دراسة إمكان التحكم في القيمة الغذائية وإنتاج الكتلة الحية لطحلب الكلادوفورا الزاحف *Cladophora crispata* في أوساط تنمية مختلفة

طالب الدراسات العليا: مهند خالد جاسم كلية الزراعة – جامعة دمشق

اشراف الدكتور: عبد الوهاب مرعي + د. عدنان علي نظام

الملخص

في هذا البحث أمكن عزل طحلب الكلادوفورا *Cladophora crispata* الأخضر من نهر بردى (دمشق – مدينة دمر – ربيع 2020) واستزراعه في وسطين اقتصاديين: وسط مياه الصرف الصحي المعقمة ووسط مستخلص التربة ووسط ثالث كيميائي لتنمية الطحالب Bolds Basal Medium (BBM) وذلك ضمن ظروف مخبرية :التهوية باستعمال جهاز ضخ الهواء Aeratingوالإضاءة بحدود 16 ساعة إضاءة: 8 ساعات ظلام، وشدة إضاءة 1800 لوكس، الرقم الهيدروجيني pH=8، درجة الحرارة 25 م°.بالنتيجة، حقق نمو الطحلب المدروس في وسط مياه الصرف الصحي المعقمة أعلى معدل نمو 0.310 خلية / ساعة وأقل زمن تضاعف 0.97 ساعة، تلاه وسط BBM ثم وسط مستخلص التربة حيث كان معدل النمو النسبي 0.27، 0.185 خلية / ساعة، وزمن تضاعف: 1.11، 1.62 ساعة على الترتيب، كما أعطى استزراع طحلب النوع *Cladophora crispata* في وسط مياه الصرف الصحي المعقم أعلى محتوى من البروتين 44% ،واليخضور الكلي 884.5 ميكروغرام /غ، والفينولات الكلية 3223 ميكروغرام /غ من الوزن الجاف للطحلب، كما حقق أعلى نشاط مضاد للأكسدة 51%، بينما تبيّن أن أعلى محتوى كربوهيدراتي وجد في الطحلب النامي في النهر تلاه المستزرع في وسط BBM 45.3 و 41% من الوزن الجاف للطحلب على الترتيب، وأعلى محتوى دهني 9% من الوزن الجاف للطحلب عند استزراعه في وسط مستخلص التربة.كما لوحظ وجود معامل ارتباط سلبي قوي بين المحتوى البروتيني والكربوهيدراتي للطحلب المدروس r=−0.795 في جميع المعاملات.

الكلمات المفتاحية: طحالب كلادوفورا، وسط غذائي BBM، مياه الصرف الصحي، مستخلص التربة، معدل النمو، زمن التضاعف، القيمة الغذائية ، كتلة حيوية .

Studying the possibility of controlling the nutrient value and biomass production of *Cladophora crispata* in different cultivating medium

Abstract

In this research *Cladophora crispata* was isolated from Barada river (Damascus - Dummr City - Spring 2020) and cultivated in tow Economic medium such Wastewater sterile medium (Wsm) and Soil water extracte medium (Swem) and Bolds Basal medium (BBM), algae were growth and development under the lab condition: aeration by aerating pumps, light sources were fluorescent tubes with 16/8 h light/dark period and intensity of illumination 1800 Lux ,PH = 8 and temperature 23 C°. The algae which cultivated in Wsm achieved the highest Growth rate K = 0.310 cell / hour with lowest Generation time G = 0.97 hour. Followed by BBM and Swem medium,the Growth rate was K = 0.27 , 0.185 cell / hour, Generation time G = 1.11 , 1.62 hour respectively, the cultivated *Cladophora crispata* in Wsm gave the highest protein content 44%,total chlorophyll $_{a+b}$ 884.5 µg/g and polyphenols 3223 µg/g of Dw algea and the highest Antioxidant activities value 51 % .While, the highest carbohydrates content found in algae which growth in river followed by BBM 45.3 and 41% of Dw algea respectively, and the highest lipids content 9% of Dw algea was in Swem. also, we noted a negative strong correlation coefficient r = -0.795 was observed between the protein content and carbohydrates content of the algae studied in all treatments .

Key Words:
Cladophora crispata, BBM, Wastewater, Soil water extract, Growth rate, Generation time, Nutrients value, Biomass.

المقدمة

تتميز الطحالب بدور مهم كمنتجات أولية للمواد العضوية في البيئة المائية نظراً إلى قابليتها العالية لتحقيق التركيب الضوئي photosynthesis، واحتلت موقعاً مهماً في السلسلة الغذائية الطبيعية كمصدر غذائي للحيوانات المائية [1]، تقسم الطحالب إلى مجموعات تصنيفية عديدة ويمكن تقسيمها أيضاً حسب الأحجام إلى مجموعتين: الطحالب الدقيقة Microalgae التي تضم الأنواع مفردة الخلية، والطحالب الكبيرة Macroalgae عديدة الخلايا [27]، وتنمو في مدى واسع من بيئات المياه العذبة والبحرية وعلى الشواطئ الصخرية، وعلى الثلوج والرمال وفي الينابيع الحارة والصحارى، وتزرع في البرك المفتوحة والمغلقة، وفي المفاعلات الحيوية الضوئية، ومياه الصرف الصحي وفي مناطق انبعاثات غاز ثنائي أكسيد الكربون في المصانع من أجل إنتاج الكتلة الحيوية للطحالب [37].

ينتمي طحلب الكلادوفورا إلى مجموعة الطحالب الخضراء المجهرية الكبيرة ويحتوي على أكثر من 183 نوعاً [34]، يظهر هذا الطحلب الشعري في المياه بسبب وجود المعذيات مثل الفُسفور والنتروجين القادمة من مياه الصرف الصحي ومخلفات معالجة النبات واستعمال المنظفات [30 ,35]، وتتميز الطحالب بمعدل نمو عال جداً [33]، إذ قُدّرت إنتاجية طحلب *Cladophora crispata* النامي في نهر الغراف – دجلة المار بمدينة الشطرة في محافظة ذي قار – العراق بحدود 8.0475 طن / دونم / سنوياً [21]، ويعتمد التركيب الكيميائي للكلادوفورا إلى حد كبير على الظروف البيئية المحيطة بوسط النمو والفصل من السنة[29]، إضافة إلى تركيز النتروجين والمعادن والفيتامينات في وسط النمو[35] ، وقد تبيّن أن المحتوى البروتيني في طحالب *Cladophora crispata* المستزرعة بلغ 40.3% وأن الحموض الأمينية المكونة لها باستعمال تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة تتكوّن من: الأسبارتيك والفينيل ألانين والتربتوفان [10]، وأمكن تحديد نشاط المركبات الدهنية المستخلصة منها أيضاً ضد مرض الأكياس العذرية مقارنة بالعقار التقليدي البندرازول [23] وتبيّن أن طبيعة هذه المركبات الدهنية: Phthalic acid, diflorophenyl undecyl ester, Nonadecoic acid, Benzendicarboxylic acid, bis (2–ethylhexyl) ester وهي ذات نشاط ضد

الرؤيسات الأولية المكوّنة للسائل العذري، كما أن هذه المركبات الدهنية كانت متقاربة بنشاطها مع الابندازول وبتراكيز أقل.

أما المحتوى الكربوهيدراتي لطحلب *Cladophora crispata* المعزول من مياه أنهار العشار وأبي الخصيب والكرمة في محافظة البصرة كان 280 ميكروغرام / غرام ،وعينت أحاديات السكاريد المكونة له باستعمال تقنية كروماتوغرافيا الغاز وتبين أنها تتكون من الرامينوز والغلالكتوز والزيلوز والريبوز بتراكيز 11.49، 12.3، 10.5، 13.3% على الترتيب [9] ، وأمكن تطبيق الطحالب في مجالات الصيدلة والكيمياء، وكذلك في مجال الزراعة والصناعة كالأسمدة والأعلاف والوقود الحيوي والصناعات الغذائية[38]، وتكوّن طحالب الكلادوفورا المادة الخام لبعض الصناعات الصيدلانية بسبب احتوائها على بعض المركبات ذات النشاط الحيوي كمضادات الأكسدة وضد الأحياء الدقيقة الممرضة، وكمضاد لارتفاع ضغط الدم ومضاد للتخثر، ويوصف لعلاج السكري والقرحة [34]، ونظراً إلى المحتوى العالي من البروتين فإنه يضاف كمكمل غذائي إلى الأغذية البشرية [28]، ولمّا كانت كتلتها الحيوية منخفضة الحريرات وعالية المحتوى المعدني والفيتامينات والألياف فإنها تدخل في مجال الصناعات الغذائية [3]، ويمكن استعمال الكتلة الحيوية لهذه الطحالب بحالتها الصلبة كسماد أو لتعديل تركيب التربة، أما المستخلص السائل لها فيُستعمل كمحفز حيوي لنمو النبات [29].

هدف البحث

هدف هذا البحث إلى التحري عن تأثير ثلاثة أوساط مختلفة للنمو هي الصرف الصحي المعقم ومستخلص التربة و BBM في نمو طحالب الكلادوفورا الزاحفة *Cladophora crispate* وفي تركيبها الغذائي.

مواد البحث وطرائقه

1. جمع الطحلب ، العزل والتنقية

جُمعت الكتلة الحية لطحالب الكلادوفورا من مياه نهر بردى بمنطقة دمر في ربيع عام 2020، وجرى غسل العينة بالماء المقطر مرات عديدة بهدف إزالة جسيمات التربة والمواد العالقة، واستُعملت طريقة التخفيف المتسلسل Serial dilution للحصول على

مزرعة وحيدة الطحلب Unialgal culture بأخذ العينة ووضعها في دورق مخروطي يحتوي على الوسط المعقم Algae culture medium وتركها في الظلام مدة 24 ساعة، ثم أُخذت الخلايا الطحلبية ووضعت مرة أخرى في دورق آخر يحتوي على الوسط المعقم نفسه مدة 24 ساعة، وأُجريت عملية تثفيل للخيوط الطحلبية على سرعة 3000 دورة / د لمدة 5 دقائق ، جُمع الراسب وغسل بالماء المعقم مرات عدة، ومن أجل التأكد من نقاوة الطحلب من البكتريا تمت زراعة الخيوط الطحلبية في أطباق بتري حاوية على وسط الآغار المغذي Nutrient agar وحضنت على درجة حرارة 33 م° مدة 72 ساعة [6].

2. تشخيص الطحلب

اعتمد التشخيص المورفولوجي للطحلب حسب الطريقة التقليدية [36]، بوضع قطرة من الماء المعقم على شريحة زجاجية ثم وضعت خيوط الطحلب وغطيت بساترة زجاجية، فحص الطحلب تحت المجهر الضوئي Olympus-cx41 على قوة تكبير ×10 .

3. زرع الطحلب وإنتاج الكتلة الحية

تم زراعة الطحلب لغرض إنتاج الكتلة الحية منه بنظام زراعة الوجبة الواحدة Batch Culture، إذ تم أخذ 10 غ من العزلة الطحلبية النقية وأضيفت إلى دورق مخروطي يحتوي على 100 مل من وسط ، مع إجراء عملية التحضين لمدة 14 يوماً ضمن حاضنة الزرع وضمن الظروف المخبرية مثل ضخ الهواء والإضاءة بحدود 16 ساعة إضاءة: 8 ساعات ظلام، وشدة إضاءة 1800 لوكس، الرقم الهيدروجيني pH=8، درجة الحرارة 25 م° ، تم حصاد الكتلة الحية في مرحلة الإستقرار[22] .

4.إكثار الطحلب

أجري إكثار الطحلب ضمن ثلاثة أوساط كالآتي:

4-1 وسط مياه الصرف المعقمة على تركيز 10%:

جمعت عينات من مياه الصرف الصحي من أحد المصارف بمنطقة دمر، نقلت إلى المخبر مباشرةً ، ثم تركت مدة ساعتين ليستقر الماء، بعدها تم تصفيتها على مرحلتين: المرحلة الأولى باستعمال ورق ترشيح Whatman №1، والمرحلة الثانية باستعمال ورق

ترشيح Whatman №2. أخضعت عينات مياه الصرف الصحي بعد ذلك لعملية تعقيم على درجة حرارة 120 م° ، مدة 30 دقيقة.

وتم إجراء بعض التحاليل الكيميائية مثل: الكشف عن وجود شوارد الفسفات والنتريت والنترات والكبريتات والكلوريد والنحاس والحديد ضمن مياه الصرف الصحي باستعمال جهاز تقدير الشوراد الآلي Lange – DR2800 [8]، أما لتحديد قيمة pH فاستُعمل جهاز pH Meter، Orion Model 420A.ولإكثار في وسط مياه الصرف الصحي المعقمة، أُخذ 10 غ من كتلة الطحلب (وزن رطب)، وزرعت في حوض زجاجي سعة 3 لترات يحتوي على وسط مياه الصرف الصحي المعقمة 10%، وطبقت عملية التهوية بإستعمال جهاز ضخ الهواء Aerating والإضاءة بحدود 16 ساعة إضاءة: 8 ساعات ظلام، وشدة إضاءة 1800 لوكس، الرقم الهيدروجيني pH=8، درجة الحرارة 25 م°[4].

4-2 وسط مستخلص التربة: أُخذ 10 غ من كتلة الطحلب (وزن رطب)، وزرعت في حوض زجاجي سعة 3 لترات يحتوي على وسط مستخلص التربة المعقم المحضر كالآتي: أخذ 500 غرام تربة زراعية (من عمق 10 سم) وأخضعت لعملية غربلة باستعمال جهاز Cisa-BA200A واستمرت العملية ساعة كاملة للحصول على حُبيبات تربة بحجم 63 ميكرومتر،كما تم التحري عن وجود الكوبالت باستعمال جهاز الامتصاص الذري SpectrAA-880 بطريقة اللهب ،مصدر الطاقة الاستيلين بمعدل تدفق 2.2 لتر / دقيقة ، طول موجة الكشف 240.7 نانومتر[16]. أُضيف لعينة التربة السابقة لتر واحد ماء مقطر، تركت ضمن الهزاز حتى ضمان الحصول على مزيج متجانس، ومن أجل الحصول على مستخلص للتربة جرى الترشيح باستعمال ورق الترشيح على مرحلتين، وأُجريت عملية تعقيم للمستخلص على درجة حرارة 121 م° مدة 20 دقيقة، وتُرك المستخلص حتى يبرد على درجة حرارة الغرفة، ومن ثم تم تحضير وسط مستخلص التربة كالآتي: ماء مقطر 900 مل، مستخلص تربة 100 مل، نترات البوتاسيوم 200 ملغ، حمض الفُسفات ثنائي البوتاسيوم 20 ملغ، كبريتات المغنزيوم

المائية 20 ملغ [11]. و طبّقت نفس الظروف المخبرية المذكورة أعلاه أثناء إكثار الطحلب ضمن هذا الوسط .

4-3 وسط Bolds Basal Medium(BBM): يبين الجدول(1) التركيب الكيميائي لوسط BBM المستخدم في التجربة ، والموجود في مختبرات قسم علم الحياة النباتية من كلية العلوم بجامعة دمشق.

الجدول 1 التركيب الكيميائي لوسط BBM

المكون	الكمية	المكون	الكمية
نترات الصوديوم	0.25 غ/ ل	محلول قلوي من EDTA 5 % وهيدروكسيد البوتاسيوم 3.1 %	1 مل
فُسفات البوتاسيوم أحادية الهيدروجين	0.075 غ/ ل	كبريتات الحديدي المائي 0.498% + 2 نقطة حمض الكبريت	1 مل
كبريتات المغنزيوم المائية	0.075 غ/ ل	حمض البوريك 1.142 %	1 مل
كلور الكلسيوم المائي	0.025 غ/ ل	كبريتات الزنك المائي 0.882 % + كلوريد المغنسيوم المائي 0.144 % +كبريتات النحاس المائية 0.157 % +نترات الكوبالت المائية 0.049 %	1 مل
فُسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين	0.175 غ/ ل	كلوريد الصوديوم	0.025 غ/ ل

كما طبّقت نفس الظروف المخبرية المذكورة أعلاه أثناء إكثار الطحلب ضمن هذا الوسط .

5. تقدير منحنى النمو

أجري تقدير نمو الطحلب قيد الدراسة بإتباع الطرائق القياسية [44] اعتماداً على قياس الكثافة الضوئية بالمطيافية الضوئية على طول موجة 650 نانومتراً، إذ عزلت المادة الطحلبية من وسط الزرع بطريقة التثفيل على سرعة 3000 دورة في الدقيقة مدة

30 دقيقة، لغرض تفكيك الخيوط إلى خلايا، وقد أهمل الراسب وأخذ السائل الطافي للقياس، مع مراعاة أن محلول الشاهد هو وسط الزرع (مياه الصرف الصحي المعقمة، مستخلص التربة، BBM) وحسب معدل النمو وكان التعبير عنه بثابت النمو النسبي، وحُسب زمن التضاعف وفقا للمعادلتين :

$$K = \frac{\text{Log}_{OD_T} - \text{Log}_{OD_0}}{T} X 3.322$$

$$G = \frac{0.301}{K} \quad [20]$$

حيث K: معدل النمو النسبي، خلية / ساعة.

OD_T: الكثافة الضوئية عند نهاية التجربة .

OD_0: الكثافة الضوئية عند بداية التجربة.

T: زمن التجربة .

G: زمن التضاعف، ساعة.

6. تقدير المحتوى المائي للطحلب

أُجري بتجفيف الكتلة الحيوية للطحلب على درجة حرارة 105 م° مدة 2 ساعة حتى ثبات الوزن باستعمال فرن التجفيف Memmert [7].

7. تقدير الرماد

وضعت عينات الطحلب الجافة في المرمدة نوع Wise Therm على درجة حرارة 550 م°مدة 4 ساعات ، وحُسبت كمية الرماد كنسبة مئوية من الوزن الجاف [7].

8. استخلاص الأصبغة وتقديرها

أخذ ثلاثة غرامات من عينة الطحلب الجاف المسحوقة وأذيبت بمقدار 150 مل استون مطلق واستمرت المعاملة بالمذيب طول الليل على درجة حرارة 4 م° . ثم طبقت عملية تنبيذ على المنيذة نمط Heraeus بسرعة 5000 دورة بالدقيقة مدة 5 دقائق ، أخذ الجزء الطافي من

اجل تقدير الاصبغة بالمطيافية الضوئية uv/vis Spectrophotometer model Optizen 2120uv plus [13] .اما حساب كمية الصباغ فقد حسبت بالمعادلات الاتية:

$$Ca = 11.75\ A_{662} - 2.350\ A_{645}$$
$$Cb = 18.61\ A_{645} - 3.960\ A_{662}$$
$$C_{x+C} = 1000\ A_{470} - 2.270\ C_a - 81.4\ C_b/227$$

C_a :اليخضور أ . C_b :اليخضور ب ،C_{x+C} : الكاروتينات والكزانثوفيلات

A_{470} :امتصاص العينة عند طول موجة 470 نانومتر

A_{654} :امتصاص العينة عند طول موجة 654 نانومتر ، A_{662} :امتصاص العينة عند طول موجة 662 نانومتر .و عبر عنها بالميكروغرام لكل غرام طحلب جاف .

أجريت التحاليل بواقع ثلاثة مكررات لكل منها [25] .

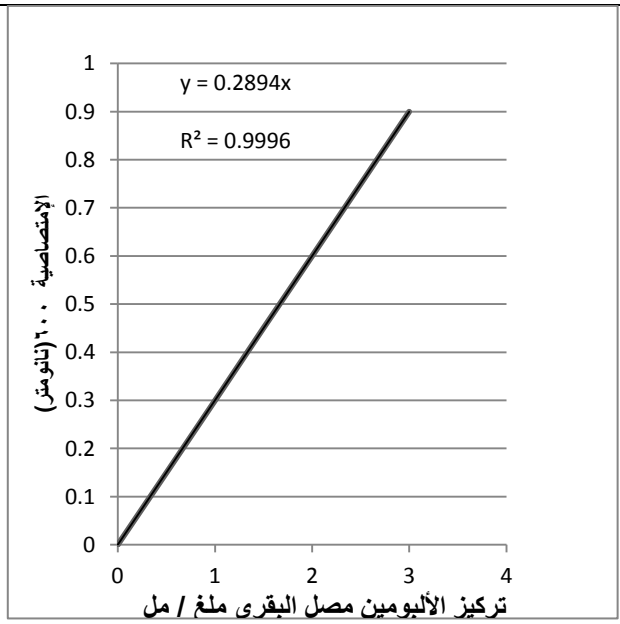
9. استخلاص و تقدير البروتين

استُخلصت البروتينات المذابة من الكتلة الخلوية للطحالب بطريقة الاستخلاص المتعاقب الحمضي – القلوي وفقاً لطريقة التقدير الكمي للبروتين [26]، والتي عدلها سلوكومب وزملاؤه إلى 5 ملغ كتلة طحلب مجففة أُضيف 200 ميكرولتر ثلاثي كلورو حمض الخل 24% مع الخلط جيداً، ثم نقل المزيج إلى حمام مائي بدرجة حرارة 90 م° مدة 15 دقيقة، وترك ليبرد على درجة حرارة الغرفة، وأُجري تمديده بمقدار 600 ميكرولتر ماء مقطر، ثم أُجريت عملية تثفيل على سرعة 5000 دورة في الدقيقة مدة 5 دقائق، استُبعد الطافي أما الجزء الراسب فقد أضيف إليه كاشف لوري D، وحضن طوال الليل في درجة حرارة 55 م° في حمام مائي، وتُرك المزيج على درجة حرارة الغرفة وأُجريت عملية التثفيل في الشروط السابقة نفسها، وأخذ الجزء الطافي إلى أنبوب اختبار جديد.

التقدير الكمي للبروتين: عُومل 25 ميكرولتراً من المستخلص بمقدار 1000 ميكرولتر كاشف لوري D، ومزج مرات عدة وحضن مدة 10 دقائق على درجة حرارة الغرفة، ثم أضيف 100 ميكرولتر كاشف لوري E وحضن المزيج مدة 30 دقيقة الجدول (2)، وأُجريت عملية تقييم الامتصاصية للمزيج على طول موجي 600 نانومتر ، وكان تحضير المحلول القياسي من الالبومين المصل البقري Bovine Serum Albumin على تراكيز 0 حتى 3 ملغ / مل من أجل الحصول على المنحني المعياري شكل رقم 1 أما محلول الشاهد فهو الماء مضاف إليه كاشف لوري D و E [43].

الجدول 2. التركيب الكيميائي لكواشف تقدير المحتوى البروتيني (Slocombe 2013).

الكاشف	التركيب
A	4 غ هيدروكسيد صوديوم مذابة في 1 ل ماء مقطر + 20 غ كربونات صوديوم
B	1 غ طرطرات البوتاسيوم والصوديوم مذابة في 100 مل ماء مقطر
C	500 مغ كبريتات النحاس مذابة في 100 مل ماء مقطر
D	A :B :C (48:1:1)
E	كاشف فولين سيوكالتو



الشكل 1. منحنى معايرة الألبومين المصل البقري Bovine serum albumin

10. استخلاص الليبيدات وتقديرها

جُففت الكتلة الخلوية للطحلب على درجة حرارة 50 م° مدة 3 ساعات، ثم طحنت واستُخلصت الليبيدات بطريقة بليغ – داير [12] ، إذ وُزنت 4 غرامات من الطحلب الجاف وخلطت بمقدار 15 مل مزيج الكلوروفورم : مِتانول بنسبة 1 : 2 حجم إلى حجم بضع دقائق، وترك المزيج مدة 24 ساعة، ثم أُجريت عملية التثفيل على سرعة 3000 دورة / الدقيقة مدة 10 دقائق، واستُخلصت الكتلة الراسبة بمقدار 5 مل من الكلوروفورم مع المزج جيداً، وأُضيف 5 مل ماء مقطر مع المزج، وأجري التثفيل على سرعة 3000 دورة / الدقيقة مدة 10 دقائق، وُزن المستخلص ثم جُمع الطور الليبيدي ذي اللون

الأخضر، وأُزيل المذيب بالتبخير على درجة حرارة 50 م°، وحُسبت كمية الليبيدات كالآتي:

النسبة المئوية لليبيدات = وزن المستخلص (غرام) / وزن الطحلب (غرام) X 100

11. تقدير الفينولات الكلية والنشاط المضاد للأكسدة

استُخلصت الفينولات الكلية وأجري تقدير النشاط المضاد للأكسدة وفقاً[39] مع إجراء بعض التعديلات، بأخذ 5 غ من مسحوق الطحلب الجاف، وحلها مع 125 مل من الإيتانول 60% مع المجانسة، تركت في الحاضنة الهزازة JSR model jssi-100 مدة 12 ساعة على درجة حرارة 30 م°، ثم أُجريت عملية التثفيل على سرعة 8,000×g مدة 5 دقائق، وأُجري ترشيح للجزء الطافي بورق ترشيح Whatman №1، وأُزيل المذيب بالتبخر، ثم جفف المستخلص، وحفظ بالتجميد لحين إجراء القياسات.

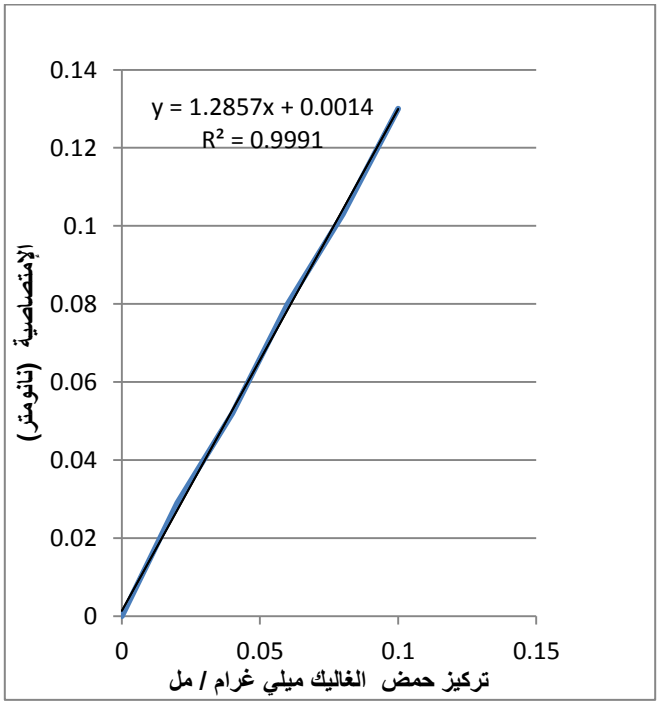
11-1- **تقدير الفينولات الكلية:** قّدرت الفينولات الكلية في المستخلص الإيتيلي باستعمال كاشف فولين [42] ، وحسب تركيز الفينولات الكلية في العينة من المنحنى المعياري لحمض الغاليك، حيث أخذ 1 مل من المستخلص وأضيف إليه 2.5 مل من كاشف فولين ، ثم أُضيف 2 مل من كربونات الصوديوم 2.5% وحضن المزيج 1 ساعة على درجة حرارة الغرفة ثم قيست الكثافة الضوئية للمزيج على طول موجي 750 نانومتراً. وكان المنحني المعياري حُضر على تراكيز من 0 - 120 جزءاً في المليون (ميكروغرام) باستعمال 0.1 غ حمض الغاليك، ثمّ أُكمل الحجم إلى 100 مل. حيث وُضع من 1 حتى 5 مل من المحلول في دورق معياري سعة 100 مل وأُكمل إلى العلامة بالماء المقطر. أخذ 1 مل من كل تركيز في أنبوبة اختبار وأُضيف إليه 0.2 مل من كاشف فولين في دورق معياري سعته 10 مل وحُرّك المزيج نحو دقيقتين في درجة حرارة الغرفة وأُضيف 4 مل من كربونات الصوديوم 2.5%، خُلط المزيج وترك 1 ساعة في درجة حرارة الغرفة، ثم ثُفل وسجّلت نتائج الامتصاص على المطيافية الضوئية على طول موجة 750 نانومتراً. رُسم المنحني على محورين للتركيز و الامتصاصية(الشكل 2)، مع مراعاة عمل محلول قياسي(شاهد) ماء مقطر لضبط الجهاز [42].

11-2- قياس القدرة المضادة للأكسدة: تم إعادة إذابة للخلاصة المجففة للحصول على تركيز 100 ميكروغرام/مل، أُخذ 1 مل من الخلاصة و أُضيف إليها 1 مل من محلول DPPH بالمتانول 0.004%، حضن المزيج مدة 30 دقيقة في الظلام ثم قيست الكثافة الضوئية للمزيج على طول موجي 517 نانومتراً ، وحسبت النسبة المئوية للقدرة المضادة للأكسدة وفق المعادلة التالية:

$$\text{النسبة المئوية للقدرة المضادة للأكسدة} = \frac{At - Ac}{Ac} \times 100$$

حيث Ac : امتصاصية معاملة الشاهد (محلول DPPH بالمتانول).

At : امتصاصية العينة + محلول DPPH بالمتانول [15].

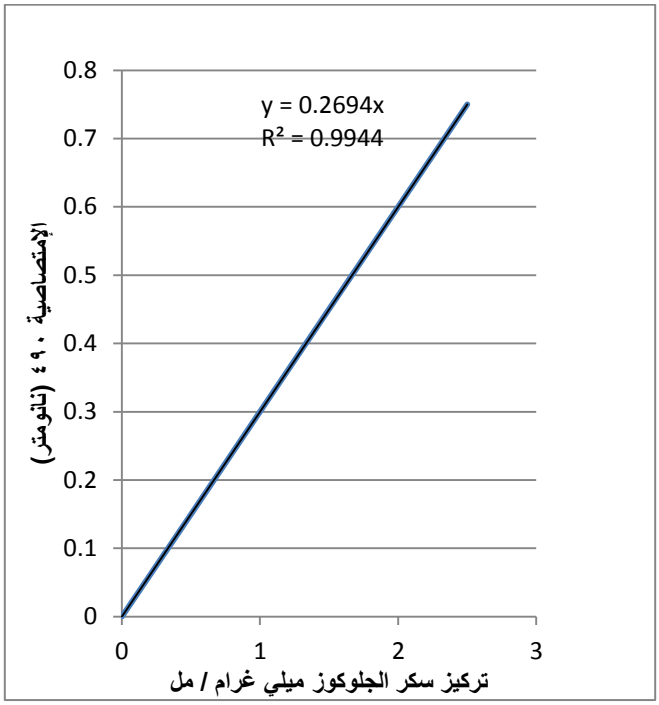


الشكل 2. المنحني القياسي لحمض الغاليك.

12. **استخلاص وتقدير الكربوهيدرات**

استخلصت الكربوهيدرات الكلية الذائبة من الكتلة الخلوية للطحلب وفقاً لطريقة[17]، وذلك بسحق 5 ملغ عينة طحالب جافة مع 5 مل ماء مقطر، ثم أجريت عملية التثفيل

على سرعة 5000 دورة / الدقيقة، بواقع 10 مرات ثم رشح الجزء الطافي.وأُجري تقدير الكربوهيدرات الكلية الذائبة ضمن الكتلة الخلوية للطحلب وفقاً لطريقة فينول حمض الكبريت، حيث أخذ 1 مل من الراشح وأُضيف إليه 1 مل من الفينول(5%) و 5 مل من حمض الكبريت المركز، كان تحريك المزيج ببطء مدة 10 دقائق، ثم نقلت العينة إلى حمام مائي وتركت مدة 10 دقائق على درجة حرارة 30 م°، قُيست الكثافة الضوئية للعينة على الطول الموجي 490 نانومتراً ، حُضر المحلول القياسي من الغلوكوز بتراكيز مختلفة من 0 حتى 3 ملغ/ مل ماء مقطر وأضيف إليها الفينول وحمض الكبريت المركز شكل رقم 3، أما محلول الشاهد فهو الماء[14].



الشكل 3. منحنى المعايرة لسكر الغلوكوز.

13. التحليل الإحصائي

أُجري اختبار تحليل التباين One-Way ANOVA بواقع ثلاثة مكررات لكل اختبار وكان التعبير عن القيمة النهائية كمتوسط الحسابي باستعمال برنامج التحليل الإحصائي Spss-Version 20 عند مستوى معنوية 1%، وحدد معامل الارتباط للقيم المدروسة ضمن المعاملات المختلفة.

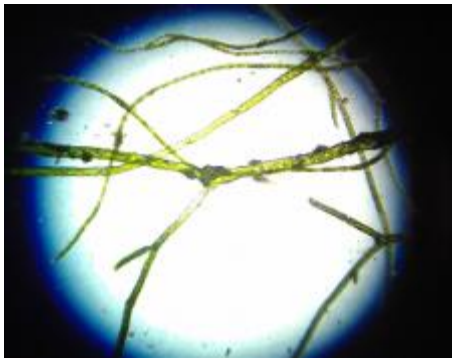
النتائج والمناقشة Results and Discussion

1. نقاوة الطحالب:

أظهرت نتائج زراعة طحالب الكلادوفورا الزاحفة ضمن الوسط الزرعي المغذي الصلب نتائج سلبية تجاه البكتريا لذا لم تضف مواد مضادة أو صادات حيوية.

2. تشخيص الطحالب:

كان الطحلب الخيطي متعدد الخلايا ومتفرع تفريعات متعاقبة، خلاياه أسطوانية الشكل والفروع الجانبية أصغر حجماً من المحور الرئيس، ما يؤكّد أن النوع هو الطحلب الزاحف *Cladophora crispata*، وقد اكتُشف عام 1843 (الشكل 4)، وهو ينتمي إلى الفصيلة Cladophoraceae، والرتبة Cladophorales وصف الطحالب الخضراء Chlorophyceae وشعبة الطحالب الخضراء Chlorophyta [36].أما البلاستيدات الخضراء فقد كانت ذات مظهر شبكي ، وذلك يتفق مع [18] .



الشكل 4. طحلب *Cladophora crispata* تحت المجهر. × **10**

3-التركيب الشاردي والرقم الهدروجيني لمياه الصرف الصحي :

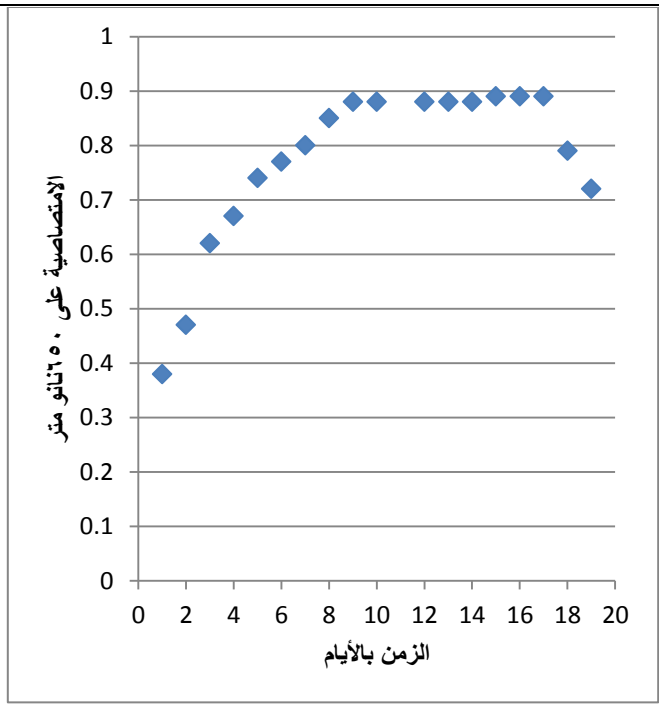
يبين الجدول 3 التركيب الشاردي والرقم الهدروجيني pH لمياه الصرف الصحي المأخوذة من أحد مصارف في منطقة دمر ، من خلال هذا الجدول نجد ان القيم المقاسة تقع ضمن الحدود المقبولة للمواصفة القياسية السورية2581 لعام 2008 الخاصة بالمخلفات السائلة الناتجة عن النشاطات الاقتصادية المنتهية إلى شبكة الصرف العامة [5].ونلاحظ أن المحتوى النتروجيني هو الأعلى بالنسبة لأوساط النمو المستخدمة في البحث.

الجدول 3. التركيب الشاردي والرقم الهدروجيني pH لمياه الصرف الصحي المستعملة في البحث.

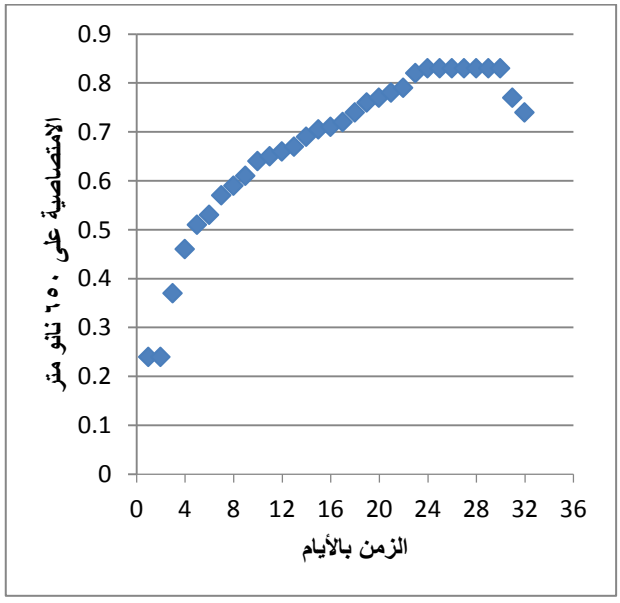
الشاردة	كلوريد	نحاس	حديد	أمونيا	نتريت	نترات	كبريتات	فُسفات	pH
القيمة المقاسة ملغ/ل	0.29	0.526	0.32	12	12	18.4	74	0.88	7

4. منحنى نمو الطحالب:

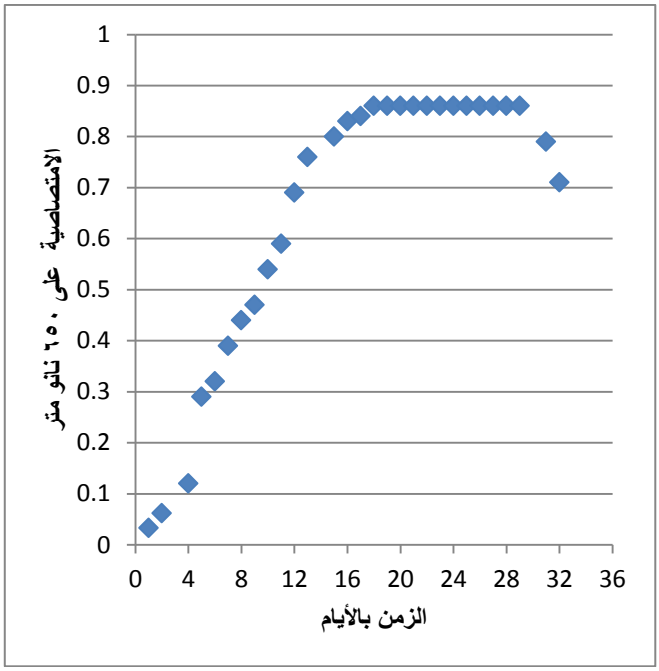
عند القيام بحساب معدل النمو النسبي ،يعزز وسط نمو الطحلب بالعناصر المغذية ويلغى التنافس مع بقية الأنواع الآخرى مع استبعاد الملوثات والسموم [32] .مع ملاحظة تأثير العوامل البيئية التي تؤثر في تركيز الصباغ و المكونات الخلوية الآخرى ضمن الطحلب والتي بدورها تؤثر في تغير معدل النمو النسبي[40]،لذا لم يتم حساب معدل النمو النسبي وزمن التضاعف للطحلب النامي في النهر كون فلورا نهر بردى غنية بالأحياء الآخرى مع عدم إمكانية ضبط كلا من نسبة المواد المغذية و الملوثات المصروف إليه الأمر الذي يزيد من التلوث .يُلاحظ من منحنى النمو لطحلب *Cladophora crispata* في أوساط التنمية: مستخلص التربة، مياه صرف صحي معقمة، وسط BBM (الأشكال 5–7)، أن الطحلب دخل طور النمو اللوغاريتمي في اليوم الثالث واستقر في اليوم التاسع عند استزراعه في وسط مياه الصرف الصحي المعقمة، وأدى استزراعه في وسط مستخلص التربة ووسط BBM إلى بدء طور النمو اللوغاريتمي في اليوم الخامس واستقر في اليوم الثاني والعشرين والسابع عشر على الترتيب ، وبعد طور الإستقرار دخل الطحلب في مرحلة الهبوط في جميع الأوساط ، لذا تم تحديد زمن حصاد الطحلب المستزرع وفقاً لكل وسط نمو، جدول (4) .



الشكل 5. منحنى نمو طحلب *Cladophora crispate* **على وسط الصرف الصحي المعقم 10%.**



الشكل 6. منحنى نمو طحلب *Cladophora crispate* **على وسط مستخلص التربة المعدل.**



الشكل 7. منحنى نمو طحلب *Cladophora crispate* على وسط BBM.

كان معدل النمو النسبي 0.310، 0.27، 0.185 خلية / ساعة، وزمن تضاعف، 0.97، 1.11، 1.62ساعة في أوساط الصرف الصحي المعقمة وBBM ومستخلص التربة على الترتيب؛ إذ حقّق نمو الطحالب في وسط مياه الصرف الصحي المعقمة أعلى معدل نمو وأقل زمن تضاعف تلاه وسط BBM ثم وسط مستخلص التربة (الجدول 4)، وعند مقارنة منحنى النمو للطحلب في أوساط النمو موضوع البحث تبيّن أن وسط مياه الصرف الصحي المعقمة أدت إلى تخفيض مرحلة النمو اللوغاريتمي، ويتفق هذا مع نتائج الباحثين[48]، إذ انخفضت مدة طور النمو اللوغاريتمي، ودخلت الطحالب في طور الاستقرار بزمن مبكر عند استزراع طحلب *Chlamydomonas debaryana* في وسط مياه الصرف الصحي المعقمة، مقارنة بها للطحلب نفسه على وسط مستخلص التربة ووسط Proteose، وتبيّن أن استعمال وسط BBM أدى إلى الحصول على أعلى نمو لطحلب *Cladophora* مقارنة بمعاملة الشاهد (ماء الحنفية) عند أخرين[47]، وكذلك فمن النادر جداً أن ينمو طحلب *Cladophora* في مياه النهر المرشحة أو أوساط تحتوي على المعادن بدون إضافة مستخلص التربة بنسبة 10%؛ ما يؤكد الدور

التحفيزي السريع لمستخلص التربة لنمو طحلب *Cladophora* [19]، وقام Moore and Mclarty بتفسير دور مستخلص التربة بسبب احتوائه على التيامين وخلصوا إلى نتيجة مفادها انه بإمكان أمثلة نمو الطحالب *Cladophora glomerata* عند احتواء 1 لتر من وسط نمو الطحلب على 10 ميكروغرام حمض التيامين إما عن طريق مستخلص التربة أو كفيتامين نقي، أما احتوائه على 1 ميكروغرام تيامين حقق نمواً مرضياً [31] .

الجدول 4. أطوار النمو لطحالب *Cladophora crispata* عند استزراعه في أوساط نمو مختلفة.

وسط التنمية	طور النمو Growth phase				ثابت النمو K	زمن التضاعف generation time G
	الركود lag	اللوغاريتمي log	الاستقرار stationary	الحصاد harvesting		
صرف صحي معقم	2-0	8-3	17-9	15-10	0.310	0.97
مستخلص التربة	4-0	21-5	31-22	29-24	0.185	1.62
وسط BBM	4-0	16-5	29-17	27-19	0.270	1.11

5-المحتوى الكيميائي لطحلب *Cladophora crispata* النامي في النهر و ضمن أوساط الصرف الصحي ، مستخلص التربة و وسط BBM:

ويُلاحظ من الجدول 5 وجود فروق معنوية في التركيب الكيميائي الغذائي للطحلب النامي في النهر وبين الطحلب النامي في أوساط النمو المختلفة (مياه صرف معقمة، مستخلص تربة، BBM)، وظهر ذلك جليًا عند تقدير المحتوى البروتيني، الكربوهيدراتي والدهني .و لوحظ عدم وجود فروق معنوية (0.01) في التركيب الكيميائي الغذائي للطحلب النامي في النهر وبين الطحلب النامي في وسط مستخلص التربة عند تقدير المحتوى من الفينولات الكلية والرماد من جهة ،ومن جهة آخرى بين وسط نمو الصرف الصحي ووسط BBM في محتوى اليخضور a والكاروتينات، ومابين وسط نمو الصرف

الصحي ووسط مستخلص التربة في النسبة المئوية للرطوبة، ومحتوى اليخضور a واليخضور الكلي .

الجدول 5. تباين التركيب الكيميائي الغذائي لطحالب *Cladophora crispata* في أوساط النمو.

المحتوى الغذائي للطحلب	وسط التنمية			
	النامي في النهر	النامي على وسط الصرف الصحي	النامي على وسط مستخلص التربة	النامي على وسط BBM
الرطوبة %	^{a}5.7 ±0.01	^{c}12 ±0.01	^{c}13 ±0.01	^{b}9.5±0.001
الرماد %	^{b}18 ±0.003	^{a}16 ±0.005	^{b}18 ±0.004	^{c}21.5 ±0.005
اليخضور a ميكروغرام/غ	^{a}357.25±0.026	^{bc}528.5 ±0.025	^{c}566 ±0.017	^{b}490 ±0.01
اليخضور b ميكروغرام/غ	^{b}290 ±0.003	^{d}356 ±0.006	^{c}313 ±0.003	^{a}207.8±0.007
اليخضور الكلي ميكروغرام/غ	^{a}647.25 ±0.007	^{b}884.5 ±0.004	^{b}879 ±0.036	^{a}697.8±0.018
الكاروتينات الكلية ميكروغرام/غ	^{b}137.3 ±0.0005	^{a}129 ±0.0004	^{c}144.5 ±0.0002	^{a}120 ±0.004
البروتين %	^{b}25.6±0.003	^{d}44±0.0025	^{c}32±0.002	^{a}17±0.01
كربوهيدرات%	^{d}45.3±0.002	^{a}24±0.01	^{b}28±0.01	^{c}41±0.006
الدهن %	^{b}5.2±0.002	^{a}2±0.002	^{d}9±0.001	^{c}7±0.01
الفينولات الكلية ميكروغرام /غ	^{a}3077±0.012	^{b}3223±0.025	^{a}3150±0.05	^{a}3111±0.002
النشاط المضاد للأكسدة %	^{a}43±0.001	^{d}51±0.01	^{c}49±0.01	^{b}46±0.002

a,b,c,d:إن وجود أحرف متشابهة ضمن الصف الواحد تشير إلى عدم وجود فروق معنوية عند 1%

إذ أن تنمية طحلب *Cladophora crispate* على وسط مياه الصرف الصحي المعقم 10% أدت إلى زيادة في قيم المحتوى الغذائي باستثناء المحتوى الكربوهيدراتي و الدهني والرماد و المحتوى من الكاروتينات بالمقارنة مع الطحلب النامي في النهر، وهذا يتفق مع نتائج الأبحاث الأخرى [41] عند استزراع طحلب *Chaetomorpha linum* في أوساط مختلفة التركيز من مياه الصرف الصحي. ولقد تبيّن عند استزراع طحلب *Cladophora* في وسط يحتوي على 10% مياه صرف صحي و K_2HPo_4 بنسب مختلفة (5–20 مغ/لتر)، فإن الكتلة الحيوية للطحلب المتشكل كانت الأعلى في محتواها من البروتين في معاملات 20 مغ/لتر K_2HPo_4 . مقارنة مع الشاهد بدون إضافة K_2HPo_4، ومع انخفاض تركيز الفُسفور في الوسط انخفضت تكوين الكتلة الحيوية للطحلب، مما أدى لانخفاض في قيمته الغذائية [24] ، ومن خلال الجدول 5 ؛نجد أن تنمية طحلب *Cladophora crispata* في أوساط مرتفعة النتروجين مثل وسط الصرف الصحي المعقم أدى إلى ارتفاع المحتوى البروتيني إلى 44 %وانخفاض المحتوى الكربوهيدراتي والدهني إلى 24 و 2 % على الترتيب. حيث وجد معامل ارتباط سلبي قوي بين المحتوى البروتيني و الكربوهيدراتي r=−0. 837 وآخر متوسط سالب بين المحتوى البروتيني و الدهني r=− 0.574 في جميع المعاملات، وهذا ما يفسر قيم المحتوى الغذائي للطحلب عند استزراعه في وسط BBM – المنخفض النتروجين– الذي أعطى أعلى محتوى كربوهيدراتي 41 % وأقل محتوى بروتيني 17 % مقارنة بوسط مياه الصرف الصحي المعقمة ومستخلص التربة ،ويمكن تعزيز هذه النتائج بملاحظة زيادة قيمة اليخضور الكلي في الأوساط مرتفعة النتروجين مثل وسط مياه الصرف الصحي المعقمة ، ويتفق ذلك أيضاً مع نتائج أخرى إذ تبيّن زيادة قيمة محتوى اليخضور في أوراق الشعير المروي بمياه الصرف الصحي[2]، ويعزى ذلك لاحتواء مياه الصرف الصحي على النتروجين المهم في عملية اصطناع اليخضور، وغياب النتروجين يؤدي إلى نقصان اليخضور وزيادة الكاروتينات [5].وقد تبين من خلال حساب معامل الارتباط وجد ارتباط قوي بين المحتوى البروتيني و المحتوى من اليخضور الكلي r=0.785 في جميع المعاملات . ومن خلال الجدول 5 نلاحظ أن أعلى قيم لليخضور الكلي 884.5

ميكروغرام /غ والفينولات كلية 3223 ميكروغرام /غ والنشاط المضاد للاكسدة 51 %وجدت عند استزراع الطحلب في وسط الصرف الصحي المعقم حيث وجد معامل ارتباط قوي بين النشاط المضاد للأكسدة والمحتوى من اليخضور الكلي ; r=0. 948.وآخر بين النشاط المضاد للأكسدة والمحتوى من الفينولات الكلية0.744=r في جميع المعاملات .ويُلاحظ من الجدول 5 أن تنمية الطحلب في وسط مستخلص التربة وBBM أدى إلى الحصول على أعلى محتوى دهني 9 و 7% على الترتيب، إذ إن التربة تحتوي الكوبالت الذي تستعمله الطحالب الدقيقة من أجل تركيب الفيتامين12B، حيث تؤكد دراسات أخرى أن الفيتامين B12 يحفز إنتاج الدهن [46]،وجاءت نتائج بحثنا متفقة مع ذلك، إذ كانت نسبة الكوبلت 2.479 ميكروغرام / كغ تربة ، وقد بيّنت الأبحاث [47] أن استعمال وسط BBM أدى إلى الحصول على أعلى محتوى دهني لطحلب *Cladophora* مقارنة بمعاملة الشاهد(ماء الحنفية).

الاستنتاجات Conclusion

1-تميز طحلب *Cladophora crispata* النامي في نهر بردى خلال مرحلة الإزدهار الربيعي بمحتوى غذائي جيد، مايلفت الإنتباه إلى حصاده خلال هذه المرحلة .

2- أدى استزراع طحالب *Cladophora crispata* في أوساط نمو مختلفة إلى الحصول على كتلة خلوية متباينة التركيب الغذائي، وازداد تخزين الكربوهيدرات في الكتلة الخلوية مع انخفاض محتوى النتروجين في الوسط، وفي حال وفرته يزداد تركيب البروتين واليخضور على نحو أفضل.

3- في حال الرغبة في الحصول على كتلة خلوية لطحالب *Cladophora crispata* غنية بالبروتين ينصح بتنميتها على وسط مياه الصرف الصحي المعقمة (تركيز 10%).

4- في حال الرغبة في الحصول على كتلة خلوية لطحالب *Cladophora crispata* غنية بالكربوهيدرات ينصح بتنميتها على وسط BBM .

5- في حال الرغبة في الحصول على كتلة خلوية لطحالب *Cladophora crispata* غنية بالدهون ينصح بتنميتها على وسط مستخلص التربة.

التوصيات Recommendations

1. التوسع في الأبحاث المتعلقة بتنمية طحالب المياه العذبة الخضراء لاسيما الطحالب متعددة الخلايا مع التركيز على نسب N:P في بيئات النمو.
2. ينصح بإكثار طحلب *Cladophora crispata* ضمن الظروف المخبرية باستعمال أوساط نمو مثل مياه الصرف الصحي المعقمة (تركيز 10%)، مستخلص التربة و وسط BBM، بغية تامين كتلة حيوية وافرة غنية بالمكونات الغذائية على مدار العام .

References المراجع

[1]-ALI- NIZAM, A. 2008- **Phytoplankton**, Publication of Faculty of Science, Damascus University. **In Arabic.**

[2]- ABBOOD,H.Y and A.W.NASER.2014. Effect of irrigation water quality and nitrogen fertilization on barley growth and some nutrient elements availability.**AL FURAT JOURNAL for Agriculure Sciences** ,VOL.6 (4).475-491. **In Arabic.**

[3]-AKKOZ ,C.;D.ARSLAN, A.UNVER; M.M.OZCAN and B.YILMAZ .2011.Chemical Composition,total phenolic and mineral contents of *Enteromorpha intestinalis* (L.) Kutz. and *Cladophora glomerata* (L.) Kutz. Seaweeds. **J Food Biochem**,VOL. 35.513–523.

[4]-ALAWADY , Z. A and K.A.ALASADY .2012. **Feasibility of *Spirogyra majuscula* and *Cladophora fracta* algae on growth with different concentrations of sewage and bioethanol production**. The Research is a part of Ms.C. University of Al-Qadisiyah. College of Education. Department of Biology. **In Arabic.**

[5]-ARUMUGAM ,M.;A. AGARWAL;M.C. ARYA andZ.AHMED.2013. Influence of nitrogen sources on biomass productivity of microalgae *Scenedes musbijugatus*, **Bioresource Technoloy**, Vol, 131.246–249.

[6]-ANDERSEN, R.A and M.KAWACHI. 2005- **Traditional Microalgae Isolation Techniques** . Algal Culturing Techniques. Academic Press, San Diego, 578p.

[7]-AOAC: Association of Official Analytical Chemists. 2005- **Official methods of analysis.18th Ed**. Gaithersburg,MD,1298 p.

[8]-APHA :American public Health Association.2003- **Standard methods for examination of water and wastewater, 20th Ed.**

[9]-ATHBI,A.M.;D.S.ALI and A.N. ABAAS .2012. The quantity determination of total carbohydrates and monosaccharides from some green algae (Chlorophyta). **Marsh Bulletin**,VOL.7(1).27-38.

[10]-ATHBI,A.M.;D.S.MALI and A.N. ABAAS.2009. Extraction and identification of total proteins and some amino acids in the green alga *Cladophora crispata(Chlorophyta)*. **Mesop. J. Mar. Sci**., Vol.24 (2):140 – 147.

[11]-BELCHER ,H and E SWALE .1982-**Culturing Algae** .Institute of Terrestrial Ecology.Cambridge .25pp.

[12]-BLIGH, EG and WJ.DYER. 1959. A Rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Vol. 37(8):911-917.

[13]-Dere, S.;T.Gunes and R. SIVACI.1998. Spectrophotometric determination of chlorophyll - a, b and total carotenoid contents of some algae species using different solvents. **Turkey Journal of Botany**.Vol:22.P:13-17.

[14]-Dubois,M.; K. A.Gilles; J. K.Hamilton; P. A Rebers, and F. Smith .1956.Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**.vol:28. 350-356.

[15]-FIDRIANNY, I.; N.ANGGRAENI and M. INSANU.2018. Antioxidant properties of peels extracts from three varieties of

banana (Musa Sp.) grown in west Java-Indonesia. **Int Food Res J. Vol**.25(1):57-64.

[16]-Ghaedi .M;A. Shokrollahi ;F. Ahmadi;H.R. Rajabi and M. Soylak.2008. Cloud point extraction for the determination of Copper, Nickel and Cobalt ions in Environmental samples by flame atomic absorption spectrometry. **Journal of Hazardous Materials** vol.150 . 533-540.

[17]- Herbert,D.;P. J.Phillips and R.E.Strange. 1971-**Chemical analysis of microbial cells**.In: Methods in Microbiology .Eds:J.R.Naris and D.W.Robbins. Academic press. London.pp:210-344.

[18]-Hirose,H;T.yamagishi and M.akiyama.1977-**Illustrations of Japans freshwater algae.**uchida rokakuho publishing.Tokyo .Japan. 933p.

[19]-HOFFMAN,R.G.;J.A.LASATER and L.W.HOUK. 1974.Nutrient limitation of algal growth in the Eau Gallie river,**Bullentin of Environmental Contamination and Toxicology**, Vol.12.587-593.

[20]-HUANG., X.H.;C.L.LI; C.W.LIU and Q.ZENG. 2002a. Studies on the Ecological factors of *Oocystis borgei*. **J. Zhanjiang Ocean Univ**.,Vol, 22(3). 8-12.

[21]-JASSIM ,J.M and J.T.AHMED.2010.Study of nutrition value chemical compoution and dry mater yield of *Cladophora crispata*.**J.Misan for Academic Research**,Vol.16 (8).254-261. **In Arabic**.

[22]-Kawaguchi, K. 1980. Microalgae production systems in Asia algae biomass. **J. Biomed**.vol 4. 25-33.

[23]-KHALAF,A.Kh.;S.H.Al-MAYAHandA.M.ATHBI.2011. Antiprotoscolices activity of nonadecoic acid ; phthalic acid, diflorophenyl undecyl ester and 1,2- Benzendicarboxylic acid , Bis (2-Ethylhexyl) ester extracted from *Cladophora crispata* and Hapalosihon aureus Compared with Albendazole. **Thi-Qar Medical Journal (TQMJ),** Vol(5) 2. 69-81.

[24]-KHUANTRAIRONG,T and S.TRAICHAIYAPORN. 2011. The nutritional value of edible freshwater alga *Cladophora sp*. (Chlorophyta) grown under different phosphorus concentrations. **Int J Agric Biol**,Vol 13.297-300.

[25]-LICHTENTHALER,H.KandA.R.WELLBURN.1985. Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b or leaf in dissolved solvents. **Biol. Soc. Trans,**Vol.11.591-592.

[26]-LOWRY,O.H.;N.J.ROSEBROUGH;A.L.FARR and R.J. RANDALL.1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent, **J. Biol. Chem,Vol.** 193. 265-275.

[27]-Mchugh, D- 2003.**Guide To The Seaweed Industry**. Rome .FAO Fisheries Technical Paper441 .118p.

[28]-MESSYASZ,B.;B.LESKA ; J.FABROWSKA;M.PIKOSZ;C.Roj; A. EDWARD andG.SCHROEDER.2015. Biomass of freshwater *Cladophora* as a raw material for agriculture and the Cosmetic Industry. **Open Chem**,VOL. 13.1108-1118.

[29]-MICHALAK,I and B.MESSYASZ.2020. Concise Review of *Cladophora sp.*: Macroalgae of Commercial Interest. **Journal of Applied Phycology**, VOL. 33.133-166.

[30]-MIHRANYAN,A.2011.Cellulose from cladophorales green algae: from Environmental problem to high-tech composite materials. **J Appl Polym Sci**,Vol. 119.2449-2460.

[31]-MOORE, L.F and D.A. MCLARTY .1975.The influence of soil water extract and thiamine on growth of *Cladophora glomerata*.**Canadian Journal of Botany** ,Vol .53.530-535.

[32]-Morin, S;M. Coste and F. Delmas.2008. A comparison of Specific Growth rates of periphytic Diatoms of varying cell size under laboratory and field conditions. **Journal of Hydrobiologia**,vol. 614.285-297.

[33]-MULBRY,W and A.WILKIE.2001.Growth of Benthic freshwater algae on dairy manures.**J.Appl. Phycol** ,VOL.301-306.

[34]-MUNIR,M.;R .QURESHIB; M.BIBI and K.A.MAHMOOD .2019. Pharmaceutical aptitude of *Cladophora*: a comprehensive review. **Algal Research,VOL**. 39 (101476).1-10.

[35]-PARKER, J.E and S.C.MABERLY. 2000. Biological response to lake remediation by phosphate stripping: control of *Cladophora*. **Freshw Biol** ,VOL.44.303-309.

[36]-PRESCOTT, G.W. 1975- **Algae of The Westeren Great Lake Area**. Willam C.Brown Publisher Dubugue. Towa6th Ed,. 977P.

[37]-RAMARAJ, R and N. DUSSADEE .2015. Biological Purification processes for Biogas using algae cultures: a review. **Int J Sustain Green Energy Special Issue: Renew Energy Appl Agric Field Nat Resour Technol**, VOL.4.20-32.

[38]-RAMARAJ,R.;N.DUSSADEE and N.WHANGCHAI .2015.Microalgae biomass as an alternative substrate in Biogas production. **Int J Sustain Green Energy Special Issue: Renew Energy Appl Agric Field Nat Resour Technol**, VOL.4.13-19.

[39]-SANTOSO, JS. ;Y.YOSHIE and T.SUZUKI.2004. Anti-oxidant activity of methanol extracts from Indonesian Seaweeds in an oil emulsion model. **Fisheries Science**,Vol. 70(1). 183-188.

[40]-Schlesinger,A. D and J.B. Shuter.1981. Patterns of growth and cell composition of freshwater algae in light-limited continuous cultures.**J.phycol**.vol.17.250-256.

[41]-SHIJIAN ,GE and C .PASCALE .2017. Cultivation of the Marine macroalgae *Chaetomorpha linum* in municipal wastewater for nutrient recovery and Biomass production. **Environmental Science and Technology journal**. Vol.51(6).3558-3566.

[42]-SLINKARD,K and V.L.SINGLETON.1977. Total phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. **American Journal of Enology and Viticulture**,Vol. 28(1).49-55.

[43]-SLOCOMBE,S.;M.PROSS;N.THOMAS;S.MCNEILL and M.S.STANLEY.2013. a Rapid and General method for Measurement of protein in Micro-Algal Biomass, **Bio Resource Technol**,Vol. 129. 51-57.

[44]-STEIN,J.1973-**Handbook of Phycological Method**. Cambridge Univ. Press. Cambridge, 445p.

[45]-Syrian Arab Organization for Standardization and Metrology.2008- **Liquid Waste resulting from Economic activities that Ended in the Public Sewage Network**. Damascus :Syria,20p. **In Arabic.**

[46]-TEO,C.L.; L.W.LAI and I. ANI.2013- **Comparison of Walne and F_2 medium in cultivating *Tetraselmis* sp. and *Nannochloropsis sp.* for Biomass and lipid production**, International Conference on Industrial Engineering and Management Science Shanghai,China.545p.

[47]-VERAWATY, M.;E. MELWITA; P.APSARI and M.WIYAHSARI .2017. Cultivation strategy for freshwater Macro- and Micro-Algae as Biomass stock for Lipid production. **J. Eng. Technol. Sci**.,Vol. 49, No. 2. 261- 274.

[48]-ZHANG,B.;L.WANG;R.HASAN and A,SHAHBAZI .2014. Characterization of a native algae species *Chlamydomonas debaryana* :strain selection,bioremediation ability and lipid characterization.**Bio Resources,Vol** . 9.(4).6130-6140.