

الدرس العملي الرابع



الطرق القياسية لتقدير أعداد الميكروبات بالأراضي

أولاً : الطريقة الميكروسكوبية المباشرة :

وهذه الطريقة من الطرق البسيطة الهامة التي تستخدم في تقدير أعداد الميكروبات بالتربة ، وهي تمكن من دراسة الشكل الظاهري لميكروبات التربة أثناء عدها.

ومن عيوب الطريقة الميكروسكوبية أنها لا تميز بين الميكروبات الحية والميتة وهذا يؤدي إلى إعطاء أعداد أكبر من الواقع، وفي بعض الأحيان يصعب التمييز بين البكتيريا وحببيبات التربة وبعض المواد العضوية الدقيقة. ومن عيوب هذه الطريقة أيضا عدم ظهور بعض أنواع الميكروبات عند إجراء الفحص المجهرى. وعندما تحتوى التربة على عدد قليل من الميكروبات فإن الطريقة الميكروسكوبية قد لا يكون لها أى قيمة .

خطوات العمل :

- ١- يؤخذ ١٠ جرام تربة زراعية وتوضع فى فرن الهواء الساخن على ١٠٥°م لمدة ٣ ساعات . ثم تحسب النسبة المئوية للرطوبة فى هذه العينة.
- ٢- يرسم مربع مساحته ٤ سم ٢ بواسطة قلم ماركر على شريحة زجاجية نظيفة.
- ٣- عدل نسبة الرطوبة فى كل وعاء إلى حوالى ٤٠-٥٠% .
- ٤- إحضر أنابيب وضع فى كل منها ٩ ملل من المحلول المثبت (٠.١% آجار أو ٠.١٥% جيلاتين فى ماء مقطر) ثم ضع بعد ذلك ١ جرام تربة للحصول على تخفيف ١-١٠ وأمزج جيدا ثم أترك الأنابيب لمدة ١-٢ دقيقة.
- ٥- أنقل كمية ٠.٠١ ملل (بواسطة ماصة مدرجة سعة ٠.١ ملل) من السائل الممزوج وضعه فى وسط أحد المربعات المرسومة على الشريحة ثم غفرد الكمية المنقولة على جميع مساحة المربع وأتركه يجف فى جو المعمل . ويكرر ما سبق على أنابيب تخفيف ١-١٠ من الثلاث أوعية الزجاجية الأخرى.
- ٦- جفف الغشاء ثم أغمس الشريحة فى حامض خليك ٤٠% لمدة ١-٣ دقائق وأغسل جيدا بالماء.

٧- ضع الشريحة على كأس به ماء يغلى ثم أضف إلى الشريحة صبغة كاربول إرثوسين أو روزبنجال وأتركها لمدة ٥-٦ دقائق (يراعى عدم جفاف الصبغة) ثم تغسل الشريحة بالماء وتجفف.

٨- تفحص الشريحة تحت الميكروسكوب باستخدام العدسة الزيتية ويقدر عدد الميكروبات الموجودة في عشرة حقول ميكروسكوبية في كل من الأربعة سنتيمترات.

٩- إحسب عدد الميكروبات في ١ جرام من العينة المستعملة . ويتم ذلك بإيجاد:

أ- قطر الحقل الميكروسكوبى:

يضبط الميكروسكوب باستخدام الشريحة الميكرومترية حتى يصل التدرج على طول قطر الحقل الميكروسكوبى من ١٤-١٦ وهذا معناه أن قطر الحل الميكروسكوبى ٠.١٤ - ٠.١٦ مم (١٤٠-١٦٠ ميكرون).

ب- مساحة الحقل الميكروسكوبى باستخدام المعادلة ط نق ٢

وبذلك تكون المساحة = ٣٠١٤ × ٨٠ × ٨٠ = ٢٠٠٩٦ ميكرون مربع .

ج- عدد المجالات أو الحقول الميكروسكوبية في ١ سم ٢ (المعامل الميكروسكوبى) =

عدد الحقول / مساحة الحقل الواحد

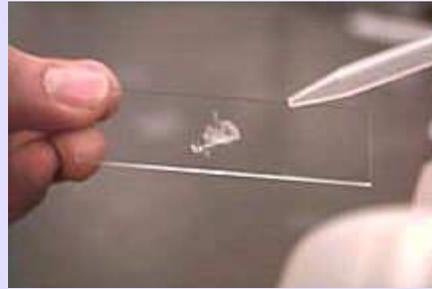
د- المتوسط الحسابى لعدد الميكروبات في الحقل الميكروسكوبى الواحد.

هـ- يضرب المعامل الميكروسكوبى × متوسط عدد الميكروبات في الحقل الواحد ×

١٠٠٠ فنحصل على عدد الميكروبات في جرام من العينة.

١٠- دون النتائج في جدول ثم إحسب عدد الميكروبات في ١ جرام تربة جافة.

خطوات الطريقة الميكروسكوبية المباشرة



ثانياً : طريقة التخفيف :

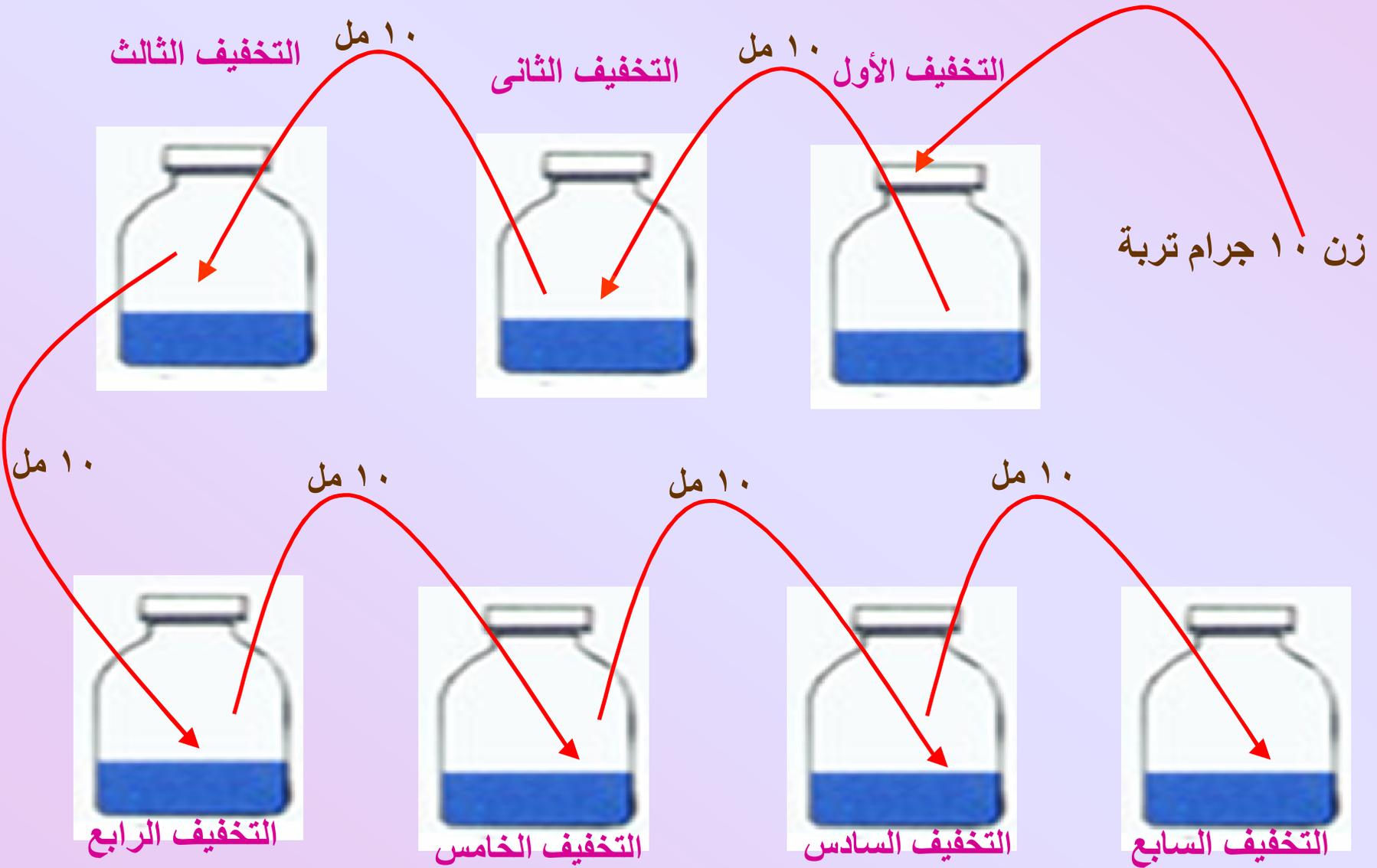
١ - إستخدام طريقة العد بالأطباق :

تعتبر طريقة العد بالأطباق من أكثر الطرق إستعمالاً لعد ميكروبات التربة، وتتميز هذه الطريقة بأنها تعطي فكرة صحيحة عن عدد الميكروبات الحية الموجودة في عينة التربة الزراعية، وقد وجد أن الطرق المزرعية تعطي أعداداً أقل من الواقع بكثير وذلك لأنه يصعب تحضير بيئة غذائية في المعمل تغطي كل الإحتياجات الغذائية اللازمة لجميع الأنواع الموجودة في عينة التربة وأيضاً درجة حرارة التحضين قد تكون غير مناسبة لنمو جميع أنواع الميكروبات الموجودة في عينة التربة الزراعية. وعلاوة على ذلك فإن طريقة العد بالأطباق تعتبر كل مستعمرة ميكروبية نامية على أطباق العد أنها ناتجة من نمو خلية ميكروبية واحدة ولكن في الواقع أن المستعمرة الميكروبية قد تنمو من خلية واحدة أو سلسلة أو كتلة من الخلايا حسب ظروف وجود الميكروبات في معلق التربة. ومن ناحية أخرى فإن بعض الميكروبات تفرز مضادات حيوية تؤثر على بعض الميكروبات وبالتالي تؤدي إلى عدم ظهورها.

خطوات العمل:

- ١- قدر النسبة المئوية للرطوبة في عينة التربة موضع الدراسة (حوالي ١٠ جرام تربة وتجفف على درجة ١٠٥°م لمدة ٣ ساعات).
- ٢- ضع ١٠ جرام من العينة في زجاجة عينات بها ٩٠ ملل ماء معقم أو محلول ملحي فسيولوجي معقم ثم رج الزجاجة جيدا لمدة ١٠ دقائق للحصول على تخفيف ١٠-١.
- ٣- خذ ١ سم^٣ من التخفيف ١٠-١ وذلك بواسطة ماصة معقمة وضعها في أنبوبة إختبار بها ٩ ملل ماء معقم أو المحلول المعقم ثم رج جيدا للحصول على تخفيف ١٠-٢ وهكذا تستمر في عملية التخفيف حتى نحصل على تخفيف ١٠-٨.
- ٤- إستخدم ماصة معقمة في نقل ١ سم^٣ من كل تخفيف بداية من التخفيف الأعلى إلى الأقل وضعة في طبق بتري معقم يعمل لكل تخفيف ٣ مكررات ويراعه كتابة التخفيف المستخدم على كل طبق.
- ٥- صب في كل طبق كمية مناسبة من البيئة الغذائية (بيئة آجار مستخلص التربة) المسالة والمبردة إلى ٥٠°م ثم حرك الأطباق حركة رجوية حتى تمتزج البيئة مع معلق تخفيف التربة، أترك الأطباق فترة حتى يتصلب الآجار ثم ضع الأطباق مقلوبة في الحضان على درجة حرارة مناسبة لمدة مناسبة.
- ٦- بعد إنتهاء فترة التحضين إنتخب التخفيف المناسب الذي يظهر عدد من المستعمرات يتراوح بين ٣٠-٣٠٠ مستعمرة بالطبق الواحد. إحسب متوسط عدد المستعمرات بالطبق الواحد.
- ٧- إحسب عدد الميكروبات في الجرام الواحد من التربة الرطبة وذلك بضرب متوسط عدد المستعمرات في الطبق في مقلوب التخفيف المستعمل به. ثم عدل النتائج المتحصل عليها على أساس الوزن الجاف بالتربة.

كيفية إجراء التخفيفات العشرية المتسلسلة



كيفية إجراء عملية التلقيح والعد بطريقة الأطباق

التخفيف السابع



١ مل



١ مل

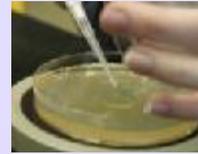


١ مل

التخفيف السادس



١ مل

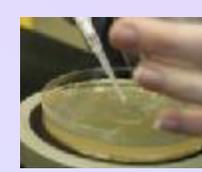


١ مل



١ مل

التخفيف الخامس



١ مل



١ مل



١ مل

- لاحظ استخدام ثلاثة تخفيفات لكل عينة واستخدام ثلاثة مكررات لكل تخفيف



أكتب رقم العينة ورقم التخفيف على كل طبق



ضع الأطباق مقلوبة في الحضان



إختلاف عدد المستعمرات في
الأطباق لإختلاف التخفيف

٢ - إستخدام طريقة العد الأكثر إحتمالاً (MPN) Most Probable Number:

تستخدم طريقة العد التقريبية فى عد بعض المجاميع الميكروبية الهامة وذلك بسبب عدم وجود بيئة خاصة تسمح بنمو تلك المجاميع عليها دون غيرها من الميكروبات، وكذلك لعدم إنتظام ظهور المستعمرات البكتيرية لتلك الميكروبات على الأطباق ومن أمثلة المجاميع الميكروبية التى يتم عدّها بهذه الطريقة ما يلى:

- البكتيريا اللاهوائية المثبتة لأزوت الهواء الجوى بطريقة حرة
- البكتيريا الهوائية واللاهوائية المحللة للسليولوز
- البكتيريا الهوائية المثبتة للأزوت الجوى بطريقة لا تكافلية
- البكتيريا الشحيحة الإحتياج للأكسجين المثبتة لأزوت الهواء الجوى بطريقة شبه تكافلية
- بكتيريا التآزت
- بكتيريا عكس التآزت
- البكتيريا المؤكسدة للكبريت
- البكتيريا المختزلة للكبريت

طريقة العمل:

- ١- خذ ١٠ جرام من تربة زراعية وضعها في فرن الهواء الساخن على ١٠٥°م لمدة ٣ ساعات وإحسب النسبة المئوية للرطوبة في هذه العينة.
- ٢- أعمل سلسلة التخفيفات كما سبق في طريقة العد بالأطباق .
- ٣- يختار خمس تخفيفات مناسبة من كل تخفيف يتم خمسة أنابيب تحتوى على البيئة المنتقاه السائلة – وذلك بمقدار ١ سم^٣ لكل أنبوبة مع مراعاة ترقيم الأنابيب .
- ٤- يتم تحضين الأنابيب الملقحة في الحضان على درجة الحرارة المناسبة وللمدة المناسبة للمجموعة الميكروبية موضع الدراسة.
- ٥- بعد إنتهاء فترة التحضين يتم تدوين النتائج من خلال الأنابيب التي أعطت نتيجة موجبة وذلك أمام كل تخفيف . ثم يؤخذ نتائج الثلاث تخفيفات الأخيرة التي تحتوى أنابيب موجبة.
- ٦- تستخرج الأعداد المحتملة للمجموعة الميكروبية موضع الدراسة في ١ جرام رطب من التربة ويتم ذلك من خلال جداول العد التقريبية حيث يختار من الجدول في عمود P1 العدد المقابل لعدد الأنابيب الموجبة من أنابيب أول تخفيف (الخمسة) ثم من عمود P2 يقرأ العدد المقابل للأنابيب التخفيف الأوسط الإيجابية ثم بعد ذلك تؤخذ قراءة M.P.N من قيم P3 في الجدول حسب عدد الأنابيب الإيجابية بالتخفيف الأخير ثم يقدر العدد بالجرام الواحد بالمعادلة الآتية:

العدد التقريبي بالجرام الواحد = M.P.N. (من الجدول) × مقلوب التخفيف الأوسط ثم تحسب بعد ذلك النتائج على أساس وزن الجرام الجاف.

التخفيف السابع



التخفيف السادس



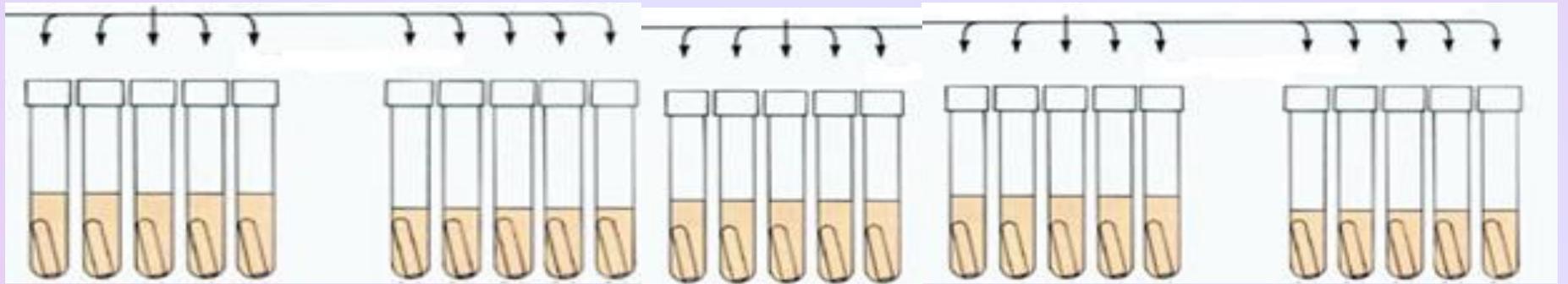
التخفيف الخامس



التخفيف الرابع



التخفيف الثالث



- لاحظ استخدام خمسة تخفيفات لكل عينة واستخدام خمس مكررات لكل تخفيف

المراجع :

[http://www.reproductionresources.com/cgi-bin/quikstore.cgi?category=Equine Breeding](http://www.reproductionresources.com/cgi-bin/quikstore.cgi?category=Equine_Breeding)

[www.alibaba.com/catalog/.../Disposable Products.html](http://www.alibaba.com/catalog/.../Disposable_Products.html)

<http://www.uvsc.edu/eath/photoGallery/envtMgmt/slide6.html>

[http://www.biology.clc.uc.edu/Fankhauser/Labs/Microbiology/Yeast Plate Count](http://www.biology.clc.uc.edu/Fankhauser/Labs/Microbiology/Yeast_Plate_Count)

[http://faculty.maryvillecollege.edu/Kneas/CHEM121L/lab equipment.htm](http://faculty.maryvillecollege.edu/Kneas/CHEM121L/lab_equipment.htm)

<http://www.apsnet.org/education/LabExercises/Microscopes/#comp1>

<http://www.microscopy-uk.net/index.html>

<http://www.microbelibrary.org/>

<http://www.micro.magnet.fsu.edu/primer/anatomy/introduction.html>

<http://www.denniskunkel.com/index.php?cPath=3>