تأثير بعض المعادن الثقيلة في نمو طحلب *CHLORELLA VULGARIS BEYERINLI*

بتول زيتل علي ، عبد الامير تعوبي ** ، مكية مهلهل الحجاج***

*جامعة بغداد- كلية التربية ابن الهيثم – قسم علوم الحياة

** جامعة البصرة – كلية العلوم- قسم الكيمياء (1) وقسم علوم الحياة (2)

الاستلام: 2000/9/2 القبول: 2001/1/9

الخلاصة

تضمنت الدراسة ملاحظة تأثير اربعة من آيونات المعادن الثقيلة Cd^{+2}, Cu^{+2}, Pb^{+2} و Zn^{+2} عند اضافتها بصورة منفردة ومجتمعة في نمو طحلب *Chlorella vulgaris* اظهرت النتائج اختلاف سمية هذه المعادن حسب نوعها وتركيزها وفترة التعريض. وكانت سميتها بالتسلسل $Cd \cong Cu > Zn > Pb$. اظهرت نتائج خلط معدنين او اكثر في الغالب الى زيادة سميتها مقارنة باضافتها بصورة منفردة.

المقدمة

ان وجود بعض المعادن الثقيلة بتراكيز منخفضة في البيئة المائية مهم لنمو وتكاثر العديد من الاحياء المائية، وتؤدي زيادة تراكيز هذه المعادن مثل النحاس والزنك والكادميوم والرصاص الى ظهور تأثيرات سمية على بعض الفعاليات الايضية للاحياء المائية كافة ومنها الطحالب، فقد تؤثر على عملية تكوين كلوروفيل أ (1) ومعدل التنفس (2) وفعالية انزيم النايتروجينيز ومعدل اخفاق الاسيتيلين (3) وتفاعلات البناء الضوئي (4). تعتمد التاثيرات السمية للعناصر الثقيلة في الطحالب على العديد من العوامل، بعضها عوامل حيوية تتمثل بنوع وحجم وكثافة الطحلب (5، 6، 7) ، وعوامل غير حيوية تشمل نوع الوسط الزرعي وفترة التعريض والدالة الحامضية ودرجة الحرارة والملوحة ووفرة المواد العضوية (8،9،10). كذلك يعتمد التاثير السمي للمعادن الثقيلة على تركيز المعدن وتراكيز المعادن الاخرى الموجودة معه في وسط النمو. فقد تؤدي هذه المعادن الى زيادة التاثير السمي عن طريق عملية التأثير التعاوني Synergistic، وبالعكس فقد تؤدي هذه المعادن الى تقليل سمية بعضها للاخر عن طريق التأثير المتضاد Antagonism.

ونظرا لاهمية الطحالب كقاعدة للدورات الانتاجية في البيئة المائية لذا فهي مناسبة لدراسة التاثيرات السمية الناتجة عن التلوث بالمعادن الثقيلة. وقد تم في هذا البحث دراسة تأثير ايونات المعادن الثقيلة (Pb^{-2},Zn^{-2},Cd^{-2}, Cu^{-2}) عند اضافتها منفردة ومجتمعة في نمو الطحالب *Chlorella vulgaris*.

المواد وطرائق العمل

استخدم الطحلب *C. vulgaris* Beyerink 18.90 والذي تم عزله من شط العرب (11) . نمى الطحلب وحفظ على الوسط الزرعي (Chu10-D) بشكله السائل والصلب (12).

تأثير أيونات المعادن الثقيلة في نمو الطحلب

تم تحضير محاليل قياسية لايونات المعادن الثقيلة (Pb^{-2}, Zn^{-2}, Cd^{-2}, Cu^{-2},) من املاح النقية $CuSO_4$. 5 H_2O و $Cd(NO_3)_2$. $4H_2O$ و $ZnSO_4$. 7 H_2O و $Pb(No_3)_2$ على التوالي في الماء الخالي من الايونات، وحضرت التراكيز المطلوبة للنحاس والكادميوم (0.1، 0.25، 0.5، 1، 2) والزنك (0.5، 1، 2، 5) والرصاص (4، 8، 16، 20، 25، 30) ملغم/لتر، وذلك باجراء التخفيف اللازم. قم تنمية الطحلب باضافة 10سم^3 من مزرعة نقية سائلة تحوي على 4 ×10^6 خلية/ سم^3 الى دوارق قمعية الحجم 2 لتر حاوية على وسط زرعي سائل بحجم 1000 سم3 مدعم بايونات المعادن الثقيلة منفردة ومجتمعة بثلاث مكررات. حضنت الدوارق بدرجة حرارة 21 م؟ وبنظام اضاءة 16 : 8 ساعة ضوء: ظلام ورج يومي. تمت متابعة النمو لمدة 12 يوما. بعدها تم تقدير كمية الكلوروفيل –أ كمقياس للنمو للمعاملات المختلفة، قيس التغير في كمية الكلوروفيل كل يومين خلال فترة الحضن.

تقدير كلوروفيل – أ

تم ترشيح 50 سم^3 من مزرعة الطحالب السائلة باستخدام ورق ترشيح مصنوع من الالياف الزجاجية (GF/C) واضيف له 1 سم^3 من كاربونات المغنيسيوم المشبع اثناء عملية الترشيح، وحفظت الورقة بالتجميد (-10م؟) في قنينة زجاجية معتمة لحين العمل. طحنت الورقة باستخدام 8 سم^3 من الاسيتون بتركيز 90% باستخدام مطحنة خزفية Morter and Pestle ، وتركت بدرجة حرارة 4 م؟ لمدة 18 ساعة في الظلام، ثم فصل الراشح بعملية الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة/ دقيقة لمدة 15 دقيقة. اخذ الراشح واكمل حجمه الى 10 سم^3 باستخدام الاسيتون 90 % ثم قيست الكثافة الضوئية للعينة

عند طول موجي 665 و 750 نانوميتر باستخدام مقياس الطيف الضوئي Spectrophotometer نوع Uvikon 810 ثنائي الشعاع، واضيف قطرات من حامض الهيدروكلوريك المخفف (2 عياري) وتركت لمدة 10 دقائق ثم قيست الكثافة الضوئية بنفس الاطوال الموجية السابقة واستخدم الاسيتون كمحلول صوري Blank. وتم حساب كمية الكورفيل –أ في العينة اعتمادا على معادلة Lorenzen الموضحة في (13).

النتائج

اظهرت نتائج تعريض الطحالب *C.vulgaris* الى تراكيز مختلفة من ايونات النحاس (0.1، 0.25، 0.5، 1، 2 ملغم/لتر) عند اضافتها بصورة منفردة (شكل 1 –أ) وجود اختلافات معنوية ($P<0.01$) في نمو الطحلب باختلاف تراكيز النحاس واختلاف فترات التعريض، حيث ادت غالبية التراكيز الى حصول انخفاض تدريجي في النمو بزيادة تراكيز العنصر باستثناء التركيز 0.1 ملغم/لتر والذي ادى الى ظهور زيادة معنوية في نمو الطحلب مقارنة بالسيطرة. اما تعريض الطحلب لايون الكادميوم بالتراكيز 0.1، 0.25، 0.5، 1،2 ملغم/ لتر (شكل 1 – ب) ولايون الخارصين بالتراكيز 0.5، 1، 2، 5 ملغم/لتر (شكل 1– ج) ادت جميع تراكيز الايونين منفردة الى خفض كمية الكلوروفيل تدريجيا بزيادة التراكيز المضافة واختلاف فترات التعريض. على العكس من ذلك اظهرت التراكيز المختلفة لايون الرصاص 4، 8، 16، 20، 25، 30ملغم/لتر زيادة معنوية ($P<0.01$) في نمو الطحلب لجميع المعاملات مقارنة بمعاملة السيطرة.

اما المعاملة الطحلب بتراكيز مختلفة من ايونات المعادن الثقيلة بصورة مزدوجة ومجتمعة لمدة 7 ايام، اظهرت نتائج تعريض الطحلب لايونات النحاس والكادميوم (شكل 2–أ) حصول انخفاض معنوي ($P<0.01$) في اغلب المعاملات ولم تظهر المعاملتين 1Cd + 0.25 Cu و 0.5 Cd + 0.5 Cu ملغم/لتر اختلافا معنويا فيما بينها وانخفضت كمية الكلوروفيل انخفاضا كبيرا في المعاملة 1Cd + 0.5 Cu ملغم/ لتر مقارنة بالمعاملات الاخرى.

كذلك اظهرت التراكيز المختلفة لخليط ايونات النحاس والخارصين (شكل 2 –ب) انخفاضا معنويا ($P<0.01$) في كمية الكلوروفيل وازداد التأثير بزيادة التراكيز المضافة من هذين المعدنين.

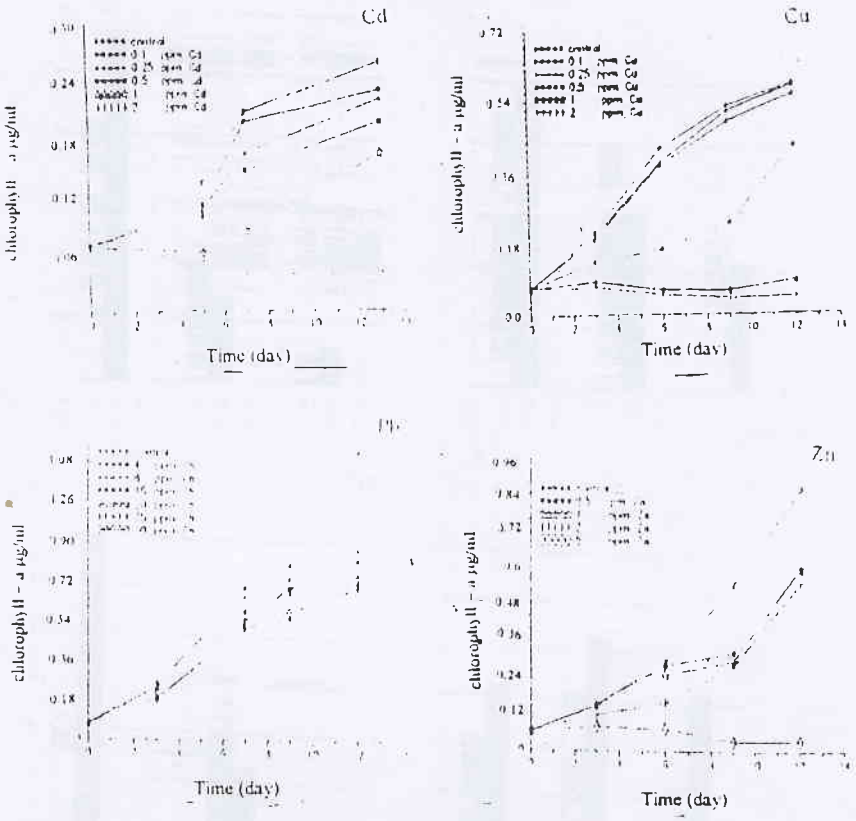
واختلف تأثير التراكيز المختلفة لخليط ايونات النحاس والرصاص على النمو حيث ارتفعت كمية الكلوروفيل في المعاملات 25 Pb + 0.25Cu و 30Pb + 0.25 Cu ملغم/لتر، بالمقابل انخفضت كمية الكلوروفيل في المعاملة 30Pb + 0.5 Cu ملغم/ لتر مقارنة بمعاملة السيطرة (شكل 2 –جـ).

اما تعريض الطحلب لخليط من ايونات المعادن الاربعة (شكل 2 –د) فأظهرت النتائج زيادة معنوية ($P<0.01$) في انخفاض النمو بزيادة التراكيز ولم تظهر المعاملتين 0.25 Cu + 25Pb + 5 Zn و 0.25 Cu + 25Pb + 5Zn + 0.5 Cd وكذلك المعاملتين 0.5Cd + 5 Zn + 0. 25 Cu + 0.0Cd و 5Zn اختلافا معنويا. وانخفض النمو بشكل كبير عند اضافة الخارصين مع المعادن الاخرى مقارنة باضافته بصورة منفردة.

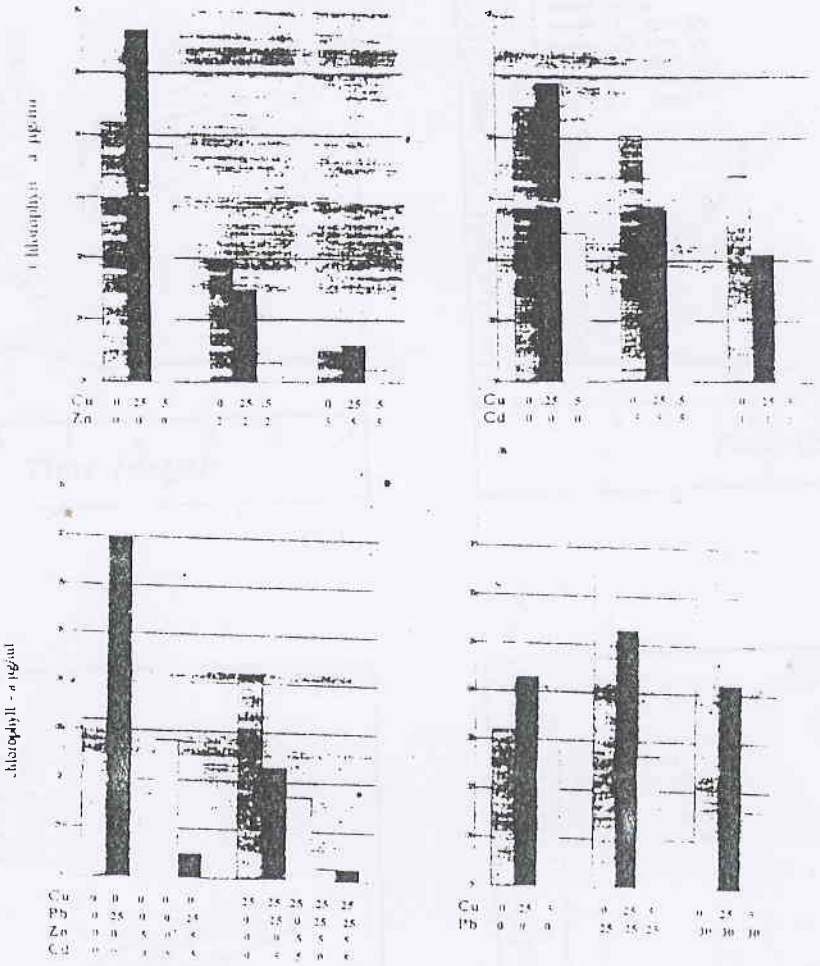
المناقشة

ان انخفاض نمو الطحلب (مقدرا بكمية الكلوروفيل) عند تعريضه لايونات النحاس منفردة باستثناء المعاملتين 0.1 و0.25 ملغم/لتر قد يعزى الى اهمية النحاس بتراكيز منخفضة ? 0.25 في نمو الطحلب، وتأثير زيادة تراكيزه سلبيا في بعض العمليات الايضية كالبناء الضوئي والتنفس والنمو ويتفق ذلك مع دراسات اخرى (1، 14). اما انخفاض نمو عند تعريضه لايونات الكادميوم فقد يعزى الى تنافس الكادميوم مع العناصر الضرورية للنمو على مواقع الارتباط بسطح الخلية او ارتباطه بمواقع غير مخصصة له داخل الخلية (15،16،17) حيث اشارت هذه الدراسات الى ان الكادميوم والخارصين متشابهان كيميائيا ويعمل احدهما على منافسة الاخر للارتباط بالمواقع الفعالة في الخلايا ومن الممكن ان يحل الكادميوم محل الخارصين في الانزيمات ومن ثم يثبط عملها مما يؤثر سلبيا على النمو. كما يعود سبب انخفاض كمية الكلوروفيل في جميع معاملات تعريض الطحلب للخارصين الى استخدام تراكيز اعلى مما يحتاجه الطحلب لنموه بشكل طبيعي وهذا يتفق مع ما اشار اليه (6) من ان الخارصين من المغذيات الصغرى وزيادة تركيزه يؤدي الى خفض النمو، ويأتي تأثير الخارصين المثبط للنمو نتيجة لارتباطه بمجموعة الفوسفات في الجسور الفوسفاتية في متعدد النيوكليوتيدات Polynucleotides او نتيجة ارتباطه بمجموعة (SH-) في الحامض الاميني السستين Cystine ومن ثم تثبيط عمل الانزيمات (7،18). وعلى الرغم من اشارة بعض الدراسات الى التاثير السمي لايونات الرصاص على الاحياء المائية (1، 19) غير ان اضافة ايونات الرصاص بتراكيز ? 30 ملغم/لتر لم تظهر وجود أي تأثير سمي على نمو الطحلب بل على العكس اظهرت زيادة في نموه هذه النتيجة تتفق مع ما اشار اليه (20، 21). وقد يعزى ذلك الى مقاومة خلايا هذا الطحلب لسمية الرصاص بادمصاص الجزء الاكبر منه على الجدار الخارجي ومنعه من النفوذ الى داخل الخلية (22). كذلك ترتبط ايونات الرصاص مع مواد اخرى داخل الخلية كمتعدد الفوسفات مما يجعلها غير فعالة (23). اما الزيادة في نمو الطحلب فقد تعزى الى استخدام الرصاص على هيئة نترات الرصاص $Pb(NO_3)_2$ ومن المعروف ان زيادة النترات في الوسط الزرعي تعمل على زيادة نمو النباتات النباتية (21).

اما اضافة العناصر بصورة مجتمعة فأظهرت جميع المعاملات التي تحتوي على ايونات النحاس والكادميوم، والنحاس والخارصين مجتمعة الى وجود تأثير تعاوني Synergistic effect في خفض نمو الطحلب وهذا يتفق مع (24). وتظهر حالة التأثير التعاوني عندما يقوم احد المعدنين بتحفيز خلايا الطحلب في اخذ ايونات المعدن الاخر ومن ثم زيادة التأثير. اما عدم وجود اختلافات معنوية في النمو عند المعاملتين 5Zn + 0.25 Cu و 5Zn قد يعزى الى وجود حالة التأثير المتضاد antagonistic effect عند استخدام النحاس والخارصين بهذين التركيزين. كذلك فأن زيادة النمو في بعض معاملات النحاس والرصاص تعزى الى حالة التأثير التعاوني بين هذين المعدنين. اما انخفاض النمو في المعاملات الاخرى لهذين المعدنين فقد يكون نتيجة لتراكم كمية كبيرة من النحاس والرصاص مما يوفر ايونات حرة من هذين المعدنين داخل الخلية وبالتالي التاثير السلبي على النمو. ان انخفاض النمو عند اضافة العناصر الاربعة مجتمعة مقارنة باضافتها بصورة منفردة يتفق مع (8) من ان سمية المعادن الثقيلة تكون اقل عندما تضاف منفردة مقارنة مع اضافتها بصورة مجتمعة.



الشكل ١: تأثير تراكيز مختلفة من أيونات العناصر الثقيلة بصورة منفردة في نمو الطحلب *C. vulgaris*



الشكل 2: تأثير تراكيز مختلفة من أيونات العناصر الثقيلة بصورة مجتمعة في نمو الطحلب *C vulgaris*

REFERENCES

1-Sunda, W.G. (1990). "Trace metal interactions with marine Phytoplankton" Biol. Oceano., 6: 411-442.

2-Hart, B.A. and Scaife, B. D. (1977). Toxicity and bioaccumulation of cadmium in *Chlorella pyrenoidosa*. Env. Res. 14: 401-413.

3-Whitton, b. A. (1980). Zinc and Plants in rivers and streams. In: Nriagu, J.O. (ed.) Zinc in the Environment Part 2: Wiley Interscience, 480 pp.

4-Twiss, M. R. and Nalewajko, C. (1992). Influence of Phosphorus nutrition on Copper toxicity to three strains of *Scenedesmus acutus* (Chlorophyceae). J. Phycol., 28: 291-298.

5-Wong, S. L. and beaver, J. L. (1980) Algae bioassays to determine toxicity of metal mixtures. Hydrobiol. 74: 199-208.

6- Kessler, E. (1986). Limits of growth of five *Chlorella* species in the Presence of toxic heavy metals. Arch. Hydrobiol. Suppl., 73 (1): 123-128.

7-Munda, I.M. and Hudnik, v. (1986). Growth response of *Fucus vesiculosus* to heavy metals, singly and in dual combinations, as related to accumulation. Botan. Mar. XXIX: 401-412.

8-Wong, P. T.S., Chau, Y.K. and Luxon, P.L. (1978). Toxicity of amixture of metals on fresh water algae.

9-Stantana-casiano, J.M., Gonzale Z-Davila, Perez-Pena, J. and Millero, F.J. (1995). Pb super (2+) interaction with the marine phytoplankton *Dunaliella tertiolecta*. Mar. Chem., 48 (2): 115-129.

10-Twiss, M.R., Parent, L. and Campbell, P.G.C. (1993). Interaction a mong algae, aluminum and fulvic acid an exception to the Free ion model of metal toxicity. In Allan, R.J. and Nriagu, J.O. (eds). "Interactions conference on heavy metals in the Environment Toronto", CEP consultants LTD. Edinburgh. 2:41-44.

11-Al-Hejuje, M. M. (1997). Distribution of heavy elements in water and sediments from Al-Ashar and Al-Khandak canals connected with shatt-Al-Arab River and their effects on algae. MSC. Thesis, Basrah Univ., 104pp.

12-Al-delaimy, a.M. (1990). Ecophsiological studies on algae isolated from rice fields in Iraq. MSC. Thesis Basrah Univ. 119pp.

13-Vollenweider, R. A. (1974). Amanual on methods for measuring primary production in aquatic enviroment. 2nd ed. IBP hand book No. 12, Blackwell, oxford 225 pp.

14-Knauer, K., Behra, R., Sigg, L. and Xue, H.B. (1994). Trace metals (Cu, Zn) speciation and interactions with fresh-water phytoplanklon. Third European conference on Ecotoxicology. Aug. 28-31. Zurich.

15-Patterson, G. (1983). Effects of heavy metals on freshwater chlorophyta. Ph. D. thesis, Durham Univ. 212pp.

16-Vymazal, J. (1987) Toxicity and accumulation of cadmium with respect to algae and Cyanobacteria. Areview. Toxi Assess. Inter. Quart. 2:287-415.

17-Jernelov, A and Martin, A. (1975). Ecological implications of metal metabolism by microorganisms. In Metal metabolism by microorganisms. :61-77pp.

18-Al-Khfaji, B. Y. (1996). Trace metals in water, Sediments and fishes from shatt Al-Arab estuary North west arabian Gulf. Ph. D. Thesis Basrah Univ. 131pp.

19-Round, F. E. (1985). The ecologu of algae Cambridge Univ. Press. 653pp.

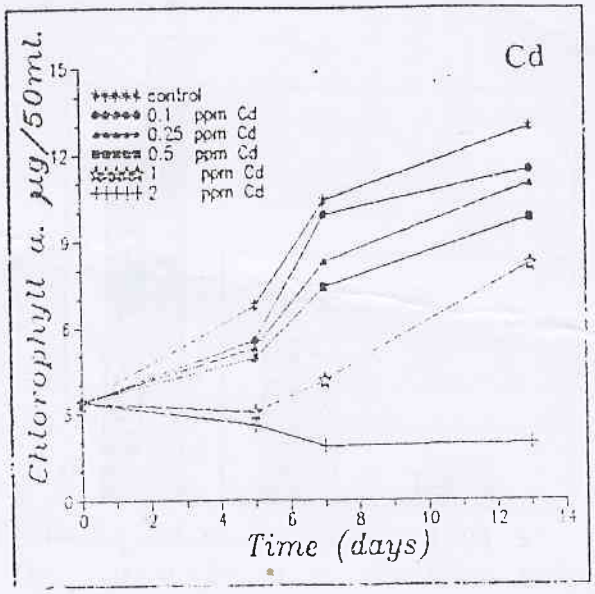
20-Al-Aaragy, M. J. (1996). Studies on the mass culture of fresh water microalgae as live food for fish larvae. PH.D. Thesis Basrah Univ. 107pp.

21-العظماوي، محمد عجه عودة (1995). بعض الجوانب البيئية لانواع من الطحالب الخضر المزرقة (السيانوبكتريا) المثبته للنتروجين المعزولة من جنوب العراق. رسالة ماجستير. كلية التربية – جامعة البصرة: ص 72.

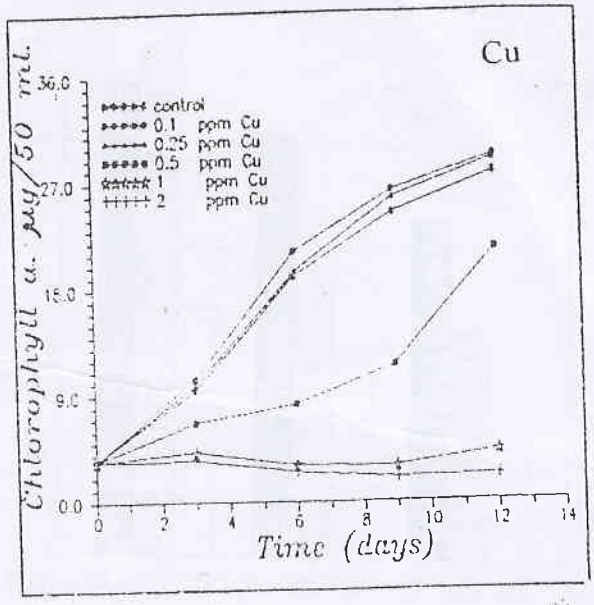
22-Vymazal, J. (1990). Toxicity and accumulation of lead with respect to algae and Cyanobacteria: Areview "Acta Hydrochem. Hydrobiol. 18 (5): 513-535.

23- الاعرجي، موسى جاسم (1998)، دراسة بيئية عن الهائمات النباتية والمغذيات في هور الحمار، العراق، رسالة ماجستير، جامعة البصرة، ص 113.

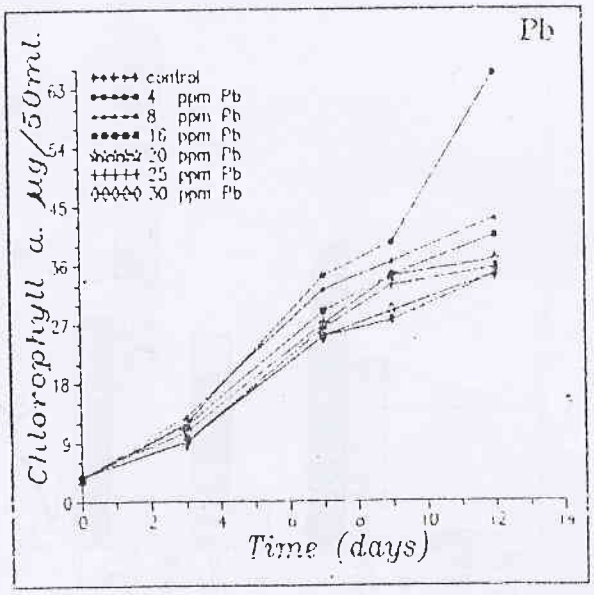
24-Aoyama, I.; Okamura, H. and Yagi, M. (1987): the interaction effects of toxic chemical combinations on *Chlorella ellipsoidea*. Toxicity Asse. Inter. Quart., 2:341-355.



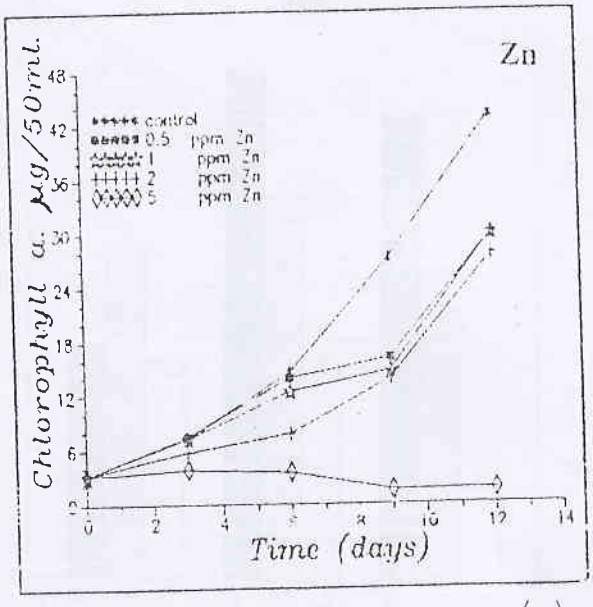
(ب)



(أ)

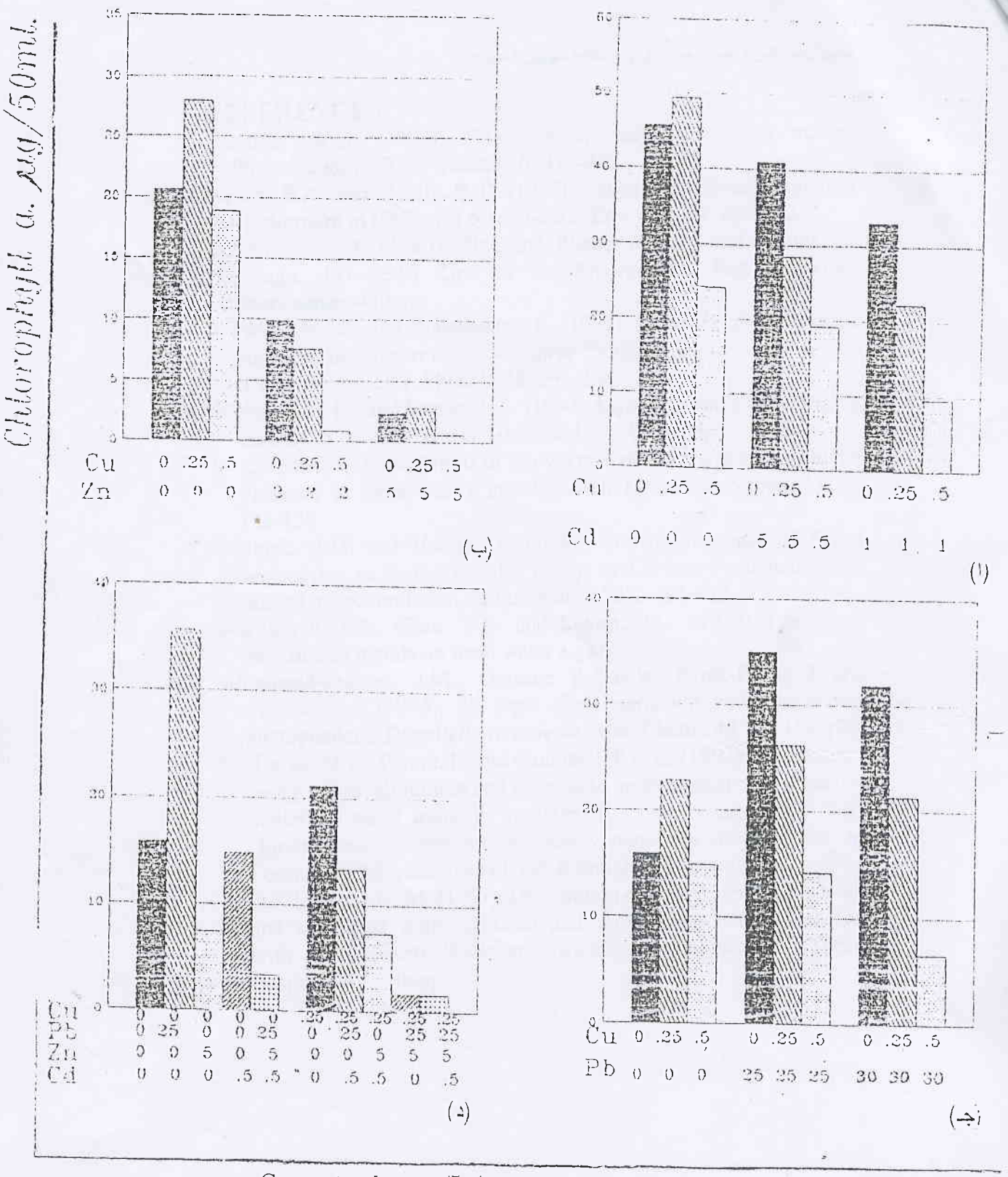


(د)



(جـ)

الشكل 1 : تأثير تراكيز مختلفة (ملغم/لتر) من أيونات العناصر الثقيلة (بصورة منفردة) في نمو الطحلب C. vulgaris.



الشكل 2 : تأثير تراكيز مختلفة (ملغم/لتر) من أيونات العناصر الثقيلة (بصورة مجتمعة) في نمو الطحلب C. vulgaris.