EFFECT OF TYPE AND CONCENTRATION OF MEDIA (GF/ 2T) ON CELL NUMBER, GROWTH RATE AND CHLOROPHYLL-A CONTENTS OF *NANNOCHLROPSIS* SP.

Journal

J. Biol. Chem. Environ. Sci., 2010, Vol. 5(4):143-162
www.acepsag.org

Khomayis, S. Hisham and Al-Harbi, M. Salim

Faculty of Marine Science, King Abdul-Aziz University, Jeddah.

ABSTRACT

This study was carried out at the Faculty of Marine Science laboratory; of King Abdul-Aziz University at Obhor, Jeddah to study effects of different concentrations (2.5, 5 and 10 ml/ 500 ml sea water) and different types (whole solution, solution without silica, solution without nitrogen and solution without phosphate) of Guillard f/2t (Gf/2t) on the development of the algae *Nannochloropsis sp*. The algae was cultured in a 500 ml conical flasks for 7 days. The algae cultured in the whole solution reached the highest cell number, the highest daily growth rate and the highest average chlorophyll-a content compared to the other solutions. The solution without P dominated the solution without N and without silica in cell number of algae/ml respectively. The whole solution dominated the solution without S, without N and without p. respectively as regard to the daily growth rate and chlorophyll-a content. The solution concentration (10 ml) gave the highest number of algae (400, 500/ml), the highest daily growth rate (0.66 gm/DW) and the highest chlorophyll-a content (208.35 mg/m^3), followed by concentration 5 ml and 2.5 ml respectively. As for the growth period, the 7th day gave the highest growth followed by the day 6, 5, 4, 3, 2 and 1 respectively. The 7th day gave the highest number of algae (651252/ ml), and the first day gave the highest growth rate (0.89 gm/ DW) followed by the days 2, 3, 4, 5, 6 and 7 respectively.

المقدمـة

يمثل الاستزراع السمكي في الوقت الحاضر احد محاور التنمية الاقتصادية والاجتماعية في العديد من الدول ، نظرا لما يمثله في المساهمة في توفير الغذاء وخلق فرص العمل وتحقيق التنمية الإقليمية والمحافظة على التنوع البيولوجي للأحياء البحرية، عليه فمن الضروري أن تتوافر بعض أنواع الطحالب وحيدة الخلية مثل طحلب *Nannochloropsis sp.* داخل المزارع السمكية لإعتباره مصدر غذائي هام غني بالأحماض الأمينية والدهنية سهلة الامتصاص ، ومناسبته لنمو الهائمات الحيوانية (الروتيفور) المستخدمة في تغذية يرقات الأسماك.

الطحالب الميكروسكوبية اللاخلوية البحرية والتي تتراوح إحجامها من 2 إلى 20 ميكرون تستخدم كغذاء لتنمية المراحل اليرقية المختلفة في مفاقس المزارع التجارية وخاصة الأنواع الثمينة مثل الرخويات وحتى الوقت الحاضر تشكل الطحالب الحية المصدر الوحيد لغذاء يرقات ويافعات الرخويات ثنائية المصراع Bivalve وعلى الرغم من أن الإهتمام الحالي ينصب نحو إيجاد البديل عن نتائج الأبحاث السابقة المتعلقة بإستخدام الأغذية الحية في تنمية اليرقات بمفاقس الرخويات والقشريات والأنواع التجارية الأخرى بهدف التوصل إلى إيجاد وتطوير أغذية غير حية وإصطناعية مناسبة لمتطلبات نمو الكائنات المستزرعة إلا أن إنتاجية الطحالب الحية سيبقى سمة من السمات الأساسية لإنجاح عملية إدارة المفاقس لما له من أهمية قصوى في تنمية يرقات أغلب الأنواع البحرية .

تمت دراسة طحلب *Nannochloropsis sp.* (Xu, et al. 2004) لتقدير النمو والمحتوى الدهني باستخدام الوسط المغذي GF/2t ووجد أن كتلة الطحلب بلغت 1.1 جم / وزن جاف خلال 10 أيام في الاستزراع وهو مايزيد بنسبة 40% من زراعته بنفس الفترة في ميديا Batch. وبين (Zittilli et al. 1999) أن إنتاج الاحماض الدهنية في *Nannochloropsis sp.* تميزت بنسبها العالية، كذلك أوضح (Durmaz, 2007) نسب الفيتامين E الضروري في نمو صغار الأسماك والروتيفور. ووجد (Fang et al 2004) أن أفضل نمو لطحلب *Nannochloropsis sp* 0.55 جم / وزن جاف بعد 8 أيام من الاستزراع في وسط مغذي حاوي على الجلكوز. كما أثبت (chiu et al 2009) أن كمية الوزن الجاف للطحلب المستزرع في F/2 كانت 0.497 جم لكل وزن جاف. كما أن (Rocha et al 2003) وجد أن هناك عوامل متعدده تزيد من نسبة نمو طحلب *Nannochloropsis sp.* منها نسبة يوريا مضافة مع المغذيات بمقدار 10 ميكرومل. كما أن كمية أستهلاك الميديا من قبل الطحلب يؤدي الى نقص ملحوظ في معدل النمو.

كما قام (Zou and Richmond 1999) بدراسة أثر الضوء والحرارة على نمو الطحلب حيث وجد أنها كائنات حساسة وتتأثر بدرجة الحرارة والإضاءة . وقد قام (Rocha et al 2003) بدراسة درجة الحرارة حيث بين أن أفضل درجة حرارة (25، ±5 م^{o}) ودرس PH حيث كانت 8 تقريبا كما ذكر أن تدفق الهواء يجب أن يكون ضعيفا وذلك لتجنب التجمعات العلوية المسببة للتلوث وغيرها من المشاكل. وقد بين (sandnes et al. 2005) أن الانتاجية بلغت أعلى مايمكن عند درجة حرارة 24م. ومن الدراسات التي أجريت على الصبغات قام (Brown, 1987) بتقدير كمية الكلوروفيل A في *Nannochloropsis sp.* حيث بلغت أكبر نسبة على ماذكر 2.5 بعد خمسة أيام من التنمية. في حين قدر (Sukenik

جميع الصبغات المساعدة في *Nannochloropsis sp.* . وقد ذكر (Zou et al,1992) أنه بتحويل الاضاءة من الخفيفة الى الشديدة ينخفض محتوى (and Richonond 2000 الكلورفيل في *Nannochloropsis sp.* كما وصف (Lee et al, 2006) صبغة xanthophylls في *Nannochloropsis sp.* .

ومن الدراسات التي تبين تأثرها بالمواد الكميائية والسامة والثقيلة حيث تبين أن طحلب *Nannochloropsis sp.* يعتبر مؤشر على صحة البيئة حيث درس (Lee and shin 2003) تأثير الكادميوم على الهضم الأنزيمي في هذا طحلب وبين النسب التى يمكن إعتبارها تعتبر كمؤشر للتلوث. ايضا سلط (kim et al 2005) الضوء على أرتباط عنصر الكادميوم في *Nannochloropsis sp.* حيث بين أنها سريعة التأثر بهذه المواد الخطيرة. ودرس (Gelin et al, 1998) تواجد الكبريت في طحلب *Nannochloropsis sp* بسبب المصانع القريبة من المزارع حيث يدخل الكبريت الى وحدة الطحالب في المزرعة عن طريق المياه. كما وجد (Sidharthan et al 2002) مادة TBT السامة المستخدمة لمنع الالتصاق الحيوي في طحلب *Nannochloropsis sp.* . ووجد (Chaturvedi et al 2002) وجود مبيدات حشرية في طحلب *Nannochloropsis sp.* من الماء المأخوذ من البحر.

بعض الدراسات الأخرى أوضحت أهمية بعض العوامل الفيزيوكيميائية على نمو طحلب *Nannochloropsis Sp.* (Sarani et al. 2000) نصح بعدم استخدام الاضاءة الطبيعية لشدتها 100000 واط وبين فترة الاضاءة 15 ساعة أضاءة يعقبة 9 ساعات ظلام. كذلك بينت الدراسات السابقة أن *Nannochloropsis sp.* تنمو أفضل ما يمكن عند درجة حرارة ثابتة تكون من 20-25م (Sarani et al., 2000) وأنها لاتتحمل درجة حرارة أعلى من 26 م ^{o} ولا أقل من 12 م ^{o} (Laing and Helm, 1988). أما الملوحة فقد بينت دراسة Laing and Helm, 1988 أن المدى المناسب للملوحة للدياتومات هو 20-25 o% ، بينما السوطيات فيقدر المدي نحو 30 o% . أما الأوساط الغذائية فتختلف بإختلاف نوع الطحلب. فتختلف طحالب المياة العذبة عن المالحة والباردة عن الدافئة، وتختلف الأوساط المغذية الخاصة بنمو السوطيات عن مثيلتها من الديتومات لذا تعتبر الاوساط الغذائية من العوامل الهامة والمؤثرة في نمو الطحالب (Sarani et al., 2000). وتظهر الإختلافات أيضا بإختلاف الموقع المأخوذ منه العينات لإختلاف الصفات الفسيولوجية للكائن المعزول.

تحصل Chebl and Yamasaki 1998 على زيادة بلغت 23% في الكثافة العددية لطحالب *Nannochloropsis sp.* عند زراعته في مياه صرف مضاف إليها عنصري النيتروجين والفوسفور بمعدل 364 و 179 ميكرجرام في اللتر على التوالي مقارنة بزراعة الطحلب في مياه البحر أن طحلب *Nannochloropsis sp.* عبارة عن طحلب وحيد الخلية عادة ما يتم زراعته في أماكن تفريخ الأسماك لتتغذي عليه يرقات السمك (Fulks et al. 1991, Lubzens et al. 1995). اختبر Rodolfi et al. (2003) تأثير إعادة تدوير الوسط الذي تنمو فيه طحلب *Nannochloropsis sp.* على نمو وإنتاجية الطحالب، ووجدوا إعادة استعمال وسط النمو مضافاً عليه عناصر تغذية قد أدي إلي انخفاض معنوي في إنتاجية الطحلب. عند زراعة الطحلب وحيد الخلية *Scenedesmus* في وسط نمو مشبع بعنصري النيتروجين والفوسفور وصل معدل نمو الطحلب 2.21×10^{6} خلية لكل مللتر

في اليوم وامتص الطحلب النيتروجين بمعدل 12.1 ملليجرام في اللتر والفوسفور بمعدل 0.7 ملليجرام في اللتر (Lixin et al. 2010). واستطاع الطحلب من تجميع اللبيد بنسبة 30% عندما كان تركيز النيتروجين في وسط نمو الطحلب 2.5 ملليجرام/لتر ومن تجميع الفوسفور بنسبة 53% عندما كان تركيز الفوسفور 0.1 ملليجرام/ لتر.

لقد جذبت الطحالب وحيدة الخلية الكثير من الباحثين نسبة لمقدرتها على إزاحة عنصر النيتروجين والفوسفور مياه الصرف إلي مياه المخلفات (Abe et al. 2008, Khan and yoshida 2008) وفي امكانياتها الكبيرة في إنتاج الديزل الحيوي (Bruce 2008, Groom et al. 2008). إن الطحالب وحيدة الخلية تنزع وتأخذ النيتروجين والفوسفور الماء فقط عن طريق إمتصاصها داخل خلايا الطحلب (Aslan and Kapdan 2006, Garcia et al 2006) يقول (Goldberg and Cohen 2006, Rodolfi et al. 2009) أن محدودية العنصر الغذائي لدي الطحالب يؤدي إلي الزيادة في تراكم اللبيد، ومثال ذلك فإن نقص عنصر النيتروجين يتسبب في إنخفاض محتوي الخلية من غشاء (Thylakoid) وفي تفعيل الـ Acyl hydrolare وفي حث Phospholipid hydrolysis .

أدي أنخفاض النيتروجين بنسبة 75% من وسط نمو طحلب *Nannochloropsis Oculata* إلي زيادة اللبيد من 7.9 إلي 15.31% (Converti et al. 2009). يقول (Benemann 1997, Miao and Wu 2006) أن الطحالب حيدة الخلية هي كائنات تقوم بعملية التمثيل الضوئي تستخدم الطاقة الضوئية وثاني اكسيد الكربون، وتقوم بعملية التمثيل الضوئي بكفاءة أكبر من النباتات من اجل الكتلة الحيوية. ويمكن إستعلالها في عدة تطبيقات مثل إنتاج الوقود الحيوي، وتنقية مياه الصرف (Mufioz and Guieysse 2006, Orus et al. 1991)، أو في إستخلاص أغذية ذات قيمة مضافة عالية والمنتجات الصيدلية (Spolaore et al 2006).

يمكن للطحالب ذات الخلية الواحدة أن تنتج وقود زيتي بمستويات عالية اكثر من النباتات نتيجة لانتاجيتها العالية، وقصر دورة حياتها ومحتوياتها العالية من الزيت (حتي 80% من الوزن الجاف) (Metting 1996). كثير من الدراسات على الطحلب *Nannochloropsis sp.* اشارت إلي التغير في كميات وجودة اللبيد في الطحلب نتيجة لتغير الظروف البيئية أو الميديا الغذائية مثل تركيز النيتروجين والفوسفور (Illman et al 2000, Liu et al. 2008). لقد وصل اعداد الطحالب *Nannochloropsis sp.* كثافة تحت ظروف درجات حرارة مرتفعة قليلاً وخليط من إضاءة طبيعية وصناعية، حيث وصل معدل النمو اليومي إلي 30× 10 ^{6} خليه في الملتر الواحد (Briassoulis et al 2010).

وجد Chinnasamy et al (2010) أن الطحالب ذات الخلية الواحده المزروعة داخل مياه صرف صحي قد ادت إلي ازاحة حوالي 96% من العناصر الغذائية التواجده في تلك المياه. وقد بلغ إنتاج الكتلة الحيوية المتحملة ومحتوي اللبيد في هذه الطحالب المزروعة داخل هذه المياه حوالي 9.2 – 17.8 طن/هكتار/ سنه و 9.8% على التوالي. وأن حوالي 63.8% من زيت الطحلب المتحصل عليه يمكن تحويله إلي ديزل حيوي. إختبر Cade–Menum and Paytan (2010) التغير الذي حدث في محتوي الفوسفور واشكال الكاريون في الطحالب المزروعة تحت ظروف ضوئية ودرجات حرارة قاسية ونقص في

محتوي الفوسفور. ووجد هنالك علاقة معنوية لمحتوي اللبيد والبروتين مع الاضاءة، وازداد اللبيد مع زيادة درجة الحرارة. هنالك تغير طفيف لاشكال الفوسفور مع الضغط الضوئي والحراري. والنقص في الفسفور لم يغير في أشكال الفسفور.

الهائمات النباتية تعتبر مؤشر بيولوجي للنظم البيئية وصحة أنظمة الاستزراع المائي لحساسيتها للتغييرات الطفيفة لنوعية الماء. للكائنات الهائمة استجابة سريعة لقلة الأكسجين، المستويات العالية من المواد المغذية، قلة نوعية الغذاء أو شدة التغذي. الصورة المثلى للظروف الحالية لنظام استزراع (حوض استزراع) يمكن توضيحه بالنظر إلى مؤشرات الهائمات على سبيل المثال كمية الكتلة الحيوية، التواجد، التنوع الحيوي (Burford, 1997; Primavera, 1998) . حيث أنه من المرغوب أن الحوض والماء لهما أهمية قصوى لدعم التنوع الحيوي للهائمات النباتية والحيوانية لتوازن نوع الماء وللحصول على غذاء جيد للكائنات المستهلكة الأخرى فإنه من المهم توضيح إتجاه الأنواع المسيطرة والعوامل المتواجدة والمتحكمة في تركيب المجتمع الأحيائي. من منطلق إقتصاديات الاستزراع وضرورة تسميد الأحواض قبل بدء الإستزراع توضع كميات كافية من الأملاح المغذية، والتي هي موضع هذه الدراسة، وذلك للمساهمة في دعم انقسام الهائمات النباتية للحصول على غذاء كافي للمستهلكين (الروتيفور).

تختلف الأوساط الغذائية التي تتغذي عليها الطحالب على حسب نوع الطحلب فهنالك إختلاف بين طحالب المياه العذبه عن المالحة والماء البارد عن الدافي والاوساط الخاصة بنمو الوسطيات تختلف عن مثيلتها الديتومات، لذا تعتبر الاوساط الغذائية من العوامل الهامة والمؤثرة في نمو الطحالب (Sarani et al. 2000, Laing and Helm 1988). وكذلك يؤثر تركيز هذه الاوساط الغذائية على نمو وخواص هذه الطحالب.

يهدف هذا البحث الى دراسة تأثير تركيزات مختلفة 2.5 ، 5 و10 مل من المحلول المغذي /500 مل ماء بحر وأربع أنواع من المحلول المغذي (McLachlan, 1973) Guillard f/2t (Gf/2t) (المحلول الكامل ومحلول بدون السليكا، محلول بدون النيتروجين والأخير بدون فسفور) وذلك لتنمية خلايا طحلب *Nannochloropsis sp.* لمدة سبعة أيام وذلك لقياس عدد الطحالب ومعدل النمو اليومي ونسبة كلوروفيل A في هذا الطحلب للاستفادة من هذه النتائج في تنمية هذه الطحالب واستخدامها كغذاء في المزارع السمكية.

المواد وطرق البحث

نفذت هذه الدراسة بمعمل كلية علوم البحار بأبحر جامعة الملك عبدالعزيز بجدة وذلك لدراسة تأثير تركيزات مختلفة.2.5، 5 و10 مل من المحلول المغذي **Gf/2t** / 500 مل ماء بحر (جدول 1) وأنواع مختلفة من المحلول المغذي (المحلول الكامل ومحلول بدون السليكا، محلول بدون النيتروجين والأخير بدون فسفور) فى دوارق مخروطية سعة 500 مل. وذلك لتنمية خلايا طحلب *Nannochloropsis sp.* لمدة سبعة ايام. ولقد تم الحصول على هذا الطحلب من معمل وزارة الزراعة والثروة السمكية بجدة.

جدول (1) تركيب المحلول المغذي Gf/2t من McLachlan (1973)

Major nutrient	molar quantity	weight mg l^{-1}
$Na\ No_3$	0.88 mM	74.79
$Na\ H_2PO_4\ 2\ H_2O$	36.30 uM	5.66
$Na_2\ SIO_3\ 5\ H_2O$	100.00 uM	21.21
Trace metals		
Na_2 EDTA	11.7 uM	4.355
$Mn\ CL_2\ 4\ H_2O$	0.90 uM	0.178
$Zn\ SO_4\ 7\ H_2O$	0.08 uM	0.023
$Cu\ SO_4\ 5\ H_2O$	0.04 uM	0.010
$Co\ SO_4\ 7\ H2O$	0.05 uM	0.014
$Na_2\ MO\ O_4\ 2H_2O$	0.03 uM	0.007
Ferric citrate – Na_2 EDTA (of ferric citrate +2molar Equivelant of Na2 EDTA) .	11.70 uM	3.900
Vitamins		**weight ug l^{-1}**
Cyanocobalamin		1.0
Biotin		1.0
Thiamine HCL		100.0

واستخدم في الدراسة تصميم القطع المنشقة مرتين (Split split – plot Design). في ثلاثة مقرارت طبقا El-Nakhlawy, (2008) حيث معاملات القطع الرئيسية (main- plot treatments) هي اربعة انواع من المحلول المغذي **Gf/2t** (المحلول الكامل ومحلول بدون السليكا، محلول بدون النبتروجين والأخير بدون فسفور) بينما معاملات القطع المنشقة (Sub - plot treatments) هي ثلاثة تركيزات من المحلول المغذي (2.5 ، 5 و10 مل) في حين معاملات القطع الصغيرة (Sub- Sub- plot treatments) هي الزمن (7 ايام).

تجهيز الحوض المائي لتنمية الطحلب

يستخدم حوض مائي مربع أبعاده 1.5 م2 وارتفاعة 20 سم وهذا النظام وضع فى غرفة ذات درجة حرارة 21 + 2م0، وإضاءة بديله لاشعة الشمس. كما ويتم استخدام دوراق مخروطية سعة 500 مل تملأ بماء البحر وتوصل بمضخة لتوفير الهواء للطحلب المنمي في هذه الدورق. بعد تهيئة الحوض و ملؤه بالماء حتى إرتفاع 15 سم، يضاف الى كل دورق ماء بحر معقم بدرجة ملوحة 30 جزء في الالف (PPT) (Sarani et al., 2000) ، وتوضع الدوارق في الحوض وتوصل بالانابيب الهوائية لعملية التقليب. ويتم تشغيل الاضاءة البديلة لأشعة الشمس 400 واط (15 ساعة إضاءة يعقبها 9 ساعات ظلام). يوضع في كل دورق20 مل طحلب (*N. oculata*) وتم حقن الطحالب بالمغذيات على

طرق العمل المستخدمة لقياس خواص الطحلب

أستخدمت شريحة Hemocytometer لعد الطحالب في كل دورق حسب طريقة (spotte, 1979) وبإستخدام مجهر ضوئي مقلوب موصل بكاميرا(Meiji microscope) لتسهيل رؤية وعد الطحالب عبر شاشة التلفاز (Screen TV).

كما تم حساب معدل النمو اليومي باستخدام طريقة (Guillard,1973) بالمعادلة التالية :

$$\mu = \ln (Nt / N0) \times 1/t$$

حيث Nt = عدد الطحالب في الزمن.

N0 = عدد الطحالب في بداية التجربة (40000).

t = زمن نمو الطحالب.

وفي نهاية التجربة (7 ايام) تم تقدير محتوي الطحلب من كلورفيل A في كل معاملة باستخدام طريقة (Lorenzen, 1967).

النتائج والمناقشة

سيتم عرض نتائج الدراسة عن طريق عرض تحليل التباين Analysis of variance لكل صفه من الصفات التي تمت دراستها تحت تأثير نوع المحلول المغذي (Gf/2t) وتركيزه والفترة الزمنية على اعداد الطحالب ومعدل نموها اليومي ومحتواها من الكلورفيل A، والتفاعلات الثنائية بين تلك العوامل وذلك في جداول تحليل التباين ويلي ذلك المتوسطات الخاصة بتلك الصفات وأما التفاعلات التي أظهرت تأثيرات معنوية على بعض الصفات فسوف يتم عرضها في صورة أشكال بيانيه.

أولاً: أعداد الطحالب:

توضح بيانات تحليل التباين (جدول 2) ان أعداد الطحالب قد تأثر معنوياً بدرجة عالية (P= 0.01) بنوعية المحلول المغذي وبتركيزات هذا المحلول وبالفترة الزمنية التي ظلت فيها الطحالب تتغذي على هذا المحلول.

فقد تفوق المحلول الكامل على سائر أنواع المحاليل الاخري إذ أعطي أعلى معدل لأعداد الطحالب/مل (441889) يليه المحلول بدون فوسفور (4086381) ثم المحلول بدون نيتروجين (374873) واخيراً المحلول بدون سليكا (269398) جدول (3).

جدول (2) تحليل التباين لتأثير كل من نوع وتركيز المحلول المغذي Gf/2t والزمن على اعداد الخلايا ومعدل النمو اليومي في طحلب *Nannochloropsis sp.* .

الصفات معدل الاختلاف	درجة الحرية	اعداد الطحالب /مل	معدل النمو اليومي للطحلب
المكرر (R)	2	1169529269.3 NS	0.007 NS
نوع المحلول المغذي (Gf /2t)	3	** 1.31	0.43 **
الخطأ الاول (a)	6	447766072.08	0.0003
تركيز المحلول المغذي (M)	2	348537421261 **	0.40 **
(Gf /2t) ×M	6	35552044235 **	0.0015 **
الخطأ الثاني (b)	16	2675474.41	0.00008
الزمن (T)	6	65246722146 **	1.25 **
(Gf /2t) ×T	18	46457236.78 **	0.07 **
T×M	12	963406795.78 **	0.15 **
(Gf /2t) × M×T	36	362152470.95 **	0.003**
الخطأ الكلي (c)	144	92204.49	0.0001

NS : غير معنوي عند مستوي معنوية ٠,٠٥ .
* : معنوي عند مستوي معنوية ٠,٠٥
**: معنوي عند مستوي معنوية ٠,٠١

وما يتعلق بتركيزات المحلول فقد تفوق التركيز 10مل حيث أعطي اعلى نسبه اعداد وطحالب (400500) يليه التركيز 5مل (374119.05) ثم التركيز 2.5 مل (344785.71) (جدول رقم3).

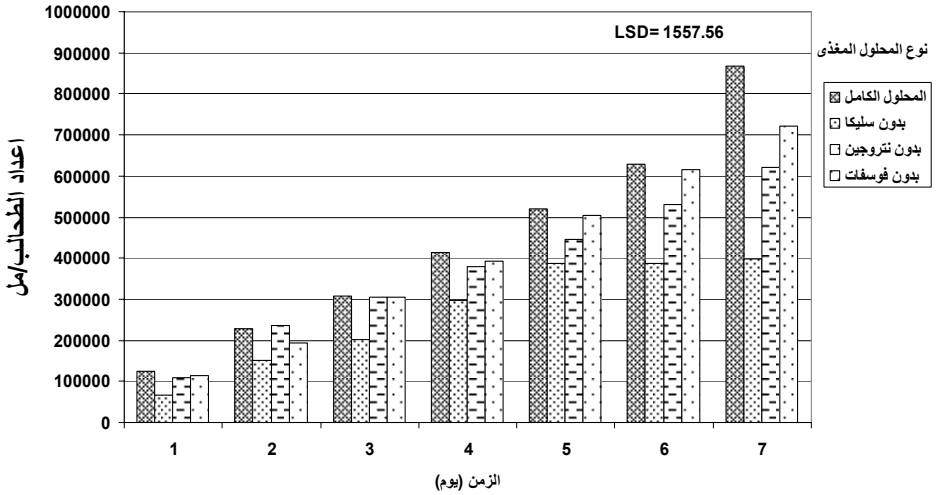
اما علاقة عدد الطحالب بأيام التغذية فقد تفوقت التغذية لمدة 7 يوم على سائر الايام حيث بلغ عدد الطحالب (651250) ثم انخفضت الاعداد تدريجياً على التوالي. بإنخفاض ايام التغذية حيث بلغت اقلها عند التغذية ليوم واحد (103694) جدول (3). وهذا يتوافق مع Chebil and Yamasaki (1998) وما جاء به Lixin et al (2010)

جـدول (3) متوسـطات كـل مـن أعـداد الطحالـب ومعـدل النمـو اليـومي فـي طحلـب *Nannochloropsis sp.* تحت تأثير نوع وتركيز المحلول المغذي Gf /2t والزمن

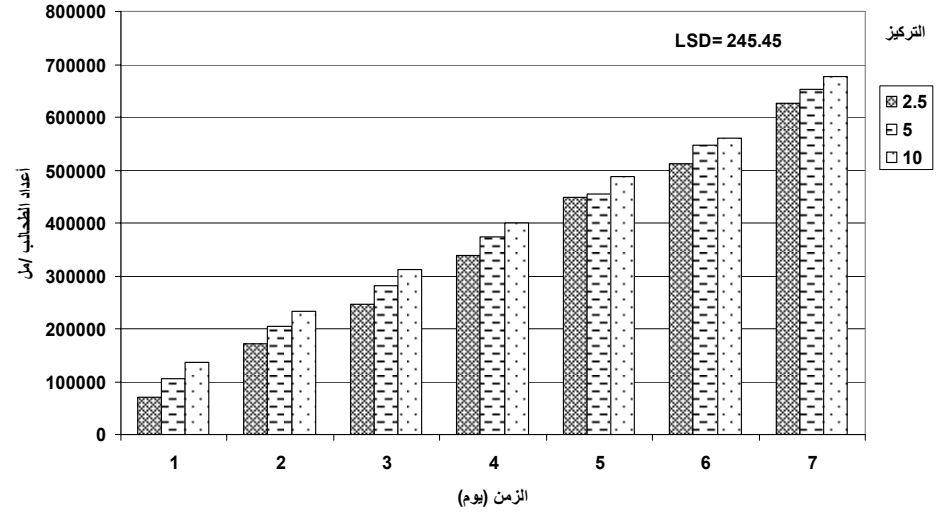
الصفات معدل الاختلاف	اعداد الطحالب /مل	معدل النمو اليومي للطحلب
المحلو المغذي **Gf/2t**		
1- المحلول الكامل	441888.9 a*	0.66 a
2- بدون سليكا	269396.8 d	0.62 b
3- بدون نيتروجين	374873 c	0.63 b
4- بدون فسفور	406381 b	0.47 c
$LSD_{0.05}$	588.14	0.002
تركيز المحلول المغذي/مل		
2.5	344785.71 c	0.52 c
5	374119.05 b	0.61 b
10	400500 a	0.66 a
$LSD_{0.05}$	92.83	0.0009
الزمن (يوم)		
1	103694 g	0.89 a
2	202944 e	0.79 b
3	279611 e	0.64 c
4	370278 d	0.55 d
5	463944 c	0.49 e
6	540222 b	0.43 f
7	651250 a	0.39 c
$LSD_{0.05}$	3436	0.002

* المتوسطات المتبوعه بنفس الحرف (الحروف) لمعاملات كل عامل من عوامل الدراسة لا تختلف معنوياً عن بعضها طبقاً لاختبار LSD عند مستوي معنوية (٠,٠٥).

عند النظر إلي تأثير تفاعل نوع المحلول المغذي والزمن **(Gf/2t x T)** على أعداد الطحالب شكل رقم (1) نجد تفوق اليوم السابع على سائر الايام حيث أعطي اعلى أعداد طحالب / مل مع كل انواع المحاليل، يليه على التوالي الايام 6، 5، 4، 3، 12 أما ما يتعلق بتأثير التفاعل المشترك لتركيز المحلول المغذي والزمن على أعداد الطجالب (T x M) الشكل رقم (2) فقد تفوق اليوم السابع على سائر الايام الاخري حيث أعطي على اعداد طحالب /مل في كل التركيزات يليه على التوالي الايام 6، 5، 4، 3، 2، 1



شكل رقم (١):- تاثير التداخل بين نوع المحلول المغذى(GF/2T) والزمن على اعداد طحلب *Nannochloropsis Sp*



شكل رقم (٢):- تاثير التداخل بين تركيز المحلول المغذى (Gf/2T) والزمن على أعداد طحلب*Nannochloropsis Sp*

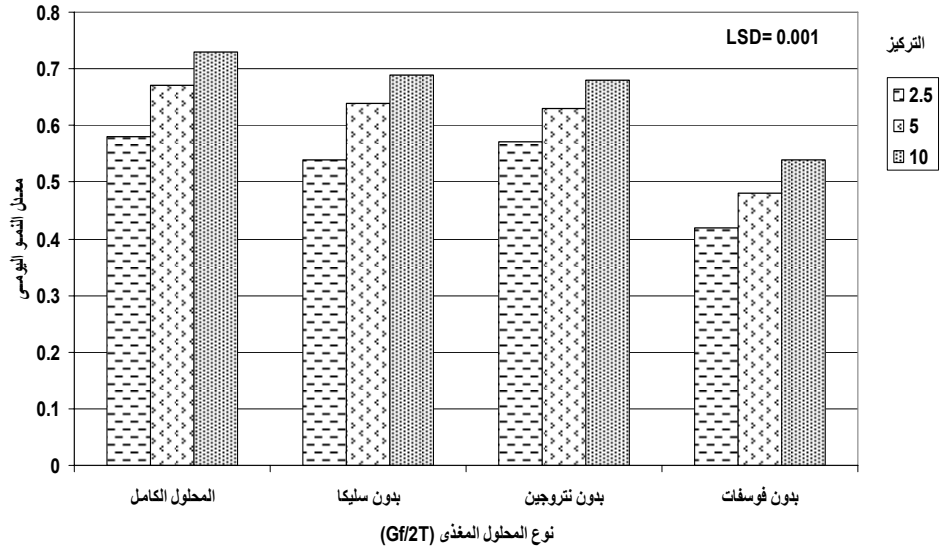
ثانياً: معدل النمو اليومي للطحالب:-

توضح بيانات تحليل التباين (جدول2) أن معدل النمو اليومي للطحالب قد تأثر معنوياً وبدرجة عالية (P=0.01) بنوعية المحلول المغذي وبتراكيزات هذا المحلول وبالفترة الزمنية التي ظلت فيها هذه الطحالب تتغذي على المحلول المغذي. فقد تفوق المحلول الكامل

على باقي المحاليل حيث اعطي اعلى معدل نمو يومي للطحالب بلغت (0.66 جم/وزن جاف). أما المحلول بدون فسفور فيد أعطي أقل نمو بلغ (0.47 جم/ وزن جاف) جدول (3). وهذا يتوافق مع جاء به (Xu, et al. 2004) وفيما يتعلق بتركيزات المحلول وتأثيرها على معدل نمو الطحالب فقد تفوق التركيز 10مل حيث أعطي اعلى معدل نمو بلع (0.66 جم/ وزن جاف) يليه على التوالي التركيز 5مل بمعدل (0.61جم/ وزن جاف) ثم التركيز 2.5مل الذي اعطي أقل معدل بلغ 0.52 جم/وزن جاف (جدول 3)، وهذا يتوافق مع ما جاء به Rodolfi et al (2003).

وبالنظر إلي تأثير الفترة الزمنية لنمو الطحالب نجد أن معدل النمو اليومي قد إزداد بنسبة عالية خلال اليومين الاول فاقت كل معدلات الايام الاخري إذا بلغت 0.89جم/ وزن جاف ثم انخفضت معدلات النمو تدريجيا بداء من اليوم الثاني إلي اليوم السابع على التوالي حيث بغلت ادناها في اليوم السابع بمعدل 0.39 جم/وزن جاف (جدول 3).

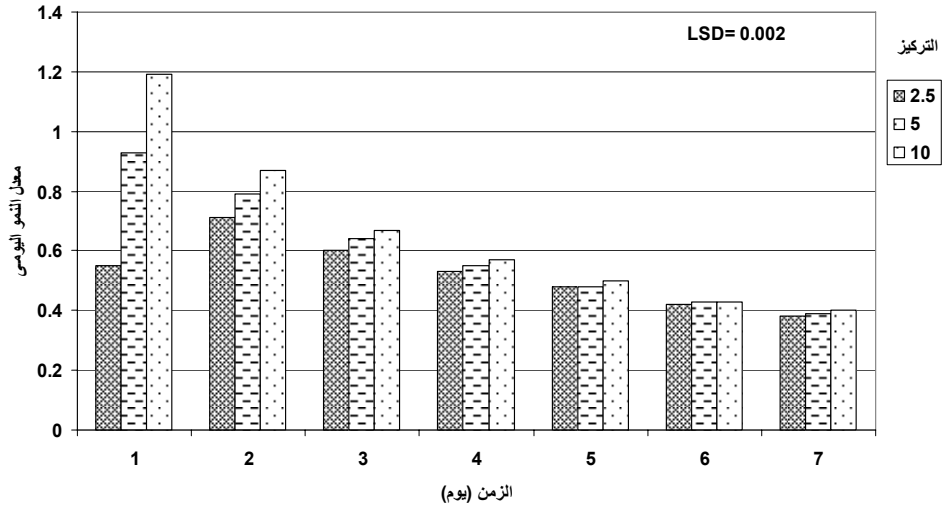
وبدراسه تأثير التفاعل المشترك بين نوع المحلول المغذي وتركيز المحلول (**Gf/2t** x M) على معدل النمو اليومي للطحالب . *Nannochloropsis sp*. شكل (3). فقد تفوق المحلول الكامل بجميع تركيزاته (2.5 ، 5، 10مل) يليه التركيز بدون سليكا قيما عدا التركيز 2.5 مل ثم التركيز بدون نيتروجين وبدون فوسفات على التوالي.



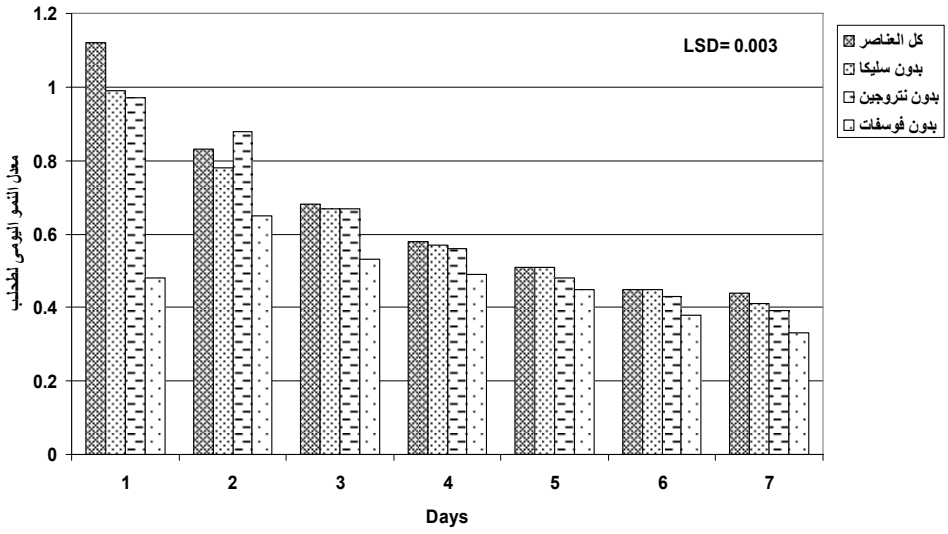
شكل رقم (٣):- تاثير التداخل بين نوع المحلول المغذى (Gf/2T) وتركيزة على معدل النمو اليومى لطحلب Nannochloropsis Sp

ويشير الشكل (4) إلي تأثير التفاعل المشترك لتركيز المحلول المغذي والزمن (T x M)على معدل نمو الطحالب اليومي فقد تفوق اليوم الاول فيما يتعلق بتركيز10 و 5 مل على

بقية الايام حيث اعطي معدل نمو يومي يليه على التوالي الايام 2، 3، 4، 5، 6، 7. ويشير الشكل (5) إلي تأثير التفاعل المشترك نوع المحلول المغذي والزمن على معدل النمو اليومي لطحلب. *Nannochloropsis sp.* وقد تفوق اليوم الاول على بقية الايام مع تفوق المحلول الكامل يليه المحلول بدون سليكا ثم بدون نيتروجين وبدون فوسفات على التوالي.



شكل رقم (٤):- تاثير التداخل بين تركيز المحلول المغذى (Gf/2T)والزمن على معدل النمو اليومى لطحلب *Nannochloropsis Sp*



شكل رقم (٥):- التاثير المشترك لنوع المغذى (GF2) والزمن على معدل النمو اليومى لطحلب نانو

ثالثاً: محتوي كلورفيل A في الطحالب:

توضح بيانات تحليل التباين لتأثير كل من نوع وتركيز المحلول المغذي على محتوي كلورفيل A في طحلب *Nannochloropsis sp.* أن محتوي كلورفيل A في الطحلب قد تأثر معنوياً وبدرجة عالية (P=0.01) بنوعية وتركيزات المحلول المغذي(جدول 4).

جدول (4) تحليل التباين لتأثيركل من نوع وتركيز المحلول المغذي Gf /2t على محتوي كلورفيل A في طحلب *Nannochloropsis sp.*

الصفات معدل الاختلاف	درجة الحرية	كلورفيل A/م3
المكرر (R)	2	18.31 NS
نوع المحلول المغذي (Gf /2t)	3	157828.7 **
الخطأ الاول (a)	6	3.44
تركيز المحلول المغذي (M)	2	31924.47 **
(Gf /2t)×M	6	131924.47 **
الخطأ الكلي (b)	16	0.38

NS: غير معنوي عند مستوي معنوية 0.05 .
* : معنوي عند مستوي معنوية 0.05
**: معنوي عند مستوي معنوية 0.01

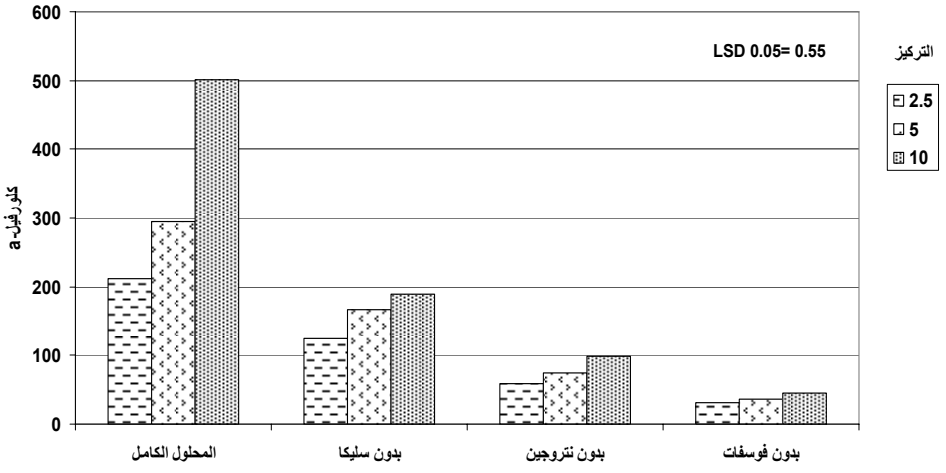
فقد تفوق المحلول الكامل على سائر المحاليل الاخري إذا بلغ متوسط محتوي كلورفيل A (336.01 مجم/م^3) يليه على التوالي المحلول بدون سليكا بمحتوي كلوروفيل (159.96 مجم/م^3) ثم بدون نيتروجين بمحتوي كلوروفيل (77.25 مجم/م^3) ثم المحلول بدون فوسفور بمحتوي كلوروفيل (37.54 مجم/م^3) وتفوق تركيز المحلول 10 مل يليه التركيز 5مل ثم التركيز 2.5 مل على التوالي حيث بلغت متوسطات محتوي الكلورفيل في الطحالب 208.35 ، 143.21 و 106.51 مجم/م^3 على التوالي جدول (5).

جدول (5) متوسط محتوي كلورفيل A في طحلب *Nannochloropsis sp.* تحت تأثير نوع وتركيز المحلول المغذي (Gf /2t)

الصفات معدل الاختلاف	مجم كلورفيل- a /م3
المحلو المغذي Gf /2t	
1- المحلول الكامل	336.01 a*
2- بدون سليكا	159.96 b
3- بدون نيتروجين	77.25 c
4- بدون فسفور	37.54 c
$LSD_{0.05}$	0.62
تركيز المحلول المغذي/مل	
2.5	106.51 c
5	143.21 b
10	208.35 a
$LSD_{0.05}$	0.53

* المتوسطات المتبوعه بنفس الحرف (الحروف) لمعاملات كل عامل من عوامل الدراسة لا تختلف معنوياً عن بعضها طبقاً لاختبار LSD عند مستوي معنوية (0.05).

أما ما يتعلق بتأثير التفاعل المشترك بين نوع المحلول المغذي وتركيزه (Gf /2t×M) على محتوي الطحلب من الكلوروفيل- A فقد تفوق المحلول الكامل إذا أعطي اعلى متوسط لمحتوي كلوروفيل -A في جميع التركيزات يليه المحلول بدون سليكا ثم بدون نيتروجين ثم بدون فوسفات على التوالي، الشكل (6).



شكل رقم (٦) :- تاثير التداخل بين نوع المحلول المغذى (Gf/2T وتركيزة على محتوى طحلب Nannochloropsis Sp من كلوروفيل -a

REFERENCES

Abe, K., Takahashi, E., Hirano, M., (2008). Development of laboratory-Scale photobioreactor for water purification by use of a biofilter composed of the aerial microalga *Trentepohia aurea* (Chlorophyta). Journal of Applied Phycology 20: 283-288.

Aslan, S., Kapdan, I.K. (2006). Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. Ecological Engineering 28. 64-70.

Benemann, J.R. (1997). CO2 mitigation with microalgae systems, Energy Convers. Man-age. 38: 475 – 479.

Briassoulis D., P. Panagakis, M. Chionidis, D. Tzenos, A. Lalos, C. Tsinos, K. Berberidis, A. Jacobsen. (2010). An experimental helical – tubular photobioreactor for continuous production of Nannochloropsis sp. Bioresource Technology 101: 6768-6777.

Brown, Jeanette S. (1987) Functional Organization of Chlorophyll a and Carotenoids in the Alga, Nannochloropsis salina . Plant Physiology 83:434-437 (1987)

Bruce, E,R., (2008). Opprtumitunities for renewable bioenergy using microorganisms Biotechnology and Bioengineering 100 (2), 203-212.

Burford, M., 1997. Phytoplankton dynamics in shrimp ponds. Aquaculture Research.

Cade-Menum, Barbara J., Adina Paytan, (2010). Nutrient temperature and light stress alter phosphorus and carbon form in culture- grown algae. Marine Chemistry.

Chaturvedi, R., Srinivasa Rao Uppalapati, Mohammad Amin Alamsjah and Yuji Fujita(2004) Isolation of quizalofop-resistant mutants of Nannochloropsis oculata (Eustigmatophyceae) with high eicosapentaenoic acid following N-methyl-N-nitrosourea-induced random mutagenesis. Journal of Applied Phycology 16: 135–144, 2004.

Chebil, Leila, Shigehisa Yamasaki, (1998). Improvement of a rotifer ecosystem culture to promote recycling marine microalga, Nannochloropsis Sp. Aquacultural Engineering 17: 1-10.

Chinnasamy, Senthil, Ashhish Bhatnagar, Ryan,W. Hunt, K.C Das (2010). Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. Bioresource Technology 101: 3097-3105.

Chiu- a, Sheng-Yi, Chien-Ya Kao a, Ming-Ta Tsai a, Seow-Chin Ong a, Chiun-Hsun Chen b, Chih-Sheng Lin(2009) Lipid accumulation and CO_2 utilization of Nannochloropsis oculata in response to CO2 aeration. Bioresource Technology 100: 833–838

Converti, A., Alessandro A. Casazza, Erika Y. Ortiz, Patrizia Perego, Marco Del Borg (2009)., Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of Nannochloropsis oculata and Chlorella vulgaris for biodiesel production. Chemical Engineering and Processing, 48: 1146–1151.

Durmaz, Yaşar., (2007) Vitamin E (α-tocopherol) production by the marine microalgae Nannochloropsis oculata (Eustigmatophyceae) in nitrogen limitation. Aquaculture 272, 717–722.

El-Nakhlawy, F.S (2008). Principles of statistivs, Experimental Design and Analysis in Scientific Research. Sci.Pub. Center. King Abdulaziz University, Jeddah, Saudi Arabia.

Fang Xu, Zhao-ling Cai, Wei Cong, Fan Ouyang (2004) Growth and fatty acid composition of Nannochloropsis sp. Grown mixotrophically in fed-batch culture. Biotechnology Letters 26: 1319–1322, 2004.

Fulks W, Main Kl, editors. Rotifer and microalgae culture systems. Proceeding of a Us- Asia Workshop. Honolulu (1991), Hawaii the Oceanic Institute 1-364.

Garcia, J., Green, B., Oswald, W., (2006). Long term diurnal variations in contaminant removal in high rate ponds treating urban waster. Bioresource Technology.97. 1709 – 1715.

Gelin, Francois Marika D. Kok, Jan W. De Leeuw and Jaap S. Sinninghe Damstea (1998) Laboratory sulfurisation of the marine microalgae Nannochloropsis salina. Org. Geochem, 29 (8)1837-1848.

Goldberg, I.k., Cohen, Z., (2006). The effect of Phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte Monodus subterraneus. Phytovhemistry 67, 696-701.

Groom, M.J., Gray, E.M., Townsend, P.A,. (2008). Biofuels and biodiversity: Principles for creating better policies for biofuel production. Conservation Biology 22 (3), 602-609.

Guillard, R.L. (1973), Division rates. In Stein, J. R. (Ed.) Handbook of phycological methods, culture methods and growth measurements. London, Cambridge University Press. 289-311.

IIIman, A. M., A. H. Scragg, S.W Shales (2000), Increase in Chlorella strains calorific values when grown in low nitrogen medium, Enzyme Microb. Technol. 27: 631-635

Khan, M., Youshida, N., 2008. Effect of $_1$-glutamic acid on the growth and ammonium removal from ammonium solution and natural wastewater by *Chorella vulgaris* NTMO6, BioresorcesTechnology 99, 575-582.

Kim,Y. K. , W. I. Yoo, S. H. Lee and M. Y. Lee (2005)Proteomic Analysis of Cadmium-Induced Protein Profile Alterations from Marine Alga Nannochloropsis oculata. Ecotoxicology, Volume 14 (6): 589-596

Laing, l. & Helm, M.M (1981) Cost effective culture unicellular algae . in : F.Vogt (Ed) Energy Conservation and Use of Renewable Renewable Energies in the Bio-lndustries Pergammon Press Oxford: 247- 259.

Laing, l., Jones, E. (1988) A turbidostat vessel for the continuous culture of marine microalgae. Aquacultural Engineering, 7: 89-96.

Lee, Mi-Young, and Hyun Woung Shin (2003) Cadmium-induced changes in antioxidant enzymes from the marine alga Nannochloropsis oculata. Journal of Applied Phycology 15: 13–19, 2003.

Lee, Mi-Young, Byung-Sul Min, Chung-Soon Chang, EonSeon Jin (2006) Isolation and Characterization of a Xanthophyll Aberrant Mutant of the Green Alga *Nannochloropsis oculata.* Springer Science, 8, 238–245.

Liu, Z.Y., G.C. Wang, B.C. Zhou (2008) . Effect of iron on growth and lipid accumulation in chlorella vulgaris, Bioresour. Technol. 99: 4717-4722.

Lixin, Hu ong-ying, Ganke, Sun Ying-Xue (2010). Effects of different nitrogen and phosphorus cooncentations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater. Bioresource Technology 101: 5494-5500.

Lorenzen, C. J. (1967). Determination of chlorophyll-a and phaeopigments: spectrophotometric equations, Limnol. Oceanogr. 12 (2) 343-346.

Lubzens E, Gibson O, Zmora O, Sukenik A. (1995),Aquaculture 133: 295-310.

McLachlan, J. (1973). Growth Media-Marine. In : Stein, J. R. (Ed.) Handbook of phycological methods. London, Cambridge University Press. 289-311.

Metting, F. B. (1996), Biodiversity and application of microalgae. J. Ind. Micropiol. Biotechnol. 17: 477-489.

Miao X, Q Wu (2006) Biodiesel Production From heterotrophic microalgal, Biore- Sour. Technol. 97: 841-486.

Mufioz, R., B Guieysse, (2006) Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants; a review, Water res. 40: 2799-2815.

Orus M. l., E. Marco, F. Martinez, Suitability of chlorella vulgaris UAM 101 for heterotrophic biomass production (1991), Bioresour. Technol. 38: 179-184.

Primavera, J.H., 1998. Tropical shrimp farming and its sustainability. In Silva, S.S. (Ed.), Tropical Maricuture. Academic Press, London

Rocha, Jorge M. S., Juan E. C. Garcia and Marta H. F. Henriques(2003) Growth aspects of the marine microalgae Nannochloropsis gaditana . Biomolecular Engineering,Volume 20, Issues 4-6, July 2003, Pages 237-242

Rodolfi, L, Graziella Chini Zittelli, Laura Barsanti, Giovanna Rosati, Mario R. Tredici (2003). Growth medium recycling in Nannochloropsis Sp. Mass cultivation. Biomolecular Engineering 20: 243-248.

Rodolfi, L., Zittelli, G.C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tridici, M.R., 2009. Microalgae for oil: strain selection, inducting of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. Biotechnology and Bioengineering 102 (1), 100-112.

Sandnes, J.M. 1, T. K¨allqvist2, D. Wenner3 & H.R. Gislerød(2005) Combined influence of light and temperature on growth rates Of Nannochloropsis oceanica: linking cellular responses to large-scale biomass production. Journal of Applied Phycology (2005) 17: 515–525

Sidharthan M., Kim Shin Young, Lee Hoe Woul, Park Kwan Soon and Hyun Woung Shin(2002) TBT toxicity on the marine microalgae Nannochloropsis oculata . Marine Pollution Bulletin, 45 (1-12): 177-180.

Spolaor., P., C. Joannis-Cassan, E. Duran, A. Isambert (2006), Commercial applications of microalgae. J. Biosci. Bioeng. 101: 87-96.

Spotte, S.(1979) Fish and lnvertedrate Culture, water Management in Systems, 2nd edition and Sons ,New York, 3p.

Sukenik, Assaf, Alexander Livne, Amir Neori, Yosef Z. Yacobi and Don Katcoff(1992), Purification and Characterization of a Light-Harvesting Chlorophyll-Protein Complex from the Marine Eustigmatophyte Nannochloropsis sp. Plant and Cell Physiology, 1992, Vol. 33, No. 8 1041-1048

Xu Fang, Cong Wei, Cai Zhao-Ling & Ouyang Fan(2004) Effects of organic carbon sources on cell growth and eicosapentaenoic acid content of *Nannochloropsis sp*. Journal of Applied Phycology (2004) 16: 499–503.

Zittelli, c., F. Lavista, A. Bastianini, L. Rodolfi, M. Vincenzini, MR. Tredici, (1999), J. Biotechnology, 70:299-312.

Zou, N., Richmond, A., 1999. Effect of light-path length in outdoor flat plate reactors on output rate of cell mass and of EPA in *Nannochloropsis sp* Journal of Biotechnology 70, 351-356.

المصادر العربية :-

السراني ، عبد العزيز بن قبلان .، التـرك ، إدريس بن منير والحسيني ، محمد محمد (2000م) الطحالب الطبعة الأولى ، جامعة الملك عبد العزيز- المدينة المنورة .

تأثير نوع وتركيز المحلول المغذي (GF/ 2T) على أعداد ومعدل النمو اليومي ومحتوي الكلوروفيل في طحلب *Nannochloropsis oculata*

هشام سليمان خميس ، سالم مرزوق الحربي
كلية علوم البحار، جامعة الملك عبدالعزيز، جدة

نفذت هذه الدراسة بمعمل كلية علوم البحار بأبحر جامعة الملك عبدالعزيز بجدة وذلك لدراسة تأثير تركيزات مختلفة.2.5، 5 و10 مل من المحلول المغذي Guillard Gf/2t / 500 مل ماء بحر وأنواع مختلفة من المحلول المغذي (المحلول الكامل ومحلول بدون السليكا، محلول بدون النيتروجين والأخير بدون فسفور) فى دوارق مخروطية سعة 500 مل. وذلك لتنمية خلايا طحلب *Nannochloropsis sp.* لمدة سبعة ايام. ولقد تم الحصول على هذا الطحلب من معمل وزارة الزراعة والثروة السمكية بجدة

تكاثرت أعداد طحالب *Nannochloropsis sp.* بمعدلات أكبر وازداد معدل نموه اليومي بنسبة اعلى ووصل متوسط محتوي الطحالب من الكلوروفيل A إلي أعلاه في حال المحلول المغذي الكامل. وتفوق المحلول بدون فسفور على المحلولين بدون نيتروجين ثم بدون سلكا على التوالي فيما يتعلق بأعداد الطحلب/مل. ويلي المحلول الكامل فيما يتعلق بمعدل النمو اليومي للطحلب ومحتوي الكلوروفيل A في الطحالب المحاليل بدون سلكا وبدون نيتروجين وبدون فسفور حيث قل معدل النمو اليومي ومحتوي الكلوروفيل Aعلى التوالي مع هذه المحاليل. وأعطي التركيز الأعلى للمحلول المغذي (10 مل) أكبر عدداً من الطحالب/مل (500 ، 400) واعلى معدل نمو يومي (0.66 جم/وزن جاف) وأعلى محتوي كلوروفيل A في الطحالب (208.35 مجم/م^3) يليه على التوالي التركيز 5مل والتركيز 2.5مل. اما فيما يتعلق بالفترة الزمنية لنمو الطحالب فقد تفوق اليوم السابع يليه الأيام 6، 5، 4، 3، 2، 1 على التوالي. فيما يتعلق بأعداد الطحالب/مل، فأكثر أعداد الطحلب كانت في اليوم السابع إذ بلغت (252 651). وفي حالة معدل النمو اليومي فقد شهد اليوم الاول أعلى معدل نمو يومي للطحلب (0.89 جم/ وزن جاف) يليه الأيام 2، 3، 4، 5، 6، 7 على التوالي.