Name of Candidate: Adel Abdel-Aziz Hussein Awad **Degree:** Ph. D.
Title of Thesis: Biotechnologies of Marine Cyanobacteria.
Supervisor: Prof. Dr. Aziz M. Higazy Dr. Refae I. Refae
Dr. El-Sayeda A. Abdel-Aal
Department: Microbiology
Branch : Cairo University **Approval :** 9/3/2006

ABSTRACT

Some applications of biotechnology of several strains of marine cyanobacteria were investigated. Results confirmed that the tested marine strains were belonging to the genera: *Xenococcus, Synechocystis, Synechococcus, Pseudoanabaena, Anabaena* and *Nostoc*. All strains were found to fix N_2 effectively and the most active one was *Nostoc sp.* as it produced 534.7 μ mole C_2H_4 ml^{-1} $culture^{-1}$ h^{-1}. Also, the pigments composition were studied for all strains and data indicated that each of chlorophyll (a), carotenoids and phycocyanin were found in all tested strains with considerable variations. In addition, data revealed that *Anabaena* and *Synechocystis* produced 0.0215 and 0.148 g indole acetic acid, 0.166 and 0.966 g abscisic acid 100 ml^{-1} $culture^{-1}$ filtrate, respectively. *Anabaena* strain excreted 2.065 g gibberellic acid 100 ml^{-1} $culture^{-1}$ filtrate. The results also indicated that *Xenococcus* (1) can produce 1.25 g carbohydrates 100 ml^{-1} $culture^{-1}$, while the lowest quantities of 0.77 g carbohydrates were produced by *Anabaena* culture.

The possible utilization of whey by the tested strains of marine cyanobacteria for growth and waste management was studied. The results indicated that both sweet and salt whey could be used as a culturing media for all the tested strains. It was found that nitrogenase activities increased when such strains were grown in any of whey types. Among the tested strains, *Nostoc sp.* proved to be the most promising one for better bioremoval of whey as one of the major dairy industrial wastes. The influence of all marine cyanobacterial strains filtrates on seeds germination of maize, soybean, wheat and barley was investigated. In addition, the effect of *Anabaena* culture filtrate on seedlings growth of both barley and wheat was evaluated. The data obviously demonstrated that germination percentage of maize and soybean seeds were increased after soaking in 95% and 85% of the tested cyanobacterial filtrates, in that order. Concerning the filtrate dilution effect, it is clear that increasing such dilutions up to 1:30 led to 100% germination of both maize and soybean seeds. Meanwhile, significant increases in seedlings lengths of barley and wheat e.g. 38-45 cm and 38-41 cm, respectively, were observed due to soaking their seeds for 12 h in *Anabaena* culture filtrates.

Key Words: Marine, Cyanobacteria, Whey, Biotechnology, Phytohormones, Maize, Soybean, Barley, Wheat.

نموذج رقم (٤)

اسم الطالب: عادل عبد العزيز حسين عوض **الدرجة** : دكتوراه

عنوان الرسالة : التقنيات الحيوية للطحالب الخضراء المزرقة (السيانوبكتريا) البحرية

المشرفون : أ.د. عزيز محمد عزيز حجازى د. رفاعى إبراهيم رفاعى

د. السيدة على حسن عبد العال

قسم : الميكروبيولوجيا الزراعية **فرع** : **تاريخ منح الدرجة** ٩/٣/ ٢٠٠٦

المستخلص

أجريت هذه الدراسة بهدف تطبيق بعض اتجاهات التكنولوجيا الحيوية على بعض السلالات البحرية من السيانوبكتريا (الطحالب الخضراء المزرقة) التابعة لأجناس *Xenococcus* ، *Synechocystis* ، *Synechococcus* ، *Pseudoanabaena* ، *Anabaena* و *Nostoc* . وقد تضمنت الدراسة تعريف بعض المواد المشجعة على نمو النباتات والمنتجة بواسطة هذه السلالات. كذلك فقد تم بحث تأثير هذه المواد على كل من إنبات بذور ونمو البادرات لنباتات الذرة، فول الصويا، القمح والشعير. ومن جهة أخرى فقد تم دراسة مدى قدرة نفس السلالات على استخدام الشرش الناتج من مصانع الألبان لنموها، وأيضا كوسيلة للتخلص الحيوى من الشرش كأحد مخلفات مصانع الألبان.

وقد أوضحت النتائج أن جميع السلالات لها القدرة على تثبيت النتروجين الجوى بكفاءة وكانت سلالة *Nostoc* أكثرهم تميزاً حيث أنتجت ٥٣٤,٧ ميكرومول إيثلين / مل/ مزرعة/ ساعة. كذلك أظهرت النتائج أن جميع السلالات المختبرة تحتوى على كميات متفاوتة من كل من صبغات كلوروفيل (أ)، الكاروتين والفايكوسيانين. هذا وقد أثبتت النتائج أيضا أن سلالة *Anabaena* و *Synechocystis* أنتجتا ٠,٠٢١٥ ، ٠,١٤٨ جم إندول حمض الخليك و ٠,١٦٦ ، ٠,٩٦٦ جم حمض أبسيسيك / ١٠٠ مل راشح، على الترتيب. وكان لسلالة *Anabaena* القدرة على إفراز ٢,٠٦٥ جم حمض جبريليك / ١٠٠ مل راشح. وقد تباينت السلالات المختبرة فى كمية الكربوهيدرات المنتجة فى راشح مزارعها وكانت أعلاهم سلالة *Xenococcus* حيث أنتجت ١,٢٥ جم كربوهيدرات/ ١٠٠ مل مزرعة.

من جهة أخرى، فقد أشارت النتائج إلى أن كل من الشرش المالح والشرش الحلو يمكن استخدامها كبيئة بديلة لتنمية جميع سلالات السيانوبكتريا المختبرة. وقد دلت النتائج أيضا على أن سلالة *Nostoc* هى الأفضل بين السلالات المختبرة فى قدرتها على التخلص الحيوى من الشرش كأحد أهم مخلفات مصانع الألبان.

من ناحية أخرى، فقد تم دراسة تأثير راشح سلالات السيانوبكتريا البحرية على إنبات بذور كل من الذرة، فول الصويا، القمح والشعير، بالإضافة إلى تأثير راشح سلالة الـ *Anabaena* على نمو بادرات القمح والشعير. وقد أظهرت النتائج أن نسبة إنبات بذور الذرة وفول الصويا زادت بعد نقعها فى ٩٥%، ٨٥% من راشح السلالات المختبرة، على الترتيب، وكانت سلالتى *Synechococcus* و *Synechocystis* هما الأفضل فى هذا الشأن. كذلك فقد لوحظ زيادة معنوية فى أطوال بادرات الشعير والقمح والتى وصلت أطوالها إلى ٣٨-٤٥سم وذلك عند نقع البذور لمدة ١٢ ساعة فى راشح سلالة *Anabaena* . أيضا فقد كانت استجابة بذور القمح للنقع فى راشح سلالة *Anabaena* – والمتمثلة فى قياسات نمو البادرات – أعلى من تلك المسجلة لبذور الشعير، ووصلت أطوال البادرات إلى ٣٨ ، ٤١ سم عند نقع البذور فى راشح سلالة *Anabaena* لمدة ٦ ، ١٢ ساعة على الترتيب.

CONTENTS

	Page
INTRODUCTION	1
REVIEW OF LITERATURE	3
I. Ecology and Taxonomy of Marine Cyanobacteria	3
II. Major Compositions	12
III. Nitrogen-Fixation of Marine Cyanobacteria	21
IV. Plant Growth Promoting Regulators.	25
V. Recent Applications of Marine Cyanobacteria	34
MATERIALS AND METHODS	47
1. The seeds; 2. Cyanobacterial strains; 3. Maintenance media and culturing conditions	47
4. Characterization of marine cyanobacterial strains	48
a) Cell morphology; b) Heterocyst formation; c) Dry weight; d) Measurement of N_2-fixation for cyanobacterial cultures.	48
e) Chemical composition	49
1. Pigments	49
2. Phytohormones ; 3. Total carbohydrates in culture filtrate	50
4. Total nitrogen	51

5. Dairy industrial liquid wastes; 6. Enumeration of bacteria ---- 51
7. Experimental ---- 53
a) Whey experiments ---- 53
b) Germination experiments ---- 54
8. Media ---- 55
RESULTS ---- 57
Cyanobacterial Strains ---- 57
Utilization of whey by marine cyanobacteria ---- 62
Germination and seedlings experiments ---- 67
DISCUSSION ---- 92
SUMMARY ---- 106
REFERENCES ---- 110
ARABIC SUMMARY