المعمل السادس

دراسة تأثير اختلاف صور النيتروجين فى الوسط الغذائى

على نمو بعض أنواع الطحالب

نستخدم أحد النوعين من الطحالب التالية :

- **طحلب الكلوريلا *Chlorella* من الطحالب الخضراء وحيدة الخلية .**
- **طحلب الفورميديوم *Phormidium* من الطحالب الخضراء المزرقة خيطي الشكل .**

الوسط الغذائى المستخدم :

إما BBM أو Chu 10 حيث أن كلاهما مناسب لطحالب المياه العذبة .

طريقة العمل :

1. **حضري الوسط الغذائي المتكامل و المحتوي على النترات في صورة نترات صوديوم كمصدر للنيتروجين .**
2. **حضري نفس الوسط الغذائي مع تبديل النترات بمصدر نيتروجيني آخر و هو الأمونيا في صورة كلوريد الأمونيوم NH_4Cl .**
3. **حضري نفس الوسط الغذائي بإضافة اليوريا بدلاً من النترات كمصدر نيتروجيني عضوي .**
4. **حضري نفس الوسط الغذائي بدون إضافة أي مصدر للنيتروجين .**
5. **حضري دوارق مخروطية معقمة سعة كل منها 250 مل و تقسم إلى مجموعات كالآتي :**
   - **4 دوارق تحتوي على الوسط الغذائي + النترات (مصدر N غير عضوي) .**
   - **4 دوارق تحتوي على الوسط الغذائي + الأمونيا (مصدر N غير عضوي) .**
   - **4 دوارق تحتوي على الوسط الغذائي + اليوريا (مصدر N عضوي) .**
   - **4 دوارق تحتوي على الوسط الغذائي خالي من أي مصدر نيتروجيني (N -) .**
6. **أضيفي إلى كل دورق 5 مل من Stock المزرعة الطحلبية و يكون معلوم تركيز الصبغ أو عدد الخلايا كما هو متبع في كل التجارب .**

7. تترك الدوارق في ظروف النمو المثلى بالحضان لمدة 7 أيام ثم تفصل الطحالب من الوسط لاختبار تأثير المعاملات على معايير النمو و سيتم هنا اختيار المحتوى البروتيني كمعيار للنمو و يتم قياسه بالطريقة التي اتبعت في عمل المنحنى القياسي للبروتين .

معلومات هامة :

عند استبدال مصدر نيتروجيني من الوسط بمصدر آخر يراعى أن يكون بنفس تركيز النيتروجين الموجود و ذلك لمراعاة ثبات النسب بين العناصر المختلفة في الوسط الغذائي الواحد .

مثال :

في الوسط الغذائي BBM يتم تحضير محلول نترات الصوديوم كما يلي 10 جم نترات الصوديوم في 400 مل ماء مقطر, و لكي نستبدلها بملح كلوريد الألمنيوم بنفس تركيز النيتروجين نتبع الخطوات التالية :

1. نحسب كمية النيتروجين الموجودة في الملح الأصلي نترات الصوديوم $NaNO_3$ كما يلي :

الوزن الجزيئي لنترات الصوديوم $NaNO_3$ =

$$M.wt = 23 + 14 + (16 \times 3) = 85$$

كل 85 جرام من ملح نترات الصوديوم يحتوي على 14 جم نيتروجين

إذاً :

10 جم من ملح نترات الصوديوم (المستخدمة في الوسط) تحتوي على س جرام نيتروجين و لإيجاد قيمة س نتبع التالي :

14 جم ← 85 جم

س ← 10 جم

$$س = 14 \times 10 / 85$$

$$س = 1.65 \text{ جم نيتروجين}$$

1.65 جم هو تركيز النيتروجين المطلوب في اي ملح مستخدم في التجربة .

2. كلوريد الأمونيوم NH_4Cl وزنها الجزيئي =

$$M.wt = 14 + (1 \times 4) + 35.5 = 53.5$$

ثم نحسب بنفس الطريقة هكذا :

كل 53.5 جم من كلوريد الأمونيوم تحتوي على 14 جم من النيتروجين و كل س جم من كلوريد الأمونيوم تحتوي على 1.65 جم نيتروجين .

14 جم ← 53.5 جم

1.65 جم ← س جم

$$س = 53.5 \times 1.65 / 14$$

س = 6.31 جم كلوريد الأمونيوم

إذاً :

يوزن 6.31 جم من كلوريد الأمونيوم و تذاب في 400 مل ماء مقطر و تستخدم في الوسط الغذائي .

3. يكرر نفس الشيء بالنسبة لإضافة اليوريا $(NH_2)_2CO$ و وزنها الجزيئي =

$$M.wt = (14 + (1 \times 2))_2 + 16 + 12 =$$

$$(14 + 2)_2 + 16 + 12 =$$

$$((14 \times 2) + (2 \times 2))_2 + 16 + 12 =$$

$$28 + 4 + 16 + 12 = 60$$

ثم نحسب بنفس الطريقة هكذا :

كل 60 جم من اليوريا تحتوي على 28 جم من النيتروجين و كل س جرام من اليوريا تحتوي على 1.65 جرام من النيتروجين .

28 جم ← 60 جم

1.65 جم ← س جم

$$س = 60 \times 1.65 / 28$$

س = 3.54 جم يوريا

المعمل السابع

تعيين المحتوى البروتيني كمعيار للنمو وعمل منحنى قياسي له

يتم استخدام طريقة لوري و آخرون 1951 (Lowry etal, 1951) و يتم فيها استخدام المحاليل الآتية :

❖ المحاليل المستخدمة :

1. **4% هيدروكسيد الصوديوم (4% NaOH 1N) - 20 جم / 500 مل ماء مقطر**
2. **2% كربونات الصوديوم (2% Na_2CO_3) - 2 جم / 100 مل ماء مقطر**
3. **1% كبريتات النحاس (1% $CuSO_4.5H_2O$) - 1 جم / 100 مل ماء مقطر**
4. **2% ملح روشيل (2% Russel salt) - 2 جم / 100 مل ماء مقطر**

❖ طريقة العمـــــــل :

1. **تفصل الأنسجة من الوسط بعد انتهاء التجربة و تطحن و يضاف لها 5 مل هيدروكسيد الصوديوم العياري و الأنسجة إما جافة أو طرية و تترك في درجة حرارة الغرفة 24 ساعة .**
2. **يسحب من المحلول الرائق 1 مل في أنبوبة اختبار أخرى و يضاف لها 0.1 مل هيدروكسيد الصوديوم + 0.5 مل 2% كربونات الصوديوم + 0.5 مل خليط من (ملح روشيل و كبريتات النحاس) و يتم خلط الأخير جيداً وقت الاستخدام و إذا تبقى من المخلوط يعدم بعد التجربة و كل مرة يخلط وقت التجربة .**
3. **اتركي الأنبوبة 10 دقائق في درجة حرارة الغرفة بعد الرج .**
4. **أضيفي 0.5 مل محلول كاشف فولن المخفف و اتركيها لمدة 15 – 30 دقيقة ثم أكملي إلى حجم (10 أو 15) مل حسب كثافة اللون ثم قيسي الكثافة الضوئية عند طول موجي 700 نانوميتر و اللون المتكون يكون أزرق .**
5. **احسبي تركيز البروتين باستخدام المنحنى القياسي للبروتين ثم يمكن بعد ذلك حساب النسبة المئوية للبروتين في النسيج كما يلي :**

النسبة المئوية للبروتين = وزن البروتين الناتج mg / وزن الطحلب mg × 100

6. **طبعاً في هذه الحالة تجفف عينة موازية لمعرفة الوزن الجاف لها للحسابات السابقة .**

❖ **طريقة عمل المنحنى القياسي للبروتين :**

1. **أذيبي 25 ملجم من مادة ألبومين في 50 مل محلول هيدروكسيد الصوديوم (1 N)**
2. **حضري التركيزات المختلفة الآتية في أنابيب اختبار :**

0.0 ug, 50 ug, 100 ug, 200 ug, 400 ug, 600 ug

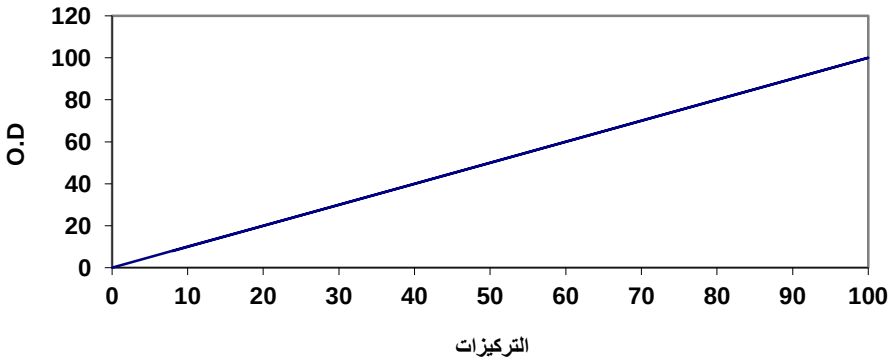
3. **أضيفي المحاليل السابقة بنفس الخطوات المتبعة أعلى ثم قومي بقياس الكثافة الضوئية عند 700 نانومتر**
4. **ارسمي العلاقة بين التركيزات المختلفة و الكثافة الضوئية لها .**

- **إذا لم تتوفر مادة Bovin serum albumin يمكن استخدام مادة الببتون لعمل المنحنى القياسي للبروتين بالطريقة الآتية :**

1. **أذيبي 65 ملجم من مادة الببتون في 100 مل ماء مقطر فيكون كل 1 مل يحتوي على 100 ug و يتم عمل التخفيفات الآتية بالماء المقطر :**

0.0 ug, 5 ug, 10 ug, 20 ug, 40 ug, 80 ug, 100 ug

2. **أضيفي محاليل الكشف السابقة بنفس الخطوات المتبعة ثم اقرئي على الجهاز عند الطول الموجي 700 نانومتر (اللون الأزرق غير ثابت لذلك يجب القراءة الفورية و لا يترك لمدة طويلة)**
3. **ارسمي العلاقة بين التركيزات المختلفة و الكثافة الضوئية لها .**



المعمل الثامن

دراسة تأثير تركيز أيون الهيدروجين على نمو الطحالب

يعتبر تركيز أيون الهيدروجين من العوامل الفيزيائية و الكيميائية المؤثرة على نمو الطحالب, و لكل مجموعة من الطحالب أرقام هيدروجينية تفضل النمو فيها و على سبيل المثال تفضل الطحالب الخضراء الأرقام الهيدروجينية المتعادلة أو قليلة الحمضية pH = 6 – 7 , بينما تفضل الطحالب الخضراء المزرقة الوسط المتعادل أول قليل القاعدية pH = 7.5 – 9.5 , و طبعاً يؤثر الرقم الهيدروجيني على سلوك الكائن في الوسط و يمكن دراسة كافة معايير النمو لمعرفة هذا و التأثير و لكن سنختار منها قياس نمو الخلايا بقياس الكثافة الضوئية كمعيار لقياس النمو في الكائن.

طريقة العمل :

6. **يتم تحضير وسط غذائي مناسب لنمو الطحلب المستخدم في الدراسة (45 مل) في كل دورق مخروطي سعة 250 مل .**
7. **يتم ضبط pH للوسط لدراسة تأثير اختلاف قيم الـ pH على نمو الكائن حيث تضبط الأرقام الهيدروجينية للوسط كما يلي (4 – 6 – 7.5 – 9)pH و يتم الضبط باستخدام محاليل مخففة لحمض الهيدروكلوريك و هيدروكسيد الصوديوم و ورق الكشف (تباع الشمس) بدقة أو باستخدام جهاز pH meter إذا وجد و أحياناً يستعان بمحاليل منظمة للضبط بدقة .**
8. **تلقح البيئة بـ 5 مل من العينة الطحلبية المراد دراسة تأثير قيم الـ pH عليها .**
9. **تحضن الدوارق في الظروف المناسبة للنمو من درجة الحرارة و الإضاءة المناسبة لمدة أسبوع .**
10. **في نهاية فترة النمو تقاس الكثافة الضوئية للخلايا لتحديد النمو أخذاً في الاعتبار أنه إذا كانت قراءة الجهاز كبيرة فهذا يعني أن النمو قليل بدليل نفاذ كثير من الضوء و العكس صحيح .**
11. **نسجل النتائج و نقارن بين قيم الـ pH المختلفة على نمو الطحلب و نقارن تأثيرها على نمو الطحالب المختلفة المنماة في نفس النوع من البيئة حيث الرقم الهيدروجيني pH يختلف باختلاف الوسط .**
12. **دوني ملاحظاتك و علقي عليها و مثلي النتائج بيانياً .**

المعمل التاسع

تعيين المحتوى الكربوهيدراتي كمعيار للنمو وعمل منحنى قياسي له

يتم استخدام طريقة دبوس و آخرون 1956 (Dubois etal, 1956) و هي طريقة بسيطة لقياس الكربوهيدرات الذائبة و الثنائية عديدة التسكر .

❖ **المحاليل المستخدمة :**

1. **الفينول (يسيح على حمام مائي) و تأخذي 5 مل + 95 مل ماء مقطر ليعطي 5 % فينول مائي .**
2. **حمض كبريتيك مركز .**

❖ **طريقة العمـــل :**

1. **تفصل الخلايا عن الوسط الغذائي بالطرد المركزي ثم يضاف حمض الكبريتيك المركز 1 مل في حمام ثلجي و تترك 24 ساعة ثم أكملي الحجم إلى 7 مل بالحامض نفسه و لاحظي اللون الأسود .**
2. **نستخدم أنابيب كبيرة الحجم واسعة في التجربة حيث نأخذ 1 مل من الأنبوبة و يخفف وقت العمل مباشرة إلى 25 مل بالماء المقطر مع مراعاة أن هذا التخفيف يختلف باختلاف تركيز السكر في النسيج لذلك يمكن عمل اختبار مبدئي و يمكن تغيير التخفيف حسب نتيجة التجربة .**
3. **نأخذ 1 مل في أنبوبة واسعة من المحلول السابق و يضاف 1 مل فينول مائي (5%) و تترك 20 دقيقة في حمام مائي درجة 25 م° ثم يترك في درجة حرارة الغرفة ربع ساعة بعد أن نكمل بالحامض المركز 5 مل و يتم القياس عند 490 (بعد أن يعطي اللون اللحمي أو البصلي) و هو لون ثابت لا يتغير مع الوقت .**
4. **عيني تركيز الكربوهيدرات في العينة باستخدام المنحنى القياسي .**
5. **يمكن حساب نسبة الكربوهيدرات في العينة كما يلي :**

النسبة المئوية للكربوهيدرات = وزن الكربوهيدرات الناتج mg / وزن الطحلب mg ×100 11100

- **عند فصل الخلايا بالطرد المركزي تؤخذ الأنسجة من دورق وتجفف و نوزن ليستخدم وزنها في المعادلات السابقة .**

❖ **طريقة عمل المنحنى القياسي للكربوهيدرات :**

1. **أذيبي 25 ملجم جلكوز في 250 مل ماء مقطر يتكون محلول تركيز السكر فيه 100 ملجم لكل 1 مل ونحضر منه التركيزات الآتية :**

0.0 ug, 50 ug, 75 ug, 100 ug

2. **تعامل التراكيز بالمحاليل السابقة بمعنى يؤخذ 1 مل من كل تركيز ويضاف له 1 مل فينول مائي 5% وترج و تترك لمدة 20 دقيقة في حمام مائي درجة حرارته 25 م° ثم يضاف 5 مل من حمض كبريتيك مركز (الحجم النهائي 7 مل), و رجي بعناية و اتركيها لمدة ربع ساعة في درجة حرارة الغرفة ثم قيسي الكثافة الضوئية عند 490 طول موجي (اللون اللحمي أو بصلي خفيف) .**
3. **ارسمي العلاقة بين التركيزات المختلفة و الكثافة الضوئية لها .**

المعمل العاشر

تثبيت النيتروجين

Nitrogen Fixation

تعتمد فكرة التجربة أساساً على قيام بعض الطحالب الخضراء المزرقة بعملية تثبيت النيتروجين لاحتوائها على الحويصلات المغايرة التي تتم فيها هذه العملية و لذلك يتم تنمية أحد هذه الطحالب كمثال :

- طحلب *Nostoc* يحتوي على حويصلات مغايرة .
- طحلب *Phormidium* لا يحتوي على حويصلات مغايرة.
- يستخدمان معاً للمقارنة حيث يتم تنمية كل منهما في الوسط الغذائي المناسب الخالي من النيتروجين حتى تسهل المقارنة و يتم الكشف عن المركبات النيتروجينة في السائل بعد فترة النمو المحددة .

❖ المواد المستخدمة :

1. كاشف نسلر Nessler's Reagent :

- و يحضر بإذابة 50 جم من مادة KI يوديد البوتاسيوم في 50 مل ماء مقطر و كذلك يذاب 22 جم من مادة كلوريد الزئبقيك $HgCl_2$ في 350 مل ماء مقطر .
- اخلطي المحلولين حتى يكون راسب ثم أضيفي 200 مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم 5 عياري (NaOH, 5N) و يحضر هذا بإذابة 200 جم هيدروكسيد / لتر ماء مقطر بعد الرج بعناية يكمل المحلول إلى لتر بالماء المقطر و يوضع في زجاجة مكتوب عليها اسم المحلول .

5. كاشف حمض السلفانيلك Sulfanilic acid Reagent :

يحضر بإضافة 15 مل من حمض الخليك المركز إلى 135 مل ماء حديث الغليان ثم أذيبي 0.5 جم من حمض السلفانيلك في هذا المحلول و رجي جيداً, و يوضع في زجاجة محكمة الإغلاق في الثلاجة .

6. كاشف ثنائي فينيل أمين Diphenyl amine Reagent :

يحضر بإذابة 0.5 جم من مادة ثنائي فينيل أمين ($C_6H_5NHC_6H_5$) في 100 مل من حمض الكبريتيك المركز (H_2SO_4) , ثم يرج بحرص شديد .

❖ الكوائن و المواد المستخدمة :

- طحلب .*Nostoc* sp يحتوي على حويصلات مغايرة (مثبت للنيتروجين) .
- طحلب .*Phormidium* sp لا يحتوي على حويصلات مغايرة (غير مثبت للنيتروجين).
- الوسط الغذائي Watanabae حيث أنه خالي من النيتروجين و موجود تركيبته في الدرس الأول أو الوسط الغذائي BBM بعد استبعاد نترات الصوديوم .

❖ طريقة العمـــــــل :

6. نحضر الوسط الغذائي بكميات مناسبة لعدد الدوارق المزروعة و يعقم .
7. يوزع الوسط الغذائي في الدوارق المخروطية سعة 250 مل ثم ترقم و يضاف حقنة متساوية في كل الدوارق مثلاً 5 مل من الكائن الأول و الكائن الثاني في ظروف التعقيم كل على حده .
8. تترك الدوارق فترة النمو (7 أيام على الأقل) في ظروف النمو المثلى)
9. تجرى عملية الكشف على المحلول (الوسط الغذائي) بعد فصله عن النسيج الطحلبي للكشف عن وجود المركبات النيتروجينية كما يلي :
   - 2 مل من الوسط الغذائي + 2 مل من كاشف نسلر (ظهور اللون البرتقالي أو الأصفر) دليل على وجود الأمونيا .
   - 2 مل من الوسط الغذائي + 2 مل من حمض السالفانيللك (ظهور اللون الأحمر) دليل على وجود النيتريت .
   - 2 مل من الوسط الغذائي + 2 مل من كاشف ثنائي فينيل أمين (ظهور لون أزرق) دليل على وجود النترات .
6. دوني ملاحظاتك ثم علقي على النتائج التي حصلت عليها .

ملاحظة هامة :

هناك بعض الطحالب الخضراء المزرقة يمكنها تثبيت النيتروجين بدون وجود حويصلات مغايرة في ظروف خاصة .