# دراسة تأثير النفط الخام على بعض المعايير الفسيولوجية في *Oscillatoria chlorina*

**حميد سلمان خميس*** **علي مؤيد سلطان ** **ايمن عوني سليم*****

*قسم علوم الحياة/ كلية التربية للبنات/ جامعة تكريت **قسم علوم الحياة/ كلية التربية للبنات/ جامعة تكريت

***كلية الصيدلة/ جامعة تكريت

## المستخلص

تم اختبار تأثير تراكيز مختلفة من النفط الخام على نوع السيانوبكتريا *Oscillatoria chlorina* واعتمد قياس النمو ككثافة بصرية وتركيز الكلوروفيل أ 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 (0.3) ككثافة بصرية وسجل تحت تأثير المعاملة 0.5% (0.18) في حين كانت القيمة المسجلة في عينة السيطرة (0.43) ككثافة بصرية، وقد اختزل 40% من تركيز الكلوروفيل عند معاملة هذا النوع بالنفط الخام 0.25% واختزال 68% من تركيز الكلوروفيل عند معاملة النفط الخام 0.5%، ولوحظ تراجع تركيز البروتين تأثرا بالنفط الخام حيث اختزل الى الثلث عند معاملة النفط الخام 0.25%، واختزال 85% من بروتين *Oscillatoria chlorina* عند المعاملة 0.5%، ولوحظ اختزال النمو وتركيز الكلوروفيل الفايكوسيانين فضلا عن تركيز البروتين كليا تحت تأثير معاملات النفط الخام ذات التراكيز الاعلى 1% و 2%، ومن طيف امتصاص الاشعة تحت الحمراء لعينات النفط الخام اختفاء مجاميع المثيل الاليفاتية مثل $CH_3$ والتي تظهر جزيئاتها حزمة المط المتناظر والمط غير المتناظر عند (2920) سم$^{-1}$ (2850)سم$^{-1}$ بفعل نشاط *Oscillatoria chlorina* وقد يكون بسبب استهلاكها من قبل هذا النوع، ومن الناحية المظهرية تغير شكل الخيط من المدبب الى المستدق عند تنميته تحت تأثير النفط الخام.

**كلمات مفتاحية** : *Oscillatoria chlorina* ، السيانوبكتريا ، النفط الخام ، الفايكوسيانين.

دراسة تأثير النفط الخام على بعض المعايير الفسيولوجية في *Oscillatoria chlorina*

حميد سلمان خميس علي مؤيد سلطان ايمن عوني سليم

# Study The Effect of Crude Oil in Some Physiological Parameters in *Oscillatoria chlorin*

**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**

## Abstract

The effect of different concentration of crude oil had been examined upon *Oscillatoria chlorina*, it was depended upon measuring Growth rate as optical density, Chlorophyll, Phycocyanin and Protein concentration as an Physiological activities indicator of crude oil effects on *Oscillatoria chlorina*, in addition to morphological changes. The growth optical density in the control sample in the day 30 was (0. 43), while it was (0.3) & (0.18) at 0.25% & 0.5% crude oil respectively, and the growth inhibited under effect of concentration of crude oil ≥ 1%. A 40% and 68% of chlorophyll concentration was reduced under the effect of crude oil treatment 0.25% & 0.5% respectively. as well as protein concentration was reduced to 33% and 85% under the effect of 0.25% 0.5% crude oil respectively. Also, the growth, chlorophyll concentration, phycocyanin pigment and protein concentration were totally reduced under influence of crude oil 1%&2%. As well as the absorption spectrum infrared by FTIR show there were absence of methyl group (CH3) at (2920 $cm^{-1}$) & (2850 $cm^{-1}$), and this is could be due to the activity of *Oscillatoria chlorine* and also could be due to its consumed by this species. Morphologically, there were changing in the filament form to be tapering when it grew under the effect of crude oil.

**Key words** : *Oscillatoria chlorine*, cyanobacteria, crude oil , Phycocyanin

## المقدمة

تنتشر أنواع السيانوبكتريا في معظم البيئات تقريباً (Whitton and Potts, 2002)، وقد بين (Fay, 1983) بان بعض أنواعها قد تتواجد في بيئات متطرفة وهي ذاتية التغذية Photoautotrophs وعند تواجد السيانوبكتريا بعيدة عن الضوء فإنها تبقى ساكنة الا ان بعض انواعها يمكنها تأييض بعض المركبات العضوية منها السكريات ( Stewart, 1973). ان من 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 والهواء 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 عن كونها مسببات سرطانية Carcinogenic وأيضا مطفرات وراثية Mutagenic ( Juhasz *et al.*, 1996)، ان تلوث بالمركبات الهيدروكربونية يسبب تعطل 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 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 اغشية الاحياء الدقيقة وبالتالي يمكن تحليلها وتحويلها الى اشكال اخرى وهذه المركبات غالبا ما تكون مركبات قطبية قابلة الذوبان في الماء ( Guha and Jaffe, 1996) الا ان الهيدروكربونات مركبات غير قطبية Nonpolarشحيحة 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 Oxygenase و Dioxygenase (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 من مدينة تكريت كانت من شمالها وجنوبها فضلا عن مواقع متعددة واقعه على طول نهر دجلة المار بالمدينة ومن بعض المستنقعات والحدائق، لضمان الحصول على انواع عديدة من افراد السيانوبكتريا، وقد تم اخذ ثلاث عينات من كل موقع من المواقع السالفة الذكر وتضمنت العينات المجموعة على ماء وتربة ووضعت العينات المجموعة لغرض الدراسة في أكياس وقناني بلاستيكية معقمة تم إعدادها مسبقا لهذا الغرض.

### الوسط الزرعي السائل BG11

يعد من أفضل الاوساط الانتقائية المتكاملة العناصر الغذائية التي توفر كافة متطلبات التغذية للسيانوبكتريا (Stanier *et al*., 1971) أذيبت 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 (7.6-7.8 pH) باستخدام بيكربونات الصوديوم ($NaHCO_3$) و حامض 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 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$^2$) لتصبح معدة لعملية الزرع، وللحصول على BG11 ذو القوام الصلب يضاف الاكار بنسبة 1%.

### تنمية وعزل السيانوبكتريا

زرعت العينات التي جمعت من مناطق متعددة على أطباق حاوية على الوسط BG11 الصلب، ثم حضنت الأطباق في الحاضنة Cooled 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 تحضن الأطباق تحت تأثير الظروف نفسها، وتكرر العملية السابقة لغاية الحصول على أنواع نقية، 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 بدرجة 25م .

**اختيار أنواع السيانوبكتريا الملائمة للدراسة**

بعد عزل وتنقية بعض الانواع، تم تنميتها على اوساط BG11 سائلة حاوية على النفط الخام، وتم إعادة زرعها ونقلها بصورة مستمرة على عدة مراحل وفي كل مرحلة يتم تعريض كل نوع الى تراكيز مختلفة من النفط الخام، ليتسنى معرفة الأنواع المقاومة للتأثير السام للمواد الهيدروكربونية النفطية، وتم انتخاب *Oscillatoria chlorine* كونه متحمل اذ ان فترة التكيف امتدت الى ستة اشهر.

**اختيار النفط الخام**

مما لا شك فيه ان النفط الخام من الملوثات الخطرة التي تهدد بيئاتنا كون العراق من البلدان المصدرة له لذا استخدم النفط الخام المستخرج من حقول كركوك لغرض معرفة مدى تأثيره على *Oscillatoria chlorina* وأيضا تأثره بهذا النوع، وقد استخدم أربعة تراكيز للنفط الخام 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 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 (Gibson and Fay, 1983).

**قياس الكلوروفيل Chlorophyll a**

تم قياس تركيز الكلوروفيل للنوع *Oscillatoria chlorina* تبعا لطريقة (Mackinney, 1941) 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 الراسب 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 حاويا 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 الطوليين الموجيين (A633،A645) نانوميتر بعد تصفير الجهاز بالبلانك ( أستون بتركيز80%) ، يحسب تركيز الكلوروفيل بوحدة ملغرام/مل من خلال التطبيق بالمعادلة Chlorophyll a (mg/ml)= 12.7 x A663 -2.69 x 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 % $NaCO_3$ مذابة في (0.1) مولار من (NaOH).

2- محلول (B) 0.5 % $CuSO_4.5H_2O$.

3- محلول (C) 1 % صوديوم بوتاسيوم ترتارات.

4- المحلول القاعدي: يحضر آنيا 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 بوساطة 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 الزرعي 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 حامضيه ( pH 7.8).

2- تحطم خلايا السيانوبكتريا بواسطة جهاز Mixer نوع Griffin مع الحفاظ على درجة حرارة (4)م$^{o}$

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 البلانك 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 $K_2HPO_4$ (0.01 M) phosphate buffer 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، تقرأ الكثافة البصرية Optical density للراشح باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer نوع Lapo Med. inc، على الطولين الموجين A652 , A615 نانوميتر حسب طريقة (Manikandavelu and Murugan, 2009).

Phycocyanin (mg/ml) = [A615- 0.474(A652)] / 5.34

**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 التنمية 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 الـ IR المشار اليه في أعلاه واخذا القراءة 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 السيانوبكتريا.

**التحليل الإحصائي**

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

## النتائج والمناقشة

تم تنمية النوع *Oscillatoria chlorina* تحت تأثير تراكيز مختلفة من النفط الخام وهي (0.25% ، 0.5% ، 1% ، 2%) وقد بينت النتائج استجابات متباينة على صعيد النمو وتركيز الكلوروفيل 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 يوما. يوضح الشكل (2) تأثير تراكيز مختلفة للنفط الخام على نمو *Oscillatoria chlorina*، ففي عينة السيطرة الغير معاملة نجد ان قيم النمو المسجلة في الأيام (8 ، 16 ، 24 ، 30) هي (0.08 ، 0.18 ، 0.32 ، 0.43) على التوالي ، وعند معاملة هذا النوع بـ (0.25%) من النفط الخام نجد قيمة النمو المسجلة في اليوم الثامن (0.02) وهو ربع القيمة المسجلة في عينة السيطرة ويرتفع النمو بشكل متدرج ليصبح (0.06 ، 0.15) في اليومين السادس عشر والرابع والعشرين على التوالي ليبلغ في اليوم الثلاثون (0.3) أي ثلاثة ارباع المسجل في عينة السيطرة في نفس اليوم أي ان النمو اختزل بقدر الربع عند هذه المعاملة، ايضا نلاحظ تقدم نمو *Oscillatoria chlorina* تحت تاثير المعاملة بـ (0.5%) لكن بصورة ابطأ اذ سجل في اليوم الثامن (0.011) وتضاعف عشرة مرات في اليوم الرابع والعشرون (0.1) ليبلغ في اليوم الثلاثون الى (0.18) وهذا اقل من نصف القيمة المسجلة في عينة السيطرة، اما في معاملات النفط الخام ذات التراكيز الاعلى (1% ، 2%) لم تسجل قيم واضحة للنمو وهذا ربما يوافق ما جاء به الباحثان (Adam and Duncan, 1999) بان النفط ومشتقاته بصورة عامة سامة Phytotoxic على الكائنات المنتجة بتراكيز معينة لكن عند مستويات أقل من هذا المستوى فان نموها لا يتوقف ومع ذلك لا يرتقي الى نموها اذ ما كانت في البيئات النظيفة، وان النمو يعتمد بشكل او اخر على فعالية الصبغات التمثيلة واهمها الكلوروفيل لذا النتائج التي تبين تاثر تركيز الكلوروفيل نجدها موضحة في الشكل (3)، في عينة السيطرة نلاحظ تراكيز الكلوروفيل المسجلة في الايام (8 ، 16 ، 24 ، 30) كانت (0.15 ، 0.43 ، 0.67 ، 0.79) ملغم/مل على التوالي، فعند معاملة *Oscillatoria chlorina* بالنفط الخام (0.25% ، 0.5%) فان تركيز صبغة الكلوروفيل يكون في اليوم الثامن (0.03) ملغم/مل لكلا المعاملتان ويزداد بشكل متدرج ومنتظم ليبلغ في اليوم الثلاثون (0.48 ، 0.26) ملغم/مل على التوالي، في حين لم تسجل تراكيز معنوية لصبغة الكلوروفيل عند معاملة *Oscillatoria chlorina* بتراكيز النفط الخام (1% ، 2%). وقد بين الباحث ( Oberholster *et*

*al.*, 2010) بان قياس محتوى الكلوروفيل يعد القياس الادق على سمية المركبات الهيدروكربونية كون الكلوروفيل الاكثر حساسية تجاه عموم الملوثات وفي اللحظة التي يتم فيها تثبيط الكلورفيل يتم تثبيط العديد من وظائف الخلية الحية. كذلك سجلت صبغة الفايكوسيانين قيم متباينة باختلاف تراكيز النفط الخام المستخدم فعند معاملة المزارع النامية ب (0.25% ، 0.5%) من النفط الخام فان محتوى الفايكوسيانين في اليوم الثامن يسجل (5 ، 3) مايكروغرام/مل على التوالي ليرتفع تركيزه بشكل بطيء ومتدرج ليبلغ في اليوم الثلاثون (6 ، 5) مايكروغرام/مل على التوالي، وقد اختفت تراكيز الفايكوسيانين عند استخدام التراكيز الاعلى من النفط الخام (1% ، 2%) اذ انها لم تسجل قيم تذكر كما هو موضح في الشكل (4). اما بالنسبة لتركيز البروتين للنوع *Oscillatoria chlorina* يلاحظ في الشكل (5) ان القيم المسجلة في عينة السيطرة في الايام (8 ، 16 ، 24 ، 30) كانت (0.04 ، 0.09 ، 0.17 ، 0.28) ملغم/مل وعند معاملة هذا النوع بالنفط الخام (0.25% ، 0.5%) نجد تركيز البروتين المسجل في اليوم الثامن (0.009 ، 0.008) ملغم/مل على التوالي ليبلغ تركيزه في اليوم الثلاثون (0.09 ، 0.04) ملغم/مل على التوالي، في حين بينت النتائج اختزال تراكيز البروتين للمعاملتان (1% ، 2%) بشكل واضح اذ ان تراكيزه قد بلغت الصفر في النصف الاخير من فترة التنمية، وهذا يعود لعدم قدرة *Oscillatoria chlorina* على تحمل تراكيز النفط الخام، وفي دراسة اجراها (Soto, 1977) *Chlamydomonas angulosa* لاحظ فيها انخفاض البروتين الكلي بعد نموه تحت تأثير المشتقات النفطية في الوسط المائي، وقد يكون ذلك بسبب تثبيط عمل DNA او تثبيط استنساخ RNA ويتبعه انخفاض في تكوين النشا Starch وهذا أيضا موافق لما يحصل في *Scenedesmus armatus* (Zachleder and Šetlik, 1982). السلايد (1) يبين *Oscillatoria chlorina* نامي تحت الظروف المثالية اما السلايد (2) نامي تحت تاثير معاملة النفط الخام ذات التركيز 0.5%. وربما اهم مايلاحظ هنا هو تغير شكل نهاية الخيط من الشكل المدبب الى العريض المستدق فضلا عن زيادة عرض الخلايا. وتوضح الجداول (3) (4) (5) (6) معامل الارتباط بين معاملات النفط الخام وبين الكثافة البصرية للنمو وتركيز الكلوروفيل والفايكوسيانين وتركيز البروتين على التوالي، ويبين الشكل (6) طيف امتصاص الاشعة تحت الحمراء لعينات النفط الخام بجهاز الـ IR للنوع *Oscillatoria chlorina* ويلاحظ طيف امتصاص حزمة مجاميع المثيل الاليفاتية مثل $CH_3$ والتي تظهر جزيئاتها حزمة المط المتناظر والمط غير المتناظر عند (2920) سم (2850) سم قد اختفت تماما تحت تأثير الأنواع المذكورة في اعلاه وربما قد استهلكت السيانوبكتريا هذه مجموعة المثيل الاليفاتية.

## 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., 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.

**4.** Cerniglia, C. E. (1992). Biodegradation of polycyclic hydrocarbons. Biodegradation, Vol. 3: 351-368.

**5.** Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K., Stackebrandt, E. (2006). The Prokaryotes, Third Edition. Springer Science+Business Media, LLC 4:1053–1073.

**6.** Fay, P. (1983). The blue-greens (cyanophyta – cyanobacteria). The institute of biology. Edward Arnold. pp. 1-88.

**7.** Gibson, C. E. and foy, R. H. (1983). The photosynthesis and growth efficieney of a plank tonic Blue Green Algae oscillatoria redke . Br phycol . J . 18: 39-4

**8.** 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.

**9.** Juhasz, A. L., Britz, M. L. and Stanley, G. A. (1996). Degradation of High Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Pseudomanas Cepacia. Biotechnology Letters, 18, 5,577-582.

**10.** 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.

**11.** Mackinney, G. (1941) Absorption of light by chlorophyll solutions. J Biol Chem 140: 315–322.

**12.** Manikandavelu, D. and Murugan, T. (2009) Utilization of swine dung in Spirulina production and isolation of phycocyanin, Tamilnadu Journal of Veterinary and Animal Sciences 5(4): 171-173.

**13.** 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.

**14.** Plohl, K. and Leskovsek, H. (2002). Biological degradation of motor oil in water. Acta. Chim. Slov., 49: 279-289.

**15.** Stewart, W. D. (1973). Nitrogen fixation by photosynthetic microorganisms. Ann. Rev. Microbiol. Vol. 27: 283-316.

**16.** Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M. and CohenBazire, G. (1971). Purification and properties of unicellular bluegreen algae (Order Chroococcales). Bacteriol. Rev. 35: 171205.

**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.

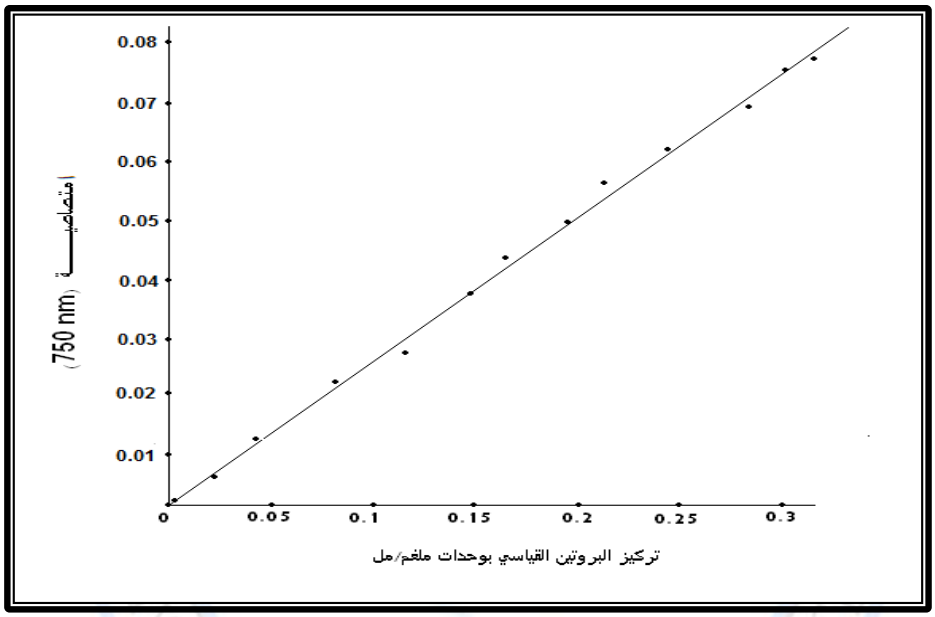
**18.** Zachleder, V. and Šetlik, I. (1982). Effect of Irradiance on the Course of RNA Synthesis in the Cell Cycle of *Scenedesmus quadricauda*. *Biologia Plantarum*, 24, 341-353.

**جدول (1) يوضح مركبات وتراكيز الوسط BG11**

| ت | المادة | الوزن | ت | المادة | الوزن |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | NaNO3 | 1.5 g | 6 | Citric acid | 6 mg |
| 2 | MgSO4•7H2O | 0.075 g | 7 | Ferric ammonium citrate | 6 mg |
| 3 | K2HPO4 | 0.04 g | 8 | Disodium EDTA | 1 mg |
| 4 | CaCl2•2H2O | 0.036 | 9 | Distilled Water | 1 liter |
| 5 | Na2CO3 | 0.02 g | 10 | Trace metal mix A5 | 1 ml |
| Trace metal mix A5 | | | | | |
| ت | المادة | الوزن | ت | المادة | الوزن |
| 1 | $H_3BO_3$ | 2.86g | 5 | $CuSO_4 \cdot 5H2O$ | 0.079g |
| 2 | $MnCl_2 \cdot 4H2O$ | 1.81g | 6 | $Co(NO_3)_2 \cdot 6H2O$ | 0.049g |
| 3 | $Na_2MoO_4 \cdot 2H2O$ | 0.39g | 7 | Distilled Water | 1 liter |
| 4 | $ZnSO_4 \cdot 7H2O$ | 0.222g | 8 | يضبط على الاس الهيدروجيني | 7.1 |

**جدول (2) يوضح تراكيز النفط الخام المستخدمة**

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




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

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

| 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 chlorina*

| 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 | |

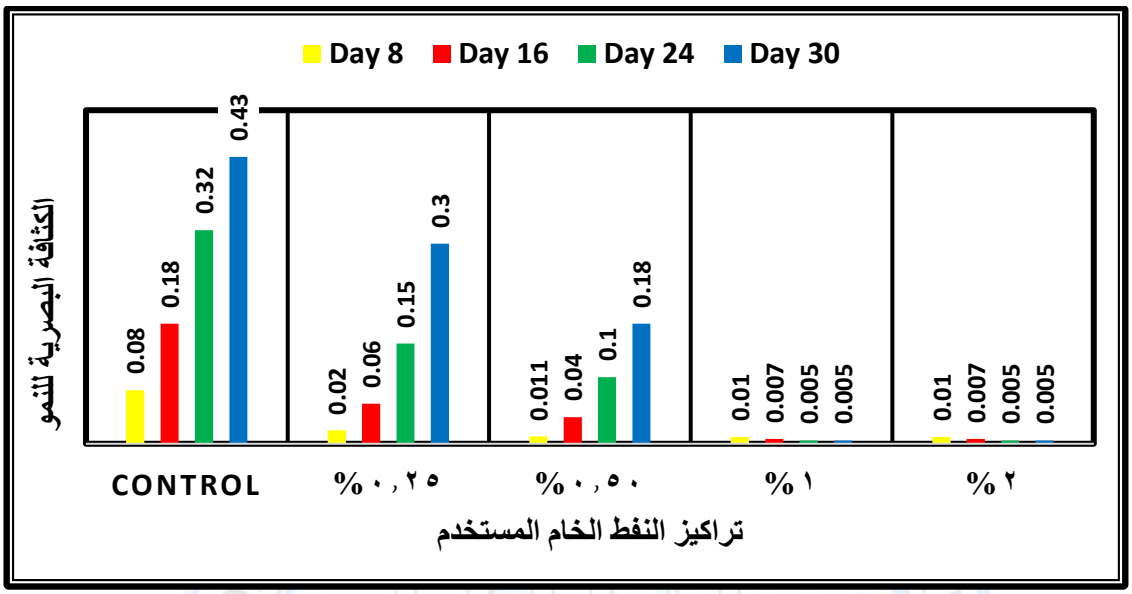
جدول (5) يوضح معامل الارتباط ما بين الفايكوسيانين ومعاملات النفط الخام (0.25% ، 0.5% ، 1% ، 2%) للنوع *Oscillatoria chlorina*

| 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 | |

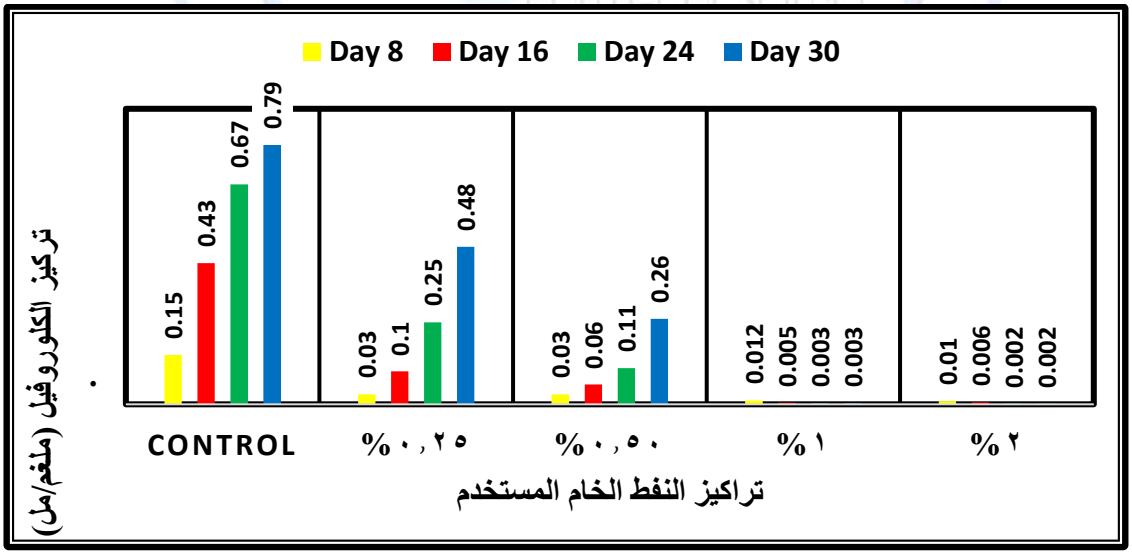
جدول (6) يوضح معامل الارتباط ما بين تركيز البروتين ومعاملات النفط الخام (0.25% ، 0.5% ، 1% ، 2%) للنوع *Oscillatoria chlorina*

| 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 | |

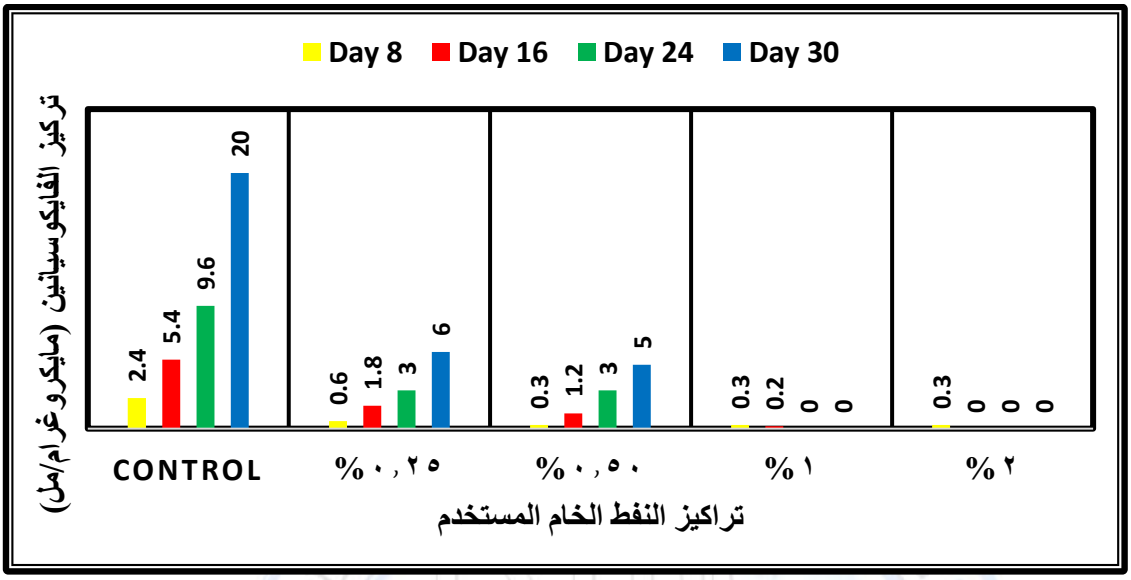
* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed). ** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).




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

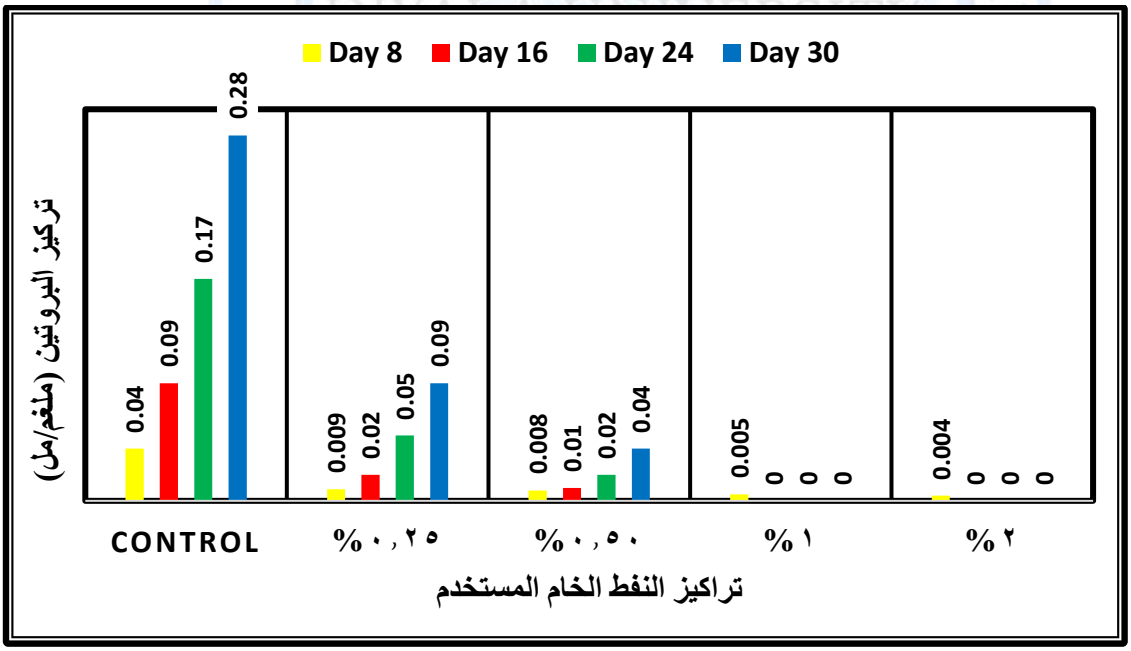



شكل (3) تأثير تراكيز مختلفة من النفط الخام على تركيز الكلوروفيل في النوع *Oscillatoria chlorina* على مدى (30) يوما




شكل (4) تأثير تراكيز مختلفة من النفط الخام على صبغة الفايكوسيانين

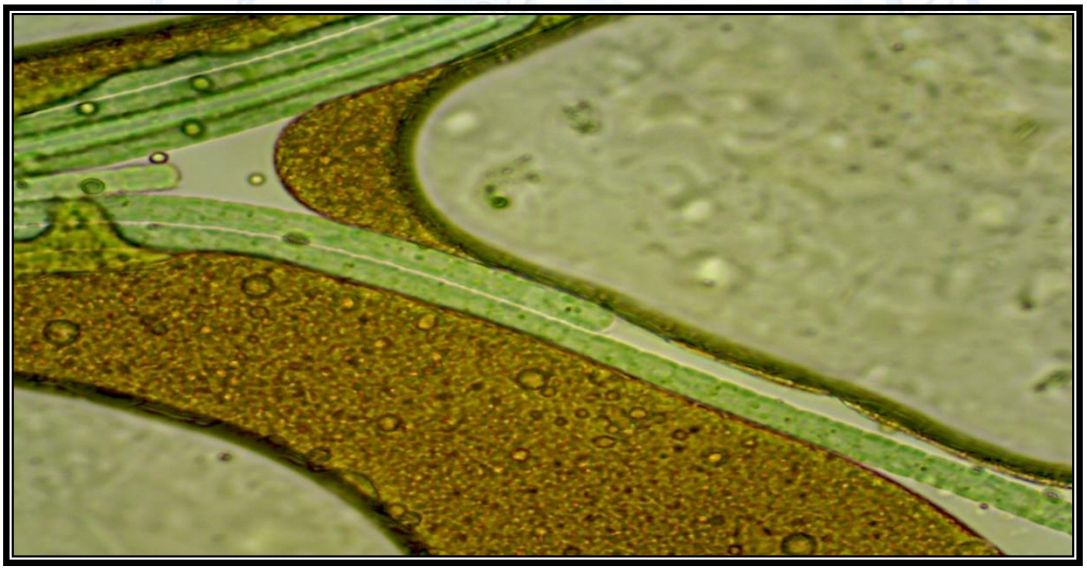
في النوع *Oscillatoria chlorina* على مدى (30) يوما



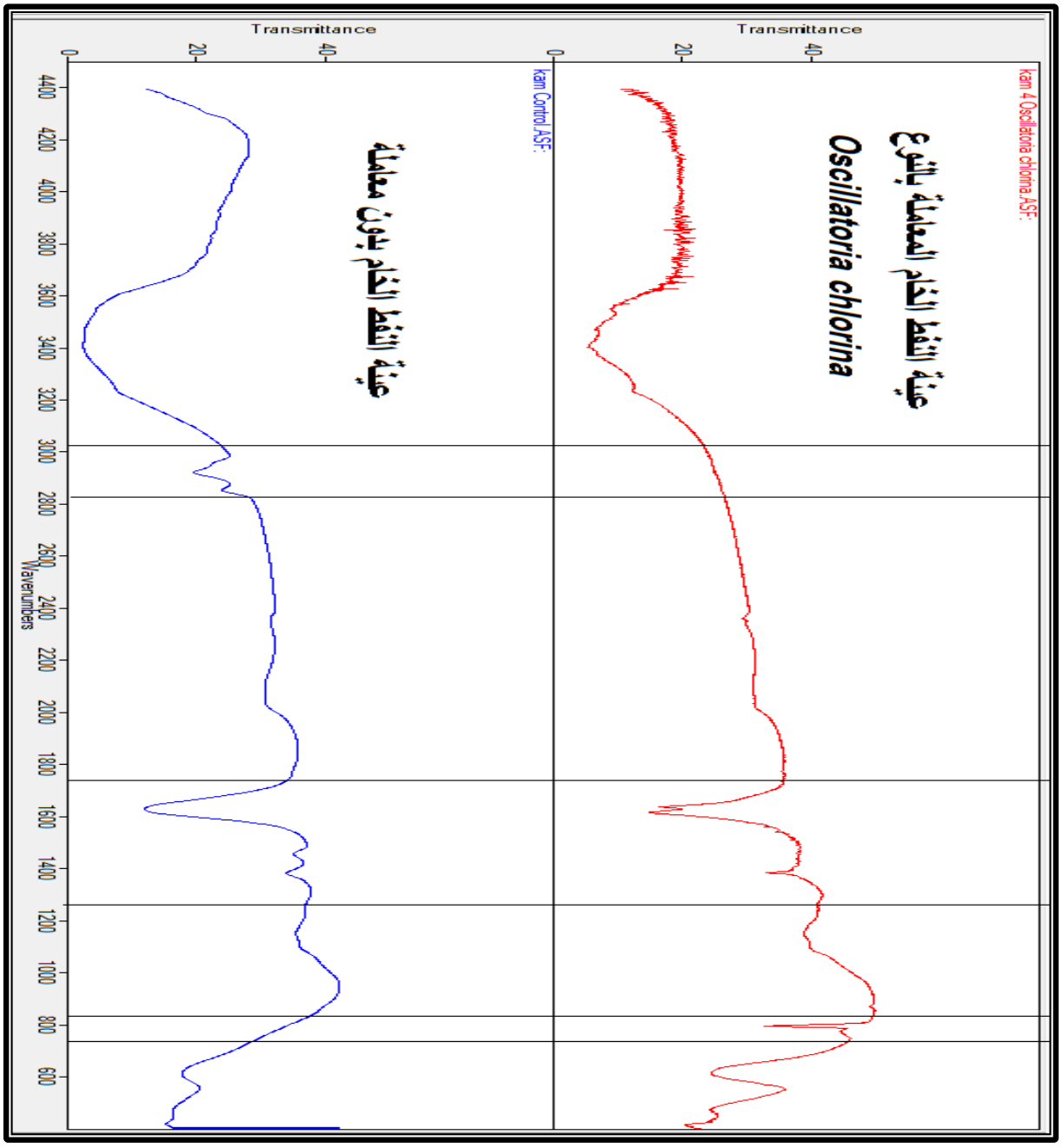

شكل (5) تأثير تراكيز مختلفة من النفط الخام على تركيز البروتين

في النوع *Oscillatoria chlorina* على مدى (30) يوما

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



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




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

**بالنوع *Oscillatoria chlorina***