

دراسة تأثير تراكيز مختلفة من النفط الأبيض في بعض الفعاليات الفسلجية في *Oscillatoria chlorina*

أ.د. حميد سلمان خميس      د. علي مؤيد سلطان      د. ايمن عوني سليم

دراسة تأثير تراكيز مختلفة من النفط الأبيض في بعض الفعاليات الفسلجية في

### *Oscillatoria chlorina*

أ.د. حميد سلمان خميس\*      د. علي مؤيد سلطان\*      د. ايمن عوني سليم\*\*  
\* جامعة تكريت - كلية التربية للبنات - قسم علوم الحياة      \*\* جامعة تكريت - كلية الصيدلة

#### المخلص

تم اختبار تأثير تراكيز مختلفة من النفط الأبيض 0.25% ، 0.5% ، 1% ، 2% في *Oscillatoria chlorina* واعتمد قياس الكثافة البصرية للنمو Optical density وتركيز الكلوروفيل Chlorophyll a وصبغة الفايكوسيانين Phycocyanin وتركيز البروتين Protein كمؤشر على مدى تأثير هذا النوع فضلا عن التغيرات المظهرية، اذ سجل النمو في عينة السيطرة في اليوم الثلاثون (0.43) ككثافة بصرية في حين بلغ النمو تحت تأثير المعاملة 0.25% (0.36)، وثبط النمو تحت تأثير المعاملات 1% و 2%، ونجد ان تركيز صبغة الكلوروفيل تحت تأثير المعاملة 0.25% في اليوم الثامن كان نصف المسجل في عينة السيطرة لليوم نفسه ونجد ان هذا النوع قاوم تأثير هذه المعاملة ليسجل في نهاية فترة التتمية (0.72) ملغم/مل. وقد سببت المعاملة 0.5% اختزال تركيز الكلوروفيل الى النصف اذ لم تتجاوز قيمة الكلوروفيل (0.42) ملغم/مل في اليوم الثلاثون، واختزالها كلياً للمعاملات 1% و 2%، وقد تراجع تركيز البروتين تحت تأثير معاملات النفط الأبيض 0.25% و 0.5% واختزاله كلياً للمعاملات 1% و 2%، ولوحظت بعض التبدلات المظهرية بفعل تأثير النفط الابيض مثل تغلظ جدران الخلايا وزيادة في عرض الخلايا. ومن خلال طيف امتصاص الاشعة تحت الحمراء IR يبدو ان *Oscillatoria chlorina* استهلك مجاميع المثلث الاليفاتية CH<sub>3</sub> ذات المط المتناظر وغير المتناظر ذات التردد (2870 سم<sup>-1</sup> و (2950 سم<sup>-1</sup> التي كانت موجودة في عينة السيطرة وايضا اختفاء حزمتي الانحناء عند التردد (1430 سم<sup>-1</sup> و (1380 سم<sup>-1</sup>.

الكلمات المفتاحية: *Oscillatoria chlorina* ، السيانوبكتريا ، النفط الأبيض.

### Study the Effect of Different Concentrations of Kerosene in Some Physiological Activities in *Oscillatoria Chlorina*

\* Hamid Salman Khamis      Ali M. Sultan \*      Ayman A. Salim \*\*

\*Tikrit University - College of Education for Girls - Department of Biology

\*\* Tikrit University - College of Pharmacy

Received 20 January 2015 ; Accepted 14 June 2015

دراسة تأثير تراكيز مختلفة من النفط الأبيض في بعض الفعاليات الفسلجية في *Oscillatoria chlorina*

د. ايمن عوني سليم

د. علي مؤيد سلطان

أ.د. حميد سلمان خميس

### Abstract

The effect of different concentrations of kerosene had been examined upon *Oscillatoria chlorina*, The optical density had been depended as measure for growth as well as chlorophyll concentration, Phycocyanin pigment and protein concentration as an indicator of kerosene effects on *Oscillatoria chlorina*, in addition to morphological changes. The optical density of growth in the control sample was (0.43), while it was (0.36) at 0.25% kerosene concentration, and the growth inhibited at  $\geq 1\%$ . At 0.25% kerosene, the chlorophyll pigment concentration in the 8th day was half of that in control sample in the same day. Also that species tolerates the effect of this concentration of kerosene As the chlorophyll concentration record (0.72) mg/ml at the end of growth period. while influence of 0.5% kerosene, the chlorophyll pigment concentration was decline to 0.42 mg/ml, and totally reduced under 1% & 2% of kerosene concentration. The protein concentration also reduced under the effect of 0.25% & 0.5% of kerosene and totally reduced at 1% & 2% of kerosene. Some morphological changes noted under the effect of kerosene as thickening of cell wall and increase in cellular diameter. As well as the absorption spectrum infrared by FTIR show that the *Oscillatoria chlorina* consume sy & asy methyl group ( $\text{CH}_3$ ) at ( $2870 \text{ cm}^{-1}$ ) & ( $2950 \text{ cm}^{-1}$ ), and absence of bending bundle at the ( $1430 \text{ cm}^{-1}$ ) & ( $1380 \text{ cm}^{-1}$ ) which were present in the control sample.

**Key words:** *Oscillatoria chlorina* , cyanobacteria , kerosene

### المقدمة

تنتشر هذه البكتريا في معظم البيئات تقريباً وربما تتواجد في معظم عينات التربة (Whitton and Potts, 2002)، وقد بين (Fay, 1983) بانها ذاتية التغذية Photoautotrophs قد تتواجد بعض أنواعها في بيئات متطرفة وعند تواجد السيانوبكتريا بعيدة عن الضوء فإنها تبقى ساكنة الا ان بعض انواعها يمكنها تأبيض بعض المركبات العضوية منها السكريات (Stewart, 1973). ان من اهم اسباب انتشارها الواسع امتلاكها آليات تكيفيه خاصة (Dworkin *et al.*, 2006) وفي مقدمتها قدرتها على تحمل تأثير الملوثات ومنها المركبات النفطية الحاوية على طيف واسع من المركبات الهيدروكربونية وقد تلعب دورا مهما في عملية التحلل الحيوي لبعض المركبات النفطية (Cerniglia, 1992). ويقدر بعض الباحثين في مجال البتروكيماويات بان عدد المركبات الهيدروكربونية في المشتقات النفطية قد يصل الى ثلاثة ملايين، وقد أشار (Plohl and Leskovsek, 2002) ان المشتقات النفطية هي المزيج الاكثر تعقيدا للمركبات الهيدروكربونية التي تسبب مشكلة تلوث عالمية تطال التربة والماء وقد تنفذ الى المياه الجوفية وبدورها تختزل اعداد كبيرة من الاحياء الدقيقة المدورة للعناصر وبالتالي تدمر وتعطل السلاسل الغذائية وتعيق سريان الطاقة، وللهيدروكربونات تأثيرات سمية بالغة Exhibit toxic فضلا

دراسة تأثير تراكيز مختلفة من النفط الأبيض في بعض الفعاليات الفسلجية في *Oscillatoria chlorina*

د. ايمن عوني سليم

د. علي مؤيد سلطان

أ.د. حميد سلمان خميس

عن كونها مسببات سرطانية Carcinogenic وأيضا مطفرات وراثية Mutagenic (Juhasz *et al.*, 1996)، ان التلوث بالمركبات الهيدروكربونية يسبب تعطل العلاقات المتبادلة بين الكائنات الحية وبيئتها، وبالتالي يحدث خلل في توازن مكونات النظام البيئي مما يجعل النتائج السلبية ظاهرة للعيان. اذ يعد النفط ومشتقاته من الملوثات الأساسية للبيئات المائية واليابسة نتيجة لعمليات التنقيب واستخراج النفط والغاز الطبيعي أو منصات تعبئة أو نقل هذه المنتجات في المناطق البحرية أو المحاذية لها (Dandekar *et al.*, 2000). ان المركبات المتاحة بايولوجيا Bioavailable هي المركبات التي تستطيع النفاذ Transporting عبر أغشية الاحياء الدقيقة وبالتالي يمكن تحليلها وتحويلها الى اشكال اخرى وهذه المركبات غالبا ما تكون مركبات قطبية Polar قابلة للذوبان في الماء (Guha and Jaffe, 1996) الا ان الهيدروكربونات مركبات غير قطبية Non-polar شحيحة الذوبان في الماء Low solubility in water وسهلة الامتصاص من قبل مكونات التربة وبالتالي فهي non bioavailable (Guha and Jaffe, 1996). أن عملية تحطيم الهيدروكربونات تتم بوجود الانزيمات المؤكسدة Oxygenase (Plohl and Leskovsek, 2002) ومن اهم متطلباتها توفر الاوكسجين. اما المركبات الأروماتية Aromatic غالبا ما تتحطم بفعل الانزيمات الخارجية Dioxygenase enzyme، ويعتقد امتلاك أنواع السيانوبكتريا المقاومة للهيدروكربونات كلا الانزيمين Dioxygenase و Oxygenase (Cerniglia *et al.*, 1979).

### المواد وطرائق العمل

#### مواقع جمع العينات

جمعت العينات خلال شهري أيار وحزيران في عام 2012 من مواقع مختلفة واقعة ضمن محافظة صلاح الدين وهي من مدينة تكريت وسامراء وبلد والدجيل، العينات المأخوذة كانت من مواقع متعددة واقعه على ضفة نهر دجلة ومن بعض المستنقعات والحدائق، لضمان الحصول على انواع عديدة من افراد السيانوبكتريا، وتضمنت العينات المجموعة على ماء وتربة ووضعت في أكياس وقناني بلاستيكية معقمة تم إعدادها مسبقا لهذا الغرض.

#### الوسط الزراعي السائل BG11

يعد من أفضل الاوساط الانتقائية المتكاملة العناصر الغذائية التي توفر كافة متطلبات التغذية للسيانوبكتريا (Stanier *et al.*, 1971) أذبيت مكونات الوسط BG11 المدرجة في الجدول (1) في الماء المقطر مع عملية التحريك المستمر باستخدام جهاز Magnetic Stirrer Hotplate نوع Gallen Kamp للحصول على ذوبان وتجانس كامل لمكونات الوسط، وضبط الأس الهيدروجيني الـ pH لهذا الوسط بحدود 7.8-7.6 باستخدام بيكربونات الصوديوم  $\text{NaHCO}_3$  و حامض الهيدروكلوريك المخفف 0.1 HCl عياري، وتمت عملية قياس الـ pH بواسطة جهاز قياس الدالة الحامضية pH meter نوع Oyster، حيث يؤخذ حجم 100 مل من الوسط ويوزع في دوارق ذات حجم 250 مل وتعلق فوهات الدوارق بسدادات معدة مسبقا من القطن الطبي والشاش، ثم تعقم باستخدام جهاز التعقيم الرطب Autoclave نوع Sanshe modl yx280B بدرجة حرارة 121 م° ولمدة 20 دقيقة تحت ضغط يبلغ 15 باوند/انج<sup>2</sup> لتصبح معدة لعملية الزرع، وللحصول على الوسط BG11 ذو القوام الصلب يضاف الاكار بنسبة 1%.

دراسة تأثير تراكيز مختلفة من النفط الأبيض في بعض الفعاليات الفسلجية في *Oscillatoria chlorina*

د. ايمن عوني سليم

د. علي مؤيد سلطان

أ.د. حميد سلمان خميس

## تنمية وعزل السيانوبكتريا

زرعت العينات التي جمعت من مناطق متعددة على أطباق حاوية على الوسط BG11 الصلب، ثم حضنت الأطباق في الحاضنة Cooling Incubator صنع في انكلترا من قبل شركة Gallen Kamp بدرجة حرارة 25 م° مع تعريضها إلى إضاءة مستمرة بشدة 2500 لوكس، وبعد مرور مدة اسبوعين الى ثلاثة لوحظت نموات دقيقة للسيانوبكتريا على شكل مستعمرات خضراء وبعضها مائل الى اللون البني ومن ثم تم تأشير المستعمرات المتميزة باستخدام القلم من اسفل الطبق بعد اجراء عملية تشخيص أوليه تحت المجهر الضوئي للمستعمرات النامية ومن ثم نقلها الى أطباق بتري حاوية على الوسط الزرعي BG11 الصلب كمرحلة أولية من مراحل التنقية لتهيئة الأجناس الملائمة للدراسة، ثم حضنت الأطباق تحت تأثير الظروف نفسها، ويستغرق النمو مدة زمنية اقل من المدة الزمنية التي استغرقها النمو في المرحلة الأولى من الزرع، لان السيانوبكتريا قد تكيفت للنمو على نوع الوسط الزرعي المستخدم، كررت العملية السابقة لغاية الحصول على أنواع نقيه، بعدها تنقل المستعمرات النامية إلى دوارق ذات حجم 250 مل حاوية على 100 مل من الوسط الزرعي السائل، ثم تحضن في الحاضنة المبردة الهزازة 100 دورة/دقيقة نوع Gallen Kamp illuminated cooled.

## اختيار أنواع السيانوبكتريا الملائمة للدراسة

بعد عزل وتنقية بعض الانواع، تم تنميتها على اوساط BG11 سائلة حاوية على تراكيز واطئة من النفط الابيض، وتم إعادة زرعها ونقلها بصورة مستمرة على عدة مراحل وفي كل مرحلة يتم تعريض كل نوع الى تراكيز مختلفة من النفط الابيض، ليتسنى معرفة الأنواع المقاومة للتأثير السام للمواد الهيدروكربونية، وقد تم انتخاب بعض الأنواع التي تكيفت وتميزت بالمقاومة ومنها *Oscillatoria chlorina*، اذ لم يظهر النمو حتى في الأنواع المقاومة الا بعد عدة مراحل زمنية طويلة من الزرع مع التعريض المستمر للمواد الهيدروكربونية امتدت الى ستة اشهر حيث تكيفت بنسب متفاوتة.

## اختيار النفط الابيض

مما لا شك فيه ان النفط الأبيض المستخدم كوقود للتدفئة من الملوثات الخطرة التي تهدد بيئاتنا اذ لا يكاد يخلو بيت منه، لذا استخدم في هذه الدراسة لمعرفة مدى تأثيره على *Oscillatoria chlorina* وأيضا تأثره بهذا النوع، وقد استخدم أربعة تراكيز للنفط الابيض وهي 0.25% ، 0.5% ، 1% ، 2% كما موضح في الجدول (2).

## قياس النمو

تم تنمية انواع السيانوبكتريا على الوسط السائل BG11 لمدة 30 يوما، تحت ظروف التنمية المشار إليها انفا، و تم قياس النمو ككثافة بصرية للـ *Oscillatoria chlorina* النامي تحت تأثير النفط الابيض وبالتراكيز 0.25% ، 0.5% ، 1% ، 2% ، واجريت القياسات في الأيام الثامن والسادس عشر والرابع والعشرون واليوم الثلاثون من مدة الزرع من خلال اخذ حجم 5 مل من المزرعة وبدلالة الكثافة البصرية Optical density على الطول الموجي 436 نانوميتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer نوع (Gibson and Fay, 1983) Lapo Med. inc.

دراسة تأثير تراكيز مختلفة من النفط الأبيض في بعض الفعاليات الفسلجية في *Oscillatoria chlorina*

أ.د. حميد سلمان خميس      د. علي مؤيد سلطان      د. ايمن عوني سليم

### قياس الكلوروفيل *Chlorophyll a*

تم قياس تركيز الكلوروفيل للنوع *Oscillatoria chlorina* تبعاً لطريقة (Mackinney, 1941) بعد تعريضه لتأثير النفط الأبيض، ويتم من خلال أخذ حجم 5 مل من المزرعة لليوم الثامن والسادس عشر والرابع والعشرين واليوم الثلاثون من مدة الزرع، ثم تطرد الخلايا عن سائل الوسط باستخدام جهاز الطرد المركزي Centrifuge نوع Hettich بسرعة 3500 دورة/ دقيقة، يؤخذ الراسب الذي يضاف إليه أسيتون بتركيز 80%، وتكسير الخلايا المعقدة بالأسيتون باستخدام جهاز Mixer نوع Griffin، يرشح المحلول الناتج من عملية التكسير، يؤخذ الرشح الذي يكون حاوياً على الكلوروفيل *Chlorophyll a* بشكل ذائب، يكمل الحجم إلى 100 مل بالأسيتون بالتركيز نفسه، ثم تقرأ شدة الكثافة الضوئية Optical density بواسطة جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer نوع Lapo Med. inc وخلية كوارتز سمك 1 سم على الطولين الموجيين A645، A633 نانوميتر بعد تصفير بالأسيتون بتركيز 80%، يحسب تركيز الكلوروفيل بوحدة ملغم/مل من خلال تطبيق المعادلة  $\text{Chlorophyll a (mg/ml)} = 12.7 \times A663 - 2.69 \times A645$

### تقدير كمية البروتين Protein Estimation

قدرت كمية البروتين من خلال تحضير كاشف لوري (Lowry *et al.*, 1951) من المواد الآتية:

- 1- محلول (A) 2%  $\text{NaCO}_3$  مذابة في 0.1 مولار من NaOH.
- 2- محلول (B) 0.5%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .
- 3- محلول (C) 1% صوديوم بوتاسيوم تترات.
- 4- المحلول القاعدي: يحضر أنياً بواسطة مزج 50 مل من محلول (A) مع 0.5 مل من محلول (B) مع 0.5 مل من محلول (C).
- 5- محلول فولن Folin-Ciocalteu reagent بنسبة 1:1 مخفف بالماء المقطر.
- 6- البروتين القياسي Standard protein تم تحضير البروتين القياسي ألبومين البقر Bovine Serum Albumin (BSA) كما يأتي:-
- A- محلول خزين Stock تركيزه 200 ملغم/لتر تم تحضيره بواسطة إذابة 5 ملغم من (BSA) في 25 مل من الماء المقطر.
- B- من المحلول الخزين يتم تحضير التراكيز المطلوبة كما موضح في الشكل (1).

### طريقة العمل

يؤخذ 5 مل من المزرعة النامية ويتم تقدير بروتين الخلايا بعد التخلص من البروتينات الخارجية الموجودة في الوسط الزراعي كما يلي:-

- 1- ترسب خلايا السيانوبكتريا باستخدام جهاز الطرد المركزي Centrifuge نوع Hettich بسرعة 3500 دورة/دقيقة مدة خمس دقائق ثم يضاف إلى الراسب 5 مل من Tris-HCl Buffer بتركيز 0.05 مولار وبدالة حامضه pH 7.8.
- 2- تحطم خلايا السيانوبكتريا بواسطة جهاز Mixer نوع Griffin مع الحفاظ على درجة حرارة 4 م°

دراسة تأثير تراكيز مختلفة من النفط الأبيض في بعض الفعاليات الفسلجية في *Oscillatoria chlorina*

د. ايمن عوني سليم

د. علي مؤيد سلطان

أ.د. حميد سلمان خميس

- 3- فصل الراسب عن الراشح بواسطة جهاز الطرد المركزي بسرعة 3500 دورة/دقيقة مدة 10 دقائق، يهمل الراسب ويؤخذ الراشح الحاوي على البروتين.
- 4- يضاف (2.5) مل من المحلول القاعدي إلى 0.5 مل من الراشح وتمزج جيدا، ويترك الأنبوب بدرجة حرارة الغرفة لمدة (10) دقائق.
- 5- يضاف 0.25 مل من محلول فولن المخفف إلى المزيج أعلاه وتمزج بسرعة ويترك المزيج لمدة 30 دقيقة.
- 6- نجرى نفس الخطوتين الأخيرتين باستخدام الماء المقطر لإعداد البلائك Blank لتصفير الجهاز.
- 7- تقرا شدة اللون لمحتوى الأنابيب بعد تصفير الجهاز عند الطول الموجي 750 نانوميتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي spectrophotometer نوع Lapo med. inc. وبالمقارنة مع نتائج المنحنى القياسي شكل (1) نقدر قيم البروتين.

## قياس Phycocyanin

تم قياس امتصاصية صبغة الـ Phycocyanin من خلال اخذ حجم 5 مل من المزرعة النامية، حيث تعزل الخلايا عن سائل الوسط باستخدام جهاز الطرد المركزي Centrifuge نوع Hettich بسرعة 3500 دورة لمدة 10 دقائق، يهمل الراشح ويؤخذ الراسب الحاوي على الخلايا ويعلق في (5) مل من محلول منظم  $K_2HPO_4$  phosphate buffer 0.01M بدالة حامضيه pH 7.0 (Tandeau de Marsac, 1977)، تكسر الخلايا باستخدام جهاز الـ Mixer نوع Griffin لمدة 20 دقيقة، ثم يرشح المحلول يهمل الراسب ويؤخذ الراشح، تقرا الكثافة البصرية Optical density للراشح باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer نوع Lapo Med. inc، على الطولين الموجين A615 , A652 نانوميتر.

$$\text{Phycocyanin (mg/ml)} = [A615 - 0.474(A652)] / 5.34$$

## قياس العينات بجهاز امتصاص طيف الأشعة تحت الحمراء FTIR

استخدم المذيب العضوي  $CCl_4$  لإذابة المركبات العضوية المتبقية في الوسط الزرع BG11 في نهاية فترة التسمية وتم فصل المذيب عن سائل الوسط بواسطة قمع الفصل ثم وضع في انابيب بلاستيكية سعة 10 مل، واجري الفحص باستخدام جهاز طيف الأشعة تحت الحمراء FTIR نوع M.R.C LTD من خلال وضع قطرة على قرص بروميد البوتاسيوم KBr المضغوط ومن ثم توضع داخل جهاز الـ IR المشار اليه في أعلاه واخذ القراء اليا Computerize، ليتسنى معرفة التغيرات التي طرأت على عينة النفط الابيض، اما عينة السيطرة فهي عبارة عن 0.5 مل من النفط الابيض موضوع في 100 مل من الوسط الزرع BG11 ومحفوظة تحت تأثير نفس الظروف البيئية للمزارع النامية الا انها غير معاملة بأنواع السيانوبكتريا.

## التحليل الإحصائي

تم تحليل البيانات إحصائيا باستخدام برنامج SPSS الاحصائي وتم إيجاد معامل الارتباط Correlations بين معاملات النفط الابيض وبين النمو وتركيز الكلوروفيل والفايكوسيانين وتركيز البروتين

دراسة تأثير تراكيز مختلفة من النفط الأبيض في بعض الفعاليات الفسلجية في *Oscillatoria chlorina*

د. ايمن عوني سليم

د. علي مؤيد سلطان

أ.د. حميد سلمان خميس

### النتائج والمناقشة

بينت نتائج تنمية النوع *Oscillatoria chlorina* تحت تأثير تراكيز مختلفة من النفط الابيض وهي 0.25% ، 0.5% ، 1% ، 2% استجابات متباينة على مستوى النمو وتركيز الكلوروفيل وصبغة الفايكوسيانين، فضلا عن تركيز البروتين كما موضح في الاشكال المرقمة (2)، (3)، (4)، (5) على التوالي. ففي الشكل (2) يلاحظ تأثير التراكيز المختلفة للنفط الأبيض على نمو *Oscillatoria chlorina* لكل من الايام الثامن والسادس عشر والرابع والعشرون والثلاثون، عند معاملة المزرعة 0.25% من النفط الابيض نلاحظ ان النمو يزداد بشكل متدرج ومنتظم اذ سجل في اليوم الثامن 0.04 أي نصف المسجل في عينة السيطرة في اليوم نفسه لتبلغ الكثافة البصرية للنمو في اليوم الثلاثون من فترة التنمية (0.36) أي اقرب مايكون لعينة السيطرة التي بلغت 0.43 عند نفس اليوم ونجد ان معامل الارتباط كان وثيقا عند مستوى المعنوية 0.01 كما هو موضح في الجدول (3)، وعند معاملة مزرعة النوع *Oscillatoria chlorina* بـ 0.5% من النفط الابيض نجد ان النمو ازداد بشكل بطيء ومنتدرج ليبلغ في اليوم الثلاثون 0.23 وهذا نصف المسجل في عينة السيطرة، وربما يكون هذا التفاوت في النمو بسبب قدرة هذا النوع على تحمل سمية المركبات الهيدروكربونية اذ اشار الباحثان (Adam, and Duncan, 1999) الى ان بعض التراكيز الواطنة تكون ضمن حدود التحمل وعند ارتفاعها تحد من امكانية النمو وهذا قد لوحظ عند معاملة *Oscillatoria chlorina* بتراكيز اعلى من النفط الابيض 1% ، 2% حيث انها لم تسجل نتائج تذكر على مستوى النمو، اعتمادا على معامل الارتباط فان العلاقة عكسية ما بين تركيز النفط الأبيض و النمو ككثافة بصرية. في بحث (Miller et al., 1978) اشار الى ان التراكيز الواطنة قد تثبط النمو اما التراكيز العالية قد تؤدي الى الموت وهذا موافق لبحث (Kusk, 1978). على اية حال ان النمو يعتمد بصورة عامة على تراكيز الصبغات التمثيلية المستقطبة للضوء ومن اهمها صبغة الكلوروفيل التي تساعد على تحويل الطاقة الضوئية Light energy الى طاقة كيميائية Chemical energy (ATP, NADPH) ثم تدخل هذه الأخيرة في صناعة محتويات الخلية وبالتالي تزداد احجام الخلايا وتنقسم بشكل متوالي (Danks et al., 1983)، بناء على ذلك فان أي تغيير يطرأ على محتوى صبغة الكلوروفيل ينعكس بصورة مباشرة على فعاليات الخلية من حيث النمو وتراكم بعض المركبات الحيوية فضلا عن المحتوى البروتيني للخلية، وقد تأثرت تراكيز صبغة الكلوروفيل استجابة للمعاملة بالنفط الابيض كما موضح في الشكل (3)، اذ نجد ان تركيز صبغة الكلوروفيل في المزرعة المعاملة النفط الابيض 0.25% في اليوم الثامن كان 0.08 ملغم/مل ليبلغ في اليوم الثلاثون 0.72 ملغم/مل وهو مقارب لما سجلته عينة السيطرة 0.79 لليوم نفسه. وعند المعاملة 0.5% يبلغ تركيز الكلوروفيل حده الاقصى في نهاية فترة التنمية 0.42 ملغم/مل ومن جدول التحليل الاحصائي (4) نلاحظ ان معامل الارتباط كان إيجابيا والعلاقة طردية تحت تأثير تراكيز النفط الأبيض 0.25% ، 0.5%، ان الدراسة التي اجراها (Miller, et al., 1978) خلصت الى ان التراكيز الواطنة للهيدروكربونات النفطية قد تختزل تركيز الكلوروفيل لكن عند تعريضها الى تراكيز اعلى فان ذلك قد يسبب الموت وهذا موافق لبحث (Kusk, 1978) وهذا ما حصل عند معاملة المزارع بتراكيز اعلى من النفط الابيض 1% ، 2% نجد ان تراكيز صبغة الكلوروفيل اضمحلت في كلا المعاملتين ويظهر معامل الارتباط بان العلاقة عكسية بين تركيز النفط الأبيض وتركيز الكلوروفيل، وفي دراسة (Oberholster et al., 2010) اكد بان قياس محتوى الكلوروفيل يعد القياس الادق على سمية المركبات الهيدروكربونية كونه الاكثر حساسية تجاه عموم الملوثات، وفي المرحلة التي يثبط فيها الكلوروفيل تثبط

دراسة تأثير تراكيز مختلفة من النفط الأبيض في بعض الفعاليات الفسلجية في *Oscillatoria chlorina*

د. ايمن عوني سليم

د. علي مؤيد سلطان

أ.د. حميد سلمان خميس

معظم وظائف الخلية، ومن جهة اخرى اكدت بعض الدراسات ان الهيدروكربونات النفطية قد تثبط inhibit او تحفز stimulate نمو الطحالب تبعا للتركيز وزمن التعرض (Margesin et al., 2003). وقد انخفض تركيز صبغة الفايكوسيانين كما هو ملاحظ في الشكل (4) عند معاملة المزارع النامية بالنفط الابيض، اذ نجد ان اعلى قيمة سجلت للفايكوسيانين تحت تأثير المعاملة 0.25% في اليوم الثلاثون من فترة التنمية 10.8 مايكروغرام/مل أي نصف قيمة عينة السيطرة التي بلغت 20 مايكروغرام/مل وتراجعت قيم الفايكوسيانين عند المعاملة 0.5% وتختفي تقريبا عند معاملة المزارع بتراكيز النفط الابيض 1% ، 2% اذ سجلت كلا المعاملتين في اليوم الثامن 0.3 مايكروغرام/مل لتصبح قيمة هذه الصبغة 0 مايكروغرام/مل في اليوم الثلاثون. يبين الشكل (5) اثر النفط الابيض على تراكيز البروتين اذ نلاحظ بان تركيز البروتين في عينة السيطرة في اليوم الثامن كان 0.04 ملغم/مل ليصل في اليوم الثلاثون الى 0.28 ملغم/مل، وعند معاملة العينات بالنفط 0.25% نجد ان تركيز البروتين في اليوم الثامن كان 0.022 ملغم/مل أي نصف القيمة المسجلة في عينة السيطرة عند اليوم نفسه، وقد ازداد تركيز البروتين بشكل متدرج ومنظم ليقترب من القيم المسجلة في عينة السيطرة في اليوم الثلاثون ليسجل 0.22 ملغم/مل أي عشرة اضعاف التركيز المسجل في اليوم الثامن وهذا يعود على عامل الزمن يلعب دورا اساسيا في التكيف، اذ ان الكائنات التي لها القدرة على الانبات والنمو وسط الملوثات تعرف بالنباتات المقاومة tolerant plants (Ogbo, 2009)، اما عند معاملة العينات بالنفط الابيض 0.5% فان تراكيز البروتين تزداد نسبيا الا انها بلغت نصف المسجل في عينة السيطرة، اذ سجلت في اليوم السادس عشر والرابع والعشرون والثلاثون (0.13)، (0.09)، (0.043) ملغم/مل على التوالي، في حين لم يسجل للبروتين تراكيز واضحة عند معاملة العينات بالتراكيز 1% ، 2% من النفط الابيض حيث كانت في اليوم الثامن 0.009، 0.007 ملغم/مل على التوالي لتكون في نهاية فترة التنمية 0 ملغم/مل لكلا المعاملتان، وقد أشار (Soto, 1977) في دراسته على *Chlamydomonas angulosa* الى انخفاض البروتين الكلي فيه بعد نموه تحت تأثير المشتقات النفطية في الوسط المائي وقد فسّر الباحثان (Zachleder and Šetlik, 1982) بان ذلك بسبب تثبيط عمل DNA او تثبيط استنساخ RNA ويتبعه انخفاض في تكوين النشا Starch وهذا أيضا موافق لماحصل *Scenedesmus armatus* عند تنميته تحت تأثير المشتقات النفطية. يوضح الشريحة (2) *Oscillatoria chlorina* معاملة بـ 0.5% من النفط الأبيض اذ يلاحظ تغلظ جدران الخلايا في الخيط وحدوث تكثف واضح لصبغة الكلوروفيل وزيادة عرض الخلايا بالمقارنة مع عينة *Oscillatoria chlorina* الغير معاملة في الشريحة (1).

## قياس طيف امتصاص عينة النفط الأبيض المفصولة عن سائل الوسط

ان طيف امتصاص الاشعة تحت الحمراء باستخدام جهاز FTIR لعينة النفط الأبيض المعاملة بالنوع *Oscillatoria chlorina* موضح في الشكل (6) حيث تمثل عينة السيطرة 0.5 مل من النفط الأبيض مضافة للوسط الزرع BG11 خالي من النوع *Oscillatoria chlorina* محضون لمدة 30 يوما تحت تأثير الظروف التنموية نفسها، لمعرفة مدى تأثير هذا النوع على عينة النفط الابيض. ونلاحظ في طيف امتصاص الاشعة تحت الحمراء لعينة النفط الأبيض الغير معاملة بالسيانوبكتريا (السيطرة) التالي

1- ظهور حزمتان عند التردد 2870 سم<sup>-1</sup> و 2950 سم<sup>-1</sup> وهي حزمة امتصاص مجاميع المثل الاليفاتية مثل CH<sub>3</sub> والتي تظهر جزيئاتها المط حيث تمثل الحزمة الأولى المط المتناظر والثانية المط غير المتناظر.



دراسة تأثير تراكيز مختلفة من النفط الأبيض في بعض الفعاليات الفسلجية في *Oscillatoria chlorina*

أ.د. حميد سلمان خميس      د. علي مؤيد سلطان      د. ايمن عوني سليم

- 2- ظهور طيف امتصاص عند التردد 1640 سم يعزى الى امتصاص حزمة C=C الاولفينية (الألكينات)، وتداخل مع التردد 1610 سم<sup>-1</sup> والذي يمثل امتصاص حزمة C=N مثل الامينات.
- 3- كذلك ظهور حزمتي انحناء عند التردد 1430 سم<sup>-1</sup> و 1380 سم<sup>-1</sup> تعزى الأولى الى الانحناء غير المتناظر ل-CH<sub>3</sub> وتعزى الثانية الى الانحناء المتناظر.
- اما بوجود *Oscillatoria chlorina* مع عينات النفط الأبيض فان حزم طيف امتصاص الاشعة تحت الحمراء تتغير بشكل جلي حيث يلاحظ اختفاء مجاميع المثيل الاليفاتية CH<sub>3</sub> ذات المط المتناظر وغير المتناظر ذات التردد 2870 سم<sup>-1</sup> و 2950 سم<sup>-1</sup> التي كانت موجودة في عينة السيطرة ويلاحظ ايضا اختفاء حزمتي الانحناء عند التردد 1430 سم<sup>-1</sup> و 1380 سم<sup>-1</sup> التي تمثل الانحناء غير المتناظر والانحناء المتناظر، وربما قد استهلكت من قبل هذه الأنواع.

### المصادر

1. Adam, G. I. and Duncan, H. J. (1999). Effect of Diesel Fuel on Growth of Selected Plant Species. Environmental geochemistry and health, 21: 353-357.
2. Whitton, B. A. and Potts, M. (2002). The Ecology of cyanobacteria: their diversity in Time and Space. Kluwer Academic Press, Norwell, MA.
3. Cerniglia, C. E. (1992). Biodegradation of polycyclic hydrocarbons. Biodegradation, Vol. 3: 351-368.
4. Cerniglia, C. E., Gibson, D. T. and Van Baalen, C. (1979). Algal oxidation of aromatic hydrocarbons: Formation of 1-naphthol from naphthalene by *Agmenellum quadruplicatum*, strain PR-6. Biochem Biophys Res Comm 88: 50-58.
5. Danks, S. M., Evans, E. H. and Whittaker, P. A. (1983). Photosynthetic system Structure, function and Assembly. By John Wiley and Sons Ltd.
6. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K., Stackebrandt, E. (2006). The Prokaryotes, Third Edition. Springer Science+Business Media, LLC 4:1053–1073.
7. Fay, P. (1983). The blue-greens (cyanophyta – cyanobacteria). The institute of biology. Edward Arnold. pp. 1-88.
8. Gibson, C. E. and foy, R. H. (1983). The photosynthesis and growth efficiency of a plank tonic Blue Green Algae oscillatoria redke . Br phycol . J . 18: 39-4.
9. Guha, S. and Jaffe, P. R. (1996). Bioavailability of Hydrophobic Compounds Partitioned into the Micellar Phase of Nonionic Surfactants. Environmental Science and Technology, 30, 1382-1391.

دراسة تأثير تراكيز مختلفة من النفط الأبيض في بعض الفعاليات الفسلجية في *Oscillatoria chlorina*

د. ايمن عوني سليم

د. علي مؤيد سلطان

أ.د. حميد سلمان خميس

10. Plohl, K. and Leskovsek, H. (2002). Biological degradation of motor oil in water. *Acta. Chim. Slov.*, 49: 279-289.
11. Juhasz, A. L., Britz, M. L. and Stanley, G. A. (1996). Degradation of High Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Pseudomonas Cepacia*. *Biotechnology Letters*, 18, 5,577-582.
12. Kusk, K. O. (1978). Effects of Crude Oil and Aromatic Hydrocarbons on the Photosynthesis of the Diatom *Nitzschia palea*. *Physiologia Plantarum*, 43, 1-6.
13. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* Vol. 75: 193-265.
14. Margesin, R., Labbe, D., Schinner, F., Greer, C. W. and Whyte, L. G. (2003). Characterization of Hydrocarbon-Degrading Microbial Populations in Contaminated and Pristine Alpine Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 3085-3092.
15. Mackinney, G. (1941) Absorption of light by chlorophyll solutions. *J Biol Chem* 140: 315–322.
16. Miller, M. C., Hater, G. R. and Vestal, J. R. (1978). Effects of Prudhoe crude oil on carbon assimilation by planktonic algae in an arctic pond. In Adriano, D. C. and I. L. Brisbin (eds.) *Environmental Chemistry and Cycling Processes*. E.R.D.A. Symposium Series, ONF 760429. National Tech. Center, Oak Ridge, Tenn.
17. Oberholster, P. J., Blaise, C. and Botha, A. M. (2010). Phytobenthos and Phytoplankton Community Changes upon Exposure to Sunflower Oil Spill in a South African Protected Freshwater Wetland. *Ecotoxicology*, 19, 1426-1439.
18. Ogbo, E. M. (2009). Effects of diesel fuel contamination on seed germination of four crop plants – *Arachis hypogaea*, *Vigna unguiculata*, *Sorghum bicolor* and *Zea mays*. *African Journal of Biotechnology*, 8 (2): 250-253.
19. Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M. and CohenBazire, G. (1971). Purification and properties of unicellular bluegreen algae (Order Chroococcales). *Bacteriol. Rev.* 35: 171205.
20. Stewart, W. D. (1973). Nitrogen fixation by photosynthetic microorganisms. *Ann. Rev. Microbiol.* Vol. 27: 283-316.

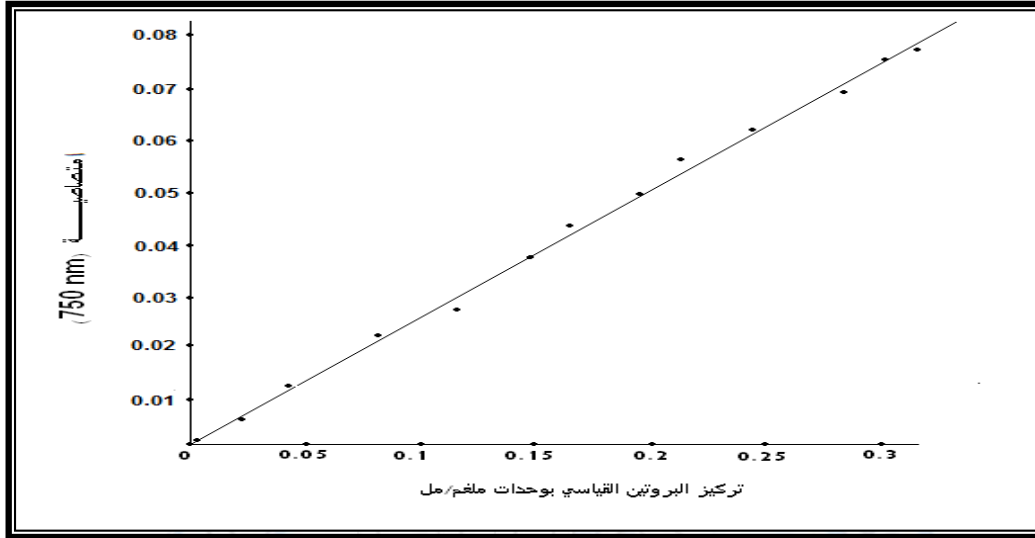
دراسة تأثير تراكيز مختلفة من النفط الأبيض في بعض الفعاليات الفسلجية في *Oscillatoria chlorina*

د. ايمن عوني سليم

د. علي مؤيد سلطان

أ.د. حميد سلمان خميس

21. Zachleder, V. and Šetlik, I. (1982). Effect of Irradiance on the Course of RNA Synthesis in the Cell Cycle of *Scenedesmus quadricauda*. *Biologia Plantarum*, 24, 341-353.



شكل (1) المنحنى القياسي لبروتين البقر Bovine Serum Albumin

جدول (1) يوضح مركبات وتراكيز الوسط BG11

الوزن	المادة	ت	الوزن	المادة	ت
6 mg	Citric acid	6	1.5 g	NaNO <sub>3</sub>	1
6 mg	Ferric ammonium citrate	7	0.075 g	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2
1 mg	Disodium EDTA	8	0.04 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3
1 liter	Distilled Water	9	0.036	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	4
1 ml	Trace metal mix A5	10	0.02 g	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	5
Trace metal mix A5					
الوزن	المادة	ت	الوزن	المادة	ت
0.079g	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	5	2.86g	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1
0.049g	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	6	1.81g	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	2
1 liter	Distilled Water	7	0.39g	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	3
7.1	يضببط على الاس الهيدروجيني	8	0.222g	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	4

دراسة تأثير تراكيز مختلفة من النفط الأبيض في بعض الفعاليات الفسلجية في *Oscillatoria chlorina*

أ.د. حميد سلمان خميس      د. علي مؤيد سلطان      د. ايمن عوني سليم

جدول (2) يوضح تراكيز النفط الابيض المستخدمة

المعاملة	التركيز الأول	التركيز الثاني	التركيز الثالث	التركيز الرابع
النفط الأبيض	%0.25	%0.5	%1	%2

جدول (3) يوضح معامل الارتباط ما بين النمو ومعاملات النفط الأبيض (%0.25 ، %0.5 ، %1 ، %2) للنوع

*Oscillatoria chlorina*

Control	Control	Control	Control	Control	Control
Control	1	.987(*)	.998(**)	-.919	-.919
		.013	.002	.081	.081
		4	4	4	4

جدول (4) يوضح معامل الارتباط ما بين تركيز الكلوروفيل ومعاملات النفط الأبيض (%0.25 ، %0.5 ، %1 ، %2) للنوع

*Oscillatoria chlorina* للنوع

Control	Control	Control	Control	Control	Control
Control	1	.991(**)	.988(*)	-.849	-.849
		.009	.012	.151	.151
		4	4	4	4

دراسة تأثير تراكيز مختلفة من النفط الأبيض في بعض الفعاليات الفسلجية في *Oscillatoria chlorina*

د. ايمن عوني سليم

د. علي مؤيد سلطان

أ.د. حميد سلمان خميس

جدول (5) يوضح معامل الارتباط ما بين الفايكوسيانين ومعاملات النفط الأبيض (0.25% ، 0.5% ، 1% ، 2%)

للنوع *Oscillatoria chlorina*

naf_2%	naf_1%	naf_0.5%	naf_0.25%	Control		
-0.818	-0.771	.986(*)	.985(*)	1	Pearson Correlation	Control
.182	.229	.014	.015		Sig. (2-tailed)	
4	4	4	4	4	N	

جدول (6) يوضح معامل الارتباط ما بين تركيز البروتين ومعاملات النفط الأبيض (0.25% ، 0.5% ، 1% ، 2%)

للنوع *Oscillatoria chlorina*

naf_2%	naf_1%	naf_0.5%	naf_0.25%	Control		
-0.903	-0.902	.995(**)	.999(**)	1	Pearson Correlation	Control
.097	.098	.005	.001		Sig. (2-tailed)	
4	4	4	4	4	N	

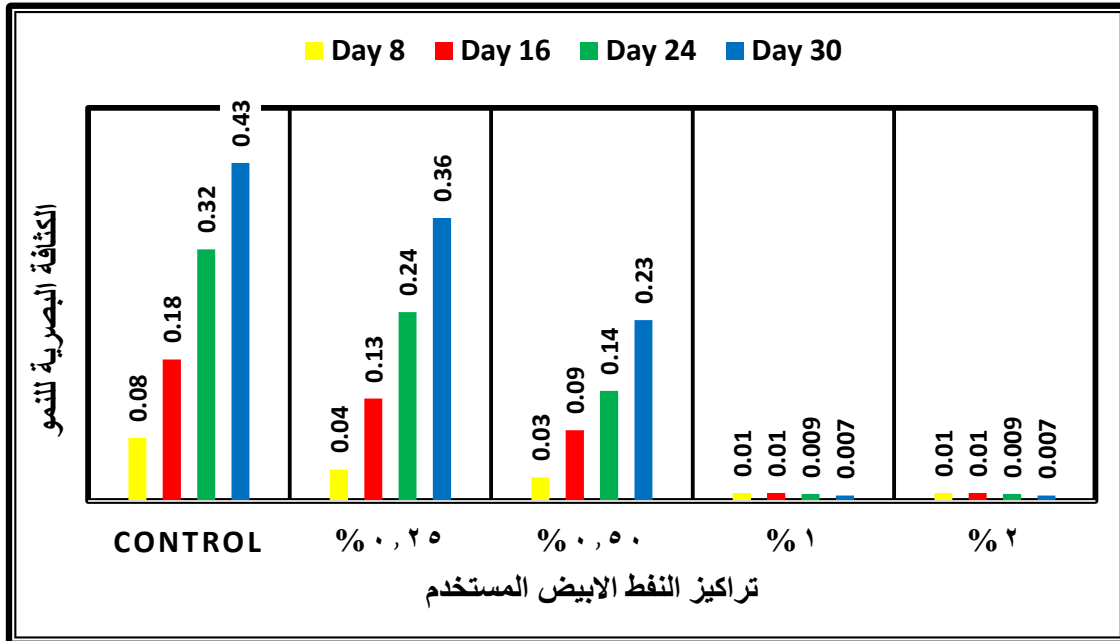
\* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed). \*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

دراسة تأثير تراكيز مختلفة من النفط الأبيض في بعض الفعاليات الفسلجية في *Oscillatoria chlorina*

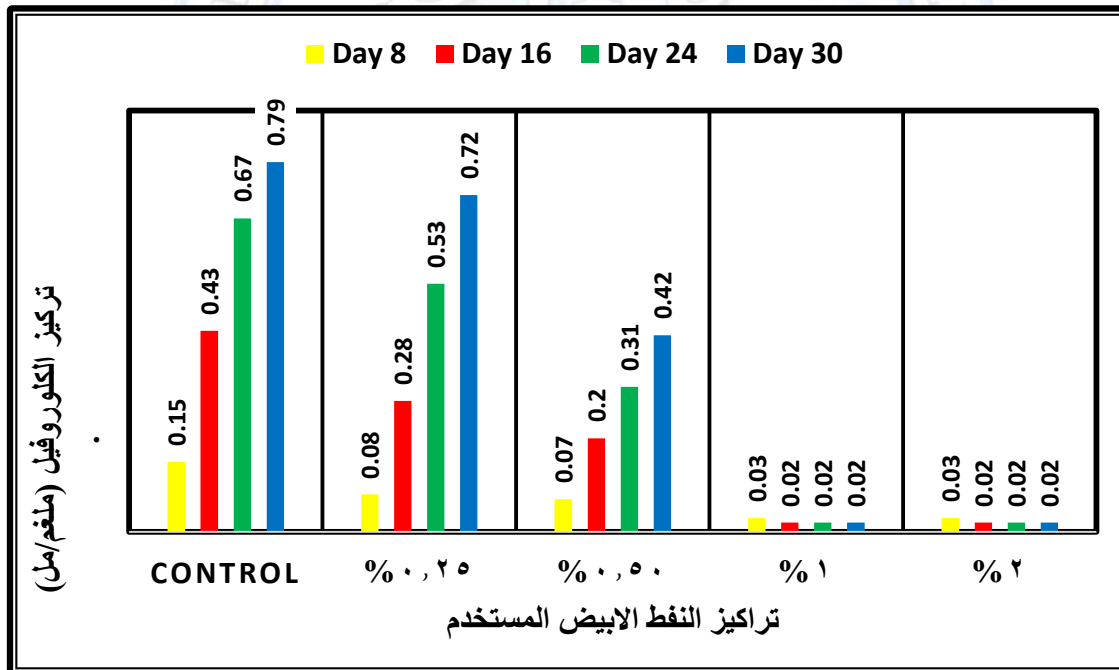
د. ايمن عوني سليم

د. علي مؤيد سلطان

أ.د. حميد سلمان خميس



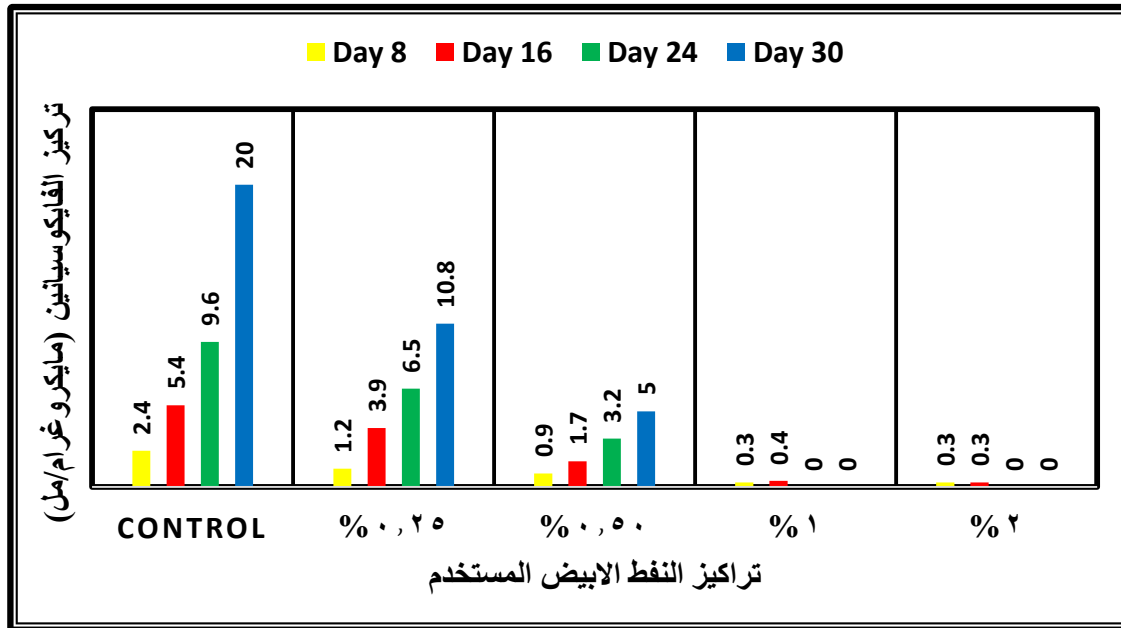
شكل (2) تأثير تراكيز مختلفة من النفط الابيض على النمو في النوع *Oscillatoria chlorina* على مدى (30) يوما



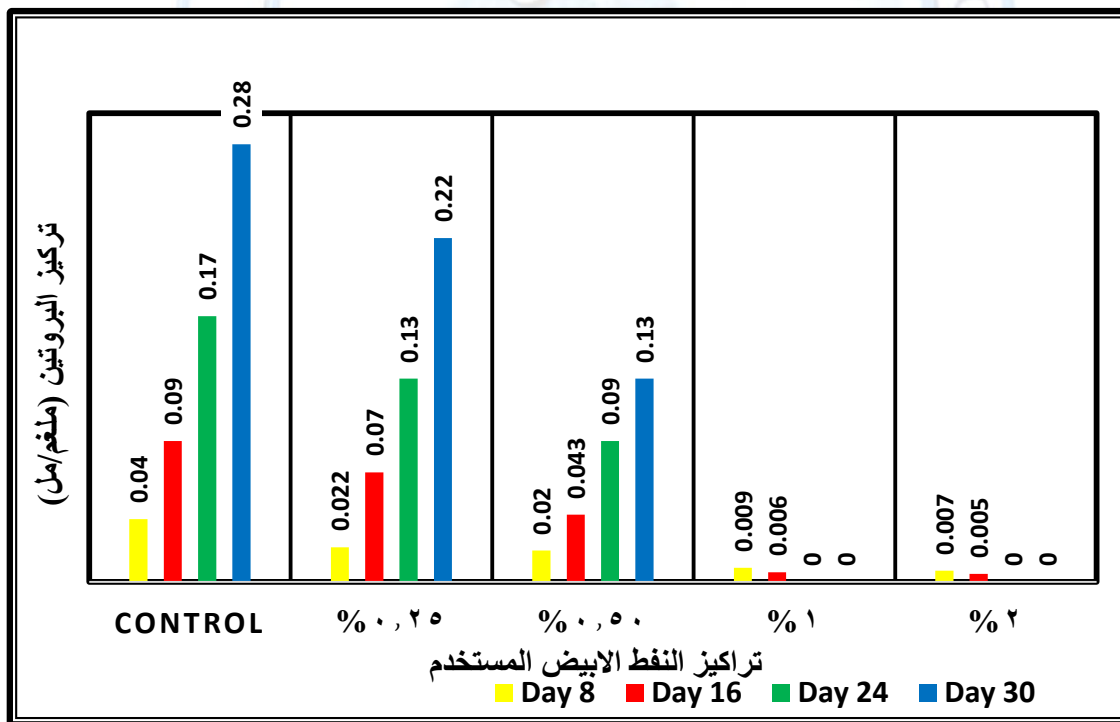
شكل (3) تأثير تراكيز مختلفة من النفط الابيض على تركيز الكلوروفيل في النوع *Oscillatoria chlorina* على مدى (30) يوما

دراسة تأثير تراكيز مختلفة من النفط الأبيض في بعض الفعاليات الفسلجية في *Oscillatoria chlorina*

أ.د. حميد سلمان خميس      د. علي مؤيد سلطان      د. ايمن عوني سليم



شكل (4) تأثير تراكيز مختلفة من النفط الابيض على صبغة الفايكوسيانين في النوع *Oscillatoria chlorina* على مدى (30) يوم



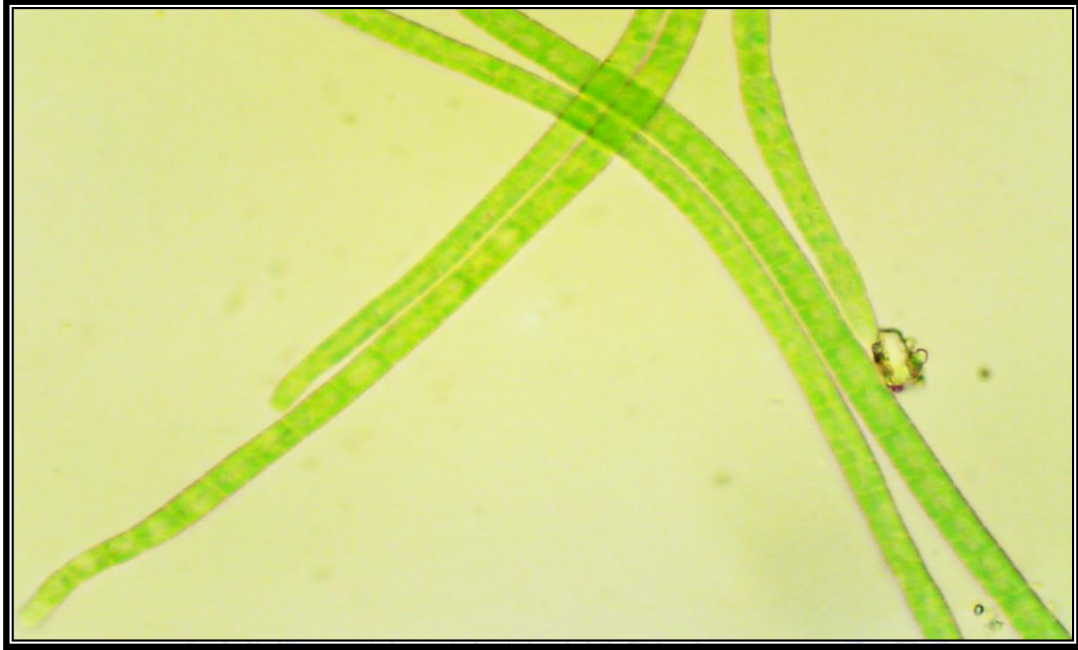
شكل (5) تأثير تراكيز مختلفة من النفط الابيض على تركيز البروتين في النوع *Oscillatoria chlorina* على مدى (30) يوما

دراسة تأثير تراكيز مختلفة من النفط الأبيض في بعض الفعاليات الفسلجية في *Oscillatoria chlorina*

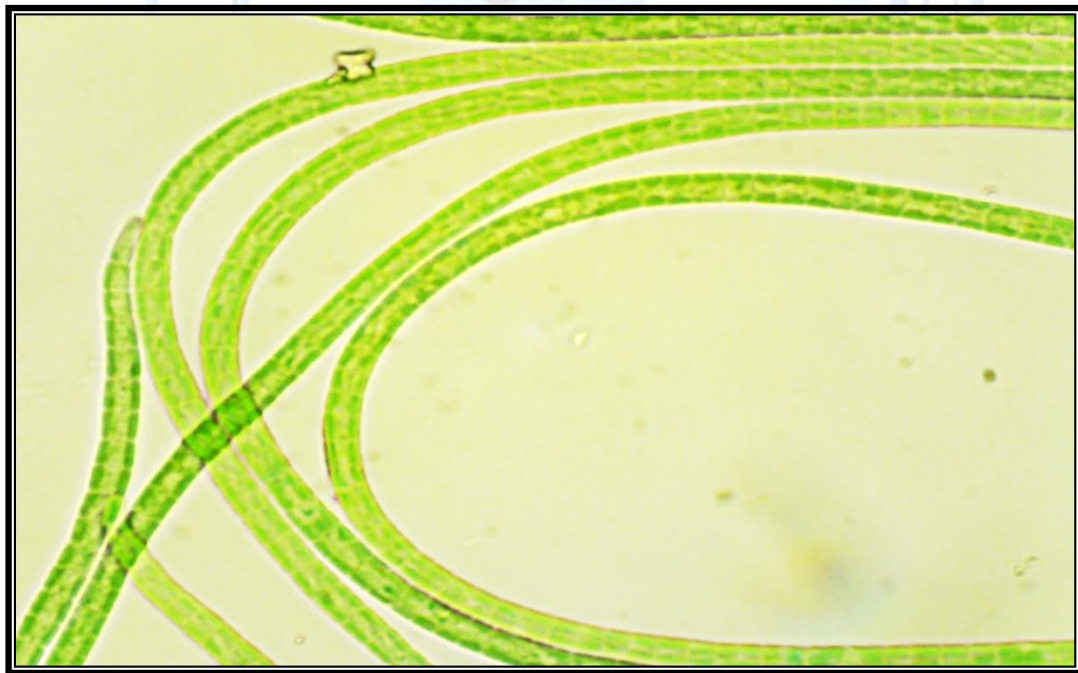
د. ايمن عوني سليم

د. علي مؤيد سلطان

أ.د. حميد سلمان خميس



شريحة (1) *Oscillatoria chlorina* بدون معاملة قوة التكبير 100x



شريحة (2) *Oscillatoria chlorina* تحت تأثير النفط الأبيض قوة التكبير 100x

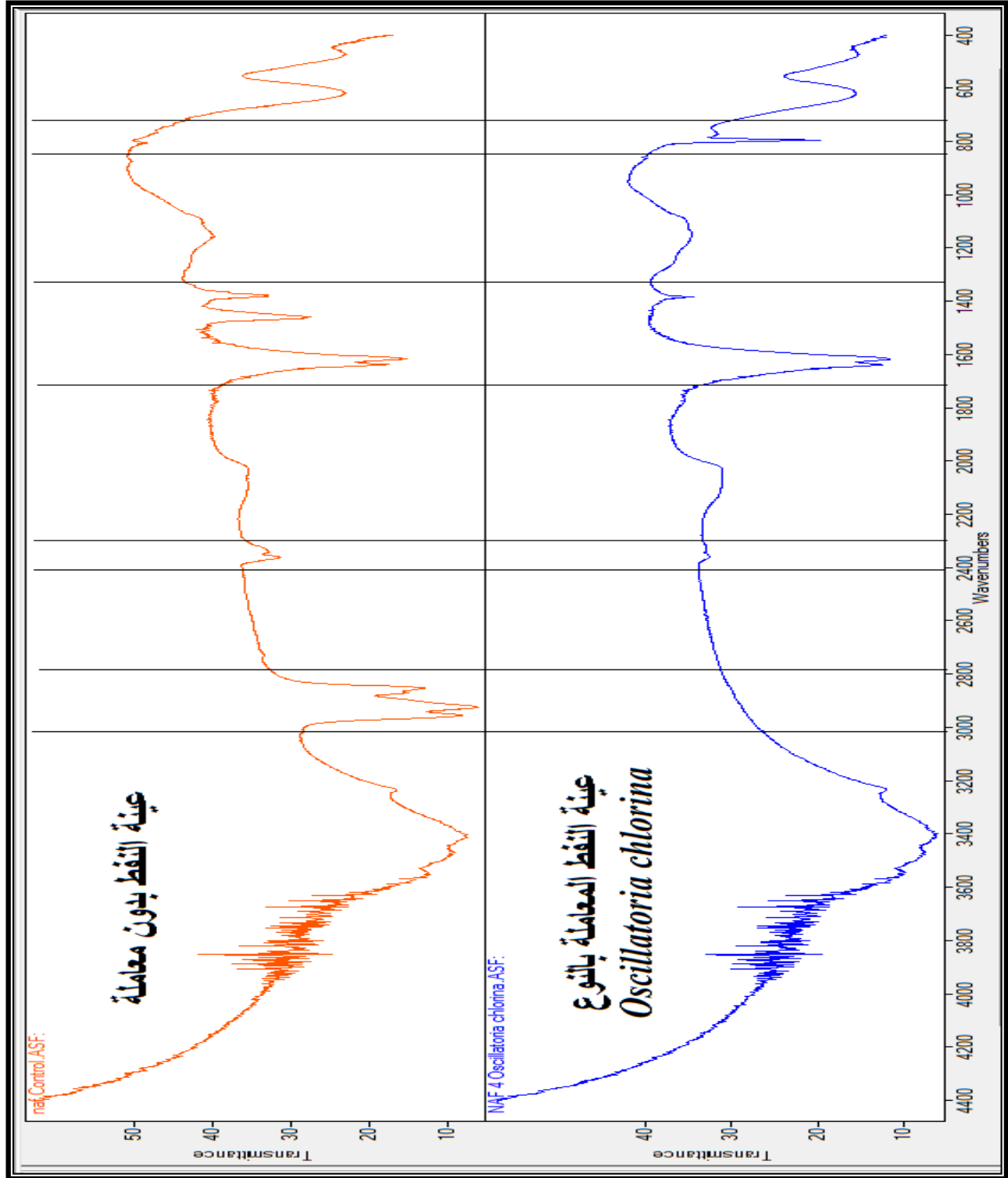


دراسة تأثير تراكيز مختلفة من النفط الأبيض في بعض الفعاليات الفسلجية في *Oscillatoria chlorina*

د. ايمن عوني سليم

د. علي مؤيد سلطان

أ.د. حميد سلمان خميس



شكل (6) يوضح طيف امتصاص الأشعة تحت الحمراء لعينة النفط الخام المعاملة بالنوع *Oscillatoria chlorina*