DOI: http://dx.doi.org/10.21123/bsj.2016.13.4.0663

تاثير اجهاد النيتروجين وكلوريد الصوديوم في إنتاجية بعض الاحماض الدهنية للطحلب الاخضر *Chlorococcum humicola*

ابراهيم مهدي عزوز السلمان ثائر محمد ابراهيم العكيلي

قسم علوم الحياة، كلية التربية للعلوم الصرفة ابن الهيثم، جامعة بغداد

استلام البحث 2015/11/15
قبول النشر 2016/1/20

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Licens

الخلاصة:

تعد الطحالب من المصادر المهمة للوقود الحيوي الذي يـــعد البديل المستقبلي للوقود الأحفوري وهذا مايدعو الدراسات البيئية التي تهتم برفع منحنيات اومعدلات النمو وزمن التضاعف للانواع الطحلبية المختلفة وكذلك استجابة الطحالب الى الظروف البيئية المختلفة ســـــواء كانت كيميائية او فيزيائية وتقييم تأثيرها في التركيب الكيميائي لخلايا الطحالب ومدى تأثر المكونات الحية التي تتكون منها هذه الخلايا، ولاسيما الاحماض الدهنية والدهون الكلية والبروتينات والكاربوهيدرات وغيرها.

اظهر الطحلب الاخضر *Chlorococcum humicola* استجابة مختلفة عند معاملته مع وسطي Chu-10 المحور و Chu-13 بوصفهما وسطين قياسين. كما أظهر الطحلب المدروس تباين في درجة الاستجابة تمثلت باختلاف كمية ونوعية الاحماض الدهنية المنتجة بداخله عن تغير مكونات كلا الوسطين، فعند المعاملة بكلوريد الصوديوم سجلت الاحماض Palmatic acid وα-Liolenic و Oleic زيادة ملحوظة أما أحماض Arachidic, Linoleic, Stearic acid فسجلت إنخفاضاً في معدلاتها في الوسط Ch-10 أما في الوسط Ch-13 فقد سجلت الأحماض الاتية Palmatic و Linoleic وα- Liolenic و Oleic أرتفاعا ملحوظا بينما أنخفضت قيمة حامض Stearic فقط. وعند ازالة النايتروجين من الوسطين المغذيين، سجل الوسط Ch-10 أرتفاعاً ملحوظا في معدلات جميع الاحماض ماعدا حامضStearic الذي سجل أنخفاظا كبيراً، أما الوسط Ch-13 فقد سجل ارتفاعا في قيم الاحماض Palmatic وLinoleic وα- Liolenic ، بينما سجلت احماض Stearic وOleic وArachidic انخفاضاً عن قيمها في الاوساط الطبيعية (السيطرة) كما بينت النتائج وجود اختلاف في قيم منحنيات ومعدلات النمو واختلاف زمن التضاعف عند المعاملات المذكورة.

الكلمات المفتاحية: الاجهاد ، التحفيز،التثبيط، الاحماض الشحمية، طحلب *Chlorocoocum humicola*.

المقدمة:

يواجه العالم مشكلة خطيرة تتمثل بالاستهلاك الكبير لجميع انواع الطاقة، وذلك للأزدياد المضطرد في اعداد المجتمع البشري فضلا عن التطور الحضاري الذي يعتمد بشكل كبير على الحياة المدنية المستهلكة بطبيعتها للطاقة بكل انواعها [1]، مما دفع العلماء للتفكير والبحث عن مصادر بديلة للطاقة ذات الكلفة القليلة والقابلة للاستعمال في عدة مجالات[2] . ويعد الوقود الحيوي بديلاً واعداً للوقود الاحفوري وصديقاً للبيئة اذ ينتج هذا الوقود من تفاعلات كيميائية للزيوت النباتية او الدهون الحيوانية مع الكحول بوجود الحامض او القاعدة بوصفه عاملاً مساعداً وذلك للوصول الى استرات المثيل للاحماض الدهنية Fatty Acids Methyl Esters والذي يطلق عليه الوقود الحيوي [3] . مرت عملية انتاج الوقود الحيوي بعدة اجيال، تمثلت بالاعتماد على زيوت وبقايا حيوانية فضلا عن محاصيل زراعية ذات اهمية اقتصادية مثل الذرة وزهرة الشمس لتكون مصدرا لانتاجه، ادت هذه الطريقة الى استهلاك كميات كبيرة من هذه المحاصيل مما أثر سلباً في كمياتها كمصادر للغذاء في الدول التي تعتمد عليها، لذا تم التفكير بمصدر اخر، تمثل ببعض النباتات غير الاقتصادية البديلة للدهون والزيوت المستعملة للغرض نفسه، ولكن واجه الباحثون مشكلة اخرى هي طول مدة النمو لكثير من هذه النباتات والمساحات الكبيرة المطلوبة للزراعة، وهنا برزت محاولات استعمال مزارع الطحالب بوصفها بديلاً ناجحاً لانتاج الوقود الحيوي، وقد لاقت نجاحاً مقبولاً في الاوساط العلمية وذلك لما تتمايزبه من خصائص،

منها قدرتها على تثبيت ثنائي CO_2 وتحويله الى سكريات ودهون وبروتينات من خلال العمليات الفسلجية التي تستطيع الخلية الطحلبية القيام بها، كما أن تربيتها واستزراعها يحتاج الى مساحات محدودة ونموها في مختلف انواع الترب حتى في غير الصالحة للزراعة، وهذا يعطي مجالاً واسعا لاستغلال الاراضي، فضلا عن قدرة الطحالب على النمو في البحيرات والبرك والمستنقعات و مياه المجاري او وحدات خاصة للتخمير واحواض الاستزراع [6,5,4]. لذا اصبح استعمال الطحالب مصدراً اساسياً للدهون والزيوت المستعملة لانتاج الوقود الحيوي مما حقق دعما للاقتصاد العالمي والنظام الغذائي [7]. يتأثر التركيب الكيموحيوي للطحالب الدقيقة بتغير العوامل البيئية للوسط الذي تعيش فيه، اذ ذكر [8 ,9] ان هناك العديد من العوامل الفيزيائية المحفزة كالضوء والجاذبية وكيميائيا من خلال تحديد المغذيات التي تؤدي الى زيادة تراكم الدهون بكميات اكبر فضلا عن تغير في محتواها، كما يعد النقص النتروجيني او زيادة الملوحة من اكثر التاثيرات الكيميائية المستعملة من قبل الباحثين لتحفيز وزيادة الدهون وتغير محتواها او البروتينات والسكريات الطحلبية والاحماض الدهنية وغيرها [10, 11, 12, 13, 14 ,15]. لذلك صممت الدراسة الحالية لغرض تسليط الضوء على تأثير نقص النيتروجين وأضافة NaCl في معدل نمو وتحفيز أو تثبيط الاحماض الشحمية المنتجة من الطحلب الاخضر *C. humicola* عند تنميته في وسطين مختلفين هما وسط Chu-10 و Chu13 المحورين.

المواد وطرائق العمل:

تم جمع عينات الطحلب *Chlorococcum humicola* من نهر دجلة قرب قضاء الطارمية شمال بغداد، وعزلت العينات بالاعتماد على طريقة التخفيف والتخطيط الموصوفة من قبل [17,16] اما تنقيتها فتمت اعتمادا على طريقة استعمال خليط من المضادات بحسب [18]. اجريت جميع مراحل العزل والتنقية تحت ظروف معقمة. تم تحضير محاليل خزينة stock solution للمغذيات الصغرى والكبرى التي تدخل في تركيب الاوساط المستعملة في التجربة كما مبين في جدول (1)، كما تم تحضير محلول خزين لكلوريد الصوديوم وعقمت الاوساط بالمؤصدة عند 121°م لمدة 20 دقيقة. كما تم تحضير 750 ml من كل معاملة، وأضافة 2 غم/لتر من NaCl، وأزالة المحاليل المجهزة للنتروجين (N) بحسب الوسط، وتمت التنمية تحت ظروف مختبرية وبدرجة حرارة 25±2 °م تحت شدة اضاءة 3000 لوكس وبنظام اضاءة 6:18 اضاءة : ظلام لمدة 49 يوماً (اي 7 اسابيع) لغرض تحديد منحنى النمو الطبيعي للطحلب عند السيطرة، اجريت التجربة على شكل اربعة مكررات لكل معاملة. تم تحديد وقياس الكتلة الحية للطحلب الاخضر *C.humicola* بوساطة تحديد الكثافة عند الامتصاصية للطول الموجي540 نانوميتر باستعمال جهاز المطياف نوع (Optima 300) وكذلك قياس اعداد الخلايا باستعمال طريقة القطاع المستعرض يوميا [19]. ولغرض رسم المنحنى وحساب معدل النمو (μ) وزمن التضاعف (G) طبقت المعدلات الاتية : معدل النمو (μ)= Log Nt - Log N0 \t *3.322 زمن التضاعف (G) = (Log2\μ) إذ: Ntعدد الخلايا بزمن معين، و N0 عدد الخلايا في بداية التجربة و 3.32 معامل التصحيح، وكما جاء في [21,20]. تم حصاد المزرعة بعد 25 يوما من بداية التجربة بوساطة الطرد المركزي عند سرعة 5000 دورة بالدقيقة لمدة 10 دقائق باستعمال جهاز الطرد المركزي المبرد، واستخلاص وتحليل الاحماض الدهنية بوساطة جهاز HPLC نوع Shimadzu LC-10-AV بحسب الطريقة الموصوفة من قبل [23,22]

جدول (1): التركيز النهائي المطلوب للاوساط المستعملة

المادة	التركيز النهائي المطلوب mg/l	
	Chu10*	Chu13*
K_2HPO_4	10	--
K_2PO_4	--	80
$NaNO_3$	20	--
KNO_3	--	400
$MgSO_4.7H_2O$	25	200
$CaCl_2$	40	107
Na_2CO_3	20	--
$FeCl_3$	0.8	--
Ferric ammonium citrate	--	20
Citric Acid	--	100
EDTA-Na	10	--
NaCl	75	--
$NaSiO_3$	14.25	--
Micronutrient Solution		
H_3BO_3	0.720	57.2
$MnCl_2$	0.050	3.62
$MnSO_4.H_2O$	--	--
$ZnSO_4.7H_2O$	0.560	0.440
$CoCl_2$	0.0100	0.200
$CuSO_4.5H_2O$	0.200	0.160
$(NH4)_6Mo7O_{24}.4H_2O$	0.070	--
$NaMo_4$	--	0.084
pH	6.4	7.5

*Chu10 : المحورمن قبل (قاسم وجماعته 1999) و *Chu13: (Yamaguchi et al. 1987) .

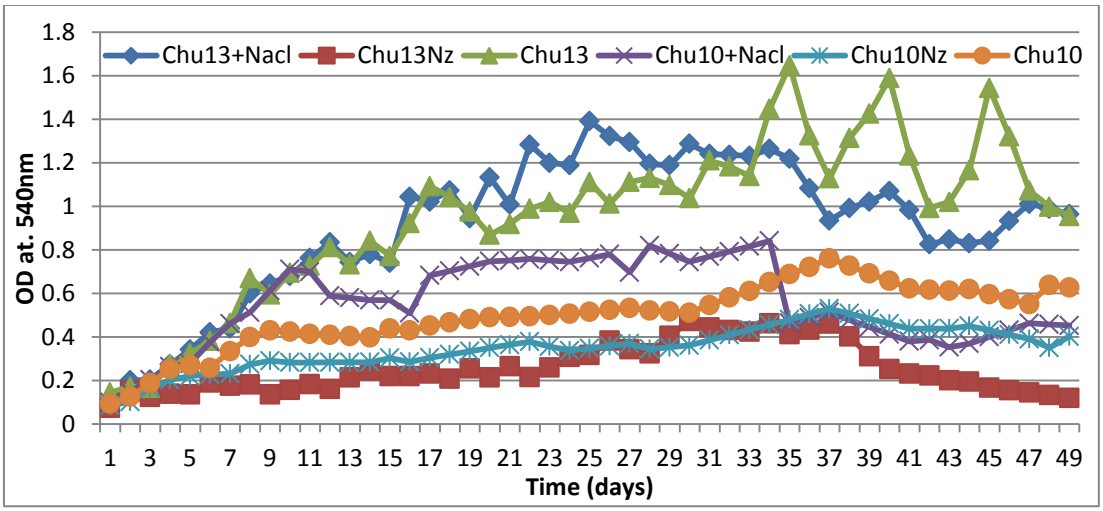
الطحلب قيد الدراسة:

يعود الجنس *Chlorococcum* الى قسم الطحالب االخضراء ويتبع التصنيف الاتي بالاعتماد على المصادر التصنيفية [25,24] وكما يأتي Division: Chlorophyta, Class:

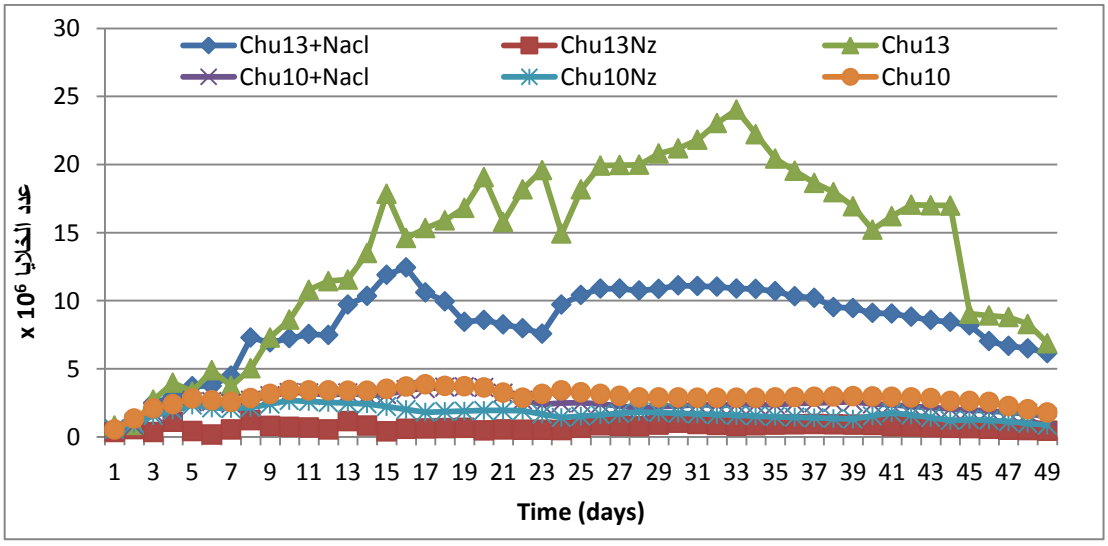
Chlorospheceae, Order :Chlorococcales, Family: Chlorosphaeraceae, Genus:*Chlorococcum*, Species: *humicola*.

النتائج:

أظهرت نتائج الدراسة فروقاً بين المعاملات في منحنى النمو الطبيعي للطحلب الاخضر *C. humicola* عند المعاملات المستعملة في (الوسطين Chu10 و Chu13) بوصفها اوساط مقارنة مع اضافة NaCl بتركيز 2 غرام/ لتر وبغياب النتروجين من الوسطين المذكورين سابقاً، اذ سجل ارتفاع في الامتصاصية في الوسط (Chu13 وChu13+NaCl) مقارنة بباقي المعاملات التي كانت متقاربة للايام الثلاثة الاولى، إلا أنها وبعد اليوم الخامس بدأت باظهار قيم امتصاصية مختلفة عن بعضها البعض. كما ظهرت مراحل النمو بشكل نموذجي عند المعاملة (Chu10+NaCl) اذ استمر الطور اللوغارتمي الى اليوم التاسع ثم بدأ بالاستقرار الى حين اليوم 33 بعدها بدأ طور الموت للمزرعة الطحلبية. بينما كان منحنى النمو يشكل ارتفاعاً متذبذباًعند المعاملتين (Chu-13+Nacl و Chu-13) كما في الشكل (1) . اما عند الاعتماد على عدد الخلايا لرسم منحنى النمو فقد سجل توافق مع ما ظهر عند الاعتماد على الامتصاصية 540 نانوميتر لكون ان المعاملتين (Chu13 وChu13+NaCl) اظهرتا تزايداً كبيرا في اعداد الخلايا الذي بلغ من 5-23×10^6 خلية/مل مقارنة بباقي المعاملات التي اظهرت اعداد خلايا اقل من 5×10^6 خلية/مل كما في الشكل (2) .



شكل (1) منحنى النمو للطحلب الاخضر ***Chlorocoocum humicola*** اعتمادا على الامتصاصية عند الطول الموجي 540 نانوميتر .



شكل (2) منحنى النمو للطحلب الاخضر ***C.humicola*** اعتمادا على عدد الخلايا $\times10^6$.

وعند حساب معدل النمو وزمن التضاعف اعتمادا على الامتصاصية 540 نانوميتر، سجل اعلى معدل نمو واقل زمن تضاعف عند الاسبوع الاول للسيطرة (Chu10) مقارنة بباقي المعاملات وبلغ 0. 589 خلية/يوم و 0.553 يوم على التوالي، اما اقل معدل نمو واعلى زمن تضاعف فقد سجل في الاسبوع السابع عند الوسط Chu13 Nz وبلغ 0.109 خلية /يوم و 4.822. يوم على التوالي جدول (2 و3).

جدول(2) معدل النمو الاسبوعي (K) للطحلب *C.humicola* اعتماداعلى الامتصاصية 540 نانوميتر(خلية/ يوم) .

الزمن/اسبوع	Chu13+NaCl	Chu13-Nz	Chu13	Chu10+NaCl	Chu10 Nz	Chu10
الاول	0.370	0.307	0.325	0.294	0.452	0.589
الثاني	0.31	0.213	0.291	0.270	0.338	0.439
الثالث	0.276	0.173	0.253	0.231	0.273	0.353
الرابع	0.244	0.150	0.224	0.203	0.232	0.299
الخامس	0.21	0.136	0.201	0.180	0.204	0.261
السادس	0.197	0.123	0.183	0.160	40.18	0.234
السابع	0.179	0.109	80.16	0.143	70.16	0.212

جدول (3) زمن التضاعف (G) للطحلب *C. humicola* اعتماداً على الامتصاصيه 540 نانوميتر(يوم).

الزمن/ إسبوع	Chu13+Nacl	Chu13-Nz	Chu13	Chu10+Nacl	Chu10 Nz	Chu10
الاول	0.865	1.182	0.964	1.010	0.705	0.553
الثاني	0.997	1.895	1.078	1.18	1.046	0.817
الثالث	1.202	2.358	1.294	1.447	1.397	1.101
الرابع	1.410	2.694	1.525	1.726	1.740	1.381
الخامس	1.649	2.905	1.764	2.058	2.05	1.643
السادس	1.956	3.391	2.018	2.632	2.333	1.885
السابع	2.282	4.822	2.310	3.214	2.679	2.163

وهذا يتوافق مع النتائج التي سجلت بالاعتماد على عدد الخلايا، إذ كان اعلى معدل نمو واقل زمن تضاعف عند وسط السيطرة في الاسبوع الاول وبلغ 0.685 خلية/يوم و4.75 يوم على التوالي، اما اقل معدل نمو واعلى زمن تضاعف فقد سجل عند المعاملة Chu13Nz وبلغ 0.08 خلية/يوم و6.552 يوم على التوالي جدول (4 و5).

جدول (4). معدل النمو الاسبوعي (K) للطحلب ا*C. humicola* اعتماداعلى عدد الخلايا(خلية / يوم) .

الزمن/اسبوع	Chu13+Nacl	Chu13-Nz	Chu13	Chu10+Nacl	Chu10 Nz	Chu10
الاول	0.543	0.203	20.47	0.582	0.549	0.685
الثاني	0.462	0.175	0.411	0.435	0.402	0.496
الثالث	0.391	0.134	0.361	0.351	0.312	0.395
الرابع	0.337	0.112	0.320	0.291	0.256	0.328
الخامس	0.298	0.099	0.288	0.249	0.218	0.282
السادس	0.267	0.090	0.260	0.220	0.190	0.248
السابع	0.241	0.080	0.236	0.196	0.168	0.221

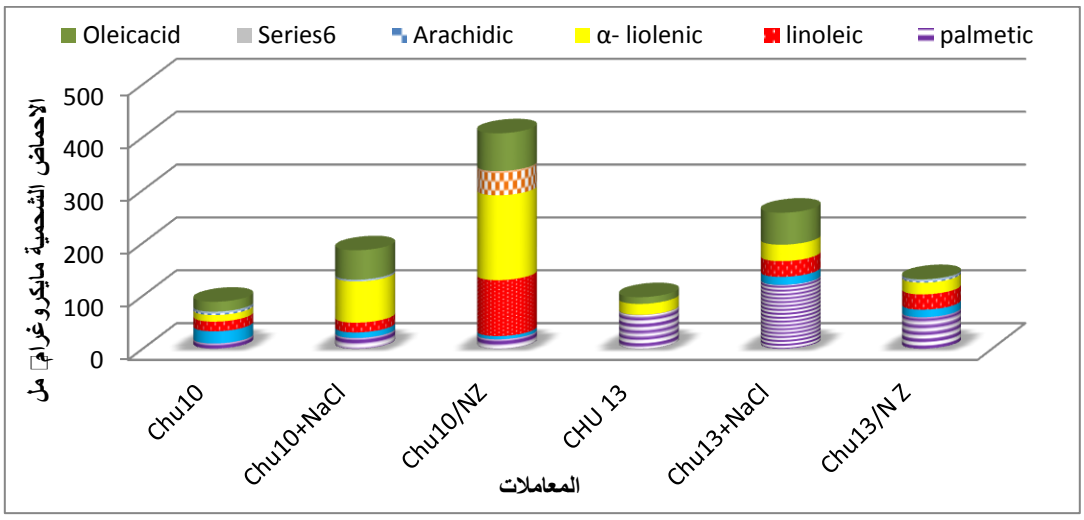
جدول (5) معدل زمن التضاعف (G) الاسبوعي للطحلب *C. humicola* اعتمادا على عدد الخلايا(يوم) .

الزمن/اسبوع	Chu13+Nacl	Chu13-Nz	Chu13	Chu10+Nacl	Chu10 Nz	Chu10
الاول	0.635	1.220	0.721	0.539	0.579	0.475
الثاني	0.722	1.765	0.794	0.805	0.899	0.742
الثالث	0.894	3.297	0.917	1.093	1.364	1.024
الرابع	1.101	4.215	1.074	1.515	1.904	1.359
الخامس	1.306	4.574	1.237	1.932	2.439	1.712
السادس	1.540	5.072	1.442	2.324	3.027	2.055
السابع	1.822	6.552	1.740	2.842	3.867	2.476

اما الجدول (6) والشكل(3) فيظهران تبايناً واسعاً بين المعاملات والسيطرة، اذ سجل الحامض Palmetic (C16:0) أعلى تركيز عند المعاملة Chu13 +NaCl 120.887 مكغم/مل واقل قيمة عند السيطرة 10.77 مايكروغرام/مل. أما حامض Stearic (C18;0) فسجل اعلى قيمة عند السيطرة 120.87 مكغم/مل واقل قيمة له عند ازالة النايتروجين من السيطرة 5.87 مكغم/مل، اما حامض Linoleic (C18:2) او (اوميكا 6) فقد سجل أعلى تركيز عند ازالة N من السيطرة 105.788 اما اقل تركيز فكان عند السيطرة بتركيز 18.37 مكغم/مل كما اختفى هذا الحامض عند استعمال الوسط Chu13. كما سجل الحامض α-Liolenic acid (C18:3) أعلى قيمة عن ازالة N من السيطرة وبلغ 160.567. مكغم/مل واقل تركيز عن السيطرة وبلغ 12.44 مكغم/مل. اما حامض Oleic acid(C18:1) فقد سجل اعلى تركيز في معاملة السيطرة عند ازالة N وبلغ 71.48 واقل تركيز عند الوسط Chu13 وبلغ 0.859 مكغم/مل. اما حامض Arachidic acid (C20: 3) فسجل اعلى قيمة عند ازالة N من السيطرة. اذ بلغت 45.742 مكغم /مل بينما اختفى عند المعاملتين (Chu13,Chu13+NaCl) وسجل اقل قيمة عند اضافة NaCl الى السيطرة 3.41 مكغم/مل.

جدول (6) تركيز الاحماض الشحمية في الطحلب الاخضر *C. humicola* (مايكروغرام/ مل) .

الاحماض الشحمية	Chu 10	Chu10 + NaCl(2g/l)	Chu10/Nz	Chu13	Chu13 + NaCl(2g/l)	Chu13/Nz
Palmetic acid C16:0	10.077	20.51	18.113	64.088	120.887	59.750
Stearic acid C18:0	22.874	10.33	5.870	--	15.098	14.175
Linoleic C18:2(Omega-6)	18.370	18.53	105.766	--	29.746	28.864
α-liolenic C18:3	12.444	77.84	160.567	20.775	31.042	22.314
Oleic acid C18:1	18.695	55.67	71.483	12.695	60.560	0.8159
Arachidic acid C20:3	6.461	3.41	45.742	--	--	5.963



شكل (3) قيم الاحماض الشحمية في الطحلب الاخضر *C. humicola* (مايكروغرام/ مل).

المناقشة:

يعد معدل النمو Growth rate من اهم الطرائق المستعملة في اختبار او اظهار النجاح البيئي للاجناس او السلالات المعزولة سواء من البيئة الطبيعية او البيئات المختبرية[26]. ويعد النيتروجين عاملاً محدداً رئيسياً في نمو الطحالب، لكونه يدخل في العديد من العمليات الابتنائية الحيوية لخلاياها، ومنها البروتين والانزيمات والاحماض الامينية والاحماض النووية وكذلك يؤدي دورا مهما في عملية ترجمة RNA الى بروتين [27]. كما ان نقص او فقدان N في الوسط الزرعي يتسبب في تثبيط نمو الطحالب من خلال التاثير في تكوين او بناء صبغات البناء الضوئي [28]. كما أشارا [29]الى ان التراكيز العالية من N قد تؤدي الى تسمم الخلايا وذلك لتحول النترات الى امونيا NH_3 من خلال وجود انزيم خاص يدعى Nitrate reductase الذي يقوم بأختزال النترات الى امونيا، التي تعد ذات سمية عالية للخلايا الطحلبية عند ارتفاعها في الوسط، مما يؤدي الى التاثير في pH فيه وتحويله الى حامضي مما يقود الى عملية تثبيط النمو. بينما يرى [30] ان تقليله من الاوساط الزرعية لانواع من الطحالب مثل *Chlorella*

valgeris و *Nanrochloropsis aculate* لم تؤثر بشكل معنوي في معدل النمو، اما في دراسة اخرى على الكلوريلا فاظهرت النتائج ان اعلى معدل نمو لها كان عند تركيز 0.06% من النترات، ثم حدث تناقص في معدل النمو بزيادة التركيز[31]. كما اشار الباحثون [33,32] الى زيادة معدل النمو بتقليل تركيزN في الوسط ، وذكر الباحثون[34] ان العديد من الطحالب تقوم بتجميع او يحدث في خلاياها تراكم للدهون بشكل عام وخاص من نوع TGA(Triacylglycerol) تحت ظروف الاجهاد النتروجيني، اي كون التركيز صفر في الوسط، واكد الباحثان على ان الاحماض الدهنية المتجمعة تكون اما من النوع المشبع واما احادية عدم التشبع Monounsaturated fatty acidsأو Saturated . في نتائج الدراسة الحالية نجد أن منحنيات ومعدلات النمو للطحلب المدروس *C.humicola* قد انخفضت بشكل ملحوظ عند إزالة N من كلا الوسطين المختبرين مع حصول زيادة في زمن التضاعف وكما يتبين في الاشكال (2,1) والجداول (5,4,3,2) .

ان التفسير لحالة استمرار النمو في التراكيز القليلة من N في الاوساط قد يعود الى ان الطحالب تستمر بالنمو الطبيعي الى حين استهلاك N الموجود في بناء الانزيمات والمركبات الاساسية في الخلية، وبعد نفاذه تتجه الخلايا الى CO_2 المثبت والذي سوف يتحول الى كاربوهيدرات او دهون اكثر من تحوله الى بروتينات[35]. بينما يرى بعض الباحثين أن الانزيمات المسؤلة عن بناء الدهون والكاربوهيدرات اقل تاثراً من تلك المسؤولة عن بناء البروتينات، لذا يتجه الانزيم الى تحويل الكاربون الى دهون وكاربوهيدرات بدلا من البروتينات.[36,7] كما تتفق هذه الاراء مع ما ذهب اليه العديد من الباحثين الى زيادة الدهون عندما يكون تركيز (N= Zero) ومنهم [39,38,37]. أما عند إزالة N من الوسطين المنمى فيهما خلايا الطحلب المدروس فقد سجلت زيادة واضحة في تكوين وكمية بعض الاحماض مثل البالمتك والفا- لينولك و الاولك والارجيدك، بينما حصل انخفاض وارتفاع متباين لبعض الحوامض بحسب الوسط المستعمل، على سبيل المثال حامض الاولك في الوسط Chu-13 سجل أنخفاضاً في كميته بينما سجل أرتفاعا واضحاً فيChu-10، بينما سجل حامض الستيارك أنخفاضا في كلا الوسطين المنزوعين من N مقارنة بوسطي السيطرة. مما يبين أن خلايا الطحالب تتمايز في سلوك الاستجابة والتعويض عن نقص N باتجاهات عدة بحسب نوع الطحلب ونوع الوسط المستعمل وطبيعة مكوناته من المغذيات. وهذه الاستنتاجات تتفق بدرجة كبيرة مع أراء وتفسيرات الباحثين الذين ذكروا في السابق بما يخص منحنيات ومعدلات النمو ومع أراء غيرهم من الباحثين بما يخص التغاير في كمية ونوعية الاحماض الدهنية المتكونة كاستجابة للأجهاد الناتج في الوسط الزرعي، إذ اقترح الباحث[40] تفسيراً لزيادة كمية ونوعية الاحماض الدهنية (TGA) كونها تمثل اللبنة الاساسية لبناء الدهون من خلال المسارات الايضية التي تؤدي دورا مهما في الاستجابة للاجهاد (نقص N) وفعالية الانزيمات التي تدخل في تكوين الحامض البايروفي والأستيل- كو- اي، وهذا ما يقود الى تركيز دهون اعلى من وسط السيطرة عند اجهاد N. بينما وجدت [32] أن الاحماض الدهنية Stearic وأولك Oleic,اتخذا المنحنى نفسه في الزيادة عند تعرض الوسط الى اجهاد N = 0 مقارنة بالسيطرة، كان ذلك مرافقاً مع زيادة الدهون الكلية المسجلة في الدراسة نفسها. ويتماشى ذلك مع دراسة [41] الذين وجدوا زيادة في انزيم Carboxylase acytel Co-A الذي يمثل المفتاح لزيادة معدل بناء الاحماض الشحمية والذي يمثل عامل سيطرة في بناء الدهون بشكل عام.

أما تأثير ملح NaCl فأنه يؤدي الى حالة تغيير متباين في منحنيات ومعدلات النمو وزمن التضاعف في مختلف انواع الطحالب، وذلك من خلال التأثيرفي التوازن الايوني Ion homeostasis أذ ان Na^+ يتبادل مع K^+ وهذا قد يؤدي الى نقص في K^+ في Cytosol، كما يسبب التماثل الوظيفي الحيوي بين عنصري K و Na تأثيراً فيبعض الانزيمات و فعاليتها وخاصة تلك التي تعتمد على وجود K، اذ يكون له دوراً مهماً في تثبيط وتحفيز بعضها مثل Superoxide Dismutase (SOD) و Ascarbate peroxidase (APX) وهي من الانزيمات المضادة للاكسدة المهمة، ومن ثم يتبادل هذا الدور مع Na [44,43,42] ومن النتائج الحالية نجد أن أضافة NaCl بمقدار 2غم/لتر الى كلا الوسطين الزرعيين قد أدى الى عملية تحفيز متباين لخلايا *C.humicola* المدروس، إذ سجل ارتفاعاً ملحوظا في قيم شدة الامتصاصية عند 540 نانوميتر وخاصة في طور الاستقرار للوسط Chu- NaCl 13مقارنة بعينة السيطرة، بينما عند الاعتماد على حساب عدد الخلايا كان منحنى النمو أقل من السيطرة، الاشكال (1 ,2). وهذا ربما يعود الى الزيادة في حجم الخلايا وتقليل العدد مع رفع كمية الكلوروفيل كحالة دفاعية تكيفية من قبل الخلايا لزيادة مستوى الملوحة في الوسط، وهذا الاستنتاج يتفق مع ماذهب اليه [45] اللذين سجلا هذه الملاحظة في خلايا طحلب السندسمس. كما يشير [46] الى ان التباين في مستويات التأثير من التحفيز أو تثبيط النمو أو المحتوى الكيميائي للطحالب المعرضة لاجهاد الملوحة يمكن تفسيره من خلال تحفيز تكوين الدهون لمواجهة الاثر الازموزي وعدم انتقال المياه من داخل الخلية الى خارجها كحالة دفاعية من قبل الخلية الطحلبية لمواجهة التغير في الملوحة.

وعند متابعة تأثير التعرض لكلويد الصوديوم في انتاج وتحفيز الاحماض الدهنية نجد أن نتائج الدراسة

الحالية قد سجلت تحفيزاً لأغلب الاحماض المختبرة والمتمثلة بالاحماض Palmatic acid و-α Liolenic و Oleic في كلا الوسطين الزرعيين بينما حصل تثبيط للحامضين Arachidic, Linoleic في الوسط Chu-10+NaCl وسجل الحامض Stearic تثبيطا ملحوظاً في كلا الوسطين المعاملين مع كلوريد الصوديوم. وتعزى هذه المتغيرات الى عدة اسباب منها، نوعية الوسط وتركيز الملح ونوعية الطحلب المختبر، إذ يشير الباحثون[47] الى أن الصدمة الازموزية (Osmotic Shock) قد تؤدي الى تحفيز انتاج الدهون. كما بين [48] أن الزيادة في تركيز NaCl من 3.5 الى 7 غم/لتر اي من 0.5 – الى 1 مول/لتر تؤدي الى زيادة في انتاج الدهون من 60 الى 67% g/g (دهون/وزن جاف). كما ان هذه المعاملة تؤدي الى زيادة الدهون القطبية مثل الدهون الفسفورية Phosphlipids والدهون السكرية glycolipid المرتبطة مع الجدار الخلوي للطحالب الدقيقة في بعض الانواع الطحلبية المحبة للملوحة مثل جنس *Dunaliella tertiolctc* وسجلت زيادة في المستوى الدهني بزيادة NaCl [49,48]. أما الباحثون [50] فقد وجدوا تأثيراً مماثلاً عند وجود NaCl على الانزيمات المضادة للاكسدة المذكورة سابقاً في انواع من طحالب المياه العذبة وخاصة *Chlamydomonas*.

أن اهمية فحص طبيعة الدهون وليس الكلية فقط، ذات أهمية كبيرة في الدراسات البيئية والكيموحيوية للطحالب وذلك لأنها تمثل معلومات مهمة في انتاج الوقود الحيوي، بسبب ان بعض انواع الطحالب قد تحوي اكثر من g/g 93% من الدهون ولكنها غير مهمة في عملية انتاج الوقود الحيوي كونها دهون فسفورية وسكرية[51]. كما قد تحتوي بعض الانواع الطحلبية على دهون غير متصوبنة Unsaponifiable وكاروتينات وكلدونيك التي تعد نواتج ثانوية وغير مفيدة في انتاج الوقود الحيوي، لذلك تعد من اهم الخصائص المرغوبة للاجناس الطحلبية المستهدفة لانتاجه هي خاصية الانتاج العالي للدهون والكتله الحيوية، أما الخاصية المرغوبة الاخرى فهي قابليتها على التحمل والنمو الجيد في البيئات ذات الطابع المتطرف [54,53,52]. تتفق هذه الاراء مع ماذكره الباحثون [47]و[54] من أن تقليل أو إزالة بعض المغذيات وخاصة N ادى الى زيادة تراكم TAG وتناقص كمية الدهون القطبية (polar lipid) عند مقارنها بالدهون الكلية في المزارع الطحلبية المختبرية للطحلب الاخضر *Chlamedomons moewusi*، كما أن تحديد المغذيات ادى الى زيادة C16:3 (PUFA) وC18:3 وC16:4 بينما زادت كميةC16:1 وC18:1، كذلك اظهرت الزيادة في الملوحة للاوساط الزرعية للطحالب تحفيز تراكم الدهون في طحلب *Chlorella vulgaris*. كما تتفق النتائج مع ما ذكره [55] من وجود اثر تحفيزي للمعاملة بتراكيز مختلفة من NaCl بين 0.2 – 1.5 غرام/لتر لمدة 27 يوماً تعريض في ثلاث عزلات طحلبية هي *Chlorella disperses, C. vulgaris, Anabaena sp*، اذ ظهرت فروق معنوية بين السيطرة والمعاملات على مستوى معدلات النمو وزيادته وتقليل زمن التضاعف .

المصادر:

[1] Vasudevan, P. and Briggs, M. 2008. Biodiesel production-current state of the art and challenges. Biotechnology, 35: 421-430.

[2] Sims, R., Mabee, W.; saddler J. and taylor M. 2010. An overview of second generation biofuel technologies. Bioresource Technol, 101: 1570-1580.

[3] Demirbas, A. 2008. Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. Energ Convers Manage, 49: 2106-2116.

[4] Spolaore, P.; joannis-cassan, C.; Duran E. and Ismbert A. 2006. Commercial applications of microalgae. J of Bio scinence and Bioengineering, 101: 87-96.

[5] De-bashan, L.; Hernandez, J.; Morey, T. and Bashan, Y. 2004. Microalgae growth-promoting bacteria as "helpers" for microalgae: a novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater. Water Res, 38:466-474.

[6] Abomohar, A.; Wanger M.; El-Sheekh M. and Hanelt D. 2013. Lipid and total fatty acid productivity in photoautotrophic fresh water microalgae: screening studies towards biodiesel production. J, of Appli. phycol, 25: 931-936.

[7] Chisti, Y. 2007. Biodiesel from Microalgae. J Biotechnol Advances. 25:294-305.

[8] Sarada, R.; Bhattacharya, S. and Ravishankar, G. A. 2002. Optimization of culture conditions for growth of the green alga

[17] Patterson, G. 1983. Effect of heavy metals on freshwater Chlorophytata. ph. D. thesis, Univ. Durham, 212pp.
[18] Belcher, H. and Swale, E. 1982. Culturing algae. Burlington Press, Ltd. Cambridge. 25pp.
[19] Guillard, R. R. L. 1973. Division rates. In, Stein (ed), Handbook of Phycological Methods, V. 1, Cambridge Univer. Press, Cambridge, pp. 289-312.
[20] Hsieh, C. H. and Wu, W. 2009. Cultivation of microalgae for oil production with cultivation strategy of area limitation. Bioresor. Technol, 100:3921-3926.
[21] Huang, X. H; Li, C. L; Liu, C. W. and Zeng, D. Q. 2002. Studies on the Ecological Factors of *Oocystis borgei*. J. Zhanjiang Ocean. 22(3):8-12.
[22] Currasi, V.; Mangione, M. R.; Sanfratello, V. 2010. Quantition of fatty acid from vegetable oil by HPLC with Uv. Detection chromatographic science, 48.
[23] Jones, J.; Manning, S.; Montorya, M.; Keller, K.; Poenie, M. 2012. Extraction of algae lipids and their analysis by HPLC and mass spectrometry. J. Am. Oil chem. Soc., 89:1371-1381.
[24] Prescott, G. W. 1973. Algae of the western great lakes area with illustrated key to the genera of desmids and freshwater diatoms. (Reprint1982). Ottokoektz, Sci. pub. koenigstinw germany.pp:977.
[25] Bold, H. C. and Wynne, M. J. 1985. Introduction to the algae, Structure and Reproduction.2nd,Edt, Prentice, Hall, Inc. Englewood – Cliffs 720pp.
[26] Hammes, F.; Vital, M. and Egli, T. 2010. Critical evaluation of the Volumetric ″bottle effect″ on microbial batch growt-h. Appli. Environ. Microbiol, 76:1278-1281.
[27] Ernst, A.; Deicher, M.; Herman, P. M. and Wollenzien, U. T. A. 2005. Nitrate and phosphate affect *Haematococcus pluvialis*. J. Microbiol. Biotechnol. 18: 517-521.
[9] Lv, J. M.; Cheng, L. H.; Xu, X. H.; Zhang, L. and Chen, H. L. 2010. Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. Bioreso. Technol. 101(17): 6797-6804.
[10] Walsby, A. 1982. cell Water and cell-solute relations. in: The Biology of Cyanobacteria (Ed.by N.carr, and Whitton B.), Uni. California press. PP. 237-262.
[11] Uslu, L.; Isik, O.; Koc, K. and Goksan, T. 2011. The effect of nitrogen deficiencies on the lipid and protein contents of *Spirulina platensis*. Afr. J. Biotechnol. 10(3):386-389.
[12] Lin, Y; Horsman, M.; Wong, B; Wu, N. 2008. Effects of nitrogen source on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochlois oleoabundans*. Appl-micro- Biotech, D01,10. 253-008-1681.1.
[13] Mutlu, Y. B.; Isik, O.; Uslu, L.; Koc, Kemal and Durmaz, Y. 2011. The effect of nitrogen and phosphorus deficiencies and nitrite addition on the lipid content of *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae). Afr. J. Biotechnol. 10(3):453-456.
[14] Afify, A. M; Shalaby, E. A. and Sanaa, M. M. 2010. Enhancement of biodiesel production from different species of algae. Grasas Aceites, 61(4):416-422.
[15] Battah, M.; El-Ayoty, Y.; Abomohra, A.; AbElGhany, S.; Esmael, A. 2013. Optimization of Growth and lipid production of Chlorophyta microalgae *Chlorella vulgaris* as a feed stroke for biodiesel production. WASJ. 28(11):1536-1543.
[16] Mohammady, N. and Fakry, E. M. 2014. comprmising Betwee Groth and oil Production of Nannonochloropsis oculte Cultivated Under Halostress. Life Sci. J. 11(5).193:197.

Oil Chemists Society, Champaign, Illinois, pp. 53-72.

[36] Richardson, B.; Orcutt, D. M.; Schwertner, H. A.; Martinez, C. L. and Wickline, H. E. 1996. Effects of nitrogen limitation on the growth and composition of unicellular algae in continuous culture. Appl. Microbiol. 18(2):245-250.

[37] Becker, W. 2004. Microalgae in human and animal nutrition. Richmond, A., ed. Handbook of microalgal culture. Blackwell, Oxford. pp. 312-351.

[38] Miao, X; and Wu, Q. Y. 2006. Biodiesel Production from Heterotrophic Microalgal Oil. Biores. Technol. 97: 841-846.

[39] Widjaja, A. 2009. Lipid production from microalgae as a promising candidate for biodiesel production. Macara. Teknolo. 13(1):47-51.

[40] Shen, Y.; Pei, Z.; Yuan, W. and Mao, E. 2009. Effect of nitrogen and extraction method on algae lipid yield. Int. J. Agric. and Biol. Eng. 2(1):51-57.

[41] Mus, F; Dubini, A; Seibert, M.; Posewitz, M.C. and Grossman, A. R. 2007. Anaerobic adaptation in *Chlamydomonas reinhardtii*: anoxic gene expression, hydrogenase induction and metabolic pathways. J. Biol. Chem. 282:25475-25486.

[42] Hu, Q. Sommerfeld, M.; Jarvis, E.; Ghirardi, M.; Posewitz, M.; Seibert, M. and Darzins, A. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. Plant J. 54:621-639.

[43] Muathis, F. and Amtmann, A. 1999. K^+ nutrition and Na^+ toxicity: the basis of cellular $K^+\backslash Na^+$ rations. Ann Bot-London, 84, 123-133.

[44] Sekmen, A.; Turkan, I.; Tokio, s. 2007. Differential responsesofantioxidative enzymes and lipid peroxidation to salt stress in salt tolerant *plantago maritime* and cultivability of cyanobacteria from environment with low nutrient levels. Appl. Environ. Micro. 71(6):3379-3383.

[28] Mortin, F. P. and Jens, B. 1996. Nutrient control of algal growth in estuarine water. Nutrient limitation and the importance of nitrogen requirements and nitrogen storage among phytoplankton and species of macroalgae. Mar. Ecol. Prog. Ser.142:261-272.

[29] Carlos, J. and Fixavier, N. 1991. Growth of *Dunaliella viridis* Teodoresco. Effect of salinity, temperature and nitrogen concentration. J. Appl. Phycol. 3:319-327.

[30] Wen, Z. and Chen, F. 2001. Optimization of nitrogen source for heterotrophic production eciosapentaenoic acid by the diatom *Nitzschia leavis* enzyme. Microbiol. Technol.29:341-347.

[31] Converti, A.; Casazaa, A. A.; Ortiz, E. Y.; Perego, P. and DelBorghi, M. 2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. Chem. Eng. Process. 48:1146-1151.

[32] Al-Shahrii, Y. A; Basheer, M. and Salman, H. 2008. Growth, Piroxidase activity and Protein content for the local isolate algae *Chlorella vulgaris.* Tikrit. J. of Pure.Sci,14(2):339-346.

[33] Al-Juboori, I. F. 2012. Lipid production from ome local algae at different cultivation conditions. M.Sci. College of Science for Women, Uni. of Baghdad.

[34] Al-Hassany, J. S. 2003. Study of Suitable Conditions to the Diatom Algae *Nitzschia palea* (Kuetz.) W. Smith. M.Sc.Thesis, Colle, of Scie, for Women, Univ. Baghdad. 91pp.

[35] Cohen, Z. and Khozin, G. I. 2005. Searching for PUFA-rich microalgae. In. (Eds) Single Cell Oils. American

saltsesitive plantagomedia. Physiol Plantarum, 131, 399-411.

[45] Cavalcanti, F.; Lima, J.; Ferreira-silva, S.; Viegas, R.; Silveira, J. 2007. Roots and leaves display contrasting oxidative response during salt stress and recovery in coepea. J Plant Physiol, 164:591-600.

[46] Alukaily; T. M. and Alsalman, I. M. A. 2015. Stimulate growth rates and doubling time of green alga *Scenedesmus quadricauda* by variation of quality of culture medium, 2nd, Conf, of Environ and Devlop, 28-29 Oct. Univ, of Tecnol. Baghdad-Iraq.

[47] Cador, J. and Bernard, O. 2008. la production de biocarburant lipidque avecdes micro algues: promesses . et defis. J. Soc. Biol. 202. 3:201-211.

[48] Goyal, A. 2007. Osmoregulation *Dunliella*. II. Photosyntiesis and starch contribute carbon for glycerol synthesis during a salt stress in *Dunaliella tertiolectg*. Plant Physiol Bioch. 45:705-710.

[49] Yoshida, K.; Igarashi, E.; Wakatsuki, E.; Miyamoto, K.; Hirata, K. 2004. Osmitigation of osmotic and salt stresses by abscisic acid through reduction of stress derived oxidative, damage in *chlamydomonas reinhandtii*. Plant. Sci, 167:1335-1341.

[50] Williams, P. and Laurns, L. 2010. Microalgae as biodiesel and biomass feed strock: review and analysis of the biochemistry, energetic and economics. Energ & Enviro. Sci, 3: 554-590.

[51] Bai, M.; Cheng, C.; Wan, H. and Lin, Y. 2011. Micro algal pigments potential as by productions in lipid production. J. of the Taiwan instit. of chemical engineers, 42(5):783-786.

[52] Rao, A; Dayananda, C; Sarada, R; Shamala, T. R. and Ravishankar, G. A. 2007. Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents, Biores. Technol. 98:560-564.

[53] Griffiths, M. J. and Harrison, S. T. L. 2009. Lipid productivity as akey characteristic for choosing algal species for biodiesel production, J. Appl. Phycol. 21(5), 493-507).

[54] Duan, X.; Ren, G. Y.; Liu, L. L. and Zhu, W. X. 2012. Salt-induced osmotic stress for Lipia overproduction in batch culture of chlorella vulgaris. Afric. J. of Biotech, 11(27):7072-7078.

[55] Hassan, F. M.; Hyder, N. H. and Hammadi, S. S. F; 2015. Enhancement of biodiesel production from local isolates of microalgae. Mesopo. Environ, J. 1(3): 66-81.

The effect of nitrogen and sodium chloride stress in the productivity of some fatty acids in *Chlorococcum humicola* green alga

Ibrahim M. A Alsalman ***Thaier I. M Alukaily***

Department of Biology, College of Education for Pure Science/ Ibn-Al-Haitham, University of Baghdad

Received 15 /11 /2015
Accepted 20 /1 /2016

Abstract:

Algae have been considered a sources task of biofuels, which is a future alternative to fossil fuels, and this lead the environmental studies concerned with the lifting of curves or growth rates and time of replication of different kinds of algae, as well as algae cells in response to different environmental conditions, whether chemical or physical, to assess their impact on the composition of these cells and the extent of affected components that make up the living, especially fatty acid ,total fats, proteins and carbohydrates, Gbrha.

Green *Chlorococcum humicola* showed a different response when treated with an average of agriculture Chu-10 and Chu-13 which used as control media, Compared with the degree of its response when exposed to environmental stress when remove of N or adding different concentrations of NaCl for both mentioned media, That represents a different quality and quantity of fatty acids produced inside. When Ch-10 treatment with NaCl fatty acids Palmetic, α-liolenic and Oleic recorded marking increase as for Stearic, Linoleic and Arachidic recorded a decrease in there rates, there for In Ch-13 the acids Palmetic, Linoleic and α-liolenic recorded significantly increase while, decreased value of Stearic acid only. When N remove from the two media, Ch-10 scored a remarkable increase in the rates of all acids except stearic acid which recorded larger decrease. Ch-13 has recorded an increase in acid values Palmetic, Linoleic and, α-liolenic, there for stearic, oleic and Arachidic recorded less than all values in (control.) The results also showed a presence difference in curves, growth rates and replication time when the transactions mentioned.

Key words: Stress, stimulation, inhibition, fatty acid, *Chlorococcum humicola* alga.