الدرس العملي الثاني

تقدير أعداد البكتريا والفطريات والاكتينومايستات في التربة وبطريقة التخافيف المتسلسلة (التخفيف والعد بالأطباق)

الأهداف

1- تقدير أعداد البكتريا والفطريات الموجودة في تربة حقل كلية الزراعة .
2- تحديد بعض الأجناس من البكتريا والفطريات والاكتينومايستات الممكن تصنيفها والمتغلبة في كل تربه من هذه الترب .

المقدمة

التربة هي عبارة عن بيئة غذائية لكل الأنواع المعروفة من الأحياء الدقيقة والتي تشمل على البكتريا , والفطريات , والاشنات والديدان , والأنواع المتغلبة تعتمد اعتماداً كلياً على تركيب التربة ,الرطوبة , PH, وعوامل أخرى .

معظم البحوث الميكروبيولوجية تحتاج إلى تقدير أعداد كل من هذه الأحياء الدقيقة الموجودة في حجم معين من التربة , وهناك عدة طرق لإجراء مثل هذه الدراسات منها استعمال العد المباشر باستعمال طريقة (Microscopis slide Technique) ولكن بالرغم من بساطة هذه الطريقة إلا انه بواسطتها لا يمكن التمييز بين الخلايا الحية والميتة كذلك بين الخلايا البكتيرية وحبيبات التربة أو المادة العضوية لذلك يفضل الكثير من الباحثين إتباع طريقة الـ (Standard plate Technique) باستعمال وسط غذائي معين وفيها يمكن عد الخلايا الحية فقط لأنه المستعمرات التي سوف تتكون على سطح الوسط الغذائي بعد عملية التحضين سوف تمثل بكتريا حية فقط .

فرضيات الـ Standard plate Technique لتنمية البكتريا

1- الوسط الغذائي الذي سوف نستعمله لتنميه البكتريا هو بيئة ملائمة لنمو جميع الأنواع والوسط الغذائي الذي سوف نستعمله لتنميه الفطريات هو بيئة ملائمة لجميع الأجناس المختلفة من الفطريات .
2- عند عمل تخفيف معين من التربة في الماء المعقم ونرجه نفترض انه جميع البكتريا او الفطريات سوف تتوزع بصورة متجانسة في جميع أجزاء المحلول (لا يوجد ترسبات) .
3- كل مستعمرة بكتيرية تظهر على سطح الوسط الغذائي بعد عملية التحضين هي ناتجة من خلية واحدة فقط .

العوامل التي تؤثر على عملية العد بهذه الطريقة

1- استعمال الوسط الغذائي المناسب للحصول على نتائج دقيقة وجيدة .

2- درجة حرارة التحضين .
3- مدة التحضين .(كلما تزداد مدة التحضين تزداد أعداد البكتريا)
4- طريقة عد المستعمرات سواء باستعمال أجهزة (Colony Counter) او باستعمال العين المجردة .

مساوئ هذه الطريقة (العد بالأطباق : Plate count method)

1- تعد طريقة بطيئة نسبيا ، إذ تحتاج إلى فترة طويلة للحضن
2- هذه الطريقة تعطي اقل من العدد الحقيقي للبكتريا .

طريقة العد بالأطباق تعطي اقل من العدد الحقيقي للبكتريا وذلك للأسباب الآتية :

1- عدم التجانس في اخذ عينة التربة من الحقل ويمكن التغلب عليها بأخذ عينات كثيرة وخلطها لكي تصبح ممثلة للحقل .
2- عدم التجانس عند تحضير التخافيف وذلك لان قسما من البكتريا تكون نامية أصلا في التربة بشكل مستعمرات ومن الصعوبة تفريقها عن بعضها مهما كانت عملية الرج كفوءة .
3- أساس الطريقة يعتمد على فرض إن كل مستعمرة ناتجة من تكاثر خلية واحدة ولكن هذا قد لا يحصل إذ إن المستعمرة قد تكون ناتجة من تكاثر خليتين أو أكثر .
4- يستعمل لغرض العد وسط غذائي واحد وظروف حضن واحدة ، وهذه بطبيعة الحال لا تناسب جميع الأنواع ، لذا فان بعض الأنواع تنمو والبعض الأخر لا تنمو .

الأوساط الغذائية المستعملة لعد البكتريا

يمكن استعمال الاكار المغذي المتعادل Nutrient Agar لتنمية وعد البكتريا والذي مكوناته كالأتي :

ت	المادة		الكمية
1	مستخلص اللحم		3 غم
2	ببتــون		5 غم
3	أكار_ أكار		20غم
4	ماء مقطر		1000 مل

عقم على درجة حرارة 121م^{0} وضغط 15 باوند / انج^{2} باستعمال الاوتوكليف ولمدة 20 دقيقة وبعض الباحثين يفضل استعمال الوسط (Soil Extraot Agar) والذي يجب استعماله في إجراء البحوث والمشاريع الدقيقة ويستعمل هذا الوسط لتنمية وعد البكتريا ومكوناته :

ت	المادة	الكمية
1	كلوكوز	1 غم
2	K_2HPO_4	0.5 غم
3	KNO_3	0.1 غم
4	أكار ــ أكار	20غم
6	ماء مقطر	900 مل
7	PH	7- 6.8

عقم في جهاز الاوتوكليف على درجة حرارة 121م^0 وضغط 15 باوند /انج^2 ولمدة 20 دقيقة .

لتحضير مستخلص التربة اتبع الخطوات التالية :

1- زن 1كغم تربة وضعها في فلاسك حجم 4 لتر . أضف 1 لتر من ماء الحنفية وحوالي 0.5 غم من $CaCO_3$ ضع الخليط في الاوتوكليف تحت درجة حرارة 121م^0 وضغط 15باوند /انج ^{2} ولمدة 25 دقيقة .
2- رشح بعد التبريد باستعمال ورقتين من ورق الترشيح إلى أن تحصل على محلول رائق (كرر عملية الترشيح).
3- ضع الراشح في فلاسكات حجم 250 مل لكل منها يحوي 100 مل من المحلول وغط بالقطن ومن ثم عقم تحت نفس الضغط ودرجة الحرارة .

الأوساط الغذائية المستعملة في عد الفطريات

في هذا المختبر سوف نستعمل Martins Medium لتنمية وعد الفطريات والذي مكوناتها كالأتي :

ت	المادة	المكونات
1	دكتروز	10 غم
2	ببتـــــــون	5 غم
3	KH_2PO_4	1 غم
4	$MgSO_4.7H_20$	0.5 غم
5	Rose benga1	33 ملغرام
6	أكار – أكار	18 غم
7	ماء مقطر	1000مل

أحياء التربة المجهرية - العملي

بعد عملية التعقيم التي تتم في جهاز الاوتوكليف على ضغط 15 باوند /انج^{2} ولمدة 20 دقيقة أضف (Streptomycin) بمعدل 30 ملغرام لكل لتر وذلك عندما تكون درجة حرارة الوسط (45-50 م^{0}) من الممكن أيضا استعمال الوسط (Nutrient Agar) لتنمية وعد الفطريات بشرط جعل الـ PH للوسط 4 ولكن المفضل استعماله في التجارب والمشاريع الدقيقة هو الوسط الغذائي الساق .

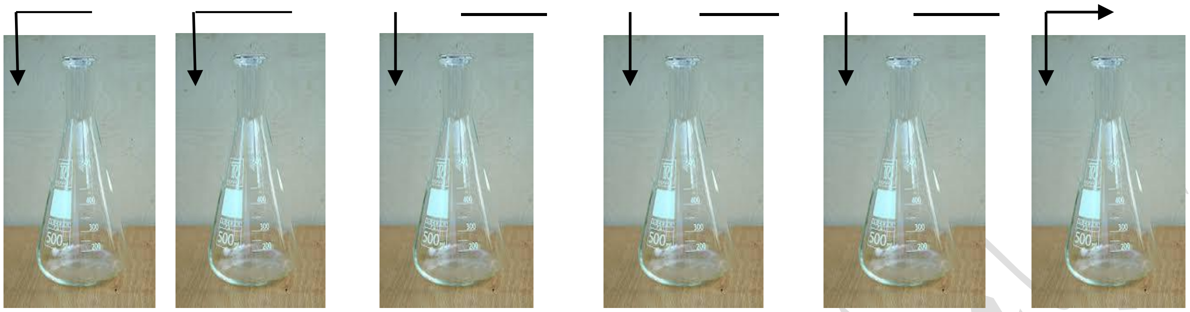
مواد التجربة : لكل مجموعة :

1- تربة حقل او حديقة من موقع معين مجففة هوائيا ذات نسبة رطوبة معلومة .
2- ماصات معقمة حجم 1 مل .
3- فلاسك يحوي 90 مل ماء مقطر معقم .
4- أطباق بتري .
5- وسط غذائي خاص بالبكتريا و آخر بالفطريات .
6-جهاز عد المستعمرات Colony Counter

طريقة العمل

1- ضع علامات واضحة على أنابيب الاختبار ، فلاسكات التخفيف وأطباق بتري المعقمة .
2- زن 10 غم تربة واضعها في 90 مل من الماء المعقم في فلاسك ورج جيداً لمدة 10 دقائق لكي تتفكك التربة وتنطلق خلايا الأحياء إلى المحلول (التخفيف 10/1 أي 10^{-1}) . أعط هذه القنينة رقم (1) .
3- انقل 10 مل من التخفيف السابق إلى فلاسك يحوي 90 مل من الماء المعقم باستعمال ماصة معقمة ورج المزيج لمدة 30 ثانية (التخفيف 100/1 أي 10^{-2}) . أعط هذه القنينة رقم (2) .
4- استمر بهذه العملية حتى تحصل على محاليل بتراكيز10^{-3} ، 10^{-4} ، 10^{-5} ، 10^{-6} أهمل 10 مل من المحلول الأخير. (تجرى عملية الرج في كل خطوة للحصول على المحلول المتجانس) كما في الشكل التوضيحي في أدناه .
5- بواسطة ماصة معقمة انقل 1سم^{3} من التخفيف 10^{-5} و 10^{-6} (لتقدير البكتريا) بعد رج القناني إلى وسط طبق زجاجي واعمل ثلاث مكررات من كل تخفيف ، ولتقدير عدد الفطريات ابدأ بالتخفيف 10^{-3}
6- اسكب في كل طبق (10 –15) مل من الوسط الغذائي الذائب بدرجة حرارة(45 - 48) م^{0} والخاص بل مجموعة ميكروبية مع مراعاة الشروط الصحيحة لتقليل التلوث ثم حرك الأطباق بشك دائري على المنضدة خمس مرات باتجاه عقرب الساعة وخمس مرات عكس اتجاه عقرب الساعة ومرتين إلى الأمام والى الخلف لكي تتوزع خلايا الأحياء المنقولة بصورة متجانسة مع الوسط الغذائي .
7- اترك الأطباق في درجة حرارة الغرفة إلى أن يتصلب الوسط الغذائي ثم اقلبها بعد ذالك وضعها في الحاضنة بصورة مقلوبة على درجة حرارة 28 م^{0} لمدة (7– 10) أيام للبكتريا و(3– 7) أيام بالنسبة للفطريات .
8- سجل أعداد المستعمرات النامية في كل طبق (بالنسبة للبكتريا تهمل الأطباق التي نمت عليها أكثر من 300 مستعمرة أو اقل من 30 مستعمرة) واحسب العدد الكلي للأحياء بضرب العدد في مقلوب التخفيف الموجودة في (1) غم تربة رطبة ثم احسب العدد في (1) غم تربة جافة بعد معرفة نسبة الرطوبة .
9- قارن إحصائيا بين أعداد البكتريا في كل تربة من الترب المعطاة بأخذ نتائج المجاميع الأخرى .اعمل نفس النوع من المقارنة بالنسبة لأعداد الفطريات كذلك .

تهمل 10مل   10 مل   10 مل   10مل   10 مل   10 مل   10 غم تربة



90 مل   90 مل   90 مل   90 مل   90 مل   90 مل

10^{-6} 10^{-5} 10^{-4} 10^{-3} 10^{-2} 10^{-1}

قنينة رقم (6)   قنينة رقم (5)   قنينة رقم (4)   قنينة رقم (3)   قنينة رقم (2)   قنينة رقم (1)

10- سجل في جدول أعداد المستعمرات البكترية وأعداد الفطريات في الغرام الواحد من التربة الرطبة والجافة وبالطريقة التالية :

رقم المجموعة	التربة المستعملة	عدد المستعمرات في كل مكرر من كل تخفيف	معدل عدد المستعمرات في كل تخفيف	عامل التخفيف	نسبة الرطوبة	عدد البكتريا في غرام واحد	
						تربة الرطوبة	تربة جافة

فحص الفطريات بطريقة الـ Wet mount

1- ادرس الصفات المورفولوجية للعفن الذي نمى على سطح الوسط الغذائي بالعين المجردة ومن ثم باستعمال الميكروسكوب بأخذ جزء من النمو باستعمال إبرتين من ابر التلقيح ووضعها على شريحة زجاجية نظيفة عليها قطرة من الـ Locto –phenol ومن ثم غط بغطاء شريحة مع مراعاة عدم تكوين فقاقيع هوائية .
2- افحص الشريحة تحت العدسة الصغرى / 10 x وعند الحاجة استعمل العدسة الكبرى الجافة (4o x)
3- ارسم وصف ما تشاهده مبيناً الخواص المورفولوجية لكل من الأنواع المختلفة من العفن .

قياس أعداد الاكيتنومايسيتات في التربة Enumeration of Soil Actinomycetss

من الممكن إجراء عملية عد لاكتينومايسيتات التربة بطريقة العد ألمجهري المباشر او بطريقة الاطباق لعد الخلايا الحية ولكن الأخيرة هي التي تعطي العدد التقريبي لما موجود في التربة .

الهدف من التجربة : تقدير أعداد الاكيتنومايستات في تربة غير مزروعة ومقارنة ذلك مع تربة مزروعة بقول وأخرى مزروعة حنطة .

لتقدير أعداد الاكيتنومايستات في التربة سوف نستعمل طريقة الـ Technique Standard plat التي استعملناها في تجربة قياس أعداد البكتريا والفطريات من التربة .

بما انه يمكن اعتبار الاكيتنومايستات بكتريا وليست فطريات لذلك يمكن استعمال الوسط الغذائي الخاص بتنمية البكتريا لتنمية الاكيتنومايستات (Nutrient Agar) بشرط ان تكون فترة التحضين أطول بسبب النمو البطيء لها . ولكن وجد بالتجربة انه هذا الوسط سوف يساعد على نمو نسبة قليلة من الاكيتنومايستات التربة لذلك سوف يستعمل وسط غذائي أخر أكثر ملائمة وهو :

(Glycerol Yeast extract Agar)

ت	المادة	الكمية
1	Glycerol	5 ml
2	Yeast extract	2ml
3	K_2 HPOH	1 gm
4	Agar -Agar	18 gm
5	Water	1000 ml

عقم في جهاز الاوتوكليف على درجة حرارة 121 م^0 وضغط 15 باوند /انج^2 ولمدة 20 دقيقة .

المواد اللازمة لكل مجموعة

1- تربة حقل أو حديقة من موقع معين .
2- ماصة معقمة حجم 1 مل .
3- فلاسك يحوي 9 مل من الماء المقطر المعقم .
4- أطباق بتري المعقمة .
5- وسط غذائي معقم .

طريقة العمل

1- ضع علامة واضحة تشير إلى نسبة التخفيف عن كل أنابيب الاختبار وعلى أطباق بتري المعقمة .
2- زن 1 غم تربة في 9 مل ماء معقم في أنبوبة اختبار ورج جيداً (التخفيف 10/1) .
3- انقل 1 مل من التخفيف السابق بعد الرج إلى فلاسك أخر تحوي 9 مل من الماء المعقم وذلك باستعمال ماصة معقمة (التخفيف 100/1).

4- استمر بعمل التخفيفات التالية وبنفس الطريقة $\frac{1}{1000}$, $\frac{1}{10000}$, $\frac{1}{100000}$, $\frac{1}{1000000}$ بتغير الماصة عند الانتقال من تخفيف الى اخر مع الرج الجيد لتجانس .

5- انقل باستعمال ماصة معقمة 1 مل من كل من التخافيف $\frac{1}{1000000}$, $\frac{1}{10000}$, $\frac{1}{10000}$ الى كل من ثلاثة اطباق بتري المعقمة (معناها ثلاث مكررات من كل تخفيف) مع مراعاة تغيير الماصة عند الانتقال من تخفيف الى اخر .

6- أضف حوالي 15 مل من الوسط الغذائي المعقم الخاص بالاكتنومايستات إلى كل من هذه الأطباق حرك الطبق جيداً لخلط الـ 1مل من التخفيف مع الوسط (حرك الأطباق) وقبل أن يتصلب الوسط الغذائي .

7- اتركه بعد ذلك لكي يتصلب ومن ثم ضع جميع الأطباق مقلوبة في الحاضنة لمدة خمسة أيام وعلى درجة حرارة (25-28 م^0) .بعد عد المستعمرات في الأطباق التي لا يقل عددها عن 30 ولا يزيد عن 300 وبضرب عدد المستعمرات في مقلوب التخفيف يمكن معرفة عدد الخلايا الموجودة في 1 غم من التربة الرطبة ومن ثم تعديلها إلى الغرام الواحد من التربة الجافة وبعد حساب نسبة الرطوبة .

8- قارن إحصائيا بين أعداد الاكينومايستات في كل تربة من الترب المعطاة بأخذ نتائج المجاميع الأخرى وبنفس طريقة المقارنة التي استعملناها في حالة البكتريا والفطريات .

المطلوب منك ألان أن تكتب تقرير كامل عن التجربة السابقة واجب على الأسئلة التالية :

س1 : لماذا تكون التربة موطنا صالحا للأحياء بصورة عامة .

س2 : لماذا كانت نسبة الكلكوز في الوسط الغذائي الخاص بعد البكتريا اقل بكثير من ذلك الخاص بالفطريات ؟

س3 : لماذا يسكب الاكار على كمية النموذج في درجة 45 ــ 48 م^0 ؟.

س4 : هل تقل أو تزداد أعداد الأحياء في نفس التربة في مواسم السنة المختلفة ؟ ولماذا ؟ .

س5 : هل يكون تقدير الفطريات بهذه الطريقة أدق من تقدير أعداد البكتريا أم العكس ؟ ولماذا ؟

س6 : ماهي أوجه الشبه والاختلاف بين كل من الـ Actinomycetes التي ظهرت كمستعمرات في الأطباق الخاصة بالبكتريا والبكتريا نفسها وكذلك مع الفطريات .

س7 : لماذا تقلب الأطباق وتحضن وهي مقلوبة .

س8 : ما هي الأخطاء التي قد تحصل في هذه الطريقة للعد ولا يمكن تجنبها ؟

س9 : ماهي العلاقات الموجودة بين بكتريا وفطريات التربة من حيث الوظيفة والصفات الفسلجية؟

س10 : ما هو الدور الذي تلعبه الفطريات في التربة ؟

ا.م.د. العجرش . العلي