جامعة الأنبار
كلية العلوم
قسم علوم الحياة

احياء مجهرية تربة ومياه عملي

المحاضرة الرابعة: دورة الكاربون Carbon Cycle (الجزء الثاني)

م.م. ليث لطيف حامد

دورة الكاربون Carbon Cycle

تحلل البكتين Degradation of pectin

يوجد البكتين في الصفائح الوسطى في خلايا النباتات وبعض الطحالب يرتبط البكتين مع كاربونات الكالسيوم التي تعطي الخلايا قواما ثابتا تقوم بعض الاحياء المجهرية بتحليل البكتين مثل بكتريا *Erwiana carotovora* ومن الاعفان أنواع تابعة لجنس *Fusarium* تفرز الاحياء المجهرية المحللة البكتين انزيم pectinase وبذلك تفقد الخلايا النباتية صلابة قوامها.

المواد وطريقة العمل

١- نماذج لترب مختلفة يعمل عالق للتربة بإضافة1 غم الى أنبوب اختبار حاو على 9 مل من الماء المقطر المعقم.
٢- تقطيع درنات البطاطا وتلقح سطوحها بكمية من عالق التربة توضع القطع الملقحة في اطباق زجاجية معقمة.
٣- تلقح قطعا من البطاطا بكتريا *Erwiana carotovora* وتوضع في اطباق معقمة تحضن الاطباق في حاضنة عند درجة حرارة 28 درجة مئوية مدة أسبوع .تضاف كمية من الماء المعقم الى الاطباق خلال فترة الحضن حتى لا يحدث جفاف لقطع البطاطا.
٤- عند فقدان قطع البطاطا طراوتها نتيجة تأثير الانزيم المنتج من الاحياء المجهرية تعمل مسحات من سطح البطاطا الملقحة بعالق التربة والبكتريا للمقارنة تصبغ المسحات بصبغة كرام وتفحص تحت المجهر.

تحلل النشا Degradation of Starch

يتحلل النشا بفعل الاحياء المجهرية الى سكريات ثنائية واحادية(الكلوكوز)التي تمتلك الانزيمات المحللة للنشا مثل. β-amylase,α-amylase and Isoamylase توثر هذه الانزيمات على أواصر ارتباط وحدات السكر المكونة للنشا.

من الاحياء المجهرية المحللة للنشا بعض الاعفان. *Fusarium, Rhizopuse, Aspergillus*
وبعض البكتريا مثل.*Clostridium, Bacillus, Micrococcus, Flavobacterium*

المواد وطريقة العمل

١- تجمع نماذج لترب مختلفة, يوزن 1 غم من كل نموذج وتعمل التخافيف المطلوبة.
٢- يستخدم نفس الوسط في عزل الاعفان والبكتريا المحللة للسيليلوز اذ يستخدم النشا بإضافة1 غم منه بدل السيليلوز.يقسم الوسط الخاص بالاعفان الى قسمين :قسم منه بدون اكار يوزع في انابيب اختبار او

دوارق والقسم الاخر يضاف له الاكار 15 غم لكل لتر واحد. وكذلك بالنسبة لوسط عزل البكتريا المحللة للنشا.

٣- تلقح الأوساط الزرعية السائلة بإضافة1 مل من تخافيف العالق المختارة(ثلاث مكررات لكل تخفيف.)

٤- تضاف كمية 0.1 مل من التخافيف المختارة الى الوسط الزرعي الصلب بعد صبه في اطباق زجاجية معقمة,وبوساطة قضيب زجاجي معقم مثلث النهاية تفرش العينة على سطح الوسط(ثلاث مكررات لكل تخفيف.)

٥- تحضن الانابيب الملقحة والاطباق عند درجة حرارة 28 درجة مئوية مدة أسبوع.

٦- يلاحظ النمو في الأوساط الزرعية السائلة وتكون العكورة نتيجة لتحلل النشا.

٧- تعمل مسحات من الانابيب وتصبغ للتعرف على البكتريا والاعفان المحللة للنشا.

٨- اما النمو على الوسط الصلب فتضاف الى احد الاطباق قطرات من محلول اليود,بعد مدة دقيقتين يلاحظ وجود هالة شفافة حول المستعمرات دليل انتاجها للأنزيما ت المحللة للنشا.اما في المناطق البعيدة عن المستعمرات فيتكون اللون الأزرق نتيجة تفاعل اليود مع النشا.

٩- تعمل مسحات من النمو وتفحص تحت المجهر للتعرف على الاحياء المجهرية المحللة للنشا

تحلل بقايا النباتات

من المعروف ان انسجة النباتات مكونة من السيليلوز,النشا,البكتين, اللكنين,البروتينات ومواد أخرى.ولدراسة تاثير الاحياء المجهرية في هذه الانسجة صممت هذه التجربة.

المواد وطريقة العمل

١- تجمع نماذج من ترب مختلفة منخولة خالية من بقايات النباتات.

٢- توزن كمية من 100 - 50 غم من كل نموذج لتربة وتوضع في دوارق مخروطية حجم250 مل (ثلاث مكررا لكل نموذج.)

٣- تطحن بقايا النباتات(أوراق نباتات الحنطة,او الشعير,او نخالة الحنطة والشعير او أوراق نباتات أخرى.) وتضاف 10 - 5 غم من كالمصدر على حدة الى الدوارق وتخلط مع نموذج التربة.

٤- يحضر الوسط الخاص بعزل الاعفان وعزل البكتريا يحضر الوسط الذي استخدم في عزل الاحياء المجهرية المحللة للسيليلوز ولكن بدون إضافة السيليلوز,اذ يستخدم بدلا منه بقاية النباتات كمصدر وحيد للكاربون يعقم الوسط ويبرد.

٥- تضاف كمية من الوسط الى الدوارق بحيث تكون نسبة الوسط السائل الى كمية التربة % 70- 60 يجب إضافة محلول صبغة الروز بنكال للمعاملة الخاصة بعزل الاعفان لمنع نمو البكتريا. بالاضافة الى تعديل PH الى. 5

٦- تحضن الدوارق عند درجة حرارة 28 درجة مئوية مدة أسبوعين الى اربع أسابيع.

٧- تعمل بعدها تخافيف من الدوارق. وتؤخذ قطرة من كل تخفيف وتنشر على وسط زرعي صلب نفس مكونات الوسط المستخد م لعزل الاعفان والبكتريا مع إضافة الاكر 15 غم لكل لتر منه .وتحضن عند درجة 28 مئوية مدة أسبوع.

٨- تفحص المستعمرات النامية بعمل شرائح وتصبغ ثم تفحص تحت المجهر8 .

٩- يمكن اجراء مقارنة بين اعدادالاحياء المجهرية الكلي(اعفان وبكتريا)قبل اجراء التجربة لنماذج التربة وبعد انتهاء مدة الحضن في الخطوة٦ بطريقة العدد بالأطباق.

١٠- تسجل الملاحظات واشكال البكتريا والاعفان تقارن نتائج نماذج ترب مختلفة.

المصادر:

1- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer,A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller,W., and Lipman,D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**, 3389–3402.
2- Eden, P.A., Schmidt, T.M., Blakemore, R.P., and Pace, N.R. (1991) Phylogenetic analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA. *International Journal of Systematic Bacteriology* **41**, 324–325.
3- Mullis, K.B., and Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* **225**, 335–350.
4- Saiki, R.K., Scarf, S., Faloona, F.A., Mullis, K.B., Hoen,G.T., Erlich, H.A., and Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globulin genomic sequences and restriction size analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350–1354.
5- Wilson, D.H., Blitchington, R.B., and Green, R.C. (1990) Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* **28**, 1942–1946.