قابلية بعض انواع السيانوبكتريا على مراكمة الهيدروكاربونات الاروماتية

احمد محسن عذبي ، حامد طالب السعد* و مريم فوزي حميد*
كلية التربية ـ قسم علوم الحياة ـ جامعة البصرة
*مركز علوم البحار- جامعة البصرة

الخلاصة

تناولت الدراسة الحالية عزل وتشخيص ثلاثة انواع من الطحالب الخضر ـ المزرقة (السيانوبكتريا) وهي *Microcystis aeruginosa* و *Hapalosiphon aureus* و *Anabaena variabilis* حيث جمعت العينات من مناطق مختلفة من شط العرب في قضاء ابي الخصيب خلال شهر تشرين الاول لعام 2008 . وتم تنقية واكثار هذه الانواع مختبرياً للحصول على مزارع وحيدة الطحلب Unialgal culture ونقية Axenic واكثارها باستخدام الوسط الزرعي (Chu-10) المحور ومن ثم اختبار قابليتها على تركيز ومراكمة الهيدروكاربونات الاروماتية الكلية.

بينت النتائج قابلية هذه الانواع الثلاثة على مراكمة هذه المركبات وبتراكيز مختلفة وان طحلب *A. variabilis* كان اكثرها تركيزاً حيث ركز (88.5)ppm يليه طحلب *H. aureus* فقد ركز (86.9)ppm ثم طحلب *M. aeruginosa* حيث ركز (58.6)ppm وكانت هناك فروق معنوية $P<0.05$ بين الطحالب من جهة وبين فترة التعريض من جهة اخرى إذ اظهرت النتائج زيادة التركيز بزيادة فترة التعريض ولكل طحلب .

1- المقدمة

يُعد التسرب النفطي واحداً من الكوارث البيئية المخيفة بسبب قدرته على تلوث الهواء والماء والتربة. وان تسرب كميات قليلة من الهيدروكاربونات النفطية إلى البيئة ممكن أن يؤدي إلى زيادة في تراكيز الهيدروكاربونات الذائبة أكثر من الحدود الطبيعية (Spence *et al.*, (2005) . ويعرف التلوث النفطي على انه ظاهرة إدخال مركب معقد من عدة عناصر أهمها الهيدروجين والكاربون مما يؤدي إلى الاضرار بالبيئة المائية من خلال تغيير خواصها الكيميائية والفيزيائية والبيولوجية والاضرار بالاحياء المائية والذي يؤدي إلى الاضرار بالإنسان بطرق مباشرة أو غير مباشرة Al-Saad *et al.* ,(2003). وقد خلفت حرب الخليج واحدة من أسوء الملوثات البيئية التي سجلت نتيجة لتسرب النفط من الفترة الواقعة بين شهر آب من عام 1990 إلى شهر شباط من عام 1991 ، حيث أدت إلى تسرب اكبر كمية للنفط في تاريخ البشرية قُدرت بحوالي 6 ملايين برميل من النفط الخام وهذه الكمية الهائلة من النفط سببت دماراً واسعاً للبيئة المائية (Al -Thukair ,2002; Barth Hans ,2003).

بالرغم من ان النفط المتسرب يعاني من عدة تغييرات فيزيائية وكيميائية تؤدي إلى تغيير تركيبه ، إلا أن التكسير الحيوي يعتبر العامل الأكثر أهمية في التخلص من المركبات النفطية في البيئة المائية والذي لولا وجود الأحياء الدقيقة التي لها القدرة على مهاجمة الهيدروكاربونات النفطية وتحطيمها لبقيت هذه المركبات في البيئة المائية لسنوات طويلة وعليه اعتبرت هذه الفعالية الحيوية من السبل الرئيسية للإزالة الطبيعية للتلوث النفطي من الماء والتربة (Zobell ,1969 ; Atlas and Bartha ,1972 ; Nogales *et al.*,2001) حيث من المعروف جيداً أن تركيب النفط أو بعض مشتقاته غالباً ما تتغير في البيئة تحت تأثير الكائنات المجهرية Malisa *et al.* ,(2006) وأن الأحياء المجهرية المكسرة للهيدروكاربونات النفطية واسعة الانتشار في الطبيعة Atlas,(1981) . فبالإضافة إلى البكتريا والفطريات ،تستطيع بعض السيانوبكتريا والطحالب الحقيقية النواة أن تكسر الهيدروكاربونات النفطية (Cerniglia ,1992 ; Hopner *et al.*,1996) ، إذ أن الدراسات الحديثة أظهرت بأن الكائنات المجهرية ذاتية التغذية خصوصاً السيانوبكتريا تمثل دوراً مباشراً أو غير مباشر في ايض

وتحلل الهيدروكاربونات (Cerniglia *et al.* ,1980 ; Radwan and Al-Hassan ,2000 ;Cohen ,2002).

أن دور السيانوبكتريا وأسهامها في عمليات التحلل الحيوي للنفط أخذ اهتماماً خاصاً حيث لوحظ النمو الكثيف للسيانوبكتريا على النفط مباشرةً بعد تسربه إلى الخليج العربي بعد حرب الخليج عام 1991 Sorkhoh *et al.* ,1992 ; Sorkhoh *et al.*, 1995) حيث يعتقد (2002), Cohen أن السيانوبكتريا تسهم وبشكل غير مباشر في تحلل النفط من خلال توفيرها للظروف الملائمة لتحلل النفط بواسطة البكتريا وذلك من خلال توفيرها للأوكسجين وتراكيز من المغذيات والدالة الحامضية الملائمة لنمو البكتريا (Abed *et al.*, 2002 ; Raeid and Cohen ,2002 ; Jurgen , 2005)، وأن نمو السيانوبكتريا الخيطية خلال طبقة النفط يكون على السطح بينما تنمو الطبقة البكتيرية تحت هذه الطبقة والتي تستهلك المواد العضوية والأوكسجين لذلك يكون النفط محصوراً بين طبقة السيانوبكتريا في الأعلى وبين طبقة البكتريا في الأسفل .وهذا هو الوضع المناسب للتحلل الحيوي حيث يعزل النفط ويزال من البيئة المحيطة Harayama *et al.* ,(2004) . وتنتج السيانوبكتريا سكريات متعددة خارجية تعتبر الأساس في الأستحلاب الحيوي Bioemulsification في حين أن البكتريا الهوائية المحللة للنفط تكون أكثر نشاطاً في هذا الوسط بسبب الإنتاج العالي للأوكسجين بواسطة السيانوبكتريا GPI ,(2003). ونظراً لأهمية السيانوبكتريا في تراكم الهيدروكاربونات الاروماتية في داخل أجسامها وبالتالي تخليص البيئة من اخطر الملوثات كونها لا تتحلل بسهولة وتبقى مترسبة لفترة طويلة في البيئة ارتأينا أن نقوم بهذه الدراسة .

2- طرق العمل

- **جمع العينات**

جمعت العينات من مناطق مختلفة من قضاء أبي الخصيب في نهر العرب بواسطة قناني بلاستيكية نظيفة سعة 500 مل وجلبت إلى المختبر . إذ ثبت جزء من العينة باستخدام الفورمالين بتركيز 4 % لغرض الفحص المجهري بينما ترك الجزء الأخر دون تثبيت لغرض استزراع الطحلب. أستخدم الوسط الزرعي Chu -10 المحور (جدول -1-) والذي حضرت مكوناته بشكل محاليل خزينة Stock solution إذ حضر الوسط الزرعي السائل بإضافة 1 مل من كل محلول خزين في دورق حجمي سعة 1 لتر ثم كمل الحجم الى اللتر بالماء المقطر الخالي من الأيونات ونظم الأس الهيدروجيني إلى 7.3 وذلك بإضافة قطرات من محلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH تركيز 0.2N الذي قيس بأستخدام جهاز pH –meter نوع (OAKTON 211285) من إنتاج شركة (EUTECH) ثم عقم الوسط الزرعي باستخدام جهاز المؤصدة الكهربائية (Autoclave) نوع Hirayama من أنتاج (Hirayama manufacturing corporation Japan/) بدرجة حرارة 121 مْ وضغط 1.5 باوند/أنج ² ولمدة 20 دقيقة ثم ترك ليبرد بدرجة حرارة المختبر ويضاف إليه الفسفور بعد تعقيمه بالترشيح من خلال أوراق الترشيح (milipores) ذات فتحات 0.2 مايكرومتر وذلك لمنع ترسب الفوسفات خلال التعقيم .

أما الوسط الزرعي الصلب فقد حضر بإضافة 1.5 غم من مادة الآگار (Agar) لكل 100 مل من الوسط الزرعي السائل بعدها عقم الوسط وصب في أطباق بتري معقمة تحت ظروف التعقيم ،تركت الأطباق بدرجة حرارة المختبر لمدة (24) ساعة للتأكد من خلوها من التلوث ثم حفظت مقلوبة في الثلاجة بدرجة حرارة 4 مْ .

جدول (1): التركيب الكيمياوي للوسط الزرعي (Chu -10) المحور

المادة	الكمية غم / لتر	المادة	الكمية غم / لتر
$NaNO_3$	53.3	$MnCl_2.4H_2O$	0.045
$K2HPO_4$	10	$(NH_4)_6MO7O_{24}.4H_2O$	0.007
$MgSO_4.7H_2O$	25	$ZnSO_4.7H_2O$	0.056
$CaCl_2.2H_2O$	40	$CuSO_4.5H_2O$	0.02
$FeCl_3.6H_2O$	1.46	$COCl_2.6H_2O$	0.01
$Na_2SiO_3.9H_2O$	6.2	H_3BO_3	0.72
$Na_2.EDTA$	31.8	PH	7.3
$NaHCO_3$	25		

● **عزل وتشخيص الطحالب**

ركزت عينات الطحالب بعد جمعها باستخدام جهاز الطرد المركزي (Centrifuge) بسرعة 3000 دورة /دقيقة . أخذ الجزء الراسب وفحص باستخدام المجهر الضوئي نوع Novel(XSZ – 107BN)وذلك من خلال تحضير الشرائح المجهرية ثم زرعت على الوسط الزرعي الصلب بطريقة التخطيط (Streaking method) وبأستخدام اللاقح (loop) واستخدمت طريقة التخفيف (Dilution method) بالنسبة للأوساط السائلة والموضحتان من قبل Stein,(1975) وذلك لغرض الحصول على عزلات وحيدة الطحلب (unialgal cultures) وحضنت في حاضنة مضاءة شدة أضاءتها (130-150) مايكروأنشتاين م ^{2} /ثا بفترة أضاءة (16ضوء: 8 ظلام) ساعة بدرجة حرارة (27±2) مْ لحين ظهور النمو بعدها صنفت الطحالب اعتماداً على المصادر التالية (Prescott ,1975; Bourrely ,1980; Desikachary ,1959) وكما هو مبين ادناه :

Division : Cyanophyta
Class : Cyanophyceae
Order : Chroococcales
Family : Chroococcaceae
Genus : *Microcystis*
Species : *Microcystis aeruginosa* (Kütz)
Class :Cyanophyceae
Order : Stigonematales
Family : stigonemataceae
Genus : *Hapalosiphon*
Species : *Hapalosiphon aureus* (west and West)
Class : Cyanophyceae
Order : Nostocales
Family : Nostocaceae
Genus : *Anabaena*
Species : *Anabaena variabilis* (Kützing ex Born. Et Flah)

● **تنقية الطحالب**

بعد الحصول على العزلات وحيدة الطحلب من الفقرة السابقة نقيت من الجراثيم والفطريات ،فقد اعتمدت الطريقة الموصوفة من قبل Wedeman *et al*.(1984) ، إذ غسلت الطحالب بالماء المقطر المعقم ثم طردت مركزياً بسرعة 3000 دورة /دقيقة ولمدة 50-90 ثانية أهمل الراشح وأعيد مزج الراسب مع الماء المقطر المعقم مرة أخرى ،كررت العملية 12 مرة على الأقل للتأكد من نقاوة العزلات فقد أتبعت الطريقة الموضحة من قبل Stein (1975), والمتضمنة الفحص المجهري للعزلات بعد زراعتها على الوسط الزرعي Nutrient agar للتأكد من خلوها من الجراثيم وعلى الوسط الزرعي Potato carrot agar للتأكد من خلوها من الفطريات ،وفي حال خلوها من النمو الجرثومي والفطري تعتبر العزلة نقية (Axenic culture) .

●**استزراع الطحالب**

بعد الحصول على عزلات وحيدة الطحلب نقية زرعت تلك العزلات باستخدام الوسط الزرعي المذكور سابقاً حيث

نقل كل نوع منها سواء كان من الوسط السائل بواسطة ماصة معقمة أو من الوسط الصلب بواسطة اللاقح المعقم أو من كلا الوسطين إلى عدد من الدوارق الزجاجية المعقمة حجم 100 مل يحتوي كل دورق على 70 مل من الوسط الزرعي المعقم وتغلق فوهات الدوارق بالقطن المعقم وتنقل إلى كابينة الزرع، رجت العينات على الأقل مرتين يومياً لمنع ترسب أو تجمع الطحالب على الجدران .استمرت عملية الزرع لحين الحصول على نمو جديد .

- **قياس معدل النمو**

قيس معدل النمو للعزلات المنتخبة بطريقة الكثافة الضوئية (Optical density) حيث قدرت كثافة الخلايا المتجانسة بأستخدام جهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometer) نوع (Spectro SC .USA) عند طول موجي 650 نانوميتر (Stein , (1975) . وعبر عن معدل النمو Growth rate بثابت النمو K والذي قدر بطريقة (Fogg,(1975) من خلال المعادلة الآتية :

$$K = \frac{\text{Log } Nt - \log No}{t}$$

حيث

K = معدل النمو (ثابت النمو).

Nt = الامتصاصية بعد (t) يوم

No = الامتصاصية في بداية التجربة

t = الزمن (الأيام)

أما زمن التضاعف G الذي حسب من المعادلة التالية :

$$G = \frac{0.301}{k}$$

- **إكثار العزلات الطحلبية**

أستعملت دوارق زجاجية جافة ونظيفة سعة 250 مل وأضيف لكل دورق 200 مل من الوسط الزرعي المعقم ولقح كل دورق بـ 20 مل من المزرعة الخزينة (Stock culture) وفي الطور اللوغارتمي للحصول على كميات كافية من المزارع الطحلبية (1975), Stein وتحت ظروف الزرع المشار إليها سابقاً حيث حصلنا على مزارع كافية لأجراء التجارب المختبرية اللاحقة.

- **إضافة الهيدروكاربونات الأروماتية الكلية إلى المزارع الطحلبية :**

لقد أستخدم تركيز 2 mg/l من النفط الخام الحاوي على المركبات الأروماتية فقط بعد فصل المركبات الأليفاتية عنه . وقد أتبعت طريقة (Pothuluri *et al.*,(1995 في إضافة المركبات الهيدروكاربونية وذلك كما يلي :

(1) حضر27 دورق زجاجي 12 منها سعة 250 مل وضع فيها 200 مل من الوسط الزرعي ،ولقح كل دورق بـ 20 مل من المزرعة النقية لكل طحلب من الطحالب الثلاثة المعزولة وفي الطور اللوغارتمي وتمت هذه العملية تحت ظروف معقمة .

(2) تركت الدوارق لمدة يومين لإتاحة الفرصة لنمو الطحالب .

(3) أضيفت الهيدروكاربونات الأروماتية الكلية بتركيز 2 mg/l وبحجم 1 مل لكل دورق وبواقع ثلاث مكررات لكل طحلب من الطحلب المعزولة وحضنت في حاضنة هزازة بدرجة حرارة (27±2) مه وبسرعة 50 دورة /دقيقة وشدة أضاءة 130- 150 مايكروانشتاين م ^{2} /ثا مع فترة أضاءة 16 ضوء : 8 ظلام لفترة أسبوعين ،ويكون الحصاد كل ثلاثة أيام بترشيح 50 مل من كل دورق.

(4) حصدت المزارع الطحلبية كل ثلاثة أيام من خلال سحب حجم قدره 50 مل من كل مزرعة للطحالب المدروسة لتحديد تركيز الهيدروكاربونات في داخل الطحلب وفي الوسط الزرعي .علماً انه وضعت دوارق سيطرة لكل نوع من الطحالب الثلاثة والتي تحوي وسط زرعي وطحالب فقط .

- **استخلاص المركبات الهيدروكاربونية الأروماتية**

(1) رشح حجم قدره 50 مل وبواقع ثلاث مكررات لكل مزرعة طحلبية كل ثلاثة أيام بواسطة جهاز الترشيح الكهربائي وباستخدام أوراق ترشيح نوع milipore filter ذات أقطار ثقوب 0.45 مايكرومتر. وذلك لفصل الطحالب عن الراشح الحاوي على المركبات الهيدروكاربونية الأروماتية .

(2) أخذ الراشح وأجريت له عملية الاستخلاص حسب الطريقة الموصوفة في دليل (UNESCO ,1976 ; UNEP ,1993) ، أستخلص الراشح مع رباعي كلوريد الكاربون بأضافة 3 مل منه ثم رجت العينة جيداً لمدة 15 دقيقة ونقلت إلى قمع الفصل Separating funnal ورجت جيداً بعدها تركت لتستقر وانفصلت إلى طبقتين الطبقة العليا تهمل والسفلى والتي تكون حاوية على رباعي كلوريد الكاربون مع المركبات الهيدروكاربونية ، مررت العينة على عمود فصل حاوي على صوف زجاجي وكبريتات

الصوديوم اللامائية ، وتم التخلص من رباعي كلوريد الكاربون باستخدام جهاز المبخر الدوار بعدها أضيف الهكسان الاعتيادي لإذابة المركبات الهيدروكاربونية بعدها تم قياس شدة الانبعاث بجهاز الفلورة .

(3) جففت اوراق الترشيح بدرجة حرارة المختبر ثم اجري لها عملية الاستخلاص بجهاز الاستخلاص المتقطع لمدة 24 ساعة وذلك بوضعها في كشتبان (thumble) حسب طريقة (1980), Goutex and Saliot والمستخدمة من قبل (1993), UNEP حيث استخدم خليط ميثانول : بنزين بنسبة 1:1 بعدها تم أجراء عملية الصوبنة Saponification للعينة بإضافة 20 مل من المحلول المائي لهيدروكسيد البوتاسيوم الميثانولي MeOHKOH بتركيز4N (والذي حضر بإذابة 22.44 غم من KOH في 20 مل من الماء المقطر ويكمل الحجم إلى 100 مل بالميثانول) لمدة ساعتين عند 40م ه وبإستخدام جهاز الاستخلاص .

(4) تركت العينة لتبرد ثم نقلت إلى قمع فصل وأضيف لها (50) مل من مذيب الهكسان النقي ، رجت جيداً ثم تركت لتستقر مكونة طبقتين تهمل السفلى أما الطبقة العليا الحاوية على الهيدروكاربونات الأروماتية المذابة في الهكسان اجري لها عملية تنقية من المواد غير النفطية بإستخدام عمود الفصل الكروماتوغرافي المكون من 3 غم من مادة الألومينا (اوكسيد الالمنيوم المتعادل) للتخلص من الأحماض الدهنية و 3 غم من كبريتات الصوديوم اللامائية لامتصاص الماء أن وجد في العينة مرر المزيج الحاوي على المركبات الهيدروكاربونية الأروماتية المذابة في الهكسان خلال عمود الفصل ،يبخر الأخير حتى الجفاف ثم تم إذابة المتبقي بالهكسان وأصبح جاهزاً للقياس بجهاز الفلورة لغرض قياس تراكيز الهيدروكاربونات الأروماتية الممدصة من قبل الطحالب .

3-النتائج

●عزل الطحالب وتنقيتها

تم في الدراسة الحالية عزل وتنقية ثلاثة أنواع من العزلات الطحلبية Axenic culture والتي تعود الى قسم الطحالب الخضر المزرقة (Cyanobacteria) والتي تباينت من حيث الشكل بعضها على هيئة مستعمرات Colonies وتمثلت بالنوع *Microcystis aeruginosa* الى الخيطي المتفرع متمثلة بالطحلب *Hapalosiphon aureus* وغير المتفرع كما هو الحال في طحلب *Anabaena variabilis* .

●وصف الطحالب المعزولة:

● ***Microcystis aeruginosa*** **(Kütz.)**

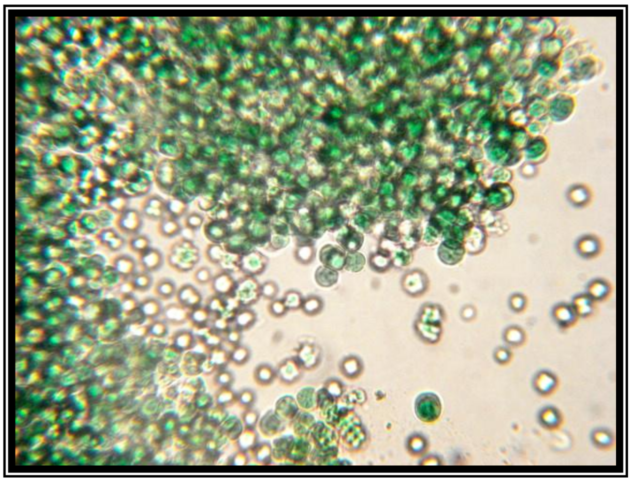
طحلب أخضر مزرق يتواجد في المياه العذبة في الأنهار ومحطات تصفية مياه الشرب والبرك وأحواض تربية الأسماك ،غالباً ما يكون أزدهارات مائية شديدة في البحيرات الثرية ،تتواجد أفراده على هيئة مستعمرات غير منتظمة محاطة بغلاف هلامي شفاف وواضح تحوي خلايا متراصفة ومزدحمة ،الخلايا كروية الشكل أو شبه كروية تحوي حبيبات كثيرة خضر مزرقة وفجوات غازية Gas vacules واضحة، يتراوح قطر الخلية بين 3 – 7 مايكرومتر (صورة -1-) .

● ***Hapalosiphon aureus*** **(West and West)**

تتفرع الخيوط تفرعاً حقيقياً متشابهاً باتجاه واحد من الخيط الأصلي ونادراً ما تكون باتجاهين ،وغالباً ما تكون قصيرة ، الخلايا برميلية الشكل أو اسطوانية خصوصاً في التفرعات قطرها 6 - 9 مايكرومتر ،طولها 12 – 24 مايكرومتر محاطة بغلاف رقيق ومغلق وعديم اللون في التفرعات واحيانا بني ذهبي في الخيط الأصلي والذي يكون قطر الخلايا فيه 11 – 12.5 مايكرومتر ، الحويصلات المغايرة بينية (صورة -2-) .

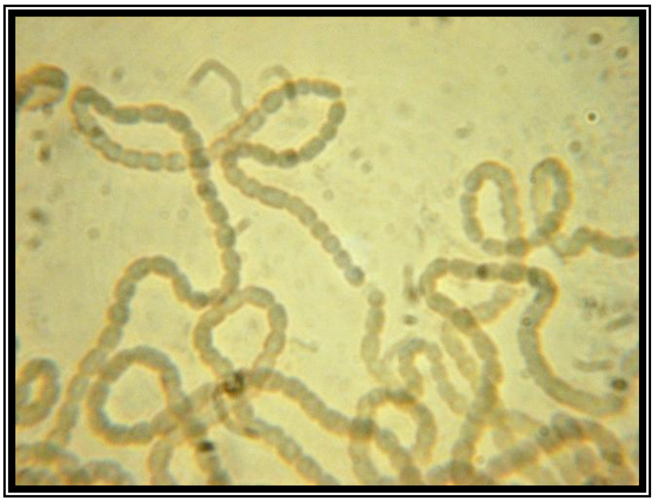
Anabaena variabilis **(Kützing ex Born. et Flah)**

يتواجد في الترب الرطبة وفي البرك الراكدة والجداول والأنهار .يكون بشكل خيوط متطاولة وملتوية وبلون أخضر غامق لاتحوي غلاف ،الخلايا مخروطية أو برميلية الشكل قطرها 4 – 6.5 مايكرومتر أحياناً تحوي فجوات غازية ،الحويصلات المغايرة دائرية أو بيضوية بعرض 5.5 – 6 مايكرومتر وطول 5.8 – 6.5 مايكرومتر واحياناً أكثر من 8 مايكرومتر ، الكونيديا بيضوية في سلسلة بعيدة عن الحويصلات المغايرة قطرها 6.8 – 9 مايكرومتر وطولها 7.5 – 8.2 مايكرومتر (صورة -3-).



(صورة -1-) الطحلب الأخضر المزرق ***M. aeruginosa***

(صورة -2-) الطحلب الأخضر المزرق ***H. aureus***



(صورة -3-) الطحلب الأخضر المزرق ***A. variabilis***

● **معدل النمو**

أظهرت نتائج الدراسة لمنحنى نمو الطحلب *M. aeruginosa* أن الطور التمهيدي Lag phase أستغرق أربعة أيام وصولاً إلى الطور ألأسي Exponantial phase في اليوم الخامس والذي لوحظ بعده زيادة مطردة في النمو وصولاً إلى اليوم الخامس عشر إذ مثلت بداية الطور المستقر Stationary phase ،حصد الطحلب في منتصف الطور الأسي أي في اليوم العاشر ،كما أظهر الطحلب ثابتاً للنمو مقداره K= 1.053 بينما كانت قيمة زمن التضاعف للطحلب G= 0.286 (جدول -2-) .

أما فيما يخص الطحلب *H. aureus* فقد لوحظ أن طور النمو التمهيدي استغرق يومين وصولاً إلى الطور الأسي الذي بدأ منذ اليوم الثالث وأستمر بالزيادة المطردة لغاية اليوم العاشر، أي أن النمو وصل إلى الطور المستقر في اليوم الحادي عشر ولغاية اليوم الرابع والعشرين ليبدأ بعدها طور التناقص ،حصد الطحلب في اليوم السابع أي في منتصف الطور الأسي وسجل ثابت النمو ومقداره K= 0.44 ومعدل زمن التضاعف له G = 0.68 . وفي طحلب *A. variabilis* فإن طور النمو التمهيدي استغرق ثمانية أيام وصولاً إلى الطور الأسي الذي بدأ في اليوم التاسع واستمر بالزيادة في النمو حتى وصل إلى اليوم السادس والعشرين والذي مثل بداية الطور المستقر وكان حصاد الطحلب في اليوم السابع عشر ،وقد أظهر الطحلب ثابتاً للنمو مقداره K=1.362 أما زمن التضاعف فكان G=0.220

جدول (2): الفترة الزمنية للنمو مقدرة بالـ (يوم) وقيم ثابت النمو (K) وزمن التضاعف (G) للطحالب المعزولة

Generation time (G)	Growth Rat (K)	الأطوار (الأيام)			النوع
		الاستقرار	الأسي	التمهيدي	
0.28	1.05	32 - 16	15 - 5	4	*M. aeruginosa*
0.68	0.44	24 - 11	10 - 3	2	*H. aureus*
0.22	1.36	48 - 27	26 - 9	8	*A. variabilis*

●**الهيدروكاربونات الأروماتية الكلية**

تم قياس تركيز الهيدروكاربونات الأروماتية الكلية في كل من الطحالب والوسط الزرعي السائل بإستخدام جهاز الفلورة و أظهرت النتائج قابلية السيانوبكتريا على تراكم المركبات الهيدروكاربونية الأروماتية الكلية في خلاياها إذ لوحظت عدة تغييرات طرأت على طبقة طافي النفط فقد اختفت هذه الطبقة من سطح الوسط الزرعي وانتشرت على شكل قطرات صغيرة كما وأن بعض أجزاء النفط التصقت بجدار الدورق . ولوحظ استمرار الطحالب بالنمو والزيادة في العدد حتى نهاية التجربة وقد ساعد على ذلك عمليات المزج الناتج من وجود الدوارق في الحاضنة الهزازة .

تم مراقبة النقصان التدريجي الحاصل للمركبات الهيدروكاربونية الأروماتية الكلية في الوسط الزرعي وزيادتها في جسم الطحلب خلال فترة التجربة . وكان إنخفاض التراكيز في الوسط الزرعي يحدث بصورة متفاوتة بين الأنواع ليصل إلى أعلى معدل في الانخفاض في اليوم الأخير من التجربة وفي المقابل كانت هناك زيادة مطردة في تركيز هذه المركبات في الطحالب ، وهذا ما أكدته نتائج التحليل الإحصائي حيث بينت هذه النتائج وجود فروق معنوية بين الأنواع المدروسة من السيانوبكتريا وكذلك وجود فروق معنوية بين الفترات الزمنية .

وعند أجراء اختبار أقل فرق معنوي معدل R.L.S.D. عند مستوى الاحتمالية $P< 0.05$ تبين أن طحلب *A. variabilis* كان من أكثر الطحالب تركيزاً لهذه المركبات في نهاية التجربة حيث ركز الطحلب 88.5 ppm وفي المقابل كان هناك تناقص مطرد في التركيز في الوسط الزرعي ليصل الى أقل تركيز والذي بلغ 0.09 ppm ، (جدول -3-) ، (شكل -1-) .

أما طحلب *H. aureus* فقد جاء بالمرتبة الثانية في تأثيره على المركبات الهيدروكاربونية الأروماتية الكلية بعد طحلب *A. variabilis* حيث بلغ تركيز هذه المركبات في الطحلب في نهاية المدة 86.9 ppm في حين كان تركيز

المتبقي منها في الوسط الزرعي في نهاية التجربة ppm 0.06 (جدول -4-) ، (شكل -2-) .

أما فيما يخص طحلب *M. aeruginosa* فقد كان تركيز المركبات الهيدروكاربونية الأروماتية الكلية في الطحلب في اليوم الأخير هو 58.6 ppm في حين أن قيمة المتبقي من هذه المركبات في الوسط الزرعي لنفس الفترة هو ppm 3.6 ، (جدول -5-) ، (شكل -3-).

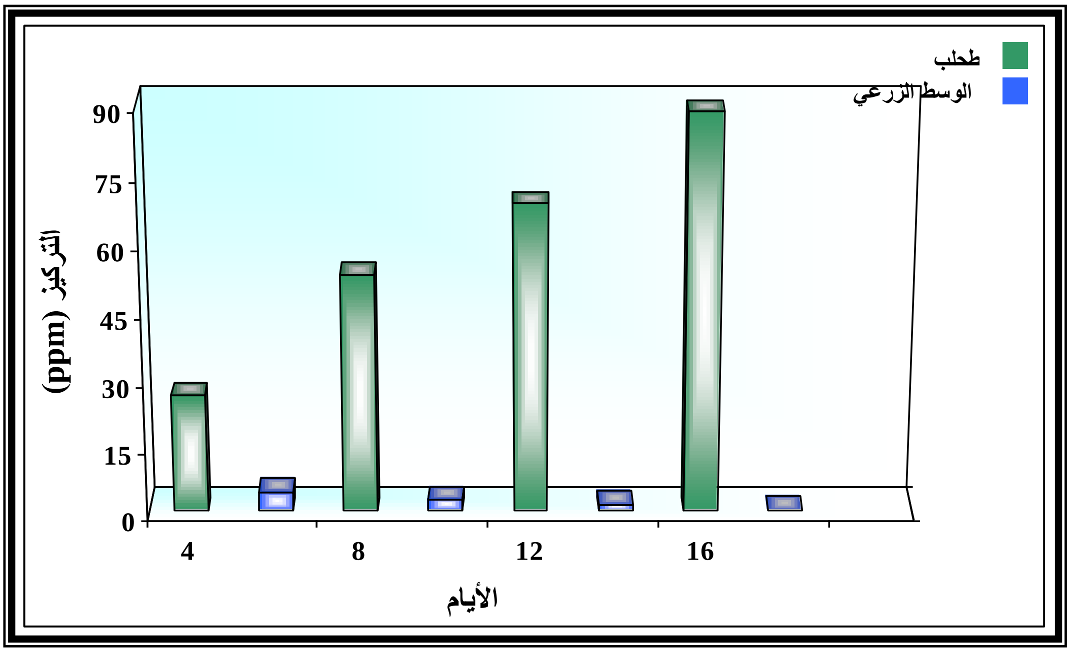
كما لوحظ أن لفترة التعرض أثر واضح على تركيز المركبات الهيدروكاربونية الأروماتية الكلية في الطحالب المدروسة إذ يزداد التركيز بزيادة فترة التعرض . ففي طحلب *A. variabilis* كانت التراكيز (88.5 ,26.2 ,53.2 ,68.9 ppm) للفترة (4, 8, 12, 16) يوم على التوالي ، (جدول - 3-) ، (شكل - 1-) وهكذا بالنسبة للأنواع الأخرى ففي طحلب *H. aureus* كانت التراكيز (15.7 ،27.8 ،53.7 ،86.9)ppm لنفس الفترة ، (جدول -4-) ، (شكل -2-). أما في طحلب *M. aeruginosa* كانت التركيز ولنفس الفترة (58.6 ,30.6 ,26.9 ,21.2 ppm) ، (جدول -5-) ، (شكل -3-) .

جدول (3): تراكيز المركبات الهيدروكاربونية الأروماتية الكلية في طحلب *A. variabilis* ووسطه الزرعي

اليوم	تركيزالهيدروكاربونات الأروماتية في طحلب (ppm)			تركيز الهيدروكاربونات الأروماتية في الوسط (ppm)		
	مدى التركيز	المعدل	الأنحراف المعياري	مدى التركيز	المعدل	الأنحراف المعياري
الرابع	26.3-26.0	26.2	0.153	4.7 - 4.0	4.3	0.379
الثامن	53.5-52.8	53.2	0.361	2.6 – 2.5	2.5	0.058
الثاني عشر	68.9-68.8	68.9	0.058	1.6 - 1.1	1.3	0.289
السادس عشر	89.0-87.9	88.5	0.569	0.10-0.09	0.09	0.006

(R.L.S.D.) =0.0336 للوقت والتركيز

(R.L.S.D.) =0.0425 للنوع والوقت والتركيز



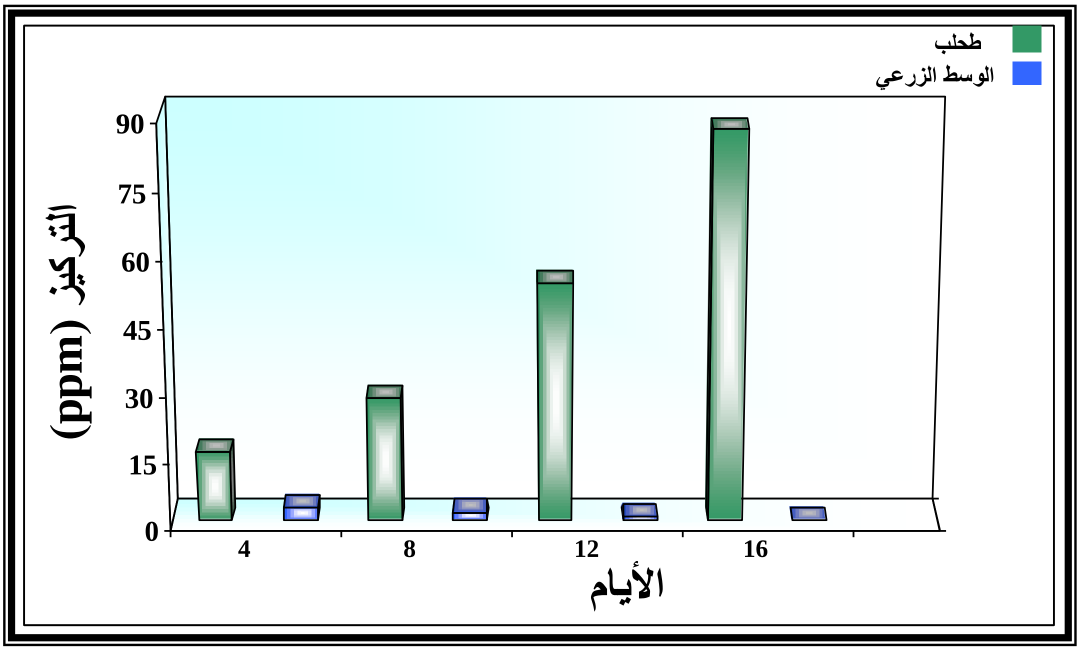
(شكل -1-) تراكيز المركبات الهيدروكاربونية الأروماتية الكلية في طحلب *A. variabilis* ووسطه الزرعي

جدول(4): تراكيز المركبات الهيدروكاربونية الأروماتية الكلية في طحلب *H. aureus* ووسطه الزرعي

اليوم	تركيز الهيدروكاربونات الأروماتية في طحلب (ppm)			تركيز الهيدروكاربونات الأروماتية في الوسط (ppm)		
	مدى التركيز	المعدل	الأنحراف المعياري	مدى التركيز	المعدل	الأنحراف المعياري
الرابع	16.1-15.3	15.7	0.400	3.1 – 2.7	2.9	0.208
الثامن	28.1-27.6	27.8	0.265	2.0 – 1.7	1.8	0.153
الثاني عشر	54.4-52.9	53.7	0.764	1.1 – 0.6	0.9	0.289
السادس عشر	87.5-86.5	86.9	0.529	0.06-0.05	0.06	0.006

للوقت والتركيز (R.L.S.D.) =0.0336

للنوع والوقت والتركيز (R.L.S.D.) =0.0425



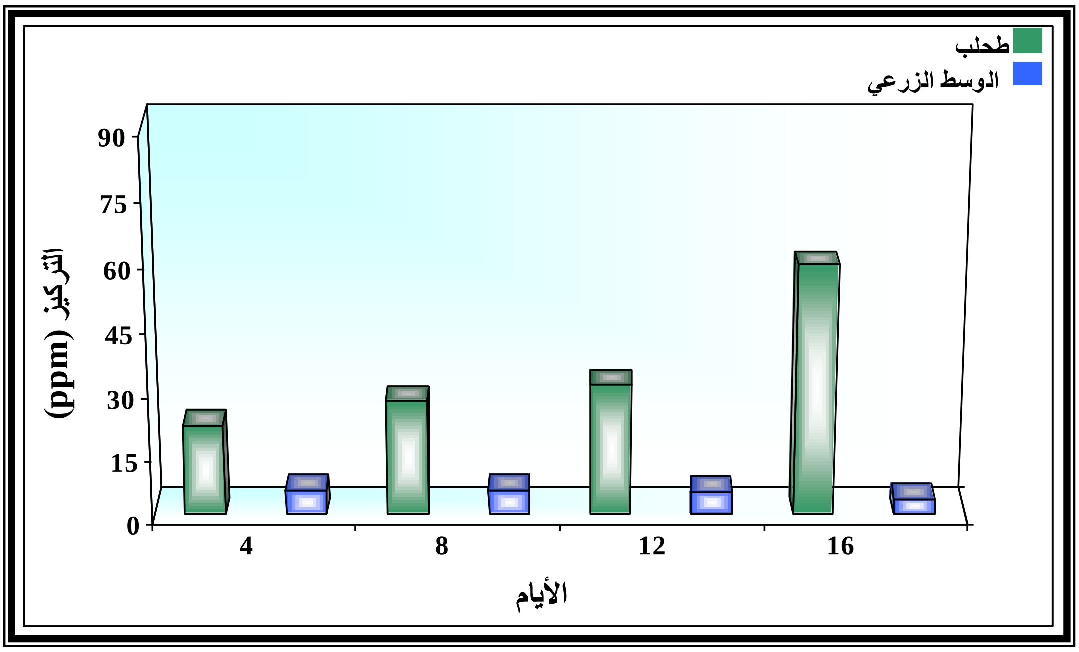
(شكل -2-) تراكيز المركبات الهيدروكاربونية الأروماتية الكلية في طحلب ***H .aureus*** ووسطه الزرعي

جدول (5): تراكيز المركبات الهيدروكاربونية الأروماتية الكلية في طحلب ***M. aeruginosa*** ووسطه الزرعي

اليوم	تركيز الهيدروكاربونات الأروماتية في طحلب (ppm)			تركيز الهيدروكاربونات الأروماتية في الوسط (ppm)		
	مدى التركيز	المعدل	الأنحراف المعياري	مدى التركيز	المعدل	الأنحراف المعياري
الرابع	22.3-20.5	21.2	0.964	5.9 – 5.7	5.8	0.100
الثامن	27.1-26.8	26.9	0.173	5.6 – 5.5	5.5	0.058
الثاني عشر	30.8-30.4	30.6	0.208	5.5 – 4.8	5.1	0.361
السادس عشر	58.9-58.4	58.6	0.289	3.6	3.6	0.000

للوقت والتركيز (R.L.S.D.) =0.0336

للنوع والوقت والتركيز (R.L.S.D.) =0.0425



(شكل -3-) تراكيز المركبات الهيدروكاربونية الأروماتية الكلية في طحلب *M.aeruginosa* ووسطه الزرعي

المناقشة

- **عزل الطحالب وتنقيتها**

أظهرت نتائج العزل والتنقية في الدراسة الحالية تواجد أجناس مختلفة من الطحالب في بيئتنا المحلية على مختلف أنواعها والتي منها *Hapalosiphon* , *Anabaena* , *Microcystis* التي تمتاز بانتشارها الواسع وسهولة جمعها من البيئة وعزلها وتنقيتها مختبرياً إضافة إلى نموها السريع وإمكانية السيطرة عليها ودراسة مدى قابليتها على تركيز الهيدروكاربونات والعناصر من البيئة المحيطة وبالتالي مساهمتها في تخليص البيئة من الملوثات

- **الهيدروكاربونات الأروماتية الكلية :**

أظهرت الدراسة الحالية إستمرار الطحالب المعزولة بالنمو والزيادة في العدد حتى بعد إضافة المركبات الهيدروكاربونية الأروماتية ويعزى ذلك إلى أن هذه الطحالب عزلت من مناطق قد تكون ملوثة لذا فأنها تكون متكيفة بشكل جيد للتلوث النفطي (Hickman and Novak ,1984; Abed *et al.* ,2002 ; Al – Thukair *et al.* ,2007) . حيث أن التعرض المستمر إلى مستويات عالية من النفط ينتج تجمعات من الأحياء المجهرية متكيفة للهيدروكاربونات النفطية Abed *et al.* ,(2002) .

كما أظهرت نتائج الدراسة قابلية الأنواع الطحلبية الثلاث المعزولة التأثير على الهيدروكاربونات الأروماتية الكلية حيث لوحظ مع تقدم وقت التجربة تحول طبقة طافي النفط على سطح الوسط الزرعي إلى قطرات صغيرة في الوسط الزرعي مسببة تعكراً واضحاً كما أن بعض أجزاء النفط التصقت بجدار الدورق العظماوي ، (1995) و الموسوي ،(1999). وأن هذه التغيرات الفيزيائية دليل مرئي وملموس لفعل الكائنات المجهرية ومنها السيانوبكتريا (Austin *et al.* ,1977 ; Higashihara *et al.* , 1978) ، حيث أن السيانوبكتريا تنتج سكريات متعددة خارجية والتي تعمل على الأستحلاب ألحيوي للنفط Bioemulsification (G.P.I. ,2003) وهذه هي الخطوة الأولى في عملية التراكم حيث أشار Cohen ,(2002) الى أن السكريات المتعددة السيانوبكتيرية تمثل دوراً أساسياً في أستحلاب النفط والتي تؤدي إلى تكسيره إلى قطرات صغيرة. كما أكد Britton,(1984) و Bruheim *et al.*,(1997) و فريد،(2001) بأن الأحياء المجهرية المكسرة للهيدروكاربونات النفطية قادرة على إفراز مواد كيميائية هي عبارة عن عوامل مستحلبة تعمل على تجزئة الطبقة السطحية للنفط مؤدية الى إستحلاب النفط في الماء منتجة العكورة . ومن ثم أختفاء هذه الطبقة ، حيث حصل تركيز لهذه المركبات داخل خلايا الطحالب الثلاث ألا أن

هناك تفاوت في مقدار ما يركزه كل طحلب إذ أظهرت النتائج أن طحلب *A. variabilis* كان أكثرها تركيزاً من النوعين الآخرين حيث بلغ مقدار ما ركزه الطحلب في نهاية فترة الحضن 88.5 ppm . يليه طحلب *H. aureus* ،حيث ركز من هذه المركبات مقدار 86.9 ppm ومن ثم طحلب *M. aeruginosa* الذي ركز 58.6 ppm. ويعزى ذلك إلى أن تركيز هذه المركبات يعتمد على نوع الطحلب وقابليته الحيوية في التراكم وهذا ما أشار إليه O'Brien and Dioxon,(1976) من خلال دراستهما حيث وجدا أن السيانوبكتريا تؤثر على النفط الخام ويعتمد تأثيرها على كمية النفط المتسربة والظروف البيئية ونوع الطحلب والمدة الزمنية بين الطحالب والنفط وعلى نوع النفط وعلى الجرعة الملوثة ووجود أو عدم وجود ملوثات أخرى في البيئة. كما لوحظ أن لفترة التعريض أثراً واضحاً على تركيز مركبات الهيدروكاربونات الأروماتية الكلية لكل طحلب من الطحالب المدروسة حيث يكون النقصان واضحاً بتراكيزها في الوسط الزرعي بأزدياد الفترة الزمنية والتي يقابلها زيادة تدريجية بهذه المركبات داخل الطحالب . وهذه النتيجة مشابهة لما توصل اليه العظماوي ،(1995) و الموسوي ، (1999) إذ لاحظا التناقص في تراكيز المركبات الهيدروكاربونية في الوسط بازدياد الفترة الزمنية كما أشاروا أيضاً إلى أن نمو السيانوبكتريا لم يتوقف في الدوارق المزروعة بعد مرور أسبوعين من بداية الحضن وإنما أزداد عددها .

كما لاحظ Cohen ,(2002) أن تجمعات الأحياء المجهرية لها القدرة على تقليل المركبات الهيدروكاربونية ومن المحتمل تحلل هذه الملوثات وهذه القدرة تقلل من ضرر هذه الملوثات بيئياً . كما أشارت الدراسات (Colwell and Walker , 1977 ; Coony ,1984 ;Floodgat , 1984) أن عدد الكائنات المجهرية التي لها القدرة على أيض المركبات الهيدروكاربونية تزداد عند التعرض المستمر للملوثات النفطية أو الملوثات البيئية الأخرى .

ونستنتج من دراستنا الحالية أن للطحالب المدروسة دوراً واضحاً في تراكمها للهيدروكاربونات الأروماتية الكلية وذلك من خلال تركيزها لهذه الملوثات داخل أجسامها وهذا ما أكده Al – Hasan *et al.* ,(2001) من خلال تحليله للهيدروكاربونات بواسطة جهاز كروموتوغرافي الغاز السائل Gas Liquid Chromatography (GLC) لأربعة عزلات طحلبية هي *Synechococcus* و*Synechocystis* و *Pleurocapsa* و *Dermocarpella* والذين لاحظوا أنها تراكم الهيدروكاربونات من الوسط السائل داخل أجسامها .وكشف المجهر الإلكتروني بأن العزلات تخزن الهيدروكاربونات في الفراغات الداخلية للثايلوكويد .

5-المصادر

العظماوي ،محمد عجة عودة (1995) .بعض الجوانب البيئية لأنواع من الطحالب الخضر المزرقة (السيانوبكتريا) المثبتة للنيتروجين المعزولة من جنوب العراق .رسالة ماجستير/ كلية التربية / جامعة البصرة،72 ص .

الموسوي ،سمية عبد الرزاق علي (1999) قابلية الطحالب الخضرالمزرقة (السيانوبكتريا) على تكسير بعض مركبات (النفط الخام)مع دراسة بعض التغييرات الحاصلة لها بتأثير (النفط الخام) .رسالة ماجستير/ كلية التربية / جامعة البصرة ،73 ص.

فريد ،وسن عبد الأمير علي (2001). دراسة التكسير الحيوي البكتيري للهايدروكاربونات النفطية في ترب محافظة البصرة .رسالة ماجستير/كلية التربية /جامعة البصرة ،82 ص .

Abed, RMM. ; Safi, NMD. ; Köster, J. ; Beer, D. ; El–Nahhal, Y. ; Rullkötter, J. and Garcia–Pichel, F. (2002). Microbial diversity of a heavily polluted microbial mat and its community changes following degradation of petroleum compounds. Appl. Environ. Microbiol ,68 : 1674 – 1683 .

Al –Hasan, R. H. ; Khanafer, M. ; Eliyas, M. and Radwan, S. S. (2001). Hydrocarbon accumulation by picocyanobacteria from the Arabian Gulf . J.of Appl. Microbiology , 91(3) : 533 –540 .

Al – Saad, H. T. ; Saeed, A. and Salman, N. A. (2003) Marine pollution , Hadida University Pub. Yamen, 260p.

Al – Thukair, A. A. (2002). Effect of oil pollution on euendolithic cyanobacteria of

crude oil and the effect of various surfactants. Can. J. Microbiol, 43(1) : 17 – 22.

Cerniglia, C. E. (1992) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons . Biodegradation, 3 : 351 – 368 .

Cerniglia, C.E. ; Baalen, C.V. and Gibson, D.T. (1980). Metabolism of naphthalene by the cyanobacterium *Oscillatoria sp.* Strain JCM. J. Gen Microbiol. 116 : 485 – 494 .

Cohen, Y. (2002). Bioremediation of oil by marine microbial mats . Int. Microbiol 5 : 189 – 193 .

Colwell, R. R. and Walker, J. D. (1977). Ecological aspects of microbial degradation of petroleum in the marine environment . Crit. Rev. Microb. , 5 : 423 – 445 .

Coony, J. J. (1984). The fate of petroleum pollutants in fresh water ecosystem. In: Petroleum microbiology , Ed. Atlas, R. M. MacMillan publishing Co. New York , 399 – 434 p.

David, A. R. ; Alistair, G. B. P. and Emma, L. J. (2006). Ecological consequences of copper contamination in macroalgae : effects onepifauna and associated herbivores .Environ. Toxicol. And Chemi , 25 (9):2470 – 2479 .

Desikachary, T. V. (1959). Cyanophyta Indian .Concil of Agricultural Research . New Delhi , India .

Floodgate, G. (1984). The fate of petroleum in marine ecosystem .In : Petroleum microbiology ,Ed. Atlas, R. M. MacMillan publishing Co. ,New York , 355 – 388 p.

the Arabian Gulf . Environ. Microb. ,4(2) : 125 – 129 .

Al – Thukair, A. A. ; Abed, R. M. M. and Mohamed, L. (2007). Microbial community of cyanobacteria mats in the intertidal zone of oil – polluted coast of Saudi Arabia , (Science Direct) Marine Pollution Bulletin ,54 : 173 – 179 .

Atlas, R. M. (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons :an environmental perspective . Microbiol Rev. ,45 : 180 – 209 .

Atlas,P. M. and Bartha, R. (1972). Biodegradation of petroleum in sea water at low temperatures .Can. J. Microbiol, 18 : 1851 – 1855 .

Austin, B. ; Colwell, R. R. and Calomisris, J. (1977). The application of numerical taxonomy to the study of petroleum degrading bacteria isolated from the aquatic environment , In : Development in industrial microbiology ,Appli. of the Society for industrial microbiology 685 – 695 p .

Barth Hans – Jörg (2003). The influence of cyanobacteria on oil polluted intertidal soil at the Saudi Arabian Gulf shores .Marine Pollution Bulletin , 46(10) : 1245 – 1252 .

Bourrely, P. (1980). Les algues deuu douce , initiation .Alga Systematic quc. Soc. Nouu. Edit. Bon. Bee. Paris , 517 p.(cited by Venkatarman and Becker ,1985).

Britton, L. N. (1984). Microbial degradation of aliphatic hydrocarbons . In :Microbial degration of organic compound . Ed. Gibson, D. T. , 89 – 129 p. Dekker INC , New York and Basel 129 .

Bruheim, P. ; Bredholt, H. and Eimhjellen, K. (1997). Bacterial degradation of emulsified

Petroleum pollutant degradation by surface water microorganisms .Scientific journals .com ,13 ESPR (5) 320 – 327 .

Nogales, B. ; Moore,E. R. B. ; Llobet – Brossa, E. ; Rossello – Mora, R. ; Amann, R. and Timmis, K. N. (2001). Combined use of 16S rRNA ribosomal DNA and 16S rRNA to study the bacterial community of polychlorinated biphenyl – polluted soil . Appl. Environ. Microbiol, 67 : 1874 – 1884 .

O'Brien, P. Y. and Dixon, P. S. (1976). The effects of oil and oil component on algae , Areview Br. Phycol. J. 11 : 115 – 142.

Pothuluri,J. V. ; Selby, A. ; Evans, F. E. ; Freeman, J. P. and Cerniglia, C. E. (1995). Transformation of chrysene and other polycyclic aromatic hydrocarbons mixture by the fungus *Cunninghamella elegans* . Can. J. Bot. , 73 : 1025 – 1033 .

Prescott, G. (1975). Algae of the Western great lake area . Ellion C. , Brown Co. pub. ,Dugugue, Lowa , USA .

Radwan, S. S. and Al – Hassan, R. H. (2000). Oil pollution and cyanobacteria. In :Whitton, B. A. and Potts, M. (Eds.), The ecology of cyanobacteria . Kluwer Academic Publisher ,Dordrecht ,The Netherlands .

Raeid, M. M. A. and Jürgen K. (2005). The direct role of aerobic heterotrophic bacteria associated with cyanobacteria in the degradation of oil compounds .Science Direct, 29 – 37 p.

Sorkhoh, N. ; Al – Hasan, R. and Radwan, S. (1992). Self cleaning of Gulf . Nature 359, 109 .

Sorkhoh, N. A. ; Al – Hasan, R. H. ; Khanafer, R. H. and Radwan,S. S. (1995).

Fogg, G. E. (1975). Algal culture and phytoplankton ecology . 2nd ed. Univ. Wisconsin press , Wisconsin , USA .

Goutex, M. and Saliot, A. (1980). Relationship between dissolved and particulate fatty acids and hydrocarbons chlorophyll a and zooplankton biomass in villefranche bay .Medterranean sea . Mar. Chem. 8: 299 – 318 .

G.P.I.,(General Project Information) (2003). Role of microbial mats in bioremediation of hydrocarbon polluted coastal zones

Harayama, S. ; Kasai, Y. and Hara, A. (2004). Microbial communities in oil – contaminated seawater . Science Direct , 15 : 205 – 214 .

Hickman, G. T. and Novak, J. T. (1984). Acclimation of activated sludge to pentachlorophenol .J. Wat. Pollut. Control Fed. 56: 364 – 369 .

Higashihara, T. ; Sato, A. and Simidu, U. (1978). An MPN method for enumeration of marine hydrocarbon degrading bacteria . Bull. Japan. Soc. Sci. Fish 44: 1127 – 1134 .

Hopner, T. ; Yousef, M. ; Berthe- Corti, L. ; Felzmann, H. Struck, H. and Al-Thukair, A. (1996) Cyanobacterial mats on oil-polluted sediments start of promising self-remedation process,ed , KRUPP, F. ; Abuzinada, A. H. and Nader, L. A. ,In :Amarine wildlife sanctuary for the Arabian Gulf- Environmental Research and conservation following the 1991 Gulf war oil spill NCWCD, Riyadh and Senckenberg Institure, Frankfurt a. m., 85 – 95 p.

Mališa P. A. ; Branimir J. ; Mila I. ; Miroslav M. V. and Jan Schwarzbauer (2006).

marine pollution studies.United Nation Environmental program.Wairobi,Kenya.

UNESCO (1976) guide to operational procedures for IGOSS pilot project on marine pollution (petroleum) monitoring,Intergovernmental oceanographic commission, Manuals and Guides No.7,pp 1-50.

Wedeman, V. E. ; Walne,P. R. and Tainor, F. R. (1984). Anew technique for obtaining axinic culture of algae . Can. J. Bot. , 42 : 985 – 995

Zobell. C. E. (1969). Microbial modification of crude oil in the sea . In : "Prevention and control of oil spills " American Petroleum Institute pub. 4040 : 317 – 326 .

Establishment of oil degrading bacteria associated with cyanobacteria in oil polluted soil . Journal of Applied Bacteriology 78 , 194 – 199 .

Spence, JM. ; Bottrell, SH. ; Thornton, SF. ; Richnow, HH. and Spence, KH. (2005). Hydrochemical and isotopic effects associated with petroleum fuel biodegradation pathways in a chalk aquifer .J. Contam. Hydrol. 79 :67 – 88 .

Stein, J. R. (1975). Handbook of phycological methods. Cambridge Univ. Press. ,Cambridge , U k.,445p.

UNEP (1993) Guidelines of monitoring chemical contamination in the sea using marine organisms . Refrence methods for

The ability of some species of cyanobacteria to accumulate the aromatic hydrocarbons

Ahmed M. Athbi ; Hamed T. AL-Ssad* and Mariam F. Bidhani*
Biology dept.– Education college - Basrah University
***Marine Science Center - Basrah University**

Abstract

The present study deals with the isolation and identification of three species of blue green algae (cyanobacteria) : *Microcystis aeruginosa* , *Hapalosiphon aureus* and *Anabaena variabilis* which were collected from different stations of Shatt AL-Arab river (Abu AL-Khasib). They are purified isolated in vitro to oftain unialgal and axenic culture to test the ability of three species to accumulate total aromatic hydrocarbons for two weeks .

The results demonstrated the ability of these three species to accumulate these compounds. The results indicate that *A. variabilis* accumulated more hydrocarbons than the other species 88.5 ppm in contrast to *H. aureus* 86.9 ppm and *M. aeruginosa* 58.6 ppm . There were significant differences $P<0.05$ between the species and the exposure period. The results showed that the concentration increased as the period increased

Key Words : Cyanobacteria , Pollution , Hydrocarbons .