مجلة جامعة الملك عبدالعزيز: العلوم، م٢٣ ع١، ص ص: ١٦٧-١٧٩ (٢٠١١م/١٤٣٢هـ)
DOI: 10.4197 / Sci. 23-1.12

دراسات فسيولوجية وكيموحيوية على استجابة السلالة المقاومة والبرية لطحلب كلوريلا فولجارس تحت تأثير الإجهاد بالنحاس

عبد الله الزهرانى، وعادل أحمد فتحي، ومجدي محفوظ يوسف[١]

قسم علوم الحياة وقسم الكيمياء، كلية العلوم، جامعة الملك فيصل. الإحساء، المملكة العربية السعودية.

المستخلص: تم خلال هذا البحث دراسة مقاومة طحلب الكلوريللا فولجارس (المعزول من بحيرة الأصفر، الإحساء، المملكة العربية السعودية) لعنصر النحاس وذلك بمقارنة بعض الخواص الفسيولوجية لسلالتين من طحلب الكلوريللا فولجارس، إحداها برية، والأخرى مقاومة فسيولوجيا. وقد أوضحت النتائج أن كلا من: معدل النمو، والوزن الجاف، ومحتوى كلوروفيل، والبروتين، والسكريات، والأحماض الأمينية كان مرتبطًا ارتباطًا وثيقًا بتركيز عنصر النحاس، حيث كانت معدلات النقص في السلالة البرية أعلى منها في السلالة المقاومة. وقد أظهرت النتائج أيضا أن هناك علاقة طردية بين إنتاج، وتراكم حمض البرولين، وزيادة سمية النحاس، حيث كانت هذه العلاقة واضحة في السلالة المقاومة فسيولوجيًا. ومن ناحية أخرى، فقد أظهرت النتائج أن الامتصاص الحيوي لعنصر النحاس بواسطة خلايا الطحلب تأثر بتركيزات النحاس التي قد تعرض لها الطحلب خلال فترة نموه حيث أدت التركيزات المنخفضة في بيئة النمو إلى زيادة قابلية الطحلب لامتصاص العنصر، ومن ثم سعة مراكمته.

المقدمة

تعرف العناصر الثقيلة بأنها تلك العناصر التي تزيد كثافتها على خمسة أضعاف كثافة الماء ٥ مجم/ سم^{٣}. وتوجد العناصر الثقيلة بكثرة في الطبيعة حيث تنطلق من خلال الدورات الجيوكيميائية إلي البيئة، وتمثل التركيزات المرتفعة من العناصر الثقيلة في البيئة المائية خطورة كبيرة على جميع الكائنات الحية. فبالرغم من أن الكثير من العناصر الثقيلة ضرورية للعديد من العمليات الأيضية لمعظم الكائنات الحية إلا أنها تكون سامة إذا زاد تركيزها عن حد معين.

يعتبر عنصر النحاس أحد العناصر الثقيلة ومن أكثرها سمية، إلا أنه من العناصر الغذائية الأساسية للنباتات، حيث يقوم بدور مهم في نقل الإلكترونات في تفاعلات الضوء أثناء عملية البناء الضوئي، كما أنه يلعب دورا هاما كعامل مساعد للعديد من إنزيمات الأكسدة والاختزال مثل إنزيم السوبر أكسيد ديسميوتيز. وبالرغم من الدور الحيوي الذي يقوم به عنصر النحاس كعنصر غذائي، إلا أنه يكون ساما عند التركيزات المرتفعة مثل بقية العناصر الثقيلة حيث أنه عند التركيزات المرتفعة يقوم بتثبيط نقل الإلكترونات[١]، تثبيط تخليق الأصباغ الضوئية[٢-٥]، كما أنه يقوم بخفض تركيزات البوتاسيوم والصوديوم البين خلوية[٦]. من ناحية أخرى فإن نقص النحاس يمكن أن يعوض جزئيًا على سبيل المثال عن طريق الاستعاضة عن الفيكوسيانين بسيتوكروم ج[٧].

تتأقلم الكائنات الحية بما فيها الطحالب على مقاومة سمية العناصر الثقيلة ويتم ذلك إما عن طريق نموها طبيعيا في بيئات ملوثة بالعناصر الثقيلة أو من خلال تعاقب زراعتها معمليا تحت تركيزات عالية من تلك العناصر[٨]، كما يوجد العديد من الأمثلة لحالات المقاومة المكتسبة لعنصر النحاس في الطحالب وخاصة التي تنمو في بيئات المياه الملوثة[٣،٤،٩-١٢].

في هذا البحث تم دراسة التأقلم الفسيولوجي للطحلب الأخضر كلوريللا فولجارس لعنصر النحاس، وذلك بمقارنة الصفات الكيموحيوية لسلالة برية مع سلالة أخرى متأقلمة فسيولوجيا لعنصر النحاس، مع الإشارة لميكانيكية امتصاص وتراكم هذا العنصر في كل منهما.

المواد وطرق العمل

تم عزل الطحلب الأخضر كلوريللا فولجارس من بحيرة الأصفر بمنطقة الإحساء التابعة للمنطقة الشرقية من المملكة العربية السعودية. وقد تم تنمية الطحلب المعزول معمليا في بيئة كول المحضرة و المعدلة[١٣] حيث تم إقصاء جميع المكونات التي يمكن أن تتداخل مع عنصر النحاس سواء بالترسيب أو بتكوين مركبات معقدة كيميائيًا ومنها سترات الحديد، حامض الستريك، والفيرسين. كما تم تقليص مستوى تركيز العناصر النادرة في البيئة إلى ٥٪ من نسبة التركيز الأصلي لهذه العناصر في البيئة المستخدمة، كما تم تحديد مستوى تركيز عنصر النحاس في البيئة إلى ٠,٥ ميكروجرام/لتر مماثلة لنفس التركيز في البيئة التي كان يعيش فيها الطحلب. ومن أجل حفز الحالة الطبيعية لعنصر الفسفور اللازم لنمو الطحلب فقد تم إضافة عنصر الفسفور (١٠ ميكروجرام/ لتر) إلى بيئة النمو كل ٢٤ ساعة، مع إزالة ٥٠٪ من البيئة الأساسية وتجديدها ببيئة جديدة. كما تم تحضين المزارع الطحلبية عند درجة حرارة ٢٧ ± ١,٠ درجة مئوية، وإضاءة مستمرة ($70\mu\ mol\ m^{-2}s^{-1}$)، وقد تم تحديد سبعة أيام كأفضل فترة لنمو الطحلب (نتائج غير مدرجة). وجميع التجارب قد تمت تحت ظروف معقمة. أما بالنسبة لعميلة التأقلم الفسيولوجي لطحلب الكلوريللا على التركيزات العالية من عنصر النحاس فقد تم تعاقب زراعة الطحلب المعزول سابقا على بيئة كول الصلبة والتي تحتوى على جرعات مختلفة من النحاس تتراوح بين ٠,٠٦ إلى ٠,٦ مليجرام/

لتر[١٤]. وقد تم رفع المستعمرات المعزولة والتي تحملت أقصى تركيز من عنصر النحاس ومن ثم تنميتها في بيئة سائلة مع زيادة تركيز النحاس تدرجيا حتى الوصول إلى تركيز ٠,٥ مليجرام/ لتر.

وقد تم تحديد عدد الخلايا الطحلبية بواسطة خلية الهيماسيتومتر، كما قدرت كمية الأصباغ التمثيلية في الأسيتون على حسب طريقة ميزنر وآخرون Metzner *et al.*[١٥]. وتم تقدير السكريات الكلية بطريقة الأنثرون[١٦] باستخدام محلول الجلوكوز كمادة قياسية. أما محتوى الأحماض الأمينية الكلي، فقد تم تقديره وفقا لطريقة شتاين ومور Moore و Stein[١٧]. كما تم أيضا تقدير البروتين الكلى وفقا لطريقة لوري وآخرون Lowry *et al.*[١٨]. وقدر محتوى البرولين في المستخلص المائي للخلايا باستخدام طريقة النهيدرين[١٩]. كما تم تقدير محتوى الخلايا لكل من الصوديوم والبوتاسيوم وفقا لطريقة راى وآخرون Rai *et al.*[٨].

كما تم تقدير كمية النحاس الممتصة من قبل الخلايا الطحلبية بعد هضم الخلايا الطحلبية الجافة والمغسولة لمدة ١٥ دقيقة في خليط من حمض النيتريك وحمض الهيدروكلوريك بنسبة ١:١[٩]، ثم قياسها باستخدام جهاز قياس مطياف الامتصاص الذرى (Perkin- Elmer Atomic Absorption Spectrophotometer with graphite furnace (Model 4000, Norwalk, USA)). وبالنسبة للتحاليل الإحصائية فالقيم المحسوبة هي متوسط ثلاث قراءات، حيث كان الانحراف المعياري أقل من ٥٪ من متوسط القيم المحسوبة.

النتائج والمناقشة

تعتبر الطحالب من المؤشرات الحيوية الحساسة للتغير البيئي، وكأساس لمعظم النظم البيئية للمياه العذبة والبحرية، وتستخدم على نطاق واسع في تقييم

المخاطر، وتطوير الأنظمة البيئية للمعادن الثقيلة[٢٠-٢١]. ومن المعلوم أيضا أن خلايا الطحالب التى تتعرض للمعادن الثقيلة قد تعاني من العديد من التغيرات المورفولوجية والكيموحيوية الخطيرة[٢٢].

يوضح جدول (١) قياسات النمو في كل من السلالة المقاومة لعنصر النحاس والسلالة البرية من الطحلب الأخضر كلوريللا فولجارس. وقد أظهرت النتائج أن جميع قياسات النمو في هذه الدراسة (معدل النمو، الوزن الجاف، كلوروفيل أ) كانت مرتفعة في حالة السلالة المقاومة مقارنة بالسلالة البرية. وقد كان الفرق واضحًا في حالة الوزن الجاف، حيث بلغ الفرق حوالي ١٠,٨٩ جم / لتر مقارنة ببقية قياسات النمو التي تراوحت بين ٠,١٣ في حالة معدل النمو و ١,١٧ في حالة محتوى الخلايا من كلوروفيل – أ. وقد توافقت هذه النتائج مع العديد من الدراسات السابقة[٢-٤، ٥-٨] وهذا يمكن إرجاعه إلى أهمية هذا العنصر في العديد من عمليات الأيض التي تتم داخل الخلايا الطحلبية [٢٣-٢٤].

جدول (١). معدل النمو، والوزن الجاف، وكلوروفيل – أ، لكل من السلالة البرية والمقاومة من طحالب الكللوريلا لعنصر النحاس.

القياسات	السلالة البرية	السلالة المقاومة
معدل النمو (انقسام/ يوم)	٠,٦٢ ± ٠,٠٢	٠,٧٥ ± ٠,٠٥
الوزن الجاف (جم / لتر)	٤٤,٧٢ ± ٠,٠٥	٥٥,٦١ ± ٠,٠٠
كلوروفيل – أ (ميكروجرام / مجم وزن جاف)	٣,٣٤ ± ٠,٠٢	٤,٥١ ± ٠,٠٤

من جهة أخرى تم في هذا البحث قياس بعض الصفات الكيموحيوية لكل من السلالتين محل الدراسة. وقد أظهرت النتائج (جدول ٢) أن محتوى الخلايا الكلى من الأحماض الأمينية والسكريات كان عاليا في حالة السلالة المقاومة، حيث وصل إلى حوالي ٤٧,٥٠٪ (الوزن الجاف) و ٩١,٩٥٪ (الوزن الجاف)، على التوالي، بينما كان المعدل منخفضًا إلى حد ما بين محتوى السلالتين من

البروتينات الكلية (٠,٦٥٪ الوزن الجاف). أما في حالة محتوى الخلايا من البرولين فقد أوضحت النتائج أن محتوى خلايا السلالة المقاومة من طحلب الكلوريللا من البرولين قد بلغ حوالي ثلاثة أضعاف محتوى الخلايا الطحلبية في السلالة البرية (جدول٢). وقد أظهرت النتائج عدم وجود فروق تذكر بين محتوى الخلايا من عنصري البوتاسيوم والصوديوم في كلا السلالتين.

جدول (٢). يوضح بعض الصفات الكيموحيوية لكل من السلالة البرية والمقاومة من طحالب الكللوريلا لعنصر النحاس.

القياسات	السلالة البرية	السلالة المقاومة
محتوى الأحماض الأمينية الكلي (٪ الوزن الجاف)	٣٥,٠٠ ± ٠,٠٥	٤٧,٥٠ ± ٠,١٥
محتوى البروتينات الكلي (٪ الوزن الجاف)	٣٠,٤٦ ± ٠,٠٢	٣١,١١ ± ٠,٠٥
محتوى السكريات الكلي (٪ الوزن الجاف)	٩٠,٤٢ ± ٠,٠٥	٩١,٩٥ ± ٠,٠٢
محتوى البرولين (x ١٠$^{-٨}$ نانوجرام / خلية)	٧,٢١ ± ٠,٠٢	٢٥,٣٢ ± ٠,٢٢
محتوى عنصر البوتاسيوم (جم / جم بروتين)	٠,٣٦ ± ٠,٠٠	٠,٣٧ ± ٠,٠٠
محتوى عنصر الصوديوم (جم / جم بروتين)	٠,٢٨ ± ٠,٠٠	٠,٢٨ ± ٠,٠٠

كما بينت هذه الدراسة أن زيادة محتوى الخلايا الكلي من الكربوهيدرات في السلالة المقاومة عن البرية يمكن أن يكون نتيجة إفراز بعض المواد السكرية التي قد تعمل على تقليل سمية النحاس[٢٥]. وقد أثبتت بعض الدراسات السابقة أن طحلب *Cylindrothica fusiformis* يقوم بإنتاج الكربوهيدرات كآلية دفاع للخلية ضد سمية عنصر النحاس عندما تتعرض خلاياه إلى تركيز ٠,٥ ملليجرام/ لتر من عنصر النحاس[٢٦]. أما من جهة زيادة محتوى الخلايا الطحلبية من السلالة المقاومة من الأحماض الأمينية الكلية عن السلالة البرية، فيمكن تفسير هذا بناء على الدور الذي تلعبه بعض الأحماض الأمينية في تقليل سمية العناصر الثقيلة[٢٤،٢٣،٥] عن طريق تكوين مركبات معقدة من الحمض الأميني، والعنصر

الثقيل[٥،٢٣،٢٤]. ومما يؤيد هذا التفسير زيادة محتوى الخلايا من السلالة المقاومة من البرولين، حيث من المعروف أن البرولين له دور وقائي كبير ضد سمية العناصر الثقيلة[٥،٢٣-٢٤]. وفي هذا السياق قدمت اقتراحات عديدة لتفسير دور البرولين في توفير الحماية للخلايا من سمية العناصر الثقيلة، منها الحفاظ على التوازن المائي الذي قد يتأثر بالعناصر الثقيلة[٢٧]، الارتباط بالعناصر الثقيلة في السيتوبلازم[٢٨]، والحد من امتصاص المعادن[٢٩] أو تكوين المركبات المعقدة بين البرولين والعناصر الثقيلة[٣٠]. بينما أظهرت النتائج أنه ليس هناك فروق تذكر بين محتوى الخلايا الطحلبية من عنصري البوتاسيوم والصوديوم في كلا السلالتين محل الدراسة.

ومن المعروف أن الخلايا الطحلبية لها قدرة كبيرة على امتصاص العناصر الثقيلة، ومن ثم تخليص الأجسام المائية من أيونات العناصر الضارة في وقت قصير، وذلك عن طريق الامتصاص الحيوي، كما أن للطحالب وظيفة حيوية هامة في تشكيل العلاقات البيئية السليمة، والتفاعلات بين الكائنات الحية في البيئات المائية المختلفة[٥،٢٤،٣١،٣٢]. وبالنظر إلى نتائج الجدول (٣) يتضح أن محتوى الخلايا الطحلبية من عنصر النحاس في السلالة المقاومة أعلى بكثير من السلالة البرية حيث يصل إلى ١٦٥٤٤ أوتوجرام/ خلية، إضافة إلى ذلك، فقد أوضحت النتائج أيضًا أن معدل امتصاص عنصر النحاس (V_{Cu}) بواسطة خلايا السلالة المقاومة، في ظل ظروف حالة الثبات أكثر وضوحًا عنه في خلايا السلالة البرية، والذي يتناسب مع معدل النمو. وقد تم حساب معدل امتصاص عنصر النحاس في ظل ظروف حالة الثبات وفقا للمعادلة التالية[٣٣]:

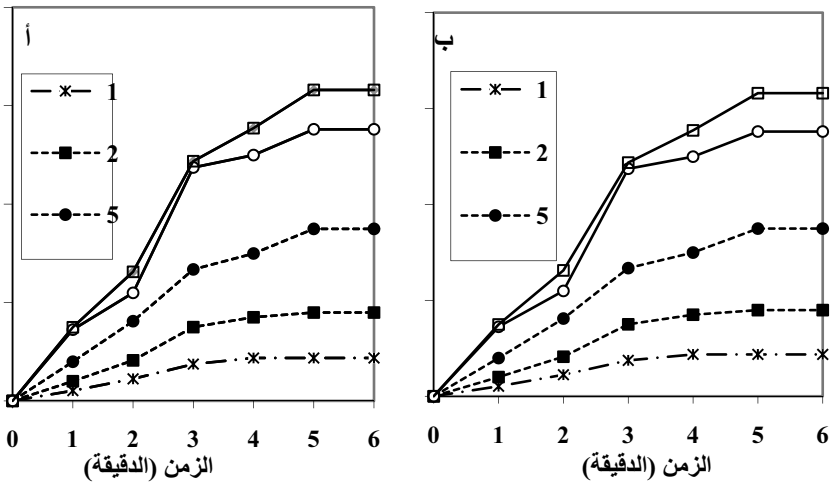
معدل امتصاص عنصر النحاس (V_{Cu}) = معدل النمو (μ) x محتوى الخلايا من النحاس (Q_{Cu}).

جدول (٣). يبين معدل النمو، ومحتوى الخلايا، ومعدل الامتصاص، في السلالة البرية والمقاومة من طحالب الكللوريلا لعنصر النحاس تحت ظروف حالة الثبات.

القياسات	السلالة البرية	السلالة المقاومة
معدل النمو للخلايا (ساعة)	٠,٠٣٢	٠,٠٣٦
محتوى الخلايا من النحاس (اوتوجرام/ خلية)	١٦٥٤	١٦٥٤٤
معدل الامتصاص (اوتوجرام / خلية)	٥٢,٩٣	٥٩٥,٥٨

اوتوجرام / خلية = $١٠^{-١٨}$ جرام لكل خلية.

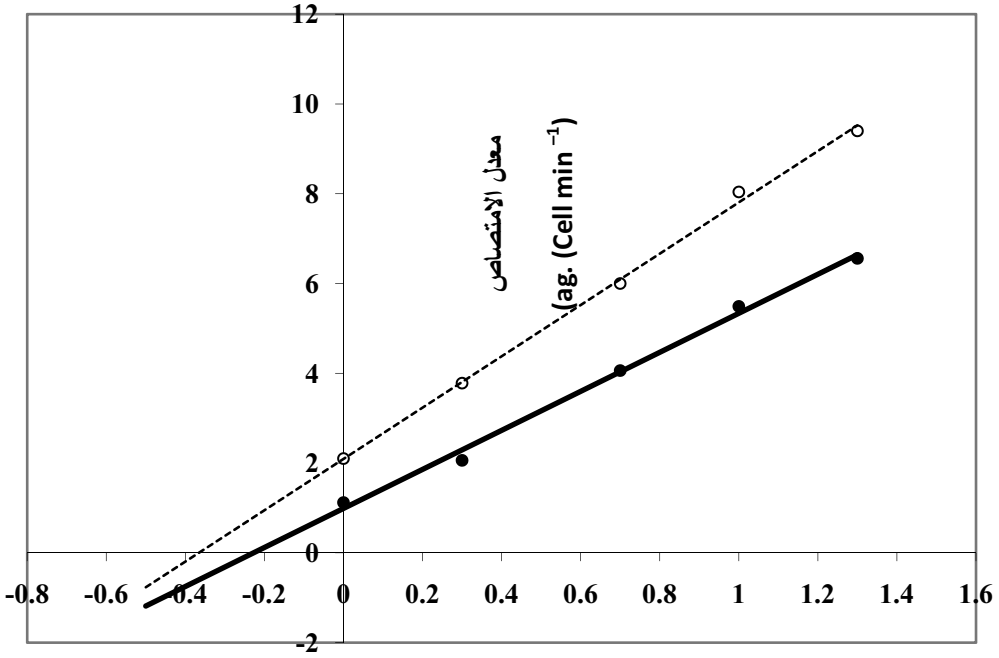
بعد إتمام عملية غسل الخلايا الطحلبية لكل من السلالتين ببيئة خالية من النحاس، ثم تعريضها لتركيزات مختلفة من النحاس، وجد أن سرعة امتصاص عنصر النحاس الابتدائية، وكمية العنصر الممتصة في السلالة البرية كانت أعلى منها في السلالة المقاومة، أو بمعنى أخر اعتمدت على تركيز عنصر النحاس الذي تعرضت له في بيئتها العادية أثناء فترات نموها السابقة، ففي البيئة الأقل في التركيز، كانت سرعة الامتصاص أعلى (شكل ١) والعكس صحيح. أبسط تفسير لهذه الرؤية هو أن انخفاض تركيز عنصر النحاس في البيئة المعتاد عليها الطحلب أثناء النمو يؤدي إلى تفعيل وزيادة نشاط نظام امتصاص النحاس في الخلايا الطحلبية والتي بدورها تحفز نقل هذا العنصر إلى داخل الخلية، وفي هذه الحالة ينبغي أن تخضع عملية امتصاص عنصر النحاس بواسطة الخلايا الطحلبية لبعض أنواع من حركية التشبع saturation kinetics التي يتم تحليلها في كثير من الأحيان على أساس نهج ميشيل منتين (Michaelis-Menten hyperbola). وبناءً على هذا التحليل يجب أن يتخذ معدل الامتصاص خطا مستقيمًا، وهذا لم يتوفر في البيانات المتوفرة لدينا، فالنتائج المسجلة لم تعط خطا مستقيمًا. وهذا الفرق لا يؤدى إلى الدهشة، لأن هذه المعادلة تصف عمليات حفز الإنزيم فقط[٩].



شكل (١). تأثير التركيزات المختلفة من عنصر النحاس ((١ و ٢ و ٥ و ١٠و٢٠) على المسار الوقتي لامتصاص عنصر النحاس في كل من السلالة البرية (أ) والمقاومة (ب) من طحلب الكلوريللا فولجارس.

وثمة نهج بديل آخر استخدم في هذه الدراسة لتحليل اعتماد امتصاص الأملاح المعدنية الخلوي على تركيز هذه الأملاح عند حالة الاتزان، الذي اقترح بواسطة تيلير في عام ١٩٧٠ (للإطلاع أكثر تفصيلًا انظر[٣٤]) وهو أكثر ملائمة من نهج ميشيل منتين لهذه الدراسة تحديدًا. وحيث أن هذا النهج هو وصف لتدفق قوة الامتصاص الخلوية المستمدة من عدم توازن الديناميكا الحرارية. ويوضح منحنى تيلير العلاقة بين معدل الامتصاص الخلوي لعنصر النحاس عند التركيزات المختلفة من نفس العنصر (لوغاريتم التركيز) في كلا السلالتين البرية والمقاومة (شكل ٢). وقد أظهرت العلاقة خطًا مستقيمًا يتقاطع مع محور لوغاريتم تركيز عنصر النحاس عند تركيزي ٠,٢٨ و ٠,٤٧ ميكروجرام/ لتر، لكل من السلالة البرية والمقاومة من طحلب الكلوريللا على الترتيب. ويمثل هذان التركيزان السالف ذكرهما التركيز الذي دونه ليصبح امتصاص عنصر النحاس سالبًا، ويتوقف نمو الخلايا الطحلبية عنده، أي أنه التركيز المحدد لنمو الطحلب في كلتا السلالتين

Threshold value. وقد لوحظ أيضًا من هذه النتائج أن تركيز عنصر النحاس المحدد لنمو السلالة المقاومة من طحلب الكلوريللا، هو أعلى من التركيز المحدد لنمو السلالة البرية. وقد يكون هذا الفرق نتيجة التأقلم الفسيولوجي للسلالة المقاومة على التراكيز المرتفعة من عنصر النحاس، والتي تعرضت له أثناء فترات نموها[٩]. وفي المجمل يمكن القول بأن التأثيرات السامة لعنصر النحاس على الطحالب تعتمد أساسًا على مستوى تركيزات عنصر النحاس في البيئة التي يعيش فيها الطحلب، وكذلك البيئات التي شهدتها فترات نموه السابقة والتي كان له المقدرة على التأقلم عليها والتكيف معها أثناء نموه.



شكل (٢). منحنى تيلير للسرعات الأولية لامتصاص عنصر النحاس في كل من السلالة البرية (...) والمقاومة (.) من طحلب الكلوريللا فولجارس.

References

[1] **Shioi, Y., Tamai, H.** and **Sasa, T.,** Effects of copper on photosynthetic electron transport systems in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol*. **19**: 203-209 (1978).

[2] **Fathi, A.A., Zaki, F.T.** and **Fathy, A.A.,** Bioaccumulation of some heavy metals and their influence on the metabolism of *Scenedesmus bijuga* and *Anabaena spiroides*. *Egypt J. Biotechnol*. **7**: 293-307 (2000).

[3] **Fathi, A.A.,** Toxicological response of the green alga *Scenedesmus bijuga* to mercury and lead. *Folia Microbiol. (Praha*). **47**: 667-671 (2002).

[4] **El-Sheekh, M.M., El-Naggar, A.H., Osman, M.E.H.** and **El-Mazaly, E.,** Effect of cobalt on growth, pigments and the photosynthetic electron transport in *Monoraphidium minutum* and *Nitzchia perminuta*. *Braz. J. Plant Physiol*. **15**(3): 159-166 (2003).

[5] **Fathi, A.A., Zaki, F.T.** and **Ibraheim, H.A.,** Response of tolerant and wild type strains of *Chlorella vulgaris* to copper with special references to copper uptake system. *Protistology*. **4**(1): 73-78, (2005).

[6] **De Filippis, L.F.,** The effect of heavy metal compounds on the permeability of *Chlorella* cells. *Z. Pflanzenphysiol.* **92**: 39-49 (1979).

[7] **Sandmann, G.** and **Böger, P.,** Copper deficiency and toxicity in *Scenedesmus*. *Z. Pflanzenphysiol*. **98**: 53-59 (1980).

[8] **Rai, L.C., Mallick, N., Singh, J.B.** and **Kumar, H.D.,** Physiological and biochemical characteristics of a copper tolerant and a wild type strain of *Anabaeana doliolum* under copper stress. *J. Plant Physiol*. **138**: 68-74 (1991).

[9] **Fathi, A.A.** and **Falkner, G.,** Adaptation to elevation of the concentration of trace element copper during growth of *Scenedesmus bijuga* is reflected in the properties of the copper uptake system. *J. Trace and Microprobe Techniques*. **15**: 321-333 (1997).

[10] [10] **Lombardi A.T.** and **Vieira A.A.H.**, Copper and lead complexation by high molecular weight compounds produced by *Synura* (Chrysophyceae). *Phycologia*. **37**, 34-39 (1998).

[11] [11] **Fathi, A. A.** and **El-Shahed A**., Response of tolerant and wild strains of *Scenedesmus bijuga* to copper. *Biologia Planta*. **43**, 99-103 (2000).

[12] **Backor, M., Fahselt, D., Davidson, R.D.** and **Wu, C.T.,** Effects of copper on wild and tolerant stains of the lichen photobiont Trebouxia erici (Chlorophyta) and possible tolerance mechanisms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*. **45**: 159-167 (2003).

[13] **Kuhl, A.,** Zur physiologie der Speicherung Kondensierter anorganischer Phosphate in Chlorella. Vorlrag Bot. Hrsg. Deut. *Botan. Ges*. **1**: 157-166 (1962).

[14] **Whitton, B.A.** and **Shehata, F.H.A.,** Influences of cobalt, nickel, copper and cadmium on the blue green algae *Anacystis nidulans*. *Environ. Pollut.* **27**: 275-281 (1981).

[15] **Metzner, H., Rau, H.** and **Senger, H.,** Untersuchungen zur Synchronisierbarkeit nzelener pigmente. Mangel-Mutanten von Chlorella. *Planta*. **65**: 186-194 (1965).

[16] **Roe, J.H.,** The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent. *J. Biol. Chem*. **212**: 335-343 (1955).

[17] **Moore, S.** and **Stein, W.,** Photometric ninhydrine method for use in the chromatography of amino acids. *J. Biol. Chem*. **17**: 367-388 (1948).

[18] **Lowry, O.H., Rosenbroug, N.J., Farr, A.F.** and **Randall, R.J.,** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*. **193**: 265-275 (1951).

[19] **Bates, L.S., Waldren, R.P.** and **Tear, I.D.,** Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*. **39**: 205-207 (1975).

[20] **Stauber, J.L.** and **Davies, C.M.,** Use and limitations of microbial bioassays for assessing copper bioavailability in the aquatic environment. *Environmental Reviews* **8**: 255-301 (2000).

[21] **Levy, J.L., Stauber, J.L.** and **Jolley, D.F.,** Sensitivity of marine microalgae to copper: The effect of biotic factors on copper adsorption and toxicity. *Science of the Total Environment.* **387**: 141–154 (2007).

[22] **Rocchetta, I., Mazzuc, V.** and **Carmen, M.,** Effect of chromium on the fatty acid composition of two strains of *Euglena gracili. Environmental Pollution*. **141**: 353-358 (2006).
[23] **Osman, M., El-Naggar, A., El-Sheekh, M.** and **El-Mazally, E.,** Differential effects of Co^{2+} and Ni^{2+} on protein metabolism in *Scenedesmus obliquus* and *Nitzschia perminuta*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. **16**: 169-178 (2004).
[24] **Afkar, E., Ababna, H.** and **Fathi, A.,** Toxicological response of the green alga *Chlorella vulgaris*, to some heavy metals. *American Journal of Environmental Sciences.* **6**(3): 230-237 (2010).
[25] **Rijstenbil, J., Dehairs, F., Ehrlich, R.** and **Wijnholds, J.,** Effect of the nitrogen status on copper accumulation and pools of metal-binding peptides in the planktonic diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Aquat. Toxicol*. **42**: 187-209 (1998).
[26] **Torres, M., Goldberg, J.** and **Jensen, T.,** Heavy metal uptake by polyphosphate bodies in living and killed cells of *Plectonema boryanum* (Cyanophyceae). *Microbios*. **96**: 141–147 (1998).
[27] **Schat, H.** and **Sharmass, R.,** Heavy metal-induced accumulation of free proline in metal-tolerant and a non-tolerant ecotype of *Silene vulgaris*. *Physiologia Plant*. **101**: 477-482 (1997).
[28] **Farago, M.E.** and **Mullen, W.A.,** Plants which accumulate metals. IV. A possible copper proline complex from the roots of *Armeria meritima*. *Chim Acta*. **32**: 93-94 (1979).
[29] **Wu, J., Hsieh, M.** and **How, L.,** Role of proline accumulation in response to toxic copper in *Chlorella* sp. (Chlorophyceae) cells. *J. Phycol*. **34**: 113-117 (1998).
[30] **Fathi, A.A.** and **Zaki, F.T.,** Role of proline level in ameliorating heavy metal toxicity in *Scenedesmus bijuga*. *El-Minia Sci. Bull*. **14**: 155–167 (2003).
[31] **Sandau, E., Sandau, P.** and **Pulz, O.,** Heavy metal sorption by microalgae. *Acta Biotechnol*. **16**: 227–235 (1996).
[32] **Bajguz, A.,** Blockade of heavy metals accumulation in *Chlorella vulgaris* cells by 24-epibrassinolide. *Plant Physiol. Biochem*. **38**: 797−801 (2000).
[33] **Droop, M.R.,** Some thoughts on nutrients limitations in algae. *J. Phycol*. **9**: 264-272 (1973).
[34] **Thellier, M.,** An electrokinetic interpretation of the functioning of biological systems and its application to the study of mineral salt absorption. *Ann. Bot*. **34**: 983-1009 (1970).

Physiological and Biochemical Studies on Response of Tolerant and Wild Type Strains of *Chlorella vulgaris* Under Copper Stress

Abdullah M. Alzahrani, Adel A. Fathi and **Magdy M. Youssef**[1]

Biological Sciences Department and Chemistry Department
College of Science, King Faisal University.

Abstract: Copper tolerance in Chlorella vulgaris (isolated from Al-asfar Lake in Al-Hasa, Saudi Arabia) has been studied by comparing the physiological properties and copper uptake in wild type and copper tolerant strains**.** The data show that the growth rate, dry weight, chlorophyll *a* content, total protein, total sugars and total amino acids were closely linked to the concentration of copper, where the decline rate in the wild type is higher than in the tolerant stains. The data showed that there is a positive relationship between copper toxicity and proline accumulation, this relationship was evident on the tolerant strain. The data also showed that copper uptake was influenced by the copper concentrations that the algae had been exposed to during their previous growth: the lower the copper concentration in the culture medium, the higher the activity of the uptake and the capacity of the cells to accumulate copper.

Keywords: copper uptake , *Chlorella vulgaris* , Al-asfar Lake , Al-Hasa, algae adaptation