الفصـــــــــــــــل الأول

عزل الطحالب واستزراعها

Algal Isolation and Cultivation

الأجهزة والمستلزمات المختبرية :

تستعمل العديد من الأجهزة والمواد المختبرية خلال تغطية المنهج العلمي لمادة الطحالب وكما يأتي :

1- **المجهر الضوئي Microscope** : يستعمل لفحص المزارع الطحلبية والشرائح الزجاجية لتشخيص الأنواع الطحلبية والأعضاء التكاثرية .

2- **المؤصدة الكهربائية (جهاز التعقيم) Autoclave** : يستعمل في تعقيم الأوساط الزرعية Media المحضرة مختبريا وتحت درجة حرارة 121 م وضغط 0.1 ميگا باسكال لمدة 20 دقيقة .

3- **الحاضنة Incubator** : يستعمل هذا الجهاز في تهيئة الظروف المثلى لنمو المزارع الطحلبية الصلبة عادة من درجات حرارة وإضاءة لفترة زمنية معينة .

4- **الفرن الكهربائي Oven** : يستعمل لتعقيم الزجاجيات والأدوات المراد استعمالها مختبريا .

5- **غرفة زرع الطحالب Growth chamber** : تستعمل لزراعة الطحالب تحت ظروف معقمة بعيدة عن التلوث ومهيأة فيها الظروف المثلى لنموها من درجات حرارة وإضاءة ورطوبة.

6- **جهاز الطرد المركزي Centrifuge** : يستعمل هذا الجهاز لفصل الراسب عن الراشح عند حصاد المزارع الطحلبية وعند عمليات العزل والتنقية.

7- **جهاز قياس الحامضية pH-meter** : يستعمل لتحديد الحامضية pH للوسط الزرعي لكي يتلاءم وطبيعة نمو الطحالب .

8- **الشرائح الزجاجية Slides** : تستعمل لتحضير نماذج من الأنواع الطحلبية المنماة على أوساط زرعية سائلة أو صلبة ،ومن العينات التي تجلب من بيئات مختلفة.

9- دوارق زجاجية - ماصات- أطباق بتري- ملاقط- أوراق ترشيح .

الأوساط الزرعية Media

الأوساط الزرعية هي عبارة عن خليط من مغذيات كبرى ومغذيات صغرى مضافا إليها بعض الهرمونات النباتية أو الأحماض الامينية أو الاثنين معا لغرض النمو إذ توزن منها أوزان معينة وتمزج مع الماء لغرض تحضير الوسط الزرعي والذي يعقم مختبرياً بواسطة جهاز المؤصدة الكهربائية وهي على نوعين، أوساط سائلة Liquid media وأوساط صلبة Solid media والأخيرة عبارة عن أوساط سائلة مضاف إليها مادة الاكار بتركيز 1 % ومن أهم الأوساط الزرعية المستخدمة هي ما يأتي :

Allen's *Cyanidium* Medium, Modified

(M. B. Allen 1959, Watanabe *et al.* 2000)

Component	*Stock Solution* ($g \cdot L^{-1}$ dH_2O)	*Quantity Used*	*Concentration in Final Medium (M)*
$(NH_4)_2SO_4$	—	1.320 g	1.00×10^{-2}
KH_2PO_4	—	0.272 g	2.00×10^{-3}
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	—	0.247 g	1.00×10^{-3}
$CaCl_2$	—	0.055 g	5.00×10^{-4}
Trace metals solution	(See following recipe)	1 mL	├─

BG-11 Medium, Modified

(Allen 1968, Allen and Stanier 1968, Rippka *et al.* 1979)

Component	*Stock Solution* ($g \cdot L^{-1}$ dH_2O)	*Quantity Used*	*Concentration in Final Medium (M)*
Fe Citrate solution		1 mL	
Citric acid	6	1 mL	3.12×10^{-5}
Ferric ammonium citrate	6	1 mL	$\sim 3 \times 10^{-5}$
$NaNO_3$	—	1.5 g	1.76×10^{-2}
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	40	1 mL	1.75×10^{-4}
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	75	1 mL	3.04×10^{-4}
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	36	1 mL	2.45×10^{-4}
Na_2CO_3	20	1 mL	1.89×10^{-4}
$MgNa_2EDTA \cdot H_2O$	1.0	1 mL	2.79×10^{-6}
Trace metals solution	(See following recipe)	1 mL	—

Chu #10 Medium

(Chu 1942)

Forsberg's Medium II

Component	*Stock Solution ($g \cdot L^{-1}$ dH_2O)*	*Quantity Used*	*Concentration in Final Medium (M)*
$Ca(NO_3)_2$	40.0	1 mL	2.44×10^{-4}
K_2HPO_4	5.0	1 mL	2.87×10^{-5}
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	25.0	1 mL	1.01×10^{-4}
Na_2CO_3	20.0	1 mL	1.89×10^{-4}
Na_2SiO_3	25.0	1 mL	2.05×10^{-4}
$FeCl_3$	0.8	1 mL	4.93×10^{-6}

(Forsberg 1965)

Component	*Stock Solution ($g \cdot L^{-1}$ dH_2O)*	*Quantity Used*	*Concentration in Final Medium (M)*
Tris base	—	0.5 g	4.13×10^{-3}
Nitrilotriacetic acid	—	20 mg	1.05×10^{-4}
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	—	0.1 g	4.06×10^{-4}
Na_2CO_3	20.00	1 mL	1.89×10^{-4}
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	80.00	1 mL	3.39×10^{-3}
KCl	30.00	1 mL	4.02×10^{-4}
Na_2SiO_3 (anhydrous)	10.00	1 mL	8.19×10^{-5}
K_2HPO_4	0.56	1 mL	3.22×10^{-6}
H_3BO_3	2.29	1 mL	3.70×10^{-5}
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	1.94	1 mL	7.18×10^{-6}
$ZnCl_2$	0.21	1 mL	1.54×10^{-6}
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25	1 mL	1.03×10^{-6}
$CuCl_2$	0.00846	1 mL	6.29×10^{-8}
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.0072	1 mL	3.64×10^{-8}
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.00807	1 mL	3.39×10^{-8}

طرائق التعقيم مختبريا

من الضروري إجراء عملية التعقيم لكافة الأدوات والمستلزمات المستعملة مختبريا عند إجراء عمليات عزل واستزراع الطحالب باستعمال أوساط زرعية مختلفة لتلافي حدوث عملية التلوث بواسطة الأحياء المجهرية (البكتريا و الفطريات) اذ يتم تعقيم المناضد والأماكن التي تستعمل لهذا الغرض ،ومن طرق التعقيم المتبعة مختبريا ماياتي :

1- **التعقيم بالحرارة** : تستعمل الحرارة الرطبة والضغط لتعقيم الأوساط الزرعية بواسطة المؤصدة الكهربائية والحرارة الجافة لتعقيم الأدوات الزجاجية المختبرية باستعمال اللهب أو الفرن الكهربائي.
2- **التعقيم بالكحولات** : يستعمل المذيب العضوي الايثانول (او مطهرات اخرى) لتعقيم المناضد وبعض المستلزمات.
3- **التعقيم بأشعة (UV)** : تستعمل الأشعة فوق البنفسجية لأغراض التعقيم في بعض الأحيان ولاسيما في غرف الزرع الطحلبية.

طرائق عزل الطحالب وتشخيصها : Isolation of algae and identification

تهدف طرائق العزل الطحلبية إلى الحصول على عزلات تحتوي على طحلب واحد وتسمى عزلات وحيدة الطحلب Unialgal cultures ويمكن أن تكون بشكل تجمعات ولكنها ربما تحتوي على فطريات أو بكتريا ،في حين تحتوي العزلات النقية Axenic cultures على نوع طحلبي واحد خال من الإحياء المجهرية . ولغرض الحصول على عزلات وحيدة الطحلب يرشح حجم معين من الماء من المصدر الذي جلب منه بواسطة اوراق ترشيح ثم تنقل هذه الاوراق في حجم قليل من الماء المقطر وتفحص الأنواع الطحلبية تحت المجهر من خلال تحضير الشرائح المجهرية، إذ يمكن ملاحظة عدد منها في حقل المجهر، ولغرض الحصول على عزلات وحيدة الطحلب هناك عدة طرق متبعة لهذا الغرض وهي :

1. طريقة ماصة باستور المعقمة : Sterile pasture pipette method

لغرض الحصول على عزلة طحلبية وحيدة الطحلب بهذه الطريقة يجب إتباع الخطوات الآتية :

أ- جلب شريحة زجاجيه ذي تقعر يمكن أن تسع إلى حجم معين من العينة وإذا لم نحصل على تلك الشريحة نستعمل شريحة اعتيادية بعد وضع قطرة واحدة من العينة وتفحص تحت المجهر بعناية مركزة ويفضل فرش العينة على مساحة غطاء الشريحة .

ب- بعد تحديد الطحلب المراد عزله نحاول سحب تلك الخلية الطحلبية وحدها قدر الإمكان وبدقة متناهية ويتم ذلك بواسطة ماصة باستور المعقمة وهي عبارة عن ماصة زجاجية احد أطرافها عريض و الأخر متناه في الضعف يحتوي الطرف العريض على قطعه بلاستيكية من خلال الضغط عليها تسحب كمية من العينة الطحلبية .

جـ- بعد سحب الخلية الطحلبية وحدها أو معها أنواعا أخرى من الطحالب تنقل إلى وسط زرعي مناسب لنموها.تكرر العملية مرة أخرى وتجرى عليها عملية التخفيف عدة مرات بالماء المقطر إلى أن نحصل على خلية طحلبية واحدة تعود لنوع طحلبي واحد . تحفظ العينات الطحلبية في مزارع خاصة بها وتعتبر مزراع خزينة Stock cultures يمكن الرجوع إليها عند الحاجة .

2- طريقة الماصة الشعرية : Capillary pipette method

في هذه الطريقة تستعمل أطباق بتري معقمة وكما يلي :

أ- نأخذ حجما معينا من العينة المائية(5-10)قطرات ونضعها في وسط طبق بتري ،بعدها نأخذ (6)قطرات من الوسط الزرعي ونجعل كل قطرة لوحدها بحيث تحيط بالعينة المائية وبشكل دائري ثم ترقم النقاط من رقم (1-6) وباتجاه عقرب الساعة.

ب- تنقل قدر الإمكان الخلية الطحلبية التي يراد عزلها من العينة المائية بواسطة ماصة معقمة ذات نهاية مدببة وتوضع على القطرة الأولى من الوسط الزرعي ،ثم تنتقل من قطرة الى أخرى لغرض التخفيف وإعطاء فرصة أكثر للحصول على عزلة طحلبية وحيدة ، بعد ها تنقل أحدى القطرات (المتوقعة هي القطرة السادسة والتي قد تمثل عزلة طحلبية وحيدة الطحلب) أو عدد من القطرات الى انابيب اختبار تحتوي على الوسط الزرعي المناسب لنمو الطحلب .

3- طريقة التخطيط : Streak plate method

تستعمل هذه الطريقة لعزل الطحالب ذات الأحجام الدقيقة حوالي (10) مايكرومتر أو اقل وتستعمل في هذه الطريقة أوساط زرعية صلبة وتتضمن ما يأتي :

أ- تحضر أطباق حاوية على أوساط زرعية صلبة ، إذ توضع قطرة أو قطرتان من العينة المائية المراد عزل الطحلب منها في حافة طبق بتري .

ب- تعمل عدة خطوط متوازية من القطرة الموجودة في حافة طبق بتري ،وذلك باستعمال سلك معدني معقم loop لعمل تلك الخطوط المتوازية، بعدها تغلق الأطباق وتحضن تحت ظروف الزرع الملائمة من درجات حرارة وإضاءة لمدة من الزمن (4-8) أيام .

جـ - بعد الفترة أعلاه تفحص الأطباق بالمجهر التشريحي للتعرف على النمو الطحلبي إذ ينقل جزء من الوسط الصلب وما يحتويه من الخلايا الطحلبية برفق إلى أنابيب اختبار حاوية على أوساط زرعية سائلة وقبل هذه الخطوة تفحص مجموعة من الأطباق تحت المجهر وذلك بعمل شرائح زجاجية لغرض الحصول على خلايا طحلبية تعود لنوع طحلبي واحد.

4- طريقة النشر Spray plate method

تستعمل هذه الطريقة أيضا لعزل الطحالب ذات الأحجام الدقيقة حوالي (10) مايكرومتر أو اقل باستعمال أوساط زرعية صلبة وتتضمن ما يأتي :

أ- تحضر أطباق بتري حاوية على أوساط زرعية صلبة .

ب- تسحب قطرة من العينة المائية الحاوية على الطحلب المراد عزله بواسطة ماصة زجاجية معقمة ذات نهاية رفعية جدا أما الطرف الآخر فيربط بواسطة محرك أو مضخة هواء ويوضع طبق بتري بشكل عمودي مقابل الطرف الرفيع للماصة .

جـ - يندفع الماء إلى الطبق بشكل رذاذ متطاير منتشرا بمساحة واسعة داخل طبق بتري .

د- تحضن الأطباق لمدة (4-8) أيام تحت ظروف العزل المعروفة وتفحص بالطريقة المشار إليها سابقا في طريقة التخطيط لحين الحصول على عزلة وحيدة الطحلب.

5- طريقة عزل الطحالب على وسط الاكار الصلب: Isolation of algae on agar

أ- تحضر أطباق بتري حاوية على اوساط زرعية صلبة .

ب- توضع قطرة أو قطرتان من العينة الطحلبية في مركز الطبق الحاوي على الوسط الزرعي الصلب ،بعدها تحضن الأطباق لمدة (4-8) أيام وتفحص مهجريا لغرض تحديد الخلية الطحلبية المراد عزلها وتسحب بطريقة حذرة بواسطة إبرة أو سلك ضعيف معقم loop وبعد عزلها تنقل إلى أوساط زرعية سائلة وتفحص باستمرار وباستعمال المجهر للحصول على عينة طحلبية وحيدة .

6- طريقة عزل الطحالب من الهواء الجوي : Isolation of algae from atmosphere

أ- تحضر أطباق بتري حاوية على أوساط زرعية صلبة ،وتعرض الأطباق إلى الهواء بصورة مباشرة ثم تغطى وتحضن لمدة (2-6) أسابيع في الحاضنة تحت ظروف العزل المعروفة.

ب- بعد فترة الحضن تفحص العينات تحت المجهر،و بعد الحصول على العينة المراد عزلها تسحب بدقة بواسطة سلك معدني ضعيف وتنقل إلى أنابيب اختبار حاوية على أوساط زرعية سائلة لغرض النمو وتفحص باستمرار .

استزراع الطحالب Algal culturing

هناك عدة طرق متبعة لاستزراع الطحالب وإكثارها وهي كما يأتي :

1- مزارع الوجبات Batch culture

تعد هذه الطريقة من اكثر المزراع شيوعا وذلك لبساطتها وقلة تكلفتها وهي عبارة عن نظام مغلق محدود الحجم ولا يتم فيها ادخال او اخراج المواد وهذا يعني ان المصادر محدودة إذ تزداد كثافة مجتمع الخلايا الطحلبية بشكل متواصل حتى تستنزف العوامل المحددة للنمو أي المكونات الغذائية للوسط الزرعي بمرور الوقت فضلا عن زيادة النواتج الايضية المنتجة من الخلايا . تستعمل المصادر الأساسية لمرة واحدة من قبل الخلايا وتموت المزرعة ما لم تزود بوسط جديد ولعمل ذلك ولغرض المحافظة على إدامة المزرعة الطحلبية يجب أن يتم زرع ثانوي Subculture للمزرعة الطحلبية إذ ينقل حجم معين من المزرعة إلى وسط زرعي جديد ذي حجم كبير يحتوي على تركيز عال من المغذيات لكي تبدأ المزرعة بالنمو من جديد وتستمر لحين الحصاد ، وعليه فان هذه الطريقة تسمح للخلايا بالنمو والتكاثر في اوعية مغلقة (قناني حجميه مختلفة الأحجام) (شكل-1).

2- المزارع المستمرة Continous cultures

تكون المصادر في مثل هذه المزارع غير محدودة إذ يتم المحافظة على المزارع عند نقطة معينة من منحى النمو من خلال الاضافة المنتظمة والمستمرة للوسط الزرعي ، أي يضاف حجم معين من الوسط الزرعي وبمعدل نسبي مساو إلى معدل نمو الطحالب ، وفي الوقت نفسه يزال حجم معين (مساو) للحجم الذي أضيف من الوسط الزرعي وعليه فان هذه الطريقة تسمح بالاحتفاظ بالمزارع بشكل مقارب جدا إلى معدل النمو العالي لها لان الوسط لايخلو دائما من المغذيات (شكل -2) وهناك نوعان منها :

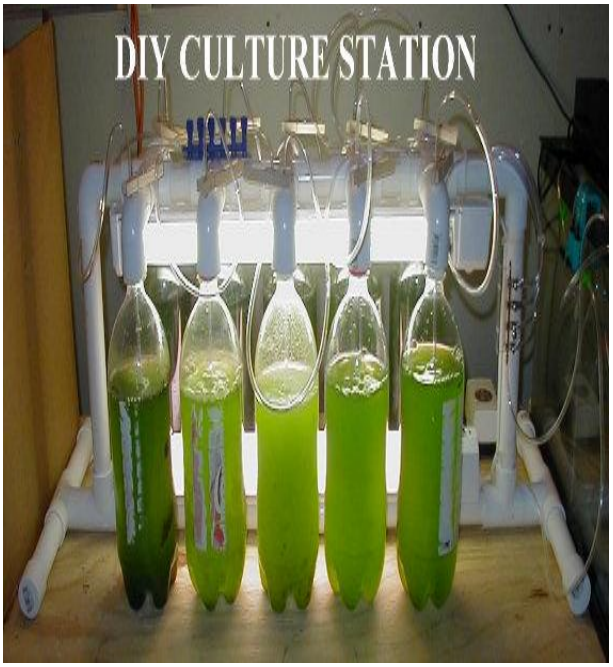
أ- Turbidostat cultures

وفيها ينقل الوسط الزرعي الجديد فقط حينما تقل كثافة الخلايا إلى النقطة المحدودة والتي تقاس بواسطة انطفاء الضوء المار خلال المزرعة وعند هذه النقطة يضاف الوسط الجديد الى المزرعة ويزال في الوقت نفسه حجم مساو له منها إذ تزداد كثافة الخلايا من جديد وهكذا تكرر العملية باستمرار.

ب- Chaemostat Cultures

يضاف فيها أيضا الوسط الجديد إلى المزرعة بشكل ثابت وبمعدل محدود كما ذكر سابقا ، مع إضافة بعض المغذيات بكمية محدودة مثل (النترات) وبمعدل ثابت وفي هذه الحالة فان معدل النمو وكثافة الخلايا لا تحتفظ بثباتها وان إضافة الوسط يجدد معدل النمو وكثافة الخلايا .

شكل -1 - يوضح مزارع الوجبات Batch cultures



شكل- 2- يوضح المزارع الطحلبية المستمرة Continuous cultures

3- المزارع شبه المستمرة : Semi-continous cultures

في هذا النوع من المزارع ينقل الوسط الزرعي الجديد إلى المزرعة ولمرة واحدة من خلال صمام بسيط مفتوح عند خط نقل الوسط إذ يمر الوسط الجديد في وعاء المزرعة و بالوقت نفسه تطرح المزرعة خلال الأوعية الجامعة.

4- المزارع الكتلوية : Mass cultures

لجأ الباحثون إلى تطوير نظام مزارع الوجبات وذلك بسبب عدم إعطائه صورة واضحة على ما يحدث في بيئة الكائن الحي، وكذلك قلة الكتلة الحية Biomass التي يتم الحصول عليها ،فقد استعملت طريقة جديدة لحل تلك المشكلات وهي طريقة المزارع الكتلوية والتي تسمى أحيانا Large-Scale cultures syste أو big-bag إذ يتم في هذه الطريقة تنمية الطحالب في مزارع وأحواض كبيرة مجهزة بجميع المغذيات ، وقد تزرع الطحالب في البيئة الطبيعية لها وذلك بإنشاء برك صناعية مخصصة لهذا الغرض مع متابعة كل الظروف المحيطة بها ودعمها بالمغذيات لانتاج اكبر كمية من الكتلة الطحلبية ، ويمكن بواسطة هذه الطريقة أن ننتج مزارع مكونة من نوع طحلبي واحد Unialgal cultures بعد إكثارها في أحواض كبيرة في المختبر مجهزة بكل الظروف الجيدة للنمو . ويمكن الاستفادة من هذه الطريقة لإنتاج كتلة طحلبية كبيرة تستعمل كغذاء للإنسان وكعلف للحيوانات و بواسطتها يتم التعرف على الأضرار الناتجة عن تأثير التلوث بالطحالب أو غيرها من الأحياء (شكل-3).

مقدمة في الطحالب :

تضم الطحالب مجاميع مختلفة من الكائنات الحية القادرة على البناء الضوئي ، وحيدة الخلية أو متعددة الخلايا وتختلف هذه الكائنات في أحجامها اختلافا كبيرا من دقيقة جدا لاترى بالعين المجردة (1مايكرومتر) إلى كبيرة جدا تصل في أطوالها إلى أكثر من 200 م كما في الطحلب *Macrocystis pyrifira* . تقع الطحالب ضمن مملكتين الطحالب الخضر المزرقة blue -green algae المعروفة بالساينوبكتريا Cyanobacteria ضمن مملكة الأوليات Monera وتضم كائنات بدائية النواة Prokaryota أما القسم الآخر ضمن مملكة الطليعيات Protista وهي كائنات حقيقية النواة Eukaryota . الطحالب من الكائنات المختلفة بشكل كبير في ألوانها مما تعد وسيلة مهمة في تصنيفها غير أنها كثير ما تتغير بتغير الظروف البيئية و إن التصنيف الصحيح لابد من أن يعتمد على المعايير الصحيحة ومنها التحليل الكيمائي للصبغات التمثيلية التي تتمثل بالكلوروفيلات (a و b و c و d و e) والكاروتينات (α وβ وγ) والبليبروتينات ومنها Phycoerythrine و Phycocyanin والزانثوفيلات التي تضم Anthraxanthin و Taraxanthinو Myxoxanthin .