

تقدير الكميات المثبتة حيويًا والنسب المئوية من النايتروجين الجوي عن طريق عزلات محلية من الطحالب الخضراء المزرقّة

يوسف جبار اسماعيل الشاهري

قسم علوم الحياة، كلية التربية، جامعة الموصل، الموصل، العراق

الملخص

استخدمت طريقة مختصة بقياس النايتروجين الجوي المثبت حيويًا التي تتضمن ثلاث خطوات هي الهضم والتقطير والتسحيح. حيث حددت تراكيز النايتروجين الجوي المثبت عن طريق سبعة أنواع من الطحالب الخضراء المزرقّة المعزولة محليًا (من مدينة الموصل) والتي لها القابلية على تثبيت النايتروجين الجوي (*Oscillatoria*, *Lyngbya taylorii*, *Arthrospira platensis*, *Anabaena helicoidea*, *Nostoc muscorum*) وكانت أفضل فترة حضانة لتحقيق أعلى كمية من النايتروجين المثبت هي خمسة عشر يومًا من التحضين إذ بلغت قيم النايتروجين المثبت (20.80-19.01-15.12-12.48-16.40-16.60-8.01 ملغم/لتر) للطحالب المدروسة على التوالي وتحققت أعلى نسبة مئوية للنايتروجين (1.48-1.12-1.22-0.99-1.28-1.31-0.89%) للطحالب المدروسة على التوالي بشكل مترادف مع كمية النايتروجين المثبت. وتبين من الدراسة أن معدل تكرار الحويصلات المتغايرة للطحالب الخيطية (*Nostoc* و *Anabaena*) يزداد مع زيادة فترة التحضين لمدة خمسة عشر يومًا. وكذلك لوحظ أن أعلى معدل نمو يومي للطحالب المدروسة بشكل عام تحقق عند خمسة عشر يومًا من التحضين وسجلت أعلى الأوزان للكتلة الحيوية للطحالب المدروسة بشكل عام بعد نفس فترة التحضين. ولوحظ ارتفاع الرقم الهيدروجيني النهائي عن الأولي ولجميع الطحالب المدروسة وفي جميع فترات التحضين.

الدراسة بينت أن كمية النايتروجين الجوي المثبت من قبل الطحالب المستخدمة تتأثر بشكل مباشر مع إضافة مصدر نايتروجيني إلى الوسط إذ زادت كمية النايتروجين المقاسة كون الطريقة المستخدمة للقياس تقدر كمية النايتروجين الكلية الموجودة في العينة، كما أن إضافة مصدر نايتروجيني إلى الوسط حفزت النمو وزادت الكتلة الحيوية والمحتوى البروتيني والنسبة المئوية للنايتروجين أما الرقم الهيدروجيني النهائي فقد ارتفع بشكل ملحوظ عن الرقم الأولي ولوحظ انخفاض في تكرار الحويصلات المتغايرة بإضافة المصدر النايتروجيني إلى الوسط. وعند دراسة تأثير النظام الضوئي على عملية تثبيت النايتروجين، لوحظ أن الطحالب تباينت في تأثرها بالنظام الضوئي، فقد أبدت الطحالب (*Nostoc* و *Anabaena* و *Arthrospira*) أعلى قدرة على تثبيت النايتروجين عند استخدام النظام الضوئي (18 ساعة إضاءة، 6 ساعات ظلام) في حين أبدت الطحالب (*Lyngbya taylorii* و *Oscillatoria limnetica* و *Oscillatoria tenuis* و *Chroococcus limneticus*) أعلى القيم لتثبيت النايتروجين عند استخدام فترة الإضاءة المستمرة والحال مشابه فيما يتعلق بالنسبة المئوية للنايتروجين ومعدل النمو اليومي ووزن الكتلة الحيوية والمحتوى البروتيني.

الكلمات المفتاحية: nitrogen fixation, *Nostoc*, *Anabaena*, *Arthrospira*, Heterocyst

المقدمة

الخلايا مع تثبيت النايتروجين الجوي وأن فاعلية التثبيت تتوافق طرديًا مع معدل تكرار الحويصلات المتغايرة في الخيط [3]. كذلك فإن للطحالب بشكل عام فوائد صناعية وبحثية كبيرة من خلال انتاجها للعديد من المركبات الايضية الثانوية كالأنزيمات والاحماض العضوية والسكريات المتعددة الخارج خلوية وكذلك إفراز الهرمونات النباتية والتي تماثل في تركيبها ووظيفتها الهرمونات النباتية في النباتات الراقية كالسايبتوكاينينات والاندولات والجبرلينات [1] كما أنها تفرز العديد من السموم كالسموم الكبدية أو السموم العصبية إلى الوسط أو البيئة الطبيعية التي تعيش بها مما يؤدي في النهاية إلى أحداث اضطراب جسيمة لحياة الانسان والحيوانات من خلال شرب هذه المياه الملوثة بهذه السموم القاتلة عند التراكيز العالية نسبيًا والتي يمكن الاستفادة منها من خلال انتاج ادوية أو مهندئات طبية خاصة بهذه السموم [3].

هذه الاسباب وغيرها الكثير الكثير دفعت الباحثين والمختصين في الكثير من دول العالم إلى الاهتمام بهذه المجموعة من الكائنات

تتميز الطحالب الخضراء المزرقّة بأن العديد من أنواعها لها القدرة على تثبيت النايتروجين الجوي، فهي بذلك تفوق في أهميتها بكتريا العقد الجذرية للنباتات البقولية والتي تثبت النايتروجين الجوي من خلال تكوين علاقات تعايشية مع النباتات البقولية في حين أن الطحالب الخضراء المزرقّة تقوم بهذه العملية بصورة حرة وبدون الحاجة إلى تكوين علاقات تعايشية مع النباتات الأخرى. وتمتلك بعض الطحالب القدرة على تثبيت النايتروجين الجوي عضيات خلوية خاصة تعتبر مصنعًا لعملية تثبيت النايتروجين وهي الحويصلات المتغايرة Heterocystes [1]. وهذه الخلايا تعد خلايا خضرية تحولت إلى خلايا تخصصية لهذه العملية. وقد لاحظ [2] أنه عند تنمية الطحالب الخضراء المزرقّة بوجود مصادر نايتروجينية مثل كلوريد الامونيوم سوف تنمو وتتواجد عدة أنواع خيطية حاوية على خلايا خضرية غير متباينة (متشابهة) إلا أنه عند تنميتها في اوساط خالية من مصادر النايتروجين سوف تظهر لهذه الأنواع الخيطية خلايا عالية التخصص تعرف الحويصلات المتغايرة وهذا يشير إلى العلاقة المباشرة لهذه

Chu10 (الخالي من مصدر نايتروجين) الصلب لنتمو بمفردها للحصول على مزرعة نقية اذ تترك لمدة ثلاثة اسابيع لكي تنمو، بعدها يتم التأكد من نقاوة المستعمرات الطحلبية (المزارع) المراد استخدامها في الدراسة وهي:

N.muscorum, A.helicoidea, A.platensis, L.taylorii, O.limnetica, O.tenuies, C.limneticus.

وبعد ملاحظة النمو الجيد يتم نقل المزارع من الوسط الصلب الى وسط Chu10 السائل (الخالي من مصدر نايتروجين) والمعقم في دوارق زجاجية حجم 250 مل وحاوية على 100 مل من الوسط ذلك بأخذ كمية مناسبة من المزارع واضافتها الى الوسط السائل تحت ظروف معقمة حيث توضع الدوارق في الحاضنة الهزازة (100 دورة/ دقيقة) واضاءة (2500 لوكس) وعند درجة حرارة 28 م° لحين الحصول على النمو المناسب. وبهذه الطريقة تم الحصول على لقاح الطحالب والذي استخدم في التجارب اللاحقة من خلال تلقيح الدوارق الزجاجية سعة (250 مل) والحاوية على (95 مل) من الوسط السائل المعقم وبنسبة (5%) من اللقاح لكل دوارق. وتم اجراء التجارب كافة بمعدل ثلاث مكررات لكل معاملة [7,8,4].

وتم اجراء عدد من التجارب لغرض دراسة قابلية الطحالب المعزولة على تثبيت النايتروجين الجوي وكما موضح في ادناه:-

1- صممت تجربة لملاحظة تأثير فترات التحضين المختلفة على تثبيت النايتروجين الجوي ومعدل النمو اليومي والكتلة الحيوية والمحتوى البروتيني للطحالب الخضر المزروعة المستخدمة في الدراسة وتحديد افضل فترة حضانة لعملية تثبيت النايتروجين. اذ تم زراعة كل نوع من الطحالب المدروسة على حدة في دوارق مخروطية حاوية وسط Chu10 بدون مصدر نايتروجيني ووضعت الدوارق في الحاضنة الهزازة تحت درجة 28 م° وبشدة اضاءة 2500 لوكس وفي نظام ضوئي 12 ساعة ظلام : 12 ساعة ضياء.

2- صممت تجربة لإجراء مقارنة للطحالب الخضر المزروعة المستخدمة في حالة غياب او جود مصدر نايتروجين (نترات الكالسيوم) في الوسط لدراسة قابليتها على تثبيت النايتروجين. اذ تم اضافة نترات الكالسيوم كمصدر نايتروجيني في الوسط وبتراكيز (0.04 غم/لتر) وبنسبة 0.03% نايتروجين واعتمادا على طريقة تحضير وسط Chu10 [6,1,8].

3- صممت تجربة لبيان تأثير فترات الاضياء والظلام على عملية تثبيت النايتروجين الجوي وبعض الفعاليات الفسلجية للطحالب المستخدمة في الدراسة، اذ تم في المعاملة الاولى تعريض الطحالب لفترة اضياء مستمرة (24 ساعة اضياء) وفي المعاملة الثانية عرضت الطحالب لنظام اضياء (18 ساعة ضياء : 6 ساعة ظلام) اما المعاملة الثالثة فقد تم اختزال فترة التعريض للاضياء الى حد (12 ساعة ضياء : 12 ساعة ظلام).

طرائق التحليل

1- قياس معدل النمو للطحالب المستخدمة

الطحلبية الا ان الدراسات المتعلقة بهذه المجموعة من الكائنات داخل القطر ما تزال محدودة وغير مطروقة بشكل كبير وما تزال تعاني من النقص الحاصل بالمعلومات والبيانات على المستوى المحلي قاصرة على دراسات بيئية فقط [4] غير شاملة لدراسات فسلجية او دراسات متعلقة بزراعة الطحالب من خلال الحصول على عزلات محلية مهمة وتوفير ظروف زرع ملائمة لنمو هذه الكائنات ومن ثم الاستفادة منها في انتاج مواد مختلفة مهمة صناعيا وبحثيا.

عليه كان الهدف من الدراسة اجراء دراسة فسلجية من خلال الحصول على عزلات نقية من الطحالب الخضر المزروعة (من البيئة المحلية) ذات كفاءة عالية في تثبيت النايتروجين وقياس كميات النايتروجين الجوي المثبت في هذه الطحالب باستخدام طريقة كداهاال [5].

المواد وطرائق العمل

الطحالب المستخدمة: تم في هذه الدراسة استخدام عزلات محلية من الطحالب الخضر المزروعة الاتية :

Nostoc muscorum, Anabaena helicoidea, Arthrospira platensis, Lyngbya taylorii, Oscillatoria limnetica, Oscillatoria tenuies, Chroococcus limneticus

اذ تم عزل هذه الطحالب من البيئة المحلية لمدينة الموصل. وحفظت هذه العزلات بعد تنقيتها وذلك بتميتها على الوسط Chu10 في اطباق بتري بوضعاها بالثلاجة بدرجة حرارة (4 م°) وتم تنشيط الطحالب بإعادة زراعتها كل اسبوعين على الوسط Chu10 وحضنت عند درجة حرارة 28 م°.

الوسط الزرعي

زرعت العينات في الوسط الزرعي Chu10 والذي يتكون من المواد التالية وبالتركيز ازاء كل منها (غم/لتر) [6]: $Ca(NO_3)_2$ 0.04 - $FeCl_2$ 0.02 - $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.025 - K_2HPO_4 0.01 - Na_2CO_3 0.02 - Na_2SiO_3 0.025. وبعد التحضير ضبط الرقم الهيدروجيني للوسط بين (7.6-7.8) باستخدام محلول $NaHCO_3$ وتم التعقيم باستخدام جهاز المعقم لمدة 20 دقيقة. اما الوسط Chu10 الصلب فيحضر بإضافة الـ Agar بنسبة 1% الى الوسط Chu10 السائل وبعد التعقيم يصب في اطباق بتري والتي تستخدم لاحقا في عزل وتنمية الطحالب المطلوبة للدراسة.

طريقة العزل

تم زرع العينات تحت ظروف معقمة على وسط Chu10 الصلب (الخالي من النايتروجين) لضمان الحصول على عزلات طحلبية مثبتة للنايتروجين الجوي. اذ نشرت قطرات قليلة من عينات الماء او كمية قليلة من التربة او قطع صغيرة من سطح الصخور التي جلبت من محطات مختلفة (من مدينة الموصل) ثم تم تحضين هذه الاطباق في الحاضنة تحت ظروف اضياء مستمرة (2500 لوكس) ودرجة حرارة 28 م° ولمدة 4-6 اسابيع بعدها تم ملاحظة مستعمرات الطحالب النامية. وتم نقل كل مستعمرة على حدة الى طبق بتري حاوي وسط