

دراسة تأثير النفط الخام على بعض الفعاليات الفسلجية في *Oscillatoria splendida*

حميد سلمان خميس¹ ، علي مؤيد سلطان¹ ، ايمن عوني سليم²

¹ قسم علوم الحياة ، كلية التربية للبنات ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

² كلية الصيدلة ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

الملخص

تم اختبار تأثير تراكيز مختلفة من النفط الخام على *Oscillatoria splendida* واعتمد قياس النمو ككثافة بصرية وتركيز الكلوروفيل وصبغة الفايكوسيانين وتركيز البروتين كمؤشر حيوي على مدى تأثر هذا النوع فضلا عن التغيرات المظهرية، اذ بلغ النمو تحت تأثير المعاملة 0.25% في اليوم الثلاثون (0.148). كثافة بصرية وسجل تحت تأثير المعاملة 0.5% (0.08) في حين كانت القيمة المسجلة في عينة السيطرة (0.34) كثافة بصرية، وقد اختزل 41% من تركيز الكلوروفيل عند معاملة هذا النوع بالنفط الخام 0.25% واختزل 63% من تركيز الكلوروفيل عند معاملة النفط الخام 0.5%، وقد تراجع تركيز البروتين تأثراً بالنفط الخام حيث اختزل 45% منه عند المعاملة 0.25%، واختزل 82% من بروتين *Oscillatoria splendida* عند المعاملة 0.5%، ولوحظ اختزال النمو وتركيز الكلوروفيل والفايكوسيانين فضلا عن تركيز البروتين الى الحد الأدنى تحت تأثير معاملات النفط الخام ذات التراكيز الاعلى 1% و 2%، ومن طيف امتصاص الاشعة تحت الحمراء لعينات النفط الخام يلاحظ اختفاء مجاميع المثلث الاليفاتية مثل CH_3 والتي تظهر جزئياتها حزمة المط المتناظر والمط غير المتناظر عند (2870) سم⁻¹ و (2950) سم⁻¹ وأيضاً اختفاء الترددات (2300) سم⁻¹، (1500) سم⁻¹ بسبب استهلاكها من قبل *Oscillatoria splendida*، مع ظهور حزم لمركبات جديدة عند (2400) سم⁻¹ و (800) سم⁻¹.

الكلمات الدالة: *Oscillatoria splendida* ، السيانوبكتريا ، النفط الخام.

المقدمة

المنتجات في المناطق البحرية أو المحاذية لها (8). ان المركبات المتاحة بايولوجيا Bioavailable هي المركبات التي تستطيع النفاذ Transporting عبر اغشية الاحياء الدقيقة وبالتالي يمكن تحليلها وتحويلها الى اشكال اخرى وهذه المركبات غالبا ما تكون مركبات قطبية قابلة الذوبان في الماء الا ان الهيدروكربونات مركبات غير قطبية Nonpolar شحيحة الذوبان في الماء Low solubility in water وسهلة الامتصاص من قبل مكونات التربة وبالتالي فهي non bioavailable (9). أن عملية تحطيم الهيدروكربونات تتم بوجود الانزيمات المؤكسدة Oxygenase (6) ومن اهم متطلباتها توفر الاوكسجين. اما المركبات الأروماتية Aromatic غالبا ما تتحطم بفعل الانزيمات الخارجية Dioxygenase enzyme، ويعتقد (10) امتلاك أنواع السيانوبكتريا المقاومة للهيدروكربونات كلا الانزيمين Dioxygenase و Oxygenase.

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 والنجيل، من نهر دجلة ومن بعض المستنقعات والحدائق، لضمان الحصول على انواع عديدة من افراد السيانوبكتريا، واشتملت العينات المجموعة على ماء وتربة ووضع العينات المجموعة لغرض الدراسة في أكياس وقناني بلاستيكية معقمة تم إعدادها مسبقا لهذا الغرض.

تنتشر أنواع السيانوبكتريا في معظم البيئات تقريبا وربما تتواجد في معظم عينات التربة (1). وقد بين الباحث Fay (2) بان بعض أنواعها قد تتواجد في بيئات متطرفة وهي ذاتية التغذية Photoautotrophs وعند تواجدها السيانوبكتريا بعيدة عن الضوء فإنها تبقى ساكنة الا ان بعض انواعها يمكنها تأبيض بعض المركبات العضوية منها السكريات (3). ان من اسباب انتشارها الواسع امتلاكها آليات تكيفه خاصة (4) 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 (5). ويقدر بعض الباحثين في مجال البتروكيمياء بان عدد المركبات الهيدروكربونية في المشتقات النفطية قد يصل الى ثلاثة ملايين، ان المشتقات النفطية هي المزيج الأكثر تعقيدا للمركبات الهيدروكربونية التي تسبب مشكلة تلوث عالمية تطل التربة والهواء والماء وقد تنفذ الى المياه الجوفية وبدورها تختزل اعداد كبيرة من الاحياء الدقيقة المدورة للعناصر وبالتالي تدمر وتعطل السلاسل الغذائية وتعيق سريان الطاقة (6)، وللهيدروكربونات تأثيرات سمية بالغة Exhibit toxic فضلا عن كونها مسببات سرطانية Carcinogenic وأيضا مطفرات وراثية Mutagenic (7)، ان التلوث بالمركبات الهيدروكربونية يسبب تعطيل العلاقات المتبادلة بين الكائنات الحية وبيئتها، وبالتالي يحدث خلل في توازن مكونات النظام البيئي مما يجعل الاعراض السلبية ظاهرة للعيان. اذ يعد النفط ومشتقاته من الملوثات الأساسية للبيئات المائية واليابسة نتيجة لعمليات التقيب واستخراج النفط والغاز الطبيعي أو منصات تعبئة أو نقل هذه

الهيدروكلوريك المخفف (HCl) (0.1) 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 وتغلق فوهات الدوارق بسدادات معدة مسبقاً 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/انج²) لتصبح معدة لعملية الزرع، وللحصول على BG11 ذو القوام الصلب يضاف الاكار بنسبة 1%.

الوسط الزراعي السائل BG11

يعد من أفضل الاوساط الانتقائية المتكاملة العناصر الغذائية التي توفر كافة متطلبات التغذية للسيانوبكتريا (3) أذيتت 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 (NaHCO₃) و حامض

جدول (1) يوضح مركبات وتراكيز الوسط BG11

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

مما لا شك فيه ان النفط الخام من الملوثات الخطرة التي تهدد بيئتنا كون العراق من البلدان المصدرة له لذا استخدم النفط الخام المستخرج من حقول كركوك لغرض معرفة مدى تأثيره على *Oscillatoria splendida* وأيضا تأثره بهذا النوع، وقد استخدم أربعة تراكيز للنفط الخام وهي 0.25% ، 0.5% ، 1% ، 2% كما موضح في الجدول (2).

جدول (2) يوضح تراكيز النفط الخام المستخدمة

| المعاملة | التركيز الأول | التركيز الثاني | التركيز الثالث | التركيز الرابع |
|-------------|---------------|----------------|----------------|----------------|
| النفط الخام | 0.25% | 0.5% | 1% | 2% |

قياس النمو

تم تنمية هذا النوع على الوسط السائل BG11 لمدة (30) يوما، تحت ظروف التنمية المشار إليها انفاً، و تم قياس النمو ككثافة بصرية للـ *Oscillatoria splendida* النامي تحت تأثير النفط الخام 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 Lapo Med. inc (11).

تنمية وعزل السيانوبكتريا

زرعت العينات التي جمعت من مناطق متعددة على أطباق حاوية على الوسط BG11 الصلب، ثم حضنت الأطباق في الحاضنة Cooled Incubator بدرجة حرارة (25) م° مع تعريضها إلى إضاءة مستمرة بشدة (2500) لوكس، وبعد مرور مدة اسبوعين الى ثلاثة اسابيع لوحظت نموات دقيقة للسيانوبكتريا على شكل مستعمرات خضراء وبعضها مائل الى اللون البني، وتم تأشير المستعمرات المتميزة باستخدام القلم من اسفل الطبق بعد اجراء عملية تشخيص أوليه تحت المجهر الضوئي للمستعمرات النامية ونقلت الى أطباق بتري حاوية على الوسط الزراعي BG11 الصلب كمرحلة أولية من مراحل التنقية لتهيئة الأجناس الملائمة للدراسة، ثم نقلت المستعمرات النامية إلى دوارق ذات حجم (250) مل حاوية على (100) مل من الوسط الزراعي السائل، ثم حضنت في الحاضنة المبردة الهزازة 100 دورة/دقيقة.

اختيار أنواع السيانوبكتريا الملائمة للدراسة

بعد عزل وتنقية بعض الانواع، تم تنميتها على اوساط BG11 سائلة حاوية على الكيروسين وتم انتخاب *Oscillatoria splendida* كونه متحمل، وتطلب تكيفه مدة زمنية طويلة من الزرع مع التعريض المستمر للمواد الهيدروكربونية امتدت الى ستة أشهر.

اختيار النفط الخام

دقائق ثم يضاف إلى الراشب (5) مل من Tris-HCl Buffer بتركيز (0.05) مولار وبدالة حامضيه (pH 7.8).

2- تحطم خلايا السيانوبكتريا بواسطة جهاز Mixer نوع Griffin مع الحفاظ على درجة حرارة (4)م°

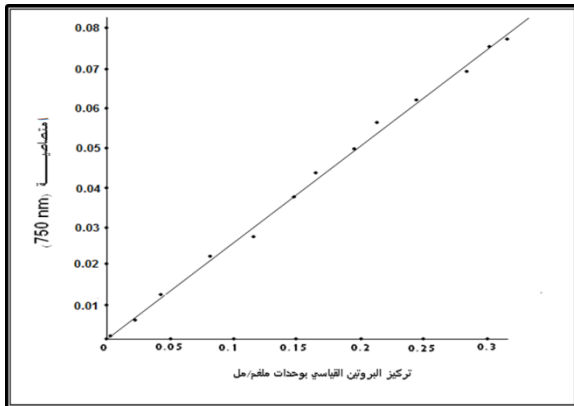
3- فصل الراشب عن الراشح بواسطة جهاز الطرد المركزي بسرعة (3500)دورة/دقيقة مدة 10 دقائق، يهمل الراشب ويؤخذ الراشح الحاوي على البروتين.

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- نجري نفس الخطوتين الأخيرتين باستخدام الماء المقطر لإعداد البلاتنك Blank لتصفير الجهاز.

7- تقرا شدة اللون لمحتوى الأنايب 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.



شكل (1) المنحنى القياسي لبروتين ألبومين البقر Bovine Serum Albumin

قياس Phycocyanin

تم قياس صبغة الـ Phycocyanin من خلال أخذ 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 الراشب الحاوي على الخلايا ويعلق في (5) مل من محلول منظم K_2HPO_4 (0.01 M) phosphate buffer بدالة حامضيه (pH 7.0) (21)، تكسر الخلايا باستخدام جهاز الـ Mixer نوع Griffin لمدة 20 دقيقة، ثم يرشح المحلول يهمل الراشب ويؤخذ الراشح، تقرا الكثافة البصرية Optical density للراشح باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer، على الطولين الموجين A615, A652، نانوميتر تبعاً لطريقة Tandeau de Marsac (8).
 $(mg/ml) = [A615 - 0.474(A652)] / 5.34$ Phycocyanin

قياس الكلوروفيل Chlorophyll a

تم قياس تركيز الكلوروفيل للنوع *Oscillatoria splendida* تبعاً لطريقة Mackinney (12) بعد تعريضه لتأثير النفط الخام، ويتم القياس 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 الراشب الذي يضاف إليه أسيتون بتركيز 80%، وتكسير الخلايا المعلقة 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 تقرا شدة الكثافة الضوئية Optical density بواسطة جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer نوع Lapo Med. inc وخلية كوارتز سمك 1 سم على الطولين الموجين (A645، A633) نانوميتر بعد تصفير الجهاز بالبلاتنك (أسيتون بتركيز 80%)، يحسب تركيز الكلوروفيل بوحد ملغم/مل من خلال التطبيق بالمعادلة 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 (13) من المواد الآتية:

- 1- محلول (A) 2% $NaCO_3$ مذابة في (0.1) مولار من (NaOH).
- 2- محلول (B) 0.5% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$.
- 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 الزرع كما يلي:-

- 1- ترسب خلايا السيانوبكتريا باستخدام جهاز الطرد المركزي Centrifuge نوع Hettich بسرعة (3500) دورة/دقيقة مدة خمس

الكوروفيل يعد مؤشر سليم ودلالة واضحة على مقاومة الخلايا للظروف المحيطة لها. ان الشكل (3) يوضح تاثر تركيز الكوروفيل في النوع *Oscillatoria splendida* عند معاملته بالنفط الخام بالمقارنة مع القيم المسجلة في عينية السيطرة في الأيام (8 ، 16 ، 24 ، 30) وهي (0.068 ، 0.12 ، 0.26 ، 0.46) ملغم/مل على التوالي، عند معاملة هذا النوع بالنفط الخام (0.25%) نلاحظ تراكيز منخفضة لصبغة الكوروفيل في الأيام الأولى من فترة التتمية لغاية اليوم السادس عشر (0.029) ملغم/مل وربما هي الفترة الحرجة للتكيف التي يقوم خلالها هذا الكائن بصناعة الانزيمات المختصة بتكبيك المركبات الهيدروكربونية النفطية وأيضاً تصنيع بروتينات تعمل على حجز بعض العناصر غير المرغوب فيها، وتمكنت ملفت للنظر خلال الفترة الممتدة من اليوم الرابع والعشرون والثلاثون أي النصف الأخير من فترة التتمية حيث بلغت قيمة تركيز الكوروفيل لهذان اليومان (0.093 ، 0.27) ملغم/مل، وعند المعاملة (0.5%) نلاحظ هنالك تناغم مماثل اذ نجد نتائج القراءات المسجلة مشابه للمعاملة الأولى الا انها سجلت في نهاية فترة التتمية (0.168) ملغم/مل، ونجد انخفاض تراكيز الكوروفيل عن تضاعف تراكيز النفط الخام فعند المعاملة (1%) نجد مقاومة *Oscillatoria splendida* بغية البقاء وقد بلغ تركيز الكوروفيل في اليوم الثلاثون (0.052) ملغم/مل وهذه القيمة اقل من المسجلة في اليوم الثامن في عينة السيطرة، لكن نجد هذا النوع يفشل في البقاء عند معاملته (2%) ولم تسجل قراءات معنوية خلال فترة التتمية، وقد ذكر الباحث Radwan (16) في دراسة أجريت حول تأثير سمية النفط الخام على الأسماك لوحظ فيها مقاومة أنواع السيانيوبكتريا لسمية هذه الملوثات وأكدت عدم تعطل وظائف التمثيل الضوئي لذلك عدت الخطوة الأولى للمعالجة البيولوجية Natural Bioremediation. ولوحظ تثبيط نمو النوع *Anabaena doliolum* تماماً بفعل النفط الخام كذلك وجد حدوث تثبيط في النمو وتركيز الكوروفيل في *Scenedesmus quadricauda* عند تعرضه للنفط الخام او مشتقاته. تاثر صبغة الفايكوسيانين مابين في الشكل (4) حيث نلاحظ ان تركيزها بلغ في المعاملتين (0.25% ، 0.5%) في نهاية فترة التتمية (7.5 ، 7) مايكروغرام/مل على التوالي، ونجد انحدار تركيز صبغة الفايكوسيانين عند معاملة *Oscillatoria splendida* بتركيز (1% ، 2%) من النفط الخام، وربما هذا بسبب حساسيتها تجاه هذه الملوثات. ويبين الشكل (5) استجابة تراكيز البروتين في النوع *Oscillatoria splendida* عند معاملته بتراكيز النفط الخام (0.25% ، 0.5% ، 1% ، 2%)، ونجد ان قيم تركيز البروتين المسجلة في عينة السيطرة كانت متدرجة بشكل منتظم طوال فترة التتمية (0.46 ، 0.08 ، 0.175 ، 0.324) ملغم/مل لايام (8 ، 16 ، 24 ، 30) على التوالي، اما عند معاملة النفط الخام (0.25%) نلاحظ قيم منخفضة في الأسابيع الثلاثة الأولى من فترة التتمية بالمقارنة مع عينة السيطرة الا ان تركيز

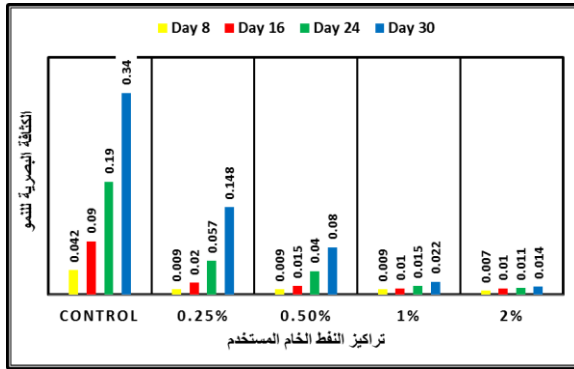
قياس العينات بجهاز امتصاص طيف الاشعة تحت الحمراء FTIR استخدم المذيب العضوي CCl_4 لإذابة المركبات العضوية المتبقية في الوسط الزرعي BG11 في نهاية فترة التتمية وتم فصل المذيب عن سائل الوسط بواسطة قمع الفصل ثم وضع في انابيب بلاستيكية سعة (10) مل، واجري الفحص باستخدام جهاز طيف الاشعة تحت الحمراء FTIR نوع M.R.C LTD من خلال وضع قطرة على قرص بروميد البوتاسيوم KBr المضغوط ومن ثم توضع داخل جهاز ال IR المشار اليه في أعلاه واخذ القراءات اليا Computerize، ليتسنى لنا معرفة التغيرات التي طرأت على عينة النفط الخام، اما عينة السيطرة فهي عبارة عن (0.5) مل من النفط الخام موضوعة في (100) مل من الوسط الزرعي BG11 ومحفوظة تحت تأثير نفس الظروف البيئية للمزارع النامية الا انها غير معاملة بأنواع السيانيوبكتريا.

التحليل الإحصائي

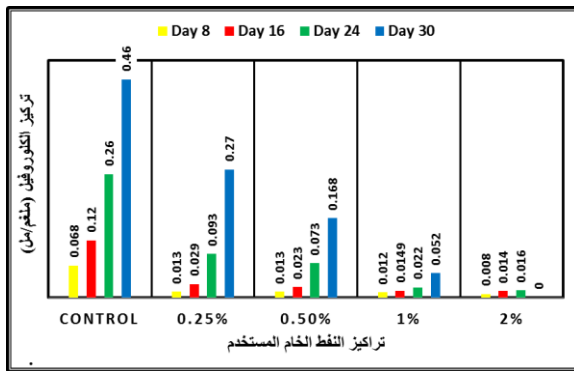
تم تحليل البيانات إحصائياً باستخدام برنامج Spss الاحصائي وتم إيجاد معامل الارتباط Correlations بين معاملات النفط الخام وبين النمو وتركيز الكوروفيل والفايكوسيانين وتركيز البروتين

النتائج والمناقشة

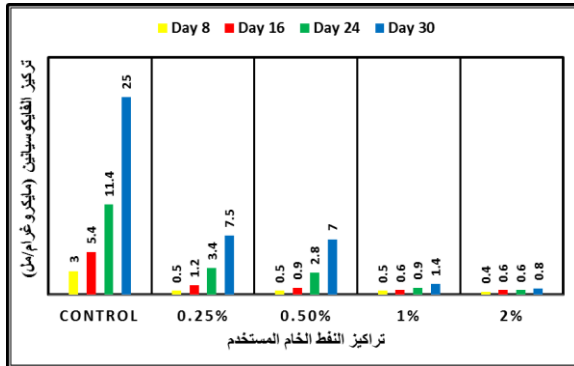
تم تنمية النوع *Oscillatoria splendida* تحت تأثير تراكيز مختلفة من النفط الخام وهي (0.25% ، 0.5% ، 1% ، 2%) وقد تاثرت الفعاليات الحيوية المدروسة مثل النمو وتركيز الكوروفيل وصبغة الفايكوسيانين وتركيز البروتين كما هو مبين في الاشكال المرقمة (2)، (3)، (4)، (5) على التوالي، حيث توضح هذه الاشكال تأثير التراكيز المختلفة للنفط الخام على مدى ثلاثون يوماً. عند تنمية *Oscillatoria splendida* تحت تأثير (0.25%) من النفط الخام كما مبين في الشكل (2) نجد النمو ضعيفاً في الايام الاولى ولغاية اليوم السادس عشر اذ لم يتجاوز (0.02) وهو ربع القيمة المسجلة في عينة السيطرة في نفس اليوم بمعنى اختزل النمو بمقدار 75% الا انه تقدم ليسجل في نهاية فترة التتمية (0.148) وهذا نصف القيمة المسجلة في عينة السيطرة أي ان هذا النوع تكيف للتأثير السام للنفط الخام بمرور الزمن وربما قد يتفوق فيما بعد على عينة السيطرة اذا ما ترك لمدة زمنية اطول ، وعند مضاعفة تركيز النفط الخام المستخدم (0.5%) نلاحظ تاخر النمو وهذا ربما بسبب تضاعف التأثير السام للمركبات الهيدروكربونية اذ بلغ في اليوم الثلاثون (0.08) وهذا يعادل المسجل في اليوم السادس عشر في عينة السيطرة، اما تراكيز النفط الخام (1% ، 2%) فقد بينت النتائج حدوث تثبيط شبه تام للنمو أي ان هذه التراكيز فاقت قدرة تحمل *Oscillatoria splendida* وبالرغم من ذلك فان نموه لم يختفي كلياً، وقد اشار الباحث (14) الى ان التراكيز الواطنة قد تعمل على تثبط النمو لكن عند ارتفاع التركيز قد يؤدي الى الموت وهذا يتوافق مع ما أشار اليه (15)، ان النمو في الاحياء الدقيقة يتمثل بزيادة اعداد الخلايا وهذا لا يحدث الا بتوفر مجموعة من الشروط منها سلامة النظام الضوئي الذي يجهز الخلية بالطاقة ليتسنى لها مراكمة البروتينات والمواد اللازمة لذا فان قياس تركيز صبغة



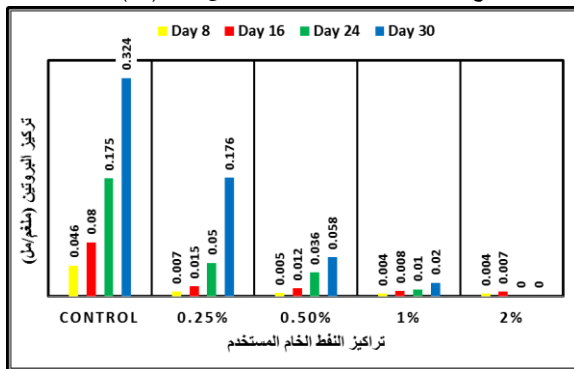
شكل (2) تأثير تراكيز مختلفة من النفط الخام على النمو في النوع *Oscillatoria splendida* على مدى (30) يوماً



شكل (3) تأثير تراكيز مختلفة من النفط الخام على تركيز الكلوروفيل في النوع *Oscillatoria splendida* على مدى (30) يوماً



شكل (4) تأثير تراكيز مختلفة من النفط الخام على صبغة الفايكوسيانين في النوع *Oscillatoria splendida* على مدى (30) يوماً



شكل (5) تأثير تراكيز مختلفة من النفط الخام على تركيز البروتين في النوع *Oscillatoria splendida* على مدى (30) يوماً

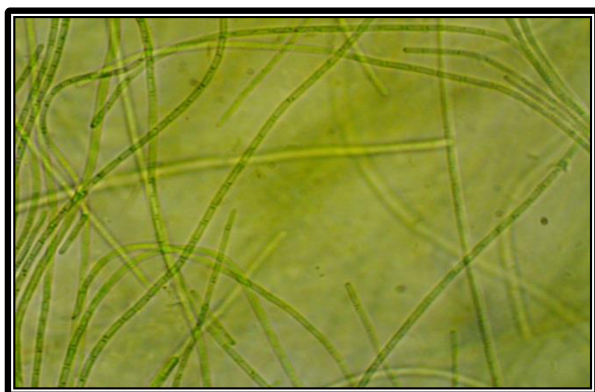
البروتين يبلغ في اليوم الثلاثون (0.176) ملغم/مل وهو نصف القيمة المسجلة في عينة السيطرة، وعلى غرار ذلك سجلت المعاملة (0.5%) تراكيز واطنة للبروتين تبلغ في نهاية فترة التتمية (0.058) ملغم/مل، اما عند رفع تركيز المعاملات الى (1% ، 2%) لم تسجل نتائج واضحة لتركيز البروتين في النوع *Oscillatoria splendida* كما هو مبين في الشكل (5). ان المحتوى البروتيني يتأثر بشكل ملحوظ تحت تأثير الهيدروكربونات النفطية وأشار (17) الى انخفاض البروتين الكلي في *Chlamydomonas angulosa* بعد نموه تحت تأثير المشتقات النفطية في الوسط المائي وقد فسر ذلك الباحثان (Zachleder and Šetlik) (18) بسبب تثبيط عمل DNA او تثبيط استنساخ RNA ويتبعه انخفاض في تكوين النشا Starch وهذا أيضاً مشابه لما جرى في *Scenedesmus armatus* عند تدميته تحت تأثير المشتقات النفطية. الشكل المظهري للنوع *Oscillatoria splendida* النامي تحت الظروف القياسية مبين في السلايد (1) اما السلايد (2) يبين الشكل المظهري تحت تأثير النفط الخام ولعل اهم ما يلاحظ هو ميل خلايا هذا النوع الى الاصفرار وقد يعزى ذلك الى انخفاض محتوى صبغة الكلوروفيل.

ان نتائج طيف امتصاص الاشعة تحت الحمراء باستخدام جهاز ال IR لعينات النفط الخام المعاملة بالنوع *Oscillatoria splendida* موضحة في الشكل (6). وتمثل عينة السيطرة (0.5) مل من النفط الخام في الوسط الزراعي خالي من وجود هذا النوع ومحضون لمدة (30) يوماً تحت تأثير ظروف مماثلة للمزارع النامية، ليتسنى معرفة مدى تأثير هذا النوع على عينة النفط الخام. ويلاحظ في طيف امتصاص الاشعة تحت الحمراء لعينة النفط الخام الغير معاملة بالسيانوبكتريا (السيطرة) التالي:

1- وجود حزمتان عند التردد (2870) سم⁻¹ و (2950) سم⁻¹ وهي حزمة امتصاص مجاميع المثل الالفاتية مثل CH₃ والتي تظهر جزيئاتها المط حيث تمثل الحزمة الأولى المط المتناظر والثانية المط غير المتناظر.

2- ظهور طيف امتصاص عند التردد (1640) سم⁻¹ يعزى الى امتصاص حزمة C=C الالفينية (الألكينات)، وتداخل مع التردد (1610) سم⁻¹ والذي يمثل امتصاص حزمة C=N مثل الامينات.

3- كذلك ظهور حزمتي انحناء عند التردد (1430) سم⁻¹ و (1380) سم⁻¹ تعزى الأولى الى الانحناء غير المتناظر لـ CH₃ وتعزى الثانية الى الانحناء المتناظر CH₃. اما بوجود *Oscillatoria splendida* مع عينة النفط الخام فان حزم طيف امتصاص الاشعة تحت الحمراء تتغير بشكل جلي للعيان حيث يلاحظ اختفاء الحزمة الواقعة عند التردد (2870) سم⁻¹ و (2950) سم⁻¹، وأيضاً اختفاء الحزم الواقعة عند الترددات (2300) سم⁻¹ ، (1500) سم⁻¹ وقد يعزى ذلك الى استهلاك تلك المركبات، وأيضاً ظهور حزمة جديدة عند التردد (800) سم⁻¹ وعند (2400) سم⁻¹ تعزى الى استحداث مركب جديد لم يكن موجود في عينة النفط الخام.



سلايد (2) *Oscillatoria splendida* تحت تأثير النفط الخام قوة التكبير x100



سلايد (1) *Oscillatoria splendida* بدون معاملة قوة التكبير x100

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

للنوع *Oscillatoria splendida*

| kam_2 % | kam_1 % | kam_0.5 % | kam_0.25 % | Control | | |
|------------|------------|--------------|---------------|---------|---------------------|---------|
| -.923 | -.923 | .983(*) | .969(*) | 1 | Pearson Correlation | Control |
| .077 | .077 | .017 | .031 | | Sig. (2-tailed) | |
| 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | N | |

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

للنوع *Oscillatoria splendida*

| kam_2 % | kam_1 % | kam_0.5 % | kam_0.25 % | Control | | |
|------------|------------|--------------|---------------|---------|---------------------|---------|
| -.985(*) | -.938 | .863 | .921 | 1 | Pearson Correlation | Control |
| .015 | .062 | .137 | .079 | | Sig. (2-tailed) | |
| 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | N | |

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

للنوع *Oscillatoria splendida*

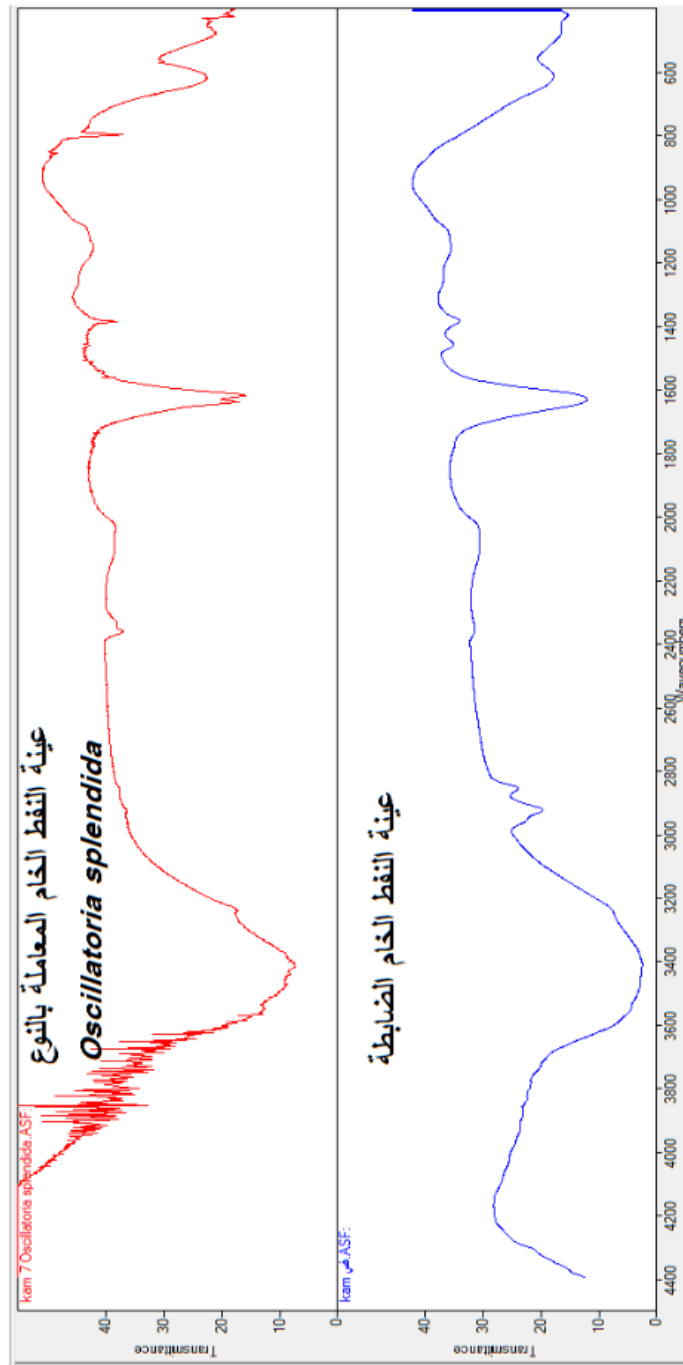
| kam_2 % | kam_1 % | kam_0.5 % | kam_0.25 % | Control | | |
|------------|------------|--------------|---------------|---------|---------------------|---------|
| -.603 | -.831 | .984(*) | .998(**) | 1 | Pearson Correlation | Control |
| .397 | .169 | .016 | .002 | | Sig. (2-tailed) | |
| 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | N | |

جدول (6) يوضح معامل الارتباط ما بين تركيز البروتين ومعاملات النفط الخام (0.25% ، 0.5% ، 1% ، 2%) للنوع *Oscillatoria splendida*

| kam_2 % | kam_1 % | kam_0.5 % | kam_0.25 % | Control | | |
|------------|------------|--------------|---------------|---------|---------------------|---------|
| -.668 | -.668 | .981(*) | .997(**) | 1 | Pearson Correlation | Control |
| .332 | .332 | .019 | .003 | | 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).



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

المصادر

- (1) Whitton, B. A. and Potts, M. (2002). The Ecology of cyanobacteria: their diversity in Time and Space. Kluwer Academic Press, Norwell, MA.
- (2) Fay, P. (1983). The blue-greens (cyanophyta – cyanobacteria). The institute of biology. Edward Arnold. pp. 1-88.
- (3) Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M. and CohenBazire, G. (1971). Purification and properties of unicellular bluegreen algae (Order Chroococcales). Bacteriol. Rev. 35: 171205.
- (4) Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K., Stackebrandt, E. (2006). The Prokaryotes, Third Edition. Springer Science+ Business Media, LLC 4:1053–1073.
- (5) Cerniglia, C. E. (1992). Biodegradation of polycyclic hydrocarbons. Biodegradation, Vol. 3: 351-368.
- (6) Plohl, K. and Leskovsek, H. (2002). Biological degradation of motor oil in water. Acta. Chim. Slov., 49: 279-289.
- (7) 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.

- (8) Tandeau de Marsac, N. and Houmard, J. (1993). Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms. FEMS. J. Microbiology Reviews. Vol. 104: 119-190.
- (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.
- (10) 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.
- (11) Gibson, C. E. and foy, R. H. (1983). The photosynthesis and growth efficiency of a planktonic Blue Green Algae *Oscillatoria redke*. Br phycol. J. 18: 39-4
- (12) Mackinney, G. (1941) Absorption of light by chlorophyll solutions. J Biol Chem 140: 315-322.
- (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) 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.
- (15) Kusk, K. O. (1978). Effects of Crude Oil and Aromatic Hydrocarbons on the Photosynthesis of the Diatom *Nitzschia palea*. Physiologia Plantarum, 43, 1-6.
- (16) Radwan, S. S., Al-Hasan, R. H., Al-Awadhi, H., Salamah, S. and Abdullah, H.M. (2000). Higher oil biodegradation potential at the Arabian Gulf coast than in the water body. Mar. Biol., 135:741-745.
- (17) Soto, C., Hellebust, J. A. and Hutchinson, T. C. (1977). Effect of Naphthalene and Aqueous Crude Oil Extracts on the Green Flagellate *Chlamydomonas angulosa*. III. Changes in Cellular Composition. Canadian Journal of Botany, 55, 2765-2777.
- (18) 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.

Study the impact of crude oil on some physiological activities of *Oscillatoria splendida*

Hammed S. Khamees¹, Ali Muayad Sultan¹, Ayman A. Saleem²

¹ Department of Biology, College of Education for Women, University of Tikrit, Tikrit, Iraq

² Faculty of Pharmacy, University of Tikrit, Tikrit, Iraq

Abstract

The effect of different concentration of crude oil had been examined upon *Oscillatoria splendida*, it was depended upon measuring Growth as optical density, Chlorophyll, Phycocyanin and Protein concentration as a Physiological activities indicator of crude oil effects on *Oscillatoria splendida*, in addition to morphological changes. The growth optical density in the control sample in the day 30 was (0.34), while it was (0.148) & (0.08) at 0.25% & 0.5% of crude oil respectively, 41% of chlorophyll concentration has been reduced under effect of 0.25% of crude oil, and reduction 63% of chlorophyll concentration with treatment 0.5%. Protein was reduced 45% at 0.25%, and 82% at 0.5% of crude oil. It was observed reduction growth, chlorophyll, phycocyanin as well as the protein concentration to a minimum under the influence of crude oil treatment 1% and 2% respectively. As well as the absorption spectrum infrared by FTIR show there were absence of methyl group CH₃ at (2950 cm⁻¹), (2870 cm⁻¹) and other bundle such as (2300) cm⁻¹, (1500) cm⁻¹, and this is could due to consumed by this species. With appearance a new compounds at 2400 cm⁻¹ and 800 cm⁻¹. Morphologically Observed that the cells within the filament appearance clearly.