الدرس العملى السادس

تقدير أعداد بعض الميكروبات الهامة فى التربة بطريقة العدد الأكثر إحتمالاً

(MPN) Most Probable Number

١ - تقدير أعداد الأزوتوباكتر فى التربة وعزلها فى صورة مزارع نقية باستخدام بيئة المانيتول والسكروز (أشبى ١٩٦٨)

تنتشر أفراد الأزوتوباكتر بكثرة فى الأراضى المصرية وتلعب دورا هاما فى خصوبة التربة حيث تعتبر من أهم البكتيريات الهوائية المثبتة لنتروجين الهواء الجوى بطريقة لاتكافلية . ويتحكم فى درجة إنتشارها فى الأراضى مجموعة من العوامل أهمها حموضة التربة ومدى إحتوائها على المادة العضوية التى تعتبر مصدرا للطاقة لهذه الميكروبات حيث أنها من الميكروبات غير ذاتية التغذية

وإحتواء التربة على أعداد كبيرة من هذه الميكروبات يعتبر دليلا على خصوبتها ، وقد نجح الكثيرون فى تقدير أعداد هذه الميكروبات فى التربة كما تمكنوا من عزلها فى صورة مزارع نقية والتدريب التالى يوضح ذلك .

الأدوات والمواد المطلوبة:

١- عينة التربة الخصبة.
٢- ماصات معقمة.
٣- أنابيب إختبار نظيفة.
٤- أطباق بترى معقمة.
٥- زجاجات العينات التى تحتوى كل منها على ٩٠ ملل ماء حنفية معقم أو محلول ملح فسيولوجى معقم .
٦- بيئة المانيتول والسكروز المعقمة والخالية من النيتروجين والتى تتركب من
مانيتول ١٠ جرام ، سكروز ١٠ جرام ، فوسفات بوتاسيوم ثنائية القاعدية ٥ جرام ، كلوريد صوديوم ٠.٢ جرام ، كربونات كالسيوم ٥ جرام ، كبريتات ماغنسيوم مائية ٠.٢ جرام ، كبريتات كالسيوم ٠.١ جرام ، آثار من كلوريد الحديديك وكبريتات المنجنيز وحمض الموليبديك ، ماء مقطر ١٠٠٠ سم٣ ، درجة الـ PH ٧ .
٧- أنابيب تحتوى على نفس البيئة مضافا إليها الآجار بمعدل ٢٠ جرام /لتر (بيئة أشبى المعدلة بواسطة عبد الملك وإسحاق ١٩٦٨)

خطوات العمل:

١- تقدر الرطوبة فى عينة التربة حتى يمكن حساب النتائج على أساس الوزن الجاف تماما .

٢- يتم عمل سلسلة التخفيفات العشرية بنفس الطريقة المعتادة .

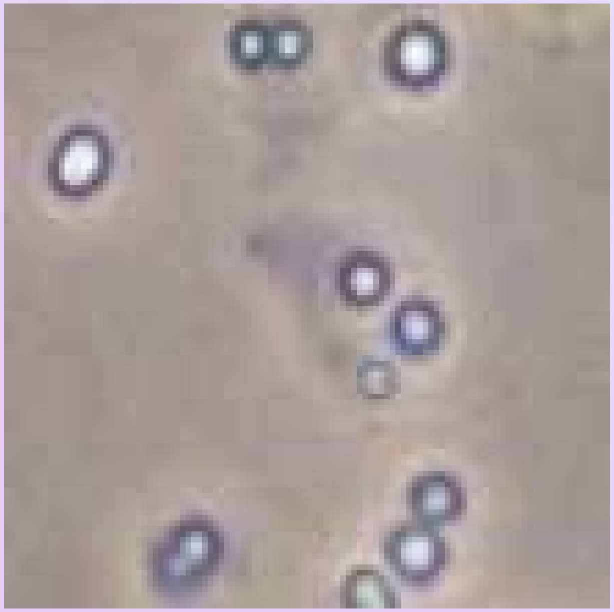
٣- تحضر البيئة بالمكونات السابقة وتوزع فى الأنابيب بمعدل ٧سم٣ لكل أنبوبة ثم تسد الأنابيب بسدادات من القطن الغير ماص وتعقم فى الأوتوكلاف على درجة حرارة ١٢١°م لمدة ١٥ دقيقة .

٤- يتم إختيار خمسة من التخفيفات المناسبة ويتم تلقيح خمس أنابيب من كل تخفيف (خمس تخفيفات × خمس مكررات) وذلك بنقل ١ ملل من اللقاح إلى كل أنبوبة بواسطة ماصة معقمة .

٥- تحضن الأنابيب الملقحة على درجة ٢٥-٢٨ °م لمدة إسبوعين ثم نفحص للتعرف على وجود خلايا الأزوتوباكتر وذلك بظهور الغشاء المميز وكذلك بالفحص الميكروسكوبى بعد عمل غشاء وصبغه بصبغه جرام للتأكد من وجود خلايا الأزوتوباكتر البيضاوية المفردة أو المتجمعة فى أزواج والسالبة لجرام والتى يحاط كل زوج منها بطبقة هلامية يطلق عليها الغلاف أو الكبسول (العلبة) وتعتبر الأنابيب موجبة إذا أعطت النتائج السابقة .

٦- تحسب النتائج بطريقة العدد الأكثر إحتمالا السابق الإشارة إليها باستخدام جداول العد التقريبية ثم تنسب لجرام وزن جاف تماما من عينة التربة .

٧- يمكن عزل الأزوتوباكتر بطريقة الأطباق المصبوبة أو المخطوطة على البيئة الصلبة باستخدام أنابيب العد التى أعطت نتيجة إيجابية ثم تحضن الأطباق على درجة حرارة ٢٥-٢٨°م حتى تظهر المستعمرات والتى ميكروسكوبيا حيث تتميز بقوامها المخاطى وإذا شوهدت إحداها نقية ينقل جزء منها إلى أنابيب البيئة الصلبة المائلة وتحضن على نفس الدرجة مع التأكد من نقاوتها بإعادة فحصها ميكروسكوبيا.



نمو الأزوتوباكتر على البيئات السائلة والصلبة وشكله تحت الميكروسكوب

٢ - عد وعزل البكتيريا اللاهوائية غير ذاتية التغذية المثبتة لآزوت الهواء الحوى بطريقة حرة والتابعة لجنس Clostridium باستخدام بيئة السكروز ومستخلص الخميرة (بيئة وينوجرادسكى المعدلة)

قد تتفوق أعداد الكلوستريديم في التربة عن أعداد الازوتوباكتر مما يعطي له فرصة في عملية تثبيت النيتروجين وإن كان معل معدل تثبيته في المزارع النقية أقل من الازوتوباكتر ومن ناحية أخري فقد وجد أن الكلوستريديم يستطيع تحمل الحموضة أكثر من الازوتوباكتر وإن كانت درجه التعادل هي المفضلة له أيضا . وقد امكن عزل هذه الميكروبات في صوره مزارع نقية وتنميتها تحت الظروف اللاهوائية وقد تم ذلك كما يلي:

الأدوات والمواد المطلوبة :

١- عينه من التربة الخصبة .

٢- ماصات معقمه سعه ١٠ ملل ،١ ملل .

٣- زجاجات العينات والتي تحتوي كل منها علي ٩٠ ملل ماء حنفية معقم أو محلول ملحي فسيولوجي معقم .

٤- فاسبار معقم أو آجار مائي معقم .

٥- أطباق بتري معقمه.

٦- بيئة السكروز ومستخلص الخميرة (بيئة وينوجرادسكي المعدلة) وهي أيضا خاليه من أي مصدر للنيتروجين وتتركب من

سكروز ٢٠ جرام ، مستخلص خميرة (١٠%) ١.٠سم٣ ، فوسفات بوتاسيوم ثنائية القاعدية ١ جرام ،كبريتات منجنيز ٠.٢ جرام ، كربونات كالسيوم ٢ جرام ، ثيوجيليكولات الصوديوم ١جرام ، كبريتات ماغنسييوم مائية ٠.٢ جرام ، كبريتات حديدوز ٠.٠٢ جرام ،آجارآجار ١ جرام ،كلوربد صوديوم ٠.٢ جرام، موليبدات أمونيوم ٠.٠٠١ جرام ،ماء مقطر ١٠٠٠سم٣ .

٧- أنابيب تحتوي علي نفس البيئة ولكنها مصلبة باضافة الآجار بمعدل ٢٠ جرام / لتر .

خطوات العمل :

١- تقدر الرطوبة في عينة التربة لامكانية حساب النتائج علي اساس الوزن الجاف .

٢- تجهز سلسله التخفيفات العشريه بالطريقة المعتادة وتختار خمسه من التخفيفات المناسبة حسب نوع التربه ويتم بسترتها بوضعها في حمام مائي علي درجه ٨٠°م لمده ١٥ دقيقه للتخلص من الميكروبات الغير متجرثمة .

٣- تجهز البيئة وتوزع في الانابيب بعد وضع مسمار حديد لامع غير صدئي في كل أنبوبة ثم تسد الانابيب بسدادات من القطن الغير ماص وتعقم في الاوتوكلاف علي درجه°م ١٢١ لمده ١٥ دقيقه.

٤- يتم تلقيح ٥ أنابيب من كل تخفيف من التخفيفات التي تم اختيارها ثم يتم حجز جو البيئة عن الهواء الخارجي وذلك بتغطية سطح البيئة بطبقة من الفاسبار المعقم (فازلين + شمع البرافين بنسبة ١:١) على ان يبرد السائل الي ٥٠ درجة مئوية ويعاد سد الأنابيب بالسدادات القطنية (يمكن إستعمل الأجار المائى بدلا من الفسبار)

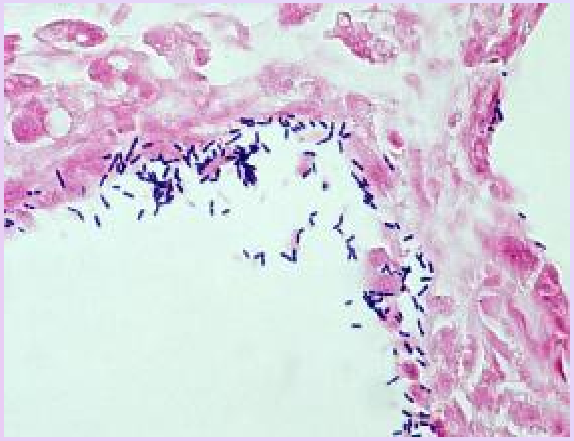
٥- تحض الأنابيب على ٢٥ – ٢٨ م لمدة أسبوعين فى الحضان

٦- بعد فترة التحضين يتم الكشف عن الأنابيب الموجبة والتى يستدل عليها بتكوين غاز يدفع طبقة الفاسبار إلى أعلى مع تكوين حامض فى البيئة ثم بالفحص الميكروسكوبى يتم التأكد من تواجد البكتيريا أو جراثيمها

طبق بترى وأنبوبة إختبار

تحتوى على ميكروب

Clostridium



شكل ميكروب

Clostridium

تحت الميكروسكوب

٣ - تقدير أعداد الأزوسبيريللم فى التربة وعزله فى صورة مزارع نقية باستخدام بيئة المالات النصف صلبة (بيئة دوبرينر ١٩٧٨)

ميكروب الآزوسبيريللم عصوى قصير مفرد سالب لصبغة جرام غير متجرثم متحرك بخصلة من الفلاجلات الطرفية غنى بمادة الـ **PHB** المخزنة وهو ميكروب هوائى وإن كان يثبت النيتروجين تحت ظروف كمية شحيحة من الأكسجين . وهذا الميكروب يثبت النيتروجين بطريقة حرة كالازوتوباكتر أو قد يقوم بالتثبيت وهو فى حالة تعاون مع جذور بعض النباتات النجيلية مثل الذرة حيث تم عزله من الصفيحة الوسطى لخلايا جذور هذه النباتات ولذلك يطلق عليه مثبت للنيتروجين شبه تكافلى ولتقدير أعداد هذا الميكروب فى ريزوسفير النجيليات وعزله فى صورة مزارع نقية يتبع ما يلى:

الأدوات المطلوبة :

١ـ أنابيب إختبار.
٢ـ أطباق بترى معقمة.
٣ـ ماصات سعه ١ مل ، ١٠ مل معقمة.
٣ـ زجاجات العينات التى تحتوى كل منها على ٩٠ مل ماء حنفية معقم .
٤ـ عينة التربة الخصبة.
٥ـ بيئة المالات نصف الصلبة الخالية من النيتروجين (دوبرينر ١٩٧٨) والتى تتركب من :

حمض الماليك (مالات الصوديوم) ٥ جرام، فوسفات بوتاسيوم أحادية القاعدية ٠.٥ جرام ، كبريتات ماغنسيوم مائية ٠.٢ جرام ، كلوريد صوديوم ٠.١ جرام ، كلوريد كالسيوم ٠.٠٢ جرام، كبريتات حديدوز مائية ٠.٥ جرام، موزلييدات صوديوم ٠.٠٠٢ جرام ، كبريتات منجنيز مائية ٠.١ جرام ، هيدروكسيد بوتاسيوم ٤ جرام ،آجار ١.٧٥ جرام ، ماء مقطر ١٠٠٠ مل ، ويضاف ٢ مل من محلول كحولى ٥% من دليل البروموثيمول بلو، درجة الـ PH ٦.٨.

طريقة العمل :

١- يتم تقدير الرطوبة فى عينة التربة موضع الإختبار حتى يتسنى حساب النتائج على اساس الوزن الجاف.

٢- تحضر سلسلة التخفيفات العشرية بالطريقة المعتادة.

٣- توزع البيئة فى أنابيب بمعدل ٧ سم٣ فى كل أنبوبة وتعقم فى جهاز الأوتوكلاف على درجة ١٢١°م لمدة ١٥-٢٠ دقيقة.

٤- تختار خمس من التخفيفات المناسبة حسب نوع عينة التربة موضع الإختبار ويستخدم كل تخفيف فى تلقيح خمس من الأنابيب المحتوية على البيئة (٥ تخفيفات × ٥ أنابيب) ثم تحضن الأنابيب فى الحضان على درجة حرارة ٣٠°م لمدة ٧ أيام.

٥- بعد فترة التحضين تختبر الأنابيب الموجبة لوجود خلايا الازوسبيريللم وذلك بملاحظة القشرة البيضاء تحت سطح البيئة وتسجل النتائج التى تم التوصل اليها.

٦- تستخدم جداول العد التقريبية (كوكران ١٩٥٠) لتقدير أعداد الخلايا منسوبة لكل ١ جرام تربة جافة تماما.

٧- لعزل هذه البكتريا فى صورة مزارع نقية يأخذ جزء من النمو الميكروبى من الأنابيب التى أعطت نتيجة موجبة فى إختبار العد ويعاد زرعها عدة مرات على نفس البيئة النصف صلبة ثم تزرع للتخطيط فى أطباق تحتوى على نفس البيئة ولكن بعد تصليبها لنحصل على مستعمرات منفصلة على سطح الآجار والتى يأخذ جزء منها وتنميته على بيئة نصف صلبة مائلة نحصل على مزارع نقية تخضع لإخبارات التعريف حتى نحصل فى النهاية على مزراع نقية معرفة.

٤ - تقدير أعداد الطحالب الخضراء المزرقة المثبتة للنيتروجين فى التربة باستخدام بيئة وتاناب المعدلة

تنتشر الطحالب فى الطبقة السطحية من التربة حيث يتوفر ضوء الشمس لتستطيع القيام بعملية التمثيل الضوئى خاصة فى وجود رطوبة عالية ، وعموما تحتوى التربة على المجاميع الآتية من الطحالب :

الطحالب الخضراء – الطحالب الخضراء المزرقة - الدياتومات - الطحالب الذهبية .

تعتبر الطحالب الخضراء المزرقة من أهم هذه المجموعات ويرجع ذلك لقدرتها على تثبيت نيتروجين الهواء الجوى فى التربة بجانب قيامها بعملية التمثيل الضوئى مما يساهم فى زيادة خصوبة التربة خاصة فى الأراضى الغدقة مثل الأراضى المزروعة بالأرز.

ونظرا لأهمية هذه المجموعة من الطحالب فقد أمكن تقدير أعدادها فى التربة كدليل لمدى أهميتها كما أمكن عزلها لإستخدامها فى تحضير لقاحات تستخدم فى تلقيح أراضى الأرز لزيادة محتواها من النيتروجين الذى يستفيد منه النبات . والتدريب التالى يوضح طريقة أعداد هذه الطحالب فى التربة وكيفية عزلها .

الأدوات والمواد اللازمة:

١- دوارق سعه ٢٥٠ مل.

٢- عينة من الطبقة السطحية من تربة غدقة أو مياه من حقل مزروع بالأرز تحتوى على هذه الطحالب.

٣- زجاجات التى تحتوى كل منها على ٩٠ مل ماء حنفية معقم أو محلول ملح فسيولوجى معقم .

٤- أطباق بترى معقمة.

٥- ماصات معقمة سعه ١٠ مل، ١ مل.

٦- بيئة وتاناب المعدلة وتتركب من الآتى

فوسفات ثنائى البوتاسيوم ٠.٣ جرام ، كبريتات ماغنسيوم مائية ٠.٢ جرام، كبريتات بوتاسيوم ٠.٢ جرام ، كربونات كالسيوم ٠.١ جرام، جلوكوز ٢ جرام ، كلوريد حديديك (١٣% محضر طازج) ٠.٢ مل، مجموعة الأملاح الصغرى ١ مل ، ماء مقطر ١٠٠٠ مل ، درجة PH ٧.٥

٧- أنابيب تحتوى على نفس البيئة السابقة معقمة بعد إضافة الآجار بمعدل ٢٠ جرام /لتر .

طريقة العمل:

١- تقدر نسبة الرطوبة فى حالة إستخدام عينة التربة حتى يتسنى حساب الأعداد على أساس الوزن الجاف تماما .

٢- تعمل سلسلة التخفيفات بالطريقة المعتادة ويختار منها خمسة تخفيفات مناسبة.

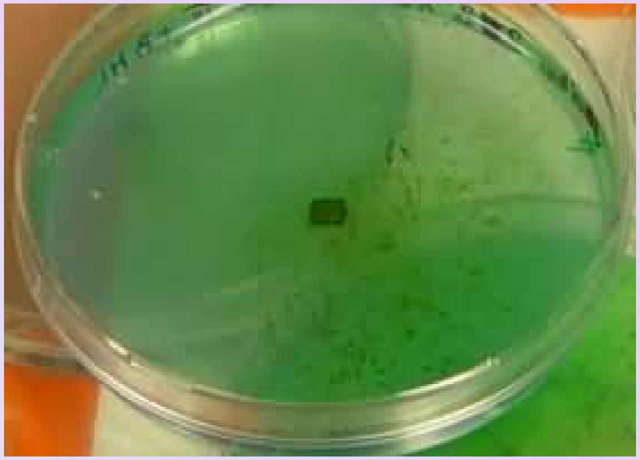
٣- تحضر البيئة السابقة وتوزع فى الدوارق بمعدل ١٠٠ سم٣ /دورق ثم تعقم فى الأوتوكلاف .

٤- يتم تلقيح ٥ دوارق من كل تخفيف تحت شروط التعقيم ثم تحضن بتركها بجوار النافذة معرضة لضوء الشمس لمدة ٣-٤ أسابيع (يمكن إستخدام وحدة للإضاءة مضبوطة درجة الحرارة بدلا من التعرض لضوء الشمس)

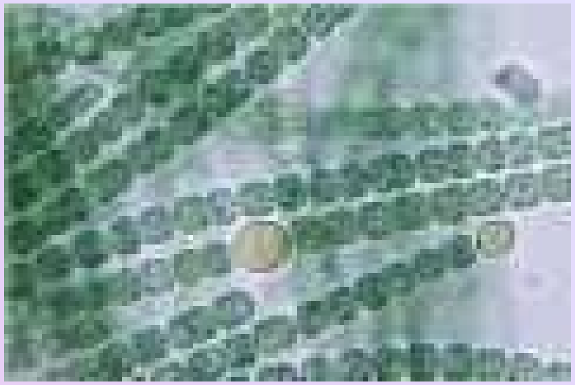
٥- تسجل الدوارق الموجبة والتى يلاحظ فيها نمو الطحالب الخضراء المزرقة مع ظهور فقاقيع من غاز الأكسجين فى الدورق.

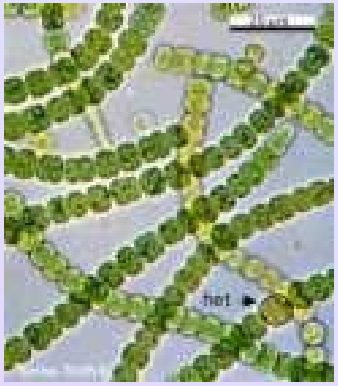
٦- تستخرج أعداد الطحالب الخضراء المزرقة لكل جرام تربة أو لكل واحد مل من عينة المياه وذلك باستخدام جداول العد التقريبى ثم ينسب العدد لجرام وزن جاف فى حالة استخدام غينة التربة.

٧- يمكن عزل الطحالب النامية فى الدوارق بحالة نقية باستخدام نفس البيئة بعد تصليبها بالاجار وصبها فى الأطباق ويتم العزل بطريقة التخطيط على هذه الأطباق تحت نفس ظروف التنمية السابقة.



نمو الطحالب الخضراء المزرقة فى أطباق بترى وعلى البيئات الصلبة فى دوارق مخروطية





شكل بعض الطحالب الخضراء المزرقة تحت الميكروسكوب

Anabaena

Nostoc

Spirulina

٥ - عد وعزل البكتيريا المحللة للسليلوز فى التربة

يمثل السليلوز نسبة عالية من مكونات المخلفات النباتية فى التربة وتحليله فى التربة يعتبر من العمليات الميكروبيولوجية الهامة التى تساعد على التخلص من هذه المخلفات وتحويلها الى عناصرها الأساسية التى يستنفيد منها النبات بامتصاصها والتغذية عليها . وتستطيع الكثير من البكتيريا تحليل السليلوز تحت كل الظروف سواء هوائية أو اللاهوائية وقد تمكن العلماء من تقدير اعداد البكتيريا المحللة للسليلوز سواء الهوائية أو اللاهوائية كما أمكنهم الحصول على مزارع نقية من هذه البكتيريات وفيما يلى الطرق المتبعة لتقدير اعداد هذه الميكروبات وطرق عزلها.

أ- تقدير أعداد البكتيريا الهوائية المحللة للسليلوز وطريقة عزلها فى مزارع نقية باستخدام بيئة دوبس

الأدوات والمواد المطلوبة:

١- أنابيب إختبار نظيفة

٢- أطباق بترى معقمة.

٣- ماصات معقمة سعة ١٠ مل ، ١ مل.

٤- زجاجات التخفيفات والتى تحتوى كل منها على ٩٠ مل ماء حنفية معقم أو محلول ملح فسيولوجى معقم.

٥- ورق ترشيح كمصدر للسليلوز.

٦- عينة تربة خصبة.

٧- بيئة دوبس وتتركب من
نترات صوديوم ٠.٥ جرام، كبريتات ماغنسيوم مائية ٠.٥ جرام، آثار من كبريتات الحديديك ، فوسفات بوتاسيوم ثنائية القاعدية ١ جرام ، كلوريد بوتاسيوم ٠.٥ جرام، ماء مقطر ١ لتر ، درجة الـ PH ٧.٥ .
٨- أنابيب تحتوى على بيئة آجار السليلوز والدكسترين المعقمة.

طريقة العمل:

١- تقدر الرطوبة لحساب الأعداد منسوبة الى الوزن الجاف تماما من التربة.
٢- تعمل سلسلة التخفيفات العشرية بالطريقة المعتادة ويتم اختيار خمسة من التخفيفات المناسبة.

٣- تحضر البيئة ثم توزع فى الأنابيب بمعدل ٥ سم٣ فى كل انبوبة مع وضع شريط من ورق الترشيح كمصدر للسليلوز فى كل أنبوبة بحيث يكون جزء منه مغمور فى البيئة وجزء فوق سطحها ثم تسد الأنابيب بسدادات من القطن الغير ماص وتعقم فى الاوتوكلاف.

٤- يتم تلقيح خمس أنابيب من كل تخفيف بإضافة ١ مل لكل انبوبة ثن ترقم الأنابيب.

٥- تحضن الأنابيب على درجة الحرارة المناسبة (٢٨-٣٠°م) لمدة ٢-٣ أسابيع.

٦- تسجل الأنابيب التى تعطى نتيجة ايجابية بعد فترة التحضين والتى يستدل عليها بظهور بقع صفراء او بنية او مسودة خاصة فى موضع ملامستها لسطح البيئة مع ظهور تآكل فى ورقة الترشيح وتفتتها عند رج الأنبوبة رجا خفيفا.

٧- تحسب النتائج باستخدام جداول العد التقريبية ثم تعدل على اساس الوزن الجاف لتربة.

٨- يمكن عزل البكتيريا المحللة للسليلوز من الأنابيب التى أعطت نتيجة موجبة وذلك بنزع جزء من ورقة الترشيح التى عليها البقع وتفتتها فى قليل من الماء المعقم الموجود فى طبق بترى ثم يأخذ جزء من المعلق ويعمل منه غشاء ويصبغ بصبغة الفوكسين القاعدى للتعرف على الميكروبات والتى يمكن عزلها فى صورة مزارع نقية من المحلول بطريقة الأطباق المخطوطة .

ب- تقدير أعداد البكتيريا اللاهوائية المحللة للسليلوز باستخدام بيئة أمليانسكى

الأدوات المطلوبة:

١- أنابيب إختبار نظيفة.
٢- أطباق بترى معقمة.
٣- ماصات معقمة سعة ١٠ مل ، ١ مل.
٤- عينة التربة الخصبة أو عينة من سماد الإسطبل.
٥- فاسبار معقم أو آجار مائى معقم .
٦- بيئة أمليانسكى وتتركب من :
كبريتات الأمونيوم أو فوسفات الأمونيوم ١ جرام ، فوسفات بوتاسيوم ثنائى القاعدية ١ جرام ، كبريتات ماغنسيوم ٠.٥ جرام، كبريتات كالسيوم ٢ جرام، آثار من كلوريد الصوديوم، ماء مقطر ١٠٠٠ سم٣ . ويمكن إستبدال أملاح الأمونيوم كمصدر معدنى للنيتروجين بمصدر عضوى مثل الأسبارجين أو الببتون بمعدل ٥ جرام/ لتر.
٧- أنابيب تحتوى على بيئة آجار السليلوز والدكسترين المعقمة.

طريقة العمل:

١- تقدر الرطوبة ليتسنى حساب الأعداد على أساس الوزن الجاف للتربة.

٢- تعمل سلسلة التخفيفات بالطريقة المعتادة ويختار منها ٥ تخفيفات مناسبة حسب نوع العينة موضع الإختيار.

٣- تجهز البيئة وتوزع فى الأنابيب بمعدل ٥ سم٣ لكل أنبوبة مع وضع قطعة من ورق الترشيح فى كل أنبوبة كمصدر للسليلوز ثم تعقم الأنابيب فى الاوتوكلاف بعد سدها بسدادات من القطن الغير ماص.

٤- تلقح خمس انابيب من كل تخفيف ثم توضع على كل منها طبقة من الفاسبار أو الاجار المائى المسيلة والمبردة عند ٥٠°م وذلك لجعل ظروف النمو غير هوائية ثم تحضن على درجة الحرارة المناسبة وللمدة المناسبة (٢٨-٣٠°م) لمدة ٢-٣ أسابيع.

٥- يستدل على إيجابية الأنابيب بمشاهدة بقع صفراء على ورقة الترشيح مع تآكل فى أجزائها وتحسب الأعداد باستخدام جداول العد التقريبية ثم تنسب الى الوزن الجاف من التربة .

٦- لعزل هذه البكتيريا يأخذ جزء من ورقة الترشيح المتآكلة ثم يفتت فى قليل من الماء المعقم ويعمل منه غشاء ويفحص ميكروسكوبيا بعد صبغة بصبغة جرام ثم يعزل بحالة نقية باستخدام طريقة الأطباق المخطوطة تحت الظروف اللاهوائية .

ملحوظة:

نظرا لأن جنس الكلوستريديم يشمل معظم البكتيريا اللاهوائية المحللة للسليلوز ولكونه من الميكروبات المتجرثمة ولذلك فإن عند الرغبة فى تقدير أعداده بالطريقة السابقة يفضل بسترة التخفيفات على درجة ٨٠م لمدة ١٥ دقيقة قبل استخدامها فى التلقيح وذلك للتخلص من الميكروبات غير المكونة للجراثيم.

٦ - تقدير بكتيريا التأزت فى التربة وطريقة عزلها :

تعتبر عملية التأزت البيولوجية من العمليات الهامة التي تحدث في التربة والتي تلي عملية النشدرة حيث تتم أكسدة الأمونيا المتكونة خلال عملية النشدرة أو تلك المضافة في التربة كسماد أمونيومى – إلي النترات خلال مرحلتين متتابعتين ومتلازمتتين ، حيث تتأكسد الأمونيا في المرحلة الأولي إلي نيتريت ويتم ذلك بواسطه خمس أجناس بكتيرية أكثرها إنتشارا هو جنس ***Nitrosomonas*** وتسمي هذه العملية **nitrosification**

أما المرحله الثانية فتتم بواسطه ثلاث أجناس بكتيرية أهمها جنس ***Netrobacter*** وفيها تتم أكسدة النيتريت المتكونة في المرحلة السابقة إلي نترات

وتختلف بكتريا التازت في أشكالها وفي قدرتها علي الحركة ولكنها جمتعا تعتبر ميكروبات هوائية اجبارا كما انها ذاتية التغذية حيث تحصل علي الكربون من ثاني أكسيد الكربون الجوي وتحصل علي طاقتها من تفاعلات الأكسدة السابق الاشارة إليها . وقد أمكن تقدير أعداد هذه البكتريا علي بيئات خاصة . كما أمكن عزلها علي السيلكاجل ، ويمكن توضيح ذلك فيما يلي :

الأدوات والمواد اللازمة :

١ـ عينة التربة المراد فحصها .

٢ـ زجاجات التخفيفات والتى تحتوى كل منها على ٩٠ مل ماء حنفية معقم.

٣ـ كربونات كالسيوم معقمة.

٤- أنابيب اختبار نظيفة.
٥- أطباق بترى وماصات معقمة.
٦- محلول مركز من بيئة إستيفنسون والتي تتركب من :
كبريتات الأمونيوم ٢٠ جرام - فوسفات بوتاسيوم ثنائيه الهيدروجين ٧.٥ جرام. - فوسفات بوتاسيوم ثنائيه القاعدية ٢.٥ جرام- كبريتات حديدوز ٠.١ جرام – كبريتات منجنيز ٠.١ جرام – كبريتات ماغنسيوم ٠.٣ جرام – كلوريد كالسيوم ٠.٠٢ جرام – ماء مقطر ١٠٠٠سم٣ – درجه PH من ٧-٩ .

تخفف هذه البيئة عند استخدامها كبيئة سائلة لتقدير الأعداد أو كبيئة السلكاجل الغروية الصلبة عند اجراء عمليات العزل وذلك بنسبة ١:١٠٠ بالماء المقطر .

خطوات العمل :

١- تقدر الرطوبة في عينة التربةالخصبة لحساب الأعداد لكل واحد جرام وزن جاف تماما من التربة.

٢- توزع البئة السابقة بعد تخفيفها في انابيب الاختبار بمعدل ٧ سم٣ في كل انبوبه وتسد الانابيب بسدادات من القطن الغير ماص ثم تعقم في جهاز الاتوتوكلاف عند ١٢١°م لمده ١٥-٢٠ دقيقة .

٣- يتم عمل سلسله التخفيفات العشرية بالطريقه المعتاده ويختار منها ٥ تخفيفات مناسبة وتستخدم كل منها في تلقيح ٥ ابابيب (٥ تخفيفات x٥ مقررات)وقبل التحضين يضاف لكل انبوبه كميه قليلة من كربونات الكالسيوم بواسطه سباتيول معقمه للمحافظة علي درجه الـPH ثم تحضن الانابيب علي درجة ٢٥ °م لمدة ٣ أسابيع .

٤- تختبر الأنابيب لتكون النترات بعد فترة التحضين باستخدام دليل الداي فنيل أمين وذلك بوضع ١ سم٣ من البيئة الملقحة المحضنة في أنبوبه اختبار نظيفة ويضاف إليها بضع نقط من الدليل فيتكون لون ازرق في حالة وجود النترات .

٥- تحسب النتائج باستخدام جداول العد التقريبية وتنسب ١ جرام تربة جافة.

٦- لعزل ميكروبات التازت (النيتروزوموناس أو النتروباكتر) تصلب البيئة السابقة باستخدام السليكاجل الغرويه وتصب في أطباق بتري معقمة ثم تاخذ غمسة أبرة من أنابيب العد السابقة وتزرع بطريقة التخطيط علي سطح البيئة الصلبة ثم توضع الاطباق في الحضان علي درجه حراره المناسبة لمدة ١-٢ أسبوع حتي تظهر المستعمرات البكترية لكل من النيتروزوموناس والنيتروباكتر والتي تتميز في الاولي بصغر حجمها المتناهي وبتماسكها ولونها البنى بينما تظهر مستعمرات النيتروباكتر دقيقة وكثيفة بعد ذلك تقطع البيئة الصلبة الغروية وما عليها من مستعمرات منفصلة لكل من الميكروبين وتنقل إلى دوراق بها البيئة السائلة السابقة أو أى بيئة مناسبة أخرى وبعد فترة الحضانة تختبر قدرة هذه الميكروبات على تكوين النيتريت والنترت .

ملاحظات :-

١- يحضر دليل الداي فنيل أمين بإضافة ٠.٥ جرام من الداي فنيل أمين النقي إلي ٢٠ سم٣ يضاف الحمض إلي الماء تدريجيا مع التقليب ثم يضاف فنيل أمين مع التقليب أمين مع التقليب حتى تمام الإذابة .

٢- يمكن استخدام كثير من الدلائل الاخري للكشف عن تكوين النيتريت أو النترات مثل حمض السلفونيليك أو الداي ميثيل الفانفثالين أو تراب الذنك بالاضافة الي استخدام الداي فنيل أمين.

٧- تقدير بكتيريا إختزال النترات وإنطلاق الأزوت فى التربة باستخدام بيئة الجلوكوز ونترات البوتاسيوم (آلن ١٥٩٥) أو بيئة البويون ومستخلص الخميرة (ألكسندر ١٩٦٥):

الأدوات المطلوبة:

١- أنابيب إختبار نظيفة.
٢- أطباق بترى معقمة.
٣- ماصات معقمة سعة ١٠ مل ، ١ مل.
٤- عينة التربة الخصبة أو عينة من سماد الإسطبل.
٥- فاسبار معقم أو آجار مائى معقم .
٦- بيئة أمليانسكى وتتركب من :
كبريتات الأمونيوم أو فوسفات الأمونيوم ١ جرام ، فوسفات بوتاسيوم ثنائى القاعدية ١ جرام ، كبريتات ماغنسيوم ٠.٥ جرام، كبريتات كالسيوم ٢ جرام، آثار من كلوريد الصوديوم، ماء مقطر ١٠٠٠ سم٣ . ويمكن إستبدال أملاح الأمونيوم كمصدر معدنى للنيتروجين بمصدر عضوى مثل الأسبارجين أو الببتون بمعدل ٥ جرام/ لتر.
٧- أنابيب تحتوى على بيئة آجار السليلوز والدكسترين المعقمة.

المراجع :

http://www.wou.edu/~boomers/research/MMLID/nitrogenpix
www.cat.cc.md.us/.../ labmanua/lab7/endobmmg.html
http://medinfo.ufl.edu/year2/mmid/bms5300/bugs/closper.html
http://visualsunlimited.com/results.jsp
http://www.mbio.ncsu.edu/JWB/MB409/lab/Bacillus/isolation.html
http://www.yamagiku.co.jp/pathology/case/case063.htm
http://www.kalyx.com/store/proddetail.cfm/AffiliateID/2003085644/ItemID/20396.0/CategoryID/12500.0/SubCatID/210.0/file.htm
http://www.wou.edu/las/natsci_math/biology/boomer/Bio331/microlab/projects/websitesspring2002/nitroweb02/AzotobacterPage.html