عزل واستزراع الطحلب الأزرق المخضر *Chroococcus turgidus* في محلول التربة مع تحديد إنتاجية كتلته الحيوية للبروتين

د. جورج حنا ديب* علي عبد السلام بكداش**

ملخّص

تم في هذا البحث عزل الطحلب الأزرق المخضر *Chroococcus turgidus* من مجرى النهر الكبير الشمالي واستزراعه في الوسط الزرعي المعدل Chu-10، بعد ذلك تم استزراع الطحلب المدروس في محلول التربة ضمن تراكيز مختلفة (25–50–75) مل/ل، تم قياس تركيز اليخضور(أ) كل أسبوع وكان أعلى تركيز 1.86ميكروغرام/مل في الأسبوع الخامس للطحلب المستزرع في الوسط الزرعي الصنعي المعدلChu-10 بالمقابل سجل 1.65ميكروغرام/مل كأعلى تركيز عند استزراع الطحلب المعزول في محلول التربة عند تركيز 75 مل/ل بيمنا كان 0.71 ميكروغرام/مل أقل تركيز لليخضور(أ) عند تركيز 25 مل/ل في الأسبوع الخامس من الاستزراع. كانت نسبة البروتين في الكتلة الحيوية الجافة للطحلب المستزرع في الوسط الزرعي المعدل Chu-10 13.6%بينما سجلت عند الطحلب المستزرع في محلول التربة (3.2, 4.9 , 9.7)%عند التراكيز 75 ,25 50 , على التوالي.

الكلمات المفتاحية: استزراع، محلول تربة، *Chroococcus turgidus*،Chu-10

*أستاذ– قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية. deebgeorge009@gmail.com

**طالب دكتوراه اختصاص علم الحياة النباتية – قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية. ali095511@gmail.com

Isolation and cultivation of blue-green algae *Chroococcus turgidus* in the solution soil with the determination of the productivity of its protein biomass

Dr. George Hnna Deeb * **Ali Abd Alsalam Bkdash ****

ABSTRACT

In this research, the blue-green alga *Chroococcus turgidus* was isolated from the Great Northern riverbed and cultured in Chu-10 amendment culture medium, After that, the studied algae was cultured in the soil solution at different concentrations (25-50-75) ml/l, the chlorophyll (a) concentration was measured every week and the highest concentration was 1.86 µg/ml in the fifth week for algae cultured in Chu-10-centered artificial culture medium. At the concentration of 75 ml/L whereas was 0.71 µg/ml the lowest concentration of chlorophyll (a) at a concentration of 25 ml/L in the fifth week of culture. The percentage of protein in the dry biomass of algae cultured in the Chu-10 hub was 13.6%, while it was recorded for algae cultured in the soil solution (9.7, 4.9, 3.2)% at concentrations of 75, 50, 25, respectively.

Keywords: culture, solution soil, *Chroococcus turgidus***,** Chu-10**.**

*Professor - Department of Botany - Faculty of Science - Tishreen University-Lattakia-Syria. deebgeorge009@gmail.com

** Ph.D. Student in Plant Biology - Department of Plant Biology - Faculty of Science - Tishreen University - Lattakia - Syria. ali095511@gmail.com

1- مقدمة:

الطحالب الزرقاء المخضرة Cyanophyta هي أبسط أنواع الطحالب وأقلها رقيا وأقدمها وجوداً على ظهر الأرض (بدائية النواة Prokaryotic)، عرفت باسم الطحالب اللزجة Myxophyta حيث تحتوى على غمد هلامي لزج حول الخلايا مثل طحلب Nostoc، شوهد بعضها في حفريات قديمة تقدر عمرها إلى ما يقرب 3000 مليون سنة، تعيش في بيئات مختلفة فهي واسعة الانتشار ومتأقلمة مع كافة الظروف البيئية [2,1].

تعد من أبرز المصادر الطبيعية الغنية بالعناصر الغذائية التي نادراً ما تتوافر بهذا التركيز في مصدر واحد حيث تحتوي على نسب عالية من الفيتامينات المضادة للأكسدة وعناصر الحديد والبيتا كاروتين والمغنيزيوم والكالسيوم. وهي غنيّة بالبروتينات نظراً إلى احتوائها على الأحماض الأمينية الأساسية، وبعض الأحماض الأمينية غير الأساسية إضافة إلى أنها تنمو بمعدل 25 مرة أسرع من المحاصيل الغذائية التقليدية ، ولا تحتاج إلى التنافس على الأراضي الصالحة للزراعة ، فضلاً عن قيمتها الصحيّة التي ما تزال الأبحاث تضيف إليها يوماً بعد يوم لذلك استوجب استزراعها واكثارها والاستفادة منها[3].

2- هدف البحث:

تستخدم الطحالب الزرقاء المخضرة المستزرعة اليوم كغذاء للإنسان في بعض الدول كاليابان، وكعلف للأنواع المائية المستزرعة مثل الرخويات والمراحل اليرقية المبكرة للأسماك والقشريات، بالتالي إنتاج الطحالب الزرقاء المخضرة يعد أمرًا أساسيًا للعديد من التطبيقات التجارية، فهناك حاجة لتقنيات الإنتاج التي تزيد من الإنتاجية وتكون مربحة اقتصاديًا وهذا دعانا إلى:

1-عزل الطحلب الأزرق المخضر *Chroococcus turgidus* من مصب النهر الكبير الشمالي في محافظة اللاذقية.

2- استزراع *Chroococcus turgidus* في وسط رخيص الثمن (محلول التربة).

3- مقارنة تركيز اليخضور(أ)، ونسبة البروتين في الكتلة الحيوية للطحلب المعزول المستزرع في محلول التربة والوسط الصنعي المعدل Chu-10.

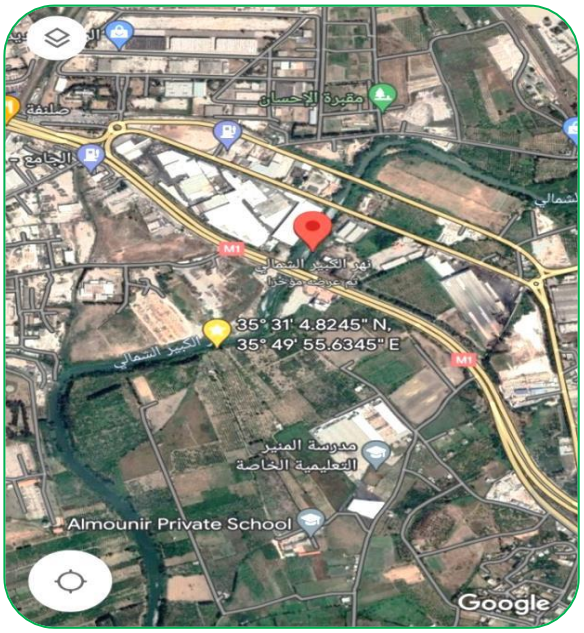
3-مواد وطرائق البحث

3-1- موقع الدراسة:

- مجرى النهر الكبير الشمالي في محافظة اللاذقية.
- كلية العلوم-جامعة تشرين.

3-2-جمع العينات:

تم جمع عينات الطحلب من مجرى النهر الكبير الشمالي(الشكل 1) باستخدام عبوات بولي ايتلين سعة 1000مل في بداية شهر تموز عام 2022م ونقلت إلى مختبر الدراسات العليا (كلية العلوم_جامعة تشرين) حيث تم تثبيت جزء من العينات بالفورمالين بتركيز(4%) بهدف دراستها مجهريا بينما ترك الجزء الآخر دون تثبيت لغرض استزراع الطحلب المراد عزله .



الشكل1: خريطة لمجرى النهر الكبير الشمالي

3-3-عزل الطحلب:

ثقلت العينات باستخدام جهاز الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة/دقيقة لمدة 3دقائق، أهمل الراشح وأخذ الراسب وفحص تحت المجهر الضوئي عند قوة تكبير (40x) للتأكد من النوع الطحلبي *Chroococcus turgidus* المراد عزله وتصنيفه ودراسة خصائصه[6,5,4].

بعد ذلك استزرعت العينات في حوجلات زجاجية سعة 500 مل وذلك بإجراء سلسلة تخفيف لكل عينة (10^{-5}) وإكمال الحجم إلى 350 مل من الوسط الزرعي السائل المعدلChu-10 [7] وتكرار التخفيف للحصول على عزلات وحيدة الطحلب Unialgal cultures.

نقلت الحوجلات إلى وحدة استزراع العوالق النباتية (قسم علم الحياة النباتية-كلية العلوم -جامعة تشرين) وحضنت تحت ظروف الزرع الملائمة من درجات حرارة وإضاءة (حرارة 25 ±2 مْ،شدة إضاءة 2500 لوكس، ونوبة ضوئية 16ضوء:8 ظلام) مع تحريك الحوجلات وتبديل أماكنها كل 8 ساعات حتى الحصول على نمو مناسب للمزرعة الطحلبية.

3-4-تنقية الطحلب:

بعد الحصول على عزلة وحيدة الطحلب يتم تنقيتها من الجراثيم والفطريات ، حيث أخذت المزرعة الطحلبية ومزجت بالماء المقطر المعقم وتم تثفيلها لمدة دقيقتين بسرعة 3000 دورة /دقيقة بعد ذلك أخذت الرسابة ومزجت بالماء المقطر المعقم وكررت العملية عدة مرات، بعد ذلك زرع قسم من العينة الطحلبية المثفلة على الوسط الزرعي الفطري الصلب Potato Dextrose Agar (P.D.A) وحُضنت الأطباق بدرجة حرارة 25°م لمدة 5 أيام، كما أخذ قسم آخر من العينة الطحلبية المثفلة وزرع على الوسط الزرعي الجرثومي الصلب Nutrient Agar وحُضنت الأطباق بدرجة حرارة 37°م ولمدة 48 ساعة، وكررت العملية عدة مرات حتى تم التأكد من عدم نمو فطريات وجراثيم على

الأوساط المغذية وبذلك يتم الحصول على عزلة نقية من الطحالب خالية من النمو الفطري والجرثومي[8].

3-5-تحضير محلول تربة:

حضر بإضافة 500 غرام من التربة (تربة حديقة الصنوبر في كلية العلوم، حيث لا تحتوي على أسمدة أو مبيدات كيميائية أو مواد سامة) إلى 1000مل من الماء المقطر، حرك جيداً ووضع في الأوتوغلاف لمدة نصف ساعة بعد ذلك رشح وأخذت الرشاحة وعقمت لمدة 20دقيقة ثم حفظت في مكان بارد لحين الاستخدام.

3-5-استزراع الطحلب المعزول في محلول التربة:

تم إضافة التركيز 1مل من المزرعة الطحلبية المعزولة إلى حوجلات زجاجية سعة 2000 مل حاوية على 1500مل من محلول التربة بتراكيز (25-50-75) مل/ل بواقع 4 مكررات، حضنت الحوجلات تحت ظروف الزرع الملائمة من درجات حرارة وإضاءة (حرارة 25 ±2 مْ، وشدة إضاءة 2500 لوكس، ونوبة ضوئية 16ضوء:8 ظلام) مع تحريك الحوجلات وتبديل أماكنها كل 8 ساعات حتى الحصول على نمو مناسب للمزرعة الطحلبية وعدم حدوث تكتل والتصاق الطحلب على جدران الحوجلات، كما تم إضافة التركيز 1مل من المزرعة الطحلبية المعزولة إلى حوجلات زجاجية سعة 2000 مل حاوية على 1500مل من الوسط الزرعي السائل المعدلChu-10 للمقارنة مع محلول التربة.

3-6-قياس تركيز اليخضور(أ):

تم قياس تراكيز الكلوروفيل(أ) كل أسبوع لمدة 5 اسابيع من خلال ترشيح 100مل من المزرعة الطحلبية كل أسبوع بواسطة أوراق ترشيح(0.45)ميكرون ثم وضعت أوراق الترشيح في أنابيب اختبار زجاجية سعة 20سم^3 ذات غطاء محكم، وأضيف لها 10سم^3 من الأسيتون(90%)، نقلت إلى الثلاجة لتحفظ عند الدرجة 4^{o}م لمدة 24ساعة وبعدها وضعت في جهاز الطرد المركزي بسرعة 3000دورة/دقيق واخذ الراشح وقيست الامتصاصية باستخدام مقياس الطيف الضوئي Spectrophotometric (الشكل2) على طول موجي (750_0) نانومتر و (665_0) نانومتر، ثم أضيف قطرتين من حامض

الهيدروكلوريك (HCl) ذو عيارية (N0.1) ومزج الخليط بشكل جيد لمدة 5دقائق، قيست الامتصاصية على نفس الاطوال الموجية (750_a) نانومتر و (665_a) نانومتر وحسب التركيز بـ ميكروغرام/مل (µg/ml) من المعادلة التالية:

$$\text{Chlorophyll a} = 11.4 \times K \times \{(E665_0 - E750_0) - (E665a - E750a)\} \times Ve / L \times Vf \quad [9]$$

إذ أن:L=طول الخلية الضوئية المستخدمة في القياس(سم).

Ve=حجم الأسيتون المستخدم في استخلاص صبغة اليخضور(أ)(سم^3).

Vf =حجم العينة المرشحة(مل).

K=ثابت يساوي2.43

الشكل2:مقياس الطيف الضوئي Spectrophotometric

3-7-تحديد نسبة البروتين في الكتلة الحيوية:

أخذ 0.5 غرام من عينة الطحالب الجافة ثم يتم مزج العينة وطحنها بشكل جيد، يضاف لها 20 مل من ثلاثي كلور حمض الخل بتركيز 10% لضمان ترسيب البروتين وذلك بعد ضبط الأس الهيدروجيني ليكون معتدل باستخدام فوسفات البوتاسيوم، حُل الراسب الناتج بـ 20 مل من ماءات الصوديوم و حُرك حتى تمام الذوبان للحصول على مستخلص البروتين، أخذ 1مل من محلول البروتين الناتج أضيف له 5 مل من كبريتات النحاس القلوي وحضن في درجة حرارة الغرفة لمدة 10دقائق، بعد ذلك أضيف 5 مل من كاشف فولين فينول ويتم الحضن في درجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة وقيست

الامتصاصية باستخدام Spectrophotometric على طول موجة 660 نانومتر [11,10].

4-النتائج ومناقشتها

4-1-خصائص الطحلب المعزول:

الشعبة:	Cyanophyta	Division**:**
الصف:	Cyanophycophyceae	Class:
الرتبة:	Chroococcales	Order:
الفصيلة:	Chroococcaceae	Family:
الجنس:	*Chroococcus*	Genus:
النوع:	*Chroococcus turgidus*	Type :

طحلب ذو لون أزرق مخضر أو أصفر مائل للأصفرار وحيد الخلية كروي الشكل محاط بغمد مخاطي(الشكل 3) يتواجد في البرك وفي المياه الراكدة يتراوح حجم الخلية بين 1-10 مللي ميكرون، يتكاثر بواسطة الانشطار أو الانقسام الثنائي البسيط، تتكون السيتوبلازم من منطقتين (منطقة مركزية عديمة اللون ومنطقة محيطية ملونة) يحيط بهما غلاف هلامي رقيق يحمي الطحلب من الجفاف والحرارة.

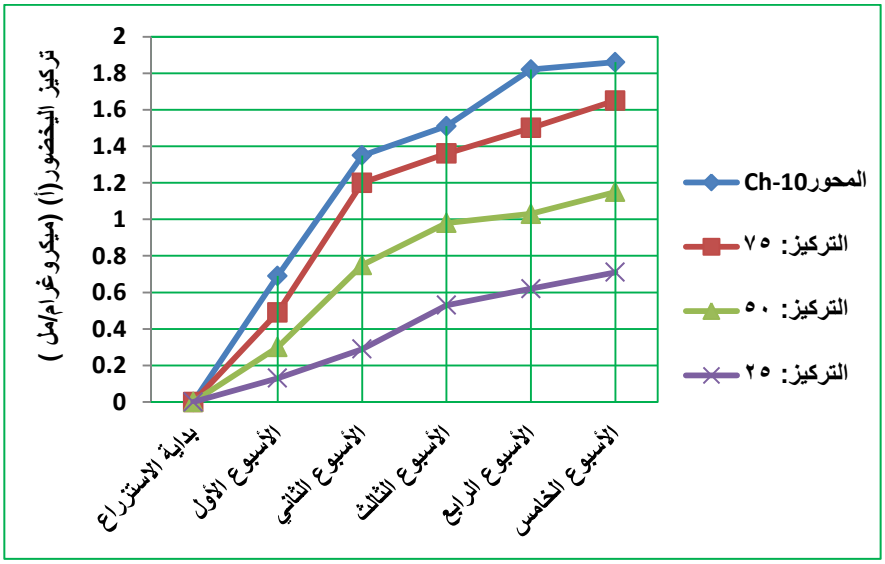
الشكل3:الطحلب الأزرق المخضر *Chroococcus turgidus*

4-2- قياس تركيز اليخضور(أ):

إن قياس تركيز اليخضور(أ) يعبر عن الكتلة الحية للعوالق النباتية ومدى كفاءة التركيب الضوئي للمسطح المائي وتختلف تراكيزه في العوالق النباتية باختلاف الأنواع [14,13,12].

من خلال النتائج التي حصلنا عليها (الشكل5,4، الجدول1) لاحظنا ازدياد تراكيز اليخضور(أ) مع ازدياد زمن القياس نتيجة زيادة تكاثر ونمو الطحلب *Chroococcus turgidus* وكان أعلى تركيز لليخضور(أ) 1.86ميكروغرام/مل في الأسبوع الخامس للطحلب المستزرع في الوسط الزرعي الصنعي المعدلChu-10 بالمقابل سجل 1.65ميكروغرام/مل كأعلى تركيز لليخضور(أ) عند استزراع الطحلب *Chroococcus turgidus* في محلول التربة عند تركيز 75 مل/ل بيمنا كان 0.71 ميكروغرام/مل أقل تركيز لليخضور(أ) في محلول التربة عند تركيز 25 مل/ل في الأسبوع الخامس من الاستزراع، هذا يتفق مع دراسة[15] سجل فيها تركيز اليخضور(أ) 2511.9 ميكروغرام/ل بعد 16يوم من استزراع الطحلب *Chroococcus turgidus* حيث يمكن أن يؤثر نوع الوسط الزرعي (المغذيات) وقيمة pH على تركيز اليخضور(أ) [16] فمثلا عند استزراع طحلب *Spirulina platensis* بوسط BG11 و BG11 المعدل كان تركيز اليخضور(أ)11.31 ملغ/غ و 9.5 ملغ/غ على التوالي عند قيمة pH=8 وتراجع النمو وتركيز اليخضور(أ) عند قيمة pH=10.

الشكل4: الطحلب الأزرق المخضر *Chroococcus turgidus* في الوسط الزرعي الصنعي المعدلChu-10 و وسط محلول التربة



الشكل5: رسم بياني لتركيز اليخضور(أ) للطحلب *Chroococcus turgidus* في الوسط الزرعي الصنعي المعدلChu-10 و وسط محلول التربة

الجدول 1: قياسات تراكيز اليخضور(أ) للطحلب *Chroococcus turgidus* في الوسط الزرعي الصنعي المعدلChu-10 و محلول التربة

	قياس تركيز اليخضور(أ) بـ ميكروغرام/مل			
	الوسط الصنعي	وسط محلول التربة		
	Chu-10 المعدل	التركيز 75	التركيز 50	التركيز 25
بداية الاستزراع	0	0	0	0
الأسبوع الأول	0.69	0.49	0.30	0.13
الأسبوع الثاني	1.35	1.20	0.75	0.29
الأسبوع الثالث	1.51	1.36	0.98	0.53
الأسبوع الرابع	1.82	1.50	1.03	0.62
الأسبوع الخامس	1.86	1.65	1.15	0.71

4-2- تحديد نسبة البروتين في الكتلة الحيوية:

من خلال النتائج التي حصلنا عليها (الجدول2) بلغت نسبة البروتين في الكتلة الحيوية الجافة للطحلب الأزرق المخضر *Chroococcus turgidus* المستزرع في الوسط الزرعي المعدل Chu-10 13.6% بينما سجلت نسبة البروتين في وسط محلول التربة (3.2, 4.9 , 9.7)%عند التراكيز 25, 50 , 75 على التوالي، بمقارنة مع دراسة [17]على النوع *Microcystis aeruginosa* وصلت نسبة البروتين في الكتلة الحيوية الجافة 4.13%، وفي دراسة على النوع *Chroococcus turgidus* وصلت نسبة البروتين في الكتلة الحيوية الجافة 17.8% عند استزراعه في الوسط CFTRI تحت نوبة ضوئية 12ضوء:12ظلام حيث يمكن ان يزداد اصطناع البروتين بازدياد فترة الإضاءة والمغذيات الآزوتية[18].

الجدول 2: نسبة البروتين في الكتلة الحيوية الجافة *Chroococcus turgidus* في الوسط الزرعي الصنعي المعدلChu-10 و محلول التربة.

	الوسط الصنعي	محلول التربة		
	Chu-10 المعدل	التركيز 75	التركيز 50	التركيز 25
نسبة البروتين في الكتلة الحيوية الجافة التي تم الحصول عليها	13.6	9.7	4.9	3.2

5-الاستنتاجات والتوصيات:

1-إمكانية استخدام وسط محلول التربة كبديل عن الوسط الصنعي في استزراع الطحلب *Chroococcus turgidus* كونه رخيص الثمن وصديق للبيئة ومتوفر بشكل دائم.

2-إنتاجية البروتين في الكتلة الحيوية الجافة للطحلب المستزرع في وسط محلول التربة كانت الأفضل عند تركيز 75%.

6-التوصيات:

1-الأهمية بمكان تدعيم الدراسة باختبار أنواع ونسب الحموض الأمينية في بروتينات الكتلة الحيوية الجافة للنوع المدروس لإمكانية استخدامها كغذاء للإنسان.

2-دراسة انواع اخرى من الطحالب الزرقاء المخضرة ذات مردود عالي من البروتين.

7-المراجع:

1. CARR, N. G., & WHITTON, B. A. (EDS.)1973- **The biology of blue-green algae** (Vol. 9). Univ of California Press.
2. BULLERJAHN, G. S., & POST, A. F2014- Physiology and molecular biology of aquatic cyanobacteria. **Frontiers in microbiology**, 5, 359.
3. KOLI, D. K., RUDRA, S. G., BHOWMIK, A., & PABBI, S. 2022. Nutritional, Functional, Textural and Sensory Evaluation of Spirulina Enriched Green Pasta: A Potential Dietary and Health Supplement, **Foods**, 11(7), 979.
4. Komárek, J., & Novelo, E. 1994. Little known tropical Chroococcus species (Cyanoprokaryotes). **Preslia, Praha,** 66, 1-21.
5. AL-HUSSIENY, A. A. 2018. **Atlas of The Algae in The Iraqi Aquatic Environment.**
6. EDWARD G, BELLINGER AND DAVID CS 2010- **Freshwater Algae Identification and Use as Bioindicators. Antony Rowe, Ltd**. Chippenham, Wilts. pp. 285.
7. AL-AARAJY, M. 1996- **Studies on the mass culture of some microalgae as food for fish larvae (Doctoral dissertation**, Ph. D Thesis, Univ. of Basrah).
8. WIEDEMAN, V. E., WALNE, P. L., & TRAINOR, F. R. 1964. A new technique for obtaining axenic cultures of algae. **Canadian journal of botany**, 42(7), 958-959.
9. AMINOT , A. AND REY , F. 2000- **Standard procedure for the determination of chlorophyll a by spectroscopic method. International Council for the Exploration of the Sea** .Techniques in Marine Environmental Science, ISSN 0903-2606 :16 p.
10. CLASSICS LOWRY, O., ROSEBROUGH, N., FARR, A., & RANDALL, R. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J biol Chem**, 193(1), 265-75.
11. LÓPEZ, C. V. G., GARCÍA, M. D. C. C., FERNÁNDEZ, F. G. A., BUSTOS, C. S., CHISTI, Y., & SEVILLA, J. M. F. 2010.

Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass**. Bioresource technology**, 101(19), 7587-7591.

12. YODER , J. A. AND KENNELLY , M. A. 2003- **Seasonal and ENSO variability in global Ocean phytoplankton chlorophyll derived from 4 year of sea Wifs measurement**. Global Biogiochemical Cycles ,17 (4) : 1112 p.
13. LAU, S. S. S., & LANE, S. N. 2002. Biological and chemical factors influencing shallow lake eutrophication: a long-term study. **Science of the Total Environment**, 288(3), 167-181.
14. FELIP, M., & CATALAN, J. 2000. The relationship between phytoplankton biovolume and chlorophyll in a deep oligotrophic lake: decoupling in their spatial and temporal maxima. **Journal of Plankton Research**, 22(1), 91-106.
15. ABDO, S. M., HETTA, M. H., EL-DIN, R. S., & ALI, G. H. 2010. Growth evaluation and bioproduct characteristics of certain freshwater algae isolated from River Nile, Egypt. **Journal of Applied Sciences Research**, (June), 642-652.
16. SIVALINGAM, K. M. 2020. Isolation, identification and evaluation of Spirulina platensis for its effect on seed germination of groundnut (Arachis hypogaea L.), Wolaita Sodo, Southern Ethiopia**. J. Algal Biomass Utln**, 11, 34-42.
17. AL-HUSSIENY, A. A., ALSAADI, A. S., & HASAN, M. A. 2019. Detection of enzymes and proteins produced from some algae isolated from Iraqi aquatic environment**. Indian Journal of Ecology**, 46(2), 413-416.
18. MURUGESAN, S., SIVASUBRAMANIAN, V., & ALTAFF, K. 2010. Nutritional evaluation and culture of freshwater live food organisms on Catla. **J. Algal Biomass Utln**, 1(3), 82-103.