

الدرس العملى الحادى والعشرون

ميكروبيولوجيا الأراضى Soil Microbiology



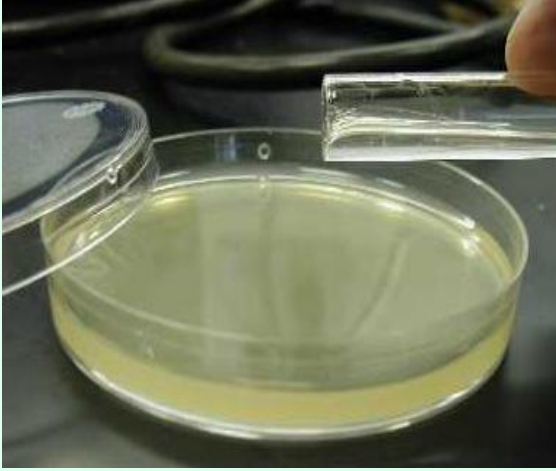
أولاً : التعرف على الأشكال المورفولوجية لميكروبات التربة

دراسة وصفية لميكروبات التربة بطريقة الشريحة المظمورة (طريقة روسي وكلودني)

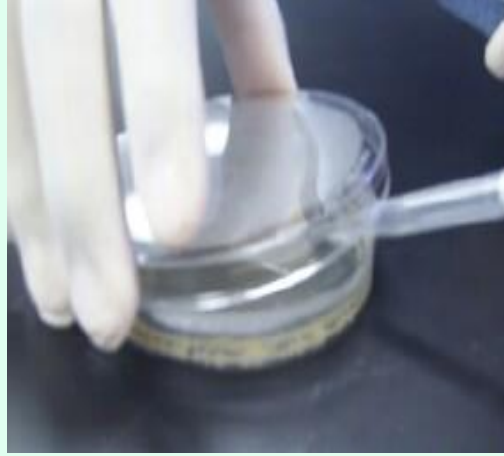
- ١- ضع حوالي ١٠٠ جرام من التربة في وعاء زجاجي وكرر ذلك في ثلاثة اوعية أخرى.
- ٢- إخلط التربة جيدا في الوعاء الأول مع نصف جرام نشا وفي الوعاء الثاني مع نصف جرام ردة والثالث مع نصف جرام بيتون وفي الوعاء الرابع مع نصف جرام مسحوق نباتي جاف ثم عدل الرطوبة في كل وعاء إلى ٤٠-٥٠٪.
- ٣- ضع في كل وعاء من ٢-٣ شرائح زجاجية نظيفة واضغط التربة حولها ثم غطي الأوعية بغطاء ليمنع البخر وضعها في الحضان على درجة حرارة ٢٢-٢٥°م أو على درجة حرارة المعمل لمدة حوالي إسبوع.

- ٤- بعد فترة التحضين أخرج الشرائح بملقط ثم نظفها مما يكون قد علق بها من التربة وذلك بإمرار تيار خفيف من الماء عليها ثم جففها هوائياً وبعد ذلك ثبت الغشاء بإمراره على لهب ضعيف.
- ٥- أصبغ الغشاء بصبغة الإيرثروسين وذلك بوضع الصبغة على الشريحة لمدة ٥-٦ دقائق مع وضع الشريحة على كأس به ماء يغلي (حمام مائى) ولا تجعل الصبغة تجف خلال هذه المدة.
- ٦- اغسل الشريحة جيداً بعد ذلك ثم جففها وإفحص الغشاء ميكروسكوبياً باستخدام العدسة الزيتية المنغمسة.
- ٧- صف الميكروبات التى فحصتها وإرسمها وقارن بين أشكالها ومدى سيادة أى منها فى الأوعية الأربعة.

عد ميكروبات التربة بطريقة الأطباق



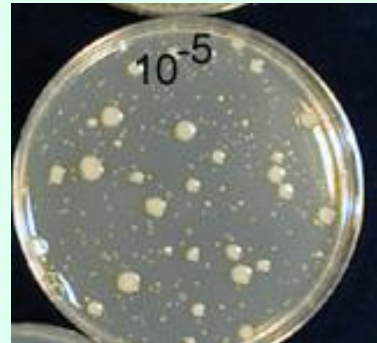
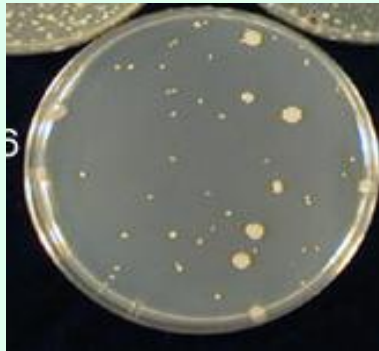
صب في كل طبق بتري من الأطباق
السابقة أنبوبة من بيئة أجار
مستخلص التربة



خذ بماصة معقمة مبتدئاً بالتخفيفات
العالية ١ سم^٣ من كل تخفيف وضعه في
طبق بتري معقم وذلك تحت شروط التعقيم



قم بعمل سلسلة من التخفيفات العشرية



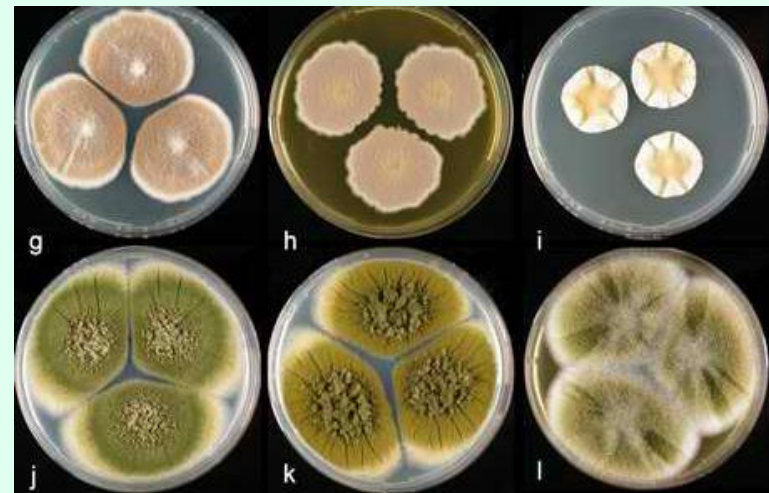
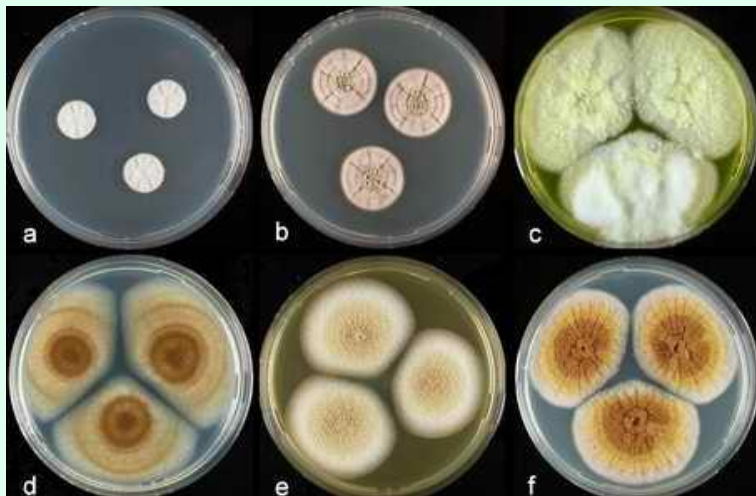
- إحص الأتباق فحصاً جيداً مستبعداً الأتباق التي تحتوي علي أعداد أقل من ٣٠ مستعمرة وتلك التي تزيد عن ٣٠٠ مستعمرة

عد وعزل فطريات التربة بطريقة الأطباق بإستعمال بيئة مارتن:

- ١- قدر الرطوبة فى العينة حتى يتسنى حساب النتائج على أساس الوزن الجاف
- ٢- إعمل تخفيفات التربة بالطريقة المعتادة.
- ٣- إختتر التخفيفات المناسبة ولقح ٣ أطباق بترى من كل تخفيف وذلك بمعدل ١ سم ٣ لكل طبق.
- ٤- سيح البيئة على حمام مائى ثم برد إلى ٥٠°م وأضف إليها الأستربتوميسين سلفات ، ثم صبها فى الأطباق الملقحة بالكميات المناسبة مع تحريك الأطباق حركة رحوية لمزج البيئة مع معلق تخفيف التربة ، ثم أترك الأطباق لفترة مناسبة حتى يتجمد الأجار.

٥- حضن الأطباق مقلوبة على درجة الحرارة المناسبة (٢٥°م) لمدة ٧ أيام، وبعد التحضين قدر عدد المستعمرات النامية على الأطباق ومنها قدر العدد الكلي للفطريات لكل جرام تربة محسوبة على أساس الوزن الجاف.

٦- يمكن عزل بعض هذه المجاميع وفحصها ميكروسكوبياً بإستعمال محلول اللاكتوفينول ووضع غطاء الشريحة عليها ويتم الفحص بإستعمال العدسة الصغرى ثم الكبرى.



طريقة العد التقريبية Most Propable Number Method

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

- البكتيريا اللاهوائية المثبتة لأزوت الهواء الجوى بطريقة حرة
- البكتيريا الهوائية واللاهوائية المحللة للسليولوز
- البكتيريا الهوائية المثبتة للأزوت الجوى بطريقة لا تكافلية
- بكتيريا التآزت

رسم تخطيطي يوضح تقدير أعداد البكتيريا بطريقة العدد الأكثر احتمالاً

التخفيف السابع



التخفيف السادس



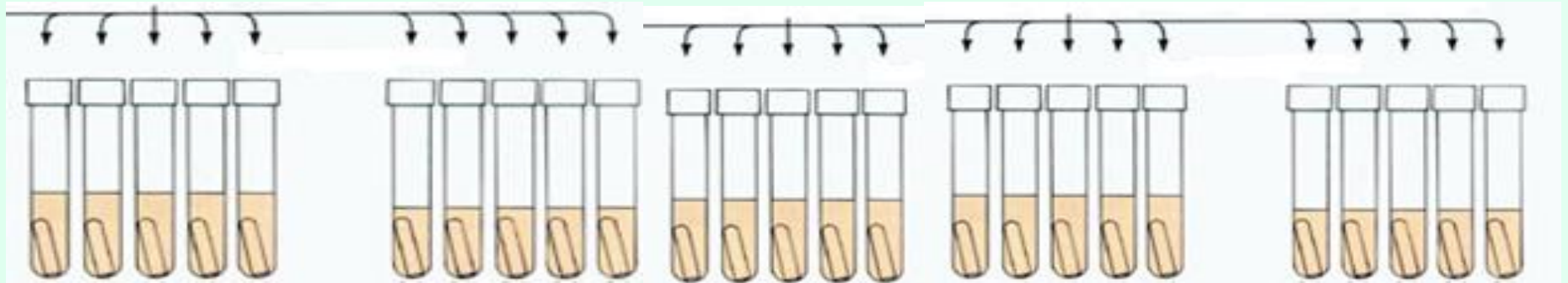
التخفيف الخامس



التخفيف الرابع



التخفيف الثالث



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

عزل بكتيريا العقد الجذرية (*Rhizobium spp.*) من جذور البقوليات

- ١ - إ فصل عقدة كبيرة الحجم بواسطة مشرط أو مقص وإقطعها مع جزء صغير من الجذر (بدون إحداث أى جرح لها منعاً من دخول المطهرات التي تقضي على البكتيريا) ثم اغسلها جيداً بالماء لإزالة ما يعلق بها من حبيبات الطين.
- ٢ - ضع العقدة في محلول السليمانى من ٣-٦ دقائق مع التحريك ثم إنقلها بواسطة ملقط معقم إلى الكحول ٩٥٪ لمدة ٣-٥ دقائق ثم إنقلها إلى الطبق المحتوى على ١٥ سم^٣ من الماء المعقم مع تقليبها للتخلص من بقايا السليمانى والكحول.
- ٣ - إنقل العقدة بعد ذلك إلى الطبق المحتوى على ١ سم^٣ ماء معقم ثم إهرسها جيداً وفتتها في الماء لتكون معلق بكتيري وذلك بالإستعانة بالملقط المعقم أو بطرف الساق الزجاجية المعقمة.
- ٤ - سيح أنابيب أجار المانيتول ومستخلص الخميرة ثم إتركها لتبرد عند ٤٥^٠م ثم صبها في الأطباق المعقمة تحت شروط التعقيم واترك البيئة حتى تتصلب في الأطباق.

٥- خذ جزء من المعلق البكتيري العكر الناتج من تفتيت العقدة على طرف إبرة التلقيح المعقمة وخطط بها على سطح الأجار المتجمد (طريقة الأطباق المخطوطة) وبنفس الإبرة وبدون غمسها لقع الطبق الثاني والثالث وهكذا. (يمكن استخدام طريقة الأطباق المصبوبة في عزل الميكروب بدلاً من طريقة الأطباق المخطوطة).

٦- ضع الأطباق الملقحة مقلوبة في الحضان على درجة الحرارة المناسبة (٢٦-٢٨°م) لمدة أسبوع ثم إفحص المستعمرات الناتجة بعد التحضين وتعرف على خصائصها وإعزلها بحالة نقية على البيئة المائية بعد عمل غشاء منها وصبغه بطريقة جرام ثم فحصه ميكروسكوبياً للتعرف على خصائص الميكروب.

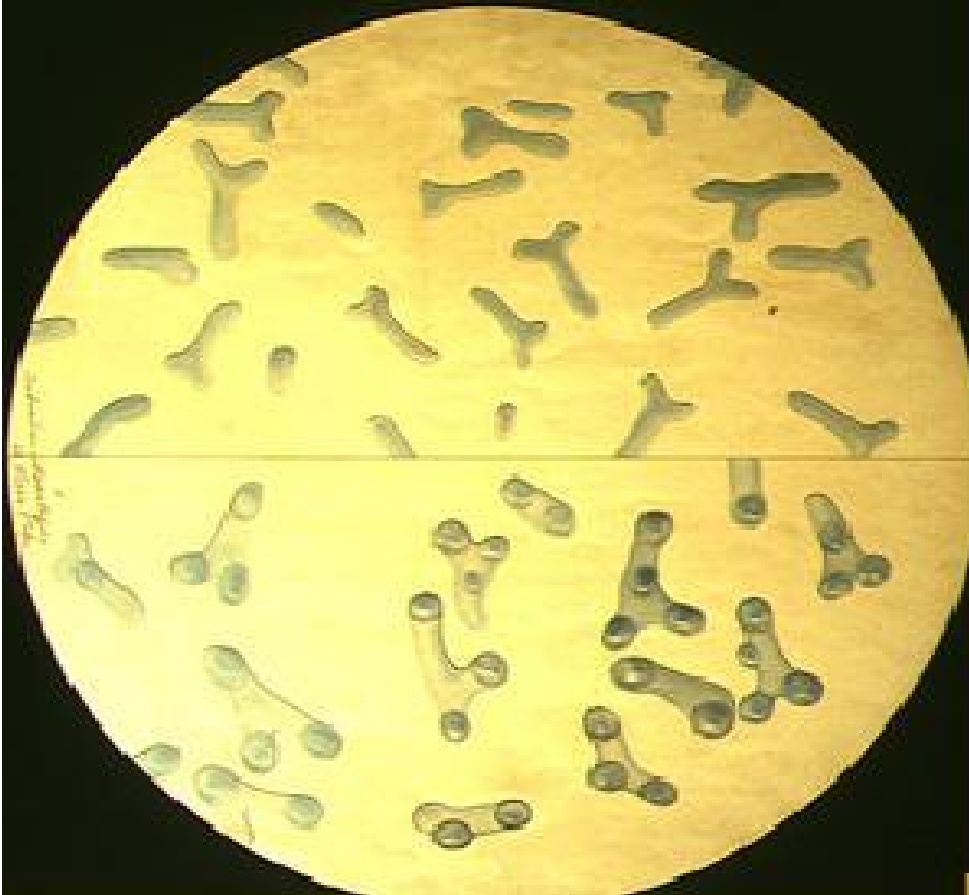


جذر نبات بقولى يبين

العقد الجذرية

الإسم العلمي : Rhizopus sp.

- شكل الميكروب : يشبه حروف اللغة اللاتينية (X,Y,L,T,V)
- نظام التجمع : مفرد
- نوع الصبغ : بسيط
- اسم الصبغة المستخدمة : الفوكسين
- لون خلايا الميكروب : أحمر



يمكنك زيارة المواقع التالية على الشبكة الدولية للإتصالات

- http://www.cbs.knaw.nl/cbs_home/cbs_home.html
<http://www.cbs.knaw.nl/publications/Aspergillus.htm~main>
- http://www.wou.edu/las/natsci_math/biology/boomer/Bio331/microlab/projects/websitesspring2002/nitroweb02/AzotobacterPage.html