

## إرشادات عامة للعمل في مختبرات الأحياء المجهرية

يجب توخي العناية والدقة التامة عند إجراء الاختبارات البكتريولوجية للحصول على نتائج دقيقة ، إذ إن التلوث الناتج عن عدم إتباع الإرشادات الصحيحة والتعقيم الصحيح والنظافة يؤدي إلى فشل التجارب المختبرية ، إضافة إلى احتمال تلف الأجهزة المختبرية والأدوات الملحقة . ولهذا يجب على الطالب مراعاة الإرشادات واتخاذ ما يلزم من الاحتياطات الرئيسية التي يجب إتباعها في مختبر أحياء التربة . ويمكن تلخيص الإرشادات الواجب إتباعها بالنقاط التالية :

- 1- يجب ارتداء صدريّة المختبر دائما قبل البدء بالعمل .
- 2- تجنب وضع أي كتب أو أدوات أو ملابس على منضدة العمل حتى لا تتعرض إلى التلف .
- 3- يجب عدم فتح أغطية الأدوات الزجاجية الحاوية على الأوساط الغذائية المعقمة أو أي مادة أخرى معقمة قبل الحاجة إلى استعمالها حفاظا على عدم تلوثها .
- 4- احذر دائما من تلوّث يديك أو المنضدة أو حوض الغسيل بالصبغات الفائضة عن الاستعمال .
- 5- لا تشعل نار المصباح الكحولي أو الغازي إلا عند الاستعمال واطفئ النار عند الانتهاء مباشرة .
- 6- عدم التدخين أو وضع أي شيء في الفم أثناء التواجد في المختبر .
- 7- يجب غسل اليدين ومسح مناضد العمل قبل البدء بالعمل مباشرة وبعد الانتهاء منه بمحلول معقم .
- 8- رتب أدوات العمل المستخدمة في التجربة بالشكل الصحيح حتى لا تحدث أخطاء أثناء العمل .
- 9- يجب عدم سكب الأوساط الغذائية الحاوية على الاكار ( Agar ) أو إلقاء القطن أو عيدان الثقاب في أحواض الغسيل لأن ذلك يؤدي إلى انسدادها .
- 10- يجب على كل طالب أن يصطحب معه كراسة العمل مع دفتر العملي في كل درس عملي ويقوم برسم وتدوين جميع المعلومات التي يراها ويطبّقها في المختبر إذ يكون مستعدا لتقديم تقرير أسبوعي بعد كل تجربة
- 11- في نهاية الدرس العملي ، على كل طالب أن ينظف محله جيدا .
- 12- يجب أن تلاحظ إطفاء مصباح الميكروسكوب وإقفال صنوبر الغاز قبل أن تترك المختبر .

## الدرس العملي الأول

### طرق اخذ عينات التربة للدراسات الميكروبيولوجية ، دراسة وظيفة الأحياء المجهرية بطريقة الشرائح المدفونة :

افترض الباحثون القدماء إن تربتين من نفس النوع والخاضعة إلى نفس المعاملات والمأخوذة من نفس المنطقة ومن أعماق محدودة معينة تحتوي على نفس العدد تقريباً من الأحياء الدقيقة . ولكن ظهر نتيجة للدراسات المتعددة إن هناك عوامل أخرى كثيرة مثل التربة في مكوناتها الطبيعية والكيميائية (قوام التربة ، درجة الحموضة والقلوية العمق ..... الخ ) قد تؤثر على تلك الأعداد وأنواعها .

ليس هناك أبحاث كثيرة حول طرق اخذ نماذج التربة وتحضيرها للدراسة الميكروبيولوجية ، علماً بان اغلب العاملين في هذا الحقل يتبعون تقريباً نفس الطريقة مع اختلاف بسيط وهو **الاعتماد على الغرض من اخذ النموذج والغرض من الدراسة** فمثلاً اخذ العالم (واكسمان عام 1922) نماذج تربة من خمسة أجزاء مختلفة من الحقل وكل نموذج مكون من مخلوط لثلاثة عينات من عمق 1-2 قدم عن بعضها . وهذه النماذج المتعددة ركبت إلى نماذج اقل عددا واستعملت للدراسة البكتيريولوجية . وفي دراسة أخرى نفس العالم (واكسمان عام 1922) قشط ربع الانج العلوي من سطح التربة قبل اخذ النماذج بواسطة أنبوب اخذ النماذج من عمق 15-16 سم ووضعته هذه النماذج في أواني معقمة وأجريت عليها الفحوصات العددية بأسرع ما يمكن واقترح وكسمان بعد ذلك بأنه يجب اخذ 3-5 عينات تربة مركبة من كل تربة لكل تحليل أو تقدير .

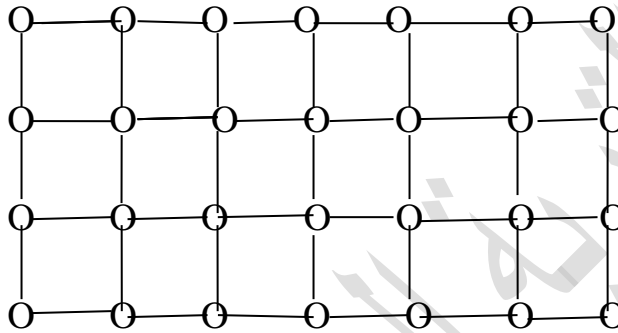
أما العالم (بريولي وزملائه عام 1927) فقط ذكر إن اختيار طريقة اخذ النماذج تعتمد **على نوع التربة وطبيعة التربة** ووجدوا في تربة اعتبروها متجانسة إن الفطريات منتشرة بصورة مختلفة في ترب قريبة من بعضها جدا . وللتخلص من خطأ اختيار الطريقة لأخذ النماذج اخذ هؤلاء العلماء ستة نماذج من التربة لكل مساحة يراد درسها ووزن كل نموذج 200-250 غرام بعد أن خلطت النماذج الستة مع بعضها خلطاً جيداً ونخلت لتكون عندهم نموذج مركب واحد ، ثم قسم هذا النموذج إلى قسمين بصوره عمودية ثم قسم كل قسم إلى قسمين آخرين وهكذا في النهاية اخذوا عينه وزنها 25 غرام من القسم الأخير وعملوا منها معلق للتربة .

واستنتج العالمان (ليمان ومارتن عام 1918) من نتائج اختباراتهم بأنه ليس من الضروري اخذ احتياطات أكثر من الاحتياطات الاعتيادية عند اخذ النماذج وتحضيرها للدراسة الميكروبيولوجية وان اخذ نماذج حقلية للتربة بواسطة استعمال الاوكر من أعماق مختلفة لم تؤدي إلى خلط بين النماذج ولذا فإنه ليس من الضروري تعقيم الاوكر بعد اخذ كل نموذج ولكن بعد اخذ النماذج يجب أن تتبع جميع الاحتياطات اللازمة من تنظيف الأطباق... الخ

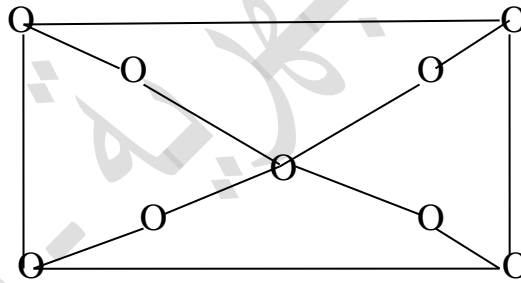
الأحياء الدقيقة في التربة غير موزعة بانتظام أي مركزه في مناطق معينة دون أخرى فمثلاً تتركز حول الدقائق العضوية أكثر من الدقائق المعدنية كما وان العدد حول المنطقة الجذرية المسماة (Rhizospher) أكثر منه عن باقي التربة . هذا بالإضافة إلى إن العدد يختلف من وقت لآخر . فكلا التربة والمجموع الميكروبي التي تحويه غير متجانس ( Hrrerio generous) وهذا مما يؤدي إلى صعوبة الحصول على عينات ممثلة للمنطقة المدروسة بشكل دقيق .

هناك طرق مختلفة لأخذ النماذج الممثلة للحقل هي :

1- **طريقة النظام الشبكي** : حيث يتم تقسيم الأرض المتجانسة إلى مربعات تمثل في مجموعها مستطيل أو مربع وتؤخذ النماذج من مراكز تلاقي الأضلاع وعلى الأعماق المطلوبة كما في الشكل التالي .



2- **طريقة المستطيل** : يرسم مستطيل في الحقل وتعلم أضلاعه وأقطاره وتكون نقطة تلاقي أقطار المستطيل وأنصاف أقطار المستطيل هي مركز لأخذ النماذج حسب العمق المطلوب كما يلي :



الطريقتين أعلاه تستخدم للمساحات الصغيرة ، أما المساحات الواسعة فتستخدم الطريقة التالية :

3- **الطريقة العشوائية** : تستعمل هذه الطريقة للمساحات الواسعة وفيها تقسم الأرض إلى وحدات متجانسة فيما بينها . من كل وحدة متجانسة تؤخذ عدد من العينات عشوائياً حسب العمق المطلوب تخلط مع بعضها لتكون بالنتيجة عينة تمثل وحدة متجانسة واحدة . ولا يجوز المزج بين عينات الوحدات الغير متجانسة .

بعد تحديد مواقع اخذ العينات تستخدم الطريقة التالية للحصول على نموذج التربة من المكان الذي يتم تحديده حسب الطريقة السالفة الذكر .

1- تزال التربة السطحية ولعمق 1 سم .

- 2- يستعمل أنبوب التربة المعدني لأخذ النماذج لعمق 15 سم أو حسب العمق المطلوب من المواقع المحددة ، وتمزج مع بعضها في كيس بلاستيكي أو أي وعاء مناسب ، أما إذا أردنا اخذ نماذج تربة من أعماق بعيدة فيمكن استخدام الاوكر .
- 3- تغسل أدوات اخذ النماذج جيداً وتجفف قبل الاستعمال حيث إن الاحتياطات الشديدة في تعقيم هذه الأدوات لم تؤدي في اغلب الأحيان إلى اختلافات جوهرية في النتائج ولكن قد يكون تعقيمها ضرورياً في بعض الدراسات مثل اخذ نماذج تربة ذات المحتوى الميكروبي المحدد كالأراضي البكر والأراضي الرملية أو عند عزل أنواع معينة من ميكروبات التربة .
- 4- تؤخذ عادة من 3-5 نماذج عشوائية من التربة المراد دراستها بحيث تبعد عن بعضها 1-3 قدم ووزن كل عينة في حدود 200-300 غرام مع مراعاة انه كلما زاد عدد المكررات المأخوذة للتحليل كلما كانت النماذج اقرب إلى الدقة .
- 5- تخلط الـ 3-5 نماذج التربة لكل مكرر مع بعضها لتكون نموذج واحد وتخلط جيداً وتقسم عدة مرات قبل اخذ النموذج وأخيراً تؤخذ منها عينة مقدارها 25 غرام .
- 6- تمرر التربة من منخل سعة ثقوبه 2 ملم يجب مراعاة عدم اخذ النماذج عندما تكون التربة زائدة الرطوبة أو زائدة الجفاف حيث إنها في الحالة الأولى سوف تقاوم عملية النخل وفي مثل هذه الحالة تترك التربة لتجف نسبياً ولكن ليس لدرجة الجفاف التام حتى تصبح مناسبة للنخل .
- 7- تحفظ العينات في الثلاجة حتى الحاجة إليها .

## العمل

- 1- احصل على عينات التربة من الحقول الزراعية وجفف هوائياً ( إذا دعت الحاجة الى ذلك ) .
- 2- انخل العينات من منخل 2 ملم .
- 3- قدر كل من تفاعل التربة PH ودرجة التوصيل الكهربائي EC .
- 4- أحفظ العينات على درجة حرارة منخفضة حتى الحاجة إليها .

## دراسة أحياء التربة بطريقة الشرائح المدفونة

تعتبر هذه الطريقة من الطرق البسيطة لدراسة أحياء التربة في بيئتها الطبيعية عن طريق دراسة الأحياء الملتصقة بسرائح زجاجية مدفونة في التربة لفترة من الزمن . اقترح هذا الأسلوب من قبل Choldny و Rossi وتسمى (طريقة روزي – كلودني ) كطريقة لدراسة العلاقة أو سلوك أحياء التربة مع ظروف البيئة . وهي طريقة غير كمية لتقدير أعداد الأحياء المجهرية حيث لا يمكن الحصول بواسطتها على حساب دقيق لأعداد الأحياء ولكنها طريقة نوعية أو وصفية حيث تعطي فكرة عامة عن كثرة أو قلة مجموعة من المجاميع الرئيسية لأحياء التربة إلى بعضها البعض .

### من فوائد هذه الطريقة :

- 1- ملاحظة مورفولوجيا مجاميع أحياء التربة المختلفة .
- 2- ملاحظة العلاقات الموجودة بين أحياء التربة كتنغذية بعض البكتريا على أحياء أخرى وافتراس بعضها من قبل بعض .

- 3- كيفية توزيع المجاميع الميكروبية كالفطريات والبكتيريا والاكثينوماسيتس والأحياء الأخرى .
- 4- ملاحظة تأثير خواص التربة الفيزيائية والكيميائية ومعاملات التربة المختلفة كالزراعة والتسميد ورش المبيدات على مجاميع الأحياء المختلفة .

### من عيوب هذه الطريقة

- 1- صعوبة التفريق بين خلايا الأحياء ودقائق الغرويات العضوية الأخرى تحت المجهر .
- 2- بعض الكائنات الدقيقة تلتصق بسطح الشريحة أكثر من الأخرى فبعض البكتيريا تغسل من سطح الشريحة بسهولة بينما البعض يقاوم حتى التيار المائي الشديد .
- 3- من الصعوبة عزل أنواع الأحياء الموجودة في التربة لان خلايا الأحياء تكون شديدة التلاصق بسطح الزجاجية . وقد جرت بعض التحويلات على هذه الطريقة كاستخدام طبقة رقيقة من السليلوز على سطح الشريحة الزجاجية المدفونة أو مواد أخرى مثل النايلون .

### المواد والأدوات

- 1- شرائح زجاجية نظيفة ومعقمة .
- 2- صبغة (phenol rosebengal) (أذب 1غم من الروز بنكل , 0,01 غم من  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  في 100سم<sup>3</sup> من 5% فينول)

### التجربة الحقلية

- 1- تختار كل مجموعة طلابية ثلاثة حقول مختلفة .
  - أ- حقل غير مزروع (بور) .
  - ب- حقل مزروع بنبات نجيلي .
  - ج- حقل مزروع بنبات بقولي .
 سجل ملاحظات كل موقع من حيث نوع المحصول ارتفاعه ونوعية الأسمدة المستعملة .
- 2- في كل حقل يعمل شقين في التربة بعمق حوالي ( 4 سم ) بواسطة سكين حادة معقمة ثم تدفن في كل شق شريحة زجاجية تاركاً ثلث طول الشريحة فوق سطح التربة على جانبيها لجعل التربة تلامس سطح الشريحة وتترك الشرائح في التربة .
- 3- تزال إحدى الشريحتين بعناية من كل حقل بعد أسبوع وتزال الثانية بعد 3 أسابيع .
- 4- بعد إخراج الشرائح يكتب عليها المكان الذي دفنت فيه وتوضع في وعاء نضيف وتغطى وتجلب إلى المختبر
- 5- بواسطة قطعة من القماش يمسح السطح السفلي من الشريحة ، أما السطح العلوي فيغسل بواسطة تيار مائي هادئ لإزالة الكتل الترابية العالقة مع مراعاة عدم مس هذا السطح باليد أو القماش أبداً .
- 6- تترك الشريحة في الهواء لتجف بعدها يثبت الغشاء على الشريحة وذلك بإمرارها على اللهب ثلاث أو أربع مرات سريعة .
- 7- توضع الشرائح على حمام مائي ثم يغمر سطح الشرائح بوضع قطرات من الصبغة . تترك الشرائح على الحمام المائي لمدة 4 - 6 دقائق مع مراعاة عدم جفاف الصبغة على الشريحة بإضافة قطرات أخرى كلما دعت الحاجة لذلك .
- 8- ترفع الشرائح وتجفف في الهواء وتفحص تحت الميكروسكوب .

## التجربة المختبرية

- 1- تحضر كل مجموعة طلابية ثلاثة بيكرات نظيفة ترقم 1، 2، 3 .
- 2- ضع في كل بيكر 400 غم تربة جافة هوائية .
- 3- اترك البيكر رقم ( 1 ) بدون معاملة للمقارنة ، أما البيكر رقم ( 2 ) فتعامل التربة ببقايا الحنطة أو الشعير المطحونة بنسبة 2 % ، أما البيكر رقم ( 3 ) فتعامل التربة فيه ببقايا ألجت المطحونة وبنفس النسبة .
- 4- أضف لكل بيكر بعد المعاملات السابقة كمية من الماء لإيصال الرطوبة إلى 60 % من السعة الحقلية .
- 5- ادفن في كل بيكر شريحتين زجاجية تاركا ثلث طول الشريحة فوق سطح التربة ثم اضغط على التربة من جانبي الشريحة لجعل التربة تلامس سطح الشريحة .
- 6- اترك الشريحة الأولى لمدة أسبوع والثانية لمدة ثلاثة أسابيع .
- 7- بعد انتهاء الفترة تزال الشرائح وتصبغ ( راجع عملية التثبيت والتصبغ كما في التجربة الحقلية ) وتفحص بالمجهر .

## ناقش نتائجك للتجربة الحقلية والمختبرية على ضوء الأسئلة التالية :

- 1- هل هناك فرق في كثافة الأحياء الدقيقة في الحقول المكرسكوبية على الشريحة التي فحصتها بعد أسبوع وبعد ثلاثة أسابيع من الدفن في الحقل أو البيكر الواحد ولماذا ؟
- 2- هل هناك فرق في الكثافة الميكروبية بين المعاملات الثلاثة وما سبب هذا الفرق ؟
- 3- هل هناك صعوبة في التمييز بين خلايا الأحياء ودقائق الغرويات العضوية ؟
- 4- ماهي الفائدة التطبيقية من استخدام طريقة الشرائح المدفونة في دراسة النشاط الميكروبي في التربة ؟