المقرر العملي لمادة تحلل حيوي

335 حدق

ملخص للمقرر العملي

إعداد:

بسام النفيسي

الجدول الزمني للمقرر العملي تحلل حيوي 330 حدق

الاسبوع	الموضوع
1	مقدمة عن الامن و السلامة و الامن في المختبرات
2	مقدمة عامة عن التحلل الحيوي و دورها في الحياة
3	عزل الكائنات الحية الدقيقة من التربة
4	تنقية الكائنات الحية المعزولة من التربة
5	تحلل الكربوهيدرات (سكر النشا) للبكتريا و الفطريات(1)
6	)تحلل الكربوهيدرات (سكر النشا) للبكتريا و الفطريات(2)
7	تحلل البروتينات للبكتريا و الفطريات(1)
8	)تحلل البروتينات للبكتريا و الفطريات(2)
9	تحلل الجيلاتين للبكتريا في الاطباق
10	تحلل الجيلاتين للبكتريا بطريقة الانابيب
12	تحلل الدهون للزيوت النباتية و الحيوانية للبكتريا و الفطريات(1)
13	تحلل الدهون للزيوت النباتية و الحيوانية للبكتريا و الفطريات(2)
14	مراجعة للمقرر العملي لمقرر التحلل الحيوي العملي
15	الاختبار النهائي العملي للمقرر

الدرس العملي الاول

عزل الكائنات الحية الدقيقة من التربة الزراعية و الصحراوية

التحلل الحيوي Biodegradation: هو 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.

الأحياء 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 تحديد 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 10/1.

***الماء الملوث بالمشتقات البترولية هو بقايا ماء غسيل السيارات من ورش المركبات**

- 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 100/1.وبنفس الطريقة يتم عمل تخفيف 1000/1.
- 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 عزلها

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 الزراعية الصحراوية

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 المختلطة Mixed 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 عقدة Loop 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.

العملي الثالث

التحلل الحيوي للبروتينات للكائنات الحية الدقيقة المعزولة من التربة الزراعية و الجافة و الماء الملوث بالبترول

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.

البروتينات: هي عبارة عن مركبات عضوية معقدة التركيب ذو وزن جزيئي عالي يتكون من أحماض أمينية مرتبطة مع بعضها بواسطة روابط ببتيدية وهي مصدر للطاقة بعد الكربوهيدرات و الدهون وهي مصدر نيتروجيني.

تدخل في تركيب الإنزيمات أَو وحدات بروتينية العديد من البروتينات تشكل الانزيمات.

الأنزيم الذي يقوم بتكسير البروتينات هو أنزيم protease

اسم التجربة: قدرة تحلل البكتريا و الفطريات للبروتين باستخدام قدرة تحللها لبروتين الحليب.

الهدف من التجربة: الكشف عن قدرة تحلل البكتريا والفطريات لبروتين الحليب.

الأدوات المستخدمة:

بيئة Skim Milk Agar- ابرة تلقيح ذات عقفة – ابرة تلقيح للفطريات- مزارع بكتيرية و فطرية طازجة منقاة من التربة و الماء الملوث بالمشتقات البترولية– لهب بنسن – ديتول.

طريقة العمل:

1- يتم تحضير بيئة Skim Milk Agar و صب الاطباق تحت وضع التعقيم.

2-اعادة زراعة البكتريا و الفطريات الطازجة بعملية تنقيتها على البيئة بعملية التخطيط المتعامد.

3-تحضينها على درجة حرارة 37 مئوية لمدة 24-48 ساعة للبكتريا و الخمائر. و لمدة إسبوع للفطريات عند25 درجة مئوية.

4-بعد التحضين نلاحظ النموات البكتيرية و الخميرية و الفطرية و نقرأ النتائج.

النتائج:

ظهور هالة للبكتريا Actinomycetes sp حول مستعمراتها وهذا يدل على تحلل البكتريا للبروتين و عدم ظهور هالة حول بعض أنواع Coliform بكتريا القولون و ظهور هالة حول Candida sp.

ظهور غزل فطري في البيئة و وجود هالة صغيرة حول الغزل الفطري.

العملي الرابع و الخامس

التحلل الحيوي للكربوهيدرات (سكر النشا)للكائنات الحية الدقيقة المعزولة من التربة الزراعية و الصحراوية

الكربوهيدرات: هي مركبات عضوية تحتوي على الاكسجين و الكربون والهيدروجين و هي مصدر كربوني و مصدر للطاقة لجميع الكائنات و يطلق عليها السكريات.

سكر النشا: 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 و الفطريات لسكر النشا و الكشف عن النشا.

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

الأدوات المستخدمة:

بيئة starch casein agar - بيئة Potatoes Starch Agar-ابرة تلقيح ذات عقفة –ابرة تلقيح للفطريات-مزارع بكتيرية وفطرية المعزولة من العينات السابقة– لهب بنسن – ديتول- كاشف الايودين iodine indicators

طريقة العمل:

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

2-اعادة زراعة البكتريا و الفطريات و الخميرة بعملية تنقيتها على البيئة بعملية التخطيط المتعامد.

3-تحضينها على درجة حرارة 37 مئوية لمدة 24-48 ساعة و للفطريات لمدة أِسبوع عند درجة 25 مئوية.

4-بعد التحضين نلاحظ النموات البكتيرية و الفطرية و الخميرية 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 Coliformلانها لم تحلل النشا. لان النشا يتفاعل مع محلول الايودين ويعطي اللون الازرق القاتم البنفسحي .

عدم ظهور هالة حول .Candida sp وبقاء النشا

للفطريات الفطر الذي يقوم بتحليل سكر النشا هو Aspergillus niger و لكن نوع الفطر المعزول Aspergillus sp المعزولة من التربة لم تقم بتحليل النشا وبقاءه مثل ما هو.

العملي السادس

التحلل الحيوي للبروتينات (الجيلاتين)للكائنات الحية الدقيقة المعزولة من التربة الزراعية و الصحراوية

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 و الفطريات للبروتين باستخدام قدرة تحللها للجيلاتين.

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

الأدوات المستخدمة:

بيئة Nutrient gelatin – ابرة تلقيح فطريات– مزارع بكتيرية و فطرية معزولة من العينات السابقة – أنابيب زجاجية محكمة الاغلاق -لهب بنسن – ديتول.

طريقة العمل:

1- يتم تحضير بيئة Nutrient Gelatin و صبها في أنابيب زجاجية تحت وضع التعقيم.
2- ترك الأنابيب في الثلاجة عند درجة حرارة 4 مئوية حتى تتصلب.
3- يتم زراعة البكتريا و الفطريات بطريقة الوخز.
4- تحضينها على درجة حرارة 37 مئوية لمدة 24-48 ساعة للبكتريا و الخمائر و لمدة أِسبوع للفطريات عند 25 درجة مئوية.
5- بعد التحضين نقوم بوضعها في الثلاجة عند درجة 4 مئوية لمدة نصف ساعة.

النتائج:

البكتريا لجنس Pseuodomonas and some of coliforms and Bacillus subtilis قاموا بتحليل الجيلاتين و بقيت البيئة في حالة سائلة

للفطريات (الأعفان و الخمائر) لم تقم بتحليل الجيلاتين وبقاءه في وضعية التصلب.

العملي السابع و الثامن

التحلل الحيوي للبروتينات للكائنات الحية الدقيقة المعزولة من التربة الزراعية و الصحراوية

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 والفطريات للدهون باستخدام قدرة تحللها للزيوت النباتية و الحيوانية.

الهدف من التجربة: الكشف عن قدرة تحلل البكتريا والفطريات للزيوت النباتية و الحيوانية.

الأدوات المستخدمة:

بيئة Water peptone and Potatoes infusion- ابرة تلقيح ذات عقفة – مزارع بكتيرية و فطرية و خميرية لهب بنسن – ديتول- أنابيب زجاجية محكمة الاغلاق- زيوت نباتية(زيت طبخ-زيت زيتون)-زيت حيواني(سمن بري).

طريقة العمل:

1- يتم تحضير بيئة Water peptone and Potatoes infusion وتوزيعها في أنابيب زجاجية.
2- اضافة 3 مل من الزيوت لكل أنبوبة و تعقيمها .
3- بعد التعقيم نقوم بتلقيح الأنابيب بالبكتريا و الفطريات و تحضينها لمدة 24-48 ساعة للبكتريا والخمائر.

النتائج:

البكتريا: قامت Pseudomonas sp. بتحليل زيت الزيتون و زيت الطبخ ولم تحلل السمن.

الخمائر: قامت Candida sp. بتحليل زيت الطبخ ولم تقم بتحليل السمن و زيت الزيتون.