# عزل وتنمية الطحالب Isolation & Culturing of algae

## الاجهزة والادوات المختبرية

تستعمل العديد من الاجهزة والادوات المختبرية عند عزل الطحالب من بيئة معينة لغرض تنميتها ودراستها وكالآتي :

1- **المجهر الضوئي Photomicroscope** : يستعمل لتشخيص انواع الطحالب والتعرف على اشكالها بواسطة فحص الشرائح الزجاجية (السلايدات) الحاوية على مسحة من المزرعة الطحلبية.

2- **المؤصدة Autoclave** : لتعقيم الاوساط الزرعية المحضرة مختبريا بدرجة حرارة 121° م وضغط 1 جو ( 15 باوند\أنج$^{2}$ ) لمدة 15 دقيقة .

3- **الحاضنة المضيئة Lightening incubator** : تعمل على تهيئة الظروف المثلى لنمو المزارع الطحلبية الصلبة عادة من درجات حرارة واضاءة مستمرة .

4- **الحاضنة الهزازة Shaker incubator** : تستخدم لتنمية المزارع الطحلبية السائلة .

5- **غرفة النمو الطحلبي Algal growth chamber** : وهي غرف مغلقة يتم فيها تنمية الطحالب تحت ظروف ملائمة من درجة حرارة مثلى واضاءة وتكون معقمة بعيدا عن التلوث

6- **الفرن الكهربائي Oven** : لتعقيم الزجاجيات المختبرية كالدوارق والبيكرات وانابيب الاختبار

7- **جهاز الطرد المركزي Centrifuge** : يستعمل لفصل الراسب عن الراشح عند حصاد المزارع الطحلبية وكذلك عند عمليات العزل والتنقية من اجل ترسيب خلايا الطحلب وفصلها عن الخلايا الاخرى .

8- **جهاز قياس الحامضية pH-meter** : لقراءة حامضية الوسط الزرعي من اجل توفير اس هيدروجيني ملائم لنمو المزرعة .

9- **الادوات الاخرى كالشرائح الزجاجية والماصات الدقيقة واطباق بتري والملاقط واوراق الترشيح والسرنجات .**

ومن الضروري اجراء عمليات التعقيم على الادوات والمستلزمات المستعملة في عزل وتنمية الطحالب وذلك لتلافي حدوث اي تلوث بالبكتريا وسبورات الفطريات كتعقيم المناضد والاماكن التي تجرى عليها عملية العزل والزرع .

1- التعقيم بالحرارة : تستعمل الحرارة الرطبة لتعقيم الاوساط الزرعية بواسطة الاوتوكليف اما الحرارة الجافة تستعمل لتعقيم الادوات الزجاجية وتتم باللهب او الفرن الكهربائي .

2- التعقيم بالكحول : يستعمل المذيب العضوي الايثانول بتركيز( 70-75 ) ٪ ومطهرات اخرى لتعقيم المناضد ومكان الزرع ( Hood ) .

3- التعقيم بالاشعة فوق البنفسجية : تستخدم لتعقيم غرف الزرع الطحلبية .

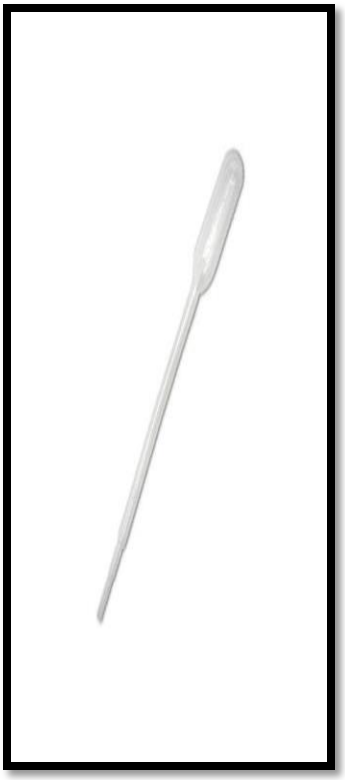
## طرق عزل وتنمية الطحالب Isolation & Culturing methods of algae

يقصد **بالتنمية Culturing** تحفيز خلايا الطحلب على التكاثر وبالتالي تضاعف اعداد الخلايا الطحلبية وزيادة الكتلة الحيوية .

اما **العزل isolation** فهو الحصول على نوع واحد من بين انواع الطحالب الموجودة في المزرعة المنماة من العينة او العينات التي جمعت مسبقاً من مواقع معلومة ضمن النظام البيئي .

ان طرائق عزل الطحالب تهدف الى الحصول على عزلات تحتوي طحلب واحد وتسمى عزلات وحيدة الطحلب Unialgal culture والتي قد تكون على شكل مستعمرات او تجمعات ولكنها تحتوي بكتريا او فطريات او ابتدائيات ، او تحتوي على نوع طحلبي واحد بدون احياء مجهرية وتسمى العزلات النقية Axenic culture .

ولغرض الحصول على العزلات الطحلبية يجب اولاً ترشيح حجم معين من العينة المائية بواسطة اوراق ترشيح معينة ثم تنقل هذه الاوراق في حجم قليل من الماء المقطر على السلايدات وتفحص تحت المجهر. ولغرض الحصول على عزلات وحيدة الطحلب تستعمل عدة طرق هي :



اولا: **طريقة ماصة باستور المعقمة Sterile pasture pipette :**

توضع عدة قطرات من ماء العينة في تقعر شريحة زجاجية مقعرة واذا لم تتوفر توضع قطرة واحدة من العينة وتفحص تحت المجهر بعناية مركزة ويفضل فرش القطرة في المنطقة الوسطى للسلايد . وبعد ان نحدد الطحلب المراد عزله نحاول سحب تلك الخلية الطحلبية بمفردها قدر الامكان وبدقة بواسطة ماصة باستور المعقمة وهي عبارة عن ماصة بلاستيكية او زجاجية احد طرفيها نحيف جدا والاخر مزود بقطعة بلاستيكية عند الضغط عليها تسحب الماصة كمية من ماء العينة مع الطحلب المراد عزله .

**ماصة باستور Pasture pipette**

**شريحة مقعرة Concave slide**

ثانياً: **طريقة الماصة الشعرية Capillary pipette methods** : يؤخذ حجم (5-10) قطرات من العينة المائية وتوضع وسط طبق بتري بعدها تؤخذ (6) قطرات من الوسط الزرعي السائل ونجعلها بشكل دائرة تحيط بالعينة المائية وترقم النقاط من 1 الى 6 مع اتجاه عقرب الساعة، ثم ننقل قدر الامكان الخلية الطحلبية المراد عزلها من العينة المائية بواسطة الماصة الشعرية المعقمة ذات النهاية المدببة وتوضع على القطرة الاولى في الطبق، ثم ننقل ايضا خلية الطحلب المراد عزلها بواسطة الماصة الشعرية الى القطرة الثانية في الطبق وهكذا الى الثالثة ..... حتى القطرة السادسة والتي تُنقل الى فلاسك يحتوى الوسط الزرعي الملائم لنمو الطحلب . ان الغرض من نقل الخلية من قطرة لأخرى هو لأجل التخفيف للخلايا الموجودة وأعطاء فرصة للحصول على خلية طحلبية واحدة وان النقل من قطرة لأخرى يكون تحت المجهر التشريحي .

**الماصة الشعرية Capillary pipette**

**المجهر التشريحي Dissecting Microscope**

**ثالثاً: طريقة التخطيط Streaking Plate method :** تستعمل هذه الطريقة لعزل الطحالب ذات الاحجام الدقيقة والتي حجمها اقل او يساوي 10μm كالسيانوبكتريا وبعض الطحالب الخضراء والدايتومات والطحالب اليوغلينية كلآتي :

**1-** تُحضر اطباق حاوية على اوساط زرعية صلبة ويوضع كمية قليلة جدا من اللقاح من مزرعة طحلبية منماة بالمختبر او قطرتان من عينة مائية جمعت مسبقاً وتوضع في حافة طبق بتري .

2- باستعمال اللوب Loop تُعمل عدة خطوط متوازية من القطرة او اللقاح الموجود في حافة الطبق ثم نغلق الاطباق ونحضن بالحاضنة المضيئة بدرجة حرارة 26±2 واضاءة مستمرة شدتها 2500 لوكس Lux .

3- بعد فترة 3 الى 4 اسابيع نلاحظ النمو الطحلبي وبواسطة الفحص بالمجهر التشريحي ننقل جزء من النمو الطحلبي التي هي من نوع واحد برفق الى الدوارق الزجاجية التي تحتوي وسط زرعي ملائم وتحضن تحت نفس الظروف السابقة بالحاضنة الهزازة Shaker incubator .

رابعاً : **طريقة النشر على الطبق Spray plate method** : تستخدم هذه الطريقة لعزل الطحالب ذات الاحجام الدقيقة حوالي 10 مايكروميتر او اقل باستعمال اوساط زرعية صلبة وكالآتي :

1- تحضر اطباق بتري حاوية على اوساط زرعية صلبة .

2- تسحب قطرة من العينة المائية الحاوية على الطحلب المراد عزله بواسطة ماصة زجاجية ذات نهاية رفيعة جدا ويكون طرفها الاخر مربوط بمضخة هواء ( ويمكن استعمال سرنج) ويوضع طبق بتري بحيث تكون النهاية الرفيعة عمودية على سطح الطبق .

3- ندفع الماء بقوة بواسطة الماصة الى سطح الطبق بشكل رذاذ متطاير منتشراً بمساحة واسعة على داخل الطبق .

4- تحضن الاطباق لمدة 3-4 اسابيع تحت ظروف العزل المعروفة من درجة حرارة 26±2 واضاءة مستمرة شدتها 2500 لوكس، وبعد ذلك نفحص النمو تحت المجهر التشريحي ثم نقوم بنقل جزء من الوسط الصلب وما يحتويه من خلايا طحلب نامية مطلوب عزلها الى دوارق زجاجية حاوية على اوساط سائلة وتحضن تحت نفس الظروف الملائمة المذكورة سابقا من درجة حرارة واضاءة مستمرة .