أكثار المزارع الطحلبية بأستعمال عدة طرائق بوساطة أوساط زرعية مختلفة

أحمد عيدان الحسيني
هبة ثامر حسين
أمل حمزة حمود
مركز بحوث ومختبرات المياه
وزارة العلوم والتكنولوجيا

الخلاصة

تناولت الدراسة عملية أكثار الطحالب بمختلف الطرائق وذلك لأهمية الطحالب في مجالات كثيرة من خلال أستعمال مركباتها الفعالة في المعالجات وأستعمالها كمسحوق لادمصاص الملوثات وهذا يحتاج إلى كتلة حيوية كبيرة ، إذ أستعملت ثلاث طرائق لإكثار الطحالب في الأوساط السائلة وهي أستعمال الأوساط الزرعية السائلة المحضرة صناعيا من مواد كيميائية وأستعمال مياه الصرف الصحي المفلترة المعقمة من حوض الترسيب الثانوي قبل مرحلة أضافة الكلور وأستعمال احد الأوساط الزرعية المحضرة صناعيا مع مياه الصرف الصحي المعقمة بنسبة 1:1 ، إذ بينت النتائج الحصول على 32 لتر ككتلة حية خلال مدة تجربة بلغت 68 يوم مبتدءه بلقاح أبتدائي للطحلب بحجم 5 مللتر ، تمت مراقبة النمو الطحلبية من خلال الأطوار الخاصة بالنمو المتمثلة بطور الأقلمة وطور الزيادة الاسية وطور الاستقرار وطور الموت ، فضلا عن موشر العدد الخلوي للطحالب أعتمدت على قياس الكثافة الضوئية وعلى الطول الموجي 540 نانومتر كموشر لزيادة الكتلة الحية للمزارع السائلة الطحلبية . من خلال النتائج تبين أن الطريقة التي تناسب جميع أنواع الطحالب للاكثار هي طريقة أستعمال الوسط الزرعي المحضر صناعيا Chu-10 مع مياه الصرف الصحي المعقمة المفلترة بنسبة 1: 1 هي طريقة تناسب كل أنواع الطحالب ، أما طريقة أستعمال مياه الصرف الصحي المعقم المفلتر فقط لبعض أنواع الطحالب الخضر المزرقة ، وأستعمال طريقة الاوساط الزرعية المحضرة صناعيا فقط تناسب مزارع الطحالب الخضر للإكثار .

الكلمات المفتاحية : أكثار ، أوساط زرعية ، طحالب ، الصرف الصحي .

المقدمة

أن الانتشار الواسع للطحالب جعلها مادة غذائية وطبية أساسية ومهمة ليس للإنسان فحسب بل للأحياء الأخرى كافة ، تنتج الطحالب نوعين من المواد وتكون هذه المواد أما موجودة داخل الخلايا فتسمىEntracellular Products وأما تقوم بإفرازها إلى المحيط الذي تعيش فيه وتسمىExtracellular products [1] . كما أن الانتشار الواسع للطحالب جعلها مادة أساسية ومهمة ليس للإنسان فحسب بل للإحياء الأخرى كافة. تشكّل الطحالب القاعدة الأساسية في السلسلة الغذائية للبيئة المائية, أذ تستخدم الطحالب بوصفها غذاءً مباشراً للإنسان, أذ تستعمل أعشاب البحر Seaweeds غذاءً منذ أقدم العصور في عدة دول مثل دول شرق آسيا والمحيط الأطلسي ومنها *Laminaria* و*Porphyra*, أذ تتميز بمحتواها العالي من البروتين والكاربوهيدرات والفيتامينات واليود والبوتاسيوم والحديد والمغنيسيوم والكالسيوم [2].كذلك تستعمل الطحالب في تغذية الحيوانات لاسيما في المناطق الساحلية أذتجفف وتطحن وتقدم علفاً للتغذية وذلك لقيمتها الغذائية واحتوائها على نسب عالية من الفيتامينات وأملاح اليود والبوتاسيوم. ويعد طحلب *Chlorella vulgaris* الاكثر شيوعا ويتميز بمحتواه العالي من البروتين والذي يتراوح بين 45-50% [3]. تستعمل الطحالب كذلك بوصفها مخصبات للتربة أذ تم تحليل هذه الطحالب كيميائياً ووجَد انها تحتوي على $CaCO_3$ بنسبة 32.1 ٪ و $MgCO_3$ بنسبة 3.1 ٪ من الوزن الجاف [4]. كما تنتج الطحالب البنية مثل *Ascophyllum nodosum* و *Fucus vesiculosus* فينولات متعددة (Polyphenols) وتكون ذات فعالية مضادة للتاكسد, وكما لها اهمية في الصناعات الدوائية[5]. كما يمكن أستعمال الطحالب في أنتاج الوقود أذ يمكن استخدامها لإنتاج الايثانول الحيوي Bioethanol والنفط الحيوي Biodiesel والبيوتانول الحيوي Biobutanol . وتستعمل الطحالب الدقيقة Micro-algae مثل الدايتومات والطحالب الخضر المزرقة أكثر من الطحالب الكبيرة Macroalgae بسبب النمو السريع وبساطة تركيبها التي تستزرع في برك مفتوحة لتنمية الطحالب بأكبر كمية ويتم أختبار الأنواع التي تحتوي على أكبر نسبة من الدهون التي تحوي أحماض دهنية غير مشبعة (Unsaturated Fatty acids) ومثال على هذه الطحالب *Parietochloris incise*

الذي يحتوي على Arachidonic acids وبنسبة 47 ٪ من الكليريدات الثلاثية [6].وللطحالب اهمية بيئية كبيرة في ادامة التوازن الغازي بين الأوكسجين وثاني اوكسيد الكاربون بين الجو والمياه, اذ أن حوالي 90% من مجموعة البناء الضوئي في الطبيعة تقوم بها الطحالب البحرية وخاصة الهائمة منها[7]. وعليه فقد هدف البحث إلى أمكانية إكثار المزارع الطحلبية بمختلف الطرائق للوصول إلى كتلة حيوية يمكن أستعمالها في مجالات مختلفة .

المواد وطرائق العمل

1- جمع النماذج وتنميتها :

جمعت النماذج من عدة مناطق في مدينة بغداد منها نهر ديالى ومنطقة الزعفرانية، تم الحصول على العزلة بطريقة الزرع على وسط Agar-Agar ، بعدها استزرعت العزلة في أوساط صلبة ولعدة مرات للحصول على عزلة نقية وأكثارها في أوساط زرعية محضرة صناعيا كما مدرجة مكوناته في الجدول(1).

الأوساط الزرعية					
الوزن (ملغم/لتر)	المحور Chu-10 [8]	Allens Modified [9]	الوزن (ملغم/لتر)	Beijerinck Media (Stein) [10]	الوزن (ملغم/لتر)
10	$MgSO_4.7H_2O$	NaNo3	1.5	NH_4NO_3 K_2HPO_4 $MgSO_4.H_2O$ $CaCL_2.2H_2O$	1.5 0.2 0.2 0.1
8	Na_2NO_3	Na2Co3	0.02	KH_2PO_4	9.07
4	K_2HPO_4	Na2SiO3.9H2O	0.058	K_2HPO_4	11.61
16	$CaCl_2$	Citric acid	0.006	H_3BO_3	1.0
0.32	$FeCl_3$	Ferric acid	0.006	$CuSO_4.H_2O$	0.15
4	$EDTA\text{-}Na_2$	EDTA	0.001	$_{Na}$ EDTA	5.0
30	NaCl	CaCl2	0.027	$MnCl_2.4H_2O$	0.5
8	Na_2CO_3	MgSo4.7H2O	0.075	$ZnSO_4.7H_2O$	2.2
0.04	$MnCl_2.4H_2O$	K2Hpo4	0.039	$FeSO_4.7H_2O$	0.5
0.007	$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	H3Bo3	0.613	$COCl_2.6H_2O$ $(NH_4)6MO_7O_2.4H_2O$	0.15 0.10
0.056	$ZnSO_4.7H_2O$	Na2Mo o4 .2H2O	0.504		
0.02	$CuSO_4.5H_2O$	MnCI2 .4H2O	0.72		
0.01	$CuCl_2.6H_2O$	Zn So4 .7H2O	0.23		
0.72	H_3BO_3	CoCl . 2H2O	0.08		
5.7	Na_2SiO_3	CuCI 2.2H2O	0.000034		

جدول (1) الأوساط الزرعية المحضرة صناعيا والمستعملة في تنمية الطحالب

عزل الطحالب

أُجري العزل بأتباع الخطوات الأتية:

أ- حضر وسط Chu-10 الصلب بأضافة Agar-Agar بنسبة 2٪, وبعد تعقيم الوسط بجهاز الموصدة صُب في أطباق بتري معقمة ثم تركت لتتصلب ليتم أستعمالها في العزل. أخذت بضع قطرات من العينة المراد زرعها ثم نُشرت على سطح الوسط الصلب. وضعت الأطباق بعدها في ظروف مسيطر عليها من إضاءة مستمرة بشدة 245 مايكروانشتاين /م^2 / ثا ودرجة حرارة25±1 مئوية لمدة 7-14 أيام . تم بعدها ملاحظة أنواع الطحالب النامية من خلال فحصها مجهرياً وتم ذلك بنقل جزء من مستعمرات الطحالب النامية إلى أطباق بتري تحتوي على الوسط Chu-10 وتركت لتنمو في الظروف نفسها لغرض الحصول على مزرعة وحيدة الطحلب (Unialgal culture). كررت هذه العملية الى حين الحصول على المزرعة وحيدة الطحلب[10].

ب- نقل جزء من المستعمرة بعد التأكد من أحتوائها على نوع واحد فقط من الطحالب الى الوسط Chu-10 السائل في دوارق زجاجية حجم250 مللتر في ظروف معقمة, ووضعت الدوارق في ظروف التنمية السابقة نفسها لمدة أسبوعين للحصول على نمو مناسب. وفحصت المزرعة السائلة مجهرياً للتأكد من خلوها من أنواع اَخرى من الطحالب وتم تجديد المزرعة كل أسبوعين للمحافظة على ديمومة المزرعة.

تنقية الطحالب

أستعملت طريقتان للحصول على عزلة نقية Axenic culture خالية من البكتريا والفطريات وهي:

الأولى : طريقة[11] لتنقية الطحالب من خلال أجراء الأتي:

أ-أخذ حجم معين 50مللتر من المزرعة وترك في مكان مظلم لمدة 24ساعة في درجة حرارة الغرفة ثم سحب 10 مللتر إلى وسط زرعي جديد ومعقم ثم ترك لمدة2-3 ساعة في الظلام أيضا.

ب-نبذت المزرعة بوساطة جهاز النبذ المركزي (2000دورة/دقيقة) لمدة ثلاث دقائق.

جـ- سحب الرائق بوساطة قطارة معقمة وأُعيد غسل الراسب بالماء المقطر المعقم وكررت هذه العملية 10-15 مرة.

د-زرع جزء صغير من الراسب في وسط زرعي معقم لغرض تنشيط النمو.

هـ-أخذت قطرة من المزرعة السابقة ونشرت على سطح الوسط Nutrient Agar وحضنت في 37 م لمدة18 ساعة للتأكد من نقاوتها ولأختبار خلو المزرعة من البكتريا والفطريات.

الثانية: طريقة الانجذاب الضوئي الموضحة من[12] لتنقية مزرعة الطحالب وحسب الخطوات الأتية:

أ- حضرت أطباق بتري تحتوي على وسط Chu-10 الصلب المعقم.

ب-أخذ حجم معين من المزرعة بوساطة عروة الناقل Loop معقمة ونشر في أحد أنصاف الطبق.

جـ- تم تغطية النصف المزروع من الطبق بوساطة ورق الألمنيوم Alminium foil مع توجيه مصدر ضوء الى النصف غير المزروع ولمدة أسبوعين.

د-بدأت الطحالب المزروعة في النصف المغطى بالنمو بأتجاه مصدر الأضاءة أخذت نهاية المستعمرات النامية التي تكون خالية من البكتريا والفطريات وبتكرار هذه العملية لعدة مرات تم الحصول على مزرعة نقية خالية من التلوث البكتيري والفطري.

الدراسة النوعية

شخصت الهائمات النباتية غير الديتومية بتحضير شرائح مؤقتة وفحصها على قوة X 40 بأستعمال مجهر مركب نوع Zeiss. ولتشخيص الديتومات وضعت قطرة من الأنموذج المركز (الذي جمع بشكبة الهائمات النباتية) وسط الشريحة الزجاجية. شخصت أنواع الهائمات النباتية غير الديتومية والدايوتومية بالاعتماد على المصادر [13] و [14] و [15].

حساب الكتلة الحية

استعمال شريحة حساب عدد كريات الدم Haemocytometer وحسبت خلايا الطحالب بأستعمال طريقة القطاع المستعرض وحسب الخطوات الآتية :-

حجم العينة في القطاع الواحد (ملم^3) =طول القطاع (ملم) ×عرض القطاع(ملم) ×عمق الشريحة (ملم) .

عدد القطاعات في مللتر واحد من العينة =1000(ملم^3) ÷ حجم العينة في القطاع الواحد(ملم^3) .

عدد الخلايا في واحد مللتر من العينة =معدل عدد الخلايا في قطاع واحد × عدد القطاعات في واحد مللتر من العينة .

واعتمدت معادلات[16]. في حساب معدل النمو(M) Growth rate

$$M = \frac{\ln(X2 / X1)}{t_2 - t_1}$$

إذ أن M = معدل النمو .

X2 = عدد الخلايا / مللتر في زمن t_2 (خلية /مللتر) .

X1 = عدد الخلايا / مللتر في زمن t_1 (خلية / مللتر) .

T_2 = أخر يوم من التعريض للعنصر المستخدم .

T_1 = أول يوم من التعريض للعنصر المستخدم .

ومن تم حساب زمن التضاعف (G) Doubling time .

وبالاعتمادعلى [16]. وحسب المعادلة الآتية :

$$G = \frac{\ln 2}{M}$$

الفحوصات الكيميائية

العكورة

أستعمل جهاز قياس العكورة Turbid meter نوع HACH موديل 2100A لقياس عكورة نماذج المياه بعد معايرة الجهاز بالمحاليل القياسية الخاصة وعبر عن النتائج بوحدة Nypthyl Turbidity Unit (NTU) .

الأس الهيدروجيني

تم قياس درجة الأس الهيدروجيني لنماذج المياه مباشرة بأستعمال جهاز قياس الأس الهيدروجيني (pH - meter) المجهز من شركة Boston نوع EXTECH

موديل m62 بعد معايرته بأستعمال المحاليل الدارئة Buffer Solution ذات pH 4 و7 و9 .

قابلية التوصيل الكهربائي والملوحة

قيست التوصيلية الكهربائية بوساطة جهاز قياس التوصيل الكهربائي Portable Conductivity meter موديل PW9525 المجهز من شركة Philips وعبر عن نتائجها بالميكروسيمنز/سم (μ S/ cm) واعتماداً على قيم التوصيلية الكهربائية تم قياس الملوحة وفقا للمعادلة التالية [17]:

$$\text{الملوحة} \circ \% = \frac{\text{التوصيلية الكهربائية (ميكروسيمنز/سم)} - 14.78}{1589.08}$$

الكالسيوم

أستعملت الطريقة الموضحة من قبل[18] لقياس تركيز الكالسيوم في الأنموذج حيث تم أخذ 50 مللتر من أنموذج الماء وأضيف إليه 2 مل من هيدروكسيد الصوديوم ذي تركيز(1 عياري) لرفع درجة الأس الهيدروجيني إلى 13-14 ثم أضيف 0.1 غم من كاشف الميوركساید Murexide indicator وتمت معادلته بمحلول Ethylene Diamante Tetra Acetic Acid ذي تركيز 0.01 عياري ببطئ مع التحريك المستمر حتى الوصول إلى نقطة التعادل وهي تحول لون المحلول من الأحمر الباهت إلى البنفسجي إذ يتفاعل هيدروكسيد الصوديوم مع الكالسيوم والمغنيسيوم مكونا راسب من هيدروكسيد المغنيسيوم وعبر الناتج ب ملغم $CaCO_3$ /لتر.

المغنيسيوم

أتبعت الطريقة الموضحة من قبل منظمة الصحة العالمية الأمريكية[19] في حساب تركيز المغنيسيوم بالاعتماد على نتائج كل من الكالسيوم والعسرة الكلية وأستخرج حسابياً من المعادلة التالية:

تركيز المغنيسيوم (ملغم / لتر) = العسرة الكلية – عسرة الكالسيوم × 024

وعبر عن النتائج بـ ملغم/لتر .

الكبريتات

أتبعت الطريقة الموضحة من قبل منظمة الصحة الأمريكية [20] لقياس الكبريتات. إذ تم أخذ 5 مللتر من الأنموذج وتم تخفيفه إلى 100 مللتر بالماء المقطر وأضيف إليها 5 مللتر من محلول Conditioning reagent (المؤلف من الكليسرول وحامض الهيدروكلوريك والكحول الأثيلي وكلوريد الصوديوم والماء المقطر) و 0.15 غم من كلوريد الباريوم مع التحريك المستمر لمدة أربع دقائق وعلى سرعة ثابتة ثم قيست امتصاصية المحلول الناتج بوساطة جهاز قياس الطيف الضوئي UV-Spectrophotometer Shimad Zu 680 وعلى طول موجي من 380 – 420 نانومتر، وحسبت تراكيز الكبريتات بعد تحضير المنحني القياسي، وعبر عن النتائج بـ ملغم/لتر.

كثافة خلايا الطحالب

تم قياس الإمتصاصية للتعرف على كثافة خلايا الطحالب باستعمال جهاز المطياف الضوئيSpectrophotometer على طول موجي 540 نانومتر يومياً خلال فترة التجربة.

النترات

تم قياس النترات بإختزال النترات الموجودة أصلاً في العينة الى نتريت بأستعمال عمود الكادميوم، إذ مررت 50 مللتر من العينة المرشحة المخففة بعد أضافة محلول كلوريد الأمونيوم اليها بعمود الكادميوم وجمع 35 مللتر منها وثم معاملة الاخيرة كما ورد في طريقة النتريت أعلاه لحساب تركيز النتريت الكلي. حسبت النترات بعد طرح كمية النتريت الموجودة أصلاً في العينة وعبر عن النتائج بـ ملغم / لتر.[20].

الفوسفات

قيست الفسفور الكلي بأخذ 10 مللتر من النماذج غير المرشحة وخفف الى 50 مللتر بالماء المقطر ثم أضيف لها 1 مللتر من حامض الكبريتيك المركز و 5 مللتر من حامض النتريك المركز لإجراء عملية الهضم بدرجة حرارة 100 م بأستعمال الصفيحة الساخنة. ثم تعامل العينة بعد أن تبرد بهايدروكسيد الصوديوم ذي تركيز (1 عياري) .وتم اجراء الخطوات الواردة في طريقة الفسفور الفعال بالاعتماد على [20] وعبر عن النتائج بـ ملغم / لتر.

البوتاسيوم

تم قياس البوتاسيوم بأستعمال الفوتو متري باللهب وهي من الطرائق السريعة والدقيقة ومن خلال أستعمال المحاليل الاتية بعد عملية الحفظ والهضم بالاعتماد على[21].

1- اذيب 1.907 غرام من مادة كلوريد البوتاسيوم KCI المجفف بدرجة 110 م ثم خفف الى اللتر بالماء الخالي تماما من الايونات .كل ملتر واحد من هذا المحلول يحتوي على ملغرام واحد من البوتاسيوم .

2- بعدها خفف 10 ملتر من محلول البوتاسيوم الاصلي بالماء الخالي من الايونات الى 100 ملتر . وكل ملتر واحد من هذا المحلول يحتوي على 100 مايكروغرام بوتاسيوم يستعمل هذا المحلول لتحضير محاليل قياسية بمدى 1 – 10 ملغم / لتر .

3- خفف 10 ملتر من محلول البوتاسيوم المتوسط بالماء الخالي تماما من الايونات الى 100 ملتر . كل ملتر واحد من هذا المحلول يحتوي على 10 مايكروغرام بوتاسيوم ويستعمل هذا المحلول لتحضير محاليل قياسية بمدى 0,1 – 1 ملغم /لتر .

الصوديوم

تم قياس تركيز الصوديوم بأستعمال جهاز Ratioturbiometery والمجهز من شركة (HACH) وبطول موجي 589 نانومتر أذ تم عمل منحي القياس بأستعمال محلولStander لعنصر الصوديوم تركيز (1000) مايكروكرام/ ملتر ، وذلك بإذابة وزن معين من كلوريد الصوديوم NaCl النقي 2.24 غم في 1 لترمن الماء المقطر ويحضر منه محاليل متزايدة، تأخذ أخذ العينة المراد فحصها من الماء وتقاس بعدها لمعرفة تركيز عنصر الصوديوم، وعبر عن النتائج بوحدة ملغم/لتر التي تعادل ppm بالنظام الأمريكي [21]. ويتم إجراء الحسابات من المعادلة الآتية:-

الصوديوم (ملغم/لتر) = D.t × SLOP × قراءة الجهاز للعينة

SLOP = الميل هو العلاقة بين الامتصاصية والتركيز.

D.F = عامل التخفيف.

النتائج والمناقشة

طرائق أكثار الطحالب :

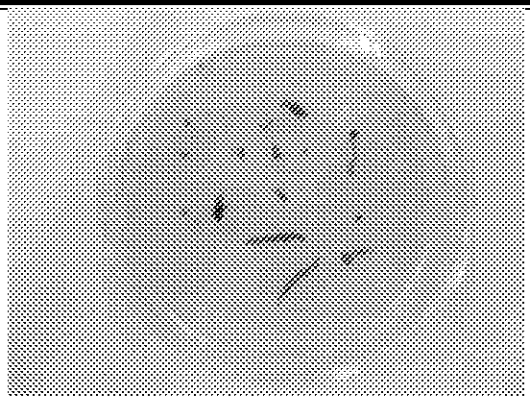
للحصول على كتلة حيوية مناسبة لخلايا الطحالب ضمن المزارع السائلة لابد من أجراء أكثار لها ضمن مستوى منحنى النمو والخاص بعملية معدل النمو وزمن التضاعف لخلايا الطحالب .

توجد ثلاثة طرائق للحصول على كتلة طحالب بعملية الاكثار :

1. أستخدام الاوساط الزرعية المحضرة صناعيا .

توجد العديد من الاوساط الزرعية كمغذي للخلايا الطحلبية متمثلة بـ Chu-10 المحور و Beijerinck Media و Modified Aiiens وكما مبين بالجدول (1) .

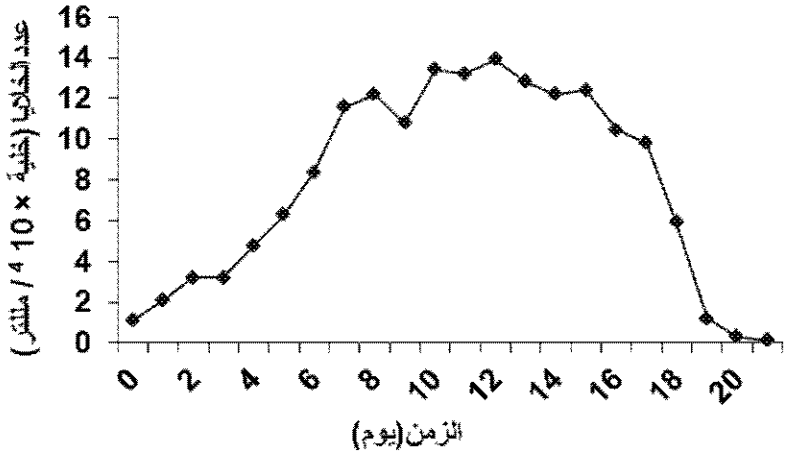
تم أستعمال في هذه الدراسة الوسط الزرعي المغذي Chu-10 المحور وذلك لاثباتات العديد من الدراسات على أمكانية هذا الوسط الجيدة ، إذ تم جلب نموذج من النهر بوساطة شبكة الهائمات النباتية ذات قطر فتحاتها 20 مايكرون بكمية 60 لتر لكل عينة حتى تحصل على أكثر كمية من الانواع المراد عزلها وأكثارها بدون أضافة أي مادة حافظة لها وذلك سوف يتسبب بموت الخلايا الطحلبية . بعد ان جلب النموذج الى المختبر تم أضافة 20 مللتر من الوسط الزرعي المحضر مسبقا لها ووضعت داخل الحاضنة المثبتة للظروف البيئية الخاصة للطحالب من درجة حرارة 25 ±2 وشدة أضاءة 245 مايكروانشتاين /م / ثا لمدة 3 أيام وذلك لحصول عملية الاقلمة للخلايا الطحلبية بالوسط الزرعي المحضر صناعيا بعدما كانت متكيفة على بيئة النهر . حضرت أطباق Agar- Agar لزراعة النموذج الذي تم جلبه من النهر للحصول على عزلات نقية من خلال زراعتها على الاكار الصلب وارجاعها الى الحاضنة لحين ظهور الخلايا الطحلبية وعادتا يتراوح ظهور أول مسعمرة أو خلية طحلبية على أطباق الاكار من 10 – 14 يوم في حالة توفر الظروف البيئية للطحالب كما موضح في الشكل (1) .



شكل (1) نمو مستعمرات مجتمع الطحالب على وسط الاكار الصلب ضمن ظروف بيئية مناسبة

حضرت قناني زجاجية ذات حجم 10 مللتر معقمة مع احتواءها على 5 مللتر من الوسط الزرعي المحضر مسبقا ، أختبرت الخلايا المفردة والمعزولة على طبق الاكار لضمان حصول على عزلة مفردة واحدة من خلال أستعمال عروة الناقل المعقم وأدخالها الى القنينة الزجاجية ذات حجم 10 مللتر مع الوسط الزرعي بحجم 5 مللتر وتكرر العملية للعديد من المستعمرات المفردة للحصول على اكثر عزلة نقية ، وأعتبارها كلقاح أبتدائي بعدها تم أدخال القناني الى الحاضنة لمدة تتراوح 10 – 12 يوم لضمان حصول الزيادة الاسية للخلايا الطحلبية المعزولة . بعدها سوف يتم الاكثار مع مراعاة منحنى النمو والذي يبدا بطور الاقلمة على الوسط الزرعي والذي يتراوح مدة هذا الطور من 3 – 4 يوم بعدها سوف تدخل الخلايا الطحلبية الى الطور الثاني وهو طور الزيادة الاسية والذي يتراوح من اليوم الخامس للمزرعة الى اليوم التاسع لها في هذا الطور تم أضافة الوسط الزرعي بعد ان كان 5 مللتر مع الخلايا الطحلبية ثم يكمل الحجم الى 25 مللتر ليتم وضعها في الحاضنة لمدة 3-4 ايام وذلك لارجاع المزرعة الى الطور الأول وهو طور الأقلمة او التكيف وذلك حتى يتم الأكثار ضمن الحجم الجديد او الحالي ننتظر الى ان تدخل المزرعة الطور الثاني وهو طور الزيادة الآسية أي يوم المزرعة التاسع ، ونضيف لها الوسط الزرعي بعد ان كان 25 مللتر يكمل الحجم الى 50 مللتر أي مضاعفة كمية المزرعة بالوسط الزرعي المحضر صناعيا ، أشارت نتائج الدراسة الى ان الطحالب أتخذت نمطاً مألوفاً لمنحني النمو كما هو الحال لمعظم الطحالب في المزارع

الثابتة (Batch culture) التي تتميز بكونها غير متجددة وذات حجمٍ ثابت[22].كما يؤدي الاختلاف في العوامل الفيزيائية والكيميائية المؤثرة في نمو الطحالب الى الاختلاف في المدة الزمنية لكل طور من اطوار نمو الطحلب ، أذ لوحظ لبعض انواع الطحالب تستغرق من 5-10 ايام في بدء طور الزيادة الاسية Exponential phase بسبب مايحتويه الوسط الغذائي من المواد المغذية..والشكل (2) يوضح ذلك .



شكل (2) مضاعفة المزرعة الطحلبية المعزولة بأستعمال الاوساط الزرعية المحضرة صناعيا .

مع مراقبة المزرعة من خلال فحص الكثافة الضوئية بأستعمال جهاز المطياف الذري وعلى الطول الموجي 540 نانومتر من اليوم الاول للمزرعة وهو طور الأقلمة وحتى يوم المزرعة التاسع وهو نهاية طور الزيادة الآسية لها وذلك لمعرفة مدى امتصاص الخلايا الطحلبية للوسط المحيط بها ، كما اشار [22] الى الاختلاف في زمن الدخول في طور الزيادة الاسية مع الاختلاف في درجة الحرارة فيما يخص الطحلب *Chaetoceros calcitrans* أذ يكون اليوم الخامس هو بداية طور الزيادة الاسية عند درجة حرارة 22 مئوية واليوم السابع عند درجة 26 °مئوية . كما تزداد الكتلة الحية للطحالب طرديا بزيادة تراكيز النتروجين – نترات في الوسط الزرعي الحاوي على 20 ملغم/لتر، وبزيادة تركيز النترات على الفوسفات فان بعض أنواع من الطحالب الخضر تتميز على غيرها من الطحالب من ناحية زيادة الكتلة الحية وأستهلاكها السريع للفوسفات والنتروجين . تتراوح نسبة النيتروجين في الخلايا الطحلبية بين 6.5-8.3% من وزنة الجاف في الظروف الاعتيادية ومن الممكن أن يكون أقل في حالة وجود نقص

في النيتروجين ، وقد تكون أعلى عند زيادة التركيز وبذلك يتضح أن حاجة الطحالب للنيتروجين أكثر من حاجتها للفوسفات [23].والجدول (2) يشير الى الكثافة الضوئية المتزايدة ضمن الطورين الاقلمة والزيادة الاسية بسبب أهمية هذين الطورين والذي يكون أساس المزرعة الطحلبية.

جدول (2) أيام التجربة ضمن أطوار النمو بالاعتماد على الكثافة الضوئية لنمو خلايا الطحالب .

أطوار منحنى النمو	أيام التجربة	الكثافة الضوئية على الطول الموجي 540 نانومتر
طور الاقلمة	اليوم الاول	0.002
	اليوم الثاني	0.030
	اليوم الثالث	0.051
	اليوم الرابع	0.092
طور الزيادة الاسية	اليوم الخامس	0.121
	اليوم السادس	0.162
	اليوم السابع	0.195
	اليوم الثامن	0.205
	اليوم التاسع	0.213

تم مضاعفة المزرعة للخلايا الطحلبية من خلال مضاعفة الوسط الزرعي لحين الوصول الى الحجم المراد التوصل اليه، يتم رسم وقياس منحنى النمو عادة في مزارع سائلة مغلقة مثل استعمال الدوارق الزجاجية والتي تحدث فيها تبادل الغازات فقط , ويتم عند الظروف المثلى من حيث توفر المواد الغذائية بكميات كافية واستعمال المزارع ذات الحركة المستمرة لغرض التخلص من البيئات الموضعية ودرجة حرارة ملائمة , وكذلك البدا بإعداد كبيرة تتراوح بين 10^3 - 10^4 خلية او وحدة تكوين المستعمرات / ملليتر لتلافي الزحام الذي يؤدي الى تغير نمط الفعاليات الحيوية للخلايا. ويتم تلقيح الوسط

الغذائي الجديد من مزروع قد نمي مسبقا لحد التشبع وبمتابعة النمو ينتج ويلاحظ ان المنحنى ينقسم الى اربعة مراحل رئيسية يتخللها دورين انتقالية . وهذة الاطوار هي التطبع او التلكؤ lag phase (A) والطور التزايدي او الطور اللوغارتيمي lag phase (C) وطور الاستقرار او الثبات stationary phase(E) , والطور الرابع هو طور الانحدار او الموت death phase(F) . وهنالك طور انتقالي هو طور التعجيل Acceleration phase(B) والذي يقع بين الطور الأول أي طور التطبع وطور النمو المتزايد , والطور الانتقالي آخر هو الذي يقع في نهاية طور النمو المتزايد وطور الاستقرار ويسمى طور التباطؤ Deceleration phase (D) [25]. والنمو في الأوساط السائلة يختلف تماما عن النمو على الأوساط الصلبة إذ انه على الأوساط الأخيرة لا يمكن ملاحظة الأطوار المذكورة وإنما يمكن أن تظهر الأحياء انماطا من النمو وظواهر خاصة بالنمو على الأوساط الصلبة مثل تكوين الأغشية الحيوية أو غير من الظواهر التي سيتم تناولها فيما بعد .أما الحالة الفسلجية للخلايا وتاريخها قبل بدء عمليه التنمية , فالخلايا الماخوذه من مزارع قديمه تكون أعداد الخلايا الحية فيها اقل من المزارع الفتيه , لذلك فان الخلايا الحية تحتاج إلى وقت لتصل الأعداد التي يمكن التحسس بها وتسجيلها , كما أن الخلايا الماخوذة من بيئات قاسيه والتي حدث ضرر في موادها الوراثية بشكل خاص وموادها الخلوية بشكل عام تحتاج إلى وقت قبل البدء , إذ أن نقاط السيطرة chech points في الخلية تمنع عمليه الانقسام قبل أن يحدث أصلاح تام لموادها الوراثية [24] .كما أن الخلايا المكونة للابواغ وكثرتها في اللقاح يؤدي إلى أطالة الطور , إذ تحدث فيها عمليات الإنبات قبل أن تشرع بالنمو . هناك ظروف أخرى يمكن أن تؤدي إلى طول الطور وبعض الأحيان عدم النمو مثل انتقال المواد المؤذية مع اللقاح . وكذلك طبيعة الوسط الغذائي الجديد المستعمل , فالأوساط الغنية تؤدي عادة إلى سرعة النمو ولكن غنى هذه الأوساط يجب أن يكون بالوحدات الأساسية مثل الحوامض الامينية والكاربوهيدرات سهله الاستهلاك من قبل الخلايا , إما اذا كانت المواد المستعملة مكوثرة ومعقدة فان الخلايا تحتاج إلى وقت لإنتاج الإنزيمات الخارجية لغرض تفكيك المواد المعقدة إلى مواد بسيطة يمكن قبطها من قبل الخلية . ولذلك يلاحظ أن نمو الخلايا في هذا الطور يكون نمو غير متوازن بالنسبة لمؤشرات

النمو ، وعندما تجمع الخلايا كل المقومات اللازمة للانقسام تستانف نموها على مستوى العدد وتبدا بالانقسام بسرعة وذلك يحدث ضمن طور بشكل متزامن [15]. ويلاحظ أن النمو في هذا الطور يكون غير متوازنا حيث يطغي المؤشر العددي على المؤشرات الأخرى خاصة الحجم وتكون الخلايا صغيره الحجم ويمثل اصغر حجم تصله وهي في حالة الفعالية . يلي الطور اللوغارتيمي طور التباطؤ وذلك يحدث نتيجة لزيادة عدد الخلايا في الوحدة الحجمية والتي تكون لها سعة معينة تعتمد على حجم الخلايا بشكل أساس وعند زيادة الأعداد تبدأ ظاهرة تحسس الزحام Quorum sensing وفي البكتريا عموما يكون العدد 10^7 /مللتر كافيا لحث الظاهرة في الخلايا التي تؤدي إلى تغير شبة كامل في العمليات الأيضية , إضافة إلى أن المواد الغذائية تستفيد من البيئة المغلقة المحيطة بالخلايا , وكذلك زيادة الفضلات التي قد تكون سامة للخلايا خاصة عند استعمال أوساط غنية، فإذا كانت الأوساط غنية بالكاربوهيدرات أدى ذلك إلى زيادة الحوامض العضوية حول الخلايا وانخفاض الأرقام الهيدروجينية [25].أما أذا كانت الأوساط ألغذائية غنية بالمواد البروتينية فأن ذلك يؤدي إلى رفع الأرقام الهيدروجنية. وفي كلا الحالتين تنحرف الأرقام الهيدروجينية عن الحد الأمثل لنمو الخلايا .كما موضح في الجدول (3).

جدول (3) كيفية أكثار المزارع الطحلبية بأستعمال أحد الاوساط الزرعية بتوفر الظروف البيئية

أيام التجربة	حجم المزرعة مللتر	حجم الوسط الزرعي المضاف مللتر	الحجم النهائي للمزرعة مللتر
1	5	5	10
8	10	10	20
13	20	25	45
19	45	65	100
25	100	125	225
31	225	275	500
38	500	500	1000
45	1000	1000	2000
52	2000	2000	4000

59	4000	4000	8000
61	8000	8000	16000
68	16000	16000	32000

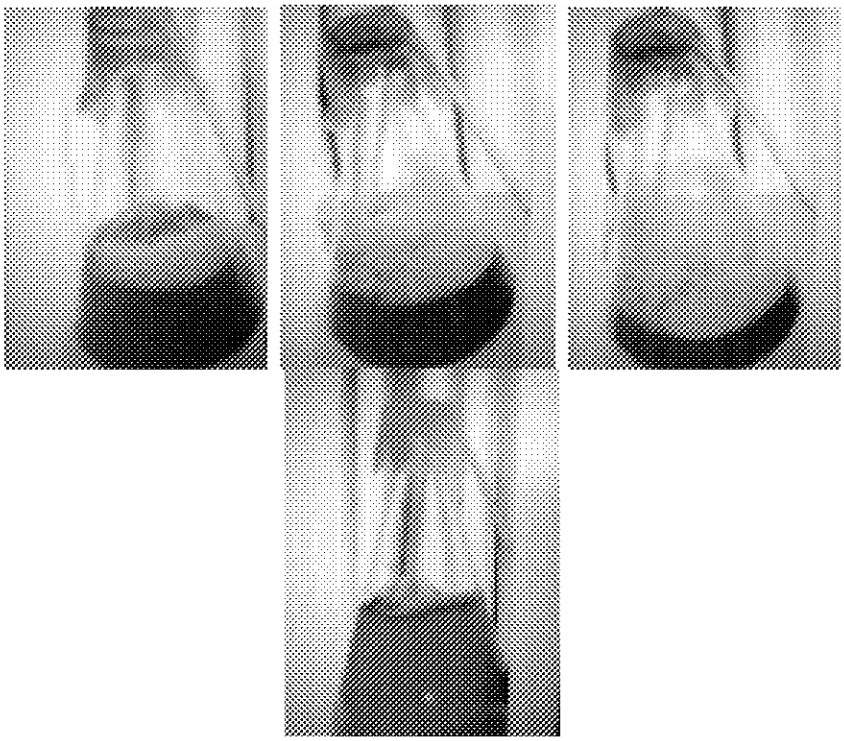
أما بعد طور الزيادة الآسية والذي ينتهي لليوم التاسع للمزرعة يبدأ طور الاستقرار وتكون مدته من 10–19 يوم للمزرعة ، بهذا الطور تستقر زيادة الخلايا الطحلبية أي تكون متذبذبة مرتفعة أو منخفضة بعض الشيء إلى أن تصل إلى طور الموت والذي يبدأ من يوم المزرعة 20 والى ما لا نهاية ،نتوصل إلى هذا الطور بحالة عدم إضافة الوسط الزرعي للمزرعة مع عدم الرج المستمر يوميا لها ونقص في بعض الظروف البيئية من شدة الإضاءة ودرجة الحرارة المناسبة لها . تم فحص الكثافة الضوئية للمزرعة أثناء طور الموت من يوم المزرعة 20 –23 لم يلاحظ أي ايجابية للفحص أي عدم وجود خلايا طحلبية بسب موت الخلايا والجدول (4) يوضح ذلك.

جدول (4) تحديد أيام أطوار النمو بالاعتماد على عدد الخلايا (خلية / لتر) والكثافة الضوئية (نانوميتر)

أطوار منحنى النمو	أيام التجربة	عدد الخلايا خلية / لتر	الكثافة الضوئية نانوميتر
طور الأقلمة	4 – 1	12 – 5	0.043 – 0.012
طور الزيادة الآسية	9 – 5	34 – 14	0.312 – 0.125
طور الاستقرار	19 – 10	68 – 40	0.402 – 0.376
طور الموت	23 – 20	2 – 12	0.001 – 0.015

مع توفير الظروف البيئية المناسبة للعزلات من درجة حرارة بمقدار 25 ±2 وبشدة أضاءة تراوحت 240 – 250 مايكروانشتاين / م^2 / ثا مع تزويد المزارع بمضخة هواء لتزويدها بـ CO_2، أضافة إلى المغذيات النباتية المتوفرة في الأوساط المغذية الزرعية السابقة الذكر من فوسفات ونترات ونتريت وامونيا وبقية الأملاح الداخلة في بناء الجدار الخارجي للخلية الطحلبية وتكوين الصبغات والأنظمة الانزيمية وعمل التركيب الضوئي وغيرها ،بالإضافة إلى النيتروجين الذي يحدد نمو معظم الطحالب ، كما إن أهميته كعامل محدد يتوقف على ما موجود منه في الوسط الزرعي وما يستهلكة

الطحلب ، أي عندما يكون النيتروجين موجود بكمية غير كافية فسوف يؤدي إلى قلة نمو الطحالب [24] .والشكل (3) توضح مراحل النمو حسب أطوار النمو .



شكل (3) مراحل نمو العزلات الطحلبية حسب اطوار النمو ضمن الظروف المختبرية .

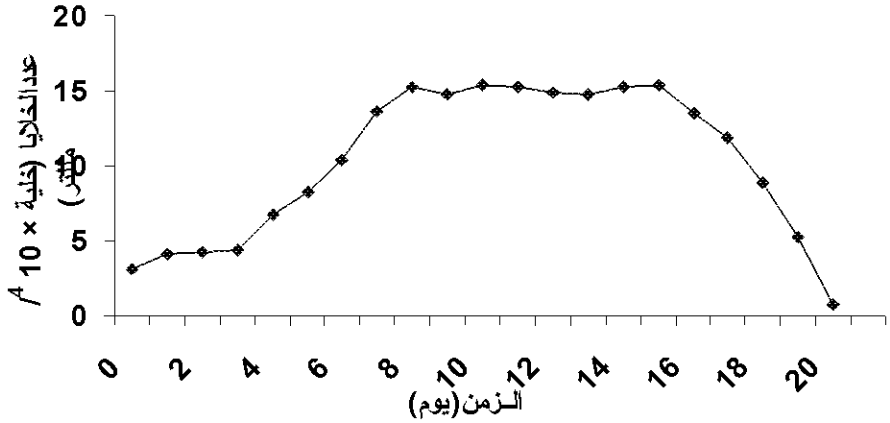
2-أستعمال مياه الصرف الصحي المعقمة لاكثار المزارع الطحلبية:

جلب مياه الصوف الصحي من الحوض الثانوي لمحطة معالجة مياه الرستمية التوسع الثالث قبل عملية الكلورة الى المختبر تم اجراء الفلترة بأستعمال ورقة ترشيح ذات قطر 0.45 مايكرون بعدها عقم وأستعمل كوسط زرعي للطحالب ، لاحتواءه على بعض العناصر الرئيسية الداخلة في تغذية الطحالب وحسب الجدول (5) في ادناه .

جدول (5) العناصر الرئيسية الموجودة في مياه الصرف الصحي لحوض الترسيب الثانوي كوسط زرعي مغذي للطحالب .

K^+ ملغم/لتر	Na^+ ملغم/لتر	Ca^{+2} ملغم/لتر	Mg^{+2} ملغم/لتر	كبريتات ملغم/لتر	pH	العكورة NTU	Sal ‰	الامونيا ملغم/لتر	نترات ملغم/لتر	فوسفات ملغم/لتر
23.8	109.7	320	121	18.234	7.28	4993.3	1.1	518	1.178	22.97

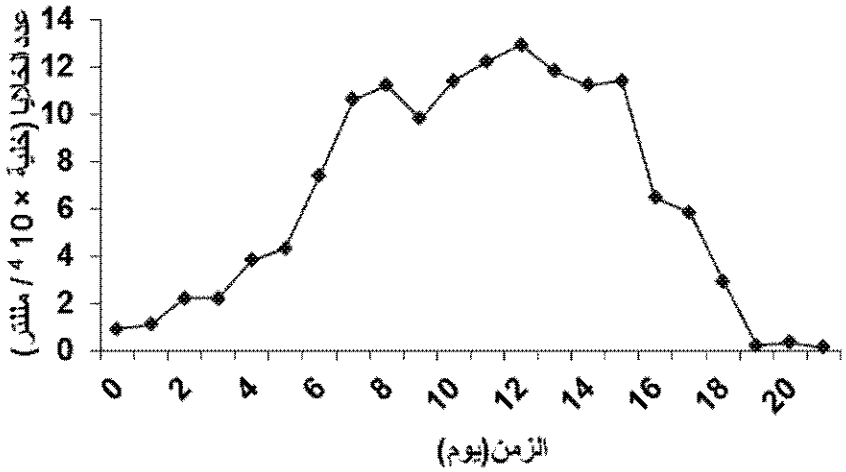
إذ تم إكثار اللقاح الابتدائي من 5 مللتر إلى 10 مللتر بإضافة مياه الصرف الصحي المعقمة وإرجاع اللقاح إلى الحاضنة لمدة من 3-4 أيام وذلك لأقلمة وتكيف المزرعة حسب طور الأقلمة لمنحنى النمو بعدها تم إكثار المزرعة من 10 – 20 مل بإضافة 10 مللتر من مياه الصرف الصحي المعقمة كوسط زرعي وارجاعها إلى الحاضنة لمدة 10 – 12 يوم وذلك للوصول إلى طور الزيادة الآسية وهو الطور الثاني لمنحنى النمو والذي يتم فيه مضاعفة الخلايا بشكل متزايد ، وقبل الوصول إلى طور الاستقرار الذي يبدء من يوم التجربة او المزرعة 13 ولمدة 9 أيام لابد من إضافة وسط مغذي لإكثار المزرعة وهكذا ، واعتمادا على الأطوار التي ذكرت يلاحظ أن الطور التطبع والطور اللوغارتمي ترتبط بعمليات النمو والبناء لذلك تسمى الأطوار المتربطة بالنمو ويطلق عليها أيضا trophophase , وفي حالة استعمال الأحياء في هذه الأطوار تكون المواد الناتجة هي مواد ايض أولية primary metabolites ومنها أنتاج الحوامض الامينيه والحوامض العضوية والفيتامينات والكتلة الحيوية، أما في طور الاستقرار وبعد تغير الفعاليات الايضية فيطلق على الجزء الثاني من منحنى النمو وخاصة طور الاستقرار بشكل أساسي وطور الموت بالأطوار غير المرتبطة بالنمو وتسمى idiophase والمواد التي تنتج منها هي مواد الايض الثانوي secondary metabolites أو idiolites ومنها أنتاج المضادات الحيوية والسموم والصبغات وغيرها من المواد .ويرتبط أنتاج مواد الايض الثانوي عادة بانخفاض معدلات النمو , ولذلك يمكن تغير معدلات النمو ليس بالتتابع الزمني ودخول الأحياء طور الاستقرار بشكل طبيعي وإنما يمكن ان تحور المزارع بعد بناء كتله حيوية مناسبة وذلك أما بخفض الحرارة أو أضافه مواد أساس بطيئة الاستهلاك من قبل الأحياء أو أي وسيلة يمكن أن تبطئ من معدلات النمو , وعندها تصبح الخلايا بمثابة مصانع للمواد المراد إنتاجها [25]. والشكل (4) يوضح منحنى النمو لطحلب من بداية اللقاح الابتدائي وحتى طور الموت .



الشكل (4) منحنى النمو لاحد الطحالب بوسط مياه الصرف الصحي المفلتر والمعقم كوسط مغذي

3-أستعمال الوسط الزرعي Chu-10 المحور مع مياه الصرف الصحي المعقمة لإكثار المزارع الطحلبية .

والشكل (5) يوضح ذلك .



الشكل (5) منحنى النمو لأحد الطحالب بوسط محضر صناعيا مع مياه الصرف الصحي المفلتر والمعقم كوسط مغذي

تم أستعمال نسب متساوية الحجم لتحضير الوسط الزرعي المغذي المراد الإكثار المزارع السائلة للطحالب مع مياه الصرف الصحي المعقم المفلتر بنسبة 1 : 1 مع أتباع نفس الطرق السابقة في عملية الإكثار أبتداءا من اللقاح الابتدائي للطحلب البالغة 5 مل وحتى إلى كميات كبيرة تصل إلى 20 لتر من المزرعة السائلة .

الاستنتاجات

1. أفضل طريقة لإكثار المزارع الطحلبية طريقة أستعمال مياه الصرف الصحي المعقم المفلتر فقط لبعض أنواع الطحالب الخضر المزرقة .
2. طريقة أستعمال الوسط الزرعي Chu -10 مع مياه الصرف الصحي المعقمة المفلترة بنسبة 1 : 1 هي طريقة تناسب كل أنواع الطحالب .
3. طريقة أستعمال الاوساط الزرعية المحضرة صناعيا فقط تناسب مزارع الطحالب الخضر للإكثار .

المصادر

1- Fogg, G.E.(1973). Phosphorus in primary aquqtic plants. Wat. Res. Pergamon press, 7, 77-91.
2- Mondragon, J. and Mondragon, J. (2003). Seaweeds of the Pacific Coast. Sea Challengers Publications, Monterey, California.
3- Thomas, D.N.(2002). Seaweeds. Smithsonian Institution press.
4- Blunden, G; Campbell, S.A.; Smith, J.R.; Guiry, M. D.; Hession, C.C. and Griffin, R.L.(1997).Chemical and physical characterization of calcified red algal deposits known as maërl. J. Applied. phycol. 9: 11 – 17.
5- Zaragozá, M.C.; López, D.; Sáiz, M.; Poquet, M.; Pérez, J.; Puig-Parellada, P.; Màrmol, F.; Simonetti, P.; Gardana, C.; Lerat, Y.; Burtin, P.; Inisan, C.; Rousseau, I.; Besnard, M. and Mitjavila, M.T. (2008).Toxicity and antioxidant activity in vitro and in vivo of two Fucus vesiculosus extracts / - In: Journal of Agricultural and Food Chemistry. 56(17): 7773-7780.
6- Khozin-Goldberg, I.; Cohen, Z.; Pimenta-Leibowitz, M.; Nechev, J. and Zilberg, D.(2006). Feeding with arachidonic acid-rich triacylglycerols from the microalga Parietochloris incisa improved recovery of guppies from infection with Tetrahymena sp. Aquaculture 255: 142–150.
7- السعدي, حسين علي وسليمان, نضال ادريس 2002 . الطحالب والاركيكونات . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جامعة بغداد, ص647 .
8- Kassim, T.I.,AL.Saadi, H .A. and Salman . N . A .(1999). Production of some Phyto-and zoo plankton and their use live food for fish larvac Inpress, 1-21 PP .

9- Allen, M. 1968. Simple conditions for the growth of unicellular blue-green algae on plates. Journal of Phycology, 4, 1-4.

10- Stein, J (ED.) .(1973). Handbook of Phycological methods. Culture methods and growth measurements. Cambridge University Press. 448 pp.

11- Patterson, G.(1983). Effect of heavy metal on fresh water chlorophyta. Ph. D. Thesis univ. Durham. Pp. 212.

12- Jawad, A.L.M.(1982). Interaction between cyanobacteria and other Microorganism. Ph. D. Thesis.Dep.Philosophy.University of Liver pool.

13-Desikachary, T.V. (1959). Cyanophyta. Indian Council of Agricultural Rese- arch New Dalhi. 686 pp.

14-Felisberto, S.A. & Rodrigues, L. (2004). Periphytic Desmids in Corumba', Goiás, Brazil: Genus *Cosmarium Corda. Braz. J. Biol.*, 64 (1):1-2.

15-Edward G. Bellinger. And David C. Sigee. (2010). Freshwater Algae Identification and Use as Bioindicators. Printed in Great Britain by Antony Rowe, Ltd. Chippenham, Wilts.pp 285.

16- Reynolds, C.S. (1984). The ecology of freshwater phytoplankton. Cambridge Univ. Press. Cambridge. 384pp.

17- Golterman , H.L., Clymo , R.S. and Ohnstad , M.A .M .,(1978). Methods for Physical and Chemical analysis of freshwater .2nd .ed .IBP .Hand book NO .8. Black well Scentific Publications . Osney Nead . Oxford .

18- Lind, G.T. (1979). Hand book of Common Method in Limnology 2nd. Ed, London. pp 1991.

19- APHA. American public health association. (1998) . Standard methods for examination of water and wastewater . 23ed ed . New York

20- APHA .(1989). *Standared methods for the examination of water and wastwater*.17th ed. American Public Health Association, 18 street, New york.

21-عباوي، سعاد عبد ومحمد سليمان حسن. (1991). الهندسة العلمية للبيئة، فحوصات الماء، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة الموصل.

22- Eppley, R.W.(1977). The growth and culture of diatoms. In:The Biology of Diatoms(ed.ByWerner,D.)Botanical Monographs .Univ.Calif. Press, Berkeley, pp. 25-65.

23-Ross,J.C.and pieterse,A.J.H.(1996). Seasonal variation of phytoplankton biomass in the middle vaul river, South,Africal . Water.S.A. 22(1) : 33-42.

24- الحسيني ، أحمد عيدان وحمود ، أمل حمزة وعبد السادة، عذراء و رزوقي، أحمد محي وزامل ،حسن." (2012) . خفض نسبة الفوسفات والنترات في الأوساط المحضرة صناعياً ومن مياه الفضلات باستخدام طحلب *"Scendesmus quadricauda* . مجلة مركز بحوث التقنيات الإحيائية . المجلد 6 العدد الاول . ص 42- 50.

25- الخفاجي ، زهرة محمود . (2008). التقنية الحيوية الميكروبية (توجهات جزيئية) .جامعة بغداد . معهد الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية للدراسات العليا . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي .

Increase algae culture by using various ways by different media culture

Ahmed Aidan Al-Hussieny , Hiba Thamer Hussein , Ameal H.Hmood

Center and Department Water research and Directorate of water Treatment Technology and Ministry of Science & Technology

Abstract

The aim of this study is to increase algae by various ways that related to the importance algae in different area of scientific research by using the effective compounds in treatment and as a powder for contamination adsorption , this needs to a big vitality, there are three methods to increase algae in liquid media by using sterile filtered waste water by 1:1 , the result showing that we get 32 l as a biomass through 68 days started by primary fertilization for algae with size 5 ml , algae growing monitored through specific periods such as localization phase and lag phase and stationary phase and decline phase .Addition to the indication of algae cell numbers adapted on depended to optical density measurement with wavelength 540 nm used as indicator for increasing biomass in algae broth .through the result , its shown that must method increase algae is used culture media that artificial prepared chu-10 with sterile filtered waste water by 1:1 that way every algae suitable whereas the use of sterile filtered waste water method for some species of cyanobacteria only and artificial culture method used for green algae increase .

Key words : Increase , media culture , algae and waste water .