

## توصيف المجتمعات الجرثومية المعزولة من ترب سورية ملوثة بالديوكسينات

صابرين محفوظ\* د. غيثاء منصور\*\* د. عبد السميع هنانو\*\*\*

### الملخص

تُعد الديوكسينات إحدى أكثر الملوثات البيئية خطورة وأكثرها سمية، وتتنمي إلى مجموعة الملوثات العضوية المعقدة؛ والمعروفة بمقاومتها لعمليات التفكك يساعدها في ذلك هيكلها الكيميائي الثابت، ينتج عن ذلك تراكمها حيوياً، ومن ثم تضخمها حيوياً، الأمر الذي يُهدد صحة الكائنات الحية بمختلف أشكالها، ومن ثم التأثير في سلامة النظام البيئي. تُمثل الترب مخزناً أساسياً لمركبات الديوكسين ومصدراً لانتشارها في البيئة، فضلاً عن تعرض الأحياء الدقيقة المستوطنة لهذه الترب الملوثة لمستويات عالية من الديوكسينات ما يؤثر في تنوعها الحيوي وخصائصها الوراثية والوظيفية. لذا هدف البحث إلى تسليط الضوء على واقع الترب المحلية واحتمالية تلوثها بالديوكسينات، إضافة إلى توصيف المجتمعات الجرثومية المستوطنة لهذه الترب الملوثة بحثاً عن سلالات تتسم بقدرتها على التفكيك الحيوي للسموم البيئية بما فيها الديوكسينات.

\* طالبة ماجستير - قسم علم الحياة النباتية (أحياء دقيقة) - كلية العلوم - جامعة دمشق.

\*\* أستاذ مساعد - قسم علم الحياة النباتية - كلية العلوم - جامعة دمشق.

\*\*\* مدير بحوث - قسم التقانة الحيوية والبيولوجيا الجزيئية - هيئة الطاقة الذرية السورية.

أنتقيت سبعة مواقع لجمع عينات التربة بوصفها مصدراً لانبعاث الديوكسينات. بينت نتائج الدراسة أن ترب الموقع C بالقرب من مصفاة حمص كانت الأكثر تلوثاً، في حين ترب مواقع معضمية الشام A1, A2, A3، والسويداء D الملوثة بانبعاثات حرق النفايات كان مستوى التلوث فيها متوسطاً، أما المستوى الأخفض من التلوث بالديوكسين فقد سُجل في عينات التربة لكل من موقع دير العصافير B الملوثة بمياه صرف صناعي ومحلي، وموقع معضمية الشام A4 المجموعة من أرض زراعية. وُصِف المجتمع الجرثومي المعزول من الترب الملوثة جزئياً بواسطة تسلسل المورثة 16srRNA، وبينت نتائج الوفرة الحيوية للأنواع الجرثومية ضمن المواقع المدروسة أن جنس *Bacillus* يليه جنسي *Pseudomonas*، *Acinetobacter* هي الأجناس الأكثر وفرة بنسبة 37.38%، 21.49%، 14.10% على الترتيب. نظراً لتعايش هذه الأنواع الجرثومية في ترب ملوثة كان لابد من البحث في جينومها عن مورثات مسؤولة عن مسارات التفكيك الحيوي لهذه الملوثات، أشارت نتائج الكشف الجزيئي للمورثتين Cytochrome P450 (CYPBM3)، angular dioxygenase (AD) وجود 22 سلالة جرثومية تمتلك مورثة AD، و14 سلالة حاوية على المورثة CYPBM3. أخيراً، أُجري تقييم القدرة الحيوية للسلالات الجرثومية على النمو بوجود مركب "2,3,7,8-TCDD" رباعي كلورو ثنائي بنزو ديوكسين أشد الديوكسينات سميةً.

**الكلمات المفتاحية:** التربة، الديوكسينات، المجتمع الجرثومي، التفكيك الحيوي، السيتوكروم cytochrome P450 (CYPBM3)، دي أوكسجيناز angular dioxygenase.

## **Characterization of Bacterial communities isolated from dioxins contaminated soils**

**Sabrin Mahfouz\***   **Dr. Gh. Mansour\*\***   **Dr. A. Hanano\*\*\***

### **Abstract**

Dioxins are one of the most dangerous and toxic environmental contaminants, belong to persistent organic pollutants, which known for their resistance to degradation process, helped by their stable chemical structure, which Leads to their bioaccumulation and biomagnification threatened the health of living organisms, thus affecting the Ecosystem safety. Soils are an essential store of dioxin compounds and a source of their spread within the environment, Besides, the microorganisms endemic to these polluted soils are exposed to high levels of dioxins, which affects their biological diversity and their genetic and functional characteristics. Therefore, the research aimed to highlight the reality of local soils and the possibility of their contamination with dioxins, in addition to characterization of the bacterial communities endemic to these contaminated soils in search of strains characterized by their ability to biodegrade environmental

---

\* Master student at Department of Plant Biology(microbiology), Faculty of Science, Damascus University.

\*\* Associate Prof. at Department of Plant Biology, Faculty of Science, Damascus University.

\*\*\* Research Director, department of Molecular Biology and Biotechnology, Atomic Energy Commission of Syria (AECS).

toxins, including dioxins. Seven soil sampling sites were selected as a source of dioxins emission. The results of the study showed that the soils of Site C near the Homs Refinery were the most polluted, while the soils of Al-Moadamyeh site A1, A2, A3, and D Al-Suwayda polluted with emissions from waste burning; the level of pollution was medium, and the lowest level of dioxin contamination was recorded in each of the soil samples for the Deir al-Asafir site B Contaminated with industrial and local wastewater, and samples of the site of Maadamiyat al-Sham A4 collected from agricultural land. Bacterial communities which isolated from contaminated soils were characterized molecularly by 16srRNA sequencing, The results of the biological abundance of the bacterial species within the studied sites showed that the genus *Bacillus* followed by the genus *Pseudomonas* and *Acinetobacter* was the most abundant by 37.38%, 21.49%, and 14.10%, respectively. Due to the coexistence of these bacterial species in polluted soils, it was necessary to search their genome for genes responsible for the biodegradation pathways of these pollutants. The results of molecular detection of the two genes Cytochrome P450 (CYPBM3) and angular dioxygenase (AD) indicated the presence of 22 bacterial strains that have the AD gene, and 14 container strains on the CYPBM3 gene. Finally, the evaluation of the biological ability of the bacterial strains to grow was carried out in the presence of the most toxic compound tetrachlorodibenzo-p-dioxin “2,3,7,8-TCDD”.

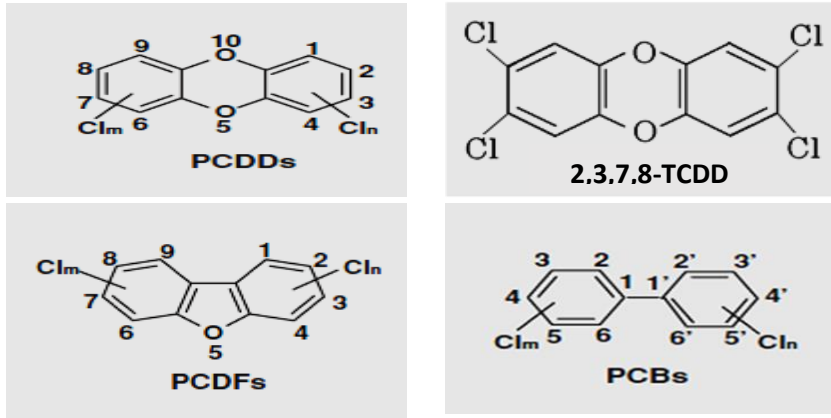
**Keywords:** soil, dioxins, bacterial community, biodegradation, cytochrome-P450 (CYPBM3), angular dioxygenase(AD).

### المقدمة:

تعد التربة جزءاً حيوياً من البيئة الطبيعية؛ إذ تمثل موطناً للكائنات الحية الدقيقة من جراثيم وشعاعيات وفطريات وطحالب وغيرها (Bhattarai *et al.*, 2015). تتنوع الكائنات الحية الدقيقة التي تستوطن الترب ويختلف عددها باختلاف طبيعة التربة والظروف البيئية المحيطة بها، تؤثر هذه الأحياء في خواص التربة الطبيعية والكيميائية، كما تتحكم في مقدرتها الإنتاجية (Ramesh *et al.*, 2019). تتفرد الأحياء الدقيقة بدورها الفعّال في عمليات المعالجة الحيوية Bioremediation لملوثات بيئية مختلفة (White *et al.*, 1998, Abatenh *et al.*, 2017, Wu *et al.*, 2017, Yuniati, 2018)، يساعدها في ذلك مرونتها في العيش والتكيف ببيئات متنوعة وتحملها للظروف البيئية المختلفة، إضافة لقدراتها الاستقلالية المميزة التي تمكنها من تفكيك الملوثات وتحويلها لمركبات أقل سمية (Abatenh *et al.*, 2017)؛ مما يجعلها أداة أساسية لحل مشكلة التلوث البيئي لاسيما تلوث التربة، والذي يُعرف بكونه أي تغيير فيزيائي أو كيميائي أو حيوي في خواص التربة الطبيعية، يؤثر في خصوبتها وقدرتها الإنتاجية. تتنوع مصادر تلوث التربة ومعظمها ناجم عن نشاطات بشرية (Cachada *et al.*, 2018)، ومن ملوثات الترب الأكثر خطورة الديوكسينات، والتي تُصنف مع الملوثات العضوية المعندة Organic Compounds Persistent (Stockholm Convention, 2001)، تُعرف بأنها هيدروكربونات مكلورة ذات ثباتية كيميائية عالية مما يجعلها مقاومة لعمليات التفكك في البيئة (Alcock *et al.*, 1996, Field *et al.*, 2008)؛ إذ تتخذ من الترب مخزناً أساسياً لها تتراكم ضمنها بتركيز عالية مؤثرة في خصوبتها (Wittich, 1998)، تتسم الديوكسينات بأنها مركبات محبة للدهس (Alcock and Jones, 1996) لذا تميل للتراكم حيوياً في الأنسجة الدهنية الحيوانية

والبشرية مسببة مجموعة من التأثيرات السمية أكثرها حدة قدرتها على التسبب في السرطان) (McGregor *et al.*, 1998, Rostami *et al.*, 2011).

تتألف عائلة الديوكسينات من ثلاث مجموعات: 75 من الديوكسينات ثنائية البنزن عديدة الكلور (PCDDs) يُصنف ضمنها المركب الأكثر سمية رباعي كلورو ثنائي بنزو ديوكسين (tetrachlorodibenzo-p-dioxin يُعرف اختصاراً بـ 2,3,7,8-TCDD (Matsumura *et al.*, 1973)، و135 من الفورانات ثنائية البنزن عديدة الكلور (PCDFs)، إضافة إلى مركبات ثنائي الفينيل عديد الكلور (PCBs) منها 12 مركب يُعرف بمشابهات الديوكسين (Dioxin-like) (Thomas O. Tiernan, 1985, Alcock and Jones, 1996). البنية الكيميائية للديوكسينات موضحة في الشكل (1).



الشكل (1) الهيكل الكيميائي للديوكسينات والمركبات المشابهة لها (Inui *et al.*, 2014, Sakaki *et al.*, 2013)

يمكن للديوكسينات أن تتشكل طبيعياً نتيجة لحرائق الغابات أو النشاط البركاني (Gribble, 1994)، لكن المستويات الأعلى من الديوكسينات تنبعث من مصادر صناعية بفعل البشر؛ إذ تتشكل عرضياً بوصفها منتجات ثانوية by-products لصناعات كيميائية عديدة منها: تبييض الورق، وصناعة مبيدات الآفات pesticides وصناعة الكلور (Hutzinger *et al.*, 1985)، كما تعد عملية حرق النفايات من أخطر مصادر انبعاثه (Thomas O. Tiernan, 1985 , Wittich, 1998, Tue *et al.*, 2016)، وكذلك احتراق الوقود الأحفوري (الفحم والنفط والغاز الطبيعي) (Dopico *et al.*, 2015).

تتأثر الكائنات الحية الدقيقة المستوطنة للتربة الملوثة بالديوكسينات، والذي ينتج عنه مدى واسع من الاستجابات الحيوية التي تتمثل بتغييرات في التنوع الحيوي والخصائص الوظيفية والوراثية للجماعات الميكروبية (Kimura *et al.*, 2009)، لذلك يعتمد على الأحياء الدقيقة في رصد حالة التربة؛ إذ تقوم بأدوار مهمة في إصلاح التربة المتضررة ونزع سمية المواد الكيميائية الخطرة الموجودة في التربة بما فيها الديوكسينات (Cerniglia *et al.*, 1979)، وهذا ما دفع الباحثين للتوجه نحو تقانة المعالجة الحيوية bioremediation لمعالجة البيئات الملوثة، والتي تتميز بأنها ذات فاعلية عالية وتكلفة اقتصادية منخفضة نسبياً، كما تمثل تقانة صديقة للبيئة (Vidali, 2001, Gulfishan *et al.*, 2021)، تعتمد على استعمال الكائنات الحية الدقيقة التي تمتلك قدرة حيوية تمكنها من خفض سمية الملوثات أو تفكيكها محولة إياها لمصدر للطاقة والكربون قادرة على الاستفادة منه وإصلاح بيئتها المتضررة بأن معاً، تُعد دراسة المجتمعات الميكروبية في البيئات الملوثة بالديوكسينات محط أنظار الدراسات البيئية الحديثة بحثاً عن أنواع وسلالات يمكن اعتمادها بوصفها مفككات لهذه الملوثات شديدة السمية لمختلف الكائنات الحية والمهددة لسلامة النظام

البيئي، وهذا ماسنركز عليه في دراستنا لتوصيف المجتمع الجرثومي المتعايش في ترب ملوثة مجموعة من ترب سورية محلية لانتقاء سلالات قادرة على تفكيك الديوكسين الأكثر سمية.

#### مبررات البحث وأهدافه:

توضح أبحاث عديدة مدى خطورة الديوكسينات لتأثيراتها السمية التراكمية في أجسام الكائنات الحية، إضافة إلى خطرها على البيئة نتيجة ثباتيتها العالية وصعوبة تفكيكها، كما تتخذ الديوكسينات من الترب مستودعاً رئيساً لها وتتراكم ضمنها بتركيز عالية مما يؤدي لتدهور خصوبتها، فضلاً عن تأثر الكائنات الحية الدقيقة المستوطنة لهذه الترب، والذي ينتج عنه مدى واسع من استجابات حيوية؛ إذ تتمثل بتغييرات في التنوع الحيوي والخصائص الوظيفية والوراثية للمجتمعات الميكروبية. تتميز الأحياء الدقيقة، ولاسيما الجراثيم، بقدرة حيوية فريدة تمكنها من التعامل مع الملوثات العضوية المعقدة؛ إذ تعمل على تفكيكها والاستفادة منها بوصفها مصدراً للطاقة والكربون. ونظراً لزيادة مصادر انبعاث الديوكسينات في السنوات الأخيرة، كان لا بد من السعي نحو إيجاد سبل فعالة لمعالجة هذه المركبات السامة وتفكيكها بالاستفادة من الخواص الحيوية للأحياء الدقيقة لاسيما الجراثيم التي تستوطن الترب الملوثة. لذلك هدف البحث إلى: تحديد مستوى التلوث بالديوكسينات في عينات ترب مجموعة من مناطق محلية متفرقة، وتوصيف الجراثيم المتعايشة ضمن الترب الملوثة بالديوكسينات جزيئياً، والبحث في جينوم السلالات الموصفة عن تسلسل لإحدى المورثات المسؤولة عن مسارات التفكيك الحيوي للديوكسينات، إضافة لاختبار القدرة الحيوية للجراثيم على تفكيك مركب 2,3,7,8-TCDD بشروط المختبر.



## مواد وطرائق العمل **Materials & Methods**:

### 1. جمع عينات التربة:

جمعت 20 عينة تربة (S1-S20)؛ إذ اختيرت مواقع عديدة لترب يُحتمل تلوثها بالديوكسينات أو المركبات المشابهة لها بوصفها مصدراً لانبعاثها، اختيرت ثلاث نقاط متفرقة من كل موقع، جُمع ما يقارب 500 غ تربة بعمق (0-10سم)، حُفظت العينات في أكياس بلاستيكية عقيمة في درجة حرارة 4 مئوية لحين إتمام التجارب عليها، يمثل الموقع A3,A2,A1 منطقة معضمية الشام والملوثة بحرق النفايات، أما عينتي الموقع A4 فجمعت بوصفها عينة شاهداً من أرض زراعية من منطقة المعضمية، أما عينات الموقع B فيمثل موقع في دير العصافير والملوث بمياه صرف صناعي ومحلي، وجمعت عينات الموقع C من التربة حول مصفاة حمص والملوثة بتسرب النفط، في حين تمثل عينات الموقع D منطقة في محافظة السويداء (قرية المشقوق) بوصفه موقعاً لحرق عشوائي للنفايات.

### 2. تحليل عينات التربة لتحديد مستوى تلوثها بمركبات الديوكسين:

خُلت عينات التربة للكشف عن تلوثها بالديوكسينات، وذلك اعتماداً على طريقة المقايسة المناعية الأنزيمية "ELISA" باستعمال (Multiskan EX, Thermo/Labsystems, microplate reader (USA)، بامتصاصية 450 نانومتر، باستعمال الطقم الخاص للكشف عن الديوكسينات (Abraxis LLC, USA)، بعد أن أُستخلصت الديوكسينات من التربة وفق الخطوات الآتية: أُضيف 6 غ من سلفات الصوديوم إلى 5 غ من كل عينة تربة على حدة، ثم عُملت العينات مع مذيب عضوي بمزجها مع 20 مل من الهكسان الحاوي على 20% من الأسيتون، وضعت الأنابيب على الرج المستمر لمدة ساعة، نُثِل المزيج بسرعة 3000 دورة في الدقيقة لمدة 5 دقائق لفصل الطور العضوي، أُضيف للطافي 8 مل حمض الكبريت المركز بهدف الغسل مع الرج الخفيف لمدة

دقيقتين، تم تبخير العينة باستعمال جهاز المبخر الدوار، أضيف 1000 ميكرو لتر من محلول ديمتيل سلفوكسيد (DMSO: dimethyl sulfoxide)، تلاه إعادة تبخير للمذيب العضوي كاملاً. أخيراً، حُلَّ المستخلص ضمن 500 ميكرو لتر من DMSO مع 500 ميكرو لتر من الماء المقطر (Casanovas *et al.*, 1994).

### 3. عزل جراثيم التربة:

حُضِر معلق تربة بمزج 1 غ تربة مع 5 مل وسط غني بالأملاح المعدنية MSM، حُضِنَت الأنابيب بحمام مائي بدرجة حرارة 30 مئوية، واهتزت 105 دورة في الدقيقة، زُرِعَ 100 ميكرو لتر من كل معلق على حدة على وسط منمي عام للأحياء الدقيقة أغار مغذي Nutrient agar، حُضِنَت الأطباق بحاضنة درجة حرارتها 30 درجة مئوية مدة ليلة كاملة. أُجريت سلسلة من التمديد ( $10^3 - 10^6$ )، تبعاً لكثافة النمو الجرثومي في كل عينة، زُرِعَ من التمديد المطلوب لكل عينة على وسط أغار مغذي، حُضِنَت الأطباق بالشروط سابقة الذكر. وصفت المستعمرات الجرثومية النامية مورفولوجياً من حيث الشكل واللون والحواف والارتفاع، وحددت خصائصها المجهرية بعد تلوينها بصبغة غرام، كما تم إحصاء عدد المستعمرات لكل عينة بحساب colony forming unit (CFU) الوحدة الجرثومية المكونة للمستعمرة لكل غرام من الوزن الجاف للتربة، وفق القانون:

عدد الخلايا المكونة للمستعمرة = عدد المستعمرات × معامل التمديد / حجم العينة المزروعة مقدرة بالغرام.  
أعيدت زراعة المستعمرات الجرثومية المفردة على وسط الأغار المغذي، وحُفظت العزلات النامية بدرجة 4 مئوية لحين توصيفها.

#### 4. توصيف العزلات الجرثومية جزيئياً اعتماداً على سلسلة المورثة 16srRNA:

في أولى خطوات التوصيف عُزل DNA الجينومي باستعمال طقم الاستخلاص ( DNA extraction KIT- QIAGENE) وفق مجموعة من الخطوات المرفقة مع الطقم، مسبوقاً بنشيط الجراثيم بزراعتها في 10 مل وسط (Luria-Bertani) LB سائل، والحضن بدرجة حرارة 30 مئوية، واهتزاز 110 دورة في الدقيقة، لمدة ليلة كاملة.

أجري تضخيم المورثة 16SrRNA من الدنا الجينومي (تركيز 200 نانوغرام/مل) بحجم تفاعل نهائي 25 ميكرو لتر، المواد الكيميائية المستعملة في التفاعل: محلول موقى Taq polymerase buffer، نكليوتيدات حرّة منقوصة الأوكسجين (dNTPs (dioxynucleotid triphosphat) 25ملي مولر)، كبريتات المغنيزيوم (MgSO<sub>4</sub>) 3 ملي مولر، أنريم البلمرة Taq polymerase (1.25 U)، بادئات Primers (16srRNA Forward , 16srRNA Reverse) بتركيز 10 ميكرو مولر (الجدول 1)، تم التضخيم باستعمال جهاز Thermal cyclers، وفق المراحل الآتية: المرحلة الأولى رفع درجة الحرارة 94°C لمدة 5 دقائق، المرحلة الثانية 35 دورة (الدنترة Denaturation بدرجة حرارة 94°C ، الالتحام Annealing 58°C، الاستطالة Extention بدرجة حرارة 72°C كل مرحلة لمدة دقيقة)، والمرحلة الأخيرة بدرجة حرارة 72°C لمدة عشرة دقائق. أُستعملت هلامة الأغاروز تركيز 1% لترحيل قطع DNA بعد تضخيمها بتفاعل PCR.

قُرئ التسلسل النكليوتيدي لنواتج تضخيم المورثة 16S rRNA باستعمال جهاز (ABI 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems)، في قسم التقنية الحيوية والبيولوجيا الجزيئية، هيئة الطاقة الذرية السورية.

تمت مقارنة تسلسل المورثة 16srRNA الخاص بكل عزلة بالتسلسلات الموجودة في قاعدة البيانات الخاصة بالمعلومات الوراثية NCBI باستعمال برنامج خاص بقراءة التتالي النكليوتيدي (Chromas- version 2.6.6)، لتحديد هوية العزلات الجرثومية. حُفظت السلالات الجرثومية بعد توصيفها ضمن وسط LB سائل مُضاف له غليسرول بنسبة 20% على الدرجة -80 مئوية.

#### 5. الكشف الجزيئي عن المورثات الخاصة بتفكيك مركبات الديوكسين ضمن جينوم السلالات الجرثومية:

نظراً لتعايش السلالات الجرثومية في تربة قريبة من مصادر انبعاث الديوكسينات كان لابد من البحث في جينومها عن مورثات تمكنها من التعامل مع هذا النوع من الملوثات العضوية شديدة السمية بواسطة استقلالها واستعمال الكربون الداخلة في تركيبها الكيميائي بوصفها مصدرًا للطاقة. أنتقي لهذا الغرض الأنواع الجرثومية المثبت مرجعياً تتنوع أدوارها الحيوية وأهمها قدرتها على تفكيك الملوثات العضوية بما فيها الديوكسينات. صُنفت السلالات الجرثومية وفق احتواء مادتها الوراثية DNA على إحدى المورثات المسؤولة عن تفكيك الديوكسين: مورثة Angular (AD) dioxygenase لدى الأنواع سلبية الغرام، مورثة Cytochrome (CYPBM3) لدى الأنواع إيجابية الغرام، أُعتمدت المورثة 16srRNA بوصفها مورثة مرجعية، تمت الدراسة بواسطة التفاعل التسلسلي للبوليمراز الكمي في الوقت الفعلي (Real time-Quantitative PCR (RT-qPCR) باستعمال جهاز (AriaMx Real-time PCR System from Agilent technologies, USA). أُجري التفاعل في حجم نهائي 20 ميكرو لتر باستعمال مزيج سايرغرين 2X (SYBR Green PCR Kit-) (Qiagen-Germany)، تسلسل البادئات المستعملة في الدراسة موضحة في الجدول (1).

الجدول (1) تسلسل البادئات المستعملة في الدراسة لتفاعل PCR، RT-qPCR

المورثة الهدف	البادئات	التسلسل النكليوتيدي Oligo Sequence (5' - 3')	حجم ناتج PCR(bp)
CYPBM3	BM3 F	ACCACCGGAAAGCGCGATCT	610
	BM3 R	ACCGTGCGATCTCGTCTGGA	
AD	AD F	GTTCCGCGGGTGGAGAACTA	200
	AD R	AAGTTCTCCGCCAGCTT	
16srRNA	F	GCACAAGCGGTGGAGCATGTGG	500
	R	GCCCGGGAACGTATTCACCG	

جميع البادئات المستعملة في دراستنا تم تصميمها وإنتاجها في مختبرات هيئة الطاقة الذرية.

### 6. اختبار القدرة الحيوية للجراثيم على تفكيك مركب 2,3,7,8-TCDD:

أُنقِيت مجموعة من السلالات الجرثومية المثبت مرجعياً قدرتها على تفكيك الملوثات العضوية المعقدة بما فيها الديوكسين بهدف دراسة قدرتها على النمو بوجود الديوكسين الأكثر سمية، تضم هذه المجموعة بعض الأنواع التابعة لجنس *Bacillus* (*B. pumilus*، *B. megaterium*)، *Pseudomonas* (*P. fluorescens*، *P. putida*، *P. stutzeri*). زُرعت الجراثيم المختارة في 10 مل وسط مغذٍ (LB سائل)، حُضنت بدرجة حرارة 30 مئوية، واهتزت 110 دورة في الدقيقة، ليلة كاملة. نُقلت أنابيب الزراعة السائلة لمدة 10 دقائق، 6000 دورة / دقيقة، ثم غُسلت الرسابة الجرثومية بوسط ملحي MSM بهدف التخلص من آثار وسط الزراعة، أُضيف لكل رسابة 5 مل MSM مع مركب 2,3,7,8-TCDD بتركيز نهائي 0.4 ppb، حُضنت السلالات المدروسة بشروط الزراعة المضبوطة ذاتها، ولمدة 6 أسابيع (Lopez-Echartea et al., 2016). قُدِّر النمو الجرثومي أسبوعياً بمتابعة قيم CFU لكل سلالة جرثومية مقدراً بـ  $10^1$  CFU mL<sup>-1</sup>.

## 7. الدراسة الإحصائية Statistical study:

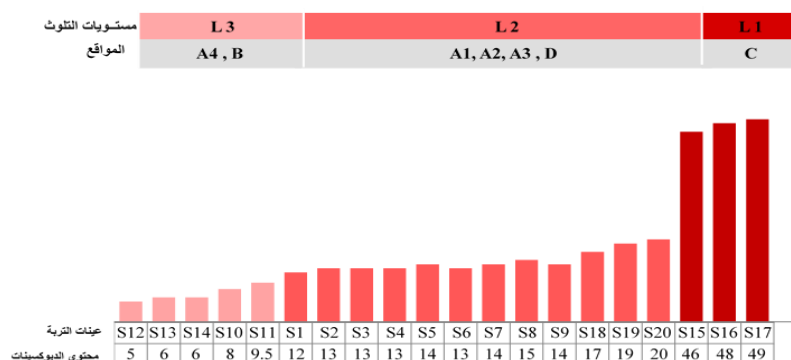
أستعمل برنامج SPSS V.25 لإجراء الاختبارات الإحصائية اللازمة لدراسة الفروقات بين متوسطات تراكيز الديوكسينات في عينات التربة، باستعمال اختبار one-way ANOVA. كما تمت دراسة الارتباط بين محتوى التربة من الديوكسينات والكثافة الجرثومية حسب معامل بيرسون، حيث كانت قيمة مستوى الدلالة  $P < 0.05$ .

## النتائج والمناقشة Results & Discussion:

### 1. تحديد مستوى تلوث التربة بالديوكسينات:

أظهرت نتائج تحليل محتوى الديوكسينات في عينات التربة المجموعة من مناطق محلية متفرقة (S1-S20) تبايناً كبيراً في مستوى تلوثها الكمي بهذه المركبات، النتائج موضحة في الشكل (2)؛ إذ تراوح مستوى التلوث بين 5 إلى 50 جزء / الترليون ppt، وبناءً على ذلك تم تصنيف مستوى تلوث التربة بمركبات PCDD/Fs وفق ثلاثة مستويات، بلغ المستوى الأعلى L1 نحو 50 جزء / الترليون، وذلك في عينات التربة للموقع C حول مصفاة حمص S15, S16, S17، أما المستوى الثاني L2 تراوح مستوى التلوث بين 12 إلى 20 جزء في الترليون تندرج ضمنه العينات من S1 إلى S9، والعينات S18، S19، S20 المتوزعة في المواقع A1، A2، A3 موقع معضمية الشام، والموقع D في السويداء. أما المستوى الأدنى L3 كانت القيم بين 5 إلى 10 جزء / الترليون، وذلك في عيني الشاهد S10، S11 من موقع معضمية الشام A4، والعينات S12، S13، S14 في موقع دير العصافير B. إحصائياً تبين وجود فروق معنوية بين متوسط تراكيز الديوكسينات في عينات التربة لكل موقع باستعمال اختبار one way anova عند قيمة المعنوية  $P < 0.05$ .

نستنتج مما سبق أن تلوث التربة بالنفط ومشتقاته نتج عنه أعلى مستوى من الديوكسينات، مما يؤكد على دور التلوث بالنفط ومشتقاته كمصدرٍ لتشكل الديوكسينات، والذي وصّف في مراجع عديدة ( Kulkarni *et al.*, 2008, Dopico and Gómez, 2015, Kanan *et al.*, 2018)، يليه في المستوى الثاني الحرق العشوائي للنفايات والمخلفات المنزلية والمحلية بوصفه مصدرًا لانبعاث الديوكسينات، وهذا ما يتوافق مع الدراسات ( Sakai *et al.*, 2001, Tue *et al.*, 2016, Song *et al.*, 2019)، من الجدير بالملاحظة وجود تراكيز منخفضة في عيني الشاهد المجموعة من موقع لأرض زراعية لأشجار الزيتون القريب من محطات حرق النفايات، ما يؤكد أن الديوكسينات لا ينحصر وجودها في أماكن انبعاثها ولها القدرة على الانتقال لمسافات بعيدة ( Bergknut *et al.*, 2010 Lavric *et al.*, 2004).



الشكل (2) يظهر مستويات تلوث عينات التربة في كل موقع مدروس بالديوكسينات

**الجدول (2) يوضح الكثافة الجرثومية، عدد العزلات الجرثومية وتنوعها**

بين إيجابية أو سلبية لصبغة غرام في كل عينة تربة

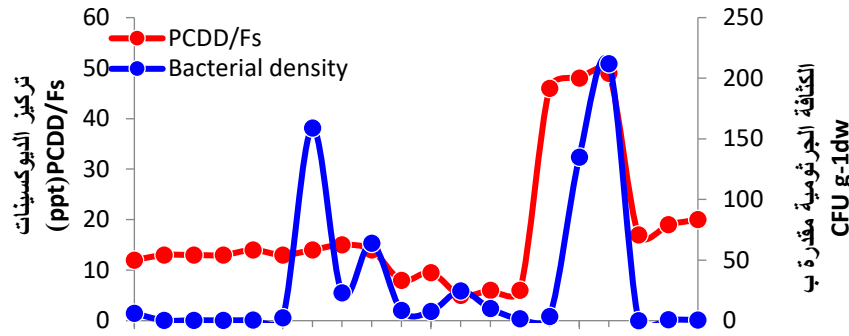
الموقع	B	A4	A1	A2	A3	D	C
	دير العصافير	معظمية الشام				السويداء	مصفاة حمص
means±SD							
(تركيز	±0.57	9 ±0.86	12.66	13.±0.57	14.33	18.66	48 ±2
الديوكسينات	5.66		±0.57	33	±0.57	±1.52	
مقدراً بـ ppt)							

**2. دراسة المجتمع الجرثومي في عينات التربة:**

وصف المجتمع الجرثومي في كل عينة تربة؛ إذ حُسبت الكثافة الجرثومية المقدر بالوحدة الجرثومية المكونة للمستعمرة/غ(CFU g<sup>-1</sup>)، النتائج موضحة في الجدول(2)، عند مقارنة نتائج الكثافة الجرثومية في عينات التربة مع مستوى تلوثها بالديوكسينات، الكثافة الجرثومية الأعلى كانت في عينات المواقع B,A3,C على الترتيب، ولُوحظ أن عينات الموقع C، والتي يصادف أنها الأكثر تلوثاً تميز المجتمع الجرثومي ضمنها بأنه الأعلى كثافة بين المجتمعات المدروسة. أما عينات الموقع D المصنفة أيضاً ضمن العينات الأكثر تلوثاً كانت الأقل كثافة جرثومية مقارنةً ببقية المواقع، بينت نتائج الدراسة الإحصائية وجود ارتباط إيجابي بين تراكيز الديوكسينات في عينات التربة والكثافة الجرثومية ضمنها حسب معامل بيرسون؛ إذ بلغت قيمته 0.23، الشكل (3).



الموقع	عينات التربة	الكثافة الجرثومية CFU g <sup>-1</sup>	العزلات الجرثومية الكلية	إيجابيات/سلبيات صبغة غرام-G+/G-
A1	S1	6×10 <sup>7</sup>	5	1/4
	S2	0.29×10 <sup>7</sup>	6	5/1
	S3	0.34×10 <sup>7</sup>	6	5/1
A2	S4	0.28×10 <sup>7</sup>	8	3/5
	S5	0.58×10 <sup>7</sup>	10	5/5
	S6	2.3×10 <sup>7</sup>	5	4/1
A3	S7	159× 10 <sup>7</sup>	3	0/3
	S8	23× 10 <sup>7</sup>	7	2/5
	S9	64× 10 <sup>7</sup>	8	3/5
A4	S10	8.4×10 <sup>7</sup>	9	7/2
	S11	7.7×10 <sup>7</sup>	5	1/4
B	S12	24.5×10 <sup>7</sup>	4	0/4
	S13	10×10 <sup>7</sup>	3	1/2
	S14	1.5×10 <sup>7</sup>	4	2/2
C	S15	3.5×10 <sup>7</sup>	4	0/4
	S16	135×10 <sup>7</sup>	2	0/2
	S17	212×10 <sup>7</sup>	2	0/2
D	S18	0.075×10 <sup>7</sup>	7	6/1
	S19	0.92×10 <sup>7</sup>	6	3/3
	S20	0.56×10 <sup>7</sup>	3	2/1
			<b>المجموع عزلات 107</b>	<b>50/57</b>

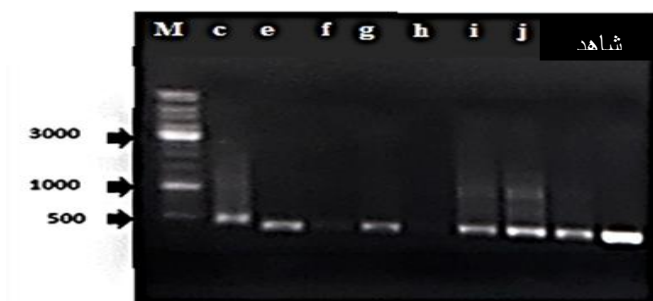


الشكل 3: مخطط يوضح كثافة المجتمعات الجرثومية في عينات التربة المقدرة بـ  $CFU \times 10^7 g^{-1}$  وفق مستوى تلوثها بالديوكسين PCDD/Fs (ppt).

## 2. توصيف العزلات الجرثومية المكونة لبنية المجتمع الميكروبي:

وُصفت العزلات الجرثومية المعزولة من تربة ملوثة بالديوكسينات جزيئياً بناءً على تسلسل المورثة 16srRNA بعد تضخيمها بتفاعل PCR الشكل (4)؛ إذ حُددت هوية 107 سلالة جرثومية، تم توثيق التسلسل النكليوتيدي للسلاسل الجرثومية الموصفة على مستوى الجنس والنوع والأعلى وثوقية في قاعدة البيانات NCBI GeneBank databases تحت أرقام تعريفية (MW475154 To MW475085 GenBank ID: from MW475085 To). بينت نتائج البحث أن جنس *Bacillus* الأكثر وفرة ضمن عينات التربة المدروسة حيث شكّل 37.38% من مجموع العزلات الجرثومية المدروسة، يليه جنسي *Pseudomonas*، *Acinetobacter* بنسبة 21.49%، 14.01% على الترتيب، في حين شكلت أجناس *Enterobacter*، *Klebsiella*، *Massilia* بنسبة 4.67%، 3.73%، 2.8%، على الترتيب، تساوت نسبة الوفرة الحيوية لأجناس *Staphylococcus*، *Arthrobacter*، *Cronobacter* بنسبة 1.86%، أما الأجناس النادرة:

«*Lysinibacillus Solibacillus*، *Microbacterium*، *Oxalicibacterium*، *Brevundimonas*، *Brevibacillus*، *Cellulosimicrobium*، *Macrococcus*، *Chryseobacterium*، *Pantoea*، *Citrobacter*» الحيوية وبلغت 0.93% في المجتمعات الجرثومية المدروسة. يُلخص الجدول (3) توزيع الأجناس الجرثومية في عينات التربة والنسبة المئوية للوفرة الحيوية لكل جنس على حدة. توافقت النتائج المتعلقة بالمجتمعات الجرثومية المعزولة من تربة ملوثة بالديوكسينات والمركبات المشابهة لها مع دراسات سابقة حول الأنواع الجرثومية المكونة لبنية المجتمع الميكروبي في التربة الملوثة بمثل هذه المركبات، والتي أشارت لغناها بأنواع جنس *Bacillus* المنتمية لشعبة *Firmicutes* والوفرة الحيوية لأفراد شعبة *Proteobacteria* لاسيما أجناس *Acinetobacter*، *Pseudomonas* المنتمية لصف *Gammaproteobacteria* (Huu et al., 2010, Chen et al., 2013, Tran et al., 2020, Zenteno-Rojas et al., 2020)، في حين اختلفت نتائج دراستنا عن نتائج هذه الدراسات بندرة أفراد شعبة الشعاعيات *Actinobacter* إذ ظهرت لدينا سلالتين فقط تابعة لها تنتمي لجنس *Arthrobacter crystallopoietes*.



الشكل (4) صورة تمثيلية توضح نتائج تضخيم المورثة 16srRNA للعزلات الجرثومية في الموقع A3 على هلامة الأغاروز 1% (DNA Ladder: M).

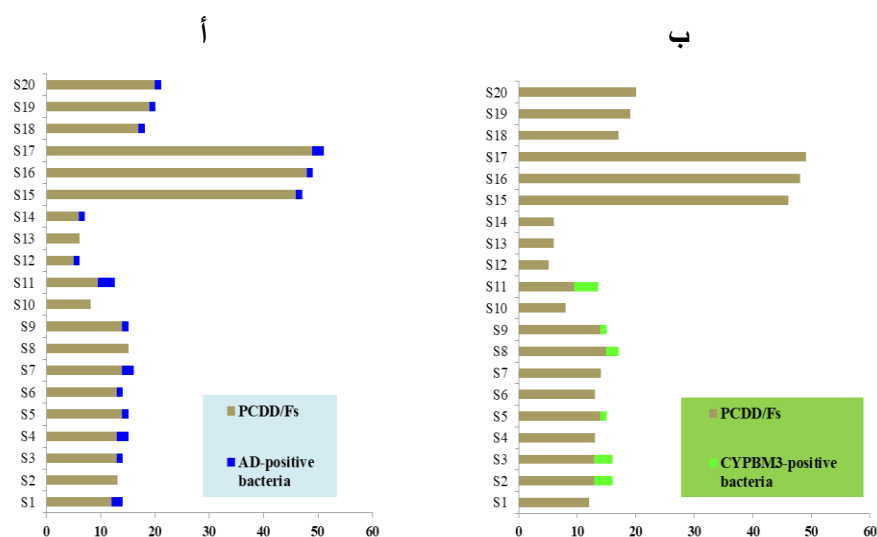
الجدول (3) توزع الأجناس الجرثومية ووفرتها النسبية في عينات التربة المدروسة

الموقع	A1 A2 A3 A4 B C D																				
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	
الأجناس الجرثومية																					
<i>Bacillus</i> sp.	1	3	4	3	4	2		2	3	5	1			2				6	2	2	
<i>Pseudomonas</i> sp.	3	1		5	2						1	3	2					1	1	3	1
<i>Acinetobacter</i> sp.					1		2	5	5					2							
<i>Enterobacter</i> sp.							1						1		1	2					
<i>Klebsiella</i> sp.	1											2	1								
<i>Moraxella</i> sp.			1		1						1										
<i>Staphylococcus</i> sp.		2																			
<i>Arthrobacter</i> sp.										2											
<i>Cronobacter</i> sp.															2						
<i>Solibacillus</i> sp.					1																
<i>Lysinibacillus</i> sp.			1																		
<i>Brevibacillus</i> sp.						1															
<i>Brevundimonas</i> sp.						1															
<i>Oxalibacterium</i> sp.					1																
<i>Microbacterium</i> sp.						1															
<i>Macrocooccus</i> sp.																				1	
<i>Chryseobacterium</i> sp.											1										
<i>Pantoea</i> sp.															1						
<i>Citrobacter</i> sp.																	1				
<i>Cellulosimicrobium</i> sp.												1									
Total 107	5	6	6	8	10	5	3	7	8	9	5	4	3	4	4	2	2	7	6	3	

### 3. الكشف الجزيئي عن المورثات الخاصة بتفكيك مركبات الديوكسين ضمن جينوم السلالات الجرثومية:

أختبرت السلالات الجرثومية المعزولة من الترب الملوثة بالديوكسينات بحثاً عن وجود إحدى المورثات المسؤولة عن تفكيك الديوكسين مورثة الأكسدة التثائية الزاوية (AD) angular dioxygenases ومورثة السيتوكروم CYPBM3 (cytochrome P450)، بوصفها المسارات الجرثومية الأكثر شهرة في تفكيك مركبات الديوكسين، تم الكشف عن 22 سلالة جرثومية سلبية الغرام تمتلك مورثة AD، و14 سلالة إيجابية الغرام حاوية على المورثة CYPBM3 الشكل (5 أ، ب)، أظهرت النتائج أن الأنواع إيجابية المورثة AD تتوزع عشوائياً في عينات التربة، إلا أنه 31% منها وجدت في الترب الأكثر تلوثاً بالديوكسينات (-S20)

S15، تنتمي هذه الأنواع بشكل رئيس لجنس *Pseudomonas* بنسبة 57.14%، أما فيما يتعلق بالأنواع إيجابية CYPBM3 تم الكشف عن أعلى وفرة لهذه الأنواع في عينات التربة التي تم جمعها من المواقع A4,A3,A2,A1 والتي أظهرت مستوى متوسط من التلوث بالديوكسينات، في حين لم توجد هذه الأنواع في التربة الأكثر تلوثاً (S20-S15)، تبين أنّ هذه الأنواع تنتمي بأعلى نسبة لجنس *Bacillus* 85.71%.



الشكل (5) مخطط بياني لنتائج الكشف الجزيئي عن المورثات المفككة للديوكسينات في المجتمعات الجرثومية، أ. توزع السلالات الجرثومية إيجابية المورثة AD ضمن عينات التربة الملوثة ربطاً مع مستوى تلوث كل عينة بالديوكسينات، ب. توزع الأنواع إيجابية المورثة CYPBM3 وتركزها في العينات متوسطة التلوث بالديوكسينات

## 4. اختبار القدرة الحيوية للسلاسل الجرثومية على تفكيك مركب 2,3,7,8-TCDD:

درست القدرة على التعبير عن المورثات المسؤولة عن تفكيك الديوكسينات (AD and CYPBM3) المكتشفة عند 36 سلالة، وذلك بالقيام بتجربة بشروط المختبر لتقييم القدرة الحيوية للنوع الجرثومي على النمو باستعمال مركب " 2,3,7,8-TCDD " بوصفها مصدرًا وحيدًا للكربون. قدر النمو الجرثومي للسلاسل المنتقاة لهذه التجربة بوحدة CFU mL<sup>-1</sup> (الجدول 4)، بينت نتائج الدراسة أن *Bacillus megaterium* سلالة A4-2d كانت الأكثر كفاءة على النمو بشروط التجربة؛ إذ بلغ معدل النمو 15.7×10<sup>6</sup> CFU mL<sup>-1</sup> في الأسبوع الخامس من الحضان، في حين أبدت كل من السلالتين (A1-2c, A3-3g) التابعة لنوع *Bacillus pumilus* قدرة أضعف على النمو؛ إذ بلغ نموها الأعظمي 7.2×10<sup>6</sup>, 5.4×10<sup>6</sup> CFU mL<sup>-1</sup> على الترتيب في الأسبوع الخامس، من جهة أخرى بينت نتائج نمو الأنواع سلبية الغرام أن *P. stutzeri* السلالة D2e تميزت بفاعلية عالية على النمو بوجود الديوكسين؛ إذ بلغها نمو الأعظمي في الأسبوع الخامس من الحضان 11.44×10<sup>6</sup> CFU mL<sup>-1</sup>، وهو أعلى نسبيًا من نمو نوعي *Pseudomonas putida* السلالة A1-1d، *P. fluorescens* السلالة (A4-3d) الذي بلغ في نفس النقطة الزمنية 9.52×10<sup>6</sup>, 7.28×10<sup>6</sup> على الترتيب.

الجدول (4) نتائج زراعة السلاسل الجرثومية ضمن وسط ملحي حاوي على مركب 2,3,7,8-TCDD

مصدرًا وحيدًا للكربون لمدة ستة أسابيع مقدرة بـ CFU. ml<sup>-1</sup>

		CFU. ml <sup>-1</sup>	CFU. ml <sup>-1</sup>	CFU. ml <sup>-1</sup>	CFU. ml <sup>-1</sup>	CFU. ml <sup>-1</sup>	CFU. ml <sup>-1</sup>
<i>P. stutzeri</i>	D2e	0.14×10 <sup>6</sup>	7.3×10 <sup>6</sup>	5.52×10 <sup>6</sup>	8.32×10 <sup>6</sup>	11.44×10 <sup>6</sup>	9.6×10 <sup>6</sup>
<i>P. putida</i>	A1-1d	0.2×10 <sup>6</sup>	4.98×10 <sup>6</sup>	8.6×10 <sup>6</sup>	8.4×10 <sup>6</sup>	9.52×10 <sup>6</sup>	8.14×10 <sup>6</sup>
<i>P. fluorescens</i>	A4-3d	1.8×10 <sup>6</sup>	9.4×10 <sup>6</sup>	9.2×10 <sup>6</sup>	6.8×10 <sup>6</sup>	7.28×10 <sup>6</sup>	7.16×10 <sup>6</sup>
<i>B. megaterium</i>	A4-2d	0.1×10 <sup>6</sup>	7.26×10 <sup>6</sup>	9.12×10 <sup>6</sup>	9.66×10 <sup>6</sup>	15.74×10 <sup>6</sup>	12.88×10 <sup>6</sup>
<i>B. pumilus</i>	A1-2c	0.1×10 <sup>6</sup>	0.32×10 <sup>6</sup>	0.4×10 <sup>6</sup>	1.2×10 <sup>6</sup>	7.2×10 <sup>6</sup>	0.66×10 <sup>6</sup>
<i>B. pumilus</i>	A3-3g	0.02×10 <sup>6</sup>	1.46×10 <sup>6</sup>	1.5×10 <sup>6</sup>	1.52×10 <sup>6</sup>	5.46×10 <sup>6</sup>	4.04×10 <sup>6</sup>

توافقت نتائج الدراسة مع أبحاث عديدة تشير لتفوق نوع *Bacillus megaterium* بالقدرة على تفكيك الديوكسينات ومن ضمنها مركب 2,3,7,8-TCDD والنمو باستعماله بوصفه مصدرًا للكربون والطاقة (Sulistyaningdyah et al., 2004, Sakaki et al., 2013, Hanano et al., 2019)، وعلى نحوٍ مختلفٍ أبدت كل من سلالتي نوع *Bacillus pumilus* قدرة على النمو بوجود مركب الديوكسين 2,3,7,8-TCDD، ولكن أضعف نسبياً، تشير الدراسات السابقة حول قدرة هذا النوع على تفكيك أحد أشكال مركبات الديوكسين والفورانات (Hong et al., 2000, Choi et al., 2003)، وفي سياق تحليل نتائج نمو الأنواع الجرثومية إيجابية المورثة AD تباينت معدلات نمو الأنواع المدروسة، تميزت أنواع *Pseudomonas* (*P. fluorescens*, *P. putida*, *P. stutzeri*) بفاعلية كبيرة على النمو بوجود الديوكسين بلغت أعظمها لدى النوع *P. stutzeri*، تؤدي أنواع *Pseudomonas* دوراً حاسماً في تخليص البيئة من الملوثات العضوية المعقدة (Takahashi et al., 2009, Isaac et al., 2015, Singh et al., 2017, Yao et al., 2017, Li et al., 2020, Jaiswal et al., 2021).

### الاستنتاجات :Conclusions

1. أشارت نتائج تحليل تلوث عينات التربة أن التراكيز الأعلى وجدت في عينات التربة المجموعة من حول مصفاة حمص الملوثة بالنفط ومشتقاته.
2. تبين احتواء التربة الملوثة بحرق النفايات على تراكيز مرتفعة من الديوكسينات، ومن الجدير بالاهتمام تلوث تربة الأرض الزراعية بالقرب من أحد محطات حرق النفايات بالديوكسينات؛ ما يؤكد قدرتها على الانتقال لمسافات طويلة بعيداً عن مصدر انبعاثها.
3. حُددت هوية 107 عزلة جرثومية، ولُوَحظ أن جنس *Bacillus* كان الأكثر وفرة ضمن عينات التربة المدروسة بنسبة 37.38% من مجموع العزلات الموصفة.

4. أظهرت البيانات المتعلقة بالكشف الجزيئي عن المورثات المسؤولة عن تفكيك الديوكسينات احتواء 22 سلالة جرثومية سلبية الغرام على المورثة AD تنتمي بشكل رئيسي لجنس *Pseudomonas*، كما سجلت 14 سلالة إيجابية CYPBM3 تنتمي هذه الأنواع لجنس *Bacillus* بأعلى نسبة.
5. أستخلص من تجربة القدرة الوظيفية لبعض السلالات إيجابية المورثة CYPBM3 الكفاءة العالية لجنس *Bacillus megaterium* على تفكيك مركب 2,3,7,8-TCDD والنمو باستعماله بوصفه مصدرًا للكربون، في حين تفوقت سلالة *Pseudomonas stutzeri* من بين السلالات إيجابية المورثة AD.



### المراجع:

1. Abatenh, E., B. Gizaw, Z. Tsegaye and M. Wassie (2017). "The role of microorganisms in bioremediation-A review." *Open Journal of Environmental Biology* 2(1): 038-046.
2. Alcock, R. E. and K. C. Jones (1996). "Dioxins in the environment: a review of trend data ".*Environmental science & technology* 30(11): 3133-3143.
3. Bergknut, M., H. Laudon and K. Wiberg (2010). "Dioxins, PCBs, and HCB in soil and peat profiles from a pristine boreal catchment." *Environmental pollution* 158(7): 2518-2525.
4. Bhattarai, A., B. Bhattarai and S. Pandey (2015). "Variation of soil microbial population in different soil horizons." *J Microbiol Exp* 2(2): 00044.
5. Cachada, A., T. Rocha-Santos and A. C. Duarte (2018). *Soil and pollution: an introduction to the main issues*. Soil pollution, Elsevier: 1-28.
6. Casanovas, J., R. Muro, E. Eljarrat, J. Caixach and J. Rivera (1994). "PCDF and PCDD levels in different types of environmental samples in Spain." *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 348(1): 167-170.
7. Cerniglia, C. E., J. C. Morgan and D. T. Gibson (1979). "Bacterial and fungal oxidation of dibenzofuran." *Biochemical Journal* 180(1): 175-185.
8. Chen, W.-Y., J.-H. Wu, Y.-Y. Lin, H.-J. Huang and J.-E. Chang (2013). "Bioremediation potential of soil contaminated with highly substituted polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans: Microcosm study and microbial community analysis." *Journal of hazardous materials* 261: 351-361.
9. Choi, S.-D., H.-B. Hong and Y.-S. Chang (2003). "Adsorption of halogenated aromatic pollutants by a protein released from *Bacillus pumilus*." *Water research* 37(16): 4004-4010.
10. Dopico, M. and A. Gómez (2015). "Review of the current state and main sources of dioxins around the world." *Journal of the Air & Waste Management Association* 65(9): 1033-1049.

11. Field, J. A. and R. Sierra-Alvarez (2008). "Microbial degradation of chlorinated dioxins." *Chemosphere* 71(6): 1005-1018.
12. Gribble, G. W. (1994). "The natural production of chlorinated compounds." *Environmental science & technology* 28(7): 310A-319A.
13. Gulfishan, M. and R. A. Mir" .(2021) The biodegradation of organic pollutants." *European Journal of Molecular & Clinical Medicine* 7(10): 3552-3562.
14. Hanano, A., M. Shaban, D. Almutlk and I. Almously (2019). "The cytochrome P450BM-1 of *Bacillus megaterium* A14K is induced by 2, 3, 7, 8-tetrachlorinated dibenzo-p-dioxin: biophysical, molecular and biochemical determinants." *Chemosphere* 216: 258-270.
15. Hong, H.-B., S.-H. Hwang and Y.-S. Chang (2000). "Biosorption of 1, 2, 3, 4-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and polychlorinated dibenzofurans by *Bacillus pumilus*." *Water Research* 34(1): 349-353.
16. Hutzinger, O., M. Blumich, M. vd Berg and K. v. Olie (1985). "Sources and fate of PCDDs and PCDFs: an overview." *Chemosphere* 14(6-7): 581-600.
17. Huu, N. B. and D. T. C. Ha (2010). "Characterization of bacterial community structure in bioremediation treatment of herbicide/dioxin contaminated soil at field trials." *Academia Journal of Biology* 32(1): 88-93.
18. Inui, H., T. Itoh, K. Yamamoto, S.-I. Ikushiro and T. Sakaki (2014). "Mammalian cytochrome P450-dependent metabolism of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and coplanar polychlorinated biphenyls." *International Journal of Molecular Sciences* 15(8): 14044-14057.
19. Isaac, P., M. Lozada, H. M. Dionisi, M. C. Estévez and M. A. Ferrero (2015). "Differential expression of the catabolic *nahAc* gene and its effect on PAH degradation in *Pseudomonas* strains isolated from contaminated Patagonian coasts." *International Biodeterioration & Biodegradation* 105: 1-6.
20. Jaiswal, P. K. and J. Gupta (2021). *Metabolism of Dioxins and Dioxins-Like Compound, Its Regulation and Toxicological Pathways*. *Environmental Microbiology and Biotechnology*, Springer: 293-308.

21. Kanan, S. and F. Samara (2018). "Dioxins and furans: A review from chemical and environmental perspectives." *Trends in Environmental Analytical Chemistry* 17: 1-13.
22. Kimura, N. and Y. Kamagata (2009). "Impact of dibenzofuran/dibenzo-p-dioxin amendment on bacterial community from forest soil and ring-hydroxylating dioxygenase gene populations." *Applied microbiology and biotechnology* 84(2): 365-373.
23. Kulkarni, P. S., J. G. Crespo and C. A. Afonso (2008). "Dioxins sources and current remediation technologies—a review." *Environment international* 34(1): 139-153.
24. Lavric, E. D., A. A. Konnov and J. De Ruyck (2004). "Dioxin levels in wood combustion—a review." *Biomass and Bioenergy* 26(2): 115-145.
25. Li, Q., Y. Huang, D. Wen, R. Fu and L. Feng (2020). "Application of alkyl polyglycosides for enhanced bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil using *Sphingomonas changbaiensis* and *Pseudomonas stutzeri*." *Science of The Total Environment* 719: 137456.
26. Lopez-Echartea, E., T. Macek, K. Demnerova and O. Uhlik (2016). "Bacterial biotransformation of pentachlorophenol and micropollutants formed during its production process." *International journal of environmental research and public health* 13(11): 1146.
27. Matsumura, F. and H. J. Benezet (1973). "Studies on the bioaccumulation and microbial degradation of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin." *Environmental health perspectives* 5: 253.258-
28. McGregor, D. B., C. Partensky, J. Wilbourn and J. M. Rice (1998). "An IARC evaluation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans as risk factors in human carcinogenesis." *Environmental health perspectives* 106(suppl 2): 755.760-
29. Ramesh, T., N. S. Bolan, M. B. Kirkham, H. Wijesekara, M. Kanchikerimath, C. S. Rao, S. Sandeep, J. Rinklebe, Y. S. Ok and B. U. Choudhury (2019).

- Soil organic carbon dynamics: Impact of land use changes and management practices: A review. *Advances in Agronomy*, Elsevier. 156: 1-107.
30. Rostami, I. and A. L. Juhasz" .(2011) Assessment of persistent organic pollutant (POP) bioavailability and bioaccessibility for human health exposure assessment: a critical review." *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 41(7): 623-656.
  31. Sakai, S.-I., K. Hayakawa, H. Takatsuki and I. Kawakami (2001). "Dioxin-like PCBs released from waste incineration and their deposition flux." *Environmental science & technology* 35(18): 3601-3607.
  32. Sakaki, T., K. Yamamoto and S. Ikushiro (2013). "Possibility of application of cytochrome P450 to bioremediation of dioxins." *Biotechnology and applied biochemistry* 60(1): 65-70.
  33. Singh, P. and B. N. Tiwary (2017). "Optimization of conditions for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation by *Pseudomonas stutzeri* P2 isolated from Chirimiri coal mines." *Biocatalysis and agricultural biotechnology* 10: 20-29.
  34. Song, S., X. Zhou, C. Guo, H. Zhang, T. Zeng, Y. Xie, J. Liu, C. Zhu and X. Sun (2019). "Emission characteristics of polychlorinated, polybrominated and mixed polybrominated/chlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans (PCDD/Fs, PBDD/Fs, and PBCDD/Fs) from waste incineration and metallurgical processes in China." *Ecotoxicology and environmental safety* 184: 109608.
  35. Stockholm Convention. (2001). "Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (POPs)".
  36. Sulistyanydyah, W. T., J. Ogawa, Q.-S. Li, R. Shinkyō, T. Sakaki, K. Inouye, R. D. Schmid and S. Shimizu (2004). "Metabolism of polychlorinated dibenzo-p-dioxins by cytochrome P450 BM-3 and its mutant." *Biotechnology letters* 26(24): 1857-1860.
  37. Takahashi, Y., M. Shintani, L. Li, H. Yamane and H. Nojiri (2009). "Carbazole-degradative IncP-7 plasmid pCAR1. 2 is structurally unstable in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1, which accumulates catechol, the

- intermediate of the carbazole degradation pathway." *Applied and environmental microbiology* 75(12): 3920-3929.
38. Thomas O. Tiernan, M. L. T., t John H. Garrett, Garrett F. VanNess, Joseph G. Solch, Daniel J. Wagel, Gerald L. Ferguson and Arnold Schecter (1985). "Sources And Fate of Polychlorinated Dibenzodioxins, Dibenzofurans and Related Compounds in Human Environments." *Environmental Health Perspectives* 59.
  39. Tran, H. T., C. Lin, H. G. Hoang, M. T. Nguyen, A. Kaewlaoyoong, N. K. Cheruiyot, X.-T. Bui and C. T. Vu (2020). "Biodegradation of dioxin-contaminated soil via composting: Identification and phylogenetic relationship of bacterial communities." *Environmental Technology & Innovation* 19: 101023.
  40. Tue, N. M., A. Goto, S. Takahashi, T. Itai, K. A. Asante, T. Kunisue and S. Tanabe (20" .(16Release of chlorinated, brominated and mixed halogenated dioxin-related compounds to soils from open burning of e-waste in Agbogbloshie (Accra, Ghana)." *Journal of hazardous materials* 302: 151-157.
  41. Vidali, M. (2001). "Bioremediation. an overview." *Pure and applied chemistry* 73(7): 1163-1172.
  42. White, C., A. K. Shaman and G. M. Gadd (1998). "An integrated microbial process for the bioremediation of soil contaminated with toxic metals." *Nature Biotechnology* 16(6): 572-575.
  43. Wittich, R.-M. (1998). "Degradation of dioxin-like compounds by microorganisms." *Applied microbiology and biotechnology* 49(5): 489-499.
  44. Wu, M., W. Li, W. A. Dick, X. Ye, K. Chen, D. Kost and L. Chen (2017). "Bioremediation of hydrocarbon degradation in a petroleum-contaminated soil and microbial population and activity determination." *Chemosphere* 169: 124-130.
  45. Xu, C., J. Hu, J. Wu, B. Wei, Z. Zhu, L. Yang, T. Zhou and J. Jin (2020). "Polychlorinated naphthalenes, polychlorinated dibenzo-p-dioxins and

- dibenzofurans, and polychlorinated biphenyls in soils in an industrial park in Northwestern China: levels, source apportionment, and potential human health risks." *Ecotoxicology and environmental safety* 188: 109895.
46. Yao, H., S. Lu, X. Zhang, J. Pei and Y.-T. Lu (2018). "Pollution status and risks of dioxin-like polychlorinated biphenyls in the soil of the yellow river." *Huan jing ke xue= Huanjing kexue* 39(1): 123-129.
  47. Yao, X., F. Tao, K. Zhang, H. Tang and P. Xu (2017). "Multiple roles for two efflux pumps in the polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading *Pseudomonas putida* strain B6-2 (DSM 28064)." *Applied and environmental microbiology* 83.(24)
  48. Yuniati, M. (2018). *Bioremediation of petroleum-contaminated soil: A Review*. IOP conference series: earth and environmental science, IOP Publishing.
  49. Zenteno-Rojas, A., E. Martínez-Romero, D. Castañeda-Valbuena, C. I. Rincón-Molina, V. M. Ruíz-Valdiviezo, R. Meza-Gordillo, J. J. Villalobos-Maldonado, M. Á. Vences-Guzmán and R. Rincón-Rosales (2020). "Structure and diversity of native bacterial communities in soils contaminated with polychlorinated biphenyls." *AMB Express* 10(1): 1-15.
  50. Zhang, X.-X., S.-P. Cheng, Z. Cheng-Jun and S. Shi-Lei (2006). "Microbial PAH-degradation in soil: degradation pathways and contributing factors." *Pedosphere* 16(5): 555-565.