

المقرر العملي لمادة تحلل حيوي

335 حدق

إعداد:

بسام النفيسي

الدرس العملي الاول

عزل الكائنات الحية الدقيقة من التربة

التحلل الحيويBiodegradation : **ه**و تحلل كيميائي للمواد في البيئة , وهو عملية تفكك المادة إلى عناصرها الأولية بالطرق الفيزيوكيميائية والحيوية. وتنتج عملية التحلل (الهضم) عن الهدم الميكروبي للملوثات العضوية

1-التحلل الحيوي الهوائي Aerobic biodegradation :

حدوث مثل هذا التحلل نتيجة نشاطات للكائنات الحية الدقيقة الهوائية بوجود الأكسجين.

2- التحلل البيولوجي اللاهوائيAnaerrobic biodegradation :
ويحدث هذا النوع من التحلل نتيجة لنشاط الكائنات الحية الدقيقة اللاهوائية عند استنزاف الأكسجين.

ا**لأحياء الدقيقة المحللة في التربة:**

نرى تحت التربة الملايين من البكتيريا التي تقوم بإتمام دورات الحياة المرتبطة بالتربة, وملايين الفطريات المفتتة للصخور والمحللة للبقايا الحيوانية والنباتية, وملايين الاكتينوميسيتات المخصبة للتربة والمنظمة لمحتواها الميكروبي, وعشرات الطحالب المخصبة للتربة, والفيروسات المنظمة لأعداد الكائنات الحية الأخرى في التربة, ونرى الحيوانات الأولية, والديدان النيماتودية المقلبة و المهوية للتربة

تعتبر التربة بيئة مناسبة لنمو كثير من الأحياء الدقيقة والغير دقيقة ، وسنركز هنا في درسنا على الأحياء الدقيقة مثل البكتيريا والفطريات التي تمثل وغيرها أعداد ضخمة جداً في التربة الخصبة، وتكون هذه الأحياء الدقيقة بينها وبين بعضها صور مختلفة ومعقدة من العلاقات التعاونية والتنافسية ، وهذه الميكروبات عبارة عن محصلة العوامل المختلفة السائدة في هذه الأراضي مثل الصفات الطبيعية والكيماوية لها والعناصر الغذائية والوسط النباتي النامي فيها والبيئة المحيطة بها.

طرق عزل الكائنات الحية الدقيقة من التربة:

1-العزل المباشر:

وفيها تؤخذ كمية صغيرة من التربة وتنثر في وسط الطبق المحتوي على الوسط الزراعي ثم توضع الأطباق في الحاضنة على درجة حرارة مناسبة لمدة مناسبة ، ثم تفحص بعد ذلك لغرض تشخيص أنواع الميكروبات النامية.

2-طريقة التخفيف:

وهى من أكثر الطرق استخداما ، حيث يمكن بهذه الطريقة تحديـد العدد النسبي للكائنات ، كما تستخدم للحصول على مزارع نقية . وتتلخص هذه الطريقة في:-

* - تجرى عملية تخفيف لعينة التربة وذلك بوزن (1جم) وتوضع في أنبوبة تحتوي على (9 مل ) ماء مقطر معقم وترج لمدة عشر دقائق إلى عشرين دقيقة تقريباً ويكون التخفيف 1/10.
* - يترك الدورق لعدة دقائق حتى يتم ترسيب حبيبات التربة الكبيرة.
* - يؤخذ (1مل) من هذا المحلول وينقل إلى أنبوبة محتوية على (9مل) من الماء المقطر وترج جيداً فيكون التخفيف هنا 1/100.وبنفس الطريقة يتم عمل تخفيف 1/1000.
* - تحضر أطباق بتري محتوية على بيئة غذائية مناسبة لنمو الميكروب المراد عزله وتلقح بواقع 1مل لكل طبق.

- توضع الأطباق في الحاضنة على درجة حرارة مناسبة ولمدة مناسبة (حسب نوع الميكروب) يمكن بعدها ملاحظة نمو المستعمرات.

\*اسم التجربة: عزل الكائنات الحية الدقيقة من التربة

\*الهدف من التجربة: الكشف عن الكائنات الحية الدقيقة في التربة و عزلهاز

الادوات المستخدمة:

* وسط غذائي خاص بنمو البكتيريا (آجار مغذي) .
* وسط غذائي خاص بنمو الفطريات (آجار تشابك دوكس).
* عينات تربة .
* تخفيفات مختلفة من معلق التربة .
* ماصات معقمة سعة 5 مل .
* كحول 70%-ديتول50% .

قطن – لهب بنزن

\*طريقة العمل:

1. كل مجموعة تأخذ طبقي بتري محتوية على الوسط المغذي(فطريات (تشابك دوكس) – بكتيريا (آجار مغذي) ) المعقم والجاهز للاستخدام وعلى حافة الطبق السفلية تدون المعلومات الخاصة بالمجموعة
2. تعقم طاولة العمل Bench با لديتول 50% ويتم تشغيل اللهب قبل العمل بعشر دقائق تقريبا.
3. يتم العزل برش التربة على سطح الأطباق المحتوية على البيئة (البكتيريا-الفطريات) ، أما العزل من معلق التربة فيتم بتلقيح البيئة بواقع 1 مل لكل طبق .
4. تحضن الأطباق -البكتيريا عند درجة حرارة 35م ° لمدة 24-48 ساعة، والفطريات عند درجة حرارة 25 م ° ولمدة اسبوع لحين تنقيتها. بعد ذلك تسجل النتائج .

الدرس العملي الثاني

تنقية الكائنات الحية الدقيقة المعزولة من التربة

ما المقصود بعملية التنقية؟؟؟

هو الحصول على مزرعة تحوي نوع واحد فقط من الاحياء الدقيقة وبالتالي الحصول على مستعمرات نقية و مستقلة.

ما الهدف من عملية التنقية؟؟؟

هو الحصول على مستعمرة نقية ومستقلة وبالتالي دراسة صفات وخصائص الكائن الحي بدقة.

المزرعة النقيةPure culture:

هي التي تحتوي على خلايا نوع واحد فقط من الكائنات الحية الدقيقة.

المزرعة المختلطةMixed culture :

هي التي تحتوي على نوعين أو أكثر من الكائنات الحية الدقيقة.

كيف نصل للمستعمرة المستقلة و النقية؟

بالحصول على نوع واحد من المستعمرات البكتيرية ويتم ذلك بتأكيد عملية التنقية(تكرارها).

\*طرق التنقية: تختلف حسب الهدف من الدراسة والامكانيات المتوفرة.

أولاً:تنقية المزارع البكتيرية

 Purification of bacterial cultures

* توجد طريقتان أساسيتان لتنقية المزارع البكتيرية
* طريقة تخطيط الأطباق (بسيط-متعامد) Streak Plate Method.
* طريقة الأطباق المصبوبة Pour Plate Method .

 **أولا : طريقة تخطيط الاطباق: Streak Plate Method**

* الهدف من التخطط هو الحصول من معلق البكتيريا على مستعمرات منفصلة تماماً.
* تخطط العينة على سطح بيئة الأجار المغذي بطريقة التخطيط البسيط أو التخطيط المتعامد.

أ ـ التخطيط البسيط :

* في هذه العملية يحدث تقليل لتركيز الميكروب بمعنى أنه كلما ازدادت عملية التخطيط كلما حصلنا على تركيز أقل للميكروب.

طريقة العمل:

* تحت ظروف التعقيم, تعقم إبرة التلقيح باللهب ثم تبرد بلمس حافة الآجار.
* يؤخذ ملء عقدةLoop full من المزرعة المختلطة ويخطط على سطح البيئة الصلبة بطريقة حلزونية.
* تكتب البيانات اللازمة أسفل الطبق.
* تحضن الأطباق مقلوبة عند 37م° لمدة 24 ساعة.
* لاحظ ظهور مستعمرات فردية في الجزء الأخير من التخطيط.
* ب) التخطيط المتعامد:
* طريقة العمل:
* تحت ظروف التعقيم, تعقم إبرة التلقيح كما سبق.
* بملء العقدة من المزرعة المختلطة يخطط خطوط متعامدة على سطح البيئة الصلبة كما بالرسم.
* نقوم بعمل ثلاث خطوط أفقية باستخدام إبرة التلقيح المحتوية على اللقاح وذلك على بيئة الآجار الصلب.
* يتم حرق إبرة التلقيح وتبريدها في طرف الآجار ثم يتم لمس آخر نقطة تم تلقيحها في الخطوط الأفقية السابقة ويتم عمل خطوط متعامدة عليها وهكذا.
* يجب مراعاة عدم خلط الخطوط الأولى مع الثالثة، والثانية مع الرابعة وهكذا أثناء التلقيح.
* يمكن عمل مكررات للتخطيط المتعامد.

تكتب البيانات أسفل الطبق ثم تحضن الأطباق مقلوبة عند درجة حرارة من 35- 37 مº لمدة 24ساعة.سنجد ألوان مختلفة من المستعمرات المختلفة،وقد تكون كل المستعمرات ذات لون واحد،لكن أشكالها مختلفة من ناحية الصفات المزرعية،وقد تكون كل المستعمرات ذات لون واحد وشكل واحد.إذا تم الجزم والتأكد من أن المستعمرة المستقلة التي تم الحصول عليها هي نقية تماما فإنه يتم حفظ المستعمرة البكتيرية على بيئة الآجار المائل (أنابيب الآجارالمائل) وتحفظ في الثلاجة لحين استخدامها لإجراء أية تجارب تطلبها الدراسة، (وذلك إذا لم يطلب الحفظ بطرق أخرى).

ثانيا: طريقة الأطباق المصبوبة:

* تحت ظروف التعقيم, كل مجموعة لديها 6 أطباق بتري فارغة معقمة تدون عليها المعلومات.
* كل مجموعة لديها مزرعة بكتيرية مختلطة وأنبوبة اختبار بها 9 مل ماء مقطر معقم. ينقل لكل طبق مقدار 4 قطرات من الماء المعقم باستخدام ماصة معقمة (بمقدار ½ مل أو أكثر). باستخدام إبرة التلقيح المعقمة باللهب والمبردة ينقل للطبق الأول ملء 4 عقد من المعلق البكتيري ويتم خلط قطرات المعلق مع الماء بإبرة التلقيح.
* ينقل من الطبق الأول إلى الطبق الثاني ملء 4 عقد وتخلط مع الماء وهكذا......
* لكل طبق يصب كمية مناسبة من بيئة الآجار المغذي السائلة والمبردة عند 45 م° (مع مراعاة خلط البيئة مع القطرات جيداً لضمان التوزيع المتجانس).
* تترك الأطباق في جو المعمل حتى تتصلب البيئة.
* تحضن الأطباق مقلوبة عند درجة حرارة مناسبة من 30-37 م° لمدة 24ساعة.

بعد ذلك يتم تحديد الأطباق التي ظهر فيها.

ثانيا: تنقية المزارع الفطرية:

 يعتبر عزل وإنماء الفطريات في بيئات نقية والاحتفاظ بها في هذه البيئات من الدراسات المهمة لعمل الدراسات المختلفة مثل النمو والتجرثم والإنبات وغيرها من الدراسات المختلفة وكذلك دراسة تاريخ الحياة لهذه الفطريات وطرق التطفل والتغذية.

طرق تنقية الفطريات...

يزرع الفطر الملوث بفطر آخر في منتصف طبق محتوي على بيئة غذائية مناسبة ثم يحضن في درجة حرارة 25م° وفي أغلب الأحيان ينمو فطر أسرع من الفطر الآخر وفي هذه الحالة يمكن عزل نهاية الهيفا باحتراس بواسطة إبرة معقمة حتى نحصل على مزرعة نقية.

الأنزيمات

التعريف:

 عبارة عن مادة عضوية بروتينية تفرز بواسطة الكائنات الحيه سواء حيوانية او نباتية أو كائنات دقيقة , تساعد على تنشيط التفاعلات الكيموحيويه لذلك تعتبر ضرورية للحياة.

ما هي أهمية الإنزيمات بالنسبة للكائنات الحية الدقيقة ؟

يعتمد النشاط الكيموحيوي للكائنات الدقيقة على عديد من الإنزيمات التي تعمل كعوامل مساعدة في كثير من التفاعلات الأيضية المختلفة.

أنزيم تكسير النشا

Amylase

النشا starch amylose:

هو عبارة عن سكر معقد و يتكون من 200 – 300 وحدة من الجلوكوز و سهل الذوبان في الماء و غير محلى الطعم و الأنزيم الذي يقوم بتكسيره هو أنزيم Amylase.

اسم التجربة: قدرة تحلل البكتريا لسكر النشا و الكشف عن النشا.

الهدف من التجربة: الكشف عن النشا و قدرة تحليل البكتريا لسكر النشا.

الأدوات المستخدمة:

بيئة starch casein agar - ابرة تلقيح ذات عقفة – مزرعة بكتيرية طازجة Bacillus subtilis and Actinomycetes sp. – لهب بنسن – ديتول- كاشف الايودين iodine indicators

طريقة العمل:

1- يتم تحضير بيئة starch casein agar و صب الاطباق تحت وضع التعقيم.

2-اعادة زراعة البكتريا الطازجة بعملية تنقتها على البيئة بعملية التخطيط المتعامد.

3-تحضينها على درجة حرارة 37 مئوية لمدة 24-48 ساعة

4-بعد التحضين نلاحظ النموات البكتيرية لنوعي البكتريا ثم وضع كاشف الايودين و نلاحظ النتائج من 2 ال 5 دقائق.

النتائج:

ظهور هالة للبكتريا Actinomycetes sp حول مستعمراتها بعد اضافة الايويدن وهذا يدل على تحلل البكتريا لتحلل النشا و عدم ظهور هالة حول Bacillus subtilis لانها لم تحلل النشا.

أنزيم تحلل البروتينProtease

تحلل الجيلاتين gelatin biodegradation

الجيلاتين: عبارة عن بروتين حيواني يمكن لبعض الكائنات الدقيقة أن تحلله لامتلاكها أنزيم خارجي هو أنزيم الجيلاتينيز gelatinase أو البروتييز Protease وعادة يتوقف إفراز هذا الانزيم في البكتيريات المفرزة له إذا ما نمت في بيئات محتوية على الكربوهيدرات طبقاً للظاهرة المعروفه بفعل الكربوهيدرات الموفرة للبروتينات protein sparing action of carbohydrate لذلك عند إجراء اختبار تحلل الجيلاتين يشترط خلو البيئة من الكربوهيدرات. يتمييز المحلول المائي للجيلاتين بأنه يكون سائل في درجة حرارة الغرفة ويتصلب عند وضعه في حمام ثلجي وإذا استطاع الميكروب تحليل الجيلاتين فإن البيئة لا تتصلب عند وضعها في حمام ثلجي ( يتحلل الجيلاتين ليعطي أحماض أمينية).

اسم التجربة: قدرة تحلل البكتريا للبروتين باستخدام قدرة تحللها للجيلاتين.

الهدف من التجربة: الكشف عن قدرة تحلل البكتريا للجيلاتين و تكسيره.

الأدوات المستخدمة:

بيئة Gelain media - ابرة تلقيح ذات عقفة – مزرعة بكتيرية طازجة Bacillus subtilis and Actinomycetes sp. – لهب بنسن – ديتول.

طريقة العمل:

1- يتم تحضير بيئة Gelatin media و صب الاطباق تحت وضع التعقيم.

2-اعادة زراعة البكتريا الطازجة بعملية تنقتها على البيئة بعملية التخطيط المتعامد.

3-تحضينها على درجة حرارة 37 مئوية لمدة 24-48 ساعة

4-بعد التحضين نلاحظ النموات البكتيرية لنوعي البكتريا و نقرأ النتائج.

النتائج:

ظهور هالة للبكتريا Actinomycetes sp حول مستعمراتها وهذا يدل على تحلل البكتريا للجيلاتين و ظهور هالة حول Bacillus subtilis و كليهما يحلل الجيلاتين.

\*\*\*\*هناك تجربة أخرى نقوم بوضع بيئة الجيلاتين و يتم تحضيرها الجيلاتين مع بعض المواد الكيميائية في أنابيب و حقن البكتريا المراد دراستها في الانابيب و قراءة النتائج خلال 12 الى 24 ساعة و النتيجة الايجايبية تحول البيئة الى الوضع السائل و يدل على تحلل الجيلاتين و النتيجة السالبة تبقى البيئة صلبة.

تحلل الدهون Lipid biodegradation

الدهون أحد المواد العضوية المهمة للطاقة للكائنات الحية و الكائنات الحية الدقيقة مثل البروتينات و الكربوهيدرات و هذه المواد أساس الطاقة لبناء الجسم وتستطيع البكتريا تحلل الدهون بأنتاج أنزيم Lipase وهذا الأنزيم يقسم جزيئ الدهن إلى جزيئ جلسرول وثلاثة جزيئات من ثلاثة أحماض دهنية وناتج هذا التحلل تستخدمه الخلية البكتيرية في تخليق الدهون البكتيرية وغيرها من المواد اللازمة للخلية.

اسم التجربة: قدرة تحلل البكتريا للدهون باستخدام قدرة تحللها لزيت جوز الهند.

الهدف من التجربة: الكشف عن قدرة تحلل البكتريا لزيت جوز الهند و تكسيره.

الأدوات المستخدمة:

بيئة coconut oil agar- ابرة تلقيح ذات عقفة – مزرعة بكتيرية طازجة Bacillus subtilis and Actinomycetes sp. – لهب بنسن – ديتول.

طريقة العمل:

1- يتم تحضير بيئة Coconut oil agarو صب الاطباق تحت وضع التعقيم.

2-اعادة زراعة البكتريا الطازجة بعملية تنقتها على البيئة بعملية التخطيط المتعامد.

3-تحضينها على درجة حرارة 37 مئوية لمدة 24-48 ساعة

4-بعد التحضين نلاحظ النموات البكتيرية لنوعي البكتريا و نقرأ النتائج.

النتائج:

عدم ظهور هالة للبكتريا Actinomycetes sp حول مستعمراتها وهذا يدل على تحلل البكتريا للزيت و ظهور هالة حول Bacillus subtilis لقدرتها على تحلل الزيت.

\*\*\*هناك تجربة أخرى نقوم بتحضير بيئة الاجار المغذي المحتوية على البيوترين الدهن الثلاثي و عمل زراعة البكتريا المراد دراستها و نضيف اليها كبريتات النحاس الكاشف على وجود الدهن و تقرأ النتيجة بوجود هالة حول المستعمرة البكتيرية أم لا.