

دراسة تأثير شوارد النتريت على أنزيم الاستيراز والمحتوى البروتيني

للنوع *Daphnia atkinsoni* (Cladocera)

محمد ماهر قباقيبي، سحر الخطيب، شفاء جاويش *

قسم علم الحياة الحيوانية، كلية العلوم، جامعة دمشق

* طالبة دراسات عليا (دكتوراه)

الملخص

سجل وجود النوع المدروس (*Daphniidae* - Cladocera) *D.atkinsoni* لأول مرة في سوريا في سد المشنف بمحافظة السويداء في عام (2009م)، حيث تراوحت درجات حرارة مياه السد بين (11-19)م، ودرجات حموضة بين (6.7-7.95)، وتراكيز شوارد النتريت بين (0.3-0.45) مغ/ليتر وتراكيز شوارد الأمونيوم (0.2-1.7) مغ/ليتر، وتراكيز شوارد الفوسفات بين (1.2-1.87) مغ/ليتر، وتراكيز الفوسفور (0.32-0.77) مغ/ليتر، وتراكيز الأوكسجين بين (8.1-9.2) مغ/ليتر. وقد تميز النوع بوجود إحدى عشرة عصابة بروتينية تراوحت أوزانها الجزيئية بين (32.833 - 108.67) KD، كما تميز بوجود ثمانية نظائر لأنزيم الاستيراز وتراوحت أوزانها الجزيئية بين (28.138-247.3) KD، وبالتالي يمكننا الاعتماد على البصمة الوراثية بهدف تأكيد تصنيف الأنواع. كما تبين لنا أن مركبات النتروجين وخاصة ازدياد تركيز شوارد النتريت تؤدي إلى انخفاض غزارة النوع *D.atkinsoni*، ويترافق ذلك مع ازدياد تركيز المحتوى البروتيني وانخفاض تركيز أنزيم الاستيراز، بسبب تثبيطها لبعض الوظائف الحيوية داخل جسم الكائن الحي. إذاً يمكننا استخدام النوع *D. atkinsoni* كموشراً بيئياً حيوياً، يدل على إمكانية استخدام المياه للري، ولتربية الأسماك، كما أنه مميز للبحيرات قليلة الغذاء *Oligotrophic*.

الكلمات المفتاحية: *D.atkinsoni* - رحلان كهربائي Electrophoresis - بروتين - نظائر أنزيم الاستيراز Isoenzymes Esterase

ورد البحث للمجلة بتاريخ 2011/10/10

قبل للنشر بتاريخ 2012/2/16

المقدمة

لقد ساهمت الأسمدة الكيميائية المستخدمة في مجال الزراعة بتلويث المياه نتيجة انجراف الكميات الزائدة منها بواسطة سيول الأمطار إلى البحيرات مسببة تلوثها بمركبات النترت والنترات والأمونيوم، ومؤدية إلى حدوث خلل في بعض الوظائف الحيوية الضرورية لاستمرار حياة الكائن الحي، وإلى اختفاء بعض الأنواع وازدياد غزارة الأنواع المتساهلة مع التلوث. فقد لوحظ أن وجود شوارد النترت بتركيز 215 $\mu\text{g}/\text{l}$ خلال 24 ساعة يؤدي إلى تثبيط حركة أفراد النوع *Daphnia magna* بنسبة 50% من مجموع أفراد التجربة [1]. بينما بتركيز $2.8 \mu\text{g}/\text{l}$ تنتشب التفاعلات الحيوية لذات النوع [2]. كما أستنتج انخفاض غزارة أفراد هذا النوع بازدياد تركيز النترت [3]. كما تبين أن ازدياد تركيز شوارد النترت وشوارد الأمونيوم في مياه البحيرات يؤثر على الوظائف الحيوية للكائنات الحية التي تعيش فيها كالفشريات مسبباً ضرراً لها [4].

وإن اختلاف الشروط البيئية لمناطق الدراسة المعزولة جغرافياً، تؤدي إلى انفصال مجموعات (Groups) تنتمي إلى نفس النوع تتشابه شكلياً فيما بينها، لكنها تبدي اختلافات كمية وكيفية في النظائر الأيزيمية. وقد وجد سبعة عشر نظيراً لأنزيم الاستيراز لدى دراسة مجموعات النوع *Daphnia pulex*، ثلاثة منها وجدوا في كافة المجموعات [5]. كما درس بعض العلماء الاختلافات الكمية والكيفية لأنزيمات ثلاث عشرة مجموعة للنوع *Daphnia magna* [6]. ونلاحظ من الدراستين السابقتين وهما على مستوى النوع فقط، أن نوعي جنس الـ *Daphnia* (*D. pulex*, *D. magna*) يبديان فيما بينهما اختلافات كمية وكيفية لنظائر أنزيم الاستيراز [5,6]. وإن استمرار انعزال مجموعات النوع الواحد لفترات طويلة من الزمن يؤدي إلى عدم تطابق كمي ونوعي بين مورثاتها، وعدم قدرتها على التكاثر فيما بينها وبالتالي تشكل أنواع جديدة. أما إذا بقيت قادرة على التكاثر فيما بينها مع وجود اختلافات في مستوى المورثات (قد لا تزيد عن ثلاث مورثات)، مع إمكانية وجود بعض الاختلافات الشكلية فيما بينها، عندئذ من الممكن أن نميز مجموعات تنتمي لتحت النوع. إذاً يمكننا بالاعتماد على تزايد درجة الاختلافات في مستوى المورثات فيما بين مجموعات النوع الواحد تأسيس

تسلسل تصنيفي يبدأ بالجماعة ثم تحت النوع ثم نصف نوع ثم أنواع شقيقة ثم أنواع غير شقيقة حتى مستوى النوع [7].

أهمية البحث وأهدافه:

ونظراً للحساسية العالية للقشريات الصغيرة تجاه الملوثات المختلفة، ونظراً لكون هذه القشريات تشكل جزءاً كبيراً من العوالق الحيوانية التي تحتل مركزاً هاماً من السلاسل الغذائية المائية، استخدمها العلماء في تجارب السمية واعتبروها أحد المؤشرات البيئية الحيوية الدالة على مدى صلاحية المياه للري ومدى إمكانية معالجتها لتصبح صالحة للشرب. وقد لاحظ العلماء أن مجموعات النوع الواحد وكذلك الأنواع الأخرى عندما توجد في شروط بيئية وجغرافية مختلفة تبدي بروتيناتها ونظائرها الأنزيمية اختلافات كمية وكيفية يمكن الاعتماد عليها للتمييز فيما بينها بالإضافة إلى الاختلافات الشكلية. ولذا نرى أنه من المفيد أن نقوم بإجراء الرحلان الكهربائي للبروتينات وللنظائر الأنزيمية للنوع *D.atkinsoni* لتأكيد تعريفه الشكلي وبالتالي لإغناء قاعدة التنوع الحيوي في سوريا، ولتحديد الاختلافات النوعية المميزة له عن بقية أنواع الجنس *Daphnia*. كما أنه من المهم أن نحدد تأثير شوارد النتريت على أنزيم الاستيراز والمحتوى البروتيني لنفس النوع الضرورين لعمل الوظائف الحيوية داخل جسم هذا الكائن الحي حيث يؤدي تثبيط أنزيم الاستيراز إلى شل حركته مما يسبب موته. علماً بأننا نسجل من خلال هذه الدراسة وجود النوع *D.atkinsoni* في سد المشنف بمحافظة السويداء لأول مرة من قبلنا في عام (2009)، وكذلك حددنا الشروط البيئية المناسبة لنموه وازدهاره، كما قمنا مخبرياً بتحديد الأوزان الجزيئية لبروتيناته ولنظائر أنزيم الاستيراز بالإضافة إلى دراسة أثر شوارد النتريت على المحتوى البروتيني والأنزيمي له. وقد هدف البحث إلى:

1- دراسة أثر شوارد النتريت على تركيز أنزيم الاستيراز وتركيز البروتين للنوع *Daphnia atkinsoni* ضمن الشروط المخبرية المناسبة لنموه وازدهاره، واستخدامه كمؤشر حيوي بيئي أولي لتقييم مياه السد المعزول منه.

2- تحديد الأوزان الجزيئية للبروتينات ولنظائر أنزيم الأستيراز للنوع *Daphnia atkinsoni* لتمييزه عن بقية أنواع الجنس *Daphnia*، ولإغناء قاعدة التنوع الحيوي.

طريقة البحث:

عينات التريية: قمنا بجمع أفراد النوع *D.atkinsoni* من سد المشنف باستخدام شبكة (تقوبها 200 ميكرومتر)، ونقل العالق إلى المخبر بواسطة أوعية خاصة حافظة للحرارة، وتم توفير الشروط البيئية المخبرية المناسبة لتربيته من درجة حرارة (15±2) م° ودرجة حموضة (7.5-8) واعتمد في تغذيته على الطحالب الطبيعية (scendesmus). ويقع سد المشنف في محافظة السويداء جنوب سوريا ويبلغ حجم تخزينه 1.21 مليون م³، ومساحته 200 ألف م²، وطوله 340 م. وأنشئ عام 2002 لتجميع مياه الأمطار والتلوج واستخدامها بعد معالجتها للشرب الشكل (1-2).



الشكل (1-2) سد المشنف وموقعه في محافظة السويداء (سوريا) (بمقياس 2 ميلي/5 كم)

العمل المخبري: شروط التجربة: أجريت التجارب في الشروط المخبرية المناسبة لنمو النوع بدرجة حرارة (15±2) م°، ودرجة حموضة (7.5-8). وتم تحضير ماء التجربة بالاستناد إلى Roux [8]. ولدراسة أثر شوارد النتريت على المحتوى البروتيني وأنزيم الاستيراز للنوع المدروس قمنا بتعريض مئة فرد إلى تراكيز مختلفة من نتريت الصوديوم لمدة 24 ساعة [8]، ثم قسنا تركيز البروتين الكلي وتركيز أنزيم الاستيراز باستخدام جهاز المطياف الضوئي.

معايرة البروتين الكلي: تم تحضير عينة البروتين بمعالجة أفراد التجربة بأحد المحلات العضوية لترسيب البروتينات، ثم نُقلت لمدة 15 دقيقة بسرعة 3000 g بدرجة حرارة 4 م°، وحل الراسب بماءات الصوديوم 1 مول/ليتر، وعُيرت بطريقة بيوريت عند طول موجي قدره 540 نانومتر بواسطة جهاز المطياف الضوئي [10,9].

ولتحضير عينة أنزيم الإستيراز للمعايرة وللرحلان الكهربائي قمنا بإضافة 30 μl من (البفر الفوسفاتي مع 0.5% Triton) إلى 150 فرد حي وتترك العينة لمدة 1-2 ساعة في الثلجة. ثم تنقل لمدة 20 دقيقة بسرعة 15000 دورة بدرجة حرارة 4-1 م [12,11]. ويتم قياس تركيز الأنزيم بإضافة 20 μL من العينة إلى 1 مل من الملون النوعي الجدول (1) ويقاس عند طول موجه قدره 492 نانومتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي. [12,11].

الرحلان الكهربائي: يتم تحضير عينة البروتين للرحلان الكهربائي: بإضافة 60 μl من (البفر الفوسفاتي مع 1% Triton) إلى 300 فرد حي وتترك لمدة 24 ساعة في الثلجة، ثم تنقل العينة لمدة 20 دقيقة بسرعة 4000 دورة بدرجة حرارة 4 م. ثم يضاف 20 μl بروتين إلى 5 μl دارئة معالجة العينة الجدول (1) وتوضع في

الجدول (1) يبين طريقة تحضير الملونات والمحاليل وشروط الرحلان الكهربائي لأنزيم الاستيراز وللبروتينات

ألفا - نفتيل أسيتات (0.05g) α -naphthil acetate، بيتا- نفتيل أسيتات β -naphthil acetate (0.025g) يحلان في 4 مل اسيتون. ثم تحل المواد السابقة في 100 مل بفر فوسفاتي (Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O(0.2M) PH(8.8) - NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O(0.2M)PH(6.6)) وتحضن بدرجة حرارة 37م لمدة ساعتين [13,11]		ملون أنزيم الاستيراز	
Tris HCl PH 6.8 (0.16ml) - غليسيرول 2.5 مل - B-Mercaptoethanol 0.5 ml، SDS 1g - Bromophenol bleu 0.02 ml (ماء مقطر 6.84 مل) [15,14,9]		دارئة معالجة البروتين	
حل 0.17g من الملون Faste blue في 1 مل اسيتون، ثم نضيف إليه كحول 70% [13,11]		ملون Faste blue	
حل حبة من أزرق كومازي في 80 مل ماء مقطر، ثم يضاف 120 مل ميتانول، ثم يضاف 200 مل حمض خل ثلجي 60%		ملون أزرق كومازي	
الأنزيم	هلامة الفصل	هلامة التركيز	دارئة الترجيل والشروط والمرجع
الاستيراز EST	Tris HCl 0.375 M, PH 8.8 Acrylamide 12.5% 250 μL بيوسلفات الصوديوم Temed 15-20 μl يكمل الحجم إلى 10 مل ماء مقطر	Tris HCl 0.065 M, PH 6.7 Acrylamide 4% 250 μL بيوسلفات الصوديوم Temed 15 μl يكمل الحجم إلى 5 مل ماء مقطر	Tris HCl 0.005 M, PH 8.3 Glycine 0.0384M 150 V - 100 A - FINAL [16]
البروتينات	Acrylamide30% /4.166ml Tris HCl PH8.8 (3.75ml) SDS 0.1 ML 250 μL بيوسلفات الصوديوم Temed 5 μl يكمل الحجم إلى 10مل ماء مقطر	Acrylamide30% /0.832ml Tris HCl PH6.8(0.624ml) SDS 0.05 ML 250 μL بيوسلفات الصوديوم Temed 15 μl يكمل الحجم إلى 5 مل ماء مقطر	Tris HCl 3.0285g Glycine 14.41g SDS 1g يحل في 1000 مل ماء مقطر 150V - FINAL [15,14,9]

حمام مائي لمدة 3 دقائق [15,14,9]. طريقة التلوين النوعية لأنزيم الأستيراز: توضع الهلامة في الملون النوعي مضافاً إليه الملون Faste blue وتحضن في درجة حرارة 37م حتى ظهور عصابات بلون بني [11-13]

الدراسة الإحصائية

وتتضمن علاقة الارتباط: والتي تكون من الشكل التالي: $Y = bx + a$ حيث X المتحول الأول، Y المتحول الثاني، و a, b ثابتين يمكن حسابهما من علاقات محددة، ويمثل الثابت b ميل المستقيم [17]. ومعامل الارتباط بين المتحولين (R): وتتراوح قيمته بين (+1، -1)، وتكون العلاقة ضعيفة كلما اقتربت من الصفر [17]

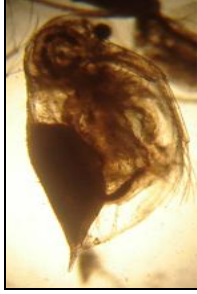
النتائج والمناقشة

ينتمي النوع *D. atkinsoni* إلى:

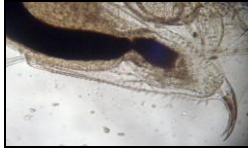
- شعبة مفصليات الأرجل (Arthropoda (Latreille, 1829
- شعبة القشريات (Crustaceae (Brunnich, 1772
- صف غلصميات الأرجل (Branchiopoda (Latreille, 1817
- رتبة (Diplostraca (Gerstaecker, 1866
- رتيبة (Cladocera (Latreille, 1829
- تحت رتيبة (Anomopoda (Stebbing, 1902
- فصيلة (*Daphniidae* (Sars, 1865
- جنس (*Daphnia* (O.F.Muller, 1785
- تحت جنس (*Ctenodaphnia* (Dybowski & Grochowski, 1895
- نوع (*Daphnia atkinsoni* (Baird, 1859 [18,19]

وصف النوع: يتميز بجسم بيضوي الشكل، مضغوط من الجانبين، وتمتد منه إلى الخلف شوكة Spine ظهرية طويلة. ويتألف الجسم من رأس Head صغير وجذع Trunk قليل القطع مغطى بقصعة Carapace كيسية الشكل. وينتهي الرأس إلى الأسفل والخلف، ويمتد على شكل منقار يسمى حيزوم Rostrum، ويحمل عيناً متوسطة eye، وعدة لواحق هي: قرنان وحيدا الشعبة Antennules، قصيران، غير

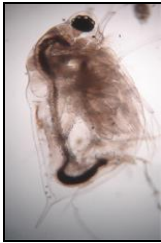
متحركين، وغير ملتحمين مع الحيزوم Rostrum، وقرنان طويلان ثنائيا الشعبة Antennae وتتألف الشعبة الظهرية Branch Dorsal من ثلاث عقل، والشعبة البطنية Branch Ventral من أربع عقل. وقيمان Mandibles، وفكيكان Maxillules. يمتد الخط المتوسط الموجود على الناحية الظهرية للقصة باتجاه الرأس وقد يظهر على جانبيه قوسين. ويحمل الجذع خمسة أشعاع من الأرجل الورقية. وتوجد شويكات صغيرة، وأشواك في مؤخر البطن Abdomen، وأشواك على مخالب البطن الخلفي، ويوجد عند الذكر انتفاخ قرب قاعدة مخالب البطن الخلفي. كما يوجد على الناحية الظهرية للجسم من الداخل كيس بيض Brood pouch، يغلق بواسطة شوكتين. يتراوح حجمه (200-1500) μm [22,21,20] الأشكال (3-7).



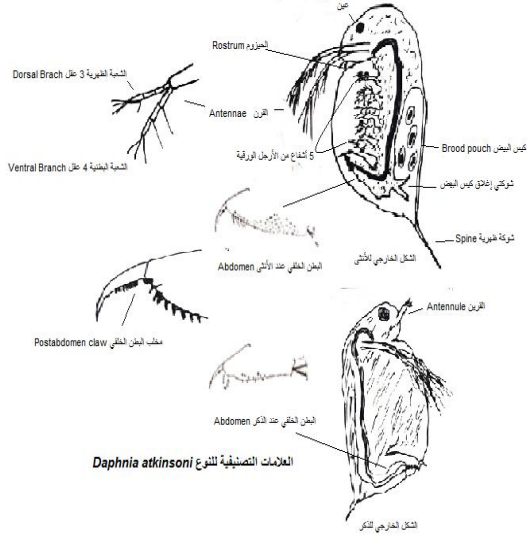
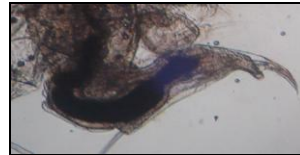
الشكل (5) الشكل الخارجي لأنثى النوع

D. atkinsoni بقوة تكبير 100

الشكل (6) البطن الخلفي لأنثى النوع

D. atkinsoni بقوة تكبير 400

الشكل (7) الشكل الخارجي لذكر النوع

D. atkinsoniالشكل (3) الخارجي والعلامات التصنيفية للنوع *D. atkinsoni*الشكل (4) البطن الخلفي لذكر النوع *D. atkinsoni* بقوة تكبير 400

وقد سجل وجود النوع *D.atkinsoni* في سد المشنف في محافظة السويداء بسوريا لأول مرة من قبلنا في عام (2009)، حيث تراوحت درجات حرارة مياه السد بين (11-19) م° ودرجات الحموضة بين (6.9-7.95) وتراكيز شوارد النتريت بين (0.3-0.45) مغ/ليتر وتراكيز شوارد الأمونيوم بين (0.2-1.7) مغ/ليتر وتراكيز شوارد الفوسفات بين (1.2-1.87) مغ/ليتر وتراكيز الفوسفور بين (0.32-0.77) مغ/ل وتراوحت غزارته بين (0.17-38) فرد/ليتر. وقد لوحظ وجوده في بحيرة Northwestern Sicily بإيطاليا حيث تراوحت درجات حرارة المياه بين (5-22) م° ودرجة الحموضة (7.5)، وتراكيز الفوسفور (1.82-1.36) مغ/ليتر وتركيز نتروجين الأمونيوم بين (0.5-0.77) مغ/ل وتراكيز شوارد نتروجين النتريت بين (0.91-0.57) مغ/ليتر وتراكيز الآزوت بين (11.27-12.58) مغ/ل [23].

أثر نتريت الصوديوم على المحتوى البروتيني وأنزيم الاستيراز للنوع *D.atkinsoni*

قمنا في بداية الأمر بحديد قيمة LC_{50} المسببة لموت 50% من أفراد النوع *D.atkinsoni* وكانت تعادل 11مغ/ليتر، ثم عرضنا أفراده إلى التراكيز التالية من نتريت الصوديوم (1.75-2-2.5-3-4-5-6-7-8) مغ/ليتر لمدة 24 ساعة، وقسنا تركيز البروتين الكلي وتركيز أنزيم الاستيراز واستنتجنا:

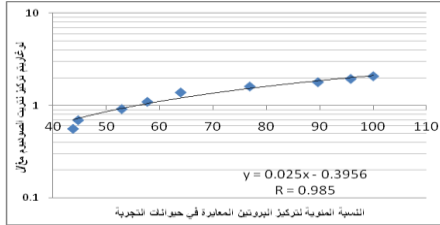
. انخفاض تركيز أنزيم الاستيراز مع ازدياد تركيز نتريت الصوديوم الجدول (2) وبيين لنا الشكل (8) العلاقة بين النسبة المئوية لأنزيم الاستيراز وتركيز نتريت الصوديوم ويمكن تمثيلها بالعلاقة التالية: $Y = -0.0912 X + 8.7459$ حيث Y لوغاريتم تركيز نتريت الصوديوم مغ/ليتر و X النسبة المئوية لأنزيم الاستيراز المتبقية في أفراد التجربة، و R معامل الارتباط ويساوي (-0.995) ويدل على وجود علاقة سلبية بين لوغاريتم تركيز نتريت الصوديوم والنسبة المئوية لتنشيط أنزيم الاستيراز.

- وانخفاض تركيز البروتين الكلي مع انخفاض تركيز نتريت الصوديوم الجدول (2) وبيين لنا الشكل (9) العلاقة بين النسبة المئوية لتركيز البروتين الكلي وتركيز نتريت الصوديوم ويمكن تمثيلها بالعلاقة التالية: $Y = 0.025 X - 0.3956$ حيث Y لوغاريتم تركيز نتريت الصوديوم مغ/ليتر و x النسبة المئوية لتركيز البروتين الكلي المعاييرة في

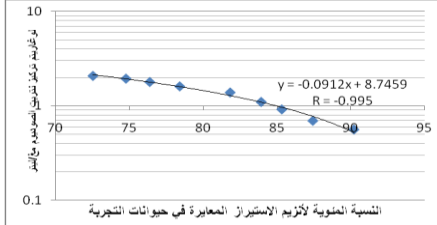
أفراد التجربة، وهي علاقة إيجابية قوية جداً وبلغت قيمة معامل الارتباط بينهما 0.985. وتفسر قيمة الثابت $a = -0.3956$ السالبة بازدياد النسبة المئوية للمحتوى البروتيني مع ازدياد تركيز لوغاريتم نترت الصوديوم.

الجدول (2) يبين تركيز أنزيم الاستيراز والبروتين لدى تعريض النوع *D.atkinsoni* لتراكيز مختلفة من نترت الصوديوم

عدد الأفراد الحية	100	100	95	90	85	75	70	65	60	100
تركيز نترت الصوديوم مغ/ل	1.75	2	2.5	3	4	5	6	7	8	شاهد
تركيز أنزيم الاستيراز	645	625	610	600	585	560.5	546	534.5	518.5	715
النسبة المئوية لأنزيم الاستيراز	%90.2	%87.4	%85.3	%83.9	%81.8	%78.4	%76.4	%74.75	%72.5	%100
تركيز البروتين ($\mu\text{g/L}$)	455	465	550	600	665	800	933	997	1041	1041
النسبة المئوية للمحتوى البروتيني	%43.7	%44.66	%52.83	%57.63	%63.88	%76.84	%89.62	%95.77	%100	%100



الشكل (9): يبين العلاقة بين نسبة تركيز البروتين الكلي المعايير في حيوانات التجربة ولوغاريتم نترت الصوديوم



الشكل (8): يبين العلاقة بين النسبة المئوية لأنزيم الاستيراز المعايير في حيوانات التجربة ولوغاريتم تركيز نترت الصوديوم

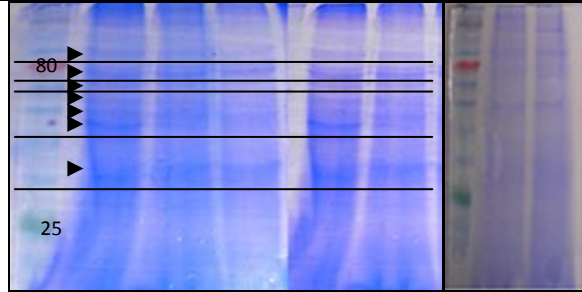
نتائج الرحلان الكهربائي لبروتينات النوع *D.atkinsoni*

لتمييز النوع عن الأنواع الأخرى قمنا بإجراء تجربة الرحلان الكهربائي لبروتيناته ولاحظنا وجود إحدى عشرة عصابة للبروتينات ويبين لنا الجدول (3) والشكل (10) نسبة المسافة التي قطعها كل عصابة على الطول الكلي للرحلان $R_{F\text{protein}}$ ، والأوزان الجزيئية لكل عصابة، وتم تحديدها بالاعتماد على العلاقة الموجودة بين لوغاريتم الوزن الجزيئي لماركر البروتين المعتمد عالمياً لتحديد الأوزان الجزيئية للبروتينات المفصولة بالرحلان الكهربائي والمسافة التي قطعها عصابات ماركر البروتين على

الطول الكلي للرحلان RF_M وتتمثل بالعلاقة التالية ($LnY = -3.2317X + 5.227$) حيث LnY لوغاريتم الوزن الجزيئي لبروتينات الماركر Lnw_m و X نسبة المسافة التي قطعتها عصابات ماركر البروتين على الطول الكلي للرحلان RF_M . ولدى تعريض أفراد النوع لتزيت الصوديوم بتركيز (1.5) مغ/لتر لمدة 24 ساعة لاحظنا اختفاء بعض عصابات البروتين منخفضة التركيز بينما انخفض تركيز البروتين في العصابات الأخرى لقيام العالق بإزالة سمية شوارد التزيت عن طريق تحويلها حيويًا بواسطة تفاعلات الأكسدة والارجاع إلى مواد قليلة السمية مرتبطة مع البروتينات، يطرحها من جسمه بسهولة [24-25] الشكل (10- أ).

الجدول (3) يبين الوزن الجزيئي لبروتينات النوع *D.atkinsoni*

الوزن الجزيئي لبروتينات الماركر. W_M													
نسبة المسافة التي قطعتها عصابات بروتين الماركر على الطول الكلي للرحلان. RF_M													
نسبة المسافة التي قطعتها عصابات بروتين النوع <i>D.atkinsoni</i> على الطول الكلي للرحلان. RF													
رقم العصابة	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
بروتينات	W_M	230	150	100	80	60	50	40	30	25	20	15	10
ماركر البروتين	RF_M	0.055	0.129	0.175	0.222	0.296	0.333	0.425	0.518	0.629	0.722	0.777	0.962
بروتينات	RF	0.166	0.185	0.203	0.242	0.259	0.277	0.314	0.37	0.407	0.444	0.537	
<i>D.atkinsoni</i>	W	108.6	102.3	96.4	85.5	80.5	75.8	67.3	56.2	49.9	44.2	32.8	



(ب)

(أ)

(أ) الرحلان الكهربائي لعينة بروتين لأفراد النوع *D.atkinsoni* عرضت لتزيت الصوديوم بتركيز (1.5) مغ/ل لمدة 24 ساعة.

(ب) الرحلان الكهربائي لعينة بروتين شاهدة لأفراد النوع *D.atkinsoni*

الشكل (10) الرحلان الكهربائي لبروتينات النوع *D.atkinsoni*

نتائج الرحلان الكهربائي لأنزيم الأستيراز للنوع *D.atkinsoni*:

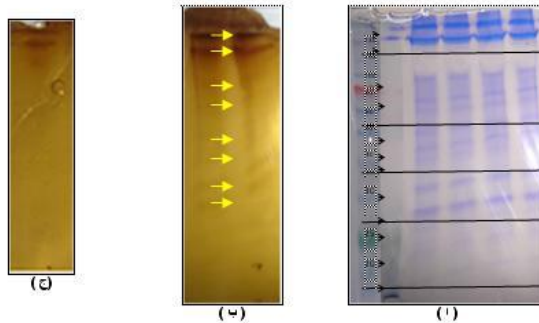
نلاحظ لدى تلوين الرحلان الكهربائي لأنزيمات النوع *D.atkinsoni* بأزرق

كومازي الملون العام للبروتينات ظهور أربع عشرة عصابة ولدى تلوينها بملون نوعي

لأنزيم الأستيراز لاحظنا ظهور ثماني نظائر لأنزيم الأستيراز ويبين لنا الجدول (4) المسافة التي قطعها كل عصابة على الطول الكلي للرحلان RF_{EST} والأوزان الجزيئية لها. ولدى تعريض أفراد التجربة لنتريت الصوديوم بتركيز (1.5) مغ/ليتر لمدة خمسة أيام لاحظنا اختفاء معظم عصابات نظائر أنزيم الاستيراز، بسبب تثبيط شوارد النتريت لبعض التفاعلات الحيوية الضرورية لاستمرار حياة الكائن الحي، مما يؤدي إلى ارتفاع تركيز بعض الشوارد داخل جسمه بينما ينخفض تركيز الشوارد الأخرى، مسببة اضطراباً في حركة الكائن الحي، والتي تعزى إلى انخفاض تركيز الأنزيمات بما فيها أنزيم استيل كولين الاستيراز المسؤول عن هدم المادة الناقلة للسيالات العصبية (وهي الاستيل كولين) وإنهاء فاعليتها البيولوجية [24-25] الشكل (11).

الجدول (4) يبين الوزن الجزيئي لنظائر أنزيم الاستيراز للنوع *D.atkinsoni*

رقم العصابة		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
ماركر	w _m	250	230	150	100	80	60	50	40	30	25	20	15	10	
البروتين	RF _M	0.037	0.092	0.185	0.277	0.351	0.425	0.481	0.555	0.629	0.703	0.777	0.851	0.962	
أنزيم استيراز	RF	0.037	0.055	0.305	0.361	0.388	0.444	0.481	0.518	0.555	0.629	0.666	0.684	0.74	0.777
بأزرق الكومازي	W	247.3	235.87	98.84	81.468	73.963	60.964	53.593	47.114	41.417	32.008	28.138	26.382	21.745	19.116
أنزيم الأستيراز	RF	0.037	0.055	0.305	0.388	0.481	0.518	0.629	0.666						
بملون نوعي	W	247.3	235.87	98.84	73.963	53.593	47.114	32.008	28.138						



(أ) الرحلان الكهربائي لأنزيمات النوع *D.atkinsoni* باستخدام الملون أزرق كومازي ونلاحظ ظهور (14) عصابة.

(ب) الرحلان الكهربائي لأنزيمات النوع *D.atkinsoni* باستخدام ملون نوعي لأنزيم الاستيراز ونلاحظ ظهور (8) عصابات

(ج) الرحلان الكهربائي لأنزيمات النوع *D.atkinsoni* لدى تعريض أفراد التجربة لنتريت الصوديوم (1.5) مغ/ليتر لمدة خمسة أيام

الشكل (11) الرحلان الكهربائي لنظائر أنزيم الاستيراز للنوع *D.atkinsoni*

الإستنتاجات:

تميز النوع المدروس *D.atkinsoni* بوجود إحدى عشرة عصابة بروتينية تراوحت أوزانها الحزئية بين (32.833-108.67) دالتون بينما تراوحت RF بين (0.537-0.166) الجدول (3) وقد أبدى هذا النوع اختلافاً نوعياً في بروتيناته المعزولة مقارنة مع بروتينات النوعين *D.magna* و *D.carinata* الجدول (5)، ويمكننا أن نلاحظ منه الاختلاف في الأوزان الحزئية لبروتينات الأنواع الثلاثة مما جعل العلماء يهتمون بفصل بروتينات الأنواع للتمييز فيما بينها.

الجدول رقم (5) يبين الوزن الحزئي لبروتينات الأنواع *D.magna, D.pulex D.carinata*

رقم العصابة	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>D.atkinsoni</i>	108.67	102.36	96.417	85.541	80.572	75.891	67.33	56.265	49.917	44.286	32.833
<i>D.carinata</i> [15]	87.8	67.2	53.6	50.6	36.2	35.5	32.1	29.3	28.4	25.7	
<i>D.magna</i>	132	122.94	102.407	93.293	82.164	80.676	79.154	76.95	71.861	69.257	67.935
رقم المرجع	[27,26]	[27,26]	[28]	[29]	[30]	[27,26]	[33-31]	[33-31]	[32]	[33-31]	[28]
رقم العصابة	12	13	14	15	16	17	18	19			
<i>D.magna</i>	63.893	61.858	59.641	49.129	48.67	32.042	21.728	13.77			
رقم المرجع	[33-31]	[34]	[35]	[34]	[35]	[36]	[36]	[37]			

كما أظهر النوع أيضاً اختلافاً نوعياً في نظائر أنزيم الاستيراز وكانت أوزانها الحزئية تتراوح بين (28.138-247.3) دالتون ونسبة RF بين (0.666-0.037) الجدول (4) وهي قريبة من نتائج العالم Hebert [38] في دراسته على مجموعات الأفراد العائدة للنوع *D.magna* والموجودة في بحيرات منطقة Hardy-Weniberg حيث وجد ستة وعشرين نظيراً لأنزيم الاستيراز الجدول (6).

الجدول رقم (6) يبين قيم RF للنوع المدروس وللنوع *D. magna*

رقم العصابة RF _{EST}	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>Daphnia magna</i>	0.01	0.02	0.03	0.07	0.15	0.19	0.2	0.21	0.22	0.25	0.26	0.27	0.29
Hardy-Weinberg	0.31	0.33	0.38	0.42	0.46	0.47	0.5	0.53	0.54	0.78	0.91	0.99	1
النوع المدروس RF _M	0.037	0.055	0.305	0.388	0.481	0.518	0.629	0.666					
<i>D.atkinsoni</i> w _m	247.3	235.87	98.84	73.963	53.593	47.114	32.008	28.138					

وفسرت الاختلافات (في عدد نظائر أنزيم الاستيراز والأوزان الحزئية لها) بين مجموعات أفراد النوع الواحد باختلاف الشروط البيئية والجغرافية لمناطق الدراسة، حيث أن مجموعات الأفراد ذات التركيب الوراثي الواحد (والمتمية لنفس النوع) تختلف

عن بعضها البعض في قوة إظهار الصفات الكمية. ولمعرفة هل هذه الاختلافات أدت إلى ظهور نوبيات أو جماعات تعود لنفس النوع، لا بد من متابعة الدراسة على المستوى المورثي للنوع ومقارنتها مع جماعات نفس النوع في مناطق أخرى [7].

في حين ذكر العلماء Haites, Masters, and Don [39] الأوزان الجزيئية لثلاث أنزيمات لبعض أنواع اللاقاريات حيث تراوح الوزن الجزيئي لأنزيم الكولين استيراز بين (300- 40) KD ولأنزيم اريل استيراز بين (108- 35) KD ولأنزيم الكاربوكسيل استيراز بين (128- 40) KD. ونستنتج مما سبق اختلاف الأوزان الجزيئية للنظائر الأنزيمية لأنزيمات بين الأنواع بحيث يمكننا اعتبارها كعلامة تصنيفية للتمييز فيما بينها بالإضافة إلى البروتينات والاختلافات الشكلية. كما لاحظنا أن مركبات النتروجين تؤثر على المحتوى البروتيني والأنزيمي للعوالق الحيوانية، فلدَى دراستنا لتأثير نترت الصوديوم على المحتوى البروتيني والأنزيمي للنوع *D.atkinsoni* لمدة 24 ساعة بلغت قيمة LC_{50} المسببة لموت 50% من أفراد التجربة 11 مغ/ل. وهي أقل بكثير من القيمة التي ذكرت في الدراسة التي تحدثت عن سمية النترات لأنواع اللاقاريات المائية، حيث كانت قيمة LC_{50} لنترت النتروجين (NO_3-N) المسببة لموت 50% من أفراد النوع *Daphnia magna* لمدة 48 ساعة تعادل 462 مغ/ل، بينما كانت تساوي 374 مغ/ل لمدة 48 ساعة للنوع *Ceriodaphnia dubia* في حين تراوحت قيمتها بين (7.1-56.5) مغ/ل لدى تعريض أفراد النوع *C.dubia* لنترت النتروجين لمدة سبعة أيام [40]. أما عندما عرضت أفراد النوع *Daphnia similoides* لنترت النتريت (NO_2-N) بلغت قيمة LC_{50} لمدة 24 ساعة 156.98 مغ/ل و لمدة 48 ساعة 63.09 مغ/ل، بينما كانت لنترت النتروجين النشادر (NH_3-N) لمدة 24 ساعة 1.7 مغ/ل، و لمدة 48 ساعة 1.33 مغ/ليتر [4]. ويتبين لنا مما سبق أن النوع المدروس *D.atkinsoni* غير متساهل مع ارتفاع تركيز شوارد النترت والأمونيوم مقارنة مع الدراسات الأخرى أي أنه أكثر حساسية تجاه التلوث بنترت الصوديوم. وبالتالي يمكننا اعتباره أحد المؤشرات الحيوية البيئية الأولية لتقييم مياه البحيرات الموجود فيها. ويفسر انخفاض غزارة الأفراد وتركيز أنزيم

الاستيراز بازياد تركيز نترتيت الصوديوم بأن مركبات أكاسيد النتروجين تعد من سموم الدم اللاعضوية، التي تؤثر على الوظائف الحيوية للكائن الحي، حيث تتحول النترات إلى نترتيت يرتبط مع الهيموغلوبين مسبباً تأكسد حديد الهيم وتشكل مركب الميتيموغلوبين الذي يمنع وصول الأوكسجين إلى الخلايا مؤدياً إلى موت الكائن الحي [3, 41, 42]. كما تثبط شوارد النترتيت بعض التفاعلات الحيوية داخل جسم الكائن الحي كانتقال الالكترونات اللازمة لعملية انتاج الطاقة ATP [40-43]. ولكن عندما توجد مركبات النتروجين بتركيز منخفضة في الوسط يقوم الكائن الحي بإزالة سميتها عن طريق تحويلها حيويًا بواسطة تفاعلات الأوكسدة والإرجاع إلى مواد أقل سمية ترتبط مع البروتينات مشكلة نواتج يسهل طرحها خارج الجسم [25]. وهذا يفسر لنا انخفاض تركيز المحتوى البروتيني الكلي مع انخفاض تركيز نترتيت الصوديوم، وارتفاع تركيز أنزيم الأستيراز مع انخفاض تركيز نترتيت الصوديوم في تجاربنا للسمية الحادة. وبذلك يمكننا اعتبار نترتيت الصوديوم من المركبات خطيرة السمية على العوالق الحيوانية حتى ولو وجد بتركيز منخفضة في الأوساط المائية العذبة [40, 44, 45]. وهذا ما استنتجه العلماء Hannas, LeBlanc and Das [3] في دراستهم على النوع *D.magna* حيث تنخفض غزارة أفراد النوع والجنس بارتفاع تركيز شوارد النترتيت وشوارد الأمونيوم. في حين تُثبط التفاعلات الحيوية عندما عرض النوع *D.magna* لشوارد النترتيت بتركيز 2.8 yg/L [2].

وأخيراً يمكننا تقييم مياه السد بالاعتماد على عدة معايير وهي:

- الحدود المسموح بها لبعض الشوارد حسب المواصفة رقم 45/ الخاصة بمياه الشرب والمعتمدة من قبل هيئة المواصفات والمقاييس العربية السورية الجدول (7).
- تصنيف المياه الصالحة للاستخدام في الري وسقاية المواشي ولتربية الأسماك وتستخدم لأغراض الشرب بعد تنقيتها حيب المواصفات الفرنسية [46] الجدول (7).
- العوالق الحيوانية وخاصة (القشريات) كمؤشرات على الحالة الغذائية للبحيرات، حيث ذكرا العالمين Gannon, Stemberger [47] أن نوعي جنس الـ *Daphnia* (*D. Longiremis*, *D. cristata*) يوجدان في البحيرات قليلة الغذاء *Oligotrophic*

وفقيرة - متوسطة الغذاء Oligo-Mesotrophic. حيث يتراوح لوغاريتم تركيز الفوسفور الكلي ($P-PO_4^{-3}$ مغ/م³) في البحيرات فقيرة الغذاء بين (3-17.7) [49-48]. ومما سبق يمكننا اعتبار وجود النوع *D. atkinsoni* في مياه السد مؤشراً بيئياً حيوياً على صلاحية مياهه لتربية الأسماك ولري الأراضي الزراعية وإمكانية معالجتها لتصبح صالحة للشرب. ودليلاً على الحالة الغذائية للسد وهي فقيرة الغذاء. الجدول رقم (7) الحدود المسموح بها لبعض الشوارد حسب المواصفة رقم /45/ الخاصة بمياه الشرب والمعتمدة من قبل هيئة المواصفات والمقاييس العربية السورية، وحسب المواصفات الفرنسية للمياه المستخدمة في الري وتربية الأسماك والممكن معالجتها لتصبح صالحة للشرب.

حسب المواصفات الفرنسية	مياه صالحة للشرب حسب المواصفة /45/ للمقاييس العربية السورية					
	سد المشف	الحد الأقصى المسموح به	الحد المسموح به	الرمز	المكون	
9 - 6	7.95-6.9	عند التعقيم بالكلور يفضل أن يكون الـ PH أقل من 8	9-6.5	-	PH	الرقم الهيدروجيني
2 - 0.5	1.7-0.2	0.5 شرط صلاحيتها للشرب جرثومياً	0.5	مغ/ل	NH ₄ ⁺	الأمونيوم
-----	0.45-0.3	0.2	0.2	مغ/ل	NO ₂ ⁻	النتريت
-----	1.87-1.2	1	0.5	مغ/ل	PO ₄ ⁻³	الفوسفات
< 44	-----	-----	-----	مغ/ل	NO ₃	النترات
5 - 3	9.2 - 8.1	-----	-----	مغ/ل	O ₂	الأوكسجين
-----	2.64-1.52	-----	-----	مغ/ل	P-PO ₄ ⁻³	الفوسفور الكلي

التوصيات والمقترحات:

- متابعة الدراسة على المستوى المورثي والبروتيني والأنزيمي لأنواع العوالق الحيوانية لوضع قاعدة بيانات يعتمد عليها في تأكيد تصنيف الأنواع وتصنيف تحت النوع.
- استخدام العوالق الحيوانية كمؤشرات حيوية تدل على مدى تلوث المياه بالأسمدة الكيميائية من خلال تحديد قيمة LC₅₀ لمركبات النتروجين والفوسفات المسببة لانخفاض الغزارة والفاعلية الأنزيمية والمحتوى البروتيني للعالق بنسبة 50%.
- الاستخدام الأمثل للأسمدة الكيميائية من قبل المزارعين للحد من انتقال الكميات الزائدة منها إلى البحيرات في موسم هطول الأمطار.
- متابعة الدراسة التصنيفية والبيئية لأحياء مياه السدود الموجودة في سوريا واستخدامها لتربية الأسماك لزيادة المردود الاقتصادي في البلاد.

المراجع

- 1- BRINGMANN G.; KUHN R.; 1977 - Results of the Damaging Effect of Water Pollutants on *Daphnia magna* (Befunde der Schadwirkung Wassergefährdender Stoffe Gegen *Daphnia magna*), *Z. Wasser-Abwasser-Forsch*, 10(5),161-166.
- 2- KOLUPAYEV Y.I.; 1989 - Sensitivity of Test Functions as a Basis for Selecting Bioassays for Aquatic Toxicity, *Hydrobiol.J*, 25(5), 52-54.
- 3- HANNAS B.R.; DAS P.C.; LI H.; LeBlanc G.A.; 2010 - Intracellular Conversion of Environmental Nitrate and Nitrite to Nitric Oxide with Resulting Developmental Toxicity to the Crustacean *Daphnia magna*, *PLOS ONE*, 5, 8.
- 4- XIANG F.; YANG W.; CHEN Y.; 2010-Acute Toxicity of Nitrite and Ammonia to *Daphnia similoides* of Different Developmental Using the Modified Gaussian Model to Describe, *Bull Environ Contam Toxicol*, 84, 708-711.
- 5- RUVINSKY Y.A.O.; LODKOV Y.I.; 1981- Esterase Genes in *Daphnia pulex* Linked Inheritance and Genotypic Distribution in Natural Populations, *TAG Theoretical and applied genetics*, 60(2), 113-117.
- 6 – WARD R.D.; BICKERTON M.A.; FINSTON T.; HEBERT P.D.N.; 1994- Geographical Cline in Breeding Systems and Ploidy Levels in European Populations of *Daphnia pulex*, *Heredity*, 73, 532-543.
- 7- رحمو عبد القادر، 2006. تحدي التكوّن الحيوي. الطبعة الأولى، دار أطلس بدمشق، سوريا، 281 صفحة.
- 8- ROUX M.; 1987 – Analyse Biologique de L'eau. TEC. Paris, 227.
- 9- UNUMA T.; YAMAMOTO T.; AKIYAMA T.; SHIRAIISHI M.; OHTA H.; 2003- Quantitative Changes Yolk Protein and other Components in the Ovary and Testis of the Sea Urchin *Pseudocentrotus depressus*, *Biology*, 206, 365-372.
- 10- كيالي نجيب، 2009- الكيمياء السريرية. دار شعاع للنشر والعلوم بحلب، سوريا، 1135 صفحة.
- 11- FRIGO M.J.; MANGOLIN C.A.; OLIVEIRA R.S.; MACHADO M.F.P.S.; 2009- Esterase Polymorphism for Analysis of Genetic Diversity and Structure of Wild Poinsettia (*Euphorbia heterophylla*) Populations, *Weed Science*, 57, 54-60.
- 12- MATEUS R.P.; CABRAL H.; BONILLA-RODRIGUEZ G.O.; CERON C.R.; 2009- Molecular Weight Estimation of Esterase Isoenzymes in Closely Related *Drosophila* Species (Diptera:

- Drosophilidae) in non Denaturing Polyacrylamide Gel Electrophoresis, *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 52(5), 1083-1089.
- 13- DOUHRI H.; SAYAH F.; 2010 - Validation of *Orchestia Gammarellus* Enzymatic Activities in Several Sites of Tangier's Bay Morocco, *Environmental science technology*, 4(5), 256-262.
- 14- FROHLICH T.H.; ARNOLD G.; FRITSCH R.; MAYR T.; LAFORSCH CH.; 2009- LC-MS/MS- Based Proteome Profiling in *Daphnia pulex* and *Daphnia longicephala*: the *Daphnia pulex* Genome Database as a Key for High Throughput Proteomics in *Daphnia*, *BMC Genomics*, 10 (171), 1-13.
- 15- MING-FENG Z.; YUN-LONG Z.; CUO Z.; 2006- Differential Protein Expression between Parthenogenetic and Sexual Female of *Daphnia (Ctenodaphnia) carinata*, *Acta Zoologica Sinica*, 52(5), 916-923.
- 16- REYES C.L.M.; MARTINEZ W.O.; BELTRAN M.; 1998- Chemical Variability in the Genus *Musa*: Genetic Characterization Using nine Enzyme Systems, *Infomusa*, I (1), 6-9.
- 17- ياسين محمد شفيق، 1995- الرياضيات. مطبعة دار الكتاب، جامعة دمشق، سوريا، 200 صفحة.
- 18- USTAOGU M. R.; 2004- A Check-List for Zooplankton of Turkish Inland Waters, *Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, 21(3-4), 191-199.
- 19- THORP J.H.; 2009- Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates. Academic Press, Science, 1021.
- 20- HUDEC I.; 1989- Distribution and Biology Species of the Genus *Daphnia* Subgenus *Ctenodaphnia* (Cladocera, Daphniidae) in Slovakia, *Biologia, Bratislava*. 44, 489-498.
- 21- MARRONE F.; BARONE R.; NASELLI-FLORES L.; 2006- Cladocera (Branchiopoda: Anomopoda, Ctenopoda, and onychopoda) from Sicilian Inland Water: an Updated Inventory, *Koninklijke Brill NV, Leiden, Crustaceana*, 78(9), 1025-1039.
- 22- DODSON S. I.; 2001- Ecology and Classification of North American Fresh Invertebrates. Academic Press, Inc. 849-954.
- 23- CASTELLI G.; MARRONE F.; BARONE R.; NASELLI L.; 2006- Crustacean Dynamics in two Argillotrophic Temporary Ponds (Northwestern Sicily, Italy), *Verh. Internat. Verein. Limnol*, 29, 6.
- 24- سلهب عبد العظيم سمور، 1990- علم السموم الحديث. دار المستقبل بعمان، الأردن، 330 صفحة.
- 25- محمد عبد الله إبراهيم، 2002- علم السموم. الطبعة الأولى، دار الكتب الوطنية بينغازي. 476 صفحة.

- 26- Labbe P., and Little T.J.2009. ProPhenolOxidase in *Daphnia magna*: cDNA sequencing and expression in relation to resistance to pathogens.Dev.Comp. Immunol. 33:674-680
- 27- LABBE P.; MCTAGGART S.J.; LITTLE T.J.; 2000- An Ancient Immunity Gene Duplication in *Daphnia magna*: RNA Expression and Sequence Analysis of two Nitric Oxide Synthase Genes, *Dev. Comp. Immunol*, 33, 1000-1010
- 28- HANNAS B.R.; LEBLANC G.A.; 2010- Expression and Ecdysteroid Responsiveness of the Nuclear Receptors HR3 and E75 in the Crustacean *Daphnia magna*. *Mol. Cell. Endocrinol*, 312, 208-218.
- 29- TOKISHITA S.; YAMAGATA H.; 2008- Genomic Organization and Expression of Hemoglobin and other Hypoxia Responsive Genes in *Daphnia*. EMBL/GenBank/DDBJ databases.
- 30- SAGAWA K.; YAMAGATA H.; SHIGA Y.; 2005- Exploring Embryonic Germ Line Development in the Water Flea *Daphnia magna* by Zinc-Finger-Containing VASA as a marker. *Gene Expr. Patterns*, 5, 669-678
- 31- KATO Y.; KOBAYASHI K.; ODA S.; TATARAZAKO N.; WATANABE H.; IGUCHI T.; 2007- Cloning and Characterization of the Ecdysone Receptor and Ultraspiracle Protein from the Water Flea *Daphnia magna*, *J. Endocrinol*, 193, 183-194
- 32- TOKISHITA S.; KIMURA S.; MANDOKORA Y.; KATO K.; SHIGA Y.; TAKAHASHI Y.; OHTA T.; YAMAGATA H.; 2006- Tissue-Specific Expression of a BHLH-PAS Protein Homologous to ARNT during the Development of Crustacean *Daphnia magna*, *Gene*, 376, 231-239.
- 33- KATO Y.; KOBAYASHI K.; ODA S.; COLBOURN J.K.; TATARAZAKO N.; WATANABE H.; IGUCHI T.; 2007- Molecular Cloning and Sexually Dimorphic Expression of DM-domain Genes in *Daphnia magna*, *Genomics*, 91, 94-101.
- 34- HAAG C.R.; MCTAGGART S.J.; DIDIER A.; LITTLE T.J.; CHARLESWORTH D.; 2009- Nucleotide Polymorphism and Within-Gene Recombination in *Daphnia magna* and *D. pulex* Two Cyclical Parthenogens, *Genetics*, 182, 313-323.
- 35- SHIGA Y.; ARAGANE Y.; HARAGUCHI T.; YAMAGATA H.; 2008- Conserved Margin Organizer Regulates Wing-Like Outgrowth of the Carapace in *Daphnia*. EMBL/GenBank/DDBJ database.
- 36- REGIER J.C.; SHULTZ J.W.; ZWICK A.; HUSSEY A.; BALL B.; WETZER R.; MAERIN J.; CUNNINGHAM C.W.; 2009- Arthropod Relationships Revealed by Phylogenomic Analysis of Nuclear Protein-Coding Sequences. *Nature*, 463, 1079-1083.

- 37- GOLDMANN T.; BECHER B.; WIEDORN K.H.; PIROW R.; DEUTSCHBEIN M.E.; VOLLMER E.; PAUL R.J.; 1999- Epipodite and Fat Cells as Sites of Hemoglobin Synthesis in the Branchiopod Crustacean *Daphnia magna*, *Histochem. Cell Biol*, 112, 335-339
- 38- HEBERT P.D.N.; 1974- Enzyme Variability in Natural Population of *Daphnia magna* III, genotypic frequencies in intermittent populations, *Genetics*, 77, 335-341.
- 39- HAITES N.; DON M.; MASTERS C.J.; 1972- Heterogeneity and Molecular Weight Inter- Relationships of Esterase Isoenzymes of Several Invertebrate Species, *Comp. Biochem. Physiol*, 42, 303-332.
- 40- CAMARGO J.A.; ALONSO A.; 2006- Ecological and Toxicological Effects of Inorganic Nitrogen Pollution in Aquatic Ecosystems a Global Assessment, *Environment international*, 32, 831-849.
- 41- WATERMAN T.H.; 1969- The Physiology of Crustacea Metabolism and Growth, *Academic Press, New York and London*, 1, 670.
- 42- GOW A. J.; PAYSON A.P.; BONAVENTURA J.; 2005- Invertebrate Hemoglobins and Nitric Oxide how Heme Pocket Structure Controls Reactivity, *Inorganic Biochemistry*, 99, 903-911.
- 43- CHEN J.C.; CHEN C.T.; CHENG, S.Y.; 1994- Nitrogen Excretion and Changes of Hemocyanin Protein and Free Amino Acid Levels in the Hemolymph of *Penaeus monodon* Exposed to Different Concentrations of Ambient Ammonia-N at Different Salinity Levels, *Marine Ecology Progress series*, 110, 85-94.
- 44- CAMARGO J.A.; ALONSO A.; SALAMANCA A.; 2005- Nitrate Toxicity to Aquatic Animals Is A Review with New Data for Freshwater Invertebrates, *Chemosphere*, 58, 1255-1267.
- 45- RAFIKOVA O.; RAFIKOVA R.; NUDLER E.; 2002- Catalysis of S-nitrosohols Formation by Serum Albumin the Mechanism and Implication in Vascular Control, *PNAS*, 99(9), 5913-5918.
- 46- المفتي محمد بشار، 1995- الهندسة البيئية. مطبعة الاتحاد بدمشق، جامعة دمشق، سوريا. 305 صفحة.
- 47- GANNON J. E.; RICHARD S.; STEMBERGER S., 1978- Zooplankton (Especially Crustaceans and Rotifers as Indicators of Water Quality, *Trans. Amer. Micros. Soc.*, 97(1), 16-35.
- 48- UHLMANN D.; 1982 - Hydrobiologie Ein Grundriss für Ingenieure und Naturwissenschaftler. Veb Gustav Fischer Verlag Jena. Zweite., 118.
- 49- Wetzel, R.G.; 1983- Limnology. Philadelphia, W.B. Saunders Co, 767.