تاثير المخلفات العضوية في نمو طحلب *Chlorella vulgaris*
EFFECT OF ANIMAL MANURE ON THE GROWTH OF *Chlorella vulgaris*

د. ازهارعلي الصابونجي* **كامل كاظم فهد****

المستخلص

استخدمت اربعة اوساط زرعية تحوي مخلفات حيوانية لزراعة الطحلب *Chlorella vulgaris* وبتراكيز متباينة (٠,٥، ١،١,٥، ٢) غم لكل لتر من الماء المقطر. ووجد ان الوسط الزرعي الحاوي على (٢)غم /لترمن المخلفات الحيوانية اعلى انتاجية للطحلب المذكور حيث بلغ عدد الخلايا (٧٨,٣×١٠^٣)فرد/مللترمن العينة وبلغت قيمة كلوروفيل -أ- (٦,٤٠)مايكروغرام/لتر وذلك بعد مرور(١٢)يوما من بدأ التجربة وان عملية النمو والتكاثر للطحلب استمرت اكثر من ٢٥ يوما في الوسط ذاته مقارنة مع بقية الاوساط الزرعية .

Abstract

Different media with different concentrations of animal manure (0.5, 1.0, 1.5, 2.0)gm. per liter and Chu. No. 10 were used for culturing green algae *Chlorella vulgaris* . Results show that higher population (78.3 × 10^3)cell/L and higher quantity of Chl.a (6.40) mg/L were recorded in medium that contans (2.0) gm./L of animal manure after 12 days. Algal growth and reproduction continued after 25 days in medium containg (2) gm/L of animal manure.

المقدمة

تعتبر الطحالب من الاحياء المنتجة الرئيسية في الوسط المائي وهي مصدر للبروتين [1] وكذلك مصدر للدهون والفيتامينات[2] لذلك فانها تشكل مصدر غذائي جيد لصغار ألاسماك [5,4,3].

جلبت عملية استزراع الطحالب اهتمام الكثير من الباحثين قبل اكثر من قرن [6]. اختيرت في عملية الاستزراع الانواع التي تمتاز بقيمة غذائية عالية بالاضافة الى سهولة عزلها واستزراعها [1].

يعتمد نمو الخلايا الطحلبية وتركيبها الخلوي على توفر المغذيات داخل ألاوساط الزرعية المستخدمة . درست العديد من العوامل التي لها تأثير على النمو منها درجة الحرارة والإضاءة والملوحة والأس

*استاذ / كلية الزراعة-جامعة البصرة
**المدرس /معهد التقني / الشطرة

الهيدروجيني والمغذيات وذلك خلال عملية الاستزراع مختبريا [8,7] . تؤكد الدراسات التي أجريت حول تغذية الأحياء المنتجة أهمية الفوسفات والنترات لاستخدامها في عملية النمو وزيادة أعداد الخلايا [9] .

ألاوساط الزرعية المستخدمة متعددة ، منها مايحضر في المختبر وهي عبارة عن خليط من المواد الكيميائية[7] بينما استخدم بعض الباحثين الأسمدة العضوية كمصدر للمغذيات في عملية استزراع الطحالب [10] .

الهدف من هذه الدراسة تحديد الوسط الزرعي والمتوفر وبكلفة قليلة جدا لنمو أحد أنواع الطحالب الأحادية الخلية وذلك من خلال استخدام أوساط زرعيه تحوي على مخلفات حيوانية وبتراكيز متباينة ومقارنة تأثيرها على النمو في وسط كيميائي ومعرفة تأثير تلك ألاوساط على الإنتاجية وزمن استبقاء أطول للخلايا الطحلبية .

المواد وطرائق العمل

جمعت عينات الطحالب من بعض البيئات المائية وذلك باستخدام شبكة هائمات ذات فتحات بقطر (٢٠ مايكرون) ثم ركزت باستخدام جهاز الطرد المركزي (Auto bench centerifuge) بسرعة (١٠٠٠دورة /دقيقة)ولمدة ٤دقيقة ، زرع الجزء الراسب في وسط زرعي صلب وحفظ في حاضنة مضاءة شدة إضاءتها (uEmS 90)وعلىدرجة حرارة (٢٥م ه) أعيدت عملية الاستزراع بعد عزل النوع المراد دراسته وباستخدام المجهر وضمن ظروف معقمة ولغرض التنقية اتبعت الطريقة الموضحة في [11] وبعد ان تم الحصول على مزرعة نقية نامية على الوسط الصلب أجريت عملية الاستزراع مرة أخرى للنوع المعزول وذلك باستخدام الوسط الزرعي (Chu.No.10)وسط رقم (١) الموضحة مكوناته من قبل [1].

استخدمت مخلفات الخيول في تحضير ألاوساط الزرعية وذلك بعد تجفيفها وتعقيمها وطحنها ثم حضرت منها التراكيز (2,1.5,1,0.5) غم لكل لتر من الماء المقطر وتمثل ألاوساط المرقمة ٢و٣و٤و٥ ومن ثم نظمت الدالة الحامضية للأوساط المختلفة وبأس هيدروجيني مقداره 7.2.

تم استزراع النوع المعزول Chlorella vulgaris Beijer في الوسط الزرعي (Chu.No.10) وهو يمثل معاملة السيطرة وكذلك تم استزراعها في الاوساط الزرعية التي تحوي على مخلفات عضوية وحسب التراكيز المحضرة ، وبمعدل (٦ مكررات) لكل وسط زرعي .

اعتمدت طريقة [3] لتقدير كمية الفسفور - الفوسفات ، اما كمية النتروجين -النترات فقد قدرت باتباع الطريقة الموضحة من قبل [14] .

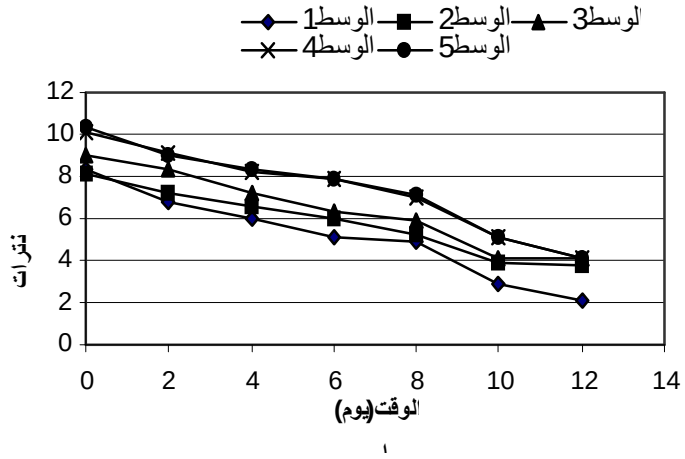
ولتحديد النمو قيست كمية الكلوروفيل -أ- وذلك باستخلاصه في (١٠مللتر) من الاسيتون بتركيز (٩٠%) ثم خزن بدرجة حرارة (٤م ه)ولمدة (٢٤ ساعة) وقدرت كميته بالمطياف الضوئي [14].

اخذت القياسات المختلفة قبل المعاملة وبعد زمن اســتبقاء مقــداره (٢ و ٤ و٨ و١٠ و ١٢) يومــا . لتحديد الكثافة الكلية للطحالب خلال التجربة ، اعتمدت طريقة [15] وذلك باستخدام شريحة الهيموسايتوميتر .

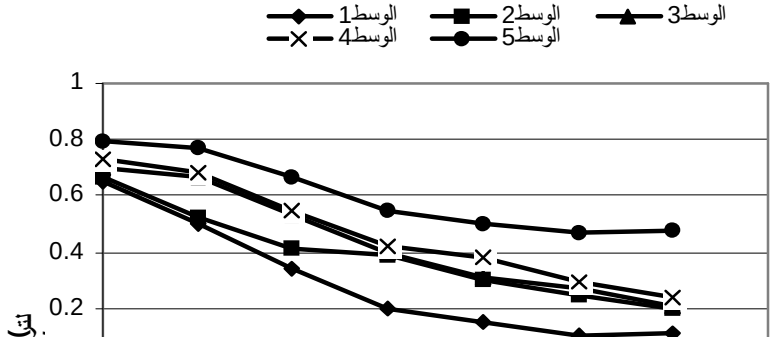
النتائج والمناقشة

توضح الاشكال (١ و٢)التراكيز الابتدائية لكل من الفسفور - الفوسفات والنتروجين - النتــرات فــي بداية التجربة وعند حساب العلاقة بين (N : P للاوساط المختلفة فانها تراوحت مابين (١٠,٦ : ١)في حالــة الوسط المحضر من مخلفات الخيول وبتركيز مقداره (٠,٥٠ غرام /لتر) وكانت نسبة (P:N) فيه بحـــدود (١٥,٦ :١)وهذه النسبة مقاربة الى النسبة المثالية التي حددها [16] لنمو الطحالب .

تراوحت كمية الفسفور -الفوسفات مابين (٠,٦٥ مايكروغرام /لتر)لوســط الــسيطرة (Chu.No.10) و(٠,٧٩ مايكروغرام/لتر) لوسط استخدم فيه(٢,٠٠ غرام/لتر)من مخلفات الخيول.وكانت عملية ازالة الفسفور -الفوسفات تزداد مع زيادة زمن الاستبقاء وتتم عملية الازالة بشكل سريع خلال الايام الاولى من التجربة ، ثم تباطئت بعدها عملية الاستهلاك لحين الوصول الى(١٢يوما)حيث بلغت النسبة المئوية للاستهلاك فــي نهايــة التجربة وللاوساط الزرعية الخمــسة بحــدود (٨٤,٦٠ % ، ٦٨,١٨ % ،٦٧,١٤ % و ٤١,٧٠ %) علــى التوالي .



شكل(١):التغير في تركيز الفسفور-فوسفات خلال فترة الاستزراع

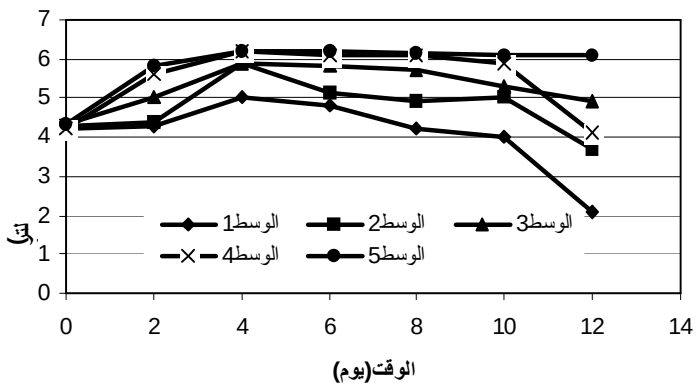


كانت تراكيز النتروجين -النترات تتراوح مابين (٨,٣٥ مايكروغرام/لتر)لوسط السيطرة (Chu.No.10) و(١٠,٣١ مايكروغرام/لتر) للوسط الذي يحوي على (٢,٠٠ غرام /لتر) من مخلفات الخيول ، وهذا يدل على ان زيادة تركيز مخلفات الخيول تعمل على رفع مستوى النترات في الوسط الزرعي .

لوحظ ان عملية الاستهلاك كانت سريعة خلال الايام الاولى من التجربة . وبلغت النسبة المؤية لاستهلاك مركبات النتروجين _النترات وعند نهاية التجربة بحدود (١٤,٠٠ % و ١٧,٩٧ % و٢٦,٩٥ % ٣٠,٦٥ % و ٣٢,٦٦ %) لوسط السيطرة والاوساط التي تحوي على المخلفات وعلى التوالي .

ان زيادة الازالة للفسفور والنتروجين ترافقت مع زيادة الكتلة الحية حيث اظهرت النتائج التغيرات في تركيز الكلوروفيل -أ- (الشكل -٣) وهذه التغيرات تعتمد على نوعية الوسط المستخدم في استزراع الطحالب الخضراء ، في الوسط الزرعي (Chu.No.10) سجل اعلى تركيزللكلوروفيل -أ- بعد اربعة ايام من وقت بدء التجربة حيث بلغ (٥,٠٠ مايكروغرام/لتر) . بعدها انخفضت القيم حيث سجلت ادنى قيمة بعد مرور (١٢يوما)وبلغت (٢,١١ مايكروغرام/لتر) .

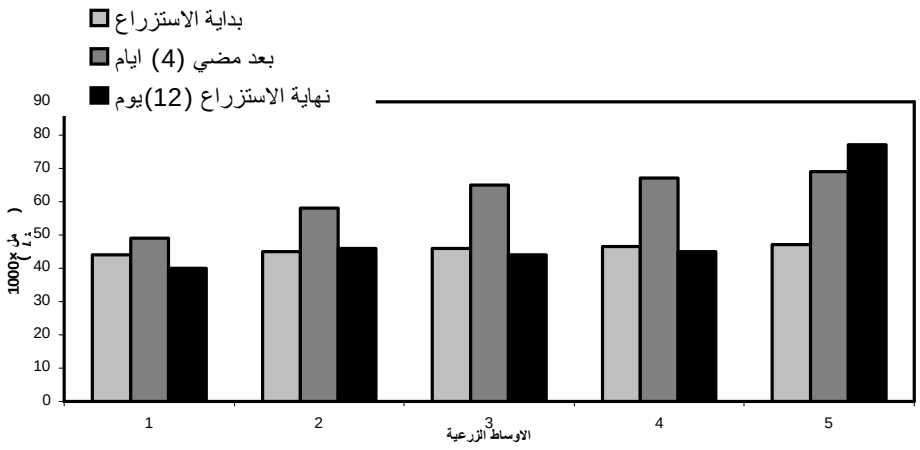
اما في الوسط الزرعي الثاني والذي يحوي على (٠,٥٠ غرام/لتر) من مخلفات الخيول فاعلى قيمة للكلوروفيل -أ- سجلت في اليوم السادس وبلغت (٥,١٢ مايكروغرام/لتر) اقل قيمة بلغت (٣,٦٩مايكروغرام/لتر) بعد مضي (١٢ يوما) من بدء التجربة .



فالاوساط الزرعية والمستخدم في تحضيرها (١,٠ و١,٥) غرام/لتر من مخلفات الخيول فان اعلى قيمة للكلوروفيل -أ- سجلت بعد مرور (٤ ايام) من بدء التجربة وبلغت (٥,٩٠ و٦,٢٠) مايكروغرام/لتر على التوالي بعدها انخفضت قيم الكلوروفيل بشكل تدريجي حيث وصلت اقل قيمة لها بعد مضي (١٢ يوما) وبلغت (٤,٩٠ و ٤,١٠) مايكروغرام/لتر وللوسطين على التوالي .

في حالة الوسط الزرعي الاخير والمستخدم فيه (٢ غرام/لتر)من المخلفات العضوية فان نمو الخلايا الطحلبية استمر وبشكل تدريجي وتراوحت قيم الكلوروفيل -أ- مابين (٤,٣١ و٦,٢٠) مايكروغرام/لتر (الشكل-٣) .

بلغت النسبة المئوية لزيادة كمية الكلوروفيل -أ- وبعد مرور اربعة ايام من بدء التجربة (١٤,٠٠ و١٧,٩٧ و٢٦,٩٥ و٣٠,٦٥ و٣٢,٦٦) وللاوساط الزرعية المستخدمة على التوالي .



شكل (٤) الفروقات في عدد افراد طحلب الالكلوريلا حسب الوسط الزراعي المستخدم وعلى فترات زمنية متفاوته

كانت اعداد خلايا طحلب *Chlorella vulgaris* المستخدمة في بداية التجربة متقاربة حيث تراوحت مابين (٤٣,٩٠ ×١٠^{٣} - ٤٤,٢٠ ×١٠^{٣}) خلية/مللتر ، وسجل اعلى عدد للخلايا الطحلبية في الوسط الزرعي المستخدم فيه(٢غرام/لتر) من المخلفات العضوية بعد مضي (١٢ يوما)، وبلغت (٧٨,٣٠ ×١٠^{٣}) خلية/مللتر (الشكل -٤) .بلغت النسبة المؤية لزيادة عدد الخلايافي اليوم الرابع من بدء التجربة (١١,٩٨ و ٢٤,٠٥ و٣٢,٤٧ و٣٧,٣٨) وللاوساط الزرعية المختلفة على التوالي ولوحظت اعلى نسبة للزيادة في الوسط الزرعي المستخدم (٢غرام/لتر) من المخلفات الحيوانية . ولوحظ اختزال عدد الافراد في الاوساط الزرعية الاربعة الاولى بعد زمن استبقاء يتراوح مابين اربعة الى ستة ايام مقارنة مع الوسط الزرعي الخامس والذي استمرت فيه عملية نمو وتكاثر الخلايا وسبب اختزال عدد الخلايا يعود الى قلة المغذيات وعملية التظليل الذاتي اذ تلقي خلايا الطحالب ظلالا فوق بعضها البعض [17] ، وعليه يمكن الاستنتاج ان المخلفات الحيوانية يمكن استخدامها كبدائل عن الاوساط الاصطناعية الباهضة التكاليف لانتاج الغذاء الحي الطبيعي وهذا يتفق مع كل من[18,12] . وجدول التحليل الاحصائي الاتي يبين الفروقات المعنوية على مستوى احتمالية ١%

جدول التحليل الاحصائي

Correlations

		VAR00001	VAR00002	VAR00003	VAR00004	VAR00005
VAR00001	Pearson Correlation	1	.967**	.973**	.978**	.958**
	Sig. (2-tailed)	.	.000	.000	.000	.000
	N	21	21	21	21	21
VAR00002	Pearson Correlation	.967**	1	.997**	.985**	.990**
	Sig. (2-tailed)	.000	.	.000	.000	.000
	N	21	21	21	21	21
VAR00003	Pearson Correlation	.973**	.997**	1	.990**	.992**
	Sig. (2-tailed)	.000	.000	.	.000	.000
	N	21	21	21	21	21
VAR00004	Pearson Correlation	.978**	.985**	.990**	1	.990**
	Sig. (2-tailed)	.000	.000	.000	.	.000
	N	21	21	21	21	21
VAR00005	Pearson Correlation	.958**	.990**	.992**	.990**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	.000	.000	.000	.
	N	21	21	21	21	21

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

المصادر

1. Febregas J., Herrero, C. Cabzas, B., and Abalde, J. Mass Culture and Biochemical Varibility of Marine Microalgae *Tetrasaelmis suecica* (Kylin). Butch. With high nutrient concentration *Aquacult*,Vol. 49, pp 231-244. . 1985
2. Oswald W. j. Algal Production Problems, Achievements and Potential. 1-8 pp. In: Shelef and Soeder, C. J. (eds.) . Algal Biomass: Production and use. Elsevier. *Biomedical Press*. Amsterdam. 1980.
3. Tamaru C., Murashige, R., Cheng-Sheng, L. Ako, H., and Sato , V. Rotifers fed Various Diets of Beaker Yeast And/Or *Nannchloropsis oculata* and their Effect on the growth and Survival of Striped Mullet (*Mugil cephallus*) and Milk Fish (*Chanos chanos*) larvae. *Aquacult*,Vol.110, pp361-372. 1993.

4. Sandbank E. and Hepher, B. Microalgae Grow in Waste Water as Ingredint in the Diet Of Warm Water Fish .In: Shelef, G. and Soeder, *C. I. (eds.)* pp. 697-706 1980.
5. Baldia S.F. Pantistico,J.B., and Baldia J.P, Acceptability of Selected Zooplanktoon and Phytoplankton for Growing Larvae / Bighead Carp (*Aristichtys nobilis)*. Paper. *Presented the Asian Symposium on Fresh Water Fish Culture* . pp10-23 May. Beijing,China. 1985.
6. Beijernick Mw., Kulturvesuche Mit Zoochlorellen, Licheogonidien und Anderen .Niederen Algen. *Botanische Zeitung* 48:pp 725-785. Cited by Shelef, J. Soeder, C...J.(eds) Algae bioass , Production and use. *Alsevier, Amesterdam*,pp 164 ,1890.
7. Febregas J., Abalde, J.,Cabezaz, and Herrero, C, Change in Protein,Carbohydrate and Gross Energy in Marine Microalgae *Dunaliella teriolecta* (Butch) by Nitrogen Concentration as Nitrite and urea . *Aquacult. Engn*.Vol. 8,pp 223- 239. 1989.
8. Laing I. and Utting, S., D., The Influence of Salinty on the Production of Two Commercially Important Unicellular Marine Algae.*Aquacult*.Vol. 21, pp79-86. . 1980.
9. Simmons I. G,.*The Ecology of Natural Resources*. Edward Arnold. London..pp .242. . 1974.
10. Ukeles R., "American Experince in the Mass Culture of Microalgae for Feeding Larvae of American Oyster Crassostrea Virginica". In ,Shelef,G.and Soeder,.C.J..(eds.) pp.287-306. 1980.
11. Patterson G., *Effect of Heavy Metals on Freshwater Chlorophyta*. Ph. D. thesis, ...Durham Univ. pp.212 . 1983.
12. Al-Aaragy M.J.,*Studies on the Mass Culture of Freshwater Microalgae as Live Food* . for Fish Larvae.Ph.D.thesis,Collegeof Science, Basrah Uviversity. pp .107. . 1996.
13. Murphy J. and Riley , J. P. A "Modified Single Solution for Determination of Phosphate in Natural Waters". *Anal. Chem. Acta*.Vol. 27:pp31-36. 1962.
14. Parsons T. R. , Matina, Y. and Lalli C. M. *Amanual of Chemical and Biological* . ...Methods for Sea Water Analysis. Pergamon Press , Oxford pp. 360 , 1984.
15. Martinez M. R., Chokroff R. P., and Pantastico J. B. "Note on Direct..Phytoplankton Counting Technique Using Heamocytometer". *Phil. Agric*. Vol. 59:pp1-12. 1975.
16. Riedfield A. C. "The Biological Control of Chemical Factors in the Environment". .....*Am. Sci*. 46:pp1-221. 1958.
17. Mallic M. and Rai L. "Influence of Culture Density, pH, Organic Acid and Divalent..Cations on the Removal of Nutrients and Metals by Immobilized *Anabaena* and *Chlorella vulgaris*". *World J. Microbiol. Biotechnol*.Vol. 9:pp 196-201. 1993
18. Venkataraman L. V. "Bioproducts from microalga *Dunaliella*". *Biomass*.Vol. 28:pp175-182. 1990.