تقدير الكميات المثبتة حيويا والنسب المئوية من النايتروجين الجوي عن طريق عزلات محلية من الطحالب الخضر المزرقة

يوسف جبار اسماعيل الشاهري

قسم علوم الحياة ، كلية التربية ، جامعة الموصل ، الموصل ، العراق

الملخص

استخدمت طريقة مختصة بقياس النايتروجين الجوي المثبت حيويا التي تتضمن ثلاث خطوات هي الهضم والتقطير والتسحيح. حيث حددت تراكيز النايتروجين الجوي المثبت عن طريق سبعة انواع من الطحالب الخضر المزرقة المعزولة محليا (من مدينة الموصل) والتي لها القابلية على تثبيت النايتروجين الجوي (*Nostoc muscorum*، *Anabaena helicoidea*، *Arthrospira platensis*، *Lyngbya taylorii*، *Oscillatoria limnetica*، *Oscillatoria tenuies*، *Chroococcus limneticus*) وكانت افضل فترة حضانة لتحقيق اعلى كمية من النايتروجين المثبت هي خمسة عشر يوما من التحضين اذ بلغت قيم النايتروجين المثبت (20.80- 19.01- 15.12 - 12.48- 16.40-16.60 -8.01 ملغم/لتر) للطحالب المدروسة على التوالي وتحققت اعلى نسبة مئوية للنايتروجين (1.48-1.12-1.22-0.99-1.28-1.31-0.89%) للطحالب المدروسة على التوالي بشكل مترادف مع كمية النايتروجين المثبت. وتبين من الدراسة ان معدل تكرار الحويصلات المتغايرة للطحالب الخيطية (*Nostoc* و *Anabeana*) يزداد مع زيادة فترة التحضين لمدة خمسة عشر يوما. وكذلك لوحظ ان اعلى معدل نمو يومي للطحالب المدروسة بشكل عام تحقق عند خمسة عشر يوما من التحضين وسجلت اعلى الاوزان للكتلة الحيوية للطحالب المدروسة بشكل عام بعد نفس فترة التحضين. ولوحظ ارتفاع الرقم الهايدروجيني النهائي عن الاولي ولجميع الطحالب المدروسة وفي جميع فترات التحضين.

الدراسة بينت ان كمية النايتروجين الجوي المثبت من قبل الطحالب المستخدمة تتأثر بشكل مباشر مع اضافة مصدر نايتروجيني الى الوسط اذ زادت كمية النايتروجين المقاسة كون الطريقة المستخدمة للقياس تقدر كمية النايتروجين الكلية الموجودة في العينة، كما ان اضافة مصدر نايتروجيني الى الوسط حفزت النمو وزادت الكتلة الحيوية والمحتوى البروتيني والنسبة المئوية للنايتروجين اما الرقم الهايدروجيني النهائي فقد ارتفع بشكل ملحوظ عن الرقم الاولي ولوحظ انخفاض في تكرار الحويصلات المتغايرة بإضافة المصدر النايتروجيني الى الوسط. وعند دراسة تأثير النظام الضوئي على عملية تثبيت النايتروجين، لوحظ ان الطحالب تباينت في تأثرها بالنظام الضوئي، فقد ابدت الطحالب (*Nostoc* و *Anabeana* و *Arthrospira*) اعلى قدرة على تثبيت النيتروجين عند استخدام النظام الضوئي (18 ساعة اضاءة،6 ساعات ظلام) في حين ابدت الطحالب (*Lyngbya taylorii* و *Oscillatoria limnetica* و *Oscillatoria tenuies* و *Chroococcus limneticus*) اعلى القيم لتثبيت النيتروجين عند استخدام فترة الاضاءة المستمرة والحال مشابه فيما يتعلق بالنسبة المئوية للنيتروجين ومعدل النمو اليومي ووزن الكتلة الحيوية والمحتوى البروتيني.

الكلمات المفتاحية: nitrogen fixation, *Nostoc, Anabaena, Arthrospira,* Heterocyst

المقدمة

تتميز الطحالب الخضر المزرقة بان العديد من انواعها لها القدرة على تثبيت النايتروجين الجوي، فهي بذلك تفوق في اهميتها بكتريا العقد الجذرية للنباتات البقولية والتي تثبت النايتروجين الجوي من خلال تكوين علاقات تعايشيه مع النباتات البقولية في حين ان الطحالب الخضر المزرقة تقوم بهذه العملية بصورة حرة وبدون الحاجة الى تكوين علاقات تعايشيه مع النباتات اخرى. وتمتلك بعض الطحالب القادرة على تثبيت النايتروجين الجوي عضيات خلوية خاصة تعتبر مصنع لعملية تثبيت النايتروجين وهي الحويصلات المتغايرة Heterocystes [1]. وهذه الخلايا تعد خلايا خضرية تحولت الى خلايا تخصصية لهذه العملية. وقد لاحظ [2] انه عند تنمية الطحالب الخضر المزرقة بوجود مصادر نايتروجينية مثل كلوريد الامونيوم سوف تنمو وتتواجد عدة انواع خيطية حاوية على خلايا خضرية غير متباينة (متشابهة) الا انه عند تنميتها في اوساط خالية من مصادر النايتروجين سوف تظهر لهذه الانواع الخيطية خلايا عالية التخصص تعرف الحويصلات المتغايرة وهذا يشير الى العلاقة المباشرة لهذه الخلايا مع تثبيت النايتروجين الجوي وان فاعلية التثبيت تتوافق طرديا مع معدل تكرار الحويصلات المتغايرة في الخيط [3].

كذلك فان للطحالب بشكل عام فوائد صناعية وبحثية كبيرة من خلال انتاجها للعديد من المركبات الايضية الثانوية كالأنزيمات والاحماض العضوية والسكريات المتعددة الخارج خلوية وكذلك افرازه للهرمونات النباتية والتي تماثل في تركيبها ووظيفتها الهرمونات النباتية في النباتات الراقية كالسايتوكاينينات والاندولات والجبريلينات [1] كما انها تفرز العديد من السموم كالسموم الكبدية او السموم العصبية الى الوسط او البيئة الطبيعة التي تعيش بها مما يودي في النهاية الى احداث اضرار جسيمة لحياة الانسان والحيوانات من خلال شرب هذه المياه الملوثة بهذه السموم القاتلة عند التراكيز العالية نسبيا والتي يمكن الاستفادة منها من خلال انتاج ادوية او مهدئات طبية خاصة بهذه السموم[3].

هذه الاسباب وغيرها الكثير الكثير دفعت الباحثين والمختصين في الكثير من دول العالم الى الاهتمام بهذه المجموعة من الكائنات

ISSN:1813 – 1662

الطحلبية الا ان الدارسات المتعلقة بهذه المجموعة من الكائنات داخل القطر ما تزال محدودة وغير مطروقة بشكل كبير وما تزال تعاني من النقص الحاصل بالمعلومات والبيانات على المستوى المحلي قاصرة على دراسات بيئية فقط[4] غير شاملة لدراسات فسلجيه او دراسات متعلقة بزراعة الطحالب من خلال الحصول على عزلات محلية مهمة وتوفير ظروف زرعية ملائمة لنمو هذه الكائنات ومن ثم الاستفادة منها في انتاج مواد مختلفة مهمة صناعيا وبحثيا.

عليه كان الهدف من الدراسة اجراء دراسة فسلجيه من خلال الحصول على عزلات نقية من الطحالب الخضر المزرقة (من البيئة المحلية) ذات كفاءة عالية في تثبيت النايتروجين وقياس كميات النايتروجين الجوي المثبت في هذه الطحالب باستخدام طريقة كلداهال [5].

المواد وطرائق العمل

الطحالب المستخدمة: تم في هذه الدراسة استخدام عزلات محلية من الطحالب الخضر المزرقة الاتية :

Nostoc muscorum ، Anabaena helicoidea ،Arthrospira platensis ، Lyngbya taylorii، Oscillatoria limnetica، Oscillatoria tenuies ، Chroococcus limneticus

اذ تم عزل هذه الطحالب من البيئة المحلية لمدينة الموصل. وحفظت هذه العزلات بعد تنقيتها وذلك بتنميتها على الوسط Chu10 في اطباق بتري بوضعها بالثلاجة بدرجة حرارة (4 م°) وتم تنشيط الطحالب بإعادة زراعتها كل اسبوعين على الوسط Chu10 وحضنت عند درجة حرارة 28 م°.

الوسط الزرعي

زرعت العينات في الوسط الزرعي Chu10 والذي يتكون من المواد التالية وبالتراكيز ازاء كل منها (غم/لتر)[6]: 0.04 $Ca(NO_3)_2$- 0.01 K_2HPO_4 - 0.025 $MgSO_4.7H_2O$ - 0.02 $FeCl_2$ 0.02- Na_2CO_3 0.025- Na_2SiO_3. وبعد التحضير ضبط الرقم الهايدروجيني للوسط بين (7.6-7.8) باستخدام محلول $NaHCO_3$ وتم التعقيم باستخدام جهاز المعقام لمدة 20 دقيقة. اما الوسط Chu10 الصلب فيحضر بإضافة الـ Agar بنسبة 1% الى الوسط Chu10 السائل وبعد التعقيم يصب في اطباق بتري والتي تستخدم لاحقا في عزل وتنمية الطحالب المطلوبة للدراسة.

طريقة العزل

تم زرع العينات تحت ظروف معقمة على وسط Chu10 الصلب (الخالي من النايتروجين) لضمان الحصول على عزلات طحلبية مثبتة للنايتروجين الجوي. اذ نشرت قطرات قليلة من عينات الماء او كمية قليلة من التربة او قطع صغيرة من سطح الصخور التي جلبت من محطات مختلفة (من مدينة الموصل) ثم تم تحضين هذه الاطباق في الحاضنة تحت ظروف اضاءة مستمرة (2500 لوكس) ودرجة حرارة 28 م° ولمدة 4-6 اسابيع بعدها تم ملاحظة مستعمرات الطحالب النامية. وتم نقل كل مستعمرة على حدة الى طبق بتري حاوي وسط Chu10 (الخالي من مصدر نايتروجين) الصلب لتنمو بمفردها للحصول على مزرعة نقية اذ تترك لمدة ثلاثة اسابيع لكي تنمو، بعدها يتم التأكد من نقاوة المستعمرات الطحلبية (المزارع) المراد استخدامها في الدراسة وهي:

N.muscorum, A.helicoidea, A.platensis, L.taylorii, O.limnetica, O.tenuies، C.limneticus.

وبعد ملاحظة النمو الجيد يتم نقل المزارع من الوسط الصلب الى وسط Chu10 السائل (الخالي من مصدر نايتروجين) والمعقم في دوارق زجاجية حجم 250 مل وحاوية على 100 مل من الوسط ذلك بأخذ كمية مناسبة من المزارع واضافتها الى الوسط السائل تحت ظروف معقمة حيث توضع الدوارق في الحاضنة الهزازة (100 دورة/ دقيقة) واضاءة (2500 لوكس) وعند درجة حرارة 28 م° لحين الحصول على النمو المناسب. وبهذه الطريقة تم الحصول على لقاح الطحالب و الذي استخدم في التجارب اللاحقة من خلال تلقيح الدوارق الزجاجية سعة (250 مل) والحاوية على (95 مل) من الوسط السائل المعقم وبنسبة (5%) من اللقاح لكل دورق. وتم اجراء التجارب كافة بمعدل ثلاث مكررات لكل معاملة [4،8،7] .

وتم اجراء عدد من التجارب لغرض دراسة قابلية الطحالب المعزولة على تثبيت النايتروجين الجوي وكما موضح في ادناه:-

1- صممت تجربة لملاحظة تأثير فترات التحضين المختلفة على تثبيت النايتروجين الجوي ومعدل النمو اليومي والكتلة الحيوية والمحتوى البروتيني للطحالب الخضر المزرقة المستخدمة في الدراسة وتحديد افضل فترة حضانة لعملية تثبيت النايتروجين. اذ تم زراعة كل نوع من الطحالب المدروسة على حدة في دوارق مخروطية حاوية وسط Chu10 بدون مصدر نايتروجيني ووضعت الدوارق في الحاضنة الهزازة تحت درجة 28 م° وبشدة اضاءة 2500 لوكس وفي نظام ضوئي 12 ساعة ظلام : 12 ساعة ضياء.

2- صممت تجربة لإجراء مقارنة للطحالب الخضر المزرقة المستخدمة في حالة غياب او جود مصدر نايتروجين (نترات الكالسيوم) في الوسط لدراسة قابليتها على تثبيت النايتروجين. اذ تم اضافة نترات الكالسيوم كمصدر نايتروجيني في الوسط وبتركيز (0.04 غم/لتر) وبنسبة 0.03% نايتروجين واعتمادا على طريقة تحضير وسط Chu10 [8،1،6].

3- صممت تجربة لبيان تأثير فترات الاضاءة والظلام على عملية تثبيت النايتروجين الجوي وبعض الفعاليات الفسلجية للطحالب المستخدمة في الدراسة، اذ تم في المعاملة الاولى تعريض الطحالب لفترة اضاءة مستمرة (24 ساعة اضاءة) وفي المعاملة الثانية عرضت الطحالب لنظام اضاءة (18 ساعة ضياء : 6 ساعة ظلام) اما المعاملة الثالثة فقد تم اختزال فترة التعريض للإضاءة الى حد(12 ساعة ضياء : 12 ساعة ظلام).

طرائق التحليل

1- قياس معدل النمو للطحالب المستخدمة

تم قياس معدل النمو بعد نهاية كل تجربة، اذ تم اخذ 2 مل من المزرعة وتقاس الكثافة البصرية Optical Density على الطول الموجي 436 نانوميتر مستخدما جهاز المطياف الضوئي (Spectro (Sc Labomed.Inc. USA [9].

2- قياس الكتلة الحيوية للطحالب المستخدمة في الدراسة

تم قياس الكتلة الحيوية للطحالب المستخدمة في الدراسة وذلك من خلال ترشيح المزرعة بعد نهاية فترة التحضين باستعمال اوراق Wathman No.1 معلومة الوزن، وبعد تجفيف العينات باستخدام الفرن بدرجة حرارة (60 م°) تم وزنها ثانية والفرق بين الوزنين يمثل الكتلة الحيوية الجافة للطحلب.

3- قياس الاس الهايدروجيني النهائي

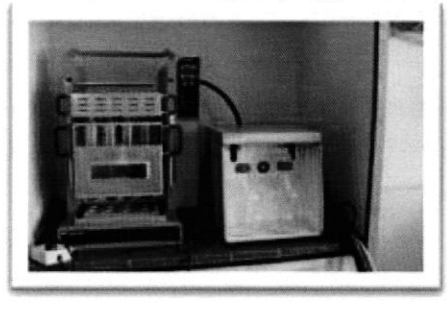
بعد نهاية كل تجربة اجري قياس الاس الهايدروجيني النهائي لكل مزرعة وباستعمال جهاز الـ pH meter اذ تم تسجيل الاس الهايدروجيني النهائي لكل مكرر.

4- تقدير المحتوى البروتيني للطحالب المدروسة

اجري تقدير المحتوى البروتيني الكلي بالاعتماد على طريقة لاوري المحورة [10] وباستعمال كاشف فولن Folin reagent وباستخدام البومين مصل البقر (BSA) بوصفه محلولا قياسيا لعمل المنحني القياسي لتقدير البروتين. وبعد اضافة المحاليل الخاصة بتقدير البروتين الى العينة تقاس الامتصاصية عند الطول الموجي 750 نانوميتر وتقدر كمية البروتين اعتمادا على المنحني القياسي.

5- تقدير النايتروجين الكلي المثبت

تتضمن طريقة تقدير النايتروجين الكلي المثبت وحسب ما تم وصفه من قبل [5] ثلاث مراحل اساسية: الهضم والتقطير والتسحيح وباستعمال جهاز كلداهال للقياس (طراز GerhardtTZ) باستخدام الكواشف والمحاليل الاتية :



صورة (1) جهاز كلداهال لقياس النايتروجين

خليط التحفيز: المكون من $NaSO_4$ و $CuSO_4.5H_2O$.

1- خليط الدليل: المكون من Bromophenol green و Methyl red المذاب في الايثانول.

2- محلول Boric acid: المكون من Boric acid و الدليل اللوني.

3- محلول NaOH بتركيز 40%.

4- حامض H_2SO_4 المركز ذو الكثافة النوعية 1.84.

5- Sodium thiosulphate.

6- حامض H_2SO_4 بعيارية 0.01N.

اذ يؤخذ 50 مل من عينة الطحالب وتوضع في انابيب الهضم الخاصة بالجهاز سعة 250 مل وتتم عملية الهضم بعد اضافة حامض H_2SO_4 و Sodium thiosulphate و خليط التحفيز وتستمر عملية الهضم لمدة ساعة الى ان تتحول المكونات المهضومة الى لون رائق. ثم تنقل محتويات الهضم الى دورق التقطير الخاص بوحدة التقطير في الجهاز ويضاف لها محلول NaOH تركيز 40% تجمع الامونيا المتحررة في الدورق ذات سعة 250 مل حاوي على Boric acid المضاف اليه الدليل اللوني وتستمر عملية جمع الامونيا الى حين الحصول على 150 مل من التقطير ويتحول لون الدليل من اللون الاحمر الباهت الى اللون الاخضر الفاتح او الازرق بعدها تأتي مرحلة التسحيح اي التعادل اذ تعادل محتويات دورق التقطير بتسحيحها مع حامض الكبريتيك ذو عيارية 0.01N عياري من حامض الكبريتيك حتى يتغير لون الدليل الى اللون الوردي ويتم حساب الحامض من السحاحة ثم يتم تقدير النايتروجين الكلي المثبت وحسب المعادلة الاتية:-

$$X= [(V_3-V_4)*C*14*2*1000]/V$$

X : كمية النيتروجين في العينة بوحدة ملغم/لتر. V3: حجم الحامض المستخدم بالتسحيح العينة، V4 : حجم الحامض المستخدم بالتسحيح عينة الماء المقطر، C: تركيز الحامض المستخدم التسحيح، 14: ثابت، 2: ثابت، 1000: لتغير من وحدة مل الى لتر، V : حجم العينة المستخدمة.

ان الية عمل الطريقة لقياس النايتروجين المثبت الكلي تتوضح بالمعادلات الاتية:-

$$\text{Organic N} + H_2SO_4 \rightarrow (NH_4)_2SO_4 + H_2O + CO_2 + \text{other}$$

$$(NH_4)_2SO_4 + 2\ NaOH \rightarrow 2\ NH_3\uparrow + Na_2SO_4 + 2\ H_2O$$

$$2\ NH_3 + 4\ H_3BO_3 \rightarrow (NH_4)_2B_4O_7 + 5H_2O$$

$$(NH_4)_2B_4O_7 + H_2SO4 + 2\ NaOH \rightarrow Na_2B_4O_7 + (NH_4)_2SO_4 + 2\ H_2O$$

6- تقدير النسبة المئوية للنايتروجين الجوي المثبت حيويا

تم تقدير النسبة المئوية للنايتروجين الجوي المثبت بالنسبة الى وزن الكتلة الحيوية للطحالب اعتمادا على القانون التالي:-

النسبة المئوية للنايتروجين = كمية النايتروجين المثبت بوحدة (غم)*100/ وزن العينة بوحدة (غم) [5].

7-حساب تردد الحويصلات المتغايرة في الطحالب المكونة لها

تم حساب تردد الحويصلات المتغايرة لكل من طحلب *N.muscorum* ، *A.helicoidea* اذ تم تثبيت العينات المجهرية المفحوصة باستخدام محلول Logal's solution وتم فحص الخيوط الطحلبية تحت قوة 100X باستخدام العدسة الزيتية وتم احصاء واعطاء النسب المئوية للحويصلات المتغايرة وحسب الطريقة الموصوفة في[5].

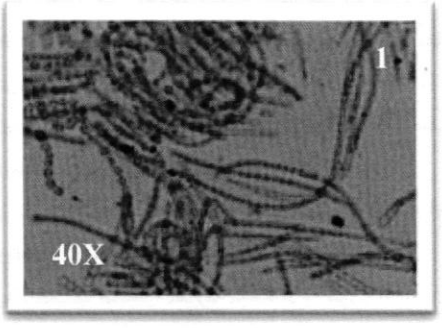
النتائج والمناقشة

1- تشخيص الطحالب المستخدمة في الدراسة

ISSN:1813 – 1662

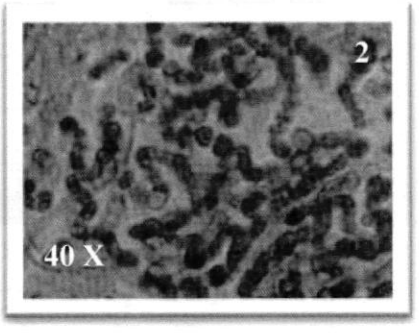
عزلت المستعمرات التي تمتاز بلونها الاخضر المزرق، اذ ان الطحالب الخضر المزرقة تمتاز بلونها الاخضر المزرق. وتم فحص الطحالب مجهريا بواسطة المايكروسكوب المركب وتحت قوة تكبير 40 و X100 واجري التشخيص بالاعتماد على المراجع التالية [12،6،11] وكما يلي:-

تم عزل الطحلب *N. muscorum* اذ لوحظ ان هذه العزلة تكون فيها الترايكومات نامية بشكل مزدحم بصورة كثيفة، ويكون الترايكوم متطاول والخلايا بأشكال متغايرة الشكل فقد تكون اسطوانية او كروية، قطر الخلية يتراوح بين (3–4) مايكروميتر. الحويصلة المتغايرة كبيرة كروية الشكل وذات قطر من (6–7) مايكروميتر. الخلايا الساكنة بيضوية يتراوح طولها من (9–13) مايكرون لوحة رقم(1).



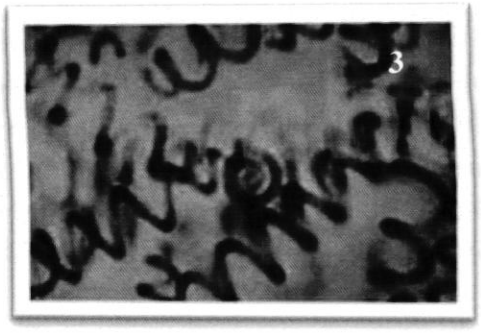
لوحة رقم (1) طحلب *N. muscorum*

تم عزل الطحلب *A. helicoidea* اذ يكون الترايكوم متطاول وحلزوني الشكل، الخلايا بيضوية وتحوي حبيبات كبيرة تمثل المواد الغذائية المخزونة. قطر الخلية(3–6) مايكرون الحويصلة المتغايرة كروية الشكل وذات قطر (5–6) مايكرون. الخلية الساكنة اسطوانية الشكل وطولها 17 مايكرون لوحة رقم (2).



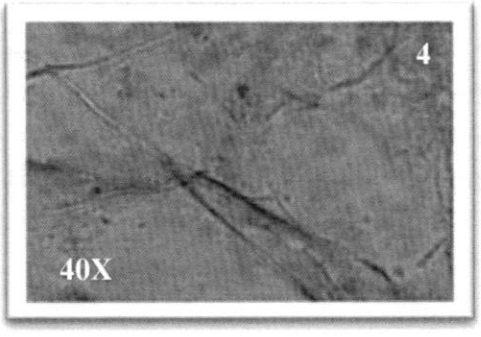
لوحة رقم (2) طحلب *A. helicoidea*

تم عزل الطحلب *A. platensis* اذ لوحظ ان ترايكوم هذا الطحلب ينمو بشكل حلزوني بصورة شديدة والخلايا النهائية غير مستدقة ومستعمرات هذا الطحلب تنمو ملتصقة على الصخور او النباتات المائية في البيئة الطبيعية ولا وجود للخلايا الساكنة و الحويصلات المتغايرة. قطر الخلية (4–6) مايكرون والمسافة بين كل حلقتين تتراوح بين (15–20) مايكرون لوحة رقم (3).



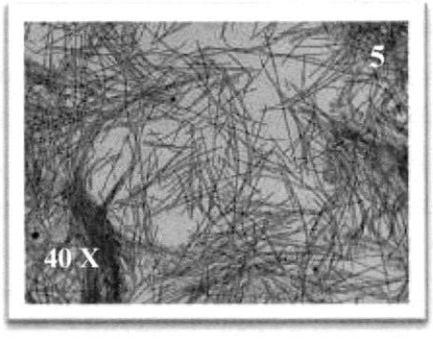
لوحة رقم (3) طحلب *A. platensis*

تم عزل الطحلب *L. taylorii* يتميز بشكله الخيطي غير المتفرع والمتوازي وقد يكون الطحلب ملتصق بالأجسام المغمورة او الطافية في الماء. ان الغلاف الهلامي لهذا الطحلب واضح ومتميز ويفتقر الطحلب الى الخلية الساكنة والحويصلة المتغايرة ولا تتميز اقراص الفصل ويكون الخيط متطاول وغير مستدق عند القمة والخلايا ذات قطر (4–7) مايكرون وغير متخصرة عند الجدران الخلوية لوحة رقم (4).



لوحة رقم (4) طحلب *L. taylorii*

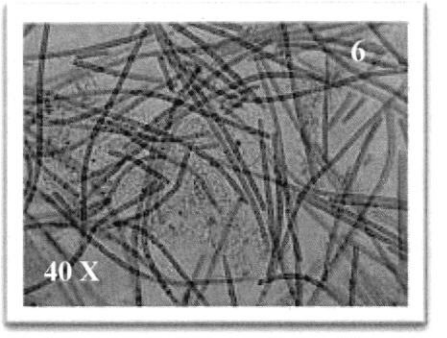
تم الحصول على عزلة نقية من طحلب*O. limneticas* اذ تم التأكد من كون الترايكوم في هذا الجنس قد يكون مستقيم او ملتوي بشكل واضح ولا توجد خلية قمية واضحة المعالم في الترايكوم ولا تحوي قلنسوة وغالبا ما تكون مستديرة النهاية ويفتقد الطحلب للخلايا الساكنة والحويصلات المتغايرة.و الخلايا ذات قطر يتراوح بين (2–1.5) مايكرون والخلايا مثخنة او مبطنة عند الجدران الفاصلة ولا تحوي حبيبات او فجوات غازية لوحة رقم (5).



لوحة رقم (5) طحلب *O. limneticas*

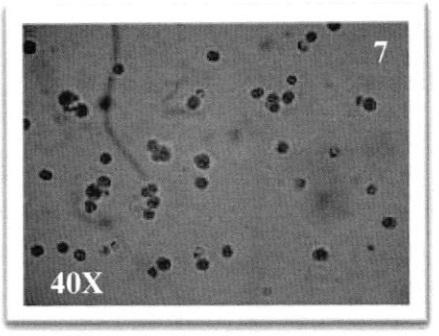
ISSN:1813 – 1662

وأيضا تم الحصول على نوع اخر من هذا الجنس، اذ تم عزل النوع *O. tenuies* والذي ينمو بشكل كتل كثيفة من الترايكومات والتي تكون مستقيمة او ملتوية وتكون الخلايا القمية مستدقة ولا تمتلك قلنسوة والخلايا متخصرة عند الحواجز بين الخلايا وحاوية على حبيبات. ويفتقد الطحلب للحويصلات المتغايرة والخلايا الساكنة عرض الخلية بين (2.5– 5) مايكرون وطولها بين (5–8) مايكرون لوحة رقم(6).



لوحة رقم (6) طحلب *O. tenuies*

وتم الحصول على عزلة نقية من طحلب*C. limneticus* اذ تكون الخلايا بيضوية او غير منتظمة الشكل والطحلب بشكل مستعمرات يتراوح عددها بين 4–16 خلية وتحاط المستعمرة بغلاف هلامي ولا وجود للخلايا الساكنة او الحويصلات المتغايرة. قطر الخلية يتراوح بين (3–4.5) مايكرون لوحة رقم(7).

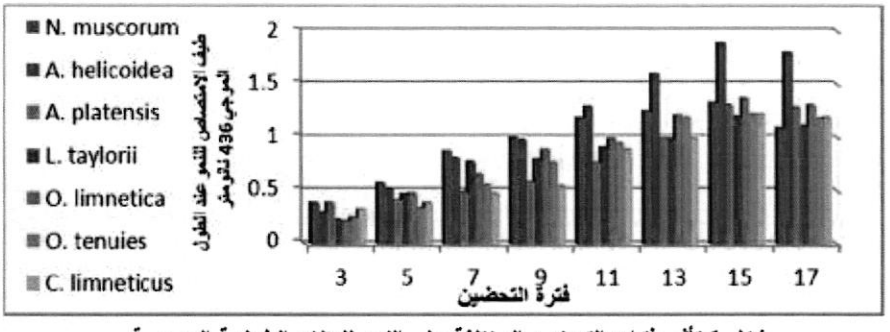


لوحة رقم (7) طحلب *C. limneticus*

واعتمادا على البيانات المدونة في اعلاه يمكن الجزم بان العزلات المستحصل عليها هي عزلات حقيقية للطحالب الخضر المزرقة *N.muscorm* و *A. helicoidea* التابعين لرتبة الـ Nostocales اما *A. platensis* و *L. taylorii* و *O. tenuis* و *O. limnetica* متتابعين لرتبة الـ Oscillatoriales والطحلب *C. limneticus* التابع لرتبة Chroococcales.

2– تأثير فترات التحضين المختلفة على عملية تثبيت النايتروجين الجوي وبعض الفعاليات الفسلجية للطحالب الخضر المزرقة المستخدمة في الدراسة

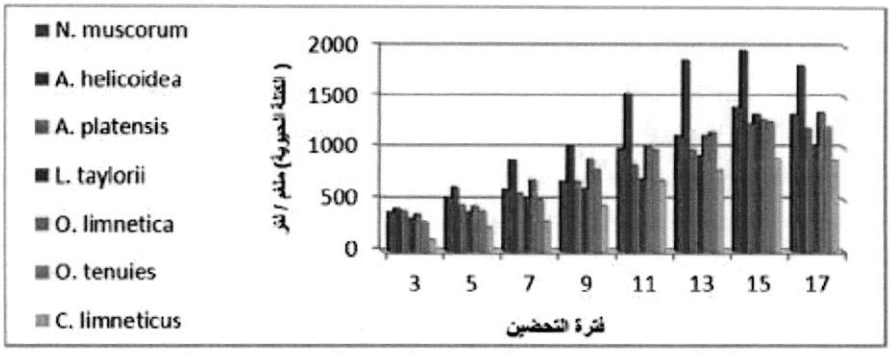
بينت نتائج طيف الامتصاص للنمو (شكل 1) ان افضل نمو تحقق بعد خمسة عشر يوم من التحضين (1.33–1.86–1.30–1.20–1.37–1.22–1.22) ككثافة بصرية لنمو الطحالب (*N.muscorum*، *A.helicoidea*، *A.platensis*، *L. taylorii*، *O. limnetica*، *O. tenuies limneticus.*، *C.*) على التوالي. ثم انخفض طيف الامتصاص للنمو مع زيادة فترة التحضين.



شكل 1 تأثير فترات التحضين المختلفة على النمو للعزلات الطحلبية المدروسة.

ان النتائج اعلاه اكدتها الكثير من الدراسات التي اشارت الى ان افضل فترة تحضين لنمو الطحالب الخضر المزرقة والطحالب بشكل عام هي خمسة عشر يوما. اذ ان الطحالب في هذه المدة قد استقرت في طور الثبات (الاستقرار) ثم ما تلبث ان تدخل طور الموت (الانحدار) مع زيادة فترة التحضين الامر الذي يعود الى نفاذ المغذيات في الوسط الزرعي للطحالب [8،4،13].

اظهرت النتائج (شكل2) زيادة وزن الكتلة الحيوية للطحالب المستخدمة في الدراسة مع زيادة فترة التحضين وبشكل متوازن مع طيف الامتصاص للنمو، اذ بلغت اوزان الكتلة الحيوية (1400–1960 – 1239–1330–1280 – 1260 – 895 ملغم/لتر) للطحالب (*N. muscorum*، *A.helicoidea*، *A.platensis*، *L.taylorii*، *O. limnetica*، *O.tenuies*، *C. limneticus*) على التوالي بعد خمسة عشر يوما من التحضين ثم انخفضت اوزان الكتلة الحيوية مع زيادة فترة التحضين. ان قيمة الكتلة الحيوية كانت متوافقة مع نمو عزلات الطحالب المستخدمة، اذ لوحظ ارتفاع وزن الكتلة الحيوية مع ارتفاع قيمة الامتصاصية للنمو وكذلك ان القيم المنخفضة لطيف الامتصاص اعطت اوزان منخفضة من الكتلة الحيوية لكل طحلب وهذا مالاحظه [4،7].

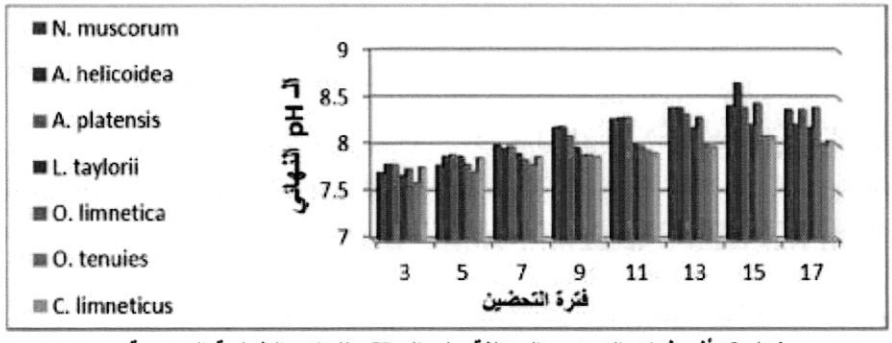


شكل2 تأثير فترات التحضين المختلفة على الكتلة الحيوية للعزلات الطحلبية المدروسة.

بينت النتائج (شكل3) ان الرقم الهايدروجيني النهائي للوسط الزرعي ارتفع مع زيادة فترة التحضين للنمو، اذ لوحظ ارتفاع الرقم الهايدروجيني النهائي عن الرقم الهايدروجيني الاولي مع نهاية فترة التحضين، وسجلت اعلى القيم للرقم الهايدروجيني النهائي عند اليوم الخامس عشر من التحضين فبلغت القيم (8.42–8.66–8.40–8.22–8.45–8.10–8.10) للطحالب المستخدمة على التوالي. ثم انخفض الارتفاع في الرقم الهايدروجيني النهائي عن الرقم الاولي مع زيادة فترة التحضين. وهذه النتيجة اكدها [14] و[1] . واشار لها[4] و [15] ان الاس الهايدروجيني يتأثر بصورة مباشرة بعملية التركيب الضوئي والتي تستهلك CO_2 ، اذ ان استمرار استهلاك الـCO_2 ولا سيما في حالة النمو المرتفع للطحالب يودي الى زيادة تكوين المسببات القاعدية واطلاقها.

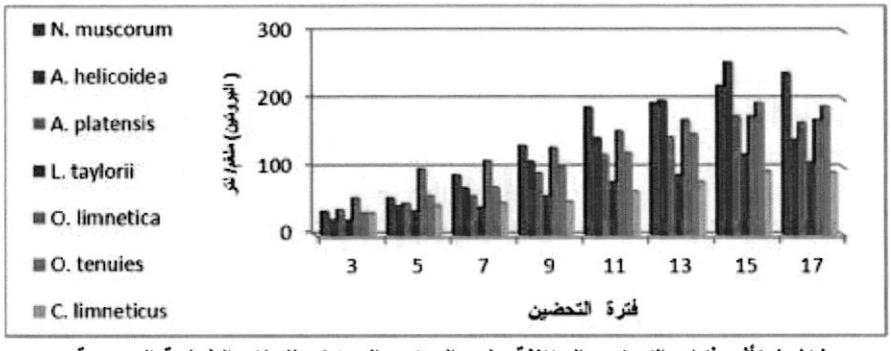
$$2HCO_3 \rightleftharpoons CO_2+CO_3^{-}+H_2O$$

$$CO_2+2OH^{-} \rightleftharpoons CO_3+H_2O$$



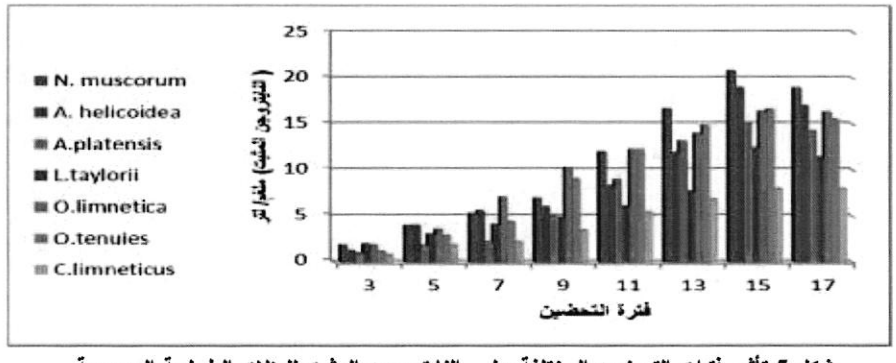
شكل 3 تأثير فترات التحضين المختلفة على الـ pH للعزلات الطحلبية المدروسة .

ولوحظ من النتائج (شكل 4) ازدياد المحتوى البروتيني مع زيادة فترة التحضين فقد بلغت قيم المحتوى البروتيني (220–255–175–119–175–195–95 ملغم/لتر) للطحالب المستخدمة (*N.muscorum*، *A.helicoidea* ، *A. platensis,* *O.tenuis*، *O. limneticus*، *L.taylorii* ، *C. limneticus*) على التوالي في اليوم الخامس عشر من التحضين. ثم انخفض المحتوى البروتيني مع زيادة فترة التحضين. ان المحتوى البروتيني يتوافق مع النمو ووزن الكتلة الحيوية لأي طحلب، هذا من جانب، ومن جانب اخر فان المحتوى البروتيني يشير وبشكل مباشر الى عملية تثبيت النايتروجين الجوي كون عنصر النايتروجين من المكونات الاساسية في تصنيع البروتين وهذا يؤكد قابلية هذه الطحالب على تثبيت النايتروجين من الهواء الجوي [5،8].



شكل 4 تأثير فترات التحضين المختلفة على المحتوى البروتيني للعزلات الطحلبية المدروسة.

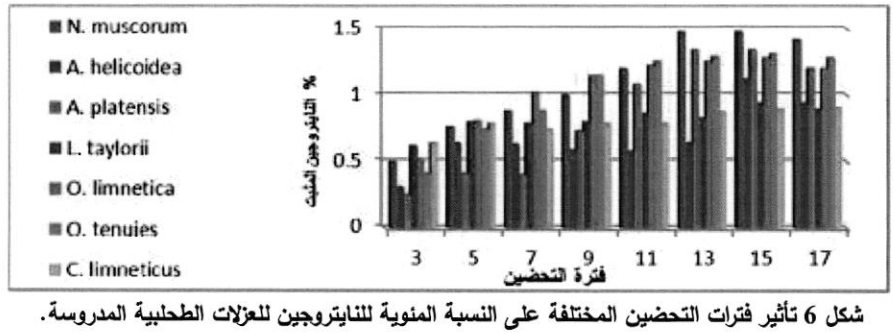
اما فيما يتعلق بعملية تثبيت النايتروجين الجوي (شكل5) فقد لوحظ ارتفاع في مقدار النايتروجين الجوي المثبت مع زيادة فترة التحضين وكانت القيم منخفضة (1.90-1.30-1.00-2.00-1.90-1.20-0.81ملغم/لتر)للطحالب المستخدمة على التوالي في بداية فترة التحضين (ثلاث ايام من التحضين) ثم لوحظ ارتفاع في تركيز النايتروجين المثبت مع زيادة فترة التحضين ومرور الطحالب للمزارع المختلفة في الطور اللوغارتمي Logarithmic phaseولوحظت اعلى القيم من النايتروجين المثبت (20.80- 19.01 - 15.12- 12.48- 16.40- 16.60- 8.01ملغم/لتر) للطحالب المستخدمة في الدراسة على التوالي عند دخول الطحالب المدروسة طور الاستقرار او الثبات Stationary phase ،هذه القيم تبقى مستقرة تقريبا حتى بعد حصول انخفاض نسبي في الكتلة الحيوية للطحالب عند زيادة فترة التحضين مما يشير الى ان المحتوى النايتروجيني يبقى مستقرا حتى بعد دخول الطحالب طور الموت او الانحدار، وكانت افضل الطحالب المستخدمة في تثبيت النايتروجين الجوي هو طحلب الـ *N. muscorum* والذي حقق اعلى قيمة لتثبيت النايتروجين (20.80 ملغم/لتر) وطحلب *A. helicoidea* والذي جاء بالمرتبة الثانية في قدرته على تثبيت النايتروجين الجوي (19.01 ملغم/لتر) وهذا يتوافق مع القيم المرتفعة نسبيا لهذين الطحلبين فيما يخص محتواها البروتيني مقارنة مع بقية انواع الطحالب المستخدمة.



شكل 5 تأثير فترات التحضين المختلفة على النايتروجين المثبت للعزلات الطحلبية المدروسة.

وعند ملاحظة النسبة المئوية للنايتروجين المثبت (شكل 6) مقارنة بوزن الكتلة الحيوية للطحالب المستخدمة في الدراسة يتبين ان هذه النسبة ازدادت بالعموم مع زيادة فترة التحضين بشكل مترادف طرديا مع كمية النايتروجين المثبتة لكل طحلب وبلغت النسب (1.48-1.12-1.22-0.94-1.28-1.31-0.89%) للطحالب المدروسة على التوالي.

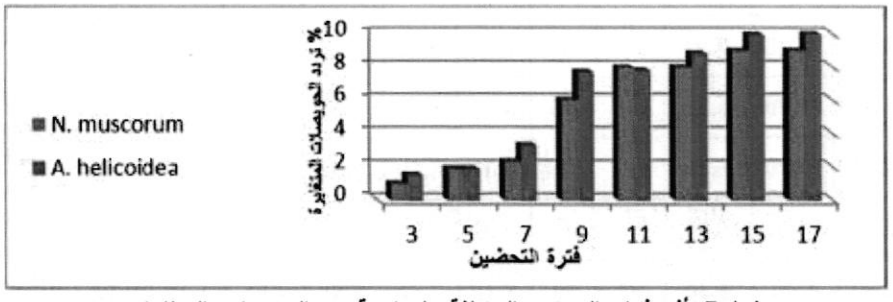
ان النتائج المستحصل عليها في الدراسة الحالية اكدتها الكثير من الدراسات، فقد اشار [5] ان للطحالب الخضر المزرقة القدرة على تثبيت النايتروجين الجوي مع زيادة فترة التحضين عند اجراءه دراسات حول تثبيت النايتروجين من قبل بعض الطحالب الخضر المزرقة ولاحظ ان النسبة المئوية للنايتروجين المثبت تتأثر بشكل واضح مع اختلاف فترات التحضين وبين ان عدد كبير من الطحالب الخضر المزرقة لها القدرة على تثبيت النايتروجين الجوي الا ان كفاءتها تختلف باختلاف الانواع والسلالات وان الانواع الطحلبية التي تمتلك حويصلات متغايرة لها القدرة العالية في تثبيت النايتروجين اذ بلغت كمية النايتروجين المثبت من خلال طحلب الـ *Nostoc* حوالي 250 ملغم/لتر. واكد [16] نتائج مقاربة عند دراسته المراحل الخاصة بتثبيت النايتروجين الجوي تحت تأثير عنصر الحديد على بعض الطحالب الخضر المزرقة واشار[17] ان عملية تثبيت النايتروجين التي تقوم بها الطحالب الخضر المزرقة تتأثر بالظروف الزرعية للمستعمرة وتتوافق عملية التثبيت مع معدل الكتلة الحيوية للطحالب المدروسة، وان النسبة المئوية للنايتروجين المثبت تتوافق طرديا مع معدل تثبيت النايتروجين.



شكل 6 تأثير فترات التحضين المختلفة على النسبة المئوية للنايتروجين للعزلات الطحلبية المدروسة.

اشارت النتائج (شكل7) ان معدل تكرار الحويصلات المتغايرة للنوعين *N.muscurm* و *A.helicoidea* ازداد مع زيادة فترة التحضين وتحقق اعلى نسبة لتكرار الحويصلات المتغايرة (8.99-0.93%) للنوعين *N.muscurm* و *A. helicoidea* بعد اليوم الخامس عشر من التحضين. ان ارتفاع نسبة تكرار الحويصلات المتغايرة يتوافق بشكل طردي مع زيادة كمية النايتروجين الجوي المثبت، الامر الذي يدل بشكل مباشر على ارتباط عملية تثبيت النايتروجين بالحويصلات المتغايرة كونها تعد مصانع لعملية التثبيت في الطحالب التي تكونها [13,6].

اذ اشارت الدراسات الى ان الوظائف الاساسية للحويصلات المتغايرة هي تثبيت النايتروجين الجوي وهذا يفسر قابلية الطحلبين *N. muscorum.* و *A. helicoidea* على التثبيت بكفاءة اعلى مقارنة مع الطحالب الاخرى المدروسة والتي لا تمتلك حويصلات متغايرة بل تعتمد على الخلايا الخضرية بعد تحفيزها بنقص النايتروجين في الوسط، وهذا ما اشار اليه [17] حول قدرة 51% من الطحالب الخضر المزرقة على تثبيت النايتروجين الجوي حتى التي لا تمتلك حويصلات متغايرة.



شكل 7 تأثير فترات التحضين المختلفة على نسبة تردد الحويصلات المتغايرة.

3-تأثير اضافة مصدر نايتروجيني الى الوسط الزرعي على عملية تثبيت النايتروجين الجوي وبعض الفعاليات الفسلجية للطحالب الخضر المزرقة المستخدمة في الدراسة.

بينت النتائج (جدول1) ان طيف الامتصاص للنمو كان مرتفعا عند وجود المصدر النايتروجيني في الوسط فقد بلغ طيف الامتصاص للنمو (0.89-1.90-1.41-1.20-1.22-1.00-1.12) ككثافة بصرية لطحالب المستخدمة بوجود النايتروجين في حين كانت القيم (0.61-0.95-1.00-0.92-1.01-0.71-0.80) ككثافة بصرية بغياب النايتروجين ولجميع الطحالب المستخدمة في الدراسة على التوالي.

وهذه النتيجة توكد الدور الفعال لعنصر النايتروجين في دعم نمو الطحالب وهذا ما ايدته الكثير من الدراسات السابقة [8،7،4]واظهرت النتائج (جدول1) ان الكتلة الحيوية للطحالب عموما كانت مرتفعة عند وجود النايتروجين مقارنة بغيابه وكانت اوزان الكتلة الحيوية (933- 900 - 1330- 1335- 1138 -1220 - 800 ملغم/لتر) في حالة وجود النايتروجين مقارنة بـ (655- 680 -995 -1003-990 -900- 612 ملغم/لتر) بغياب النايتروجين ولجميع الطحالب المستخدمة في الدراسة على التوالي. ان لعنصر النايتروجين دور فعال في البناء الحيوي لخلايا الطحالب بشكل عام ولكافة الكائنات الحية كون النايتروجين يدخل في بناء الكثير من المركبات الحيوية (كالأنزيمات) والعضيات الحيوية (النواة) في خلايا الطحالب، وايده هذه النتائج كل من [8،4] واكدت النتائج (الجدول1) ان الرقم الهايدروجيني النهائي للمزارع الطحلبية بشكل عام كانت مرتفعة عن الرقم الهايدروجيني الاولي ولكلا المعاملتين. الا ان الرقم الهايدروجيني النهائي عند وجود النايتروجين في الوسط كان مرتفعا عن الرقم الهايدروجيني النهائي في حالة غياب النايتروجين في الوسط، اذ بلغت قيم الرقم الهايدروجيني النهائي (8.50- 8.15- 8.33 - 8.12 - 8.31 - 8.09 - 8.10) للطحالب المستخدمة على التوالي. وهذا ما يؤكد ان نشاط الطحالب يرفع الرقم الهايدروجيني النهائي للمزارع. وهذه النتائج ايدتها ابحاث كل [15،18].

جدول (1) تأثير اضافة مصدر نايتروجيني (نترات الكالسيوم) بتركيز 0.04 غم/لتر على عملية تثبيت النايتروجين وبعض الفعاليات الفسلجية للعزلات الطحلبية المدروسة.

الطحلب	طيف الامتصاص للنمو عند 436 نانوميتر		الكتلة الحيوية ملغم/لتر		الرقم الهايدروجيني النهائي		المحتوى البروتيني ملغم/لتر		النايتروجين المثبت ملغم/لتر		النسبة المئوية للنايتروجين %	
	N-	N+	N-	N+	N-	N+	N-	N+	N-	N+	N-	N+	N-
Nostoc muscorum	0.81	0.98	655	933	8.3	8.50	129	191	15.01	16.99	2.29	1.82
Anabeana helicoidea	0.90	1.90	680	900	8.00	8.15	133	202	14.52	17.52	2.13	1.94
Arthrospira platensis	1.00	1.41	990	1330	8.15	8.33	108	179	9.92	15.30	0.99	1.15
Lyngbya taylorii	0.92	1.20	1003	1335	8.00	8.12	95	117	6.22	11.70	0.62	0.87
Oscillatoria limnetica	1.10	1.22	990	1138	8.10	8.31	111	177	5.20	10.70	0.52	0.94
Oscillatoria tenuies	0.71	1.00	900	1220	7.98	8.09	107	168	5.00	10.60	0.55	0.86
Chroococcus limneticus	0.80	1.12	612	800	7.82	8.10	75	97	4.30	6.90	0.70	0.86

N- خلو الوسط الزرعي من النايتروجين، +N اضافة النايتروجين الى الوسط الزرعي.

ولوحظ من النتائج (جدول1) ان المحتوى البروتيني للطحالب المستخدمة بلغ (191-202-179-117-177-168- 97 ملغم/لتر) للطحالب المستخدمة على التوالي عند استخدام المصدر النايتروجيني في حين كانت قيم المحتوى البروتيني (129-133-108-95-111-107-75 ملغم/لتر) للطحالب المستخدمة على التوالي في حالة غياب النايتروجين من الوسط الزرعي.

ان اضافة النايتروجين الى الوسط الزراعي يدعم وبشكل فعال بناء البروتين في داخل الخلايا الحية الامر الذي يعمل على سرعة هذه العملية مقارنة بغياب النايتروجين من الوسط مما يتطلب من خلايا هذه الطحالب صرف طاقة حيوية في عملية تثبيت النايتروجين الجوي الى داخل الخلايا ثم الدخول في عملية بناء البروتين والذي يعد النايتروجين فيها عنصر اساسي. هذه النتائج اكدتها دراسة [5] عند دراسة الظروف الزراعية المثلى لعملية تثبيت النتروجين الجوي من قبل بعض الطحالب الخضر المزرقة حيث ان إضافة النايتروجين في الوسط الزراعي له دور ايجابي في بناء البروتين داخل خلايا الطحالب.

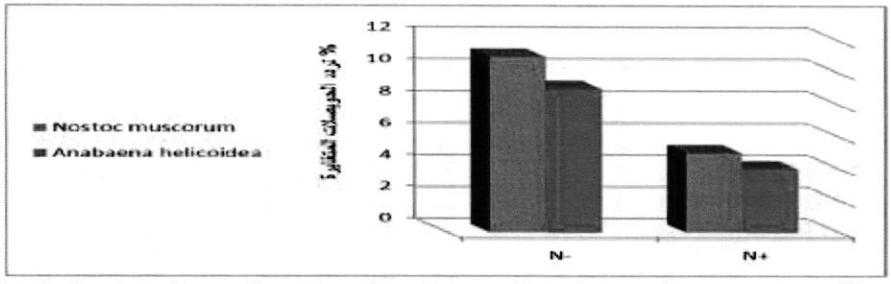
اظهرت النتائج (جدول1) ان كمية النايتروجين الكلية المقاسة تكون متباينة في كلا المعاملتين اذ لوحظ ارتفاع واضح في كمية النايتروجين المقاسة عند اضافة النايتروجين الى الوسط اذ بلغت القيم (16.99-17.52-15.30-11.70 -10.70-10.60-6.90 ملغم/لتر) للطحالب المستخدمة في الدراسة على التوالي بالمقارنة مع كمية النايتروجين المثبتة عند غياب النايتروجين من الوسط (15.01-14.52- 9.92- 6.22- 5.20- 5.00- 4.30 ملغم/لتر) للطحالب المدروسة على التوالي. وفيما يتعلق بالنسبة المئوية للنايتروجين فغالبا ما كانت مرتفعة عند اضافة النايتروجين الى الوسط مقارنة بغيابه ، ماعدا طحلبين*N. muscurm* و *A.helicoide* واللذين حققا اعلى النسب في كلا المعاملتين مقارنة مع بقية الطحالب المشتركة.

ان النتائج المستحصل عليها في هذه الدراسة تشير الى ان عملية قياس النتروجين المستخدمة في الدراسة تقيس النايتروجين الكلي المتوفر في العينة بغض النظر عن وجوده داخل الخلايا الطحلبية او في خارج الخلايا (الوسط الزرعي) وان عملية التثبيت للنيتروجين الجوي تقل كفاءتها في حالة وجودها في الوسط الزرعي كون هذه العملية لا تتحفز الا عند غياب النايتروجين الامر الذي تعمل عنده الطحالب الخضر المزرقة على تلبية حاجتها من النتروجين من خلال تنميته حيويا .

ان النتائج اعلاه اكدتها دراسات وابحاث عديدة ، فقد اشار [18] ان انزيم النايتروجينز الخاص بعملية تثبيت النايتروجين يتحفز في غياب النايتروجين بالوسط والذي يعمل على تحويل النايتروجين الجزيئي داخل الخلايا الحية الى امونيا (NH_3) ، نتريت (NO_2)، نترات(NO_3) وهذه بدورها تدخل في تركيب الاحماض الامينية وكذلك المادة النووية. وبين[17] ان كمية النايتروجين الجوي المثبتة من الطحالب الخضر المزرقة تختلف باختلاف الاوساط الزرعية المنماة بها وكذلك تتأثر بشكل كبير عند اضافة النايتروجين اذ ان كلما زادت تركيز النايتروجين في الوسط ثبطت عملية التثبيت من قبل الطحالب. وايدت [18]عند دراسته تثبيت النايتروجين الجوي في الطحالب الخضر المزرقة تحت تأثير الملوحة والازموزية النتائج المستحصل عليها من

الدراسة الحالية. ولاحظ [19] ان كمية النايتروجين المتحررة من خلايا الطحالب الخضر المزرقة تتراوح بين (5–10%) من النايتروجين المثبت وتكون الكمية واطئة في الطور اللوغارتمي وعالية في طور الاستقرار.

واشارت النتائج (شكل 8) ان نسبة تردد الحويصلات المتغايرة في كل من طحلب (*N.muscurm* و *A. helicoidea*) كانت منخفضة (4.00–5.00%) على التوالي عند اضافة النايتروجين الجوي الى الوسط مقارنة بنسبة تردد الحويصلات (9.00– 11.00%) للطحلبين اعلاه على التوالي عند غياب النايتروجين من الوسط.

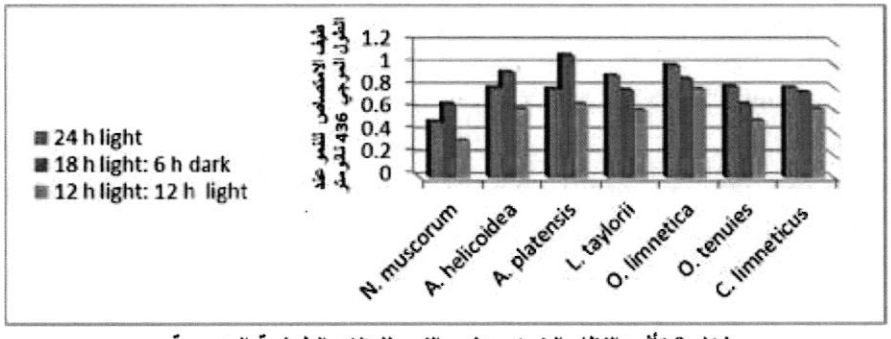


شكل 8 تأثير اضافة مصدر نايتروجيني (نترات الكالسيوم) بتركيز 0.04 غم/لتر على نسبة تردد الحويصلات المتغايرة للطحلبين *N. muscorum* و *A. helicoidea*.

الامر الذي يقود بشكل مباشر الى ان عملية تثبيت النايتروجين الجوي لها علاقة بعملية تكوين الحويصلات المتغايرة وخاصة في الطحالب الخيطية من الطحالب الخضر المزرقة، اذ ان انشاء هذه الخلايا دائما ما يلاحظ عند تحسس الطحالب لغياب النايتروجين او للتراكيز المنخفضة من النايتروجين وكلما زاد تركيز النايتروجين في الوسط كلما قل تردد الحويصلات المتغايرة في الخيط الطحلبي[16،17] انه يمكن اعتبار الحويصلات المتغايرة خلايا تخصصية لتثبيت النايتروجين الجوي. فيما [2] ان الطحالب الخضر المزرقة لها القدرة على تثبيت النايتروجين حتى تلك التي لا تمتلك حويصلات متغايرة.

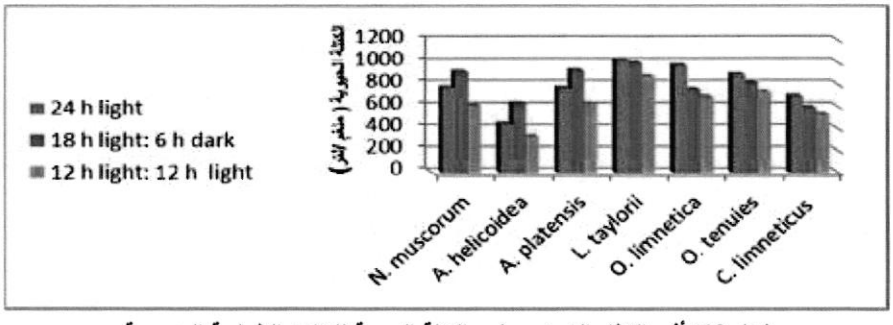
4–تأثير النظام الضوئي على عملية تثبيت النايتروجين الجوي وبعض الفعاليات الفسلجية للطحالب الخضر المزرقة المستخدمة في الدراسة.

بينت النتائج (شكل9) ان طيف الامتصاص للنمو تأثر بشكل مباشر بفترات الاضاءة وان الطحالب المستخدمة تباينت في تأثرها بفترات الاضاءة، اذ لوحظ ان افضل فترة اضاءة تحقق فيها نمو مرتفع للطحلبين *N. muscurm* و *A. helicoide* و *A. platensis* كانت عند استخدام نظام الضوئي (18 ساعة ضياء : 6 ساعات ظلام) اذ بلغ معدل النمو (0.66 –0.94 –1.09) ككثافة بصرية على التوالي. فيما اظهرت الطحالب (*L. taylorii* و *O. limnetica* و *O.tenuies* و *C.limneticus*) معدلات نمو مرتفعة (0.91 – 1.00 – 0.81–0.80) ككثافة بصرية على التوالي عند استخدام النظام الضوئي (الاضاءة المستمرة). و على العموم فقد سجلت اقل القيم للنمو عند استخدام النظام الضوئي (12 ساعة ضياء: 12 ساعة ظلام) ولجميع الطحالب المستخدمة في الدراسة. ان النتائج المستحصل عليها في هذه التجربة اكدتها الكثير من الدراسات والتي اشارت الى ان الكثير من الطحالب يتحفز نموها مع زيادة فترة الاضاءة حتى اذا كانت على مدار الساعة (24 ساعة اضاءة)، في حين تتطلب طحالب اخرى فترات ظلام لكي تنمو بصورة مثالية [20] ولإكمال دورة التواقت الضوئي الطبيعية [1] وكلما زادت فترات الظلام كلما قل نمو الطحالب حتى وان وصلنا الى فترات الظلام المستمر تستطيع الطحالب النمو بشرط توفر مصدر كاربوني في وسط النمو [21].



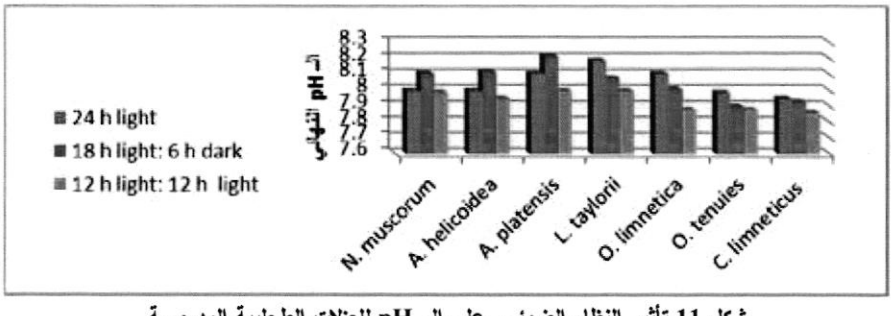
شكل 9 تأثير النظام الضوئي على النمو للعزلات الطحلبية المدروسة.

لـوحظ مـن النتـائج (شـكل 10) ان الكتلـة الحيويـة للطحالـب *N.muscurm* و *A.helicoidea* و *A. platensis* كانت مرتفعة (921-633-933 ملغم/لتر) علـى التـوالي عنـد اسـتخدام النظـام الضوئي (18 ساعة ضياء : 6 ساعات ظلام) ثم انخفض وزن الكتلة الحيويـة مـع زيـادة فتـرة الظـلام. فـي حـين اسـتخدام النظـام الضـوئي (اضاءة مستمرة) تحقق فيه اعلى قيم للكتلة الحيوية (1029- 980- 695-900 ملغم/لتر) للطحالب (*L. taylorii* و *O. limnetica* و *O. tenuies* و *C. limneticus*) على التوالي ، ولوحظ انخفاض الكتلة الحيوية مع زيادة فترة الظلام لهذه الطحالب. ان النتائج المستحصل عليها من الدراسة جاءت متوافقة مع نتائج [4،7،8] والتي اشارت الى اختلاف قابلية الطحالب المختلفة في استجابتها للنظام الضوئي من خلال قياس الكتلة الحيوية.



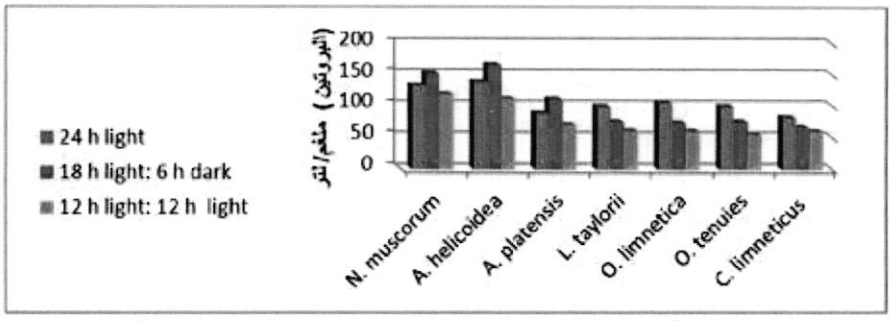
شكل 10 تأثير النظام الضوئي على الكتلة الحيوية للعزلات الطحلبية المدروسة

بينت النتائج (شكل 11) ان الرقم الهايدروجيني النهائي ارتفع عن الرقم الهايدروجيني الاولي ولجميع المعاملات المستخدمة للطحالب المدروسة وان اعلى القيم من الرقم الهايدروجيني النهائي (8.09-8.10-8.20) للطحالب (*N.muscurm* و *A. helicoidea* و *A. platensis*) على التوالي لوحظت عند استخدام النظام الضوئي (18ساعة: 6 ساعات) ولوحظ اقل ارتفاع في الرقم الهايدروجيني النهائي عند استخدام النظام الضوئي (اضاءة مستمرة) ولكل الطحالب المدروسة. هذه النتائج تشير بشكل واضح على العلاقة المباشرة لعملية التركيب الضوئي بارتفاع او انخفاض الرقم الهايدروجيني للوسط الزرعي للطحالب، فعلى الرغم من ان نمو الطحالب يعمل على اطلاق المسببات القاعدية الا ان عملية التركيب الضوئي التي تجري بصورة مستمرة (اضاءة 24 ساعة) تعمل على اختزال المسببات القاعدية وكذلك رفع قيم الحامضية نسبيا في الوسط الزرعي وهذا ما اكده كل من [14].



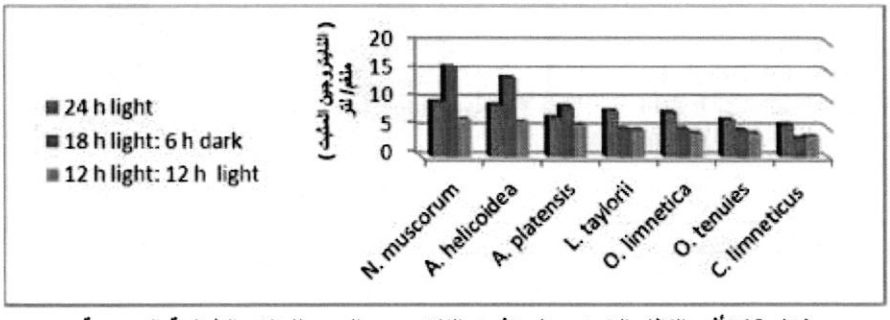
شكل 11 تأثير النظام الضوئي على الـ pH للعزلات الطحلبية المدروسة

اظهرت النتائج (شكل12) ان المحتوى البروتيني ارتفع بشكل ملحوظ (152- 166- 111 ملغم/لتر) للطحالب (*N. muscurm* و *A. helicoidea* و *A. platensis*) على التوالي عند استخدام النظام الضوئي (18 ساعة : 6 ساعة) على التوالي بينما اعلى القيم (99-105- 99- 82 ملغم/لتر) لوحظت في الطحالب(*L. taylorii* و *O. limnetica* و *O. tenuies* و *C. limneticus*) عند استخدام النظام الضوئي (اضاءة مستمرة) ثم انخفض المحتوى البروتيني ولجميع الطحالب مع استخدام النظام الضوئي (12 ساعة: 12 ساعة) ان المحتوى البروتيني للطحالب المستخدمة جاء متوافقا مع قيم الكتلة الحيوية ومعدل النمو اليومي، ففي الوقت الذي حققت فيه الطحالب اعلى نمو وكتلة حيوية لوحظ ارتفاع المحتوى البروتيني والعكس صحيح وهذا ما ايده كل من [4،4،8،13].



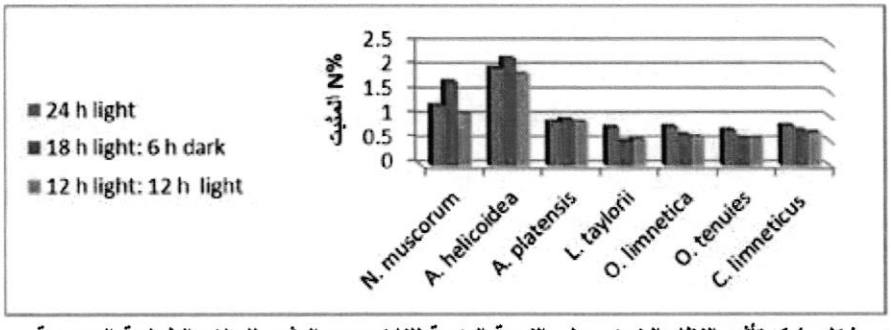
شكل 12 تأثير النظام الضوئي على المحتوى البروتين للعزلات الطحلبية المدروسة .

بينت النتائج (شكل 13) ان الطحالب (*N. muscurm* و *A. helicoidea* و *A. platensis*) سجلت اعلى القيم لتثبيت النايتروجين (15.90 – 14.00 – 8.90 ملغم/لتر) عند المعاملة (18 ساعة: 6 ساعات) ثم انخفضت قيم النايتروجين المثبتة عند زيادة فترات الظلام (12 ساعة) بينما لوحظ ان الطحالب (*L. taylorii* و *O. limnetica* و *O. tenuies* و *C. limneticus*) بلغت اعلى قيم النايتروجين المثبت خلالها (8.13–7.90–6.60–5.7 ملغم/لتر) على التوالي عند تعريضها للإضاءة المستمرة (24 ساعة) ثم انخفضت كفاءة هذه الطحالب في تثبيت النايتروجين مع زيادة فترات تعرضها للظلام.



شكل 13 تأثير النظام الضوئي على تثبيت النايتروجين الجوي للعزلات الطحلبية المدروسة

وكانت نتائج النسبة المئوية للنايتروجين (شكل 14) متوافقة مع نتائج النايتروجين المثبت حيويا، اذ سجلت الطحالب (*N. muscurm* و *A. helicoidea* و *A. platensis*) اعلى النسب للنايتروجين (1.72– 2.2– 0.95 %) عند استخدام النظام الضوئي (18ساعة:6 ساعات) في حين ان الطحالب (*L. taylorii* و *O. limnetica* و *O. tenuies* و *C. limneticus*) سجلت اعلى النسب للنايتروجين (0.71–0.80–0.73– 0.80%) عند تعريضها للإضاءة المستمرة (24 ساعة).



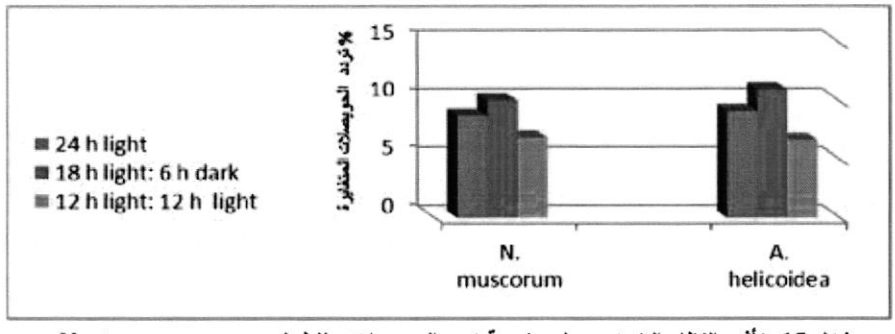
شكل 14 تأثير النظام الضوئي على النسبة المئوية للنايتروجين المثبت للعزلات الطحلبية المدروسة

ان النتائج المستحصلة في الدراسة الحالية جاءت متوافقة مع نتائج دراسات اخرى، فقد اشارت [18] ان عدد لا باس به من الطحالب الخضر المزرقة لها القدرة على تثبيت النايتروجين الجوي تحت ظروف الاضاءة المستمرة وحققت اعلى النسب في النايتروجين المثبت 3.4%، مثال على هذه الطحالب *Synechoccus* ، *Goleocapsa* ، *Gloeothece*. في حين ان طحالب اخرى تزداد كفاءتها في تثبيت النايتروجين الجوي عند تعريضها لفترات ظلام محددة كون كفاءة انزيم الـ Nitrogenase تتناسب عكسيا مع نواتج عملية التركيب الضوئي، ففي الوقت الذي تكون فيه عملية التركيب الضوئي على اشدها وكذلك انتاج الـ O_2 عالي فان فعالية النايتروجينيز تكون واطئة والحالة معكوسة عند الظلام ولو حتى في ساعات محدودة فأنها كافية لزيادة نشاط وكفاءة انزيم النايتروجينيز والذي يعتبر اساسيا في عملية تثبيت النايتروجين، بين [4] ان عملية تثبيت النايتروجين الجوي في الطحالب الخضر المزرقة سواء كانت احادية الخلية او خيطية فأنها

ISSN:1813 – 1662

تتأثر بعملية التوافق الضوئي ويختلف التأثير باختلاف الطحالب. ولاحظ [3] عند قياسه تثبيت النايتروجين الجوي في الطحالب الخضر المزرقة باستخدام طريقة كلداهال ان كميات النايتروجين المثبتة تزداد عندما تكون فترات الاضاءة مناسبة للطحالب بحيث تتطلب الطحالب فترات اضاءة طويلة وظلام قصير. وهذا ما ذكره [5]عند دراسته تثبيت النايتروجين الجوي من قبل بعض الطحالب الخضر المزرقة تحت تأثير الملوحة.

اظهرت نتائج نسبة تكرار الحويصلات المتغايرة (شكل15) للطحلبين (*N. muscurm* و *A. helicoidea*) ان نسبة تكرار الحويصلات المتغايرة ارتفع (10.10– 1.00%) على التوالي عند استخدام النظام الضوئي (18 ساعة : 6 ساعات) بينما انخفضت النسبة مع زيادة فترة الظلام (12 ساعة). هذه النتائج جاءت متوافقة مع نتائج كميات النايتروجين المثبتة في الطحلبين اعلاه والذي يشير للعلاقة المباشرة بين عملية تثبيت النايتروجين وعملية تكون الحويصلات المتغايرة في الطحالب الخيطية من جهة وعلاقتها مع طبيعة النظام الضوئي المعرضة له هذه الطحالب من جهة اخرى اذ ان هذه الخلايا تزداد مع زيادة فترات الاضاءة مع وجود فترات ظلام محددة. وكذلك بين [3] ان عملية تثبيت النايتروجين الجوي في الطحالب الخيطية تتوافق طرديا مع عملية تكون الحويصلات المتغايرة في الطحالب المكونة لهذه الخلايا كونها تعتبر مصانع خاصة لعملية تثبيت النايتروجين الجوي وانها تتأثر سلبا مع فترات الاضاءة المستمرة.



شكل 15 تأثير النظام الضوئي على نسبة تردد الحويصلات للطحلبين *Nostoc muscorum* و *Anabaena helicoidea*

من خلال النتائج المستحصلة في هذا البحث يتبين لنا انه من الممكن عزل وتنمية عزلات محلية من الطحالب الخضر المزرقة لها القدرة والكفاءة العالية في تثبيت النايتروجين الجوي من خلال الكميات المقدرة لهذا العنصر باستخدام طريقة كلداهال والتي لوحظ (من خلال الدراسة) انها طريقة دقيقة وقياسية لقياس النايتروجين الجوي وكونها تتحسس حتى التراكيز القليلة نسبيا من هذا العنصر. وتبين من الدراسة ان الطحالب الخيطية الحاوية على الحويصلات المتغايرة (*N. muscurm* و *A. helicoidea*) المستخدمة في الدراسة كانت افضل الطحالب المدروسة في قابليتها على تثبيت النايتروجين. واجد من الضروري اجراء مسوحات اخرى عن انواع جديدة من الطحالب الخضر المزرقة والتي قد تظهر كفاءة في عملية تثبيت النايتروجين الجوي او اتباع طرق فيزيائية او كيميائية لإحداث طفرات (على مستوى الجين) ايجابية على العزلات المستحصل عليها من الدراسة الحالية لغرض زيادة قابليتها في التثبيت الحيوي للنايتروجين الجوي لما لهذه العملية من ايجابيا على المستوى الصناعي والزراعي وعلى المستوى البحث العلمي.

المصادر :

1. Edward, E.A. (2006). Ecology of Harmful Algae. University of new york. US.A.
2. Wolk, C.P.(1992). Hetrocystes in the biology in the cyanobacteria.p.359-389.Ed:ted by N.G. carr and B.A. Whitton. Oxford: black well scientific publication.
3. Cixueyan (2012). Determination of the amount of nitrogen in cyanobacteria by kjeldahl method. Central ostrobothnia university of Applied science. China
4. الشاهري، يوسف جبار؛ اسماعيل ، محمد بشير وخميس، حميد سلمان (2008). قياس وفعالية البروكسيديز والمحتوى البروتيني والمحتوى الكلوروفيلي لعزلة محلية من طحلب *Chlorilla vulgaris* ، مجلة تكريت للعلم الصرفة. 12:14-17.
5. Malhotra, K. (2011). Studies on nitrogen Blue green algae and mass cultivation. M. Sc. In Biotechnology. Thparunivercity. Patiala. Indian.
6. Bold, H.C. and Wynne, M.J.(1985). Introduction to the algae structure and reproduction.2 nd prentice-Hall. ,Inc. Englewood cliffs .New Jersey.US.A.
7. الطائي، زبيدة محمود صالح (2012). تأثير بعض الظروف الزرعية والمغذيات على النمو وبعض الفعاليات والمكونات الحيوية لعزلة محلية من طحلب *Chlorella vulgaris*. رسالة ماجستير. كلية التربية. جامعة الموصل. العراق.
8. الشكرجي،هبة خليل سعيد (2012) تأثير عدد من المعادن الثقيلة على بعض الفعاليات الحيوية لعزلات محلية من السيانوبكتريا المثبة للنايتروجين *Anabeana, Nostoc, Oscillatoria*. رسالة ماجستير. كلية التربية. جامعة الموصل. العراق.
9. الجبوري، علي صالح حسين(1989). دراسة حول تأثير عدد من العوامل على السيانوبكتريا المثبة للنايتروجين المعزولة من منطقتي

16. Frank, I.B.; Quigg, A.; Finkel, Z.V.; Irwin, A.J. A and Haramaty. L. (2007). Nitrogen - fixation strateges and Fe requirementin cyanobacteria .Limnol. Oceanog. 52(5): 2260-2269.
17. Lehtimaki,L.;Moisander,P.;Sironen, K. and Kononen, K.(1997). Growth, nitrogen fixation and nodulation production by two Baltic sea cyanobacteria. Appl. Environ. Microbiol., 63(5) 1647.
18. Meichou, H; Chow, T.; Tu,j.; Wang, H.R. and Chi Huang, T. (1989). Rhythmic nitroginase activity of *Synechoccus* spp. RF-1 established under various light – dark cycles. Bol.Bull Acad. Sinica.30:391-296.
19. Stewart, W.D.P.(1970).Nitrogen fixation by blue green algae in yellow stone thermal area. Phycol. 9:261-268.
20. Chen, G., and Chen, F.(2006). Growing phototrophic cells without light. Biotechnol. Lett. 28: 607-616.
21.Meichou,H;Chow,T.;Tu,j.;Wang,H.R.andChiHuang, T. (1989). Rhythmic nitroginase activity of *Synechoccus* spp. RF-1 established under various light –dark cycles. Bol. Bull Acad. Sinica.30:391-296.
22.Al-Shahrii,Y.J.I. (2008). Estimation of growth rate, biosilica, protein and lipid content in locally isolated *Fraellaria vaucheria*. J. Edu.and Sci., 21 (3): 116-129.

صلاح الدين وشقلاوة. رسالة ماجستير. جامعة صلاح الدين. اربيل. العراق.
10. Lowery, O.H.:Rosebrough,N.J.; Farr, A.L. and Randall, R. J.(1951) .Protein measurement with the folin phenol reagent. Bio. Chem., 193:265-275.
11. Prescott, G.W.(1968). Thealgae: A. Review (eds. w.c. treet and H.B. Glass), Houghton on Mifften Co. Bolon.
12. Desikachary, T.V.(1995). "Cyanophyta" Indian council of Gricultural Research,New Delhi,PP.,77-621.Academic press,New york and London.
13. علي، هالة ارشد(2006). تأثير عدد من المعادن الثقيلة على عدد من الفعاليات الحيوية في السيانوبكتريا *Anabeana oryzae* المثبتة للنايتروجين الجوي. رسالة ماجستير. كلية التربية للبنات. جامعة تكريت. العراق.
14. Celia, Y.C. and Edward, G.D.(1994). Effect of pH on the growth and carbon uptake of marinphytoplankton.Mar.Ecol.Prog..Ser.,109:83-94.
15. طليع،عبد العزيز يونس وابراهيم، ضياء ايوب وصفاوي، نوار طلال (2002). دراسة نوعية المياه الحوفية لقرية الكونسية وصلاحيتها للاستعمالات المنزلة. مجلة التربية والعلم.

Determination amount and percentage of biologically atmospheric nitrogen fixing by local blue green algae isolates

Yousef J.I. Al- Shahrii
Biology Department , College Education , Mosul University , Mosul , Iraq

Abstract

In present work, specific method was utilized for determining biologically atmospheric nitrogen fixing which includes three steps: digestion, distillation and titration. Nitrogen fixing was determined in seven species of local blue green algae isolates (in Mosul city), these species (*Nostoc muscorum, Anabaena helicoidea, Arthrospira platensis, Lyngbya taylorii, Oscillatoria limnetica, Oscillatoria tenuies and Chroococcus limneticus*). The best incubation period which achieved a high amount of nitrogen fixing is fifteen day and it was reached to (20.80, 19.01, 15.12, 12.48, 16.40, 16.60 and 8.01 mg/L) for understudy isolates, respectively. Also the highest percentage of nitrogen fixing was achieved for understudy isolates which synomounosly increased with increasing amount of nitrogen fixing, (1.48, 1.12, 1.22, 0.99, 1.28, 1.31 and 0.89%). Also, the results revealed that the frequency of heterocysts of filamentous algae (*Nostoc* and *Anabeana*) was increased with increasing incubation period and for fifteen day. Generally, the highest rate of daily growth and weights of biomass was achieved after fifteen day. Increasing of final pH was also observed as compared with initial pH for all understudy isolates and under affect all incubation period. This study revealed that the amount of nitrogen fixing for tested isolates affected directly with exogenous nitrogen source supply into the medium, so the amount of nitrogen fixing was increased because the utilized method determined the total amount of nitrogen in sample and also the addition of nitrogen source into the medium stimulated the growth and elevated the biomass, protein content and percentage of nitrogen. Furthermore, the final pH increased significantly from initial pH under this condition. The results showed, a remarkable declined in heterocysts frequency when nitrogen source was added to the medium. The effect of illumination regime on nitrogen fixation was also studied, the data revealed, that the tested isolates showed variation in their response under this condition. *Nostoc*, *Anabeana* and *Arthrospira* showed maximum ability of nitrogen fixing when illuminated under (18 hour light :6 hour dark) while the remaining algae revealed maximum nitrogen fixing values when illuminated under continuous photoperiod, also the percentage of nitrogen fixing, the rate of daily growth rate, biomass weights and protein content showed same manner.