اهم الاجهزة المختبرية
طرق التعقيم
طرق عزل الطحالب

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 الاتنين 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	⊢

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 .

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.