع مصطلح المعالجة البايلوجية مصطلح التكسير الحيوي Biodegradationوتعني عملية تكسير الملوثات الموجودة في النفط الخام بواسطة سلسلة من التفاعلات البايوكيميائية بينما ألمعالجة البايلوجية تعني العملية التي يتم بواسطتها تحليل تلك الملوثات باستخدامالأحياء ألمجهرية (Vidali,2001).

وقد ذكر(2007) Binsadiaq العديد من الشروط لكي تأخذ المعالجة البايلوجية دورها في البيئات الملوثة منها :

1- ألإحياء المحللة يجب أن تكون موجودة في تلك البيئات الملوثة .

2- يجب أن تتواجد لدى ألكائنات المحللة ما يكفي من الإنزيمات لإحداث التحلل البايلوجي.

3- يجب أن تكون الملوثات متاحة للأحياءالمحللة.

4- يجب أن تكون الظروف ألبيئية ملائمة لعمل الأحياء المحللة .

5-2 -2-1:طرق المعالجة البايلوجية للتربة الملوثة بالنفط الخام

2-5-2-1-1:المعالجة الفطرية Mycoremediation

تعمل الفطريات على تحلل النفط الخام و يفضل استخدامها في معالجة الملوثات النفطية في التربة بسبب قدرتها على النمو بشكل كثيف وسريع مما يجعل الفطر بتماس مع الملوثات،

ولكونها أيضا تمتلك نظام أنزيمي فعال يتكون من العديد من الأنزيمات الخارج خلوية المتنوعة (Chen, 2013) . حيث تفضل الفطريات في كثير من الحالات على البكتريا في المعالجة البايلوجية لسبب أن النظام الأنزيمي الذي تمتلكه الفطريات أكثر فعالية مما هو علية في البكتريا إضافة إلى ذلك فأن الكتلة الحيوية الفطرية تعد أكبر من تلك التي تشكلها البكتريا في التربة (Adnan *et al*., 2018) .

أن المرة الأولى التي اقترح فيها دور الفطريات في التحلل البايلوجي للنفط الخام كانت عام 1973 حيث نشر Cerniglia دراسة حول أمكانية استخدام الفطريات غير المحللة للكنين في تحلل النفط الخام باستخدام تقنية المعالجة البايلوجية ، ثم توالت الدراسات باستخدام الفطريات في معالجة التربة الملوثة بالنفط الخام و قدرتها على إزالة تلك الملوثات ، فقد وجد Odire (2009) أن للفطريات دور في التحلل البايلوجي للنفط الخام وكانت أجناس الفطريات الأكثر شيوعاً في تحليل النفط هي *Rhizopus* و *Paecilomyces* و *Penicillium* و *Cladosporium* و*Alternaria* و *Fusarium* و *Mucor* و *Aspergillus* و *Gliocladium*.وقد وجد Thenmozhi *et al*.(2013) أن الجنسين *Aspergillus* و *Rhizopus* المعزولين من بيئات ملوثة في جنوب الهند كانت فعالة في معالجة المركبات الاروماتية عديدة الحلقات .

أستطاع Senem and Hanife (2016) في دراسة أجراها بأستخدم الفطر *A.niger* أن يثبت دور هذا الفطر في أزاله أجمالي الهايدروكاربونات في التربة الملوثة بالنفط الخام حيث استخدم ثلاثة أوساط زرعيه للتربة ألملوثه بالنفط الخام الأول حاوي على الفطر فقط والثاني الفطر مع الكائنات الحية الدقيقة والثالث الكائنات الحية الدقيقة فقط ،فقد وجد أن الوسط الحاوي على الفطر تمكن من أزاله كل الهايدروكاربونات الموجودة في الوسط ألزرعي . وفي دراسة أخرى أجراها Ye *et al*.(2011) أن الفطر *A. fumigatus* المعزول من التربة الملوثة كان له دور تحطيم المركب الحلقي الانثراسين .

هنالك الكثير من الأنواع الفطرية التي كان لها دور كبير في تحليل النفط الحام منها *A.alternata* *A.terreus* و *Paecilomyces variotii* و*Fusarium oxysporum* (Jiang *et al*., 2016 ; Ameen *et al*., 2016 ; Marchad, 2011).أكد Chang *et al*. (2015) أن من بين الأجناس الفطرية التي لها دور في استعادة التربة الملوثة ولها القدرة على تحطيم المركبات الحلقية عالية الاستقرار في التربة *Mucor* و *Fusarium* و *Drechslera* و*Aspergillus* و*Penicillium* وجد Haritash *et al*. (2009) أن

المركبات الهايدروكاربونية ذات الأوزان الجزيئية الواطئة يمكن أن تتحلل بسهولة بواسطة فطريات مثل *Aspergillus* spp. و *F.oxysporum* .

لقد درس Okparanma *et al*. (2011) المعالجه باستخدام الفطر *Pleurotus ostreatus* وسجل في هذه الدراسة انخفاضا نسبته 92.4 % من أجمالي الهايدروكاربونات الحلقية العطرية مقارنتا بالدراسة التي اجراها Borras (2010) حيث كان معدل أزاله أقل فعالية بمعدل 15 % من أجمالي تلك المركبات الحلقية العطرية بواسطة الفطر *Trametes vesicolor*. وفي دراسة أخرى وباستخدام الفطر *Anthracophyllum discolor* وجد Acevedo (2010) أن لهذا الفطر القدرة على أزاله 62 % من المركب phenanthrene و 73% من Anthracene و 54 % من Fluoranthene و 60 % من Benzo{a}pyren وجميعها مركبات اروماتية.

درس Zebulumh (2011) دور الفطر *P. ostreatus* في تحطيم المركب الحلقي Anthracene في التربة الملوثة ووجد بأنه كان قادرا على تحليل 80 -95 %من هذا المركب . وقد استخدموا Kota *et al*.(2014) الفطريات *A.versicolor* و *A.flavus* و *P.chermesinum* في معالجة التربة الملوثة بالنفط وأظهرت النتائج بأن لها قابلية عالية على تحليل النفط .

2-5-2-1-2 :طرق اخرى للمعالجة البايلوجية

تعتبرالمعالجة البكترية Bacteria Remediation من الطرق المستخدمة في معالجة التربة الملوثة بالنفط الخام لكن في كثير من الأحيان تفضل الفطريات على البكتريا لعده أسباب منها كون البكتريا بطيئة جدا في ملء المسافات المفتوحة من التربة وكذلك البكتريا غير قادرة على التكيف مع الظروف القاسية وأيضاً الإنزيمات الفطرية أكثر أنتاجاً (Holker *et al*., 2004). إما المعالجة بواسطة النباتات فيطلق عليها Phytoremediation تعني استخدام النباتات في المعالجة الحيوية للتربة الملوثة بالنفط الخام حيث لها القدرة على تحلل الملوثات لأنها تتميز بزيادة الكتلة الحيوية ، حيث أن النباتات لديها القدرة على امتصاص الملوثات العضوية وغير العضوية وغالبا ما يتم امتصاص تلك الملوثات في الجذور(Liu *et al*., 2014). وهناك المعالجة بالطحالب Algae وتعتبر من الكائنات الحية التي لها القدرة على تحطيم مكونات النفط الخام فقد وجد Lei *et al*. (2007) بأن *Chlorella vulgaris* كان قادرا على تحطيم 48% من المركب الحلقي Pyrene في سبعة أيام .

6-2:العوامل المؤثرة في المعالجة البايلوجية الفطرية للتربة ألملوثه بالنفط الخام

1-6-2 :درجة الحرارة Temperature

تعد درجة الحرارة عاملاً مهماً ومؤثراً في المعالجة البايلوجية حيث تؤثر على على معدلات التحلل الفيزيائي والكيميائي للنفط ، وكذلك تؤثر على النشاط الأنزيمي للمايكروبات أن درجة الحرارة المثلى الذي توجد فيها أعلى معدلات تحلل هو 30- 40 حيث تقلل درجة الحرارة المتزايدة من لزوجة النفط وتزيد من قابلية الذوبان للمركبات الهايدروكاربونية الملوثة للتربة (Sizhong *et al*., 2009 ; Perfumo *et al*.,2007) .

2-6-2 :محتوى الأوكسجين Oxygen Content

أن عمليات التحلل البايلوجي بواسطة الفطريات تتم في ظروف هوائية أو غير هوائية لكن معدل التحلل للملوثات يكون أسرع عند توافر الأوكسجين (Arora *et al*.,2010).فقد وجد Walworth *et al*.(2013) أن معدل المعالجة ينخفض أذا استمر استهلاك الأوكسجين ، وقد أوضح Mari *et al*. (2013) أن المعدل سوف يرتفع عند استخدام التحفيز الحيوي في التربة ذات المسامات الكبيرة التي تسمح بدخول الأوكسجين .

3-6-2: المغذيات Nutration

لتعزيز عملية التحلل في المواقع الملوثة فان ذلك يتطلب تحفيزاً للكائنات المحللة من خلال تواجد وأضافه العناصر الغذائية ، وتعد عناصر الفسفور والنتروجين من أهم تلك المغذيات بعد الكربون(Zeng *et al*., 2016).

4-6-2: خصائص وتركيز الهيدروكاربونات

أن معدل تحلل الملوثات النفطية يعتمد على تركيبها وتركيزها حيث تعتبر الالكانات ذات السلاسل القصيرة والمتوسطة الأكثر تحللا مقارنة بالمركبات ذات السلاسل الطويلة والحلقية الاروماتية والتي تتحلل يبطئ ، أن التراكيز ألسامة والعالية من هذه الملوثات تؤثر على نمو الأحياء المجهرية وبالتالي على المعالجة (Sihag *et al*., 2014).

5-6-2 :الأس الهايدروجيني pH

يعد الأس الهيدروجيني في التربة الملوثة بالنفط الخام عاملاً مهماً في المعالجة البايلوجية لأنه يوثر على النمو وإنتاج الأنزيمات الضرورية لتحلل النفط ، حيث تظهر الفطريات نطاقاً واسعاً من الأس الهيدروجيني ولكنها في أغلب الحالات تفضل الأس الهيدروجيني الأقل من 7 أو المتعادل(Rousk *et al.*,2010).

6-6-2 :محتوى الرطوبة Moisture Content

إن محتوى الرطوبة يؤثر بشكل كبير على نشاط الكائنات المحللة من خلال نفاذ وانتشار المواد العضوية وان الكثير من المواد التي يستهلكها الكائن المحلل تكون ذائبة في الماء لذلك فان محتوى الرطوبة مهم لأدامه نشاط الأحياء المجهرية حيث أن مستوى الرطوبة الأمثل للتحلل البايلوجي يتراوح بين 75-100% (Shahgholi, 2014).

7-6-2 :التوافر البايلوجي Bioavailabillity

يعني معدل أو مدى أمكانية الوصول إلى المغذيات والملوثات من قبل الكائنات المحللة وامتصاصها لتلك الملوثات ، حيث يمكن أن يحدث التمثيل الغذائي بالسرعة التي تتمكن من خلالها الكائنات الدقيقة من الوصول إلى الملوث (Sihag *et al.*, 2014).

8-6-2 :خصائص التربة Soil Characteristics

تؤثر بنية التربة وخصائصها ونوعها على حركة الملوثات وبالتالي على المعالجة البايلوجية ، أيضاً وجود المواد العضوية فيها يعزز من نمو الفطريات والكائنات المحللة الاخرى والذي بدورة يحفز التحلل (Scherr *et al.*, 2007) .

9-6-2:الوجود المايكروبي النشط والفعال

يحدد أعداد الفطريات والكائنات المحللة الاخرى وخاصة النشطة والفعالة منها في التربة الملوثة بالنفط معدل التحلل حيث أن نقص هذه الكائنات يؤدي إلى انخفاض المعالجة (Perelo,2010).

الفصل الثالث

المواد وطرق العمل

Materials and Methods

3-1: المواد

3-1-1: الاجهزة والمعدات Equipment and Instruments

جدول (3-1) الاجهزةوالمعدات المختبريه المستخدمة

اسم الجهاز	اسم الشركة (المنشأ)
Autoclave	Hirayama(Japan)
Biosafety Cabinet	Lab Tech(France)
Cylinder	Iso Lab (Germnay)
Distillation device	GFR(Germany)
Filter Paper	Whatman(UK)
Flask	Iso Lab (Germnay)
Gloves	Broche (Malaysia)
Incubator	Human lab(Korea)
Light Microscop	Olympus (Japan)
Loop	Himedia(India)
Oven	Memmert (Germany)
Petri Dishes	Bio zek Medical(Holland)
pH-meter	Hanna (Romania)
PT-20	Sartorius(china)
Refrigetor	Vestel (Poland)
Sensitive Balance	Sartorius (Germany)
Shaking Incubator	Zenith lab(China)

Slides and Cover Slides	Superstar (India)
Test Tubes	Als (Canada)

3-1-2- المواد الكيميائية Chemical Materiale

جدول (3-2)المواد الكيميائية المستخدمة في التجارب المختبرية

اسم المادة	اسم الشركة (المنشأ)
Agar	KR(Chile
Alpha- naphthol	BDH(USA)
Calcium chloride	SCR(China)
Casein	Himedia(India)
Chlorid Sodium	SCR(China)
Chloroamphenicol	INF (Indonosia)
Congo red	Himedia(India)
Ethanol 70%	Scharlau(Spain)
Ethanol 95%	Alpha(Turkey)
Glucose	Himedia(India)
Hydrochloric Acid	BDH(USA)
KH_2 PO_4	Himedia(India)
Lactophenol	Bio neer(Korea)
Lactophenol-cotton blue	Bio neer(korae)
Mg $S0_4.7H_2O$	Himedia(India)

Pepton	BDH(England)
Sodium Hydroxide	BDH(USA)
Tween20	Himedia(India)
Yeast extract	Himedia (India)

3-1-3- الأوساط الزرعية

جدول (3-3) الأوساط المستخدمة في التجارب

اسم الوسط	اسم الشركة (المنشأ)
Glucose Yeast Extract Pepton Agar (GYEPA)	حضر مختبريا
Malte Extracte Agar (MEA)	Direvo (Germany)
Mineral Salt Media (MSM)	حضر مختبريا
Minimal Agar Medium (MAM)	حضر مختبريا
Nutrient Agar + Gelattin	حضر مختبريا
Peptone Aga Medium (PAM)	حضر مختبريا
Phytase Screening Medium (PSM)	حضر مختبريا
Potato Dextrose Agar (PDA)	Neogen (China)

2-3- طرق العمل Methods

1-2-3:جمع العينات Sample Collection

خلال الدراسة جمعت 120عينة أخذت من التربة الملوثة بالنفط الخام من حقول النفط الواقعة شرق محافظة ميسان ، حيث كانت التربة ملوثة بهذة المنتجات النفطيه على مدى عقود شكل (1-3)، جمعت العينات خلال المدة من أيلول 2020 إلى نيسان 2021 ، باستخدام اداة حفر

معقمة بواسطة كحول اثيلي 70 % ، أخذت العينات من أطراف ووسط منطقة جمع العينات وعلى عمق 5-20 سم من التربة ووضعت في اكياس النايلون المعقمة وتم تسجيل المعلومات عليها كتاريخ جمع العينات ورقم العينة ونقلت إلى مختبر الفطريات في قسم علوم الحياة – كلية العلوم – جامعة ميسان من اجل اجراء التجارب عليها .

شكل (3-1) صور تمثل تربة ملوثة بالنفط الخام

2-2-3: تحضير الاوساط الزرعية

1-2-2-3: وسط اكار البطاطا والدكستروز Potato Dextrose Agar (PDA)

أُستخدم هذا الوسط لعزل الفطريات من الترية الملوثة بالنفط الخام وحُضر أعتمادا على توصيات الشركة ألمصنعة بأضافة 39 غم من الوسط إلى 1000 مل من الماء المقطر في دورق زجاجي ، أضيف المضاد الحيوي Chloramphenicol بمقدار 250 ملغم/ لتر، عقم الوسط ثم ترك ليبرد وصب في اطباق بتري زجاجية معقمة ليكون جاهزا لعزل وتنمية الفطريات .

2-2-2-3: وسط Malte Extracte Agar (MEA)

أُستخدم هذا الوسط لحفظ الفطريات ، حُضر حسب تعليمات الشركة المصنعة بأذابة 61 غم من الوسط في 1000 مل من الماء المقطر في دورق زجاجي ، اضيف المضاد الحيوي Chloroemphenico بواقع 250 ملغم / لتر، عقم الوسط ثم يترك ليبرد ويصب في اطباق بتري معقمة ، ليكون جاهزاً للاستعمال.

3-2-2-3: وسط الاملاح المعدنية Mineral Salt Media

حُضرحسب طريقة Lemos *et al*.(2002) من المواد التالية:

2 غم NH_4SO_4 ، 4 غم KH_2PO_4 ، 6 غم $NaHPO_4$ ، 0.2 غم $FeS0_4.7H_2O$ ، 0.001 غم $CaCL_2$ ، 0.00015 غم H_3BO_3 ، 0.00001 غم $MnSO_4$ ، 0,00007 غم $ZnSO_4$ ،0.00001 غم $CuSo_4$ ، أضيفت إلى 1000 مل من الماء المقطرفي دورق زجاجي .أُستخدم هذا الوسط لدراسة قابليه الفطريات المعزوله من التربة الملوثة بالنفط على تحليل النفط الخام .

2-3 -2 -4: وسط الكشف عن انزيم Lipase

أستخدم وسط Pepton Agar medium (PAM) للكشف عن الانزيم وحُضر من المواد المدرجة أدناه وحسب طريقة Sierra (1957).

مكونات الوسط :

20 غم أكار، ببتون 10غم ، كلوريد الصوديوم 5 غم ، كلوريد الكالسيوم المائي 0.1 غم خلطت المواد وأذيبت في 1000 مل من الماء المقطرفي دورق زجاجي ، اضيفت مادة Tween

20 إلى الوسط بعد تعقيمها بشكل مفرد بواقع 1 مل لكل 100 مل من الوسط ، يعدل الأس الهايدروجيني الى 5.5 قبل التعقيم باستخدام حامض الهايدروكلوريك HCL أو NaOH.

3-2-2-5: وسط الكشف عن أنزيم Protease

أستخدم وسط Nutrient Agar مع الجيلاتين للكشف عن الإنزيم والذي حُضر من المواد التالية وحسب طريقة Hankin and Anagnostakis (1975)

مكونات الوسط :

20 غم من Nutrient Agar أذيبت في 1000 مل من الماء المقطر في دورق زجاجي ، ثم حضرمحلول الجيلاتين من أذابة 0.8 % من الجيلاتين في الماء وقبل التصلب أضيف محلول من الجلاتين بمقدار 5 مل لكل 100 مل من الوسط المستخدم عدل الاس الهايدروجيني كما في الفقرة 3-2-2-4.

3-2-2-6: وسط الكشف عن انزيم Laccase

أستخدم وسط Glucose yeast extract pepton medium (GYEPM) للكشف عن الانزيم والذي حُضر من المواد التالية وحسب طريقة (Sunitha *et al*., 2013)

مكونات الوسط :

10غم ببتون ، 5 غم مستخلص الخميرة ، 20 غم كلوكوز، 5 غم اكار ، 0.05 غم مادة الفانافثول ، خلطت المواد وأذيبت في 1000 مل من الماء المقطر في دورق زجاجي ويعدل الاس الهايدروجيني كما في الفقرة 3-2-2-4.

3-2-2-7: وسط الكشف عن انزيم Phytase

أستخدم وسط Phytase screening medium (PSM) للكشف عن الانزيم والذي حُضر من المواد التالية وكما في طريقة Howson and Davis (1983):

مكونات الوسط :

15غم كلوكوز ، 3 غم Sodium phytate ، 0.5 غم $MgSO_4.7H_2O$ ، 5 غم $NH_4 NO_3$ ، 0.01 غم $FeSO_4.2 H_2O$ ، 0.5 غم KCl ، 0.01 غم $MnSO_4.7H_2O$ ، أكار15غم .

خلطت المواد جيدا أذيبب في 1000 مل من الماء المقطر في دورق زجاجي ويعدل الاس الهيدروجيني كما في الفقرة 3-2-2-4 .

3-2-2-8: وسط الكشف عن انزيم Xylanase

أسُتخدم وسط Minimal agar medium (MAM) للكشف عن الانزيم وحُضر من اذابة المواد التالية وبطريقة Adesina and Onilude (2013) :

مكونات الوسط :

0.05 غم Mg $SO_4.7H_20$ ، 0.005 غم $NaNO_3$ ، 0.005 غم من كلوريد الكالسيوم ، 0.002 غم Zn SO_4 ، 0.009 غم $FeSO_4.7H_2O$, 0.012 غم $MnSO_4$ ، 0.23 غم KH_2PO_4 ، 19غم أكار ، 2 غم ببتون، 0.23 غم KCl ، أضيف 0.5 % من مسحوق بذور الشوفان كمصدركاربوني وحيد (Sridevi and Charya, 2013) خلطت المواد جميعا وأذيبت في 1000 مل من الماء المقطر يعدل الأس الهيدروجيني كما في الفقرة 3-2-2-4.

3-2-3: التعقيم : Sterilization

عُقمت جميع ألاوساط الزرعيه المستخدمه في الدراسة بواسطة جهاز المؤصدة Autoclave تحت درجة حرارة 121 م ْ وتحت ضغط 15 باوند/ انج ولمدة 15 دقيقة ، أما الادوات الزجاجيه المستخدمة جميعها عقمت في جهاز الفرن الكهربائي Electric Oven عند درجة حرارة 150 مْلمدة ساعتان .

3-2- 4: التحليل الفيزيائي physical Analysis

تم قياس كل من الأس الهيدروجيني (PH) والتوصيلية الكهربائية Electrical Conductivity والمحتوى المائي Water Conntat لعينات التربة الملوثة بالنفط الخام .

3-2-4-1: الأس الهيدروجيني pH

تم قياس الاس الهيدروجيني لعينات التربة الملوثة بالنفط الخام وحسب طريقه Page *et al.*(1982) ولكل عينه وكما يلي :

وزن 10 غم من التربة بواسطة الميزان في أناء زجاجي سعته 300 مل ثم أضيف 100 مل من الماء المقطر مع التحريك المستمرمن أجل أذابة التربة وترك لفترة 10 دقائق ثم قيس الأس الهيدروجيني ، ونظف قطب القياس عند كل أستخدام .

2-4-2-3:المحتوى المائي Water Content

تم تقدير المحتوى المائي للتربة الملوثة بالنفط وبالطريقة الموصوفة لدى Page *et al.* (1982) لكل عينة وبالطريقة الاتية :

1- بوضع طبق زجاجي على كفة الميزان ثم سجل وزنة .

2- وزنت 10 غم من الترب‍ه الملوثة بالنفط الخام وسجل الوزن .

3- وضع الطبق في جهازالفرن الكهربائي Oven على درجة حرارة 75 مْ لمدة 48 ساعة .

4- وزن الطبق الحاوي على التربة المجففة واستخرج الوزن الجاف . ثم احتسبت النسبة المئوية بالطريقة أدناه :

$$\text{النسبة المئوية على اساس الوزن الرطب} = \frac{\text{الوزن الرطب} - \text{الوزن الجاف}}{\text{الوزن الرطب}} \times 100$$

3-4-2-3: التوصيلية الكهربائية Electrical Conductivity

تم أحتساب التوصيلية الكهربائية للعينات التربة الملوثة بالنفط الخام بجهاز قياس التوصيلية ، اخذت 10 غم من كل عينة للتربة مع أظافة 100 مل من الماء المقطر في دورق سعته 300 مل ويحرك الخليط ويترك لمدة 10 دقائق بعدها سجلت قيمة التوصيلية .

5-2-3:عزل وتنمية الفطريات Isolation and Growth Fungi

أستخدمت طريقة العزل المباشرDirect Method لعزل الفطريات من التربة الملوثة بالنفط الخام بأخذ 1 غم من كل عينة و نثرت على سطح الوسط الزرعي PDA المتصلب والمعقم بعدها حضنت الأطباق في الحاضنه Incubator تحت درجة حرارة ± 25 مْ .

3-2-6: فحص وتشخيص الفطريات Examination and Identifiction of Fungi

3-2-6-1: تحضير المزارع النقية والفحص المظهري للمستعمرات

فحصت الاطباق بعد مرور 3-5 أيام من الحضن لمشاهده نمو الفطريات ثم حضرت منها مزارع نقية Pure culture وذلك بنقل جزء صغيرمن المستعمرة وبواسطة ابرة معقمة من حافة المستعمرات النامية على الوسط الزرعي والحاوي على العينات إلى طبق أخر حاوي على نفس الوسط الزرعي وتحضن تحت درجة حرارة ±25 مْ لمدة 5-7 أيام . بعد ذلك فحصت المستعمرات وشخصت الفطريات اعتمادا على العديد من الصفات المظهرية للمستعمرات مثل نسجتها اذا كانت حبيبية granular ، صوفيه Wooly ، قطنية Cottony ، لونها ، أرتفاعها عن الطبق ، وفيما أذا كانت حافتها منتظمة أو غير منتظمة .

3-2-6-2: الفحص المجهري للفطريات

فحصت الفطريات المعزولة وشخصت مجهريا أعتماد على العديد من الصفات مثل الخيوط الفطرية فيما اذا كانت مقسمة او غير مقسمة ، لونها ، سمكها ، طول الحامل الكونيدي متفرع ، غير متفرع ، الأبواغ والكونيدات Conidia شكلها ، لونها ، ابعادها ، ترتيبها على الحامل الكونيدي ، عدد الحواجز الموجوده .

وشخصت الفطريات المعزولة خلال الدراسة اعتماداً على العديد من المفاتيح التصنيفيه منها Watanable 2002) و Thomas *et al.*, 2018 و Carmen v.sciortion 2017 و (Watanble 2010 ولكي يكون التشخيص المجهري دقيق عملت شريحة زجاجية بنقل جزء من مسعمرة فطرية نامية بواسط ناقل معقم ويوضع على الشريحة مع أضافة قطره من صبغة Lactophenol Cottton Blue أو Lactophenole ثم فحصت تحت المجهر الضوئي على قوة تكبير x 400 , x 100. تم تصوير الشرائح الزجاجية المحضرة بواسط الكاميرا .

3-2-7: حفظ المزارع النقية للفطريات

لحفظ المستعمرات الفطرية لفترة أطول لحين أستعمالها في المراحل اللاحقة من البحث حضرت مزارع مائلة Slant Culture نقلت جزء من المستعمرة النقية بواسطة لوب معقم إلى

أنابيب أختبار 10 مل حاوية على الوسط الزرعي MEA المائل بعدها حضنت على درجة حرارة 25 مْ لمدة 5-7 ايام ، ثم حفظت المزارع المائلة في الثلاجة على درجة حرارة 4 مْ .

3-2-8: الصبغات والكواشف المستخدمة

لغرض دراسة الفطريات وتشخيصها أستخدمت الصبغات التالية :

3-2-8-1:Lactophenol Cottton Blue و Lactophenole

أستخدمت صبغة Lactophenol Cottton Blue لتصبيغ الخيوط الفطرية والكونيدات الشفافة ، أما صبغة Lactophenol أستخدمت عندما تكون الخيوط والكونيدات ملونة .

3-2-8-2: صبغة Congo Red

أستخدمت هذه الصبغة للكشف عن قابلية الفطريات على أنتاج أنزيم Xylanase وحضرت بأذابة 0.4 غم من صبغة Congo red في 100 مل من الماء المقطر وحسب طريقة Adesina and Onilude (2013) .

3-2-8-3:التصبيغ المزدوج

أستخدمت طريقة التصبيغ المزدوج للكشف عن أفراز أنزيم الفايتيز وحضرت حسب طريقة Bae *et al*.(1999) وكالتالي :

حضر محلول من Cobalt chloride بأذابة 2 غرام من هذه الماده في 100 مل من الماء المقطر، أستبدل بمحلول أخر حضر من أذابة كل من Ammonium vanadate 0.42 غم و Ammonium molybdate 6.25 غم في 100 مل ماء مقطر.

3-2-9:النسبه المئوية لتردد وظهور الفطريات Frequently andOccurrence

تحسب النسبة المئوية لتردد Frequency وظهور 0ccurrence الفطريات المعزولة من التربه الملوثة بالنفط الخام وحسب طريقة Krebs (1972) وبواسطة المعادلات الرياضيه ادناه:

$$\text{النسبة المئوية للتردد}(\%) = \frac{\text{عدد عزلات النوع الواحد}}{\text{مجموع العزلات الكلي}} \times 100$$

$$\text{النسبة ألمئوية للظهور}(\%) = \frac{\text{عدد العزلات النوع الواحد}}{\text{مجموع عدد العينات}} \times 100$$

10-2-3 : دراسة الفعالية الأنزيمية للفطريات المعزولة على الأوساط الصلبة

أختبرت عشرة فطريات معزولة من التربة الملوثة بالنفط خلال هذه الدراسة الجدول (3-4) لدراسة قابليتها على أفراز إنزيمات Xylanase, Phytase, Laccase, Protase, Lipase

جدول (3-4) الأنواع الفطرية المختبرة لدراسة فعاليتها الانزيمية

ت	Species
1-	*Alternaria alternata*
2-	*A. chlamydospora*
3-	*A. tenuissima*
4-	*Aspergillus nidulans*
5-	*A. Niger*
6-	*Bipolaris sacchari*
7-	*Cladosporium cladosporioides*
8-	*Curvularia lunata*
9-	*Rhizopus oryzae*
10	*Ulocladium botrytis*

1-10-2-3: انزيم اللايبيز Lipase Enzyme

أختبرت قدرة الفطريات على أفراز هذا الأنزيم حسب طريقة Sierra (1957) ، حضُرت أطباق بتري حاوية على وسط Pepton Agar ، لُقحت الأطباق بقرص قطرة 6 ملم اخذ من حافة المستعمرة الفطرية الفتية بعمرأسبوع بواسطة ثاقب فليني معقم وضعت في مركز الطبق ، ثم وضعت الاطباق في الحاضنة تحت درجة حرارة 25± مْ لمدة لمدة أسبوعين، بعدها فحصت الاطباق لمعرفة قدرة الفطريات المختبرة لأفراز هذا الانزيم من خلال ملاحظة تكون هالة شفافة بيضاء أو بلورات أو رواسب بيضاء حول المستعمرات .

2-10-2-3 : أنزيم البروتييزProtease Enzyme

أختبرت قدرة الفطريات على أفراز هذا الأنزيم حسب طريقة Hankin and Anagnostakis (1975) ، حُضرت أطباق بتري حاوية على الوسط وسط نيوترينت أكارNutreint Agar مع الجيلاتين ، لُقحت الأطباق بقرص قطرة 6 ملم أخذ من حافة المستعمرة الفطرية الفتية بعمرأسبوع بواسطة ثاقب فليني معقم وضعت في مركز الطبق ، ثم وضعت الأطباق في الحاضنة تحت درجة حرارة ± 25 مْ لمدة لمدة أسبوعين ، فحصت الاطباق لمعرفة قدرة الفطريات على أفراز هذا الإنزيم من خلال ملاحظة تكون هالة شفافة حول النمو مما يدل على أفراو هذا الإنزيم .

3-10-2-3: انزيم لاكيزLaccase Enzyme

أختبرت قدرة الفطريات على أنتاج هذا الأنزيم حسب طريقة Sunitha *et al.* (2013) حُضرت أطباق بتري تحتوي على ألوسط Glucose yeast extract pepton ، لُقحت الأطباق بعدها بقرص قطرة 6 ملم أخذ من حافة المستعمرة الفطرية الفتية بعمرأسبوع بواسطة ثاقب فليني معقم وضعت في مركز الطبق ، ثم وضعت الأطباق في الحاضنة تحت درجة حرارة ± 25 مْ لمدة أسبوعين ، ثم فحصت الأطباق لمعرفة قدرة الفطريات المختبرة على أفراز هذا الانزيم من خلال ملاحظة تكون هالة زرقاء أو بيضاء أو صفراءاللون حول المستعمرات .

4-10-2-3: انزيم الفايتيزPhytase Enzyme

أختبرت قدرة الفطريات على أنتاج هذا الأنزيم حسب طريقة Howsonand Davis (1983) حيث حُضرت أطباق بتري حاوية على الوسط Phytase screening ، لُقحت الأطباق بقرص 6ملم أخذ من حافة المستعمرة الفطرية الفتية بعمرأسبوع بواسطة ثاقب فليني معقم وضعت في مركز الطبق ، ثم وضعت في الحاضنة تحت درجة حرارة ± 25 مْ لمدة أسبوعين، فحصت الاطباق بعدها للتاكد من قدرة الفطريات المختبرة على انتاج هذا الانزيم من خلال تكون منطقة واضحة حول النمو ، يتم الأستدلال على تكون ألهالة من خلال ما ياتي:

أضيف 10 مل من محلول Cobalt chloride إلى الأطباق وبعد فترة 5 دقائق على درجة حرارة الغرفة أزيل هذا المحلول وتم أضافة 10 مل من محلول Ammonium vanadate و Ammonium molybdate وبعد 5 دقائق فحصت الأطباق لمشاهدة الهالة .

3-2-10-5:انزيم الزايلانيزXylanase Enzyme

تم أختبار قدرة الفطريات على أنتاج هذا الأنزيم حسب الطريقة Adesina and Onilude (2013) ، حُضرت أطباق بتري حاوية على وسط Minimal agar ، لُقحت بواسط قرص قطرة 6 ملم أخذمن حافة مستعمرة فطرية فتية بعمر أسبوع بواسطة ثاقب فليني معقم وضعت في مركز الطبق ، بعدها وضعت في الحاضنة لمدة أسبوعين تحت درجة حرارة 25± م°، ثم فحصت الاطباق للتاكد من قدرة الفطريات على أنتاج الأنزيم من خلال ملاحظة تكون هالة حول المستعمرات وتم ألأستدلال على تكون الهالة باستخدام صبغة Congo red بتركيز0.4 % ، حيث تضاف إلى الطبق وبعدها تغسل بعد مرور10 دقلئق بواسطة NaCl بتركيز واحد مولاري.

3-2-11: دراسة قابلية بعض الفطريات المعزولة علىتحلل النفط الخام

تم أختبار قابلية 8 أنواع فطرية عزلت خلال هذه الدراسة على قابليتها على تحليل النفط الخام خلال فترتي 7 , 30 يوم جدول (3-5) .

3-2-11-1 - أختبار قابلية الفطريات على تحلل النفط الخام خلال 7 أيام

حُضرت دوارق زجاجية سعتها 25 مل وضع فيها 2 مل من وسط (MSM) المعقم ، أضيف 10 مايكروليترمن النفط الخام في كل دورق ، ثم لقحت بقرص قطرة 6 ملم أخذ من حافة مستعمرة فطرية فتية بواسط ثاقب فليني معقم ، وحضر دورقان حاويان على الوسط الزرعي والنفط الخام كمعامل سيطرة ، حضنت الدوارق لمدة 7 أيام وعلى درجة 25± مْ ، ثم فحصت للتاكد من حدوث تحلل للنفط الخام (Lemos *et al.*(2002 .

3-2-11-2- أختبار قابلية الفطريات على النمو وتحلل النفط الخام خلال30 يوم

حُضرت دوارق زجاجية سعتها 250 مل وضع فيها 100مل من وسط (MSM) المعقم ، أضيف 100 مايكروليترمن النفط الخام في كل دورق ، ثم لقحت بثلاثة أقرص قطرها 6 ملم أخذت من حافة مستعمرة فطرية فتية بواسط ثاقب فليني معقم ، وتم عمل مكرران لكل فطر مع دوارق سيطرة حاويه فقط على الوسط الزرعي والنفط الخام للتاكد من عدم حدوث تحلل للنفط الخام بسبب التلوث ، حضنت الدوارق في الحاضنه لمدة 30 يوم وعلى درجة حرارة ± 25 مْ ، ثم فحصت للتاكد من حدوث تحلل للنفط الخام من عدمه ، تم أستخراج الخيوط الفطرية من كل

دورق ووضعت على ورق ترشيح سجل وزنها وغسلت بالماء المقطر ثم وزنت وسجل الوزن ، وضت في الفرن على درجة حرارة 70مْ لمدة 24ساعة ثم وزنت مرة اخرى وتم حساب الوزن حسب المعادلة التالية :

الوزن الجاف = (وزن أوراق الترشيح + الخيوط الفطرية) _ وزن أوراق الترشيح

وحسب طريقة Cochrane(1958) .

تم تحديد قابلية الفطريات على تحلل النفط الخام خلال فترة 7 أيام و 30 يوم أعتمادا على تقديركمية النفط المتحللة حيث يشير الرقم 0 بعدم وجود تحلل ، + قابلية تحلل ضعيفة تراوحت 25-30 % ، ++ قابلية تحلل عالية تراوحت 70-75 % (Lemos *et al*., 2002) .

جدول (3-5) الفطريات المختبرة لدراسة قابليتها على تحلل النفط الخام

ت	Species
1-	***Alternaria alternata***
2-	***Aspergillua terreus***
3-	***Aspergillus niger***
4-	***Bipolaris sacchari***
5-	***Nigrospora oryzae***
6-	***Rhizopus oryzae***
7-	***Stemphylium herbarum***
8-	***Ulocladium botrytis***

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

Results and Discussion

4-1-التوصيف المظهري لبعض الفطريات المعزولة من التربة الملوثة بالنفط

تم عزل وتشخيص 27 نوعاً فطرياً من التربة الملوثة وفيما يأتي وصفاً مظهرياً ومجهرياً لبعض تلك الأنواع المعزولة :

1- *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler., Beihefter Zum Botanischen Centtralbatt 29:433 (1912).

المستعمرات صوفية ، بنية ، مسطحة ، حوافها منتظمة ، تنمو في غضون 5-7 أيام. الخيوط الفطرية Hyphae مقسمة ، ذات لون بني، سمكها 3.5- 4.5 مايكرون . الحامل الكونيدي Conidiophore قائم ، بسيط أو متفرع ، مقسم ، ذو لون بني شاحب ، أبعادة 75-85 × 4.5- 3.5 مايكرون ، يحمل في نهايته سلسلة مكونة من 2-8 كونيدات ، الفتية منها في طرف السلسلة البعيد عن الحامل . الكونيدات هراوية الشكل ، بنية داكنة ، أبعادها 18-30 × 6.5- 15.5 مايكرون ، نهايتها العليا ضيقة وحاوية على عنق Beak قصير، بعض الكونيدات تكون أنبوب إنبات Germ Tube ، وتحتوي على حواجز طولية عددها 1-2 وعرضية عددها 3-4 . يتميز هذا النوع بوجود Chlamydospore ، خلاياه كروية الشكل ، شفافة ، قطرها5.5-10.5 مايكرون شكل (4-1).

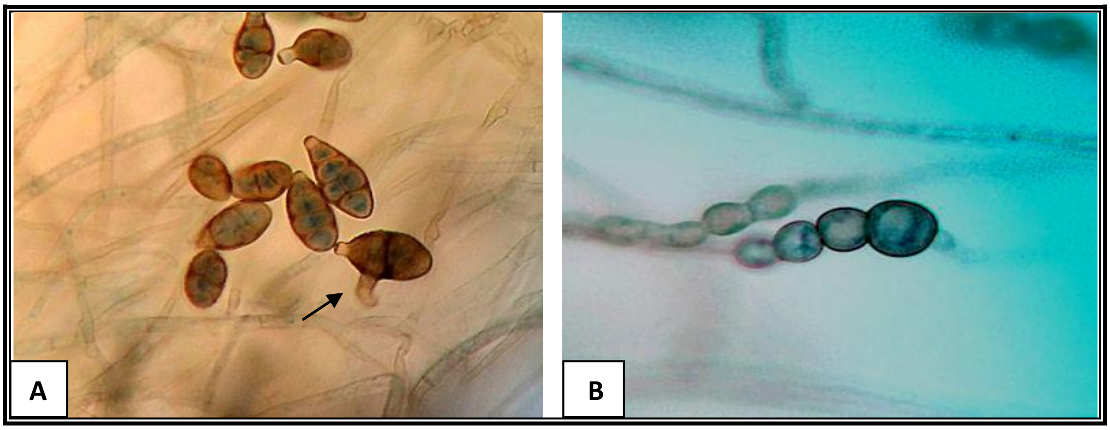
شكل (4-1) التراكيب التكاثرية للفطر *Alternaria alternata* ، A: 1- مناطق ارتباط الكونيدات (السهم) 2- أنبوب الإنبات (السهم) B : Chlamydospore

يماثل هذا الوصف مع ما تم وصفة لدى Keissler (1912) ، يختلف هذا النوع عن الأنواع الاخرى لهذا الجنس بكون كونيداتة أصغر حجماً وأكثر عدداً والحواجز الطولية والعرضية أقل

وقد وجد بأن هناك تقارب واضح وكبير بين هذا النوع و*A.citri* لكن وعند استخدام المجهر الماسح وجود بأن هناك فرق في زخرفة جدار كونيدات كل نوع وكان جدار الفطر*A.citri* أكثر خشونة (عبد الله، 2015)

2- *Alternaria citri* Ellis and Pierce, Botanical Gazette Crawfordsville 33(3):234 (1902)

المستعمرات صوفية ، بنية اللون ، مسطحة على الوسط ، حوافها منتظمة ، تنمو في غضون 5-7 أيام . الخيوط الفطرية مقسمة ، لونها بني فاتح ، سمكها 4.5-5.5 مايكرون . الحامل الكونيدي قائم ، متفرع ، مقسم، ذو لون بني ، ابعادة 45-75 × 3.5-4.5 مايكرون ، يحمل في نهايتة سلسلة قليلة من الكونيدات 3-4. الكونيدات بيضوية ، ذات لون بني داكن ، سميكة الجدار،عريضة من الوسط ، أبعادها 20-40 × 10-15 مايكرون ، حاوية على عنق قصيرBeak ، تظهر على بعضها ثقوب أنبات Gem Tube ، عدد حواجزها الطولية 1-3 والعرضية 2-4. يتميز هذا النوع أيضاً بتكوين Chlamydospore شكل (4-2) .

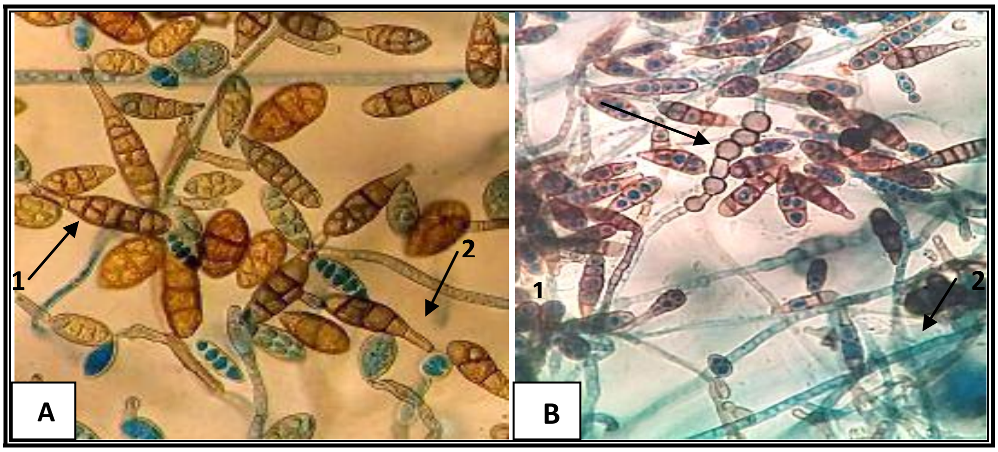


شكل (4-2) التراكيب التكاثرية للفطر *Alternaria citri* :A الكونيدات (السهم يشير إلى أنبوب الانبات) ،B : Chlamydospore.

تتطابق صفات هذا الفطر مع ما ذكره Ellis and Pierce (1902) . من الناحية المظهرية تعتبر كونيدات *A.citri* أوسع من المنتصف وأكبر حجما وعدد الحواجز الطولية والعرضية أكثر وتميل لتكون ذات شكل بيضوي عند المقارنة مع كونيدات *A.alternata* (Thomas *et al.*, 2018) .

3- *Alternaria tenuissima* (Kunzee) wilteshire,Tranactions of the British Mycol.Sco.,18(2): 157 (1933)

المستعمرات صوفية ، خضراء إلى زيتونية ، مسطحة ، حدودها منتظمة ، تنمو على الوسط ألزرعي خلال 5-7 أيام . الخيوط الفطرية مقسمه بحواجز، بنية اللون ، سمكها2.5-4.5 مايكرون .الحامل الكونيدي قائم ، بسيط أو متفرع ، مقسم ، بني إلى ذهبي اللون ، أبعادة 15-40 ×3-3.5 ، يحمل سلسلة مكونة 2-8 من الكونيدات ، الطرفية فتية صغيرة الحجم منها .الكونيدات متطاولة مضربيه الشكل ، خضراء إلى ذهبية اللون ، نهايتها العليا ضيقة وحاوية على عنق Beak طويل ، أبعادها 40 -100 × 10-20 مايكرون ، حاوية على حواجز، الطولية عددها 3- 1 وعرضية عددها 3-6. يتميز هذا النوع بتكوينه الأبواغ الكلاميدية كروية الشكل ، شفافة ، قطرها بين 8-12مايكرون.شكل (3-4).



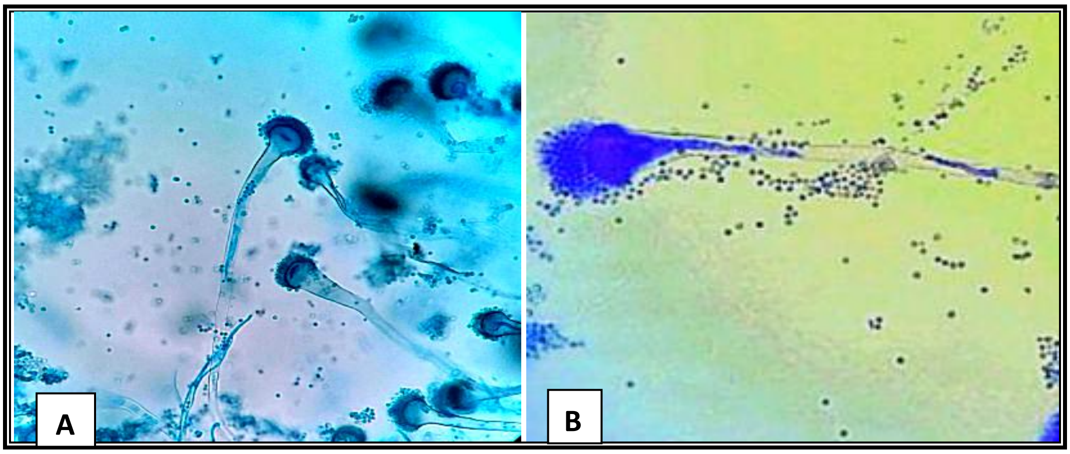
شكل (3-4) التراكيب التكاثرية للفطر *Alternaria tenuissima* ، A: الكونيدات 1-الحواجز(السهم) 2- العنق (السهم) . B: Chlamydospore (السهم)

تم عزل هذا الفطر لأول مرة من التربة الملوثة في العراق.

يتطابق هذا الوصف لما تم وصفة لدى (1933) wilteshire ، يمكن تمييز هذا النوع عن النوعين *A. citri* و *A.alternata* من خلال طول الكونيدات وشكلها وعدد الحواجز الموجودة وصفات أخرى فيها فكونيدات هذا النوع تتميز باللون الذهبي الداكن وتحوي على مناقير مستدقه وطويلة مقارنة بالكونيدات الصغيرة وذات المناقير القصيرة التابعة للنوعين السابقين (Pastor and Guarro, 2008).

4- *Aspergillums fumigatus* Fresenius, in :Beitr. Mycol., 3:81 (1863)

المستعمرات Colony مخملية ، خضراء إلى زيتونية ، مسطحة ، حوافها منتظمة ، تنمو في غضون 4-7 أيام . الخيوط الفطرية مقسمة ، شفافة ، سمكها 3-4 مايكرون . الحامل الكونيدي قائم ، غير متفرع ، غير مقسم ، شفاف ، رقيق الجدار، طولة 55-125 مايكرون ، سمكه عند قاعدة الحويصلة 6-8 مايكرون وعند القاعدة 3.5-4.5 مايكرون ، يحمل في نهايته تركيب الحويصلة Vesicle شفافة ، قطرها 10.5-14.5 مايكرون ، تحمل صف من تراكيب أصبعية الشكل حاملة للأبواغ ، طولها 5.5-15.5، الأبواغ على شكل سلاسل ، كروية ، خضراء فاتحة اللون ، قطرها 2.5-3.5 مايكرون .شكل (4-4) .



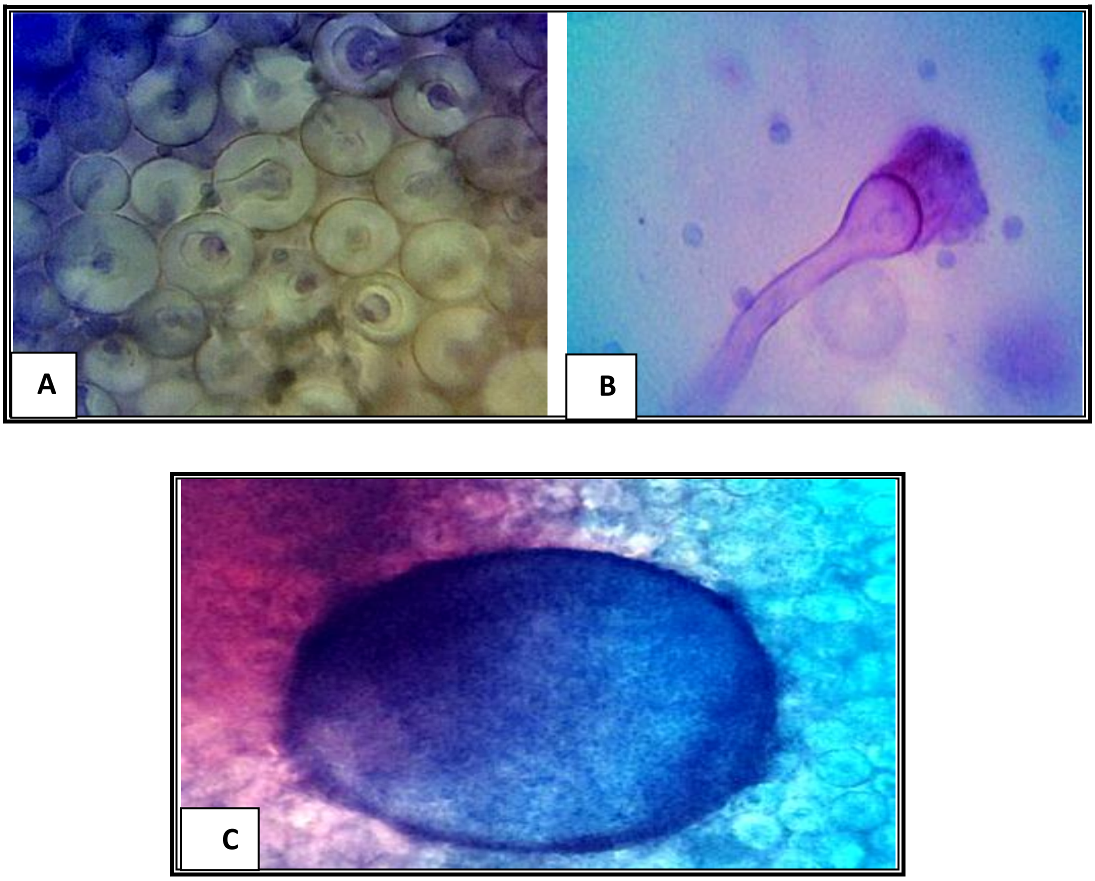
شكل (4-4) الفطر *Aspergillus fumigatus* ، A: الحويصلة، B: الحامل الكونيدي Conidiophore

أن جميع الصفات التصنيفية مطابقة مع ما ذكر من قبل Fresenius(1863) ، هناك تشابه كبير بين أنواع جنس *Aspergillus* لكن يمكن التمييز بينها من خلال عدد من الصفات منها قطر الحويصلة وشكل وإبعاد التراكيب الاصبعية وطول الحامل الكونيدي وشكل المستعمرات ولونها (Watanabe, 2012).

5-*Aspergillus nidulans* (Eidam) Gwinter in : Rabenh.kryp. fl, Leipzig 1.2:62 (1884)

المستعمرات Colony مخملية ناعمة ، لونها بني فاتح ، مسطحة ، حدودها منتظمة ، تنمو ببطء على الوسط ألزرعي بأكثر من 7 أيام . الخيوط الفطرية مقسمه ، شفافة ، سمكها 3.5-6.5 مايكرون . الحامل الكونيدي قائم ، غير متفرع ، غير مقسم ، شفاف ، طولة 100-150مايكرون

، سمكه عند قاعد الحويصلة 5.5-4.5 وعند القاعدة 4.5-3.5 مايكرون، يحمل حويصلة شفافة ، قطرها 15-10 مايكرون ، تترتب عليها تراكيب إصبعية الشكل ، طولها 12-16 مايكرون،.



شكل (5-4) الفطر *Aspergillus nidulans* ، *A* : الحويصلة والحامل الكونيدي ، B : خلايا Hulle ، C : Cleistothecia

الأبواغ مرتبة في سلسلة ، كروية الشكل، ملساء ، ذات لون بني فاتح ، قطرها 2-2.5 مايكرون .الجسم الثمري المغلق Cleistothecia كروي الشكل ، قطره 150-200 مايكرون ، خلايا Hulle ، شفافة ، حاوية على تجويف في الوسط ، قطرها 15-30 مايكرون شكل (5-4)

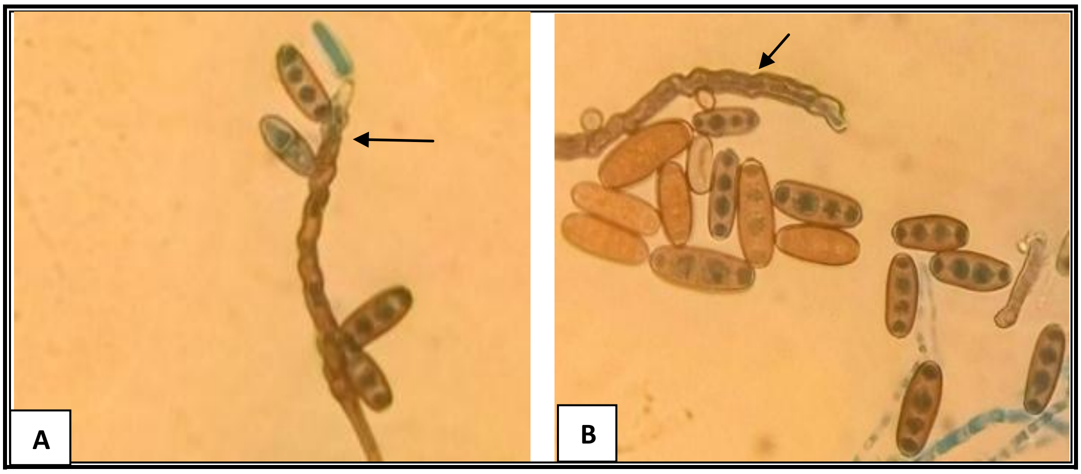
الطور الجنسي : *Emericella nidulans*

الوصف أعلاه مطابق لما وصفة Gwinter (1884) يمكن تميز هذا النوع عن الأنواع الأخرى التابعة لهذا الجنس من خلال العديد من الصفات منها قطر الحويصلة والابواغ وطول الحامل والتراكيب الإصبعية ، يسمى هذا النوع في حالة Telomorpha أسم *Emericella nidulans* (Osmani and Mirabito, 2004) . يعتبر *A.nidulans* أحد أنواع هذا الجنس

التي يحدث فيها التكاثر الجنسي ويتميز بتكوين أجسام ثمريه مغلقة تتكون داخلها ابواغ جنسية إضافة إلى تكون خلايا Hulle حيث يعتقد أنها تعد بمثابة نسخ جينية احتياطية حيث وجد بأنها ترث أنويه من خلايا أبوية وبالتالي يمكن إن تعمل بمثابة خلايا جذعيه فطرية عندما تكون الظروف قاسية (Herman *et al*., 1983) .

6- *Bipolaris australiensis* (Bungnic.ex M.B.Ellis) Tsuda and Ueyama,in: Mycologia ,73: 90 (1981)

المستعمرات صوفية ، بنية إلى سوداء ، مرتفعة قليلا عن الطبق ، حوافها منتظمة ، تنمو في غضون 5-7 أيام . الخيوط الفطرية مقسمة ، لونها بني فاتح ، سمكها 4-5 مايكرون. الحامل الكونيدي مقسم ، بسيط أو قليل التفرع ، بني اللون ، أبعادة 50-150 × 3.5-4.5 مايكرون ، يحمل كونيدات الفتية منها في القمة ثم تتدرج على الجوانب ، كثير العقد ويبدو بمظهر متعرج ، هذه التعرجات تمثل مناطق اتصال الكونيدات بالحامل . الكونيدات اسطوانية أو بيضوية الشكل ، ذات لون بني داكن، أبعادها 15.5-30 ×4.5 -7.5 مايكرون حاوية على 3-4 خلايا ، ولا تحتوي على نقير قاعدي واضح .شكل (4-6) .



شكل (4-6): التراكيب التكاثرية للفطر *Bipolaris australiensis*، A: الحامل الكونيدي (يشير السهم) B: الكونيدات والحامل الكونيدي (السهم يشير إلى التعرجات)

الطور الجنسي : *Cochliobolus australiensis*

تم تشخيص هذه الفطر أول مرة في العراق من التربة الملوثة بالنفط الخام

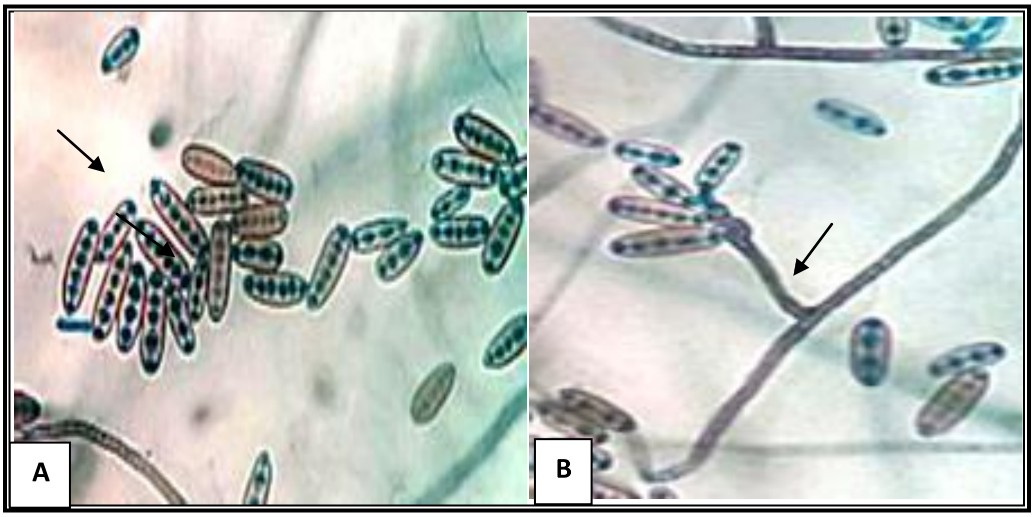
تم وصف هذه العزلة من قبل Tsuda and Ueyama (1981) ، يطلق على هذا النوع في الحالة الجنسية Telomorpha أسم *Cochliobolus australiensis* (Alcorn, 1983) ، هذا الجنس قريب الشبه من جنس *Curvularia* من ناحية شكل وحجم وعدد الحواجز الكونيدية، لكن يختلفان عن بعضهما فكونيدات *Bipolaris* لا تحتوي على انحناء في الوسط ولا على خلايا مركزية داكنة اللون بالمقارنة مع جنس *Curvularia* ، جاءت تسمية هذا الجنس بأسم *Bipolaris* بكون كونيداته تستطيع الأنبات من الجهتين (Manamgoda *et al*., 2012)

7- *Bipolaris sacchari* (E.J. Butler) Shoemaker, Basionym in: Canadian Journal of Botany, 37(5) :882 (1959)

المستعمرات قطنية ، بنية، مرتفعة قليلا عن الوسط ألزرعي ، حوافها منتظمة ، تنمو في غضون 5-7 أيام . الخيوط الفطرية مقسمة ، لونها بني فاتح ، سمكها 3-5 مايكرون . الحامل الكونيدي قائم ، بسيط أو قليل التفرع ، مقسم ، بني شاحب ، أبعادة 50-100 × 3.5-5.5 مايكرون ، يحمل كونيدات في القمة أو تحتها على شكل مجموعة Cluster من 8 كونيدات أو أكثر تبتعد عن بعضها بمسافات قليلة ، يحتوي على عقد في نهايته تعطيه مظهر متعرج. الكونيدات اسطوانية الشكل ، ذات لون بني فاتح، أبعادها 30-50 × 8.5-11.5 مايكرون ، حاوية على 6-7 خلايا ، بدون نقير كونيدي واضح شكل (4-7).

يتطابق الوصف لهذه العزلة مع ما تم وصفة لدى Shoemaker (1959) . لقد تم وصف هذا النوع اولا بأسم *Helminthosporium sacchari* من قبل (Butler,1913) بعد ذلك تغيير أسم ألجنس فقط إلى *Bipolaris* أي ثنائي القطب . و جد بأنه يختلف عن الفطر *B. stenospila* بكون كونيداته أكبر حجما Sivanesan (1985) ،ويختلف أيضا عن الفطر *B.austaleinsis* حيث تكون كونيداتة أكبر حجما وعدد الخلايا تكون أكثر (Carmen, 2017)

.

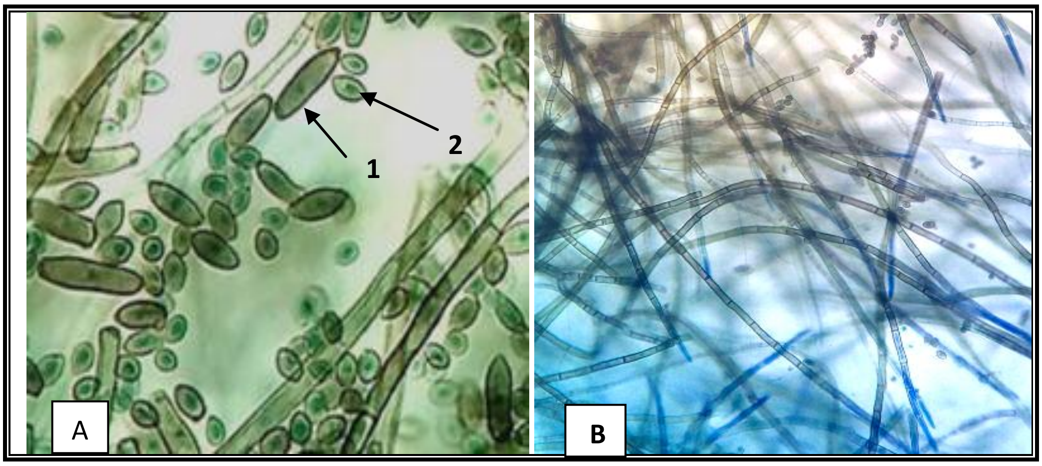


شكل (4-7) التراكيب التكاثرية للفطر *Biplaris Sacchari* ، A : الكونيدات الأسطوانية (السهم) B : الحامل الكونيدي (السهم) .

8- *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G.A.De vries ,contr. Know.Of the genus *Cladosporium*: 57:(1952).

المستعمرات قطنية ، زيتونية إلى خضراء ، مسطحة ، حوافها غير منتظمة ، تنمو ببطء من 7-10 أيام . الخيوط الفطرية مقسمة ، لونها أخضر فاتح ، سمكها 2-4 مايكرون ،الحامل الكونيدي قائم ، متفرع إلى 2-3 فرع ، مقسم بعدد من حواجز، أخضر فاتح، أبعادة 100-225 × 3.5-4.5 مايكرون ، كل فرع أبعادة 10-22 × 2-3 مايكرون يحمل خلايا Shield cell .الكونيدات محمولة على تراكيب تدعى الذنيبات Sterigmata في سلسلة مكونة من أكثر من عشر كونيدات ، الكونيدات بيضوية الشكل ، لونها أخضر داكن، أبعادها 3-7 × 2-4 مايكرون شكل (4-8) .

وصف هذه العزلة مطابق لما ذكره Vries (1952) . لقد تم وصف جنس هذا النوع أولا على أنه *Penicillium* عام 1880 من قبل Fresenius لكن بعد ذلك تم نقلة إلى جنس *Cladosporium* حيث يتميز هذا النوع بصغر حجم كونيداته وينتج أعداد كثيرة منها وهي متكيفة للانتقال وبهذا ساعده على أنتشاره (Park *et al*., 2004) .وحاليا تستخدم الطرق الجزيئية للتمييز بين أنواع هذا الجنس(Bensch *et al*., 2012) .



شكل (4-8) تراكيب الفطر *Cladosporium cladosporioides* A: 1-: خلايا Shield 2 -: الكونيدات ، : B الخيوط الفطرية .

9-*Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn, in: Bull. Jard.Bot., Buitenzorg, 13(1): 127 (1933)

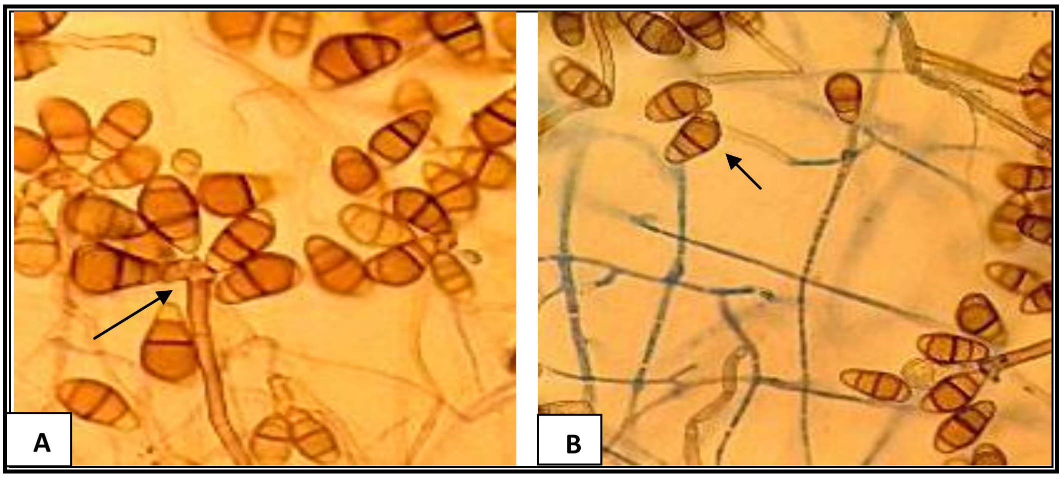
المستعمرات صوفية، بنية، مرتفعة قليلا عن سطح الوسط ألزرعي ، حوافها غير منتظمة ، تنمو في غضون أسبوع . الخيوط الفطرية مقسمة ، لونها بني، سمكها 2.5-3.5 مايكرون وتصبح سميكة بتقدم العمر. الحامل الكونيدي قائم ، بسيط أو قليل التفرع ، مقسم ، بني ، أبعاده 150-300× 3.5-4.5 مايكرون ، يحمل في القمة وتحتها مجموعة من الكونيدات 1-8 ، ذو نهاية مقوسه Curved وحاوي على الكثير من التعرجات في نهايته تمثل مناطق اتصال الكونيدات . الكونيدات مقوسة الشكل ، تحتوي على أنحناء في الوسط ، ذات لون بني فاتح ، أبعادها 15-20× 10-14، حاويه على ثلاث حواجز عرضية ، وأربع خلايا اثنان مركزيتان واثنان طرفيتان ، الخلايا المركزية تكون منتفخة ، تتميز بوجود نقير قاعدية شكل (4-9).

الطور الجنسي: *Cochliobolus lunatus*

هذا الفطر عزل لأول مرة من التربة الملوثة بالنفط الخام في العراق.

تتطابق صفات هذا الفطر مع ما ذكره Bodijn (1933) ، ويمكن التمييز بين أنواع هذا الجنس من خلال عدد الخلايا والحواجز وكذلك وجود أو عدم وجود أنحناء في الكونيدات أضافه إلى شكلها وحجمها ولونها (Yan *et al*., 2009) .أن كونيدات *C.protuberata* تحتوي على 4-5 خلايا اسطوانية الشكل ، والخلايا المركزية غير منتفخة ، وبالتالي يمكن تميزها عن

C.lunata (Watanabe, 2012)، يطلق على هذا الفطر في الحالة الجنسية *Cochliobolus lunatus* (Nelson and Haasis, 1964).



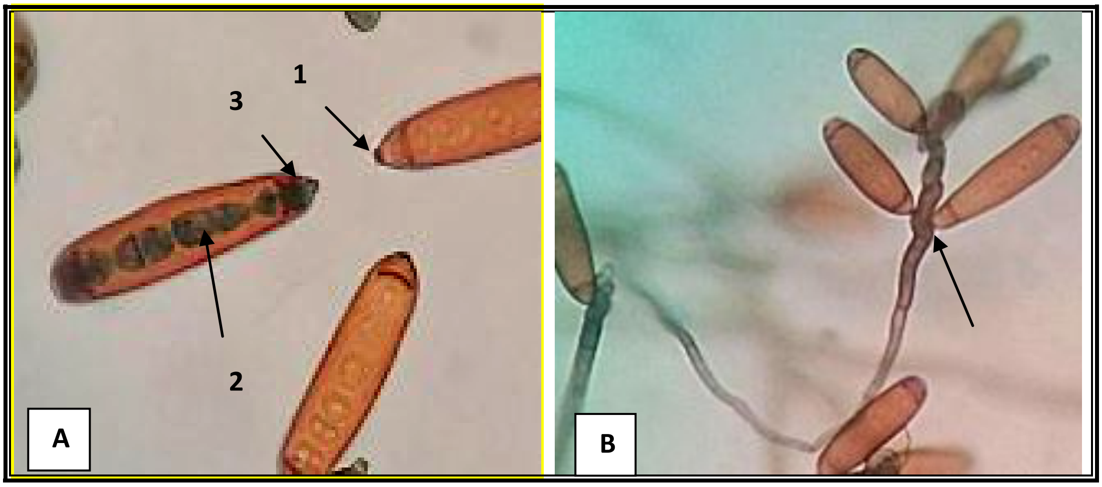
الشكل (4-9) كونيديا الفطر *Curvularia lunata*، A: الكونيدات وترتيبها على الحامل الكونيدي (السهم). B: أنحناء الكونيدات (السهم)

10- *Exserohilum holmii* (Lutterll) K.J. Leonard and Suggs., Mycologia 66:289, (1974)

المستعمرات قطنية ، بنية ، مرتفعه قليلا عن الوسط ألزرعي ، حدودها منتظمة ، تنمو في غضون 6-7 أيام من الحضانة . الخيوط الفطرية مقسمة ، ذات لون بني ، سمكها 3.5-5.5 مايكرون . الحامل الكونيدي قائم ، بسيط أو قليل التفرع ، مقسم بعدد من الحواجز ، بني داكن ، أبعادة 250-300 ×2.5-4.5 مايكرون ، يحتوي على الكثير من التعرجات تمثل مناطق اتصال الكونيدات ، يحمل الكونيدات على في القمة وعلى الجوانب.الكونيدات أسطوانية الشكل ، ذات لون بني فاتح ، سميكة الجدار ، أبعادها 50- 75× 15.5-25 .5 مايكرون ، حاوية على 6-7 خلايا بشكل يشبه الشاغول Plumb-bob. وتحتوي على حواجز داكنة اللون عند النهايتين ، تتميز بوجود نقير شكل (4-10) .

وصف هذه العزلة مطابق مع ما تم وصفه من قبل Leonard (1974) . كانت هذه العزلة موصوفة سابقا بأسم *Helminthosporium holmii* من قبل (Luttrell, 1963) ، أهم ما يميز هذا النوع هو وجود نقير كونيدي بارز والكونيدات مستديرة القمة ووجود حواجز داكنة بالقرب من النهايتين ، يشبه جنس هذا ألنوع كلا من الاجناس *Drechslera* و*Bipolaris* لكن

يمكن التمييز بينها من خلال صفات الكونيدات والتي تستخدم كمعايير تصنيفية لهذه الأجناس ومن أهم هذه الصفات هو عدد الخلايا وجود أو عدم وجود نقير Hilum واضح ومكان أنبات الكونيدات فكونيدات *Bipolaris* تستطيع الأنبات من كلا الجهتين وعدد خلاياه 3-6 والنقير غير واضحة أما *Drechslera* فأنها تنبت من الخلايا الوسطية وعدد خلاياها أكثر من 8 والنقير تكون واضحة وفي *Exserohilum* تستطيع الأنبات من جانب واحد فقط وعدد خلاياها 4-8 والنقير واضحة جدا (Alcorn, 1983).



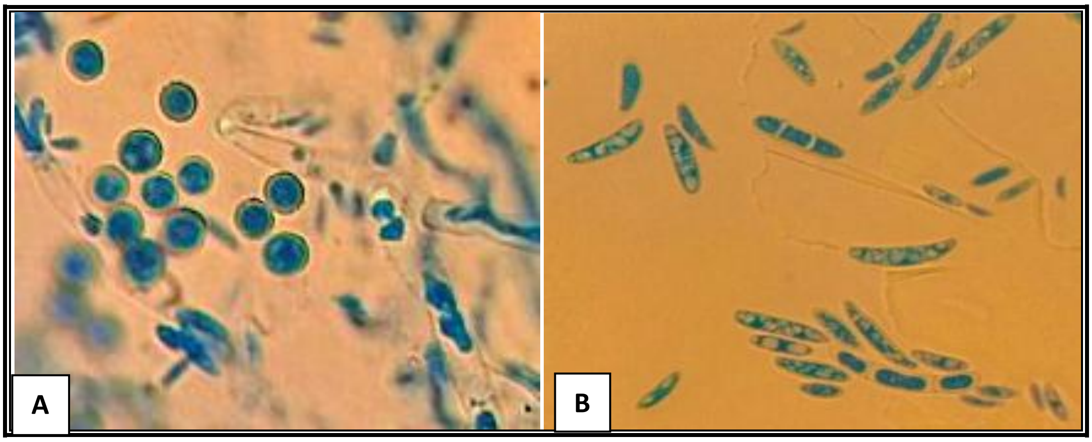
شكل (4-10) التراكيب التكاثرية الفطر *Exerohilum holmii* ، A: الكونيدات 1- النقير الكونيدي (السهم) 2- الخلايا (السهم) 3- الحواجز الداكنة (السهم)، B : ترتيب الكونيدات على الحامل الكونيدي .

11.*Fusarium solani* (Mart.) Sacc., michelia 2(7):296 (1881)

المستعمرات قطنية ، بيضاء ، مسطحة ، حدودها منتظمة ، تنمو خلال 7 أيام أو أكثر. الخيوط الفطرية مقسمه ، شفافة ، سمكها 3-6 مايكرون . الحامل الكونيدي Conidiophore قائم ، بسيط أو قليل التفرع ، شفاف اللون ، أبعادة 50-165 × 2.5-3.5 مايكرون ، يحمل نوعين من الكونيدات في القمة هما الكونيدات الكبيرة Macroconidia ذات شكل زورقي ، شفافة ، أبعادها 31.5-59.5 × 4.5-6.5 مايكرون ، حاوية على 3-5 خلايا ، أما النوع الأخر فهي الكونيدات الصغيرة Microconidia أسطوانية الشكل ، شفافة ، أبعادها 7.5-15.5 × 2.5-4.5 مايكرون ، حاوية على خلية واحدة أو اثنين .الأبواغ الكلاميدية ، كروية الشكل ، شفافة ،قطرة 10.5-7.5مايكرون شكل (4-11) .

الطور الجنسي : *Nectria haematococca*

وصفت هذه العزلة من قبل Sacc(1881)، ويطلق عليها في حالة Telomorpha أسم *Nectria haematococca* Berk.(1960)، يمكن تمييز الأنواع التابعة لهذا الجنس من خلال العديد من الصفات المرفولوجية منها أشكال واحجام الكونيدات الصغيرة والكبيرة وعدد الحواجز ، فوجد بأن الكونيدات الكبيرة لهذا النوع أكبر من تلك الموجودة في النوعين *F.roseum, F.oxysporum* إضافة إلى ذلك يمكن تمييز الأنواع على أساس معدل النمو على أوساط غذائية المختلفة ، فمعدل النمو لهذا ألنوع يكون أبطأ مما هو علية لدى الفطر *F.oxysporum* (Raghu *et al.*, 2016 ; Watanabe, 2002) .



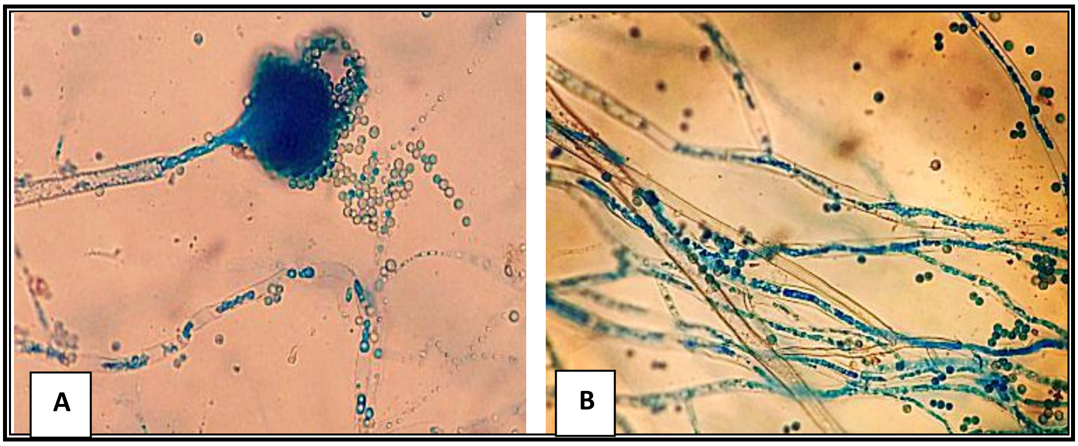
شكل (11-4) الفطر *Fusarium solani* ، A: Chlamydospore ، B : الكونيدات

12-*Mucor plumbeus* Bonorden., .In : Abh. Naturforsch.Ges. Halle 8:109.(1864)

المستعمرات قطنية ، بنية ، مسطحة ، حوافها غير منتظمة ، تنمو بسرعة وخلال 4 أيام . الخيوط الفطرية غير مقسمة ، عريضة ، لونها بني فاتح ، سمكها 6-12 مايكرون. حامل الحافظة البوغية Sporangiphore قائم ، متفرع ، غير مقسم ، شفاف ، طوله 2 -3 ملمتر، وسمكة 6-10 مايكرون ، يحمل في نهاية حافظة بوغية Sporangium بنية اللون ، كروية الشكل ، قطرها 50-100 مايكرون ، العويمد Columellate ذو لون بني شاحب .الابواغ كروية ، ذات لون بني شاحب ، احادية الخلية ، قطرها 5.5-7.5 ، الابواغ الكلاميدية مكونه من خلايا كروية الشكل ، قطرها 15-20 مايكرون ، لا يكون أشباه جذورRhizoids شكل (4-12).

يطابق الوصف السابق مع ماتم وصفة من قبل Bonorden (1864) . هذا النوع قريب الشبة من النوع *M. racemosum* مع ذلك هنالك اختلافات بينهما تكمن في لون المستعمرة وحجم

وشكل ولون الحوافظ الاسبورية وقطر الاسبورات حيث تكون المستعمرات في النوع *M.rasemosum* بنية اللون والحافظة كروية بنية قطرها اكثر من 80 مايكرون والابواغ بيضوية الشكل بقطر 5-8 مايكرون (Hoffmann *et al*., 2013)



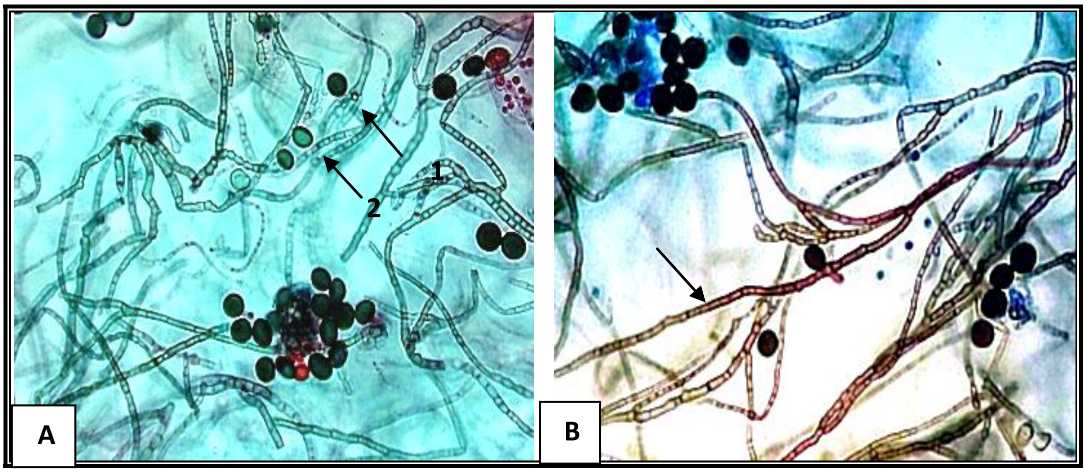
شكل (4-12) الفطر *Mucor plumbeus.* ، A :الحامل الكونيدي والأبواغ ، B: الخيوط الفطرية

13- *Nigrospora oryzae* (Berk. and Broome) Petch, in : Indian bot., (1924)

المستعمرات صوفية ، ذات لون بني داكن، مرتفعة عن الوسط ألزرعي ، حدودها غير منتظمة ، تنمو خلال فترة 4-7 أيام . الخيوط الفطرية مقسمه ، كثيرة التعرجات ، لونها بني داكن، سمكها 2-6 مايكرون . الحامل الكونيدي قصير جدا ، غير متفرع ، شفاف ، يحمل كونيديا واحدة فقط ، بيضوية ، بنية فاتحة اللون تصبح سوداء عند النضج ، ابعادها 10-15 ×-7.5- 10 مايكرون شكل (4-13) .

الطور الجنسي : *Khuskia oryzae*

تم وصف هذه العزلة أول مرة في العراق من التربة الملوثة بالنفط .



شكل (4-13) ، تراكيب الفطر *Nigrospora oryzae* ،A: الكونيدات 1- الكونيدات الناضجة (السهم) 2- الكونيدات الفتية(السهم) ،B: الخيوط الفطرية المتعرجة (السهم) .

أن الوصف أعلاه لهذه العزلة يتفق مع ما تم ذكره من قبل Petch (1924) ، يطلق على هذا النوع في حالة Telomorpha أسم *Khuskia oryzae* Huds (1963) ،الأنواع التابعة لهذا الجنس متشابهة لكن يمكن تمييزها عن طريق حجم الكونيدات (Domsch *et al*., 1980) .فمن خلالها تم التمييز بين ثلاثة أنواع لهذا الجنس هي *N.oryzae* و *N.sacchari* و*N.sphaerica* (Watanabe, 2002) .

14- *Rhizopus oryzae* Went and Prnisen Geerligs,in Verh.k. Akad. Wet., tweed sect., 4(2): 16 (1895)

المستعمرات صوفية ، رمادية اللون ، تنمو وتملأ الطبق بسرعة خلال 3 أيام . الخيوط الفطرية غير مقسمة ، شفافة ، سمكها 5-15 مايكرون .حامل الحافظة البوغية قائم ، غير متفرع ،غير مقسم ، ذات لون رمادي داكن ، طوله أكثر من 1500مايكرون ، سمكة 15-20 مايكرون، يرتبط كل حامل مع أخر عن طريق مدادات Stolon ، يحمل الحامل في نهايته تركيب يدعى الحافظة البوغية كروية الشكل ، ذات لون رمادي ، قطرها 75-150 مايكرون ، تحمل في داخلها أبواغ حافظيه كروية ، رمادية شاحبة ، ناعمة الجدار ، أحادية الخلية قطره 5.5-10.5 مايكرون . يوجد تركيب يدعى العويمد ذو لون بني ، يفصل الحامل عن الحافظة البوغية ، عند النضج يندفع العويمد داخل الحافظة مما يؤدي إلى تمزقها وتحرير الأسبورات إلى الخارج ، توجد تركيب أشباه الجذور Rhizoids في منطقة التقاء المدادات مع الحامل ويقع أسفل الحامل مباشره شكل (4-14)..

عزل هذا الفطر لأول مره من التربة الملوثة بالنفط الخام في العراق .

جميع الصفات التصنيفية السابقة اتفقت مع ما تم ذكره من قبل Went and Prnisen (1895)، يختلف هذا الجنس عن جنس *Mucor* بوجود Rhizoid فيه وعن *Lichtheimia* بكون Rhizoid ينشأ من نقطه مقابل الحامل، يشبه هذا النوع إلى حدا ما النوع *R.stolonifer* ولكن يتميز عنه بصغر الحافظة البوغية والابواغ ألحافظيه (Schipper,1984).

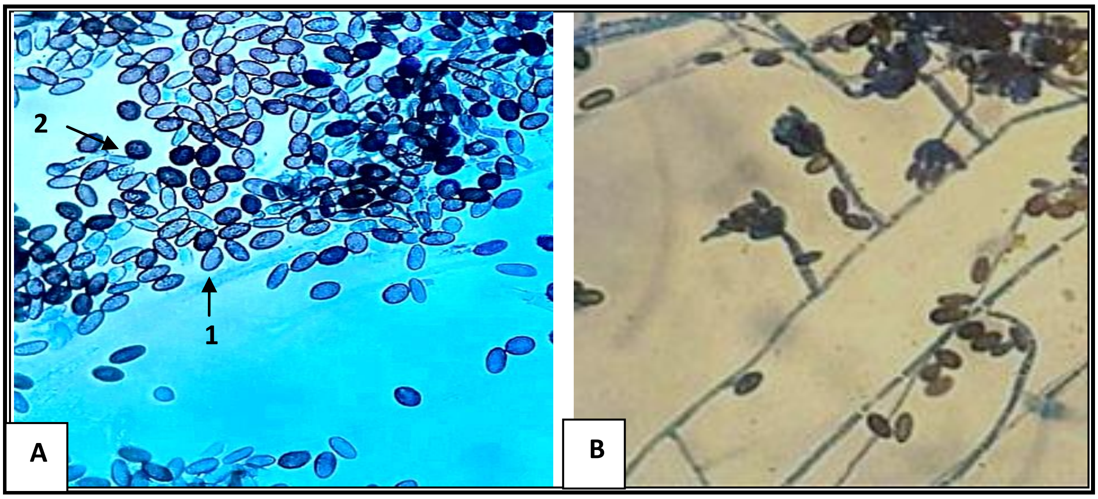
شكل (4-14)الفطر *Rhizopus oryzae*، A: الحافظة الاسبورية والاسبورات 1-الحافظة الأسبورية (السهم)2-الأبواغ (السهم) .، B : اشباه الجذور Rhizoids

15-*Stachybotrys chartarum* (Ehrenb.): S.Hughes, in Canadian Journal of Botany 36:812. (1958)

المستعمرات قطنية ، بنية اللون، مسطحة ، حدودها غير منتظمة ، تنمو خلال 3-7 أيام . الخيوط الفطرية شفافة ، مقسمه ، سمكها 3-5 مايكرون ،الحامل الكونيدي قائم ، متفرع ، بني شاحب ، ضيق عندما يكون فتي ثم يصبح سميك الجدار بتقدم العمر ، أبعادة 50-100 × 4.5-3.5مايكرون ، يحمل في قمة 2-3 من التراكيب الأصبعية ، تترتب عليها الكونيدات على شكل عناقيد ، بعدد يتراوح 3-10 كونيدات ، بنوعين الكونيدات ، غير الناضجة بيضوية الشكل ، شفافة ، ملساء الجدار ، قطرها 6-8 مايكرون ، الناضجة كروية الشكل ، ذات لون بني داكن ، وخشنه الجدار، بقطر7-10 مايكرون شكل (4-15).

تم عزل هذا الفطر لأول مرة في العراق من التربة الملوثة بالنفط الخام.

يتطابق هذا الوصف تماما مع ما أكده Hughes (1958) ، يمتلك هذا النوع العديد من الصفات المميزة ويصبح من السهل التعرف علية حيث يحتوي على نوعين من الكونيدات الشفافة والداكنة التي تبقى مرتبطة بالحامل الكونيدي إلى أن يجف الفطر ثم تنتشر بواسطة الهواء أو الوسائل الأخرى (Vesper *et al*., 2000 ; Dill *et al*., 1997) .



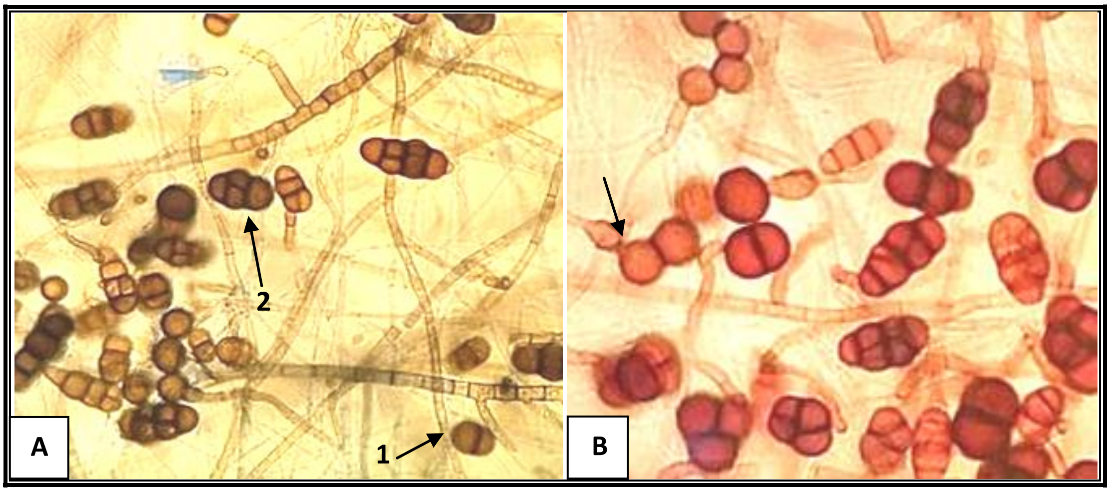
شكل (4-15) الفطر *Stachybotrys chartarum* ، A : الكونيدات1- الكونيدات الفتية (السهم) 2- الكونيدات الناضجة (السهم) B :الحامل الكونيدي والغزل الفطري

16- *Stemphylium herbarum* E.G.Simmons,in Sydowia, 38:291 (1986)

المستعمرات قطنية ، ذات لون بني مائل للأخضر، مرتفعة قليلا عن الطبق ، حدودها منتظمة، تنمو ببطء خلال 7-10 أيام .الخيوط الفطرية مقسمة ، خشنة الجدار ، بنية اللون ، سمكها3.5 -5.5 مايكرون . الحامل الكونيدي قائم ، غير متفرع ، قصير ، بني شاحب ، أبعادة 10-50 ×5.5-7.5 مايكرون . يحمل كونيدة مفردة ، الغير ناضجة تكون بيضوية الشكل ، شفافة، قطراها 10-15 مايكرون ، أما الناضجة فتكون كبيرة الحجم ، بيضوية إلى أسطوانية الشكل ، ذات لون أخضر داكن ، أبعدها 20-35 ×8-20 مايكرون ، تحوي حواجز طولية عددها 1-2 وعرضية 3-4 عددها ، تعطي هذه الحواجز للكونيده مظهر يشبه الرقم 8. يتميز هذا النوع بتكوينة أبواغ كلاميدية كروية الشكل ، شفافة ، قطرها 5.5-7.5مايكرون. شكل (4-16).

جميع هذه الصفات التي ذكرت مطابقة لما ذكر (Simmons,1986). يشبه جنس هذا النوع جنس *Ulochladium* لكن الاختلاف بالمظهر الذي تعطيه الحواجز الطولية والعرضية في الكونيدات حيث تعطي لهذا النوع مظهر رقم 8 (Carmen, 2017). أيضا يشبه الجنس

Alternaria ويختلف عنه في كون كونيداتة لا تترتب في سلاسل والحامل الكونيدي يحمل كونيدات مفردة (Simmons, 1986) . وقد أشار(2017) Woudenbery *et al.* بأن أعتماد الصفات المظهرية وحدها دون الطرق الجزيئية يجعل من الصعب تحديد الأنواع التابعة لهذا الجنس، يطلق علية قديما أسم (Pers and Rabenh, 1857) *Pleospora herbarum* .



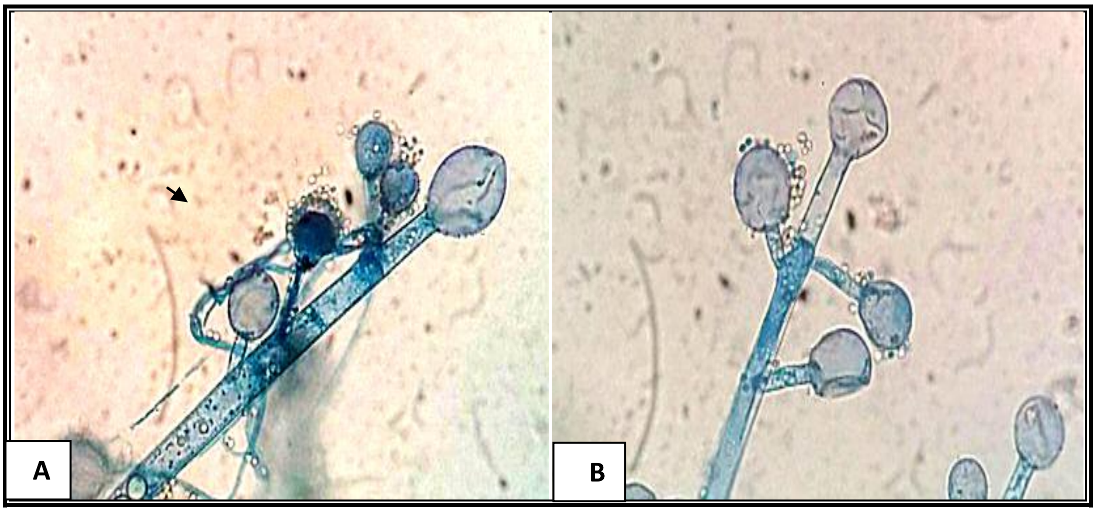
الشكل (4-16) كونيدات الفطر *Stemphylium herbaryum* :A الكونيدات 1- الفتية (السهم) 2- الناضجة (السهم) :B الأبواغ الكلاميدية

17- *Syncephalastrum racemosum* Cohn, Kryptogamen-Flora von Schlesien 3-1(2):217 (1886)

المستعمرات قطنية ، رمادية ، مرتفعة قليلا عن الطبق ، تنمو في غضون 4-5 أيام . الخيوط الفطرية غير مقسمه ، عريضة ، شفافة ، سمكها 5-10 .حامل الحافظة البوغية قائم ، غير مقسم ، متفرع ، شفاف ، بطول أكثر من 1000 مايكرون ، سمكه 6.5-9.5 مايكرون ، يحمل كل فرع في نهايته حويصلة كروية الشكل ، شفافة ، قطرها 15-50 مايكرون ، وحافظة بوغية يطلق عليها Merosporongia مرتبة على الحويصلة بهيئة تراكيب تشبه الأصابع Finger like أنبوبية الشكل ، رمادية اللون ، أبعادها 12-40 × 4-6 مايكرون ، تترتب الأبواغ والتي يطلق عليها merospores في داخلها بشكل سلسلة مكونة من 3-18، الأبواغ دائرية الشكل ، ذات لون رمادي شاحب ، قطرها 2.5-4.5 مايكرون، نادرا ما يكون هذا النوع أشباه جذورRhizoid.شكل (4-17)

هذا النوع تم عزلة لأول مرة في العراق من التربة الملوثة بالنفط الخام .

هذا الوصف مطابق لما تم وصفة من قبل Schroter (1886) ، ويعتبر جنس*Syncephalastrum* الوحيد لعائلة Syncephalastraceae التابعة لرتبة Mucorales وتم عزلة إضافة إلى التربة الملوثة بالنفط من أماكن أخرى مثل المواد النباتية Rao *et al.*, (2007



شكل (4-17) الفطر A*Syncephalastrum racemosum*: الحافظة البوغية، B : حامل الحافظة البوغية Sporangiophore .

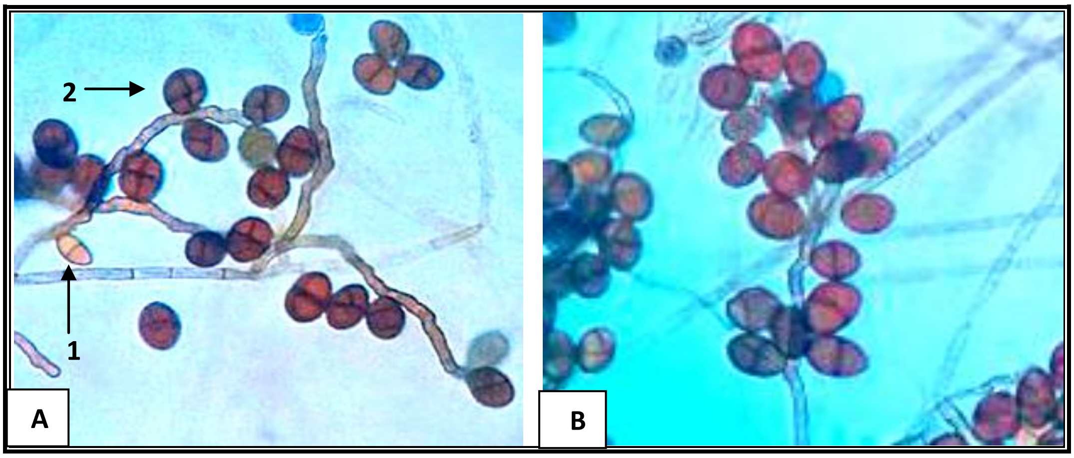
18-*Ulocladium botrytis* (preuss.) Published in: Preuss. In:Linnaea 24:111(1851).

المستعمرات قطنية ، زيتونية ألى خضراء ، ذات حواف غير منتظمة ،تنمو في غضون 7-5ايام . الخيوط الفطرية مقسمة ، ذات لون أخضر داكن ، سمكها 2-5 مايكرون . الحامل الكونيدي قائم ، بسيط أو متفرع قليلا، أخضر اللون، أبعادة 25-75× 3-4 مايكرون ، يحمل من واحدة إلى عدة كونيدات على القمة وفي الجوانب ، غير الناضجة منها في القمة ، بيضوية الشكل ، شفافة ، أبعادها 10-15 × 3-5 مايكرون ، الكونيدات الناضجة بيضوية إلى كروية الشكل ، ذهبية ألى خضراء اللون ، أبعادها 20-40 × 12-15 مايكرون ، تحوي على حواجز ، الطولية عددها 1-2 عرضية عددها 1-3 شكل (4-18).

هذا الفطر عزل لأول مرة من التربة الملوثة بالنفط الخام في العراق

جميع الصفات أعلاه تتفق لهذه العزلة ما تم ذكره من قبل Preuss (1851) ، يختلف جنس هذا النوع عن جنس*Stemphylium* من خلال حجم وشكل الكونيدات و مظهرها الذي تعطيه

الحواجز العرضية والطولية وعددها ، فتعطي تلك الحواجز لكونيدات جنس *Uolochladium* شكل حرف Y (Carmen, 2017) بينما أنواع هذا الجنس تختلف فيما بينها من خلال حجم الكونيدات وسطحها أملس أو خشن وشكلها ولونها حيث أن هذا النوع تميل كونيداته للشكل البيضوي وليس الكروي ولونها الذهبي ، يطلق على هذا النوع حاليا أسم *Alternaria botrytis* (Woudenberg *et al*., 2013)



شكل(4-18): تراكيب الفطر A : *Ulocladium botrytis* الكونيدات 1-الكونيدات غير الناضجة (السهم) ، 2- الكونيدات الناضجة (السهم) , B : ترتيب الكونيدات على الحامل الكونيدي .

4-2-التحليل الفيزيائي للتربة الملوثة بالنفط الخام

أوضحت نتائج قياس التحليل الفيزيائي لعينات التربة الملوثة بالنفط الخام أن جميعها ضمن الحدود الطبيعية الملائمة لنمو الفطريات وكالتالي :

4-2-1- الأس الهيدروجيني pH

أظهرت نتائج قياس الأس الهيدروجيني (pH) للتربة الملوثة بالنفط الخام في هذه الدراسة قيماً تراوحت بين 6.4-7.3 أي أنها تميل إلى الحمضية الضعيفة والقاعدية الضعيفة ، (جدول 4-1).

يعبر عن الأس الهيدروجيني بتركيز أيونات الهيدروجين (Addy *et al*., 2004) ، وبمقارنة هذه القيم لهذه الدراسة نجدها مناسبة لنمو الفطريات حيث أن أغلبها تفضل مستوى من الأس الهيدروجيني ضمن درجة الحموضة وقد وجد Bijay *et al*.(2012) بأن النمو الأمثل للفطريات يقع ضمن حدود بين 5.5-8.8 ، وقد ذكر Rousk *et al*., (2010) بأن لكل نوع فطري مدى معين من الأس الهيدروجيني يكون ملائم للنمو، لكن مع ذلك فأن جميع الفطريات

تفضل النمو في الوسط ألحامضي وكلما كان الوسط الذي تنمو فيه ذو قاعدية عالية فأن أعدادها سوف تقل .

يعد الأس الهيدروجيني عاملاً محدداً لنمو الفطريات من خلال تأثيره على نفاذية الايونات التي تحتاجها لغرض النمو فقد وجد بأن أفضل نفاذية تكون ضمن الحدود التي يكون فيها pH حامضياً (خالد واخرون 2018) ، إضافة إلى ذلك يعتبر الأس الهيدروجيني من محددات المعالجة البايلوجية للنفط الخام من خلال تأثيره على إفراز الإنزيمات المهمة لتحلل النفط حيث ان لكل فطر مدى من pH يستطيع من خلاله إفراز أنزيم معين (Crognale *et al*., 2019) .

4-2-2- المحتوى المائي Water Content

أظهرت نتائج قياس المحتوى المائي لعينات التربة الملوثة بالنفط الخام قيماً تراوحت نسبتها 62 %-88% وتعتبر هذه القيم ملائمة لنمو الفطريات في التربة، (جدول4-1).

يعد المحتوى المائي من محددات النمو في التربة حيث وجد أن أغلبها تفضل محتوى مائي بين 75-100% وهذا ما أكده Shahgholi (2014). وقد وجد Sarma *et al*. (2016) بأن قدرة الفطريات على الاحتفاظ بالماء أو وجود مستوى معين منه يعتبر من العوامل المحددة لنموها يأتي ذلك من خلال تأثير الماء على انتشار المواد وذوبانها فالكثير من المركبات التي تستهلكها تلك الإحياء تحتاج للماء لأذابتها ، وقد وجد Yuan *et al*. (2001) بأن محتوى المائي المنخفض يمكن أن يثبط نمو الفطريات في البيئات الموجودة فيها .

4-2-3-التوصيلية الكهربائية Electrical Conductivity

أظهرت نتائج قياس التوصيلية الكهربائية لعينات التربة معدلات تراوحت بين 41.1-190.4 مليموز/سم (جدول 4-1).

التوصيلية الكهربائية تعني مقدار الأملاح الذائبة والموجودة في التربة ، وتعتبر من الصفات التي تعزز من وجود ونمو الأحياء المجهرية في التربة , حيث وجد Rateb and Abel (2011) بأن إضافة كلوريد الصوديوم إلى الوسط ألزرعي الخاص بتنمية أنواع من جنس *Penicillium* يؤدي إلى تعزيز نموها بالمقارنة بالوسط الذي لا يحتوي على هذا الملح ، ولكن المحتوى الملحي العالي يمكن أن يؤثر سلبا على نمو تلك الأحياء ومن الممكن أن يثبط نموها على النقيض من المحتوى الملحي المنخفض والذي من شأنه أن يحسن من أمكانية وصول

الفطريات للمواد العضوية الموجودة في التربة وهذا ما أشار أليه(2008)Muhammad *et al*. وتعد الملوحة من العوامل المهمة و المحددة للتواجد الفطري في كل البيئات فهي تؤثر على انتشارها وتوزيعها (السعدي، 2006)

بشكل عام تتأثر جميع الأحياء المجهرية الموجودة في التربة وخاصة الفطريات بالخصائص الفيزيائية للتربة مثل الأس الهيدروجيني والمحتوى المائي والتوصيلية الكهربائية ،حيث أن الظروف المثلى لتلك الخصائص تلعب دور مهم بالنسبة لدور الفطريات وأهميتها في التربة وخاصة في معالجة الملوثات النفطية يأتي ذلك من خلال تأثيرها على نمو الفطريات ونشاطها الأنزيمي (Chaudury *et al*., 2005)

جدول (4-1) قيم الأس الهيدروجيني والتوصيلية والرطوبة للعينات التربة الملوثة بالنفط في محافظة ميسان

ت	خصائص التربة	القيم
1-	PH	6.4-7.3
2-	Water Content	62 % - 88%
3-	Electrical Conductivity	41.1-190.4 ms/cm

4-3- دراسة مسحية للفطريات المعزولة من التربة الملوثة بالنفط الخام

بلغ المجموع الكلي لعدد العزلات خلال الدراسة 235عزلة فطرية تم عزلها من 120عينة جمعت خلال الدراسة من الترب الملوثة بالنفط الخام وكانت جميع العينات المفحوصة والمشخصة حاوية على فطريات

لقد تم عزل وتشخيص27 نوعاً الفطريات المتواجدة في التربة الملوثة بالنفط الخام في محافظة ميسان ، وقد بينت النتائج التي تم التوصل أليها والموضحة في الجدول (4-2) بأن أغلب الفطريات المعزولة خلال الدراسة كانت تابعة للفطريات الكيسية Ascomycota وكانت ممثلة بالحالة اللاجنسية Anomorphic وقد بلغ عدد أنواعها 24 وبنسبة بلغت 88.8 % و الفطريات اللاقحية Zygomcota بنسبة بلغت 11.2% حيث تم عزل 3 أنواع فقط ، فيما تم عزل

وتشخيص ثمان أنواع لأول مرة من التربة الملوثة بالنفط الخام في العراق هي و *Alternaria tenuisima* و *Bipolaris austeralinsis* و *Curvularia lunata* و *Nigrospora oryzae* و*Rhizopus oryzae* و*Stachybotrys chartarum* و *Syncephalastrum raceosum* و*Ulocladium botrytis* وتم عزل جميع الفطريات باستخدام بطريقة الزرع المباشر Direct Culture..

تم عزل 16جنس خلال الدراسة هي *Aspergillus* بعدد أنواع بلغ 6 هي (*A.niger* وعدد عزلات 51 و *A.terreus* 12عزلة و *A.flavus* 8 عزلات و *A.versicolor* و *A.nidulans* بثلاث عزلات لكل منهما و *A.fumigatus* عزلة واحدة) ، تلاه الجنس *Alternaria* بأربعة أنواع هي (*A.alternata* بعدد عزلات بلغ 47 و *A.chlamydospora* 9 عزلات و *A.citri* و *A.tenuissima* 4 عزلات لكل منها) ، ثم الأجناس *Bibolaris* و*penicillium* و *Ulocladium* بنوعين لكل منها وبلغ عدد عزلات *B.australeinsis* 4 عزلات و *B.sacchari* عزلة واحده و *P.janthinellum* 9 عزلات و *p.lanosum* 17 عزلة و 2 *U.atrum* و 12 عزلة *U.botrytis* . أما الأجناس *Nigrospora* و *Fusarium* و *Curvularia* و *Rhizopus* و *Syncephalastrum* و *Mucor* و *Stemphylium* و *Cladosporium* و*Stachybotrys* و *Phoma* و*Exserohilum* ظهرت ممثلة بنوع واحد فقط لكل منها . وتشير النتائج إلى أن أنواع جنس *Aspergillus* الأكثر ظهوراً تلاه أنواع جنس *Alternaria* .

تشير النتائج والمبينة في جدول (4-2) بأن الأنواع المعزولة أعطت نسبة ظهور وتردد متباينة عن بعضها البعض فقد جاء الفطر *A.niger* بأعلى نسبه ظهور بلغت 42.5 % وتردد 21.70 %، تلاه الفطر *A.alternata* بنسبة ظهور39.16 % وتردد 20 % ، ثم *Rhizopus oryzae* بنسبة ظهور بلغت 17.5% وتردد8.93% .

أما الفطر *P.lanusum* فقد بلغت نسبة ظهوره 14.16 % وتردده 7.23 % والفطر *C.cladosporioids* بنسبة ظهور بلغت 11.66 % وتردد 5.95 % أما النوعين *Aspergillus terreus* و *Ulocladium botrytis* فقد ظهرا بنسبة 10% وبتردد بلغت 5.10 % ، أما الفطرين *P.janthinellum* و *A.chlamydospora* فقد كانت نسبة ظهورهما 7.5 % وبتردد بلغ 3.82 % و الفطر *A.flavus* فقد كانت نسبه ظهوره 6.66 % وتردده

3.40 %. أما بقية الأنواع فلوحظ أنها كانت قليلة الظهور والتردد وتراوحت نسبة ظهورها 0.83--3.33 % وبتردد يتراوح بين 0.42 %- 1.70% .

جدول (2-4) نسب تردد وظهور الفطريات المعزولة على وسط PDA من التربة الملوثة بالنفط الخام

الأنواع الفطرية	عددالعزلات	نسبة الظهور %	نسبة التردد %
Ascomycota			
Alternaria alternata	47	39.16	20
A. chlamydospora	9	7.5	3.82
A.citri	4	3.33	1.70
A.tenuissima	4	3.33	1.70
Aspergillus flavus	8	6.66	3.40
A.fumigatus	1	0.83	0.42
A.niger	51	42.5	21.70
A.nidulans	3	2.5	1.27
A.terreus	12	10	5.10
A.versicolor	3	2.5	1.27
Bipolaris australinsis	4	3.33	1.70
B.saccharia	1	0.83	0.42
Cladosporium cladosporioides	14	11.66	5.95
Curvularia lunata	2	1.66	0.85

Exserohilum holmii	3	2.5	1.27
Fusarium soloni	1	0.83	0.42
Nigrospora oryzae	1	0.83	0.42
Penicillium janthinellum	9	7.5	3.82
p.lanosum	17	14.16	7.23
Phoma glomerata	1	0.83	0.42
Stachybotrys chartarum	1	0.83	0.42
Stemphylium herbarum	1	0.83	0.42
Ulocladium atrum	2	1.66	0.85
U.botrytis	12	10	5.10
Zygomycota			
Rhizopus oryaae	21	17.5	8.93
Syncephalastrum racemosum	1	0.83	0.42
Mucor plumbeus	2	1.66	0.85
Total	235		

أن نتائج الدراسة الحالية أظهرت بأن أغلب الفطريات التي تم عزلها كانت للفطريات الكيسية Ascomycota ممثلة بالحالة اللاجنسية Anomorphic وكانت ضمن مجموعتين هما Hyaline hyphomycetes التي تتميز بلونها الشفاف والزاهي مثل جنس *Aspergillus* ومجموعة Dematiaceous hyphomycetes ذات الكونيدات الداكنة كجنس *Alternaria* (عبد الله، 2015) ، و تعتبر شعبة الفطريات الكيسية من أكثر الشعب الفطرية تواجداً وانتشاراً

في التربة وسوى كانت تلك التربة ملوثة أو غير ملوثة بالنفط الخام وتملك أدوار بيئية مختلفة في تلك البيئات (Hawksworth, 2012; Torn and Lynch, 2007).

أن ظهور الفطريات الكيسية وبحالتها اللاجنسية بنسبة عالية خلال الدراسة الحالية راجع إلى أسباب عديدة من أهمها امتلاكها لنظام أنزيمي فعال و قادر على تحلل الكثير من المواد العضوية الموجودة في التربة وخاصة مكونات النفط الخام ، وإنتاجها للعديد من الوحدات التكاثرية التي بإمكانها أن تنتشر بسهولة بالماء والهواء والتربة ، وقدرتها على التكيف بسهولة عند تعرضها لظروف بيئية قاسية جداً كندرة المغذيات حيث تميزت بأن لها القدرة على تكوين تراكيب متعددة من خلالها تستطيع التغلب على الظروف الصعبة (Durairaj *et al*., 2016).

أن من بين الأجناس والتي ظهرت بنسبة عالية في هذه الدراسة هي أجناس *Aspergillus* ومن أنواعه الذي ظهر بتردد عالي هو*A.niger* (جدول 4-2) ، وقد اتفق ذلك مع دراسة الطائي واخرون (2016) التي تضمنت عزل فطريات من الترب القريبة من مصفى النجف كان من بين الفطريات الأكثر تردداً هذا الفطر ، وجنس *Alternaria* ممثلا بالفطر*A.alternata* وجاء متفقا مع دراسة (Chaudhary *et al*., 2012) .

يعود ظهور الأجناس والأنواع التابعة للفطريات الكيسية وبالحالة اللاجنسية بصورة أكبر من باقي الفطريات في هذه الدراسة إلى أسباب عديدة منها قدرتها الكبيرة على استغلال واستعمال النفط الخام كمصدر غذائي وحيد لنمو والتكاثر (Dossary *et al*., 2019) ، يأتي ذلك من خلال امتلاكها لنظام أنزيمي فعال وقادر على تحليل الكثير من المواد العضوية الموجودة في التربة مثل مكونات النفط الخام وتحويلها إلى مواد أبسط يسهل أخذها من قبل الفطريات وتكون مهمة لتغذيتها (Olukunle and Oyegoke, 2016) ، فالفطر *A.niger* يفرز أنزيمات متعددة مثل Cytochrome p-450 monooxygenase و Peroxdase وLaccase تعتبر هذه من الإنزيمات المحللة للنفط الخام (Durairaj *et at*., 2016 ; Sabah *et al*., 2016).

أن من الأسباب الاخرى التي أدت إلى ظهور هذه الفطريات في الدراسة الحالية هي قدرتها الكبيرة على التكيف مع الظروف الصعبة مثل قلة الغذاء والظروف البيئية القاسية والتعرض لأقصى درجات الإشعاع والمواد الكيميائية السامة والملوثات مثل النفط الخام (Moye, 2003) جاء ذلك من خلال مجموعة من الوسائل والآليات منها أنتاجها للعديد من الوحدات التكاثرية اللاجنسية التي بإمكانها الانتشار بسهولة بالماء والهواء وتصل إلى التربة، وأيضا سمك جدران

خلاياها وتكوينها لتراكيب مقاومة والابواغ الكلاميدية والابواغ الساكنة ;Dehong, 2014 (Adelowo *et al*., 2015 ; Aimeur *et al*., 2016)، وكذلك تستطيع النمو في ظروف معاكسه فيما يخص درجات الحرارة والاس الهايدروجيني ومحتوى مائي (Smits, 1998) .

أن أنتاج المضادات الحيوية والسموم من قبل الأنواع الفطرية كوسيلة دفاعيه لها وبالتالي التنافس مع الفطريات الأخرى الموجودة في نفس البيئة ربما يكون هذا سبباً أخر الفطريات (Serna- Chavez *et al*., 2013) .

أشارت نتائج الدراسة الحالية إلى زيادة ملحوظة في أعداد الأجناس و الأنواع الداكنة المعزولة من التربة الملوثة بالنفط الخام مثل *A.alternata* و *U. botrytis* بالحالة اللاجنسية ربما كان السبب انتشارها هو أنتاجها لصبغة الميلانين في الجزء الخارجي لجدران خلاياها التكاثرية مثل الكونيدات حيث تعطي هذه الصبغة المظهر الداكن لتلك الوحدات ومن الممكن أن تجعلها هذه الصبغات أكثر مقاومه للظروف الصعبة (Mosher *et al*., 2006) .

أما الفطريات اللاقحية فقد ظهرت في الدراسة الحالية بنسبة11.11% وهي ممثلة بالأجناس *Rhizopus* و *Syncephalostrum* و *Mucor* وبنوع واحد لكل منها (جدول 4-2) ، ولقد كانت نسبة ظهورها اقل من الفطريات الكيسية بالحالة اللاجنسية وهذا أتفق مع الدراسة التي أجراها أبو الغيث (2020) حيث تمكن من عزل أنواع من *Apergillus* وكانت متفوقة على أنواع من الجنس *Rhizopus* المعزوله من التربة الملوثة بالنفط في مناطق من ليبيا، وأيضاً يتفق مع دراسة (2017) Islam في الهند والذي تمكن من عزل 20 نوع فطري كانت اغلبها للجنس *Aspergillus* وكان من بينها أنواع تابعة للجنس *Rhizopus ,Mucor*.

أحد الأسباب التي أدت إلى ظهور الفطريات اللاقحية بنسبة أقل هو ربما أن النظام الأنزيمي الذي تمتلكه ذو فعالية اقل وبالتالي من الصعب عليها المنافسة مع الفطريات التي تمتلك نظام أنزيمي أكثر فعالية في تحليله للمواد العضوية وخاصة عندما تكون المغذيات قليلة ونادرة في البيئة (Bonugli, 2015) ، وأن هذا الفطريات تستطيع النمو بسرعة كبيرة جدا عندما تكون المغذيات متوفرة ولكن سرعان ما يتلاشى نموها عند نفاذه(Cajthaml *et al*., 2008 ; Singh *et al*., 2012) .

أن الأنواع التي ظهرت بنسب تردد وظهور قليلة في هذه الدراسة ربما كانت أسباب ذلك بأنها تحتاج إلى فترة حضانة أطول لكي تنمو وتظهر على الوسط ألزرعي و قد تكون التربة الملوثة

بالنفط الخام سامة وغير ملائمة لها أو ربما يكون الوسط المستخدم في عزلها و تنميتها غير ملائم والتي ربما كانت موجودة في عينات التربة المزروعة (عبود، 2018) .

أما الفطريات البازيدية Basidomycota فلم يسجل أي نوع فطري لها في هذه الدراسة وهذا لا يعني أنها غير موجودة في التربة الملوثة بالنفط ولكن يمكن أن يكون السبب في عدم ظهورها أنها تحتاج إلى وسط زرعي خاص لعزلها وتنميتها يختلف عن الأوساط المستخدمة لعزل الفطريات الاخرى (Lundell *et al*., 2011).

وجاءت نتائج الدراسة الحالية لعزل بعض الفطريات من التربة الملوثة بالنفط الخام متقاربة مع عدد من الدراسات حيث تمكن Flayih and Jawharia (2014) من عزل الاجناس *Alternaria* و *Aspergillus* و*Fusarium*. وتمكن Dawoody (2015) من عزل اجناس عديدة كان من بينها *Rhizopus*، وقامت الفريجي (2016) بعزل الفطريات *A.niger* و *A.flavus* و *A.terreus* و*Mucor sp* و *Penicillium sp*. وأستطاعت Mohsenzadeh (2012) من عزل الفطريات *U.atrum* و *A. alternata* و *F.soloni* و *A.flavus* و *P.natatum* .

4-4- قابلية بعض الفطريات المعزولة خلال الدراسة على أنتاج ألأنزيمات

اختيرت (10) أنواع فطرية معزولة خلال الدراسة لغرض دراسة قابليتها على أنتاج أنزيمات Lipase و Laccase و Phytase و Xylanase و Protease ، جاء اختيار هذه الأنواع باعتبارها الأكثر تردداً وظهوراً جدول (4-3).

أظهرت جميع الفطريات قابلية على إفراز أنزيم Lipase عدا الفطر *B.sacchari* تلاه أنزيم Xylanase فقد تم إفرازه من جميع الفطريات عدا الفطرين *C.lunata* و *R.oryzae* أما أنزيم Protease فقد أظهرت غالبية الفطريات قدرة على إفرازه عدا الفطريات *A.alternata* و *A.nidulans* و *C.lunata* بينما أظهرت الفطريات قابلية متفاوتة على إفراز أنزيمي Phytase و Laccase .

وجد من خلال النتائج التي توصلت أليها هذه الدراسة بأن قابلية الفطريات المختبرة على أنتاج أنزيمات تختلف باختلاف الأنواع الفطرية ، والتي أظهرت اختلافاً وتبايناً في قابليها على الإفراز

في الأوساط المخصصة بكل أنزيم حيث تمكن بعضها من إفراز الإنزيمات بينما لم يستطع الأخر من أنتاجها.

جدول (3-4) قابلية بعض الفطريات المعزولة من التربة الملوثة بالنفط على إنتاج الإنزيمات

أسم الفطر	الإنزيمات				
	Lipase	Phytase	Laccase	Xylanas	Protease
A. alternata	+	–	+	+	–
A. chlamydospora	+	–	–	+	+
A.tenuissima	+	+	+	+	+
A. nidulans	+	–	–	+	–
A.niger	+	+	+	+	+
B.sacchari	–	–	–	+	+
C. cladosporioides	+	+	+	+	+
C.lunata	+	+	–	–	–
R.oryzae	+	–	–	–	+
U.botrytis	+	–	–	+	+

(+)Present ,(-)Absent

أشارت نتائج الدراسة بأن الفطريات *A.niger* و *A. tenuissima* و *C.cladosporioides* كانت لها القابلية على إفراز جميع الإنزيمات المدروسة بينما أظهر الفطر *A.alternata* إفراز لثلاث أنزيمات هي Laccase و Xylanase و Lipase في حين وجد أن الفطريات *A.clamydospora* و *U.botrytis* أظهرت قدرة على إفراز الأنزيمات Lipase و

أما الفطر *A. nidulans* أظهر إفراز لأنزيم Lipase و Xylanase و Protease فيما تمكن الفطر *C. lunata* من افرز انزيمي Lipase و Phytase والفطر *B. saccharia* تمكن من أفرز أنزيمي Xylanase و Protease أما الفطر *R. oryzea* فأظهر إفراز لأنزيمي Lipase و Protease

أشارت النتائج بأن أنزيم Lipase أفرز من قبل كل الفطريات المختبرة عدا فطر واحد حيث أظهرت تسعة فطريات إفرازا له ، وتم الاستدلال على إفراز الإنزيم من خلال تكون هالة شفافة أو بيضاء حول المستعمرات أو بلورات بيضاء أسفل الوسط دلالة على ترسب وتحلل المواد ألدهنية الموجودة في وسط الاختبار (جدول 4 -3 ، شكل4-19) .

وتعزى الفعالية العالية التي ظهرت عليها الفطريات المختبرة لإنتاج إنزيم Lipase إلى أمكانية إفرازه ضمن حدود واسعة من الأس الهيدروجيني بين 5-11 وتنوع المادة الأساس (Mahmoud *et al*., 2015)، يقوم الإنزيم بتحليل المركبات الدهنية إلى وحدات صغيرة من الأحماض ألدهنية الحرة وبالتالي تتمكن هذه المواد من المرور بسهوله عبر الغشاء البلازمي المحيط بالخلية كمصدر مهم من مصادر الكربون التي تستخدمها الفطريات للحصول على الطاقة ألللازمة (Gopinath *et al*., 2013) . أن إفراز هذا الإنزيم من الفطر *A.niger* جاء متفقا مع دراسة (2016) Mauti ألذي وجد بأن هذا الإنزيم يكون له دور في تحلل المركبات الأروماتية متعددة الحلقات ،أن عدم قدرة الفطر *B.sacchari* على إفراز الإنزيم لا يعني أنه غير قادر على الإفراز ولكن ربما يحتاج إلى فترة حضانة أطول ، أو ربما الإنزيم الذي تم إفرازه غير قادر تحلل المادة الأساس في وسط الاختبار، وتعتبر المغذيات ومصادر الكربون و العوامل الفيزيائية كالحرارة والأس الهيدروجيني والرطوبة عوامل مؤثرة ومحددة لإفراز هذا الإنزيم Abdel-Raheem and Shearer, 2002).

أما انزيم Xylanase فقد أظهرت النتائج بأن ثمانية أنواع لها قابلية على أنتاجة وتم الاستدلال على أنتاج هذا الإنزيم من خلال تكون هالة شفافة بعد عملية التصبيغ بصبغة Congo red دلالة على تحلل المادة الأساس والموجودة في بذور الشوفان المستخدمة كمصدر وحيد للكربون (جدول 3-4 شكل4-20).

ويعتبر Xylanase واحدا من أهم أنزيمات التحلل المائي لخارج خلوية التي تقوم بتحليل Xylane وتحويله إلى سكريات ابسط حاوية الكربون كمصدر للطاقة (Uday *et al*., 2016) .

أن عدم أنتاج إنزيم Xylanase من بعض الأنواع المختبرة ربما كان سببه هو اختلاف المادة الأساس المستخدمة في وسط الاختبار والتي يعمل عليها الإنزيم ربما كانت ملائمة لبعض الأنواع وغير ملائمة لأنواع أخرى فهناك العديد من المواد الأساس التي تحفز إفراز هذا الإنزيم ومنها الذرة والشوفان وقصب السكر(Oliveira *et al*., 2006) ، وقد أشار(Sharma (2011 إلى أن قشور الرز كانت محفزات جيدة لهذا الإنزيم ، لذلك فـأن استخدام مصادر كربون متنوعة يلعب دور مهم في أنتاج هذا الإنزيم ، وقد تكون فترة الحضانة غير كافية لإفراز هذا الإنزيم Gupta (*et al*., 2009) . فقد وجد Antoine *et al*. (2010) بأن فتره الحضانة عامل مهم ومحدد لإنتاج هذا الإنزيم ، أضافه إلى ذلك فأن نوع السلالة والعوامل الفيزيائية والتركيب الجيني قد تلعب دور مهم في إنتاج هذا الإنزيم (Dhiman, 2008).

أظهرت النتائج بأن سبعة فطريات تمكنت من إفراز أنزيم Protease وتم الاستدلال على إفراز هذا الإنزيم من خلال تكون هالة شفافة دلالة على تحلل المادة الأساس (الجدول 4-3 الشكل 4-21) .

تحتاج الفطريات إلى النتروجين كمصدر ثان من مصادر الغذاء اللازمة للنمو بعد الكربون ، حيث يقوم هذا الإنزيم بتحليل البروتينات إلى وحدات اصغر من الأحماض الامينية التي تحتوي على النتروجين في تركيبها ، وهذا يفسر أهمية إفراز أنزيم Protease من قبل الأنواع المختبرة أما الأنواع التي لم تتمكن من إفراز هذا الأنزيم لا يعني أنها لا تنتجه بشكل نهائي فربما أفرازة يتأثر بعدد من العوامل والتي من أهمها درجه الحرارة والأس الهيدروجيني وفترة الحضانة التي تعتبر عامل محدد لإنتاج الإنزيم والتي تختلف من فطر إلى أخر(Bhati *et al*., 2007) . وتعتبر مصادر الكربون المختلفة والقابلة للتمثيل الغذائي مثبطات لهذا الإنزيم حيث أكد Geisseler and Horwath (2008) أن مستوى إفراز الإنزيم يزداد عندما تكون هناك مستويات منخفضة من الكربون، لذلك فوجوده في وسط الاختبار يكون له تأثير سلبي على أنتاج الإنزيم (Kimura and Tsuchiya, 1982) .

أما أنزيم Laccase فقد تمكنت أربعة أنواع فطرية فقط من إفرازه وتم الاستدلال على قابلية الأنواع المختبرة على الإفراز من خلال تكون هالة بيضاء أو صفراء دلالة على أن الإنزيم لا يحتوي على ذرات النحاس الزرقاء لأنه وجود مثل هذه الذرات يعطي هالة زرقاء والتي لم تظهر في الأنواع المختبرة ، أن تكون الهالة دلالة على أكسدة المادة الأساس التي يعمل عليها الإنزيم وهي Alpha Naphthol (جدول 4-3 شكل 4-22) .

أن أنزيم Laccase له دور في تحطيم المركبات الأروماتية وهذا ما أكده Silva *et al.* (2009) أن عدم قدرة أغلب الأنواع الفطرية المختبرة على أنتاج الإنزيم ربما يعود سبب ذلك إلى اختلاف طبيعة الوسط والذي ربما قد يكون ملائم فقط للفطريات التي تحوي على ذرات النحاس الزرقاء في تركيبة وبالتالي فأن هذه الفطريات سوف تفرز هذا الإنزيم وتكون هالة زرقاء في نفس الوقت قد يكون غير ملائم للفطريات الاخرى التي لا تحتوي على تلك الذرات وبالتالي تكون غير قادرة على إفراز الأنزيم ، أو قد يحث العكس لذلك يجب أن تكون هذه الأوساط ملائمة لكل نوع (Brijwani *et al.,* 2010; Aber *et al.*, 2015; Sette, 2008)

وقد وجد Vasconcelos *et al* (2000) بأن إنزيم Laccase يفرز بتركيزات قليلة جدا من قبل الفطريات المنتجة أي أن الفطريات المختبرة في هذه الدراسة ربما كانت قادرة على إفراز الإنزيم لكن لم تظهر الهالة بشكل واضح بسب قلة تركيزه ، وقد وجد بعض الباحثين بأن إضافة بعض المكملات الغذائية في أوساط الاختبار من شأنه أن يحفز زيادة إفراز الإنزيم فقد أكد Neifar *et al.* (2009) بأن أضافه النحاس بتركيزات قليلة من شأنه أن يحفز إنتاج الإنزيم وهذا ما أشار إليه أيضاً Ali *et al.*(2015) الذي وجد بأن أنتاج هذا الإنزيم يزداد بنسبة 122 % عند إضافة كبريتات النحاس($CuSO_4$) إلى الوسط المستخدم في أنتاج هذا الإنزيم بواسطة الفطر *A. flavus* . ينتج هذا الأنزيم بالدرجة الأولى من قبل الفطريات البازيدية ولكون أغلب الفطريات المختبرة لا تعود إلى هذه الفطريات ربما يعطي ذلك تفسير أخر لقلة إفرازه من قبل الفطريات في هذه الدراسة وهذا ما أكده (Lopez *et al.* 2014) الذي أشار إلى أن الفطريات البازيدية هي منتجات رئيسية في أنتاجه ثم بعد ذلك تأتي الفطريات الكيسية .

وأشارت النتائج بأن أربعة فطريات تمكنت من إفراز أنزيم Phytase ، وتم الاستدلال على إفراز الأنزيم من خلال تكون هالة شفافة حول المستعمرات دلالة على تحلل المادة الأساس في وسط الاختبار وهي Sodium Phytate بواسطة هذا الإنزيم (جدول 4-3 شكل 4-23).

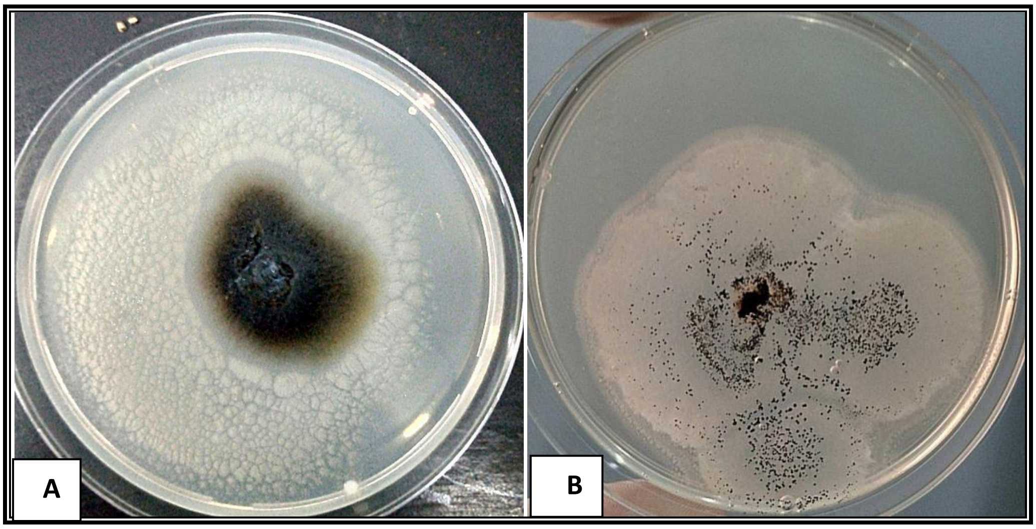
خلال النتائج التي توصلت أليها هذه الدراسة والتي تشير إلى أن قدرة وقابلية بعض الأنواع الفطرية المعزولة من التربة الملوثة بالنفط الخام على أنتاج هذا أنزيم Phytase ربما تدل على وجود علاقة بين أنتاج هذا الإنزيم وتحلل النفط الخام من منطلق بأن التحلل البايلوجي للنفط الخام يعتمد على توافر المغذيات الضرورية لنمو الأحياء المجهرية المحللة ومنها الفطريات وبما أن الفسفور واحد من تلك المغذيات ومحدد للمعالجه البايلوجية (Wang, 2007 ; عبود، 2018) ، لذلك فأن أنتاج هذا الإنزيم والذي يقوم بالتحلل المائي لحامض Phytic acid الموجود في التربة

الملوثة وهو ألشكل المخزن للفوسفات (Soni and Koman, 2009) ، وبذلك سوف يؤدي إلى أطلاق الفوسفات الذي يسرع المعالجة الحيوية للنفط الخام .أضافه إلى ذلك فأن الإحياء المجهرية تحتاج مركبات الفسفور لأنه عنصر ضروري وأساسي ويدخل في بناء وتركيب الوحدات الأساسية لها مثل الأحماض النووية وأيضا في تصنيع الدهون الفوسفاتية Phospholipid في الغشاء الخلوي (Chaineaue *et al.*, 2005; Klionsky *et al.*, 1990).

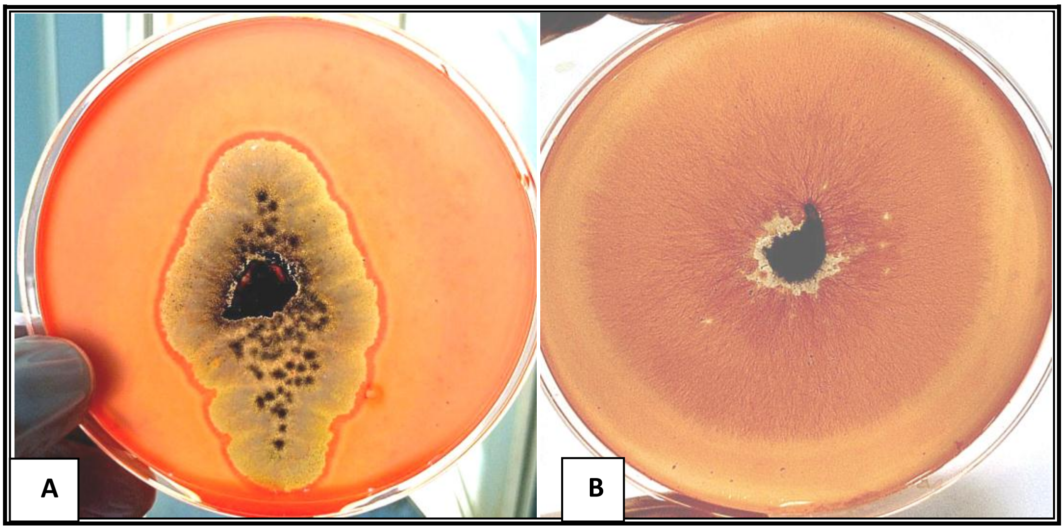
أن عدم قدرة الأنواع على أنتاج وإفراز الإنزيم في هذه الدراسة أتفق مع ما توصل أشار أليه Kumatand and Bhat . (2011) حيث وجد أن عدد قليل من الأنواع الفطرية لها القدرة على إنتاج هذا الإنزيم فقد تمكن في دراسة أجراها من اختبار (161) عزلة على أنتاج هذا الإنزيم فلن تتمكن سوى 33 عزلة فقط من أفرازة.وأتفق أيضا مع ما توصل إليه Lee *et al.* (2005) فقد وجد أن من بين الأنواع المعزولة والمختبرة فلن تتمكن سوى (5) أنواع فقط من أفرازة.

أن من بين ثلاثة فطريات في هذه الدراسة استطاعت أن تفرز جميع الإنزيمات هو الفطر *A.niger* وهذا يتفق مع العديد من الدراسات حيث وجد Mohmoud *et al.* (2015) أن انزيم Lipase يفرز من هذا الفطر وكان له دور في معالجة التربة الملوثة بالنفط الخام ، ويتفق مع ما توصل إلية Muti (2016) ، وتمكن هذا الفطر من أنتاج أنزيم Phytase وهذا ما أكد Ekunday and Osunia (2013) والذي أشار بأن هذا الفطر قادر على تحلل Phytic Acid وتكوين هالة شفافة ، وقد وجد Jahromi *et al.* (2011) بأن هذا الفطر له القدرة على إفراز أنزيمي Xylanase و Laccase وهذا يتفق مع ما وجده Lawal *et al.*(2010) ، كما أن لهذا الأنزيم قدرة على إفراز Protease وهذا ما أكدة (O'Donnell *et al.*, 2001) .

بشكل عام أن اختلاف الأنواع الفطرية في إفرازها لبعض الإنزيمات وعدم إفرازها لأنزيمات أخرى راجع إلى عدة أسباب منها أن لكل فطر فعالية أنزيمية تختلف عن الأخر اعتمادا على الظروف البيئية وقدرة الفطر على التكيف مع تلك الظروف (Sunitha *et al.*, 2013 ; Patil *et al.*, 2015) . وأن عدم قدره بعض الأنواع الفطرية على أنتاج الأنزيمات هي غير مؤكدة تماما أي لا يعني بأنها غير قادرة على إفرازها بشكل نهائي فربما تمكنت من إفراز الإنزيم لكنه لم يخرج خارج الخلايا ، أو يحتاج إلى حضانة أطول أو الوسط غير ملائم أو تأثر الإفراز بالعوامل البيئية مثل الأس الهيدروجيني ودرجه الحرارة وغيرها (Abdei-Raheem and Sheare, 2002) .

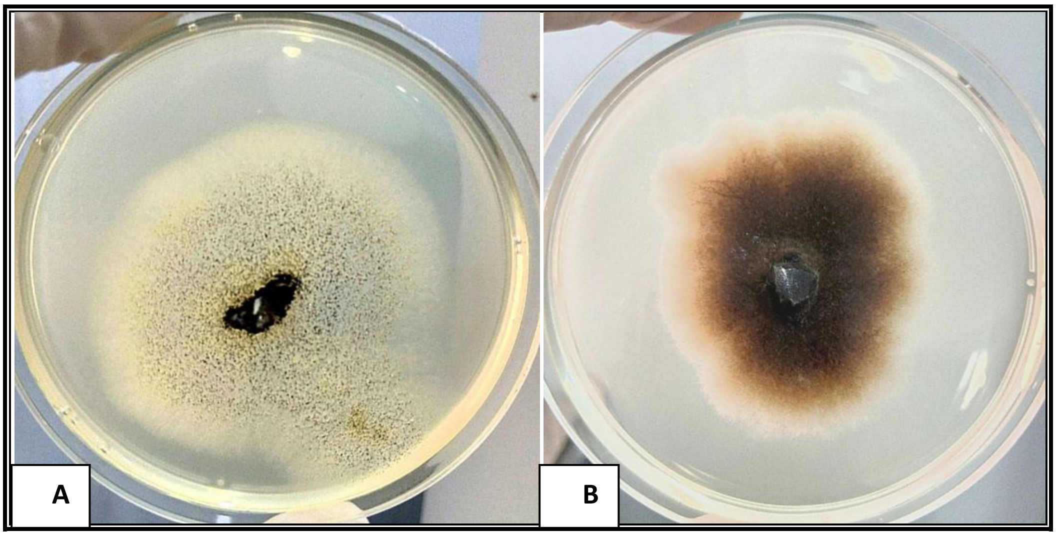


الشكل (19-4) إفراز أنزيم Lipase بواسطة الفطريات A : *Ulocladium botrytis* :و B : *Aspergillus niger*

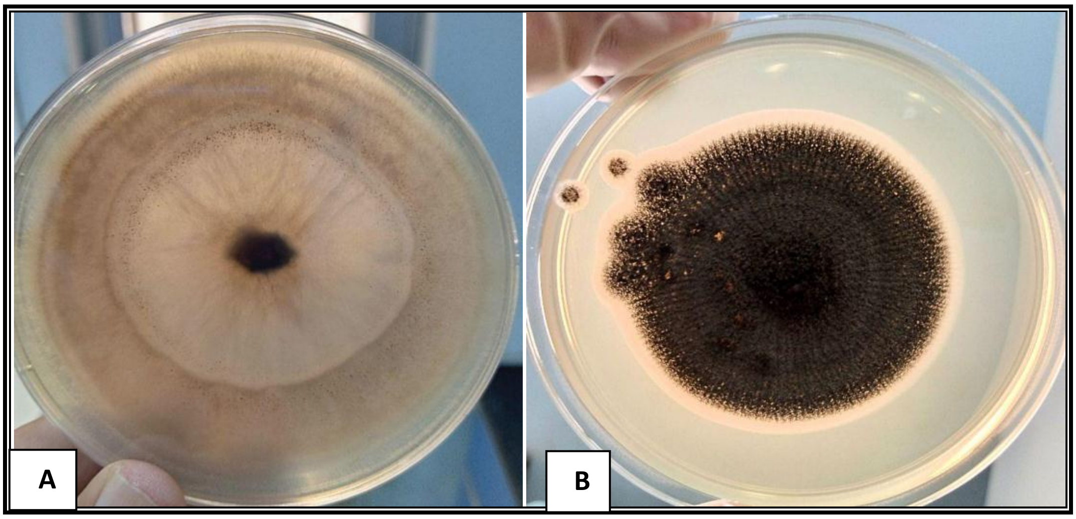


شكل (20-4) إفراز أنزيم Xylanase بواسطة الفطريات A : *Cladosporium cladosporioides*

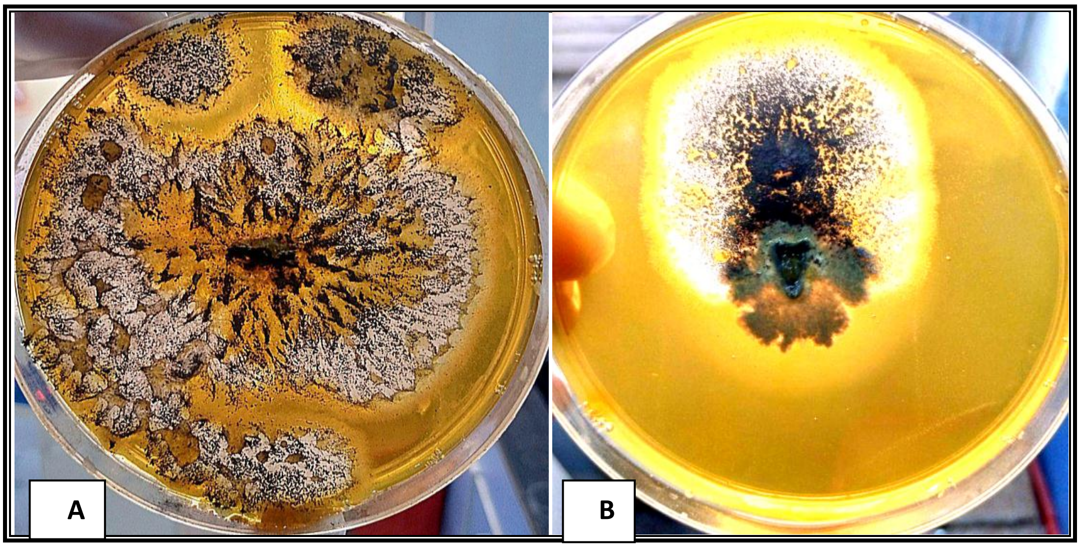
B : *Alternaria chlamydospora*



شكل (4-21) أفراز أنزيم Protease بواسطة الفطريات A:*Aspergillus niger* و B : *Ulocladium botrytis*



Pشكل (4-22) إفراز أنزيم Laccase بواسطة الفطريات A : *Alternaria tenuissima* و B:: *Aspergillus niger*



شكل (4-23) أنتاج أنزيم Phytase بواسطة الفطريات A: *Aspergillus nige* و B: *Alternaria tenuissima*

4-5- قابلية بعض الفطريات المعزولة على تحلل النفط الخام

اختبرت قابلية 8 فطريات والمعزولة من التربة الملوثة بالنفط الخام على قدرتها في تحلل النفط الخام باستخدام وسط الأملاح ألمعدنية (MSM) خلال فترة 7 أيام حضانة ، وأظهرت النتائج أن جميع الفطريات المختبرة كانت لها قابلية على تحليل النفط الخام بالمقارنة مع معامل السيطرة Control ، وقد تراوحت قابليتها على التحلل بين 25-30% و 70-75% ، فقد أظهرت الفطريات *B. saccharia* و *A. niger* و *N. oryzae* و *U.botrytis* و *S. herbarum* و *R. oryzae* نسبة تحلل بلغت 70-75 % بينما أظهرت الفطريات *A.alternata* و *A.terreus* قابلية تحلل بلغت 25-30% الشكل (4-24) الجدول (4-4) .

بعد التأكد من قدرة الفطريات المختبرة على تحلل النفط الخام خلال 7 أيام تم أختبار قدرتها وتكوينها لكتلة حيوية من الغزل الفطري في وسط الأملاح ألمعدنية (MSM) خلال فترة 30 يوم حضانة ، وقد أظهرت النتائج أن كل الفطريات المختبرة كانت قادرة على تحلل النفط بالمقارنة مع معامل السيطرة Control وبمعدلات متقاربة حيث اظهر كل من *S.herbarum* و *A. niger* و *R.oryzae* و *N. oryzae* و *A. Alternata* و *U.botrytis* و *B.sacchari* قابلية تحلل بلغت 70-75% بينما أظهر النوع *A.terreus* قابلية تحلل بلغت 25-30% الشكل (4-25) و الجدول (4-4) .

جدول (4-4) قابلية تحلل النفط الخام بواسطة الفطريات المعزولة خلال 7 ايام و30 يوم

الفطريات ألمحللة للنفط الخام	التحلل الحيوي	
	7 ايام	30 يوم
A. alternata	+	++
A. niger	++	++
A. terreus	+	+
B. saccharia	++	++
N. oryzae	++	++
R. oryzae	++	++
S. herbarum	++	++
U.botrytis	++	++

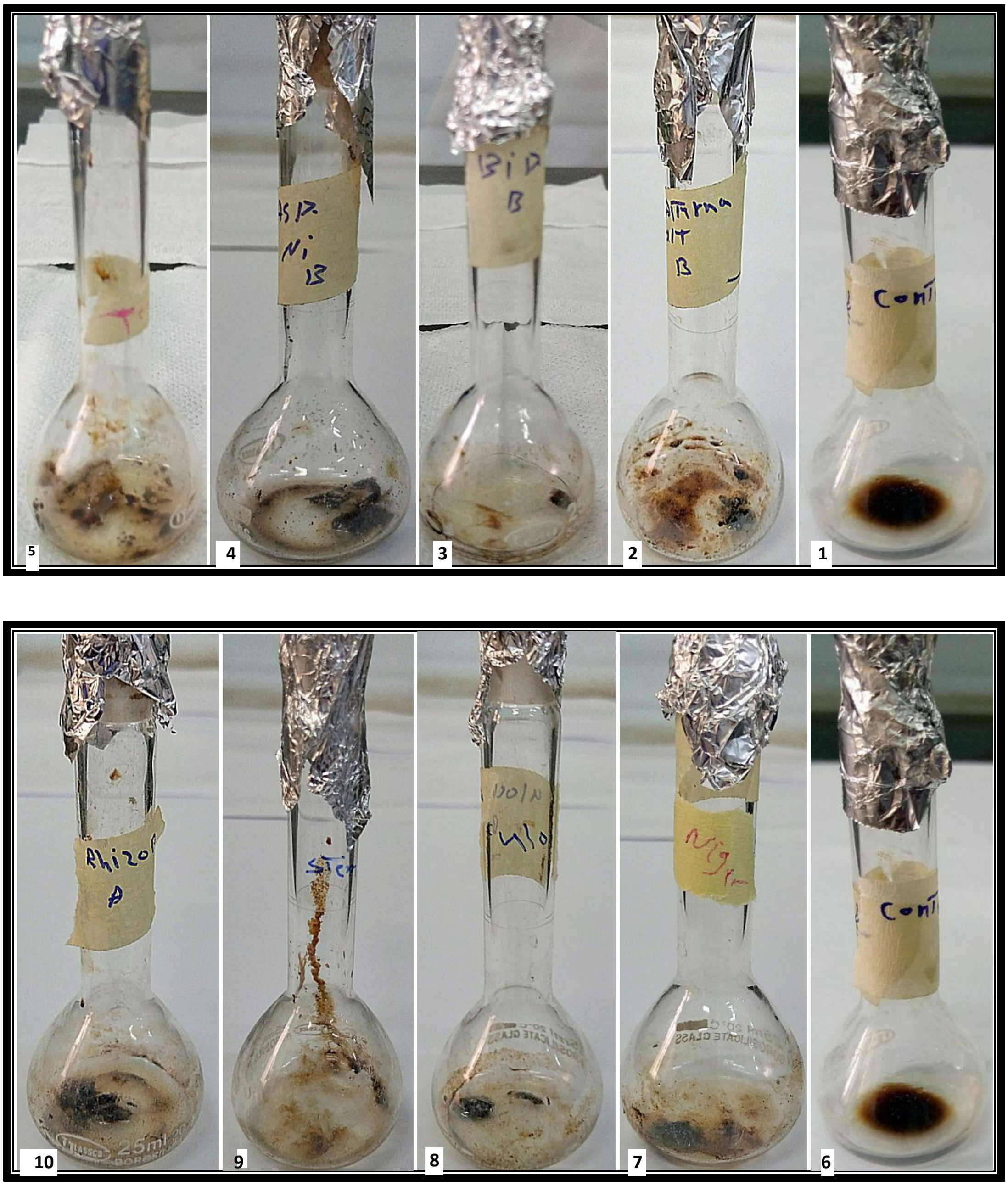
* + قابلية تحلل ضعيفة 25-30 % ، ++ قابلية تحلل عالية 70-75%

وأظهرت نتائج الدراسة بعدم وجود اختلافاً وتبايناً كبيراً في قابليها على تحلل النفط خلال 7 أيام عما هو علية خلال 30 يوم عدا الفطر *A. alternate* الذي أظهر قابلية تحلل بين 25-30 % خلال 7 أيام بينما اظهر قابلية تحلل بلغت 70-75% خلال 30 فيما لم تسجل الفطريات المتبقية اختلافات في قابلية التحلل خلال الفترتين .

جدول (4-5) الوزنين الطري والجاف وقيم الاس الهيدروجيني بعد فترة حضانة 30 يوم لتحلل النفط الخام

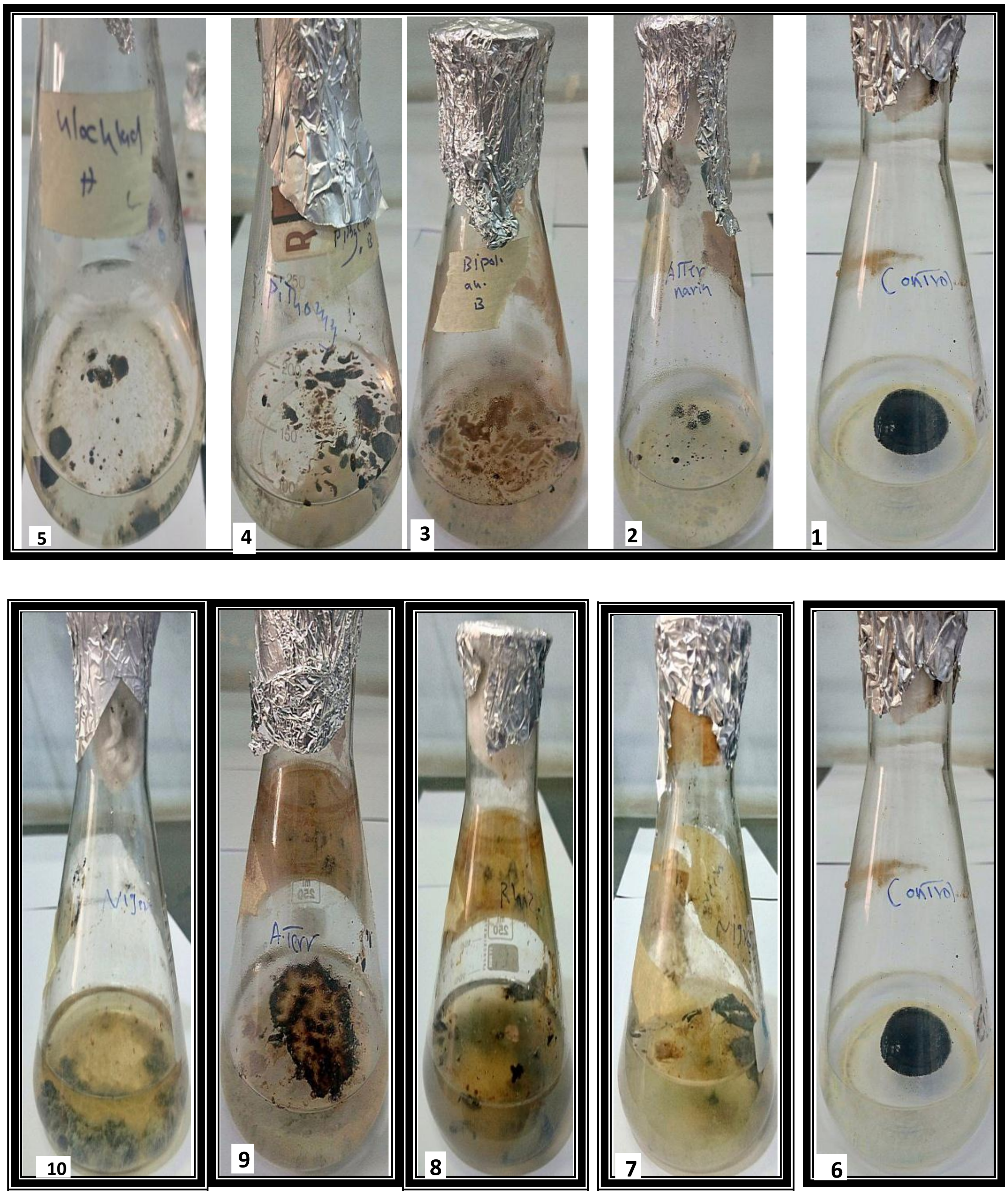
الفطريات المحللة للنفط الخام	الوزن الطري(غم)	الوزن الجاف (غم)	قيمه pH
A. alternata	6.11	0.37	6.3
A. niger	6.87	0.40	6.3
A. terreus	3.22	0.18	6.7
B. saccharia	6.13	0.37	6.3
N. oryzae	6.72	0.39	6.3
R. oryzae	7.50	0.44	6.3
S. herbarum	5.82	0.35	6.3
U.botrytis	7.22	0.42	6.3

وتشير النتائج ألمبينه في الجدول (4-5) إلى أن الفطريات المختبرة كانت قادرة على تكوين كتلة حيوية من الغزل الفطري ولكن بمعدلات مختلفة فقد سجل الفطر *R.oryzae* أعلى نمو فقد بلغ وزنة الطري 7.50 غم إما وزنة الجاف فبلغ 0.44 غم بينما أظهر الفطر *A.terreus* اقل معدل فبلغ وزنة الطري 3.22 غم وزنة الجاف 0.18 ، وقد وجد أيضاً انخفاض قيمة الأس الهيدروجيني في نهاية فترة الحضانة ألى 6.3 في الفطريات التي حللت النفط الخام بنسبة 75%- 70 و 6.7 للفطريات المحللة بنسبة 25-30 % بعد أن كانت 6.9 في بداية الحضانة.

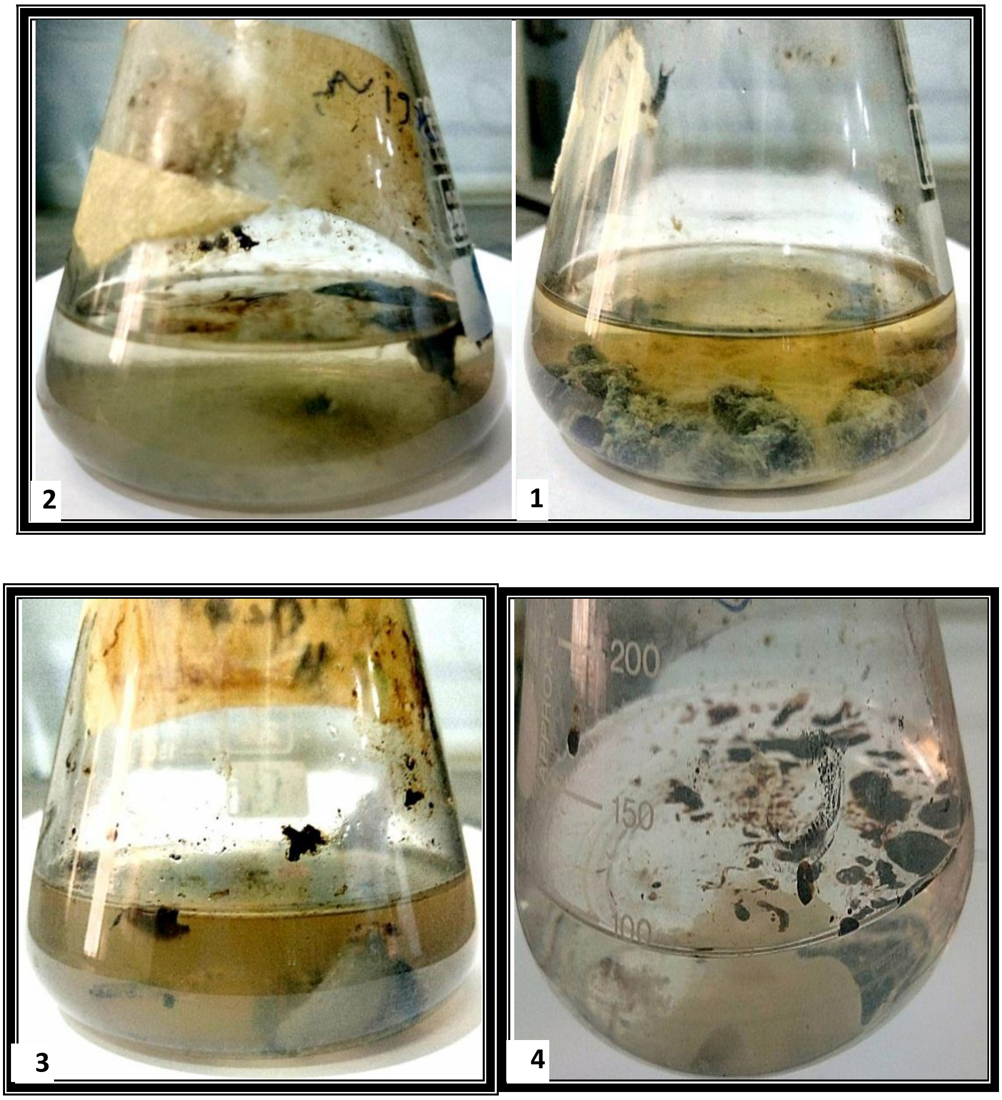


شكل (4-24) قابلية الفطريات على تحليل النفط الخام خلال 7 أيام بالمقارنة مع معامل السيطرة Control: 1,6 . 2,5 : فطريات تحلل النفط بنسبة 25-30% . 3,4,7,8,9,10 : فطريات تحلل النفط بنسبة 70-75% .

2: Alternaria altrnata ، 3: Bipolaris sacchari ، 4: Aspergillus niger ، 5 :Aspergillus terreus ، 7: Nigrospora oryzae ، 8: Ulocladium botrytis ، 9: Stemphylium herbarum ، 10: Rhizopus oryzae



شكل(4-25) تحلل النفط بعد مرور 30 يوم حضانة بالمقارنة مع معامل السيطرة Control: 1,6 :9 : فطريات تحلل النفط الخام بنسبة 25-30% . 3,4,2,5,7,8,10 : فطريات تحلل النفط الخام بنسبة 70-75% . 2: *Alternaria alternta* , 3:*Bipolaris sacchari* , 4:*Stemphylium herbarum* , 5: *Ulocladium botrytis* , 7: *Nigrospora oryzae* , 8: *Rhizopus oryzae* ,9: *Aepergillus terreus* , 10: *Aspergillus niger*



شكل (4-26) الخيوط الفطرية النامية على وسط الأملاح المعدنية MSM خلال 30 يوم ,1: *Aspergillus niger* . 2: *Nigrospora oryzae* . 3: *Rhizopus oryzae* . 4: *Stemphylium herbarum*

النتائج التي توصلت أليها هذه الدراسة تشير على أن كل الفطريات المختبرة والمعزولة من التربة الملوثة بالنفط أظهرت قابلية على تحلل النفط الخام بمعنى أخر أن الفطريات المعزولة من التربة الملوثة بالنفط تكون أكثر كفاءة في تحلل النفط مقارنتا بالفطريات المعزولة من تربة غير ملوثة (Fatuyi *et al*., 2012). أن الفطريات الموجودة في التربة الملوثة بالنفط متكيفة مع المركبات النفطية من اجل احتياجاتها الأيضية ، وأيضا قادرة على استهلاك جزء أو كل النفط الخام والسبب في ذلك هو اعتمادها بشكل كامل على مصدر الكربون الموجود في النفط الخام كمصدر وحيد للحصول على ألطاقة التي تحتاجها لفعالياتها الحيوية (Sheifert *et al*., 2011 ; Agarry and Jimoda, 2013) .

ويظهر من خلال الشكلين (4-24) و(4-25) على وجود ثلاث دلائل أشارت على أن الفطريات تمكنت من تحلل النفط الخام أولها هو التغير في اللون الذي حصل لوسط (MSM)والثاني اختفاء كل أو جزء من النفط الخام أو في بعض الأحيان تشتته والثالث هو تكون كتلة من النمو الفطري في الدورق وهذا يتفق مع ما أشار أليه AL-Nasrawi (2012) .

لقد أظهر الفطر *A. niger* قدرة عالية على تحلل النفط وأتفق مع النتائج التي توصل أليها Gesinde *et al*. (2008). الذي أكد بأن لهذا الفطر قدرة على تحلل أربع مركبات نفطية وكذلك يتفق مع الدراسة التي أجراها Senem and Hanife (2016) والتي من خلالها أثبت أن لهذا الفطر دور في تحلل النفط الخام .

أما الفطر *A. alternata* فقد اظهر قابلية تحلل عالية وهذا اتفق مع ما توصل إلية Ameen *et al*. (2016) الذي أشار في دراسته إلى أن من بين الفطريات المحللة للنفط الفطر *A. alternate* ، ويتفق أيضا مع ما توصل أليه الفريجي (2016) حيث أظهر هذا الفطر كفاءة عالية في تحلل النفط .

أن الفطريات *R. oryzae* و *U.botrytis* أظهرت قابلية تحلل عالية خلال فترتي الحضانة وهذا ما أكده Odire (2009) و Binsadiq (2013) الذين أشارا إلى أن هذا الفطريات كانت لها القدرة على النمو في بيئات ملوثة بالنفط وبعد ذلك أثبتوا بأن له قدرة على تحلل النفط .

أما الفطر *A. terreus* الوحيد من بين الفطريات المختبرة الذي اظهر قابلية تحلل ضعيفة خلال فترتي الحضانة ربما يعود سبب ذلك هو امتلاكه نظام أنزيمي ضعيف غير قادر على تحلل النفط (Uzoamak *et al*.,2009)

أما بخصوص الفطريات *B. Saccharia*,. و *S. herbarum* و *N. oryzae* فكانت قادرة على تحلل النفط خلال فترتي الحضانة لكن لم تكن هناك دراسات تشير على أن لهذه الفطريات قدرة على تحلل النفط من عدمها لكن في هذه الدراسة تم أثبات قدرة هذه الفطريات في تحلل ألنفط

أن انخفاض قيمة الأس الهيدروجيني بعد نهاية فترة الحضانة ربما كان سببه بأن تحلل النفط الخام ينتج عنه العديد من المركبات مثل الكحول والأحماض الدهنية وتراكمها يتسبب في انخفاض الأس الهايدروجيني (Oboh *et al* ., 2006). أن التفاوت والتباين البسيط الذي ظهر في قدرة الفطريات المختبرة على تحلل النفط الخام خلال فترتي ألحضانة في هذه الدراسة ربما

كانت له أسباب عديدة منها اختلاف الأنواع الفطرية وهذا ما أكده Sabah *el al.* (2013) الذي أشار إلى أن قابلية الفطريات على تحلل النفط تختلف باختلاف الأنواع والسلالات وبالتالي سوف يكون هناك اختلاف في النمو والتحلل ، أيضا الفطريات التي أظهرت قابلية عالية على تحلل النفط كانت تمتلك نظام أنزيمي فعال قادر على تفكيك مكونات النفط (Zhang *et al*., 2015)

وقد يكون السبب في ذلك التباين هو اختلاف نوع وتركيب النفط الخام وقابليته على التحلل حيث أن النفط الخام خليط من عدة مكونات قسم منها يتحلل بسهوله كالهايدروكاربونات قصيرة السلسلة وقسم منها لايتحلل كالمركبات الاروماتية والتي ينخفض تحللها البايلوجي بزيادة عدد الحلقات الاروماتية (Shen *et al*., 2015) .ووجد بأن هناك علاقة بين فتره الحضانة وتحلل النفط الخام حيث أن التحلل يتناسب تناسبا طرديا مع فترة الحضانة (Agarry and Jimoda, 2013)، أو قد يكون السبب في تفاوت قابلية الفطريات هو القدرات الإنزيمية التي تختلف باختلاف الأنواع الفطرية وأيضا ربما يكون السبب هو اختلاف المسارات الخاصة بتحلل مركبات النفط الخام ألذي تسلكه الأحياء لتحلل النفط (Olukunle and Oyegoke, 2016). أضافه إلى ذلك فأن معدل التحلل البايلوجي للنفط يتأثر بعدد من العوامل نوع الكائنات المحللة و عوامل بيئية عديدة أهمها درجة الحرارة والأس الهيدروجيني والعناصر المغذية والأوكسجين ومحتوى الرطوبة (Avishia *et al* ., 2017 ; Aharoni *et al*., 2017)

يظهر الشكل (4-26) قدرة بعض الفطريات على تكوين كتلة حيوية من الغزل الفطري في وسط الأملاح ألمعدنية (MSM) فقد أظهرت بعضها نمو ضعيف وأخر متوسط وبعضها أظهرت نمو كثيفاً للغزل الفطري ولكن هذا لا يعني أن الأنواع التي كونت نمواً متوسطاً أو كثيفاً هي أنواع قادرة على تحلل النفط أسرع بالمقارنة مع الأنواع التي كونت نمو ضعيف والسبب في ذلك بأن النمو في الفطريات تتحكم فيه وتحدده عوامل عديدة منها درجة الحرارة الرطوبة الأس الهيدروجيني المغذيات وغيرها فمثلا أن لكل فطر مدى معين من درجة الحرارة يستطيع من خلاله النمو وتكوين كتلة حيوية (Delille and Pelletier, 2004) .

لكن مع ذلك يبقى لزيادة المساحة السطحية للكتلة الحيوية دور مهم في تحلل النفط لأنه زيادة الكتلة الحيوية تؤدي إلى زيادة الاتصال بين مكونات النفط الخام والخلايا الفطرية مما يؤدي إلىأفراز الأنزيمات المحللة وبالتالي تزداد عملية التحلل الحيوي(Steliga, 2012) ، فكلما كانت الخيوط الفطرية أكثر ملامسة للنفط الخام ولفترة أطول ، زاد معدل تحلل النفط وتحول إلى نواتجه النهائية وهي الماء وثاني أكسيد الكربون وهذا ما أكده Chigu *et al*. (2010) ، وأن

تكوين الكتلة الحيوية من الغزل الفطري يشير إلى قدرة تلك الفطريات على التكيف في البيئات الملوثة بالنفط (Orji *et al*., 2012).أن للمغذيات والعوامل البيئية لها دور في قابلية الفطريات على تحلل النفط (Suja, 2014) ، وقد وجد Yong-Chao (2014) بأن توفر المغذيات سوف يؤدي إلى زيادة أعداد الفطريات مما يؤدي إلى زيادة التلامس وإفراز الإنزيمات وبالتالي يزداد التحلل ، وأكد Kreishna (2012) بأن استخدام الظروف المثلى لنمو الفطريات يؤدي إلى زيادة أعدادها وكتلتها وأنزيماتها وبالتالي يزداد دورها في تحلل النفط .

أن قدرة وقابلية الأنواع الفطرية على النمو في الأوساط الملوثة والمحتوية على النفط الخام وقدرتها على تحليله واستخدامه كمادة أساس لبقائها تم عن طريق أنزيماتها الخلوية والتي حطمت جزيئات الهايدروكاربونات وفككت سلاسلها واستخدمت الكربون كمصدر للطاقة حيث حولت النفط إلى أشكال أبسط تمكنت من أمتصاصة (Adekunle, 2007) .

عموماً أظهرت جميع الفطريات المختبرة في هذه الدراسة قابلية عالية على تحلل النفط الخام على اعتبار بأنها أصلا عزلت من الترب الملوثة بالنفط وبالتالي كانت هذه الفطريات أكثر تكيفا لهذه البيئات وهذا ما أكده Peper *et al*., (2015) و Marchand *et al* . (2017) .

الأستنتاجات والتوصيات

Conclusions and Recommendation

الأستنتاجات

1- وجد أن بعض الفطريات لها القابلية على أستيطان التربة الملوثة بالنفط الخام .

2- أن هناك أنواع فطرية سجلت لأول مرة في العراق فقد تم تسجيل ثمانية أنواع هي *A.tenuissima* و *B. australiensis* و *C. lunata* و *N. oryzae* و *R. oryzae* و *S. chartarum* و *S. raceosum* و *U.botrytis* .

3- وجد أن الفطريات تمتلك نظام أنزيمي تستطيع بواسطته أن تنمو في التربة الملوثة بالنفط الخام وذلك من خلال دراسة قابليتها على افراز 5 أنواع من أنزيمات .

4- أظهرت الفطريات المختبرة قابلية عالية على تحلل النفط الخام يمكن استغلالها في أصلاح التربة الملوثة بالنفط الخام .

5- أن التربة الملوثة بالنفط الخام كانت ملائمة لنمو الفطريات من خلال دراسة التحليل الفيزيائي لها والتي كانت ضمن الحدود الطبيعية .

.

التوصيات

1- أجراء المزيد من الدراسات لمناطق أخرى في العراق لكون هناك العديد من المناطق الملوثة بالنفط الخام بأعتباره من الدول المنتجة للنفط ودائما ما تتعرض تربته للتسربات والانسكابات النفطية بغية الحصول على أنواع جديدة تسجل لأول مرة في العراق أو أنواع غير مسجلة على مستوى العالم واعتماد الطرق الجزيئية في تشخيصها.

2- اعتماد الطرق الجزيئية في تصنيف الفطريات المعزولة من التربة الملوثة بالنفط الخام

3- عزل وتشخيص الفطريات من البيئات المائية الملوثة بالنفط الخام .

المصادر

References

المصادر العربية :

ابو الغيث ، سعاد محمد حليفة ، احلام الغمودي ، محمد زعيط (2020). عزل وتعريف واختبار كفاءة الفطريات في تحليل الهايدروكاربونات من التربة الملوثة بالنفط . مجلة العلوم التطبيقية ، جامعة الزوية ، ليبيا ، العدد (1).

حبة ،اصيل منذر، رامي محمنود ، هبة فرحان دلي (2015). دراسة تاثير بعض العزلات المعاملة بالنفط الخام على انبات بذور الكرفس . مجلة علوم المستنصرية، جامعة المستنصرية ، مجلد 26 العدد1.

حميد، مروان سالم (2015). قابلية بعض الأنواع الفطرية على النمو في أوساط ملوثة بالنفط الخام .مجلة تكريت للعلوم الصرفة ،جامعة تكريت'،العراق (250): 47-50

خالد، ايمن وليد ، بكر، صفاء زكريا ، عبود ، هادي مهدي (2018).تاثير درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني في نمو وتبوغ العزلتين المحليتين لفطري المقاومة الحيوية Metarhizium anisopliae و Beauveria bassiana وفعاليتهما في انتاج الإنزيمات المحللة . *TikritJ. pureSci*,. 22(4): 8-14.

الطائي، ميسون مهدي صالح؛ حمد، نداء شهاب و البكري، جوالن جبار صاحب (2016) .دراسة امكانية از الة الهيدروكاربونات النفطية وبعض الملوثات في مياه المخلفات النفطية لمصفى النجف .مجلة جامعة بابل ،العلوم الصرفة والتطبيقية .24 (1): 50-60..

عبد الله ، زينب خلف (2015) .دراسة تصنيفية وحياتية للفطريات الناقصة الملونه في محافظة البصرة .اطروحة دكتوراة ،كلية التربية ، جامعة البصرة.

عبود ،شيماء عبد الأمير (2018) .تأثير بعض العوامل التحفيزية و التعزيز الحيوي على عملية تكسير النفط الخام بأستعمال بعض أنواع الفطريات والبكتريا المعزولة من بعض الترب الملوثة في محافظة البصرة مختبريا. رسالة ماجستير، كلية العلوم ، جامعة البصرة ، صفحة 110.

الفريجي، زينب قاسم منور (2016). عزل وتصنيف بعض الفطريات من التربة الملوثة بالمخلفات النفطية لمصفى البصرة ودراسة بعض العوامل المؤثرة على التحلل الحيوي للنفط الخام. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة البصرة.صفحة . 116

المصادر الاجنبية :

AL-Dossary, AM., Abood, S.A., Al-Saad, H.T. (2019). Biodegradation of Crude Oil using *Aspergillus* species. *J. Biol. Agric. Healthcare.*, 9(4): pp.60-64

AL- Husaeny, L. R. S .(2014).An Eucological study of soil pollution by some heavy metals and totals bacterial pathogens in Babylon province Iraq. College Agriculture. University of Babylon

AL-Kadeeb, S. A. (2007) Soil Analysis of contaminated soil from Riyadh city, Saudi Arabia and influence of aluminium and cobalt ions on the growth of fungi isolated. *Asian Network for Scientific Information* 7: 549-553.

AL-Nasrawi, H.(2012). Biodegradation of crude oil by fungi isolated from Gulf of México. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 3 (4):pp. 1-6.

Abdel – Raheem, A., and Shearer, . C.A. (2002). Extracellular enzyme production by fresh water ascomycetes. *Fungal Diversity,* 11: pp.1-19

Abeer, A.A., Aliaa, R., Sherien, M.M., Ahmed I. and Eman, R. (2015). Screening of fungal isolates for Laccase enzyme production from marine sources. *ReHsearch Journal of Pharmaceutical, Biol. Chem.Scie,* 6 (1): pp.221-228.

Acevedo, F., Leticia P., María D. C., Raphael, C., and María, C. D. (2011). "Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by the Chilean White-rot Fungus Anthracophyllum Discolor." *Journal of Hazardous Materials*, 185.1 (January): pp .212-219.

Addy, K., Green, L., and Herron, E. (2004). PH and Alkalinity. URI Watershed Watch.

Adekunle, A.A., and Adebambo, O.A. (2007). Petroleum Hydrocarbon Utilization by Fungi Isolated From Detarium Senegalense (J. F Gmelin) Seeds. *Journal of American Science*, 3:pp. 69-76

Adelowo, F.E., Amuda ,O.S., Giwa, A.A., Onawumi, O.E. and Falana ,O.F. (2015). Biodegradation of organophosphonates by Aspergillus species. Oriental. *J. Chem*., 31:pp. 165-171.

Adesina F.C., and Onilude A.A., (2013). Isolation identification and screening of xylanase and glucanaseproducing microfungi from degrading wood in Nigeria, 8(34):pp. 4414-4421

Adnan, B., Maytham A. D., Shue, A., Ahmad, A., Hayder A., Abbood, D., Xiaoyu, Z., and Fuying, M (2018). Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment.*EgyptianJournal of Aquatic Research*, 44:pp. 71–76.

Adnan, B. A., Jawadayn, T., Alkooraneea,C., Hayder, A. Abboodd, Jialong, Z., Jin, S., and Xiaoyu, Z .(2018) .Fuying Isolation and characterization of two crude oil-degrading fungi strains from Rumaila oil field, Iraq Biotechnology Report -University of *Science and Technolog*,(17):pp. 104–109.

Agarry, S.E., Jimoda, and L.A .(2013). Application of Carbon-Nitrogen Supplementation from Plant and Animal Sources in In-situ soil Bioremediation of Diesel oil. Experimental Analysis and Kinetic Modelling. *J. Environ. Earth Sci.,* 3(7):pp. 51-62.

Agbor, V.B., Cicek N., Sparling, R., Berlin, A.,and Levin B.D., (2011). Biomass pretreatment: fundamentals toward application. *Biotechnology advances* 29(6):pp. 675-685.

Aharoni, I., Siebner, H., and Dahan, O. (2017). Application of vadose-zone monitoring system for real-time characterization of leachate percolation in and under a municipal landfill. Waste Manage., 67:pp.203–213.

Aimeur, N., Tahar, W., Meraghni, M., Meksem, N., and Bordjiba, O. (2016). Bioremediation of pesticide (mancozeb) by two

*Aspergillus*species isolated from surface water contaminated by pesticides. *J. Chemi. Pharma.* Sci., 9(4): 2668-2670.

Alberto, B.G.R., Vinoth, V.K., Arielle, A., Eduardo, T.H., Dlivier, S., Heidy, P.J., Deborah, G.A., Jackson, S.A., Dobson, A.D.W., Del Rayo, S.C.M., FolchMallol, J.L., Leduc, R. and Cabana, H. (2017). Simple screening protocol for identification of potential mycoremediation tools for the elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons and phenols from hyperalkalophile industrial effluents. *J. Environ. Manag.,* 198 (2):pp. 1-11.

Alcorn, J.L. (1983). *Cochliobolussp*. nov. Transactions of the British *Mycological Society*, 81: pp.172–174

Ali, M.I.A., Ouf, S.A., Khalil, N.M. and Abd El-Ghany, M.N. (2015). Biosynthesis of laccase by *Aspergillus flavus* NG85 Isolated from Saint Catherine protectorate. *Egyptian Journal of Botany*, 55(1):pp. 127-147.

Ameen, F., Moslem, M., Hadi, S., and Al-Sabri, A. E. (2016). Biodegradation of diesel fuel hydrocarbons by mangrove fungi from Red Sea Coast of Saudi Arabia. *Saudi J. Biol. Sci,.* 23: pp. 211–218.

Amend, A., Burgaud, G., Cunliffe, M., Edgcomb, V. P., Ettinger, C. L., Gutiérrez, M. H., and Kagami, M. (2019). Fungi in the marine environment: Open questions and unsolved problems. *MBio*, 10(2):pp.1- 15.

Antoine, A.A., Jacqueline D, and Thonart P (2010) Xylanase production by Penicillium canescens on soy oil cake in solid-state fermentation. Appl *BiochemBiotechnol* 160:pp.50–62.

Arora, P.K., Srivastava, A., and Singh,V.P. (2010) "Application of Monooxygenases in dehalogenation, desulphurization, denitrification

and hydroxylation of aromatic compounds. *Journal of Bioremediation and Biodegradation,* vol. 1, pp. 1–8.

Avishai, L., Siebner, H., Dahan, O. and Ronen, Z. (2017). Using the naturalbiodegradation potential of shallow soils for In-situ remediation of deep vadose zone and groundwater. *J. Hazard. Mater*, 324:pp. 398–405.

Azubuike, C.C., Chikere, C.B., and Okpokwasili, G.C., (2016). Bioremediation techniques-classification based on site of application: Principles, advantages, limitations and prospects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. .

Bae, H. D., Yanke, L.J., Cheng, K.J., and Selinger, L.B., (1999). A novel staining method for detection phytase activity. *Journal of Microbiological Methods,* 39:pp. 17-22.

Balaji, V., Arulazhagan, P., and Ebenezer P. (2014). Enzymatic bioremediation of polyaromatic hydrocarbons by fungal consortia enriched from petroleum contaminated soil and oil seeds. *Journal of Environmental Biology*. 35(3):pp. 521-529.

Baldrian P. (2006). Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbiol., Rev*. 30: 215-242.

Baldrian, P., and Šnajdr, J. (2006). Production of ligninolytic enzymes by litter-decomposing fungi and their ability to decolorize synthetic dyes. *Microb.Technol.,*39: pp.1023-1029 .

Barr, DP., and Aust, D. (1994). Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. Environ. Sci. *Technol*., 28: pp. 78 – 87.

Barrett, A.J., Rawling N.D., Woessner, J.F. (2003). "The Hand book of proteolytic enzyme" 2 nd ed. Academic press.

Barata, R.A., Andrade, M.H.G.,and Rodrigues, R.D. (2002). Purification and Characterization of an Extracellular Trypsin-Like Protease of Fusarium oxysporum var. lini. *J Biosci Bioeng* 94:304-308

Bensch, K., Bruan, U., Groenewald, JZ., Crous, PW. (2012) .The genus*C l cladosporium*. *Studmycol*, 72:pp.1-401 .

Raghu,S., Benagi,V .,and Nargund, V. (2016) .Culture morphological a ndpathogentic variability among the isolates of *Fusarium solani* c causing wiltdisease of chilli. J. pure Appl. *Microbial.Shahjahanabad* , 10(1):pp. 599-604.

Binsadiq, A. (2007). Bioremediation of petroleum contaminated soils in the Arabian Gulf Region: A Review. JKAU: Sci., 19:pp. 81-91.

Binsadiq, A. (2012). Fungal Bioremediation of Petroleum Contamination. *International Journal of Chemical and Environmental Engineering Systems*, 3(1):pp. 321-325.

Binsadiq, A. (2013). Microbial Bioteratment of Petroleum Contaminated Soil. *International Journal of Microbiology and Immunology,* 1(8):pp. 87-89.

Blasi, B., Poyntner, C., Rudavsky, T., Prenafeta-Boldú, X.F., de Hoog, S., Tafer, H. and Sterflinger, K.(2016). Pathogenic yet environmentally friendly Black fungal candidates for bioremediation of pollutants. *Geomicrobiol*. J., 33: 308–317.

Bonugli-Santos, R.C., Santos Vasconcelos, M.R., Passarini, M.R., Vieira, G.A., Lopes, V.C., Mainardi, P.H., Santos, J.A., Azevedo Duarte, L., Otero, I.V., and Silva Yoshida, A.M. (2015). Marine-derived fungi: diversity of enzymes and biotechnological applications. *Front. Microbiol*.,6-269.

Bonorden, H.F. (1864). Abhandlungen aus dem Gebiete der Mykologie. Abhandlungen der Naturforschenden Gesellschaft zu Halle. 8:1-168

Borras, E., G. Caminal, M. Sarra, and C. Novotny. (2010). "Effect of soil bacteria on the ability of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) removal by Trametes versicolor and Irpex lacteus from contaminated soil." *Soil Biology and Biochemistry* 42.12 (December):2087–2093.

Brijwani, K., Rigdon,A. and Vadlani, P.V.(2010). Fungal laccases: production, function, and applications in food processing. *Enzy. Rese.*, 10:pp.149-151.

Broderick, J.B. (1999). "Catechol dioxygenases". *Essays in Biochemistry,* vol. 34, no. 11: pp. 173–189.

Butler E. J. (1913), Memoirs of the Dept. Agric. *India, Bot. Ser*.: 207

Cai, B., Ma, J., Yan, G., Dai, X., Li, M.,and Guo, S.(2016). Comparison of phytoremediation, bioaugmentation and natural attenuation for remediating saline soil contaminated by heavy crude oil. *Biochem Eng J*,112:170–175.

Cajthaml,T.,Erbanova,p.,Kollmann,A.,Novotny,C., and Mougin,C.(2008). Degradation of PAHs by ligninolytic enzyme of Irpex lacteus. *FoliaMicrobiol*,53(4):289-294 .

Calvo, C., Manzanera, M., Silva-Castro, G.A., Uad, I. and González-López, J. (2009). Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. *Science of The Total Environment* [online]. 407(12), pp. 3634-3640.

Carmen, V. Sciortion, J.r. (2017) . Atlas of Clinically Important Fungi.

Chaineaue,C.H., Rougeux,G.,Yepremian, C. and Oudot, J.(2005).Effect of nutrient concentration on the biodegradation of crude oil and associated microbial populations in the soil. *Bio. Biochem.*, 37(8):pp.1490-1497.

Chang, Y.T., Lee, J.F., Liu, K.H., Liao, Y.F., and Yang, V. (2015). Immobilization of fungal laccase onto a nonionic surfactant-modified clay material: application to PAH degradation. *Environmental Science and Pollution Researc*h.,23(5):pp. 4024-4035.

Chaudhry, Q., Blom-Zandstra, M., Gupta, S., and Joner, E. J. (2005). Utilizing the synergy between plants and rhizosphere microorganisms

to enhance breakdown of organic pollutants in the environment. *Environ. Sci. Poll. Res*12: 34-48.

Chaudhry, S., Luhach, J., Sharma, V., and Sharma, C. (2012). Assessment of diesel degrading potential of fungal isolates from sludge contaminated soil of petroleum refinery, Haryana. *Research Journal of Microbiology*, 7: pp. 182–190.

Chen, C., Zhang, X., Chen, J., Chen, F., Li, J., Chen, Y., Hou, H. and Shi, F. (2020): Assessment of site contaminated soil remediation based on an input output life cycle assessment. *Journal of Cleaner Production*, 263: 121-422.

Chen, y. (2013). Application of hydrocarbon degrading microorganism enumeration and catabolic genes detection in soil assessment. University of Helsinki. *M.Sc*. Thesis. 68 pp.

Chigu, L., Hirosue, S., Nakamura,C.,Teramoto, H., Ichinose, H., and Wariishi, H. (2010) .Cytochrome P450 monooxygenases involved in anthracene metabolism by the white rot basidiomycete phanerochaete.Appl. *Microb.Biotechnol,* 87(5):pp.1907-1916.

Chorom, M., Shariffi, H.S., and Mutamedi, H. (2010). Bioremediation of a crude-oil polluted soil by application of fertilizers. *Iran Journal of Health Science Engineering*, 7:pp.319-326.

Chuks, K., Agha, NC., and Ogbulie, JN.(2008) Lipase activities of microbial isolates from soil contaminated with crude oil after bioremediation. *Afr J Biotechnol*,20087(16):pp. 2881-2884.

Colen, G., Junqueira, R.G., and Moraes- Santos, T. (2006). Isolation and Screening of alkaline lipase- producing fungi from Brazilian Savanna soil. *World* J *MicrobiolBiotechnol*,. 22(8):pp. 881- 885.

Coulon, F., Brassington, K.J., Bazin, R., Linnet, P.E., Thomas, K.A., and Mitchell, T.R.(2012). Effect of fertilizer formulation and

bioaugmentation on biodegradation and leaching of crude oils and refined products in soils. *Environ Technol.*,33: pp.1879–1893.

Crognale,S., Pesciaroli , L., Felli , M., and Petruccioli, M.(2019). *Aspergillus* olivimuriae sp. nov., a halotolerant species isolated from olive brine. Int. J. *Syst. Evol. Micro*, 69(9):pp.2899-2906.

Csutak, O., Stoica, I., Ghindea, R., Tanase, A., and Vassu, T. (2010). Insights on yeasts bioremediation process. *Rom. Biotechnol. Lett.* 15(2):pp. 5066 – 5071.

Dariush, M. T., Shahriari, M. H., Gholamareza, S. F., Kalantari, F. and Azzi M.(2007). Effect of light crude oil- contaminated soil on growth and germination of Festuca arundinacea. *Journal of Applied Sciences,* 7 (18): pp.2623-2628.

Dawoodi, V., Madani, M., Tahmourespour, A., and Golshani, Z. (2015) .The study of heterotrophic and crude oil-utilizing soil fungi in crude oil contaminated regions. J *BioremedBiodegrad.*, 6:270.

De, H., G.S. (2014) Ecology and phylogeny of black yeast-like fungi: diversity in unexplored habitats. *Fungal Divers.,* 65:pp.1–2.

Delille, D., Coulon, F., Pelletier, E. (2004). Effects of temperature warming during a bioremediation study of natural and nutrient-amended hydrocarbon-contaminated sub-Antarctic soils. *Cold Regions Sci Technol.,*40(2):pp. 61–70.

Desai, A., and Vyas, P. (2006). Petroleum and hydrocarbon microbiology. Department of Microbiology. *M.S.University of Baroda*.

Desai, SS., and Nityanand, C. (2011). Microbial laccases and their applications: a review. Asian *J Biotechnol* 3(2):pp. 98–124.

Dhiman, S.S., Sharma, J.,and Battan B. (2008). Industrial applications and future prospects of microbial xylanases: a review. *Bioresources*, 3(4):pp.1377-1402.

Dill, I., Trautmann, C., and Szewzyk, R. (1997). Mass development of *Stachybotrys chartarum* on decomposable plant-pots made of recycling paper. Mycoses 40:pp. 110-114.

Dobian, A.S. (2016). The acute and chronic toxicity of crude oil and its dispersant on some intertidal bivalves in Aden Governorate. M.C thesis, Collage of Science, Sana'a University, 194 pp.

Durairaj, P.; Hur, J. and Yun, H. (2016). Versatile biocatalysis of fungal cytochrome P450 monooxygenases. *Microb.CellFact*., 15:pp. 125-139.

Ekunday F.O. and Osunia C.A (2013).phytase activity of fungi from oil polluted soil and their ability to degrade bonnylight crude oil. African *Journal of Biotechnology,*12(36):pp. 5540-5548.

Elham, M., Mahdi, A.,and Asadollah, B. A. (2017) .Diversity of culturable fungi inhabiting petroleumcontaminated soils in Southern Iran Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology Department of Plant Protection, University of Tabriz, Tabriz, Iran .DOI 10.1007/10482-017-0863-1.

Eman, K., and Andrew, H. (2017). soil bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon polluted environments. *AIMS Microbial*,3(1): pp.25-49.

Evans, G.M and Furlong, J.C.(2003). Environmental biotechnology theory and application. Wiley, Chichester.

Fariba, M . Z ., and Abdolkarim, C. R . (2012) Evalutin Of Oil Remove efficiency And Enzymatic Activty In some fungi strain for Bioremdation of Petrolleum Polluted soil irania. *Journal of Environmennt Helth Scince enginrring*, 9(1): pp.26.

Fatuyi, O.E., Oluwatoyin, F.O., Esther, A.E. (2012). Biodegradation of Bonny light crude oil by locally isolated fungi from oil contaminated soils in Akure, Ondo state. Malaysian. *J. Microbe.*,8(1):pp. 42-46. .

Flayyih, I., and AI–Jawhari, H. (2014). Ability of some soil fungi in biodegradation of petroleum hydrocarbon. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 2:pp. 46–52.

Gesinde, A.F., Agbo, E. B., Agbo, M.O. and Dike, E.F.C. (2008). Bioremediation of some Nigrerian and Arabian crude oils by fungal isolates. *Int .J. App. Sci*., 2: 37- 44. 82.

Gessner, R. V. (1980) . Degradative Enzyme Production by Salt-marsh fungi. *Botanica Marina*, 23(2):pp. 133-139.

Gontia,M., Dhanshree D., Niraj, T., Khushboo, B., , Keerti, T.,and Sharad T.(2012). Isolation, morphological and molecular characterization of phytate-hydrolysing fungi by 18S rDNA sequence analysis. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, (1):pp. 317-323.

Gopinath, S. C. B., Anbu, P., Lakshmipriya, T. and Hilda, A. (2013). Strategies to characterize fungal lipases for applications in medicine and dairy industry. *Bio. Med. Rese. Inter*,1-10.

Gupta, V.K., Gaur, R., Gautam, N., Kumar, P., Yadav, I.J., and Dharmwal, N.S. (2009). Optimization of xylanase production from Fusarium solani F7. Am J *FoodTechnol*, 4:pp.20–29.

Hankin, L., and Anagnostakis, S. L. (1975). The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, 67(3):pp. 597-607.

Haritash, A.K., and Kaushik.C.P. (2009). Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PHCs): A review. *Journal of Hazardous Materials*, (ISSN:0304- 3894). 169(3):pp. 1-15.

Hashem, A.R. (2007). Bioremediation of petroleum contaminated soils in the Arabian Gulf region: a review. *Kuwait J Sci.*, 19:pp.81–91.

Hawash, AB., Alkooranee, J.T., Abbood, HA., Zhang, J., Sun, J., Zhang, X., and Ma, F. (2018). Isolation and Characterization of Two Crude

Oil Degrading Fungi Strains from Rumaila Oil Field, Iraq. *Biotech. Reports*. 17(1): pp.104-109.

Hawksworth, D. L. (2012). Global species numbers of fungi: are tropical studies and molecular approaches contributing to a more robust estimate *Biodiversity and Conservation*, 21(9): pp.2425-2433.

Hawksworth, D.L. (2001). The magnitude of fungal diversity. *Mycological Research*, Volume 105 pg. 1422–1432.

Hermann, TE., Kurtz, MB.,and Champe, SP. (1983). Laccaselocalized in Hulle cells and *cleistothecial primordia* of *Aspergillus nidulans. J Bacteriol*,154:pp.955–964 .

Hidayat, A., tachibana, S.(2012). Biodegradation of aliphatic hydrocarbon in three types of crude oil by *Fusarium* sp. F092 under stress with artificial sea water. *J. Environ. Sci. Technol*,. 5 (1):pp. 64.

Hoffmann, K., Pawlowska, J., Walther, G., Wrzosek, M., de Hoog, GS., and Benny GL. (2013). The family structure of the Mucorales a synoptic revision based on comprehensive multigene-genealogies. *Persoonia*,30:pp. 57–76.

Hölker, U., Bend, J., Pracht, R., Tetsch, L., Müller, T., Höfer, M.,and de Hoog, G.S., (2004). Hortaea acidophila, a new acid-tolerant black yeast from lignite.*Antoni van leeuwenhoek*, 86:pp. 94-287

Hughes, S.J. (1958). Revisiones Hyphomycetum aliquot cum appendice nominibus rejiciendis. *Canadian Journal of Botany*. 36(6):727-836

Howson, S. J. and Davis, R.P. (1983). Production of phytate-hydrolysing enzyme bysome fungi. *Enzyme Microb. Technol.*, 5:pp. 377- 382.

Hyde, K. D., Sarma, V.V., and Jones, E. B. G. (2000). Morphology and taxonomy of higher marine fungi .In : Marine Mycology - A Practical Approach (eds. K.D. Hyde and S. B. Pointing) . *Fungal Diversity press,Hong Kong*, 1: pp.172 – 204 .

Ikram, H., and Mukhtar, H. (2007). Biosynthesis of acid proteases by Penicillium griseoroseum IH-02 in solid-state fermentation. *Pak J Bot.*, 39:pp. 2717-2724.

Ikuesan, F.A. (2017). Evaluation of crude oil biodegradation potentials of some indigenous soil microorganisms. *Journal of Scientific Research and Reports.*, 13:pp.1-9.

Islam, N.F. (2017). Bioprospecting fungal diversity from crude oil infiltrate soil of India's Northeast . *Tropical Plant Research*, 4(2):pp. 319–329.

Jahromi, M.F., Liang, J.B., Rosfarizan, M., Goh, Y.M., Shokryazdan, P., and Ho, Y.W. (2011). Efficiency of rice straw lignocelluloses degradability by *Aspergillus terreus* ATCC 74135 in solid-state fermentation. Afr. J. *Biotechnol.,* 10(21):pp. 4428-4435.

Jasim,H.,Naama and Noor, A., Alhusainy .(2018). bioremediation of diesel by soil fungi, university of Mustansiriyah, Iraq. Pak. J. *Biotechnol*,Vol. 15 (2):pp. 321-331.

Jiang, S., Wang, W., Xue, X., Cao, C., and Zhang, Y. (2016). Fungal diversity in major oil-shale mines in China. *J. Environ. Sci*,. 41:pp. 81–89.

Joergensen, R.G., and Wichern, F. (2008). Quantitative assessment of the fungal contribution to microbial tissue in soil. *Soil Biol. Biochem*. 40:pp. 277–299.

Jones, E.B.G., Suetrong, S., Sakayaroj, J. Bahkali, A.H., Abdel-Wahab, A.A., Teun, B., and Pang, K.L. (2015). Classification of marine Ascomycota, Basidiomycota, Blastocladiomycota and Chytridiomycota. *Fung. Dive*.,73:pp.1-72.

Jové, P., Olivella, M.À., Camarero, S., Caixach, J., Planas, C., Cano, L., and Heras, F.X. (2015). Fungal biodegradation of anthracene-polluted cork: A comparative study. *J. Environ. Sci. Health* Part, A 1–8

Kantharaj, P., Boobalan, B., Sooriamuthu, S., and Mani, R. (2017). Lignocellulose degrading enzymes from fungi *and* their industrial applications. Int. *J. Cur. Res. Rev*,| Vol., 9(21): pp.1-12.

Keissler.,K. (1912).Zur Kenntnis Pilzflora Krains. Beihefte zum botanischen Centralblatt 29: 433 (1912

Ki,H. K., Shamin, J., Ehsanul, K., and Richard, J.C. (2013) . Brown review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons PAH sand their human health effects. Environment International ,(60): pp.71–80

Kimura, T. and Tsuchiya, K.(1982). "Characteristics of protease production by *cephalosporium* spp" . *Appl. Env. Microbial* . 43(3):pp. 654-658 .

Kirk, P.M; Cannon. P.F and Stalpers,J.A. (2008). Ainsworth and Bisdys Dictionary of Fungi.10 ed.

Klionsky, D. J., Herman, P. K., and Emr, S. D. (1990). The fungal vacuole, composition, function, and biogenesis. *Microbiol*. Rev. 54:pp. 266-292.

Kota, M.A., Hussaini, A.A.S.A., Zulkharnain, A. and Roslan, H.A. (2014). Bioremediation of crude oil by different fungal genera. *Asian Journal of Plant Biology*. 2(1): 16- 23.

Kranthi, V.S., Rao, D.M., and Jaganmohan, P. (2012). Production of Protease by *Aspergillus flavus* Through Solid State Fermentation Using Different Oil Seed Cakes. *Int J Microbiol Res* 3:pp.12- 15.

Krauss, G. J., Solé, M., Krauss, G., Schlosser, D., Wesenberg, D. and Bärlocher, F.(2011). Fungi in freshwaters: ecology physiology and biochemical potential. *femsMicrobiol*, Rev., 35:pp. 620 – 651.

Krishna, V. and Mishra, S. (2012). Hydrocarbon degradation using fungal isolate: nutrients optimized by combined grey relational analysis. Inter. J. *Engin. Rese. Appl*., 2(2): 390-399.

Krebs,C.J.(1972).Ecology the experimental analysis of distra abundance by Charles J.Krebs (NO.574.5K74.).

Lavelle, P., and Spain, A.V. (2005). Soil ecology and Soil Organisms, *Springer*: New delhi, India.

Lawal, T.E., Iyayi, E.A., Adeniyi, B.A., and Adaramoye, O.A. (2010). B biodegradation of palm kernel oil cake by multienzyme complexes f r formm fungi and its feeding value for broilers. Int. *J. PoultrySci*., 9(7):pp. 695-701 .

Lei, A., Hu, Z., Wong, Y., and Tam.N. (2007) . "Removal of Fluoranthene and Pyrene by Different Microalgal Species." *Bioresource Technology* 98.2 (January):pp. 273-280.

Lemos, J. L.S., Rizzo,A.C., Millioli,V.S,.Soriano, A.U.,Sarquis, M.I. and Santos,R.(2002). Petroleum degradation by filmentous fungi . *International Petroleum Environmental Conference*, October 22 -25, Albuqureque,NM.

Leonard, K.J.; Suggs, E.G. (1974). Setosphaeria prolata, the ascigerous State of *Exserohilu mprolatum*. *Mycologia*. 66:281-297

Leung, M.(2004). “Bioremediation: techniques for cleaning up a mess,” *Journal of Biotechnology,* vol. 2: pp. 18–22.

Li R, Liu Y, Mu R, Cheng W.(2017). Evaluation of pulsed corona Ognier S. discharge plasma for the treatment of petroleum-contaminated soil. *Environmental Science and Pollution Research International*, 24:pp.1450-1458.

Li, H., Qu, R.. Li, C., Guo, W., Han, X., He, F., Ma, Y. and Xing, B. (2014). Selective removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from soiwashing effluents using biochars produced at different pyrolytic temperatures. *BioresourTechnol*, 33:pp. 745-755.

Liu, D., Coloe, S., Baird, R., and Pedersen, J. (2000). Application of PCR to the identification of dermatophyte fungi. *Journal of medical microbiology,* 49(6):pp. 493-497.

Liu, R., Xiao, N., Wei, S., Zhao, L., An, J. (2014). Rhizosphere effects of PAH-contaminated soil phytoremediation using a special plant named Fire Phoenix. *Sci. Total Environ.*pp.473-474:

Lopez, L. (2014). Study of the biodegradation level of oil from the Orinoco oil belt (Junin area) using different biodegradation scales.Org.*Geochem* .,66:pp.60-69.

Luttrell, E.S. (1963). A Trichometasphaeria perfect stage for a *Helminthosporium* causing leaf blight of Dactyloctenium. Phytopathology. 53(3):281-285

Lundell, T.K., Makela, M.R., and Hilden, K.(2011).Lignin-modyfying enzymes in filamentous basidomycetes ecological, functional and phylogenetic .J. Basic. *Microbiol*., 50:pp. 2-50.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V., and Clark, D.P.(2010). Brock Biology of Microorganisms, Benjamin Cummings, 12th edition,.

Mahmoud, G.A., Koutb, M.M.M., Morsy, F.M.,and Bagy, M.M.K. (2015). Characterization of lipase enzyme produced by hydrocarbons utilizing fungus *Aspergillus terreus*. *Eur J Biol Res,*5(3):pp. 70-77.

Mandal A.(2015). Review on microbial xylanases and their applications. *International Journal of LifeSciences*, 4(3):178-187

Manamgoda, D.S., Cai, L., Bahkali, A.H., Chukeatirote, E., and Hyde K.D.(2011). *Cochliobolus*: an overview and current status of species. *Fungal Divers,*51:pp.3–42. .

Mair, J., Schinner, F. and Margesin, R. (2013) A feasibility study on the bioremediation of hydrocarbon-contaminated soil from an Alpine f

former military site: Effects of temperature and biostimulation. *Cold Regions Science and Technology*. 96(0), pp. 122-128

Marchand, C., St-Arnaud, M., Hogland, W., Bell, T. H., and Hijri, M. (2017). Petroleum biodegradation capacity of bacteria and fungi isolated from petroleum-contaminated soil. Int. *Biodeterior. Biodegradation,* 116:pp. 48–57.

Martin Y.B., Acosta S., Sanchez A., Toledo A., Gonzalez F.,and Garcia R.M.(2012). Study and isolation of aerobic hydrocarbon-degrading bacteria from Cuban shorelines. *Biotechnologia Aplicada*., 29 :pp. 80.

Mauti, G.O., Onguso, J., Kowanga, D.K., Mauti, E.M. (2016). Biodegradation activity of *Aspergillus niger* lipase isolates from a tropical country garage. *J Sci Innov Res*. 5:pp. 15-18.

Michel, J. (2006). Oil behaviour and toxicity, Introduction to coastal Habitats and biological resources for spill response report, NO: hmrd 92-4.

Mohsenzadeh, F., Chehregani, R. A., and Akbari, M. (2012). Evaluation of oil removal efficiency and enzymatic activity in some fungal strains for bioremediation of petroleum-polluted soils. Iran. *J. Environ. Health Sci.Eng*., 15:pp.26.

Mohsenzadeh, F., Nasseri, S., Mesdaghinia, A., Nabizadeh, R., Zafari, D., Khodakaramian, G., Chehregani, A. (2010). Phytoremediation of petroleum-polluted soils: application of polygonum aviculare and its root-associated (penetrated) fungal strains for bioremediation of petroleum-polluted soils. *Ecotox Environ Saf.*, 73:pp.613–619.

Mosher, J.J., Findlay, R.H.. and Johnson, C.G.(2006).Physical and chemical factors affecting microbial biomass and activity in contaminated subsurface sediments. Cana. *J. Microbiol*., 52:pp .397-403.

Moustafa, A.M. (2016). Bioremediation of Oil Spill in Kingdom of Saudi Arabia by using Fungi Isolated from Polluted Soils.*International Journal of Current Microbiology and Applied Science* ,(5): pp. 680-691.

Moye-Rowley, W.S. (2003). Regulation of the transcriptional response to oxidative stress in fungi: similarities and differences. *Eukaryot Cell,* 2:pp.381–389.

Muhammad, S., Muller, T. and Joergensen, R.G. (2008) Relationships between soil biological and other soil properties in saline and alkaline arable soils from the Pakistani Punjab. *JAridEnviron,* 72:pp. 448–457

Mullins, O.C. (2008). Review of the molecular structure and aggregation of asphaltenes and petroleomics. *Spe. J,* 13:pp. 48-57.

Murygina, V., Gaydamaka, S., Gladchenko, M. and Zubaydullin, A. (2016). Method of aerobic–anaerobic bioremediation of a raised Bog in western Siberia affected by old oil pollution. a pilot test. Int. *Biodeter. Biodeg.,* 114:pp.150-156.

Mustafa, A.. A ., Shaymaa, A.A., and Hamid, T.A . (2019) . Biodegradation of Crude Oil Using *Aspergillus* species *,Journal of Biology.Agriculture and Healthcar* University of Basrah, Iraq Vol. 9: No.4.

Nashmeel S. K., and Nareen, Q. F. A. (2016) . Soil fungal population study related to oil pollution along different distances from kawrgosk oil refinery of erbil-iraq Uni. of Salahaddin Al-Anbar. *J. of Agr. Sci.,* Vol. 14:NO. 2.

Neifar, M., Jaouani, A., Ellouze-Ghorbel, R., EllouzeChaabouni, and S., Penninckx, M.J. (2009). Effect of culturing processes and copper addition on laccase production by the white-rot fungus Fomes fomentarius MUCL 35117. *Letters in Applied Microbiology,* 49:PP. 73-78.

Novotný, ý., Svobodová, K., Erbanová, P., Cajthaml, T., Kasinath, A., Lang, E., and Šašek V. (2004). Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. *Soil Biol. Biochem*. 36: pp.1545-1551.

Donnell, D., Wang, L., and Xu, J. (2001). Enhanced heterologous protein production in *Aspergillus niger* through pH control of extracellular protease activity. *Biochem Eng J.*,8:pp.187-193.

Odire, O., and Anyanwu, E.C .(2009). Impact of various concentrations of crude oil on fungal populations of soil. *Int J Environ Sci Technol.,* 6:pp. 211-218.

Odili1 , U.C., Ibrahim, F.B., and Shaibu-imodagbe, E.M.(2006). Utilization of petroleum hydrocarbons by indigenous fungi isolated from a petroleum refinery effluent site in nigeria bayero. *journal of pure and applied sciences,* 12(1):pp. 513 - 520.

Okparanma, R. N., Josiah, M., Ayotamuno, D., Davis,D., and Mary Allagoa.D. (2011). "Mycoremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH)-contaminated Oil-based Drill-cuttings." *African Journal of Biotechnology* 10.27 (June): pp.5149-5156.

Olabemiwo O.M., Adediran G .O., Adekola FA, Adelowo O.O,and Olajire.A .(2011). Preliminary study on biodegradation of Nigerian natural bitumen. *Microbiology Journal*, 1: 139-148.

Oliveira, L.A., Porto, A.L.F., and Tambourgi, EB (2006). Production of xylanase and protease by *Penicillium janthinellum* (CRC 87M-115) f from different agricultural wastes. Biores. *Technol*, 97: 862-867.

Olukunle, O.F., Oyegoke,and T.S .(2016). Biodegradation of Crude-oil by Fungi Isolated from Cow Dung Contaminated Soils. *Nig. J. Biotech.*,31(4):pp. 46-58.

Olukunle, OF., Oyegoke, T.S. (2016). Biodegradation of Crude-oil by Fungi Isolated from Cow Dung Contaminated Soils. Nig. *J. Biotech*. 31(4):pp. 46-58.

Orjil, F. A., Ibiene, A. A., Uzomba, P. C., Itoandon1, E. E. and Nwachukwu , N. C.(2012). Cow dung and water hyacinth nutrient powder good sources of limiting nutrients for bioremediation of hydrocarbon polluter mangrove seamips in the niger delta , Nigeria .*Nigerian Journal of Agriculture, Food and Environment,* 8(2):pp.52-58

Osmani, SA., and Mirabito, PM. (2004). "The early impact of genetics on our understanding of cell cycle regulation in *Aspergillus nidulans*". *Fungal Genet Biol*,41 (4):pp. 401–410 .

Page, A. L., Miller, R.H., and Kenney, D.R. (1982) . Methods of Soil analysis part (2). 2nd ed. Agronomy 9. Am. Soc. Agron. Madison, Wisconsin.

Park ,HG., Managbanga,JR., Stamenova,E., and Jong,SC. (2004).Comparative analysis of common indoor *Cladosporium* species based on molecular data and conidial characters. *Mycotaxon*, 89(2):pp.441-451. .

Prasad, M.N.V., and Katiyar, S.C. (2012). Drill cuttings and fluids of fossil fuel exploration in north-eastern India: environmental concern and mitigation options. *Current Science* 98(12): pp.1566–1569.

Pastor, F.J., Guarro, J. (August 2008). "*Alternaria* infections: laboratory diagnosis and relevant clinical features". *Clinical Microbiology and Infection.* 14 (8):pp 734–746.

Patil, M.G., Pagare, J., Patil, S.N. and Sidhu, A.K. (2015). Extracellular enzymatic activities of endophytic fungi isolated from various medicinal plants. Int. *J. Curr. Microbiol*, App. Sci., 4(3):pp. 1035-1042.

Pepper, I. L., Gerba, C.P., and Gentry, T. J.(2015). Environmental microbiology. Elsevier Inc. *Academic Press*, 681 pp.

Perelo, L.W. (2010). Review: in situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. *J Hazard Mater* ,177:pp. 81–89.

Perfumo, A., Banat, I.M.,and Marchant, R. (2007). Thermally enhanced approaches for bioremediation of hydrocarbon-contaminated soils. *Chemosphere* 66:pp. 179–184.

Pokorny, D., Friedrich, J.,and Cimerman, A .(1994). Effect of nutritional factors on lipase biosynthesis by *Aspergillus niger*. *Biotechnol Lett.*,16:pp. 363-366.

Polizeli M.L.T.M., Rizzatti A.C.S., Monti R., Terenzi H.F., Jorge J.A., and Amorin D.S. (2005) Xylanases from fungi: properties and industrial applications. Appl. *Microbiol. Biotechnol.*, 67:pp. 577-591.

Prasad, M.N.V., and Katiyar, S.C. (2012). Drill cuttings and fluids of fossil fuel exploration in north-eastern India: environmental concern and mitigation options. *Current Science* 98(12): pp.1566–1569.

Rateb, M. E. Ebel, R.(2011). Secondary metabolites of fungi from marine habitats. Nat. Prod. Rep., 28:pp.290 – 344.

Radhika, D., Shuman, A., and Khardenavis, H. (2016).diverse metabolic capacities of fungi for bioremadition, Indian. *journal of microbiology*, (56): pp.247 -264

Rao, C.Y., C. Kurukularatne, J.B., Garcia-Diaz, S.A., Kemmerly, D., Reed, S.K., Fridken, and Morgan.J. (2007). Implications of detecting the mold *Syncephalastrum* in clinical specimens of New Orleans residents after hurricanes Katrina and Rita. *Journal of Occupational and Environmental Medicine,* 49:pp.411-416.

Rousk, J., Bååth, E., Brookes, P. C., Lauber, C. L., Lozupone, C., Caporaso, J. G., et al. (2010). Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *ISMEJ*. 4:pp. 1340–1351.

Ruibal, C., Gueidan, C., Selbmann, L., Gorbushina, A.A., Crous, PW., Groenewald, JZ., Muggia, L., Grube, M., Isola, CL., Schoch, D., Staley, JT., Lutzoni, F., and De Hoog, GS. (2009). Phylogeny of rock-inhabiting fungi related to Dothideomycetes. *StudMycol.,* 64:pp. 123–133.

Sabah, G., Jatau , E., and Whong, C. (2016) . Assessment of biodegradation ability of *Aspergillus niger* isolated from mechanic workshops soilon refinery effluent and petroleum hydrocarbons .*Int. J. Sci. Rese. Pub*.,6 (3) :pp. 381-389.

Sabotic, J., and Kos, J. (2012). Microbial and fungal protease inhibitors—current and potential applications. *ApplMicrobiolBiotechnol*, 93:pp.1351-1375.

Salvachua, D., Prieto, A., Lopez-Abelairas, M., Ku-Chau, T., Martinez, AT., and Martinez, A.J. (2011). Fungal pretreatment: An alternative in second generation ethanol from wheat straw. *Biores. Technol.,* 102:pp. 7500- 7506.

Sambrook, H. C. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor,NY*.

Sapre, M.P., H. Jha, and Patil, M.B. (2006). Purification and characterization of a thermostabile-cellulose free xylanase from *Syncephalastrum racemosum*. *Journal of General and Applied Microbiology,* 51: pp.327-330.

Sarma, H., Islam, NF., Borgohain, P., Sarma, A., and Prasad M.N.V. (2016). Localization of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals in surface soil of Asia"s oldest oil and gas drilling site in Assam, northeast India: Implications for the bio-economy. *EmergingContaminants*,2:pp. 119–127.

Sato, H., Tsujino, R., Kurita, K., Yokoyama, K., and Agata, K.(2012). Modelling the global distribution of fungal species: New insights into microbial cosmopolitanism. *Mol. Ecol.,* 21:pp.5599–5612.

Scherr, K., Aichberger, H.,and Braun, R. (2007) Influence of soil fractions on microbial degradation behavior of mineral hydrocarbons. *Eur J Soil Biol.,* 43: pp.341–350.

Schipper, M.A.A. (1984). "A revision of the genus *Rhizopus*.. The *R. stolonifer*-group and R. oryzae". *StudiesinMycology*., 25: pp.1–19.

Senem U., and Hanife B.(2016). Bioremediation of total petroleum hydrocarbons in crude oil contaminated.*Turcica Univercity,* 59(2) : pp.57-60 .

Serna-Chavez, H., Fierer, N., and Van-Bodegom, P. M. (2013). Global drivers and patterns of microbial abundance in soil. Glob. *Ecol. Biogeogr*,22: pp.1162-1172.

Sette, L.D., Oliveira, V.M. and de Rodrigues, M.F.(2008). Microbial lignocellulolytic enzymes: industrial applications and future perspectives. *Microbiol. Aust*., 29:pp. 18-20.

Shah, M.P. (2016). Microorganisms in bioremediation. *J. Bioremd. Biodeg*.,7(4):pp. 45- 56.

Shahgholi, H. (2014). Factors controlling degradation of pesticides in the soil environment: A review. *Agri. Sci. Devlop*., 3(8):pp. 273-278.

Sharma, K.B.,and Arora, D.S. (2011). Biodegradation of paddy straw obtained from different geographical locations by means of *Phlebia* sp. for animal feed. *Biodegradation*, 22:pp. 143-152.

Sharma,D., Sharma,B., and Shukla, A.K.(2011). "Biotechnological approach of microbial lipase: a review," *Biotechnology*, vol. 10, no. 1, pp. 23–40.

Shen, T., Pi, Y., Bao, M., Xu, N., Li, Y., and Lu, J. (2015). Biodegradation of different petroleum hydrocarbons by free and immobilized

microbial consortia. *Environmental Science: Processes and Impacts,* 17(12):pp. 2022–2033.

Sheifert, K., Jones, G.M., Games, W., and Kendrick, B.(2011). The genera of hyphomycetes. *CBS-knaw Fungal Biodiversity Center Utrecht* ,the Netherland .485 pp.

Sierra,G.(1957). A simple method fo, the detection of lipolytic activity of microorganisms and som observation on the influence of the component between cell and fatty substrates. *Ned.3.Hyg.,* 23:pp.15-22

Sihag, S., Pathak, H.,and Jaroli, D. (2014). Factors affecting the rate of biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *Int J Pure App Biosci* 2:pp. 185–202.

Silva, I.S., Grossman, M., and Durrant, L.R. (2009). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons under microaerobic and very low oxygen conditions by soil fungi. Int. *Biodeterioration Biodegradation*, 63:pp. 224- 229 .

Simmons, E.G. (1969). Perfect states of *Stemphylium*. *Mycologia*. 61(1):1-26

Singh ,K., Sharma, R., Sharma, A., and Chandra, S.(2012).Bioremediation fungal flora isolated from petroleum contaminated soil in rural area of Jaipur distict Rajasthan*, J. Biotechnol.*, 1:pp.1-7.

Singh, B., Kunze, G.,and Satyanarayana T (2011) Developments in biochemical aspects and biotechnological applications of microbial phytases. *Biotechnol Mol Biol Rev.*, 6(3):pp.69–87.

Singh, B., Sapna, J. J., and Satyanarayana, T. (2012). Fungal phytases for combating environmental phosphorus pollution and ameliorating the nutritional status of non-ruminants. Energy-water-waste nexus for environment management. Narosa Publishing House, New Delhi, pp. 292–301.

Simmons, Emory G. (January 1967). "Typification of *Alternaria, Stemphylium,* and *Ulocladium*". *Mycologia, 59* (1):pp. 67–92.

Sivanesan A (1985). New species of Bipolaris. Transactions of the British *MycologicalSociety,pp.* 84: 403–421.

Si-Zhong, Y., Hui-Jun, J., and Zhi, W. (2009). Bioremediation of oil spills in cold environments: a review. *Pedosphere*, 19:pp. 371–381.=161

Smits, J.P., Sonsbeek, H.M., Rinzema, A., and Tramper, J. (1998). Solid-state fermentation- a mini review. *Agro Food Ind High Tech*., 9:pp.29–36.

Sohlberg, E., Bomberg, M., Miettinen, H., Nyyssönen, M., Salavirta, H., Vikman, M. and Itävaara, M.(2015). Revealing the unexplored fungal communities in deep groundwater of crystalline bedrock fracture zones in Olkiluoto *.Finland. Front. Microbiol.*, (6):pp. 573

Soni, S., K. (2009). Phytase from *Aspergillus niger* NCIM 563:Isolation Purification, Characterization and its Applications .

Speight, J.G. (2017). Sources and types of organic pollutants. In: Environmental organic chemistry for engineers. Kidlington, Oxford, United Kingdom: Butterworth Heinemann, 153-201.

Sridevi B., and Charya M.A.S.(2013). Isolation, identification and s screening of potential cellulase-free xylanase producing fungi. *African Journal of Biotechnology*. 10(22): 4624-4630.

Spini, G., Spina, F., Poli, A., Blieux, A-L., Regnier, T., Gramellini, C., Varese. G.C. and Puglisi E. (2018) Molecular and Microbiological Insights on the Enrichment Procedures for the Isolation of Petroleum Degrading Bacteria and Fungi. Front. *Microbiol.*, 9:pp.25-43.

Steliga,T .(2012). Role of fungi in biodegradation of Petroleum hydrocarbons in drill west. oil and gas institute, krakow, poland. pol. *J. Environ. stud* .,Vol. 21 No (2) : pp.471_479.

Sterflinger, K.(2010). Fungi: Their role in deterioration of cultural heritage. *Fung. Biol. Rev.,* 24: pp.47–55.

Suja, F., Rahim, F., Taha, M.R., Hambali, N., Razali, M.R. Khalid, A. and Hamzah, A. (2014). Effect of local microbial bioaugmentation and biostimulation on the bioremediation soil based on laboratory and field observations. Int. *Biodet. Biodeg,.* 90: pp.115-122.

Sunita, j.v. (2017).microbial degradation of petolleum hydrocarbon. *Bio resource technology,* (223): pp.277-286.

Sunitha, V.H., Nirmala Devi, D. and Srinivas, C. (2013). Extracellular enzymatic activity of endophytic fungal strains isolated from medicinal plants. World. *J. Agri. Sci.,* 9 (1):pp.1-9.

Thapa, B. and Ghimire, A. (2012). Areview on bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil. asian institute of technology, pathumthani Bangkok, Thailand. kathmandu university journal of science,. vol. 8, pp 164-170.

Thenmozhi, R., Arumugam, K., Nagasathya, A., Thajuddin, N., & Paneerselvam, A. (2013). Studies on mycoremediation of used engine oil contaminated soil samples. *Advances in Applied Science Research,* 4(2): 1.

Thomas, J., Walsh, M.D., Fidsa, F . (2018).Larones medically important fungi. weill cornell medicine of cornell university, NewYork–Presbyterian Hospital.

Tsuda, M., and Ueyama, A.(1981). Pseudocochliobolus australiensis the ascigerous state of *Bipolaris australiensis* . *Mycologia,*73(1),88-96.

Uday, U.S.P., Choudhury, P., Bandopadhyay, T.K., and Bhunia, B. (2016). Classification, mode of action and production strategy of xylanase and its application for biofuel production from water hyacinth. *International journal of biological macromolecules*, 82:pp.1041-1054.

Uzoamaka, GO., Floretta, T., and Florence, MO, (2009) Hydrocarbon Degradation Potentials of Indigenous Fungal Isolates from Petroleum Contaminated Soils. *Journal of Physical and Natural Sciences*, 3(1):pp. 1–6.

Van Hamme,J.D., Singh,A., and Ward,O.P. (2003). "Recent advances in petroleum microbiology." *Microbiology and Molecular Biology Reviews,* vol. 67, no. 4: pp. 503–549.

Van, J.B.B., and E. G. Funhoff, E.G.(2007). "Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation." *Applied Microbiology and Biotechnology,* vol. 74, no. 1: pp. 13–21,.

Vasconcelos, A.F.D., Barbosa, A.M., Dekker, R.F.H., Scarminio, I.S., and Rezende, M.I. (2000). Optimization of laccase production by Botryosphaeria sp. in the presence of veratryl alcohol by the response-surface method. *Process Biochemistry,* 35(10): 1131-1138.

Vázquez-Luna, D. (2012). Environmental bases on the exploitation of crude oil in the world . environmentalbases-on-the-exploitation-of-crude-oil-in-mexico. pp. 89-92.

Vesper, S. J., Dearborn, D. G., Elidemir, O., and Haugland, R. A. (2000). Quantification of siderophore and hemolysin from *Stachybotrys chartarum* strains, including a strain isolated from a child with pulmonary hemorrhage and hemosiderosis. *Appl. Environ. Microbiol*, 66: pp.2678-2681

Vidali,M.(2011).Bioremedation an overview. *Pure.Appl. Chem*,73:1163-1172. =

Vishwanatha, K.S., Rao, A.G., Singh, S.A. (2010). Acid protease production by solid-state fermentation using Aspergillus oryzae MTCC 5341: optimization of process parameters. *J Ind Microbiol Biotechnol* 37:pp.129-138.

Vries, G.A. de. 1952. Contribution to the knowledge of the genus *Cladosporium*. :1-121

Wang, C., Sun, H., Li, J., Li, Y., and Zhang, Q. (2009). Enzyme activities during degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by white rot fungus Phanerochaete chrysosporium in soils. *Chemosphere,* 77:pp. 733–738.

Wang, Y., Gao, X., Su, Q., Wu, W., and An, L. (2007). Expression of heat stable phytase from *Aspergillus fumigatus* in tobacco (Nicotiana tabacum L. cv. NC89). Ind *J Biochem Biophys ,* 44:pp.26-30.

Walworth, J., Harvey, P. and Snape, I. (2013) Low temperature soil petroleum hydrocarbon degradation at various oxygen levels. *Cold Regions Science and Technology*.96(0), pp. 117-121

Watanabe,T., (2012). Pictorial atlas of soil and seed fungi.

Watanabe,T., (2002). Pictorial atlas of soil and seed fungi.

Wiltshire, S.P. (1933). The foundation species of Alternaria and *macrosporium*. *Transactions of the British Mycological Society*. 18(2):135-160

Winter, G. (1884). Rabenhorst's Kryptogamen-Flora, Pilze - Ascomyceten. *Ed*. 2, 1(1):1-192

Woudenberg, J.H.C.; Groenewald, J.Z.; Binder, M.; Crous, P.W. (2013). *Alternaria redefined*. *Studies in Mycology*. 75:171-212

Worton, D. R., Zhang, H., Isaacman-VanWertz, G., Chan, W. H., Wilson, K. R. and Goldstein, A. H. (2015). Comprehensive chemical characterization of hydrocarbons in NIST standard reference material 2779 gulf of Mexico crude oil, Environ. *Sci. Technol*, 49(22):pp.13130-13138.

Wu, M.; Li, W.; Dick, W.A.; Ye, X.; Chen, K. and Kost, D.(2017). Bioremediation of hydrocarbon degradation in a petroleum

contaminated soil and microbial population and activity determination. *Chemosphere*,169: pp.124-130.

Wu, T.Y., Mohammada, A.W., and Jahim, J.M. (2006). Investigations on protease production by a wild-type *Aspergillums terreus* strain using diluted retentate of pre-filtered palm oil mill effluent (POME) as substrate. *EnzymMicrobTechnol*, 39:1223-1229.

Wurzbacher, C., Kerr, J., and Grossart, H. (2011. The dynamical processes of biodiversity .Case studies of evolution and spatial distribution, *Rijeka*, *Croatia*, V (1). pp. 227–258.

Yan H. H., Chen J, and Song X. Y. (2009). Genetic polymorphism and physiological differentiation of *Curvularia lunata* on maize. *Journal of Maize Sciences*, 17, 139–142.

Yang, S., Jin, H., Wei, Z., He, R., Ji, Y., Li, X. and Yu, S. (2009) Bioremediation of Oil Spills in Cold Environments: AReview. *Pedosphere*[online]. 19(3): pp. 371-381.

Yang, W., He, Y., Xu, L., Zhang, H., and Yan, Y. (2016). A new extracellular thermo-solvent-stable lipase from Burkholderia ubonensis SL-4: Identification, characterization and application for biodiesel production. *J Mol Cat B: Enz.*, 126: pp.76-89.

Ye, J.-S., Yin, H., Qiang, J., Peng, H., Qin, H.-M., Zhang, N., and He, B.-Y. (2011). Biodegradation of anthracene by *Aspergillus fumigatus*. *Journal of hazardous materials*, 185(1): 174–181.

Yong-chao, G., Shu-hai, G.; Jia-ning, W., DanLi ,H.W. and De-Hui, Z.(2014). Effects of different remediation treatments on crude oil contaminated saline soil. *Chemosphere,*117: 486-493.

Yuan, SY., Wei, SH., and Chang, B.V. (2001). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a mixed culture. *Chemosphere* 41:pp. 1463.

Zebulun, H.O., Isikhuemhen, O.S., and Inyang, H. (2011). Decontamination of anthracene-polluted soil through white rot fungus-induced biodegradation. *The Environmentalist,* 31(1):pp. 11-19.

Zeng, J., Liu, Z., Song, L., Lin, X., Zhang, H., Shen, S. and Chu , H.(2016).Nitrogen fertilization directly affects soil bacterial diversity and indirectly affects bacterial community composition. *Soil Bio. Bioche.*, 92: 41- 49.

Zhang, J.H., Quan-Hong, A., Xue, A., Gao, H., Xinmaa. A., and Pingwang, B. (2015). Degradation of crude oil by fungal enzyme preparations from *Aspergillus* spp. for potential use in enhanced oil recovery. *J. Inter. Biodet. Biodeg.*, 62: 21-30.

Zhao, J., Zeng, J., De Hoog, G.S., Attili, A., Prenafeta, B. F.X. (2010). Isolation and identification of black yeasts by enrichment on atmospheres of monoaromatic hydrocarbons. *Microb Ecol.*, 60:pp.149–156

Zhao, R.L., Li, G.J., Sa´nchez-Ramı´rez , S., Stata, M., Yang, Z. L., Wu, G., Dai, Y.C., He, S.H., Cui, B.K., Zhou, J.L., and Wu, F.(2017). A six-genephylogenetic overview of basidiomycota and allied phyla with estimated divergence times of higher taxa and a phyloproteomics perspective. *Fung. Dive.*, 84 (1):pp.43-74.

Summary

Oil pollution is considered as one of the most dangerous types of pollution on all environmental systems, especially the soil. It is the final basis for these pollutants and it contains many toxic compounds. It is also considered harmful for the organisms. The study aims at isolation of fungi that exists the polluted soil of oil. It also aims at examining the fungi, its enzymatic activity, and its bioremediation. The fungi were isolated by direct culture method and by using several culture media, including PDA, MEA, and MSM medium.

The study was conducted during September 2020 to April 2021 in the laboratory of the mycology of college of Science, University of Misan. One hundred and twenty of polluted soil samples by crude oil were collected from East of Misan Governorate

Twenty seven species were isolated and diagnosed from soil contaminated with crude oil. The isolated fungi were affiliated to the Ascomycota (Anomorphic) with a rate of 88.8%. Three species for Zygomycota appear with a rate of 11.2 % . The total number of isolated fungi during the study reached 235. The *A.niger* appeared with the highest incidence rate of occurrenc 42.5 % and frequency 21.70 %. The *A. alternata* manifested with an occurrence of 39.16 % and a frequency of 20%. The *Rhizpus oryzae* appeared with a occurrence rate of 17.5 % and a frequency of 8.39. Eight species gave occurrence rate 0.83% and frequency 0.42.

Eight species were isolated for the first time in Iraq is: *Alternaria tenuissima, Bipolaris australeinsis ,Curvularia lunata Syncephalastrum racemosum, Stachybotrys charatarum ,Nigrospora oryzae, R. oryzae, U.botrytis.*

The results of the physical analysis of the contaminated soil showed values that were almost appropriate for the growth of fungi.

The pH recorded values between 6.4 -7.3, the conductivity ranged between 41.1- 190.4 ms, and water content showed a ranging between 62-88%.

The ability of ten isolated fungi were tested to secrete five enzymes: Lipase, Protease, Phytase, Laccase, and Xylanase. All the secreted the Lipase enzyme except *B.saccharia*. tested fungi showed As for the Xylanase enzyme, eight species of fungi showed the ability of its secretion. The Protease enzyme gave seven types of secretion. Laccase and Phytase showed dissimilar ability. The fungi which were given secretions for all enzymes are *A.niger, A.tenuissima,* and *C.cladosoprioides*.

Eight species tested during the study of the ability of fungi on degraded crude oil. It was found that they were able to degraded crude oil after the seven and the thirty days of incubation periods but with slightly different rates. All tested species had a higher ability to bioremediation oil during the two incubation periods between 70% - 75%, except *A.terreus* which showed between 25 -30 %. The tested species varied in their composition of biomass from mycelium in flask.

The study concluded that some fungi had the ability to colonize soil contaminated with crude oil and had enzymatic activity that had a role in the bioremediation of crude oil.

Republic of Iraq
Ministry of Higher Education
and Scientific Research
University of Misan College of Science

The Characterization of Isolated Fungi and their Enzymatic Activity to Degraded Crude Oil Compounds in Misan Province

Thesis
Submitted to the council of College of Sciences – University of Misan
In Partial – Fulfillment of the Requirements for the Degree Master of Science in Biology

By
Ahmed Radhi Musa
B.Sc. Biology
Supervised by
Prof.Ali A. Kasim (Ph.D.)

2021A.D **1443.H**