

Study of Light Wavelength and Some Concentration Salts in Growth Medium on Growth, Protein and Nitrogen Content of *Hapalosiphon arboreus* 3OW05S02

Fatin Mahdi Saleh Al-Rashidy^{1*}, Yousef Jabar Al-Shahere²

^{1,2}Department of Biology, College of Education for Pure Sciences, University of Mosul, Mosul, Iraq

E-mail: ^{1*}fatinbio91@gmail.com, ²yousefalshahery@uomosul.edu.iq

(Received November 21, 2020; Accepted January 18, 2021; Available online June 01, 2021)

DOI: [10.33899/edusj.2021.128991.1122](https://doi.org/10.33899/edusj.2021.128991.1122), © 2020, College of Education for Pure Science, University of Mosul.
This is an open access article under the CC BY 4.0 license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract

Local isolation was obtained from cyanobacteria fixing atmospheric nitrogen, and isolated from the local environment of the city of Mosul (Tigris River forest area). This isolation was grown laboratory in the medium of Chu₁₀. As for the change of wavelengths of light, the red light results showed that the best wavelength of light was (620-750)nm, the biomass is (770) mg /L, the protein content is (230) □g /ml, while the nitrogen content is (119) mg /L. Also I studied a number of mineral elements that affected on growth and nitrogen content, and it was found that the best concentration of potassium phosphate K₂HPO₄ is (50) mg/L, as recorded the biomass is (802) mg/L, the protein content is (202) □g / ml, and the nitrogen content is (107) mg /L. When adding different concentrations of Ca(NO₃)₂ to the medium and comparing them without adding this material to the medium, the best concentration was (60) mg/ L, the biomass is (790) mg/L, the protein content is (138) □g / ml, and the nitrogen content is (74) mg / L.

Keywords: *Hapalosiphon*, Nitrogen Fixation, Heterocystis

دراسة تأثير الطول الموجي للضوء وتركيز بعض الأملاح في وسط التنمية على النمو والمحتوى البروتيني والنايتروجيني للطحلب *Hapalosiphon arboreus* 3OW05S02

فاتن مهدي صالح الراشدي^{1*}، يوسف جبار الشاهري²

^{2,1*} قسم علوم الحياة، كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة الموصل

الخلاصة

تم الحصول على عزلة محلية من السيانوبكتريا المثبتة للنيتروجين الجوي من منطقة الغابات - نهر دجلة - مدينة الموصل *Hapalosiphon arboreus* 3OW05S02. تم تنمية هذه العزلة مختبرياً في وسط Chu₁₀ وبينت النتائج أن أفضل طول موجي للضوء هو (620 - 750) نانوميتر للضوء الأحمر، إذ سجلت أفضل قيمة للكتلة الحيوية (770) ملغم/لتر. ومحتوى البروتين (230) مايكروغرام/مل، والمحتوى النيتروجيني (119) ملغم/لتر. وتم دراسة عدد من العناصر المعدنية المؤثرة على النمو والمحتوى النيتروجيني، فنتبين أن أفضل تركيز لمادة K₂HPO₄ الحامضية هو (50) ملغم/ لتر، كان معدل الكتلة الحيوية (802) ملغم/لتر، والمحتوى البروتيني (202) مايكروغرام/مل، المحتوى النيتروجيني (107) ملغم/لتر. أما عند إضافة مادة Ca(NO₃)₂ نترات البوتاسيوم الى الوسط بتركيز مختلفة ومقارنتها مع عدم إضافة هذه المادة الى الوسط كان أفضل تركيز (60) ملغم/ لتر، إذ سجلت الكتلة الحيوية (790) ملغم/لتر، محتوى البروتين (138) مايكروغرام/مل، المحتوى النيتروجيني (74) ملغم/ لتر.

الكلمات المفتاحية: *Hapalosiphon*, تثبيت النيتروجين, الحويصلات المتغايرة .

المقدمة:

السيانوبكتريا: مجموعة من الأحياء يطلق عليها أيضاً الطحالب الخضراء- المزرقة (blue-green algae) وتسمى كذلك طحالب بدائية النواة (Prokaryotic algae) وكذلك تسمى Cyanophyta ويرجع تسميتها بهذا الاسم نتيجة وجود صبغات ثانوية فيها تسمى Phycocyanin وهي التي تعطيها اللون الأخضر- المزرق المميز لهذه المجموعة، ويتدرج تحت هذه المجموعة العديد من الأجناس التي تتفاوت في الشكل الخارجي وفي بعض الصفات الفسيولوجية فيما بينها تفاوتاً كبيراً، حيث تضم هذه الأحياء مجموعة من الأجناس تتميز بقدرتها على تثبيت النيتروجين الجوي وذلك لوجود خلايا خاصة فيها وتكون مختلفة بالشكل عن بقية الخلايا الأخرى وتسمى الحويصلات المتغيرة Heterocystis [1]. إن امتلاك السيانوبكتريا القابلية على تثبيت النيتروجين الجوي جعلها محط اهتمام الكثير من الباحثين حيث تقوم بتثبيت النيتروجين بصورة حرة كما في الأجناس *Gloeoetrichia, Hapalosiphon, Rivullaria, Anabaena, Nostoc* [2-5]. يتوالى اهتمام الباحثين على عملية تثبيت النيتروجين وذلك لكون هذا العنصر من العناصر الكبرى الداخلة في عملية تكوين البروتين والمادة الوراثية الداخلة في بناء الخلية الحية وتكوين الكلوروفيلات، السايوتوكانيات، الأوكسينات والهرمونات [6]. السيانوبكتريا تحتوي على النيتروجينز وهو الإنزيم المسؤول عن تحفيز تثبيت النيتروجين N_2 إلى الأمونيا NH_3 وهو عملية حيوية للحفاظ على ديمومة الحياة [7]، وهذا الإنزيم عبارة عن بروتين مغاير يتكون من وحدتين من الحديد والموليبدنوم (MoFe) وفي بعض الأحيان (فاناديوم V) [8]. إن النيتروجين الجوي (الجزئي) N_2 هو غاز خامل لا يتفاعل مع المواد الكيميائية الأخرى لكي يكون مركبات جديدة يمكن الاستفادة منها، لذلك فإن عملية تثبيته هي عملية تحويله من الشكل غير الفعال إلى الشكل الفعال (الأمونيوم) بمساعدة إنزيم النيتروجينز [9]. وتتشكل الحويصلات المتغيرة للسيانوبكتريا في ظل الظروف البيئية المناسبة عندما يكون النيتروجين شحيحاً وبمعزل عن الهواء. إذ أنها تظهر اختلافاً مقارنة مع الخلايا الخضراء، فتكون أكبر حجماً وأخف لوناً، ولها جدران خلوية أكثر سمكاً، ولها سماكة تسمى العقيدات القطبية nodules polar عند نقاط الارتباط بالخلايا الخضراء [10]. تشير النتائج إلى أن السيانوبكتريا يمكنها استخدام الضوء المتاح بشكل مثالي لتعديل تخليق البروتين والكتلة الحيوية، وذلك لتأثيره المباشر على الأنشطة الأيضية والبايوكيميائية وعلى نتائج الأبحاث المخبرية [11]. وتعد الكتلة الحيوية للسيانوبكتريا مصدراً مهماً لمجموعة كبيرة من المواد مثل: البروتينات، الأحماض الدهنية، الفيتامينات، السكريات المتعددة، أصباغ كاروتينية ومركبات حيوية أخرى [12]. كذلك بعض أنواع السيانوبكتريا تكون حاوية على نسبة كبيرة من البروتينات بمقدار (60-70%) من الكتلة الجافة، وهذه البروتينات متكونة من أحماض أمينية، وإن مستوى ومقدار البروتين يعتمد على نوع الطحلب المنتج له [13]. استخدمت طريقة كدهال منذ عام 1883 لقياس كمية النيتروجين وهي من أقدم الطرق لهذا القياس سواء كانت المادة عضوية أو غير عضوية، فنسبة النيتروجين العضوي في البروتين تكون على الأكثر ثابتة [14].

اهداف البحث:

تحديد الظروف الزراعية المثلى ومعرفة تأثير الاطوال الموجية المختلفة على زيادة النمو وتحسين المحتوى النيتروجيني والبروتيني والكتلة الحيوية للسلسلة المعزولة محليا *Hapalosiphon arboreus* 3OW05S02

مواد وطرق العمل

التجارب الفسيولوجية

جمع العينة وعزلها Method of sample collection and isolation

تم الحصول على عينة *Hapalosiphon* من موقع نهر دجلة في غابات الموصل. سجلت درجة حرارة الماء والهواء للمنطقة المأخوذ منها العينة، وبعد ذلك جمعت العينة في قنار خاصة واستعملت الملاقط والقطارات لجمع كميات من التربة الرطبة من مواطن بيئية مختلفة لهذا الموقع وتم وضعها في قنار خاصة، بعدها نقلت إلى المختبر من أجل فحصها مجهرياً والحصول على عينة أقل تلوث ومن ثم زراعتها وعزلها [15]. تم القيام بعملية زرع العينة المختارة بعد فحصها بالمجهر مبدئياً في ظروف تعقيم تامة في وسط Chu₁₀ الصلب الحاوي على الاكار وذلك باطباق بتري إذ أجري الزرع بواسطة نشر قطرات قليلة من العينة المائية في الطبق، كذلك تم نشر كمية قليلة من التربة الرطبة التي جمعت من المنطقة المدروسة بعد ذلك وضعت الاطباق في الحاضنة تحت ظروف زرع مناسبة لتنمية السيانوبكتريا كالإضاءة المستمرة 2500 لوكس، درجة حرارة 28°م ولمدة (4-16) أسبوع. تم ملاحظة المستعمرات النامية على الوسط الصلب للعينات المأخوذة من نهر دجلة إذ نقلت كل مستعمرة على حدة وتم زراعتها بطريقة التخطيط streaking method وطريقة التخفيف Dilution method على وسط Chu₁₀ الصلب بطبق بتري للحصول على المزرعة النقية [16]. فحصت المزرعة النقية كل خمسة أيام بواسطة المجهر ولمدة (4-6 اسابيع) وذلك من أجل التأكد من نقاوة المستعمرة لجنس السيانوبكتريا المدروسة.



حاضنة من نوع BS-1 Intelligent shaking incubator

الوسط الزراعي والظروف الزراعية المناسبة لتنمية الطحلب السياتي قيد الدراسة

Culture medium and the agricultural conditions for growing of *Hapalosiphon arboreus* :

من أكثر الأوساط الزراعية استخداماً لتنمية الطحالب التي تعيش في المياه العذبة ومنها الطحالب الخضراء المزرقية (سيانوبكتريا) هو وسط Chu₁₀ المحور الذي يتكون من عدد من المواد والأملاح المعدنية ذات تراكيز محددة ومقاسة بـ(غم/ لتر) من الماء المقطر [18]:

المادة	الوزن غم/ لتر
Ca (NO ₃) ₂	0.4
K ₂ HPO ₄	0.1
Na ₂ CO ₃	0.2
Mg SO ₄ .7H ₂ O	0.25
Na SiO ₃	0.25
Ferric Ammonium Citrate	0.05

تم تحضيره بإضافة هذه المواد الى 1 لتر من الماء المقطر في دورق زجاجي سعته 1000 مل مع استخدام جهاز Magnetic Stirrer لزيادة عملية ذوبان المواد بالماء المقطر, بعد ذلك يتم ضبط الاس الهيدروجيني ليصبح ما بين (7.6-7.8) باستعمال محلولي HCl و NaOH بتركيز 1 عياري. وزع الوسط على دوارق سعة كل منها 250 مل بمقدار 95 مل/ دورق ووضع سدادات قطنية لكل دورق مع قطع من الألمنيوم (foil) ومن ثم تعقم الدوارق بجهاز المعقم بدرجة 121°م وضغط جو واحد ولمدة 20 دقيقة.

أما وسط Chu₁₀ المحور الصلب فقد تم تحضيره بإضافة الأكار بنسبة 1% الى وسط Chu₁₀ السائل المحضر بنفس الطريقة مع اجراءات التعقيم, وبعد التعقيم يتم صب الوسط في أطباق بتريية تحت ظروف معقمة وبعد أن تبرد يتم حفظها بالثلاجة لحين استخدامها في عملية الزرع.

عند إجراء عملية الزرع يتم أخذ الدوارق المحضرة مسبقاً لوسط Chu₁₀ السائل ويضاف الى كل دورق 5 مل من العينة اللقاح وتتم هذه العملية تحت ظروف معقمة. وبعدها يتم تنمية السيانوبكتريا في الحاضنة الهزازة 100 دورة/ دقيقة, وتحت درجة حرارة 28°م وشدة إضاءة 2500 لوكس. يعد الضوء أحد أهم العوامل التي تتحكم في نمو السيانوبكتريا كما ان لكل من عامل الجودة والنوعية تأثيراً كبيراً على النمو وانتاج الكتلة الحيوية وأصباغ الكلوروفيل والدهون [25]. ولهذا السبب أجريت هذه التجربة لمعرفة مدى تأثير تنمية العزلة المدروسة للسيانوبكتريا في أطوال موجية مختلفة على عدد من المكونات الحيوية, وعلى عملية تثبيت النيتروجين, حيث وضعت العينة المزروعة في وسط Chu₁₀ السائل داخل حاضنة تحت تأثير الأطوال الموجية (الأحمر 620-750nm, الأخضر 495-570nm, الأزرق 450-495nm) لمدة 15 يوم لكل معاملة.

إن عنصر الفسفور من العناصر المهمة التي تحدد النمو الأولي للسيانوبكتريا ويعد من العناصر التي تدخل بتركيب الأحماض النووية، وكذلك تركيب انزيم النيتروجيناز الذي يعمل على تثبيت النيتروجين الجوي.[28]. كذلك يؤثر عنصر الفسفور بالتركيز العالية حيث استخدمت ستة تراكيز لـ K_2HPO_4 (50, 100, 150, 200, 250, 300) ملغم/مل .
ونظراً لهذه الأهمية أجريت هذه التجربة للكشف عن مدى تأثير التراكيز المختلفة للنيتروجين على النمو، الكتلة الحيوية عدد من المكونات الحية وعلى فعالية تثبيت النيتروجين الجوي لعزلة السيانوبكتريا المدروسة. ويعد النيتروجين (N) بشكل عام من المغذيات الرئيسية التي تحد من انتاجية السيانوبكتريا في المياه العذبة ولهذا فإن الأبحاث الحديثة تولفت الانتباه الى أهمية النيتروجين في البحيرات الصغيرة[33].

وتمت اضافة $Ca(NO_3)_2$ بتراكيز مختلفة الى وسط Chu₁₀ السائل الخاص بتنمية الطحالب، إذ كانت التراكيز المستخدمة (0.0, 60, 80, 100, 200) ملغم/لتر وبعد فترة حضانه خمسة عشر يوماً لوحظت نتائج الكتلة الحيوية.

تحضير لقاح السيانوبكتريا Preparation of the Cyanobacterial inoculant

تم نقل 10 مل من المزرعة السيانوبكتيرية النقية وتحت ظروف معقمة الى دوارق زجاجية بسعة 250 مل وحاوية على 100 مل من وسط Chu₁₀ السائل والمعقم، ونقلت الدوارق الملقحة الى الحاضنة الهزازة بسرعة (100 دورة/ دقيقة) ودرجة حرارة 28°م وإضاءة 2500 لوكس، لحين الوصول الى طور النمو [17].
بعدها استخدم اللقاح لإجراء التجارب اللاحقة وذلك بنقل 5 مل منه الى دورق سعة 250 مل والحاوي على 95 مل وسط Chu₁₀ السائل والمعقم وتحت ظروف معقمة.

حفظ الطحلب السيانوبكتيري Cyanobacterial Isolate Save

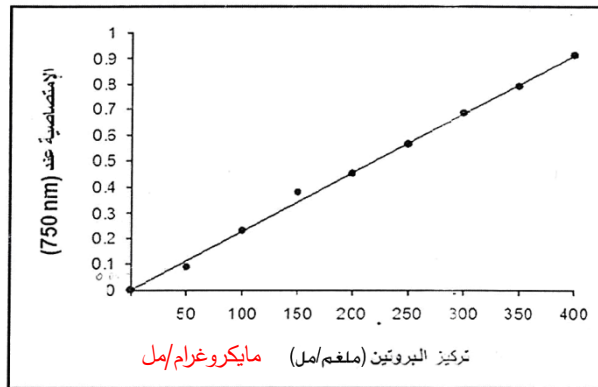
تم حفظ العزلة المنقاة والمستعملة في التجارب بتنميتها في اطباق بتري حاوية على وسط Chu₁₀ الصلب ، ومن ثم حفظها في الثلاجة بدرجة 4°م وتم تنشيطها بإعادة زراعتها شهرياً على نفس الوسط المستخدم.

قياس الكتلة الحيوية Biomass measurement

قيست الكتلة الحيوية للطحلب السيانوبكتيري وذلك بأخذ 10 مل من المزرعة ورشحت بورقة الترشيح من نوع Whatman No. 1 قطرها (15 cm) ذات وزن معلوم، تركت الورقة لتجف في الفرن عند درجة حرارة 48°م ولمدة 24 ساعة، ثم تم وزنها بواسطة الميزان الحساس Sensitive balance من نوع Gmbtt Sohn Electronic balance, KRER2 والفرق بين الوزنين يمثل وزن الكتلة الحيوية.

تقدير المحتوى البروتيني Determination of protein content

تم قياس المحتوى البروتيني وذلك بالاعتماد على طريقة لاوري المحورة [19]. حيث تم استعمال كاشف فولن Folin reagent وكذلك البومين مصلى البقر Bovine Serum Albumin (BSA) بوصفه محلولاً قياسياً لعمل المنحني القياسي وتقدير البروتين [20] كما في الشكل (1):



الشكل (1) المنحني القياسي للبروتين

المحالييل المستخدمة لهذه التجربة موضحة في الجدول (1):

الجدول (1) المحالييل المستخدمة بطريقة فولن

المحلول	طريقة تحضيره
كاشف فولن	يخفف بنسبة 1:1
محلول A	أذيب 0.7 غم من NaOH و3.5 غم من Na_2CO_3 ويكمل الحجم الى 200 مل من الماء المقطر.
محلول B	تم اذابة 0.1 غم من تترات الصوديوم- بوتاسيوم ثم اضيف لها 0.05 غم من كبريتات النحاس اللامائية $CuSO_4$ في 10 مل من الماء المقطر.
محلول C	يتم مزج 50 مل من محلول A مع 1 مل من محلول B
BSA	يحضر بنسبة 100 مايكروغرام/100 مل من الماء المقطر.

أخذ 10 مل من المزرعة وسحقت بجهاز سحق الخلايا (Homogenizer ultrasonic) لمدة دقيقتين، ووضعت في انبوبة اختبار سعة 10 مل بجهاز الطرد المركزي centrifuge، بمعدل 3000 دورة /دقيقة لمدة 5 دقائق وبعدها أخذ 1 مل من الراشح ثم أضيف إليه 5 مل من محلول C ، مزجت المكونات في الأنبوب جيداً وتركت لمدة 10 دقائق بدرجة حرارة الغرفة، واضيف إليها 0.5 مل من محلول كاشف فولن وترك أيضاً لمدة 30 دقيقة، وقرات الامتصاصية عند الطول الموجي 750 نانوميتر بواسطة جهاز المطياف، باستخدام المنحني القياسي للبروتين تم حساب تركيز البروتين.

تقدير المحتوى النيتروجيني Determination of nitrogen content:

أجري قياس المحتوى النيتروجيني بالاعتماد على طريقة كلداهال Kjeldahal method والتي تكون على ثلاث مراحل أساسية وهي (الهضم، التقطير، المعايرة) [21].

أولاً: الهضم Digestion:

هي المرحلة الأولى التي أنجزت بنقل (0.5) غم من العينة السيانوبكتيرية الرطبة النقية إلى دوارق خاصة بالهضم سعة (100) مل ثم اضيف إليها (5) مل من حامض H_2SO_4 المركز وتركت فيه لمدة 24 ساعة، في اليوم التالي وضعت الدوارق على مصدر حراري وسخن المزيج ببطء وبعد أن بدأ الزبد بالتكون تم رفع درجة الحرارة ليستمر الهضم لحين تغير لون المزيج من الغامق إلى الفاتح (رائق جداً) كما في الشكل (2).



الشكل (2) عملية الهضم للعينة

ثانياً: التقطير Distillation:

تم نقل العينات المهضومة للعزلة إلى دوارق التقطير داخل وحدة التقطير الشكل (3)، تم تبريدها لغاية درجة 25°م، وأخذ 1 مل من العينة المهضومة واضيف إليها بحذر شديد 10 مل من هيدروكسيد الصوديوم (NaOH) وتم جمع الأمونيا المتحررة من جهاز التقطير في دوارق بسعة (250) مل وبعد إضافة الدليل إليها أصبحت جاهزة لمرحلة التسحيح.



الشكل (3) جهاز كلداهال لقياس النيتروجين

طريقة تحضير الدليل الخاص بكداهال:

أخذ (40) غم من حامض البوريك واضيف إليها (500) مل من الماء المقطر وترك على جهاز Magnetic stirrer hotplate إلى ان تمت إذابته بالكامل، واطلق عليه المحلول رقم (1). وزن (0.2) غم من دليل أزرق المثلين واضيف له (100) مل من الماء المقطر، كما وزن (0.125) غم من دليل الأحمر المثلي واضيف له (100) مل من الأيثانول واطلق عليه المحلول رقم (2). تم أخذ (20) مل من محلول الأزرق المثلي، واضيف له (30) مل من محلول الأحمر المثلي واكمل الحجم إلى (100) مل بالماء المقطر. أخذ (20) مل من الخليط أعلاه واضيف له (500) مل من حامض البوريك المحضر مسبقاً وأخيراً أكمل الحجم إلى

واحد لتر والذي يكون لونه أزرق وهذا يمثل الدليل المستخدم بعملية التسحيح. خلال عملية التقطير يتغير لون الدليل من الأزرق الى الأخضر دليل على انتهاء عملية التقطير كما هو موضح في الشكل (4).



الشكل (4) تحول لون الدليل من الأزرق الى الأخضر

ثالثاً: المعايرة Calibration:

بعد انتهاء عملية التقطير وتهيئة العينة المقطرة ذات اللون الأخضر, تبدأ عملية المعايرة (التسحيح) حيث يتم إضافة حامض H_2SO_4 (0.014) عياري بواسطة السحاحة مع ملاحظة تغير اللون من الأخضر الى اللون الزهري وحساب كمية الحامض المستهلك لعملية التسحيح كما في الشكل (5).



الشكل (5) تحول اللون من الأخضر الى الزهري بعملية التسحيح

وأخيراً تم حساب النسبة المئوية لكمية النيتروجين من عزلة السيانوبكتريا المدروسة باستخدام المعادلة الآتية:

$$N\% = \frac{\text{حجم المستخلص الكلي} \times \text{الوزن الذري N} \times \text{عيارية الحامض} \times \text{حجم الحامض من المساحة}}{\text{حجم المستخلص المستخدم} \times 1000}$$

النتائج والمناقشة

عزل وتوصيف السيانوبكتريا مجهرياً:

Isolation and characterization of microscopic cyanobacteria:

عزلت العينة المدروسة التي تتميز بلونها الأخضر المزرق وتم فحصها مجهرياً بواسطة المجهر المركب وتشخيصها مظهرياً وذلك بالاعتماد الدراسات السابقة [22-24]. على أنه

Hapalosiphon arboreus 3OW05S02

يمتاز هذا الجنس بكونه ذا خيوط منفردة أو في مجموعات صغيرة وبشكل غير منتظم, متشابكة في بعض الأحيان وتكون متفرعة بشكل حقيقي, لكن الفروع تكون قصيرة نسبياً ومماثلة لشكل الخيوط الرئيسية, تحتوى على أعماد رقيقة وبسيطة, وعديمة اللون ومرتبطة ارتباطاً وثيقاً بالترايكوم Trichome, وتكون على طول الخيط باتجاه واحد وغير متوسعة في النهاية, والخلايا ذات شكل كروي الى كروي متطاوول ومتساوي بشكل متكرر, وذات لون أخضر مزرق شاحب, وشريحة الحبيبات, والخلايا الطرفية مشابهة للخلايا الخضرية الأخرى كما هو واضح في الشكل (6).

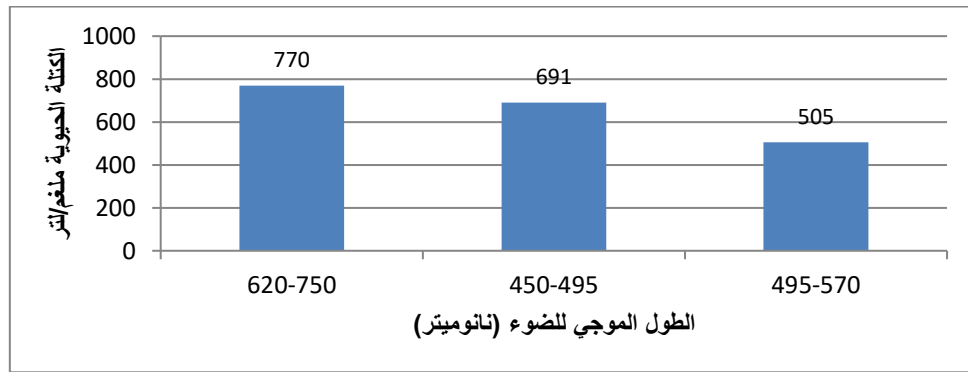


الشكل (6) صورة مجهرية لطحلب *Hapalosiphon arboreus* 3OW05S02 تحت قوة تكبير X40

تأثير عامل الطول الموجي للضوء على نمو الطحلب والمحتوى النيتروجيني والبروتيني

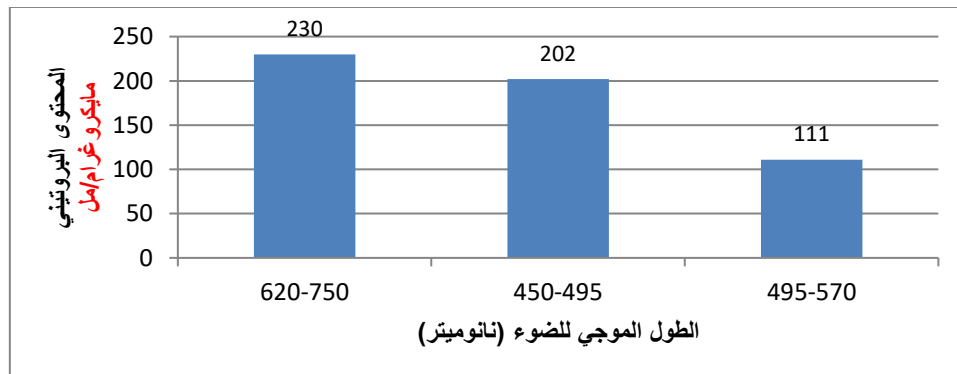
Effect of Light wavelength on cyanobactreium Biomass, Protein and Nitrogen content

يبين الشكل (7-A) تأثير تغير الطول الموجي للضوء على الكتلة الحيوية للعزلة السيانوبكتيرية المدروسة وسجلت قيمة الكتلة الحيوية عند الضوء الأحمر بمقدار (770) ملغم/لتر. وعند الضوء الأزرق كانت بمقدار (691) ملغم/لتر وكانت بمقدار (505) ملغم/لتر عند الضوء الأخضر، وهذا يوضح تأثير الطول الموجي للضوء على الكتلة الحيوية وزيادتها إذ تعتبر نوعية الضوء وجودته من أهم العوامل المؤثرة على الكتلة الحيوية والنمو في السيانوبكتريا وهذا ما يتطابق مع نتائج [25].



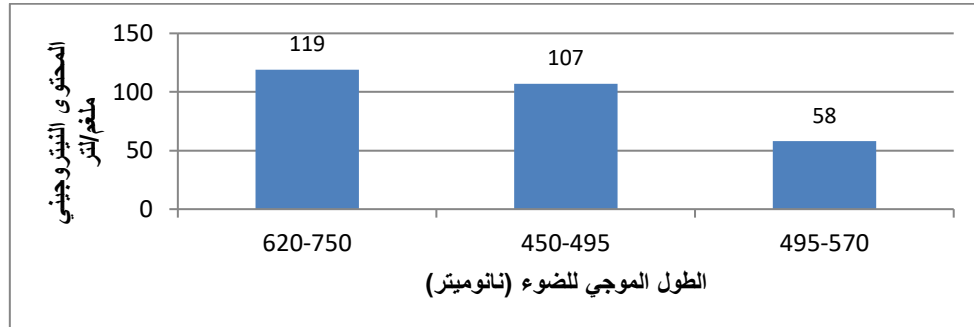
الشكل (7): تأثير تغير الطول الموجي للضوء على الكتلة الحيوية للعزلة السيانوبكتيرية

وبين الشكل (8) تأثير تغير الطول الموجي للضوء على المحتوى البروتيني حيث اتفقت مع مقدار النمو ومقدار الكتلة الحيوية للعزلة المدروسة. فإن قيمة المحتوى البروتيني عند الضوء الأحمر سجلت بمقدار (230) مايكروغرام/مل. وعند الضوء الأزرق سجلت قيمة المحتوى البروتيني (202) مايكروغرام/مل. أما عند الضوء الأخضر فقد كان مقدار محتوى البروتين (111) مايكروغرام/مل. وهذا يعني أن الضوء الأحمر كان له التأثير الأكبر على المحتوى البروتيني يليه الأزرق فالأخضر الأقل تأثيراً، إذ يؤدي الضوء الى حدوث تغييرات هيكلية في الكاروتين والبروتين وذلك لقيام السيانوبكتريا بالتكيف للبيئة التي تعيش فيها عن طريق تطويرها آليات الحماية الضوئية للتعامل مع ظروف الاضاءة المتقلبة [26].



الشكل (8): تأثير تغير الطول الموجي للضوء على المحتوى البروتيني للعزلة السيانوبكتيرية

أما الشكل (9) فيبين تأثير تغير الطول الموجي للضوء على المحتوى النيتروجيني للعلزلة المدروسة عند الضوء الأحمر فقد بلغت (114) ملغم/لتر، وعند الضوء الأزرق كانت قيمته (107) ملغم/لتر أما في الضوء الأخضر فقد سجلت قيمته (58) ملغم/لتر ومن هذه النتائج نلاحظ أن اللون أو الضوء الأحمر هو الأفضل في عملية تثبيت النيتروجين يليه الأزرق حيث أشار [27] ان للضوء تأثير مباشر على نشاط انزيم النيتروجينز المسؤول عن تثبيت النيتروجين الجوي في السيانوبكتيريا.

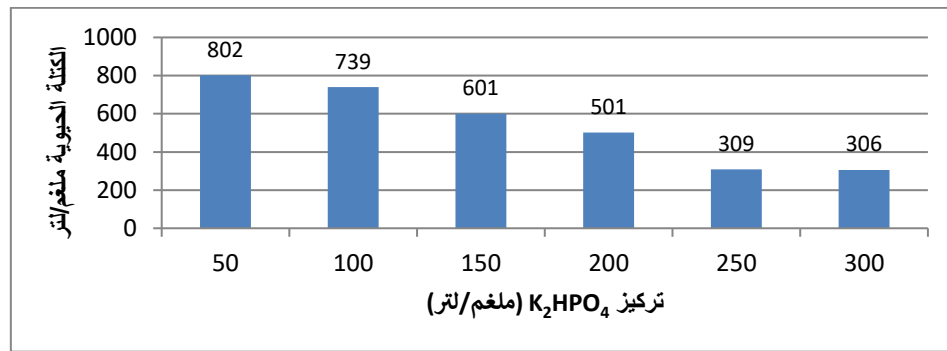


الشكل (9): تأثير تغير الطول الموجي للضوء على المحتوى النيتروجيني للعلزلة السيانوبكتيرية

تأثير تركيز فوسفات البوتاسيوم على الكتلة الحيوية والمحتوى البروتيني والنيتروجيني للطحلب

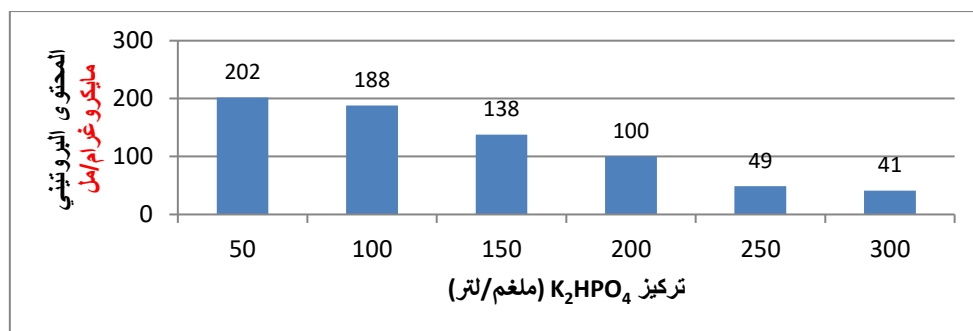
Effect of Potassium Phosphate concentration on cyanobacterium Biomass, Protein and Nitrogen content

بينت النتائج في الشكل (10) تأثير التراكيز المختلفة لمادة K_2HPO_4 على الكتلة الحيوية ولوحظ أن أعلى قيمة للكتلة (802) ملغم/لتر تجت عند استخدام أقل تركيز للفسفور (50) ملغم/لتر بمقدار، بينما عند أعلى تركيز لعنصر الفسفور (300) ملغم/لتر فقد لوحظ انخفاض لقيمة الكتلة الحيوية فكانت عند تركيز تساوي (306) ملغم/لتر، ويعزى هذا الانخفاض الى الآلية الحيوية لحركة الفسفور والتي تعتمد على طبيعة الناقل المختص بعملية الامتصاص، وأن زيادة كمية الفسفور تعمل على زيادة الشحنة على سطح الخلية الطحلبية والذي يؤدي الى قلة الكتلة الحيوية بسبب قلة النمو المتأثر باختلاف تركيب العشاء الخلوي للخلية [29].

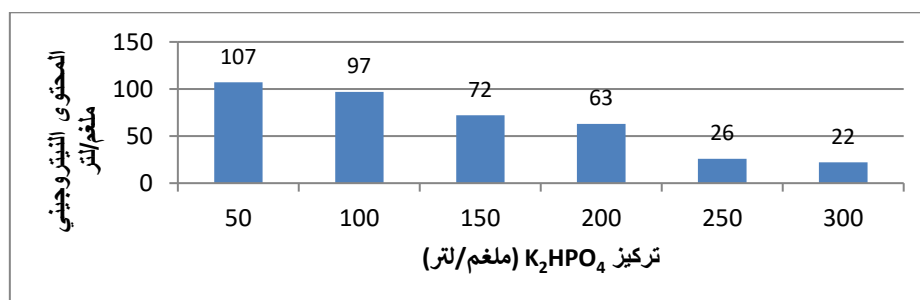


الشكل (10): تأثير التراكيز المختلفة لمادة K_2HPO_4 على الكتلة الحيوية

يبين الشكل (11) تأثير التركيز المختلف لمركب K_2HPO_4 على المحتوى البروتيني للعلزلة المدروسة أن أعلى قيمة للمحتوى البروتيني سجلت (200) مايكروغرام/مل عندما كان تركيز الفسفور (50) مايكروغرام/مل، وبدأ بالانخفاض عند زيادة تركيز عنصر الفسفور في الوسط حيث سجل أقل قيمة للمحتوى البروتيني (41) مايكروغرام/مل عندما كان تركيز الفسفور (300) ملغم/لتر، والسبب في هذا الانخفاض هو التغييرات التي تحدث في البروتينات الناقلة للفسفور وكذلك تغييرات التركيب الخلوي للجدار وتحول الفسفور الى فسفور عضوي وتشفير البروتين [30]. ويعتمد تشفير البروتين على فعالية أنزيم النيتروجينز بحيث يحدد فعالية الانزيم في خلية السيانوبكتيريا [31].

الشكل (11): تأثير التراكيز المختلفة لمادة K_2HPO_4 على المحتوى البروتيني

أما تأثير التراكيز المختلفة لـ K_2HPO_4 على المحتوى النيتروجيني للعزلة المدروسة فقد تبين من النتائج الواردة في الشكل (12) أن أعلى قيمة للمحتوى النيتروجيني سجلت عند التركيز (50) ملغم/لتر وكانت بمقدار (107) ملغم/لتر في حين سجلت أقل قيمة للمحتوى النيتروجيني عند التركيز (300) ملغم/لتر وكانت بمقدار (22) ملغم/لتر وعلى الرغم من وفرة عنصر الفسفور إلا أنه يكون غير متواجد بشكل يسهل استخدامه من قبل الخلية وهذا يؤدي الى نقص بمستوى النمو والكتلة الحيوية ومن ثم نقص في محتوى الكلوروفيل وكذلك محتوى الكربوهيدرات ومحتوى البروتين والنيتروجين وهذا ما يتفق مع نتائج [32] بدراستهما المتعلقة بالتوصيف الجزيئي لعزلات السيانوبكتريا المثبتة للنيتروجين إذ تم ملاحظة انخفاض المحتوى النيتروجيني مع زيادة تركيز هذه المادة.

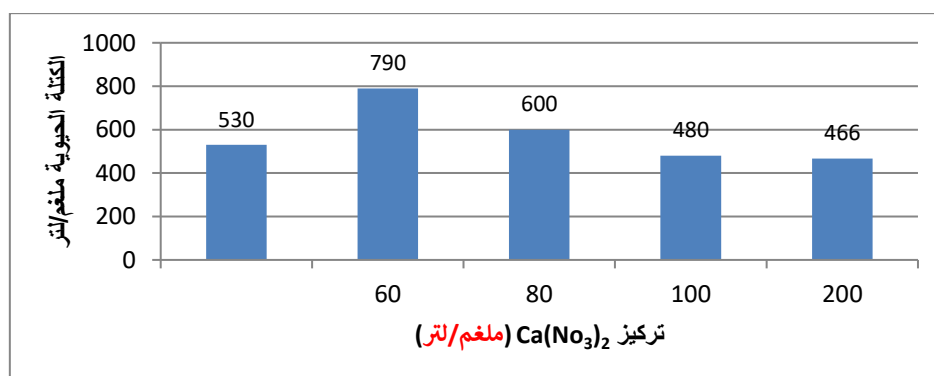
الشكل (12): تأثير التراكيز المختلفة لمادة K_2HPO_4 على المحتوى النيتروجيني

تأثير تركيز نترات الكالسيوم على الكتلة الحيوية والمحتوى البروتيني والنيتروجيني للطحلب السيانوبكتيري

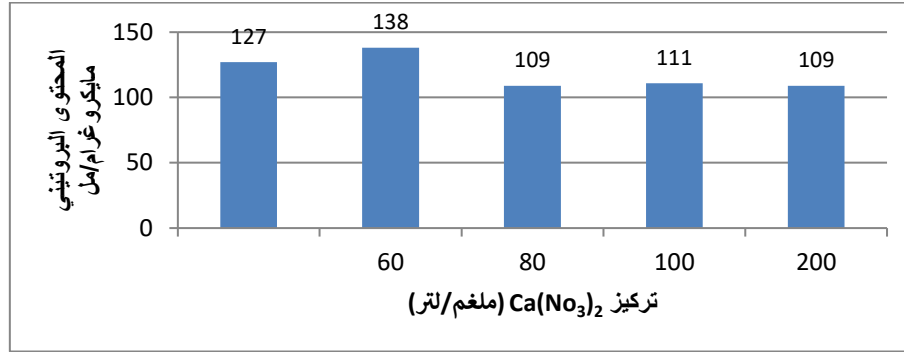
Effect of Calcium Nitrate concentrations cyanobacterium Biomass and Protein and Nitrogen content:

أظهرت النتائج الواردة في الشكل (13) , أن أعلى قيمة للكتلة الحيوية نتجت عند استخدام التركيز (60) ملغم/لتر لعنصر النيتروجين, بمقدار (790) ملغم/لتر أما أقل قيمة للكتلة الحيوية فظهرت عند التركيز الأعلى لعنصر النيتروجين وبلغت (466) ملغم/لتر عند التركيز (200) ملغم/لتر.

نستنتج من ذلك ان الكتلة الحيوية تتناسب طردياً مع مقدار النمو وتقل عند استخدام المستويات أو التراكيز العالية لمصدر النيتروجين ويعزز هذه النتائج ما أجراه [34] عند استخدام قشور الفول السوداني كركيزة مدعمة بأربعة مصادر نيتروجين مستقلة أدت الى زيادة في الكتلة الحيوية عند تنمية السيانوبكتريا.

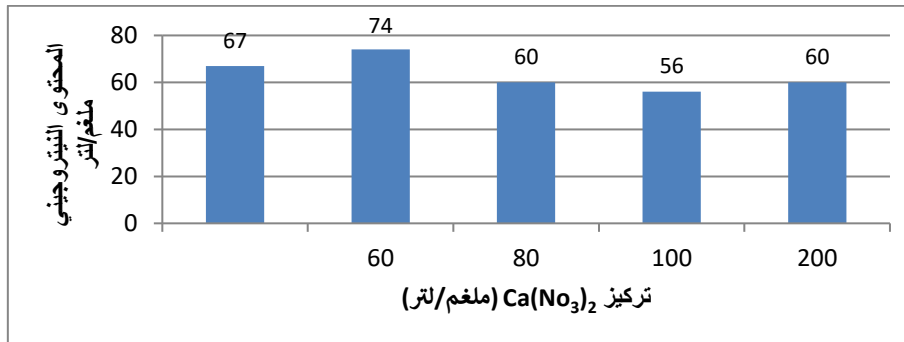
الشكل (13): تأثير التراكيز المختلفة لمادة $Ca(NO_3)_2$ على الكتلة الحيوية

أما الشكل (14) فقد أظهرت النتائج تأثير التراكيز المختلفة لعنصر النيتروجين على المحتوى البروتيني لعزلة السيانوبكتريا المدروسة. الذي وصل مقداره الى (138) مايكروغرام/مل عند التركيز (60) ملغم/لتر، أما عند التركيز (200) ملغم/لتر فقد سجلت قيمة المحتوى البروتيني (109) مايكروغرام/مل وهذا يوضح مدى تأثير التراكيز المختلفة لعنصر النيتروجين في وسط Chu10 على المحتوى البروتيني في السيانوبكتريا، وتطابقت هذه النتائج مع نتائج [35] في دراستهم المتعلقة بتأثير التراكيز المختلفة من المصدر النتروجيني على الكتلة الحيوية، محتوى البروتين، الكلوروفيل وكذلك الدهون في الطحالب الخضراء والسيانوبكتريا.



الشكل (14): تأثير التراكيز المختلفة لمادة $Ca(NO_3)_2$ على المحتوى البروتيني

يبين من الشكل (15) مدى تأثير التراكيز المختلفة للمصدر النتروجيني في الوسط على فعالية تثبيت النيتروجين الجوي لعزلة السيانوبكتريا المدروسة، فقد ظهر أن أعلى قيمة في كمية النيتروجين الثابت عند التركيز (60) ملغم/لتر كانت بمقدار (74) ملغم/لتر أما عند التركيز (100) ملغم/لتر فقد كانت قيمة النيتروجين الثابت بمقدار (56) ملغم/لتر. يدل ذلك على التأثير السلبي لاضافة المصدر النتروجيني على عملية تثبيت النيتروجين الجوي في السيانوبكتريا [36]. كذلك التجارب التي قام بها [37]، حول استخدام السماد الحيوي لزيادة عملية تثبيت النيتروجين في السيانوبكتريا لحقول الأرز وكذلك استخدام الأسمدة النيتروجينية الاصطناعية حيث يظهر استخدام الأسمدة القائمة على السيانوبكتريا إمكانية وزيادة كفاءة تثبيت النيتروجين في حقول الأرز.



الشكل (15): تأثير التراكيز المختلفة لمادة $Ca(NO_3)_2$ على المحتوى النيتروجيني

الاستنتاجات:

تم الحصول على سلالة *Hapalosiphon arboreus* 3OW05S02 من البيئة المحلية لمدينة الموصل، وكانت نتائج التجارب الفسلجية للسلالة المدروسة تؤكد ارتفاع عملية تثبيت النيتروجين الجوي مع انخفاض بعض المغذيات المطلوبة. وان للضوء أهمية بالغة في التأثير على عملية تثبيت النيتروجين من حيث الطول الموجي للضوء المستخدم. كذلك نسبة اضافة بعض الاملاح المكونة لوسط التنمية له تأثير واضح على النمو والمحتوى البروتيني والنايتروجيني للطحلب السيانوي.

المصادر:

- [1] ALI, G.H. "Phytoplankton (algae)". National research center, water and waste water management program, GTZ project No. 06. 3. (2008).
- [2] Brouwer, P., Brautigam, A., Buijs, V.A., Tazelaar, A.O., Van der Werf, A., Schluter, U. & Schlupepmann, H. In Plant – Science, 8, 442. (2017).

- [3] Sinha, R. International journal of Bioassays , 6, 5386-5388. 4. (2017).
- [4] Snehee, S. & Verma , M. P. The journal of plant science Research, 35 (1) 55 - 58. (2019).
- [5] He , P., Cai, X., Chen, K. & Fu, X. Annals of microbiology, 70 (1), 1-13. (2020).
- [6] Miyawaki, K., Rylarkowski, P. Matsumoto Kitano, Tarkowski, P. Matsu Kato, T., Sato, S., Tarkowska, D., ... & Kakimoto, T. National Academy of sciences 103 (44) 16598-16603. (2006).
- [7] Hoffman, B.M., Lukoyanov, D., Yang, Z.Y., Dean, D.R., Seefeldt, L.C. Next Stage Chem. Rev. 114 (8): 4041-4062. (2014).
- [8] Benediktsson, B., & Bjornsson, R., Quantum Mechanics (Molecular mechanics study of Resting state Vanadium Nitrogenase : Molecular and Slectronic structure of the Iron - Vanadium Cofactor. Inorganic Chemistry. 59(16): 11514-11527. (2020)
- [9] Latysheva, N., Junker, V.L., Palmer, W.J., Godd, G.A. & Barker, D., The evolution of nitrogen fixation in Cyanobacteria. Broinformatics, 28(5): 603-606. (2012).
- [10] Kulasooriya S.A. Faculty of Science, University of Peradeniya, pp. 143.(2008).
- [11] Chakdar, H., & Pabbi, S. "Cyanobacterial Phycobilins: Production, Purification, and Regulation In Frontier Discoveries and Innovations in Interdisciplinary Microbiology" (pp. 45-69). Springer New Delhi. (2016).
- [12] Anderson R. A. "Algal to Culturing Techniques Amsterdam". Ed West Boothbay Harbor. (2005).
- [13] Lpez, C.V.G.; Gareda, M.C.C.; Ferngdez, F.G.A.; Bustos, C.S.; Chisti, Y.; and Sevilla, J.M.F. Bio. Res. Technol., 101: 7587-7591. (2010).
- [14] Hiler, A.; Plazin, J and Slyke, D.D.V., J. Biol. Chem, 176: 1401 - 1420. (1948).
- [15] Al-Shahri, Y.J. Said, H.K., J Rafidain Scie., 27 (1): 95-117. (2018). (In Arabic)
- [16] Rippka, R. "Isolation And Purification Of Cyanobacteria In Methods In Enzymology" (Paker, L. and Glazer, A. N. eds.), 167: 3-112. London. Academic Press. (1988).
- [17] Shukrji, Hiba Khalil Saeed (2012). The impact of a number of heavy metals on some vital events of local isolates from cyanobacterium stabilizers of Oscillator, Nostoc and Anabaena, Master's thesis, Unpublished, College of Pure Sciences Education, Mosul University (In Arabic)
- [18] Al-Taie, Zubaydah Mahmoud Saleh (2012). The effect of some agricultural conditions and nutrients on growth and some activities and vital components of a local isolate of Chlorella Vulgaris, Master Thesis, College of Education, University of Mosul, Iraq.(In Arabic).
- [19] Lowry, O.H.; Rosebrough N. J.; Farr A.L. and Randall R. J., Biol. Chem., 193: 265 275. (1951).
- [20] Sadasivam , S. & Manickam, A. "Biochemical method" 3^{ed}, New Age, International (P) Ltd. Publisher app. 52. (2008).
- [21] Silva , T.E. d.; Detmann, E; Franco, M. and Rocha, G. C. Acta Scientiarum Ani. Sci. 38 (1): 45-51. (2016).
- [22] Bold, H. C. & Wynne, M. J. "Introduction to the algal structure and reproduction". 2nd prentice-Hall. In C. Englewood Cliffs. New Jersey, U.S.A. (1985).
- [23] Prescott G. W., The algal : A Review Teds W. E street and H. B. Glass Houghton Mifflin Co. Boton. (No.04; QK566, p7). (1968),
- [24] Desikachary, TV. "Cyanophyta ICAR Monographs" on algae Indian Council of Agricultural research, New Delhi, p 686. (1959).
- [25] Barnett, J.Z. Effects of Light Quality and light Quantity on the Kinetics of a Louisiana Native microalgal Cyanobacterial Co-Culture. (2015).
- [26] Kirilovsky, D., & Kerfeld, C.A. (BBA)- Bioenergetics, 1817 (1) 158-166. (2012).
- [27] Weare, N.M., Benemann, J.R. Archive for Mikrobiol. 93(2), 112-118. (1973).
- [28] Hoffman, P. F. Geobiology 14 (6): 531-542., (2016).
- [29] Dittrich, M and Li, J., Enu. Micr. 21 (2): 572-583. (2019).
- [30] Raven, J., Plant Rev 48: 67-79. (2018).
- [31] Stanton, D.E.; Batterman, S.; Fisher, J.C.V. and Hedin, L.S., Ecology 100 (9): 279-291. (2019).

- [32] Al-Qassimi, A.H.; Abdul-Razzaq S.. Molecular characterization of intra-diameter isolates of bio-nitrogen and the study of a number of psychochemical variants affecting them, an unpublished Doctoral thesis, College of Education of Pure Sciences, University of Mosul, (2020). (In Arabic)
- [33] Hu, T. L., & Wu, S. C. *Bioresource technology*, 77 (1), 93-95. (2001).
- [34] Mishar, A., & Kumar, S. *Biochemistry*, 42 (4), 681-685. (2007).
- [35] Piorreck, M., Baasch, K.H., & Pohl, P. *Phytochemistry*, 23 (2), 207-216. (1984).
- [36] Berg, A., Danielsson, A., & Svensson, B.H. *Plant and Soil*, 362 (1-2), 271-278. (2013).
- [37] Pereira, S., Zille, A., Micheletti, E., MoradasFerreira, P., De philipis, R. & Tamagnini, p. *FEMS microbiology reviews*, 33(5):917-941. (2009).