الترقيم الدولي ٨٦٩٠ - ١٩٩١ ISSN 1991- 8690
Website: http://jsci.utq.edu.iq Email: utjsci@utq.edu.iq

دراسة تأثير العنصر النزر الرصاص في نمو نوعين من الطحالب *Microcystis sp.* & *Chroococcus sp.*

رؤى جعفر الخيرالله
قسم علوم الحياة- كلية العلوم- جامعه ذي قار

الخلاصه

تضمنت الدراسه الحاليه تأثير اضافة معدن الرصاص وهو احد المعادن الثقيله في نمو نوعين من الطحالب الخضر المزرقه cyanophayta وهما : Chroococcus sp. & Microcystis sp. بالاعتماد على طريقة العد المباشر direct counting باستخدام شريحه العد chamber slide .

تم اضافه المعدن بالتراكيز التاليه (0.5,1,2,4) % ملغم/لتر للوسط الزرعي وكان التركيز (4 %) ملغم/لتر الاكثر سميه لكلا الطحلبين اذ بلغت اقل قيمه لعدد المستعمرات في طحلب Microcystis sp. (66) مستعمره في المليلتر الواحد مقارنه بمعامله السيطره ، وفي طحلب Chroococcus sp. بلغ اقل عدد للخلايا (62) في نفس التركيز .ومن خلال قياس معدل التثبيط لكلا الطحلبين وجد ان طحلب Microcystis sp اكثر مقاومه لتراكيز الرصاص من الطحلب الاخر .لوحظ زيادة السميه بزيادة فترة التعريض فكان التركيز 4% سام لكلا الطحلبين .

الكلمات الافتتاحيه :الرصاص ، Chroococcus, Microcystis ،معدل نمو الطحالب ، معدل التثبيط.

Effects of Heavy Metal (Pb) on the Growth of Algae *Microcystis sp.* & *Chroococcus sp.*

Roaa Jafar El-Khairalla
Dept. of Biology. College of Sciences .Thi- Qar University

Abstract

The Study dealing with the influence of heavy metal(Pb) separately in the growth of the algae ***Microcystis & Chroococcus*** (cyanophyta)under lab. Conditions,the parameters were total cell count by slid chamber.The results indicates that the toxic effect of studied heavy metals depend upon metal construction,lowest total cell count . lead ions was added to the culture media as aconcetration (0.5, 1, 2,4)mg/l . the (4)mg/l concentration was more toxicity for both algae , the minimum chroococcus colonies count was (62) colony and (66) colony in microcystis at (4) mg/l concentration. By measuring inhibit rate for both algae,found , *Microcystis* was more resistant lead than other algae.Obsorved increase toxisity increased period was concentration of 4% toxcisity for both algae.
keyword: Pb , Microcystis sp. , Chroococcus sp. , Growth rate , Growth Inhibition .

١ – المقدمه

يعرف التلوث بانه التغير النوعي او الكمي في الصفات الكيميائيه او الفيزياويه او الحيويه للعناصر البيئيه (Alashour,2002) ، او التغيرات غير المرغوب فيها التي تحصل في البيئه بصوره كليه او بدرجه كبيره كناتج عرضي لفاعليه الإنسان من خلال التاثير المباشر او الغير مباشر للتغيرات في شكل الطاقه ومستوى الاشعاع والمكونات الكيمياويه والفيزياويه (Al-Khafaji,1996) .تعد مشكلة التلوث من المشاكل التي تواجه العالم وخاصة التلوث المائي الذي يعرف بانه التغير في ظروف مياه النهر بشكل مباشر او غير مباشر نتيجه لفعاليات الإنسان وبالتالي فانه يسبب تغيرات في الانظمه البيئيه ويشكل خطوره على صحة الإنسان (Beiny et al.,1976) . وقد صنف (Round & Chapman , 1996) الملوثات الى ثلاث مجموعات هي ملوثات كيميائيه مثل المعادن الثقيله والهيدروكاربونات النفطيه والملوثات الفيزياويه مثل الاشعه النوويه والملوثات الحيويه مثل البكتريا والفيروسات . تعد العناصر الثقيله من اخطر الملوثات المائيه .تتعرض الطحالب الى تاثيرات التلوث كما في الاحياء المائيه او يعد تاثير الملوثات ومنها المعادن الثقيله على الطحالب موضوعا مهما كونه يشكل بداية التاثير على اهم مكونات البيئه المائيه وهي سلسلة الغذاء (خصوصا اذا تعرضت هذه الطحالب الى خليط من المعادن).

يتمثل تاثر الطحالب بالمعادن الثقيله بعدة اشكال منها مظهريه او فسلجيه او في المحتوى الكيموحيوي . تمتلك الطحالب سلسله من اليات المقاومه لهذا التاثير ، وهناك العديد من الدراسات التي اهتمت بدراسة تواجد المعادن الثقيله في البيئه المائيه وتاثيرها على اعداد وتنوع الطحالب في تلك البيئه (Abaychi & A-Obaidy,1987; Kassim et al.,1997) . ان سمية المعادن الثقيله تكون اما سميه حاده Acute toxicity او سميه مزمنه Chronic toxicity ،يقصد بالسميه الحاده هي تلك السميه الناتجه عن تعريض الكائن الحي لجرعات كبيره من السموم لفتره زمنيه قصيره غالبا ماتكون مميته ، اما السميه المزمنه فهي ناتجه عن تعريض الكائن الحي لجرعات قليله من السموم لفترات زمنيه طويله وممكن ان تكون مميته او دون مميته (Crompton & Consultan,1998)،تدخل المعادن الثقيله جسم الطحلب بثلاث طرق :

١- البلع او الابتلاع Phagocytosis .

٢- الامتصاص Absorption عبر اغشية الخليه المعرضه للمياه المحيط بها .

٣- الادمصاص Adsorption حيث تتجمع المعادن الثقيله على سطح المناطق المعرضه

٢ – مواد العمل وطرائقه

٢-١ جمع العينات

جمعت العينات من المياه السطحيه لنهر الغراف في محافظه ذي قار من مناطق مختلفه بقناني بلاستيكيه نظيفه سعة ٥٠٠ سم^3 وجلبت الى المختبر ، اذ ثبت جزء العينه باستخدام الفورمالين بتركيز ٤% لغرض الفحص المجهري بينما ترك الجزء الاخر دون تثبيت لغرض الاستزراع .

٢-٢ الوسط الزرعي

استعمل الوسط الزرعي Chu-10 والمحور من قبل (Al-Arajy & Al-saadi,1998) لتنمية العزلات الطحلبيه (جدول ١) ، حضر الوسط الزرعي بشكل محاليل خزينه Stock Soluation وحفظت بالثلاجه بدرجة حراره (٤ م) بدون تعقيم لحين استخدامها ، حيث يتم خلط كميات محدده منها عند تحضير الوسط الزرعي ويكمل الحجم المطلوب ويعدل الرقم الهيدروجيني بين (٧ – ٧,٤) عند زراعة الطحالب باضافة قطرات من محلول هيدروكسيد الصوديوم ذو عياريه(N 0.2).عقمت الاوساط الزرعيه بعد ذلك باستخدام جهاز الموصده الكهربائيه Autoclave بدرجة حراره ١٢١ م وضغط (1.5 باوند/انج)ولمدة ٢٠ دقيقه .

جدول رقم (١) مكونات الوسط الزرعي Chu-10 المستخدم لتنمية الطحالب في الدراسه الحاليه

الاملاح	التركيز غم/١٠٠ مل ماء مقطر
$MgSo_4.7H_2o$	2.5
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	5.76
$NaHCO_3$	1.585
Na_2SIO_3	0.262
$FeCL_3$	0.146
$Na_2.EDTA$	O.318
$CaCL_2.2H_20$	3.583
K_2HPO_4	1
$MnCL_2.4H_2O$	0.0045
$MoNa_2O_4$	0.0007
$ZnSO_4.5H_2O$	0.0057
$CuSo_4.5H_2O$	0.002
H_3BO_3	0.072
PH	7.4

٢-٣- عزل وتنقية الطحالب

لغرض الحصول على مزرعه وحيدة الطحلب Unialgal Culture أستخدمت طريقة تخطيط اطباق الاكار وبعد اجراء سلسله من التخافيف للحصول على مزارع وحيده الطحلب.تم تنقية مزارع وحيدة الطحلب من الجراثيم طبقا الى (Droop,1967;Weidman et al.,1984) الموضحه تفاصيلها في (Anderson ,2005) .

٢-٤ تشخيص الطحالب

اعتمدت المصادر التاليه في تشخيص الانواع من الطحالب المستخدمه في الدراسه (Bourrelly,1980;Prescott,1975;Desikashary,1959): حيث تم عزل الطحلبين والمبين تصنيفهما ادناه :

Division : Cyanophyta (Blue green algae)

Class: Cyanophyceae

Order: Chroococcales

Family:Chroococcaceae

Genus:*Chroococcus sp.* and *Microcystis sp*.

٢-٥ تحضير محاليل المعادن الثقيله

حضرت المحاليل القياسيه بتراكيز (١٠٠٠ ملغم/لتر) لمعدن الرصاص وذلك باذابة املاح نقيه لخلات الرصاص Pb(Ch3coo)2 في الماء الخالي من الايونات وحضرت التراكيز باجراء التخفيف اللازم ، اذ تم تجهيز التراكيز (4-2-1-0.5) ملغم/لتر من الرصاص.

٢-٦ اضافة المعادن الثقيله

نعين العزلات باضافة (0.10) من المزرعه النقيه السائله كلقاح inoculums الى دوارق حجميه (250) مل حاويه على وسط زرعي مدعم بايونات العنصر الثقيل (4,2,1,0.5) ملغم/لتر من الرصاص وباستخدام ثلاث مكررات لكل تركيز ، حظنت بدرجة حراره (27±2) م مع فترة اضاءه (١٢ ساعه ضوء :٨ ساعه ظلام) مع رج الدوارق يوميا وكذلك تم زرع عينة بدون اضافة معدن الرصاص لها وذلك لاعتبارها عينة السيطره control .

٢-٧ قياس معدل النمو

استخدمت لحساب او لعد الطحالب بطريقة شريحة العد Counting Chamber واستخدمت في هذه الطريقه سلايد المسمى Petroff – hausser slide وهي عباره عن شريحه مقسمه الى مربعات كبيره وصغيره يتم حساب الخلايا الطحلبيه فيها بعد اخذ حجم معلوم من العينه ووضعها في السلايد .

٢-٨ قياس معدل التثبيط

تم حساب معدل التثبيط حسب المعادله التاليه:

$$GI = (C-T)/C$$

GI: معدل التثبيط

C : عدد الخلايا لكل واحد مل في مزارع المعامله

T : عدد الخلايا لكل واحد مل في مزارع السيطره (Nyholm,1985)

٣ – النتائج

اشارت نتائج تعريض طحلب Chroococcus sp. وطحلب Microcystis sp. الى تراكيز مختلفه من الرصاص (4,2,1,0.5) ملغم /لتر انخفاض في عدد الخلايا مع زياده التراكيز وبصوره تدريجيه خلال مده التعريض جدول رقم (٢) و(٣) .اظهرت نتائج التحليل الاحصائي وجود فروق معنويه ($p \leq 0.05$) بين المعاملات ووجود علاقه سالبه بين عدد الخلايا وزياده التراكيز وعلاقه موجبه بين معدل التثبيط والتراكيزلكلا الطحلبين جدول (٤) (٥).

نلاحظ من خلال الجداول (٥,٤) ان طحلب Microcystis sp. ابدى مقاومه للرصاص اكثر من طحلب Chroococcus sp. حيث عند حساب معدلات التثبيط وجد ان اعلى نسبه تثبيط في طحلب *Chroococcus* sp. عند تعريضه للتراكيز المختلفه من الرصاص كانت 77% عند التركيز (4) ملغم /لتر في اليوم التاسع من الزراعه واقل نسبه تثبيط كانت %(19) عند التركيز (0.5)ملغم/لتر في اليوم الثالث، اما طحلب *Microcystis* sp. فقد بلغ اعلى معدل للتثبيط %(69) عند التركيز (4) ملغم/لتر في اليوم التاسع ايضا واقل تثبيط %(4)عند التركيز (0.5) ملغم/لتر في نفس اليوم .

جدول رقم (٢) تاثير الرصاص في اعداد خلايا طحلب Chroococcus

	1 day	3 day	5 day	7 day	9 day	L.S.D.
control	165Ae	185Ad	311Ac	379Ab	401Aa	4.77
0.5	100Bd	149Bc	146Bc	190Ca	189Bb	11.97
1	99Bc	113Cb	97Dc	98Ed	130Da	3.66
2	95Bb	110Cb	87Dc	97Ec	96Ec	11.86
4	85Cb	62Dc	78Dd	96Ec	90Ec	14.13
L.S.D.	10.1	15.35	15.99	3.37	13.98	

- الحروف الكبيره المتشابهه في نفس العمود تعني عدم وجود فرق معنوي لمعدل نمو الطحلب عند مستو احتماليه < 0.05 .
- الحروف الكبيره المتشابهه في نفس الصف تعني عدم وجود فرق معنوي لمعدل نمو الطحلب عند مستو احتماليه < 0.05 .

جدول رقم (٣) تاثير الرصاص في اعداد خلايا طحلب Microcystis

	1 day	3 day	5 day	7 day	9 day	L.S.D.
control	198Aa	240Aa	188Aa	176Aa	175Aa	59.26
0.5	155Ab	143Bb	178Bc	161Bb	105Bd	13.74
1	152Ab	141Bc	170Cd	156Ce	88Ca	8.42
2	136Ab	104Cc	142Dd	111De	86Ca	7.67
4	105Ab	92Dc	102Ee	86Ed	53Da	9.47
L.S.D.	59.57	5.78	8.26	2.83	14.17	

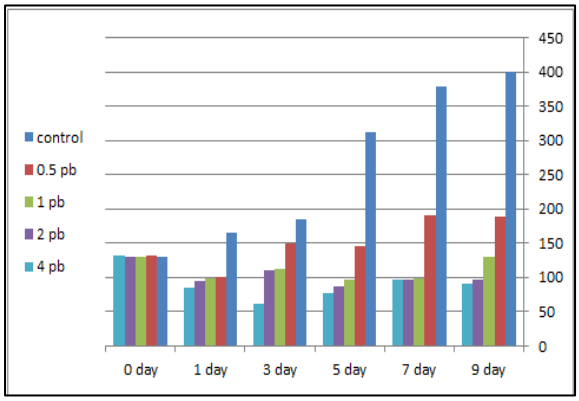
- الحروف الكبيره المتشابهه في نفس العمود تعني عدم وجود فرق معنوي لمعدل نمو الطحلب عند مستو احتماليه < 0.05 .
- الحروف الكبيره المتشابهه في نفس الصف تعني عدم وجود فرق معنوي لمعدل نمو الطحلب عند مستو احتماليه < 0.05 .

جدول رقم (٤) معدل التثبيط الحاصل لطحلب *Chroococcus sp.* المعرض لتراكيز مختلفه من الرصاص

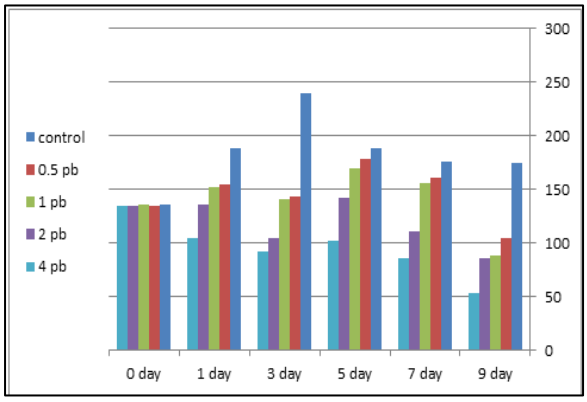
	0	1 day	3 day	5 day	7 day	9 day
control	0	0	0	0	0	0
0.5	0	39	19	53	49	52
1	0	40	38	68	74	67
2	0	42	40	72	74	76
4	0	48	66	74	74	77

جدول رقم (٥) معدل التثبيط لطحلب Microcystis sp. المعرض لتراكيز مختلفه من الرصاص

	0	1 day	3 day	5 day	7 day	9 day
control	0	0	0	0	0	0
0.5	0	21	40	15	8	4
1	0	23	41	9	11	49
2	0	31	56	24	36	50
4	0	52	61	45	51	69



شكل (١) تاثير اضافه معدن الرصاص في نمو طحلب Chroococcus



شكل (٢) تاثير اضافه معدن الرصاص في نمو طحلب Microcystis sp

٤- المناقشه

بينت نتائج العزل من بيئتنا المحليه انتشار انواع واجناس مختلفه وعديده من الطحالب اغلبها من الطحالب الخضر المزرقه والدايتومات ، ومن بين اكثر هذه الاجناس هو *طحلب Chroococcus sp.* وهو طحلب احادي الخليه يتجمع بشكل مستعمرات وتتميز الخلايا بشكلها الكروي وتكون محتويات الخليه متميزه الى منطقه داكنه ومنطقه فاتحه ومن اهم الانواع التابعه لهذا الجنس *C.minor* . اما الطحلب الاخضر المزرق *Microcystis* فهو ايضا يتواجد في بيئتنا الا انه يكون معدل نموه اطول من معدل نمو الكروكوكس ويتواجد بشكل مستعمرات ايضا ا لان مستعمرته تكون اما منتظمه او دائريه او متطاوله او غير منتظمه ويعتقد انه يسبب الموت للاسماك وذلك جعله من الطحالب السائده . ان الانتشار الواسع لهذين الجنسين في بيئتنا المحليه شجع على عزلهما وتنقيتهما ودراسة تاثير الرصاص الذي يعد من المعادن الاكثر سميه بين المعادن الثقيله على معدل نمو هذين الطحلبين .تدخل المعادن الثقيله الى جسم الطحلب من خلال جدار الخليه والغشاء الخلوي ومن ثم تستقر داخل خلايا الطحلب فاذا كان تركيزها اعلى من الحد الطبيعي الذي تتواجد فيه فانها تحدث تغيرات ضاره في الخليه (Robinson,1989) . ولوحظت تغيرات في النظام الفجوي والبلاستيدات والمايتوكوندريا عند تعريض الخلايا الطحلبيه للمعادن الثقيله مثل الرصاص (Sick-Goad&Lazinsky,1981) ، والكروم(Fasulo et al., 1983) ،والنحاس(Brinkhuis & Chung , 1986) ، والزرنيخ (Pellegrin et al., 1990).وفي دراسه اخرى (Albergani et al.,1980) وجماعته الذين وجدوا ان التراكيز 0.62-1.13 mg cd\L من الرصاص يسبب تثبيط لعملية النمو في طحلب *Euglena gracilis* تتفق هذه النتيجه مع الدراسه الحاليه حيث ان تثبيط نمو الطحلبين حصل ايضا عند اضافة تراكيز مختلفه من الرصاص وازداد تثبيط النمو بزيادة تركيز الرصاص وطول فترة التعريض وقد يعود هذا الى تاثير الرصاص على الطحلب في طور النمو الاسي والذي يسبب تناقص في انقسام الخلايا في هذا الطور وبالتالي على معدل نمو الطحلب بشكل عام(Kessler,1986) . ومن تاثيرات الرصاص الاخرى هو تثبيط لعملية التصنيع الحيوي للبورفيرين (Hamp & Lendzein,1974). فان العلاقه عكسيه بين تراكيز الرصاص ومعدل النمو (Bajgoza,2000) ، اذ لاحظ ان معدل النمو لانواع من الطحالب الخضر المزرقه والحمر قد ثبطت عند تعريضها

لتراكيز مساويه من الرصاص او اكبر من ١٠ ملغم / لتر وهذا يتفق مع دراستنا الحاليه. تختلف الطحالب فيما بينها من حيث اليه المقاومه للعناصر الثقيله حيث تقوم بانتاج معقدات عضويه تقلل من اخذ العناصر الثقيله مما يخفض سميه هذه المواد بواسطه الارتباط بها وضعف فعاليه الايون ومن بين هذه المركبات العضويه الرابطه هي السكريات المتعدده التي تؤدي عمل كبيرا في ربط العناصر الثقيله لوجود التداخل الذي يحصل بسبب شحنتها السالبه والمعدن ولوحظ بان قابليه الربط تعتمد على التركيب الكيميائي للسكريات المتعدده(Pistocchi et al.,1997)،وهذا يتفق مع اختلاف استجابه الطحلبين لتراكيز الرصاص المختلفه حيث ابدى طحلب Microcystis sp مقاومه للمعدن اكثر من الطحلب الاخر.وفي دراسه مشابهه اجريت على طحلب Scenedesmus له قابليه عاليه على تركيز الرصاص في خلاياه بزياده التراكيز وطول فتره التعريض وكذلك تزداد معدلات تثبيط نمو هذا النوع بزياده تراكيز العنصر وطول مده التعريض(Awasthi & Rai ,2007).

٥- المصادر References

-**Abaychi,J.K.andAl-Obaidy** ,S.Z.(1987).Concentration of trace elements in aquatic vascular plants from Shatt Al-Arab river.iraq.water.Res.19(4):457-462.

-**Al-Aarajy,M.J. and Al-Saadi,H.A**.(1998) : Effect of heavy metals on physiological and biochemical features of ***Anabaena cylindrica*** .DIRASAT,natural and engeineering science . 25(1) :160-166.

-**Alashour,A.SH.(**2002). Effect of heavy metals on physiological and biochemical feature of ***Nostoc linckia*** . Ms.c theses,Uni.of Basrah.

-**Albergani , V. ; Pissinni, E. and Coppellotti, O**. (1980). Response to heavy metals in organism, excretion and accumulation of physiological metals in ***Euglena gracilis*** . Conp. Bio. Chem. Physiol., 67: 121 – 127.

-**Al-Khafaji ,B.Y.(1996**).Trace metals in water ,sediment and fishes from shatt Al-Arab estuary north west Arabian Golf PH.D theseis , collage of education ,Basrah.Univ, pp.171.

-**Anderson,R.A.(**2005).Algal culturing techniques . Physiological society of America ,Elsevier Academic press ,pp.578.

-**Awasthi, M.and Rai,L.C**.(2007).Toxicity of Nickel,Zinc and Cadmium to nitrate uptake in free and immobilized cells of Scenedesmus quadricauda.Ecotox. Environ.268-272.

-Bajgoza,A.(2000).Blockadge of heavy metals accumulation in Chlorella vulgaris cell by 24-epibrassinolid- plant physiol.Bioch.(7): 797- 801.

-Bieny,C.D.,Calama,D.and Moriea,P.(1996) Review of heavy metals.Review of pollution in African Aquatic Enviroment ,25:17.

-Bourrrely,P.(1980).les Algues deuu douce , initition ala systematic , Soc. Nour. Edit. Boubee,Paris ,517 p. Cited by venkataraman and Beeker,1985.-

-Brinkhuis, B.H. and Chung I.K. (1986). The effects of copper on fine structure of the klep Laminaria saccharina.

-Cobbett,C.&Goldbrough,P.(2002).Phytochelatin and metallothinoneins : Roles in heavy metal detoxification and homeostasis, Annu,Rev.plant Biol.Volume:53,pp.159-182.

-Crompton,T.R. and Consultant,A.G.(1998).Toxicant in the aqueos ecosystem . -

-Desikashary.T. (1959). Cyanophyta . India council of agriculture Reaserch , New Delhi, 517 p.

-Droop,M.(1967).A producer for routin purification of algae culture with antibiotics .Br.Phycol.Bull.3:295-297.

-Fasulo, M.P.;Basst , M. and Donini ,A. (1983). Cytotoxic effect of hexavalent chromium in Euglena gracilis.

-Hamp,R. and Lendzein, K. (1974). Effect of lead on chlorophylle synthesis . Nature wisswnschaften., 61: 218-219.

-Kassim,T.L.;Al-Saad,H.A.;Al-Lami,A.and Al-Jabery ,H.H.(1997).Heavy metal in water , suspended particales sediments and aquatic plants of the upper region of Euphrates river .Iraq .J.Enviro.Sci.Health,A32(9&8),2497-2506.

-Kessler,E.(1986). Limits of growth of five Chlorella species in the presence of toxic heavy metals . Arch. Hydrobiol. Suppl. 73(1): 123-123.

-Nyholm,N.(1985).Response variable in algae growth inhibition test biomass or growth rate .Water research ,19(3):273-279.

-Pellegrin,L.;Delivpopulos, S. and Pellagrini, M. (1990). Arsenic induced ultrastructural changes in vegetative cells of Cytocera barbata form repens zinova et kalugina (Fucophyceas, Fucales). Biotonica mar. 33: 229 – 234.

-Pistocchi, R.; Guerrini, F.; Balboni,V. and Boni,L . (1997). Copper toxicity and carbohydrate production in the micro algae Cylidrothica

fusiformis and Gymnodinium SP. Eur. J. Phycol., 32:125-132.

-Prescott ,G.(1975).Algae of the western Greet take areas. Ellion C. Brown Co. Phd, Lowa. Pp.977.

-Robinson,N.J.(1989). Algal metallothioneins : ssecondary metabolites and proteins .J.app.phycol.1:5-18.

-Round,F.E.&Chapman D.I.(1983) Progress in phicological research .Elselver Science publisher (1983).

-Sicko – Goad, L. and Lazinsky , D. (1981). Accumulation and cellular effect of heavy metals in benthics and planktonic algae . Great lakes research ,Univ. of Michigan, 3: 289 – 290.

-Weidman .V.;Walne , P. and Tinor ,F.(1984).A new technique for abtaining axenic culture of algae .Can. J.Bot.42:958-959.