تجربة الأولى
قياس أعداد البكتريا والفطريات في التربة
Enumeration of Bacteria and Fungi in Soil

الأهداف:

1. تقدير أعداد البكتريا والفطريات الموجودة في التربة الدراسة.
2. تحديد بعض الأجناس من البكتريا والفطريات الممكن تصنيفها في تربة الدراسة.

المقدمة:

تُعرف التربة بأنها عبارة عن البيئة الغذائية لكل الأنواع المعروفة من الاحياء المجهرية والتي تشمل (البكتريا ، الفطريات ، الاكتينوميسيتات) بالإضافة إلى الأشنات والديدان الصغيرة، والتي تعتمد اعتماداً كلياً على تركيب التربة ، الرطوبة ، pH وعوامل أخرى.

معظم البحوث المايكرو بيولوجية تحتاج إلى تقدير أعداد كل من هذه الاحياء الدقيقة الموجودة في حجم معين من التربة ، وهناك عدة طرق لإجراء مثل هذه الدراسة منها استعمال العد المباشر باستعمال طريقة الـ Microscopies slid Technique ولكن بالرغم من بساطة هذه الطريقة إلا أنه بواسطتها لا يمكن التمييز بين الخلايا الحية والميته كذلك بين الخلايا البكتيرية وحبيبات التربة أو المادة العضوية لذلك يفضل الكثير من الباحثين إتباع طريقة Standard plate Technique باستعمال وسط غذائي معين وفيها يمكن عد الخلايا الحية فقط لأن 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 لتنمية البكتريا هو بيئة ملائمة لنمو جميع الأنواع والوسط الغذائي الذي سوف نستعمله لتنمية الفطريات هو بيئة ملائمة لجميع الاجناس المختلفة من الفطريات.
2. عند عمل تخفيف معين من التربة في الماء المعقم ونرجه نفترض أن جميع البكتريا أو الفطريات ستتوزع بصورة متجانسة في جميع أجزاء المحلول.
3. كل مستعمرة بكتيرية تظهر على سطح الوسط الغذائي بعد عملية التحضين هي ناتجة من خلية واحدة فقط.

العوامل المؤثرة على عملية العد بطريقة Standard plate Technique

a. استعمال الوسط الغذائي المناسب للحصول على نتائج دقيقة وجيدة.

b. درجة حرارة التحضين.

c. مدة التحضين.

d. طريقة عد المستعمرات سواء باستعمال أجهزة colony counter أو باستعمال العين المجردة.

الأوساط الغذائية المستعملة لعد البكتريا:

يمكن استعمال الآكار المغذي المتعادل Nutrient Agar لتنمية وعد البكتريا والذي مكوناته كالآتي:

مستخلص اللحم	3 gm
ببتون	5 gm
Agar – Agar	18 gm
Distell water	1000 ml

عقم على درجة حرارة 121˚c وضغط 15 pound/A^2 باستعمال جهاز الاوتوكليف ولمدة 20 mint .

الأوساط الغذائية المستعملة لعد الفطريات:

يمكن استعمال الوسط Martins Medium لتنمية وعد الفطريات والذي مكوناته كالآتي:

دكتروز	10 gm
ببتون	5 gm
KH_2PO_4	1 gm
$MgSO_4.7H_2O$	0.5 gm
Rose Bengal	33 mg
Agar – Agar	18 gm
Distell water	1000 ml

بعد عملية التعقيم التي تتم في جهاز الاوتوكليف على درجة حرارة 121c˚ وضغط 15 pound/A^2 باستعمال جهاز الاوتوكليف ولمدة 20 mint أضف Stroptomycin بمعدل 30 $mg.L^{-1}$ وذلك عندما تكون درجة حرارة الوسط (40 - 50˚C). من الممكن أيضاً استعمال الوسط Nutrient Agar لتنمية وعد الفطريات بشرط جعل الـ pH للوسط (4) ولكن المفضل استعماله في التجارب والمشاريع الدقيقة هو الوسط الغذائي Martin's Medium.

مواد التجربة:

- تربة حقل من موقع معين
- ماصة Pipette معقمة حجم 1 ml أو ماصة تومتيكية
- دورق مخروطي Conical Flask يحوي 99 ml ماء معقم.
- أنابيب اختبار Test Tubes تحوي كل منها 9 ml ماء معقم.
- اطباق بتري Petri Dishes معقم.
- وسط غذائي خاص بالبكتريا وآخر بالفطريات.

طريقة العمل:

1. ضع علامة واضحة على كل من انابيب الاختبار ، اطباق بتري .
2. زن 1 gm تربة وضعها في الدورق المخروطي سعة 99 ml ورج جيداً لمدة دقيقة للحصول على تخفيف (1/100).
3. باستعمال الماصة أنقل 1 ml من التخفيف السابق إلى انبوبة اختبار سعة 9 ml للحصول على تخفيف (1/1000).
4. أنقل 1 ml من التخفيف السابق (1/1000) بعد الرج براحة اليد إلى انبوبة اختبار سعة 9ml للحصول على تخفيف (1/10000).
5. أنقل 1 ml من التخفيف السابق بعد الرج براحة اليد إلى انبوبة اختبار سعة 9 ml للحصول على تخفيف (1/100000).
6. أنقل 1 ml من التخفيف السابق بعد الرج براحة اليد إلى انبوبة اختبار سعة 9 ml للحصول على تخفيف (1/1000000).
7. أنقل 1 مل من كل من التخافيف السابقة (1/10000 و 1/100000 و 1/1000000) إلى كل من ثلاثة أطباق بتري (مع عمل ثلاث مكررات من كل تخفيف). استعمل ماصة معقمة لكل تخفيف. أضف 15مل من الوسط الغذائي الخاص بالبكتريا، حرك الطبق جيداً لخلط 1 ml من التخفيف مع الوسط (حرك على شكل رقم 8) قبل تصلب الوسط. اتركه بعد ذلك لكي يتصلب ومن ثم ضع جميع الاطباق بصورة مقلوبة في الحاضنة لمدة 5 أيام على درجة حرارة (25 - 28°c) بعدها عد المستعمرات البكتيرية في الاطباق وبضرب العدد في مقلوب التخفيف يمكن معرفة عدد الخلايا البكتيرية الموجودة في 1 gm من التربة للتربة الرطبة ومن ثم تعديلها إلى الغرام الواحد من التربة الجافة بعد حساب نسبة الرطوبة.

8. كرر نفس العملية السابقة بالنسبة لعد الفطريات باستعمال الوسط الخاص بالفطريات Martin's Medium
9. سجل في جدول أعداد المستعمرات البكتيرية والفطرية في الغرام الواحد من التربة الرطبة والجافة وبالطريقة التالية:

رقم التجربة	التربة المستعملة	عدد المستعمرات في كل مكرر من كل تخفيف			معدل عدد المستعمرات في كل تخفيف	عامل التخفيف	نسبة الرطوبة	عدد البكتريا في الغرام الواحد	
		1	2	3				تربة رطبة	تربة جافة

أجب عن الأسئلة التالية

س1/ أشرح مميزات وعيوب طريقة Standard plate Technique لعد البكتريا والفطريات

س2/ جد وزن الخلايا البكتيرية في الغرام الواحد من التربة الجافة ومن ثم في الدونم الواحد على اعتبار أن الوزن الرطب لكل خلية بكتيرية يعادل تقريبا 1.5×10^{-12} .

س3/ إذا كان لديك تربة عضوية وتربة معدنية ايهما نجد أعداد بكتيرية أكثر؟ ولماذا.

التجربة الثانية

اولاً: صبغة كَرام Gram staining

1. ضع بإستعمال إبرة التلقيح المعقمة Inoculating loop قطرة من الماء على شريحة زجاجية نظيفة تماما (أغسل الشريحة المستعملة سابقاً بالماء الساخن ومررها عدة مرات من خلال مصباح بنزن لتجفيفها وتعقيمها ومن ثم تبريدها).
2. خذ باستعمال أبرة التلقيح المعقمة كمية قليلة جداً من المستعمرة البكتيرية وانشرها بحيث تشكل غشاء رقيق جداً (smear) واتركها تجف في هواء المختبر. بعد التجفيف التام مرر الشريحة من خلال مصباح بنزن عدة مرات (لا تحمل الشريحة مباشرة فوق النار لان ذلك سوف يحرق الخلايا البكتيرية).
3. بعد تحضير وتثبيت الغشاء (Fixation of smear) أضف صبغة Grystal violet واترك الشريحة وفوقها الصبغة لمدة 45 second ومن ثم اغسل بالماء.
4. أضف الـ Gram Iodine واتركها 45 second ومن ثم اغسل بالماء.
5. اغسل بالكحول تركيزه 95% لمدة 20 second ومن ثم اغسل بالماء للتخلص من الكحول.
6. أضف بعد ذلك صبغة الـ Safranine واتركها لمدة 30 second بعد ذلك اسكب الصبغة وأغسل بالماء وجفف باستعمال ورق النشاف وافحص الشريحة بالمايكروسكوب أولاً تحت قوة تكبير 10x ومن ثم ضع قطرة من زيت السيدر وافحص تحت العدسة الزيتية.

التجربة الثانية

ثانياً: حركة البكتريا Bacterial movement

لفحص حركة البكتريا يفضل أن تكون البكتريا نامية في مزرعة سائلة

1. بواسطة إبرة التلقيح المعقمة ضع أربعة نقط صغيرة من الماء حول غطاء الشريحة (الزورايا الأربع)
2. عقم إبرة التلقيح وبردها بتركها في هواء المختبر لمدة ثواني أو ملامستها على سطح الوسط الغذائي في طبق بتري ومن ثم خذ عقدة من النمو البكتيري في المزرعة السائلة.

ملاحظة: في حال إذا كانت المزرعة مأخوذة من وسط غذائي صلب يجب وضع قطرة ماء صغيرة في وسط الشريحة

3. نظف الشريحة الزجاجية المجوفة وضعها على غطاء الشريحة الزجاجية باحتراس بحيث يكون التجويف إلى الأسفل وتكون نقطة المزرعة في منتصف التجويف (مع مراعاة الا تلمس النقطة قاع التجويف) فتظهر بشكل معلقة Hanging drop .
4. أعدل الشريحة المجوفة وضعها على مسرح الميكروسكوب وافحصها أولاً بالعدسة الصغرة 10x مع تقليل الإضاءة بفعل الحجاب جزيئاً وتجفيف المكثف. أبحث عن حالة النقطة حتى تراها بوضوح تام حيث تكون الحافة رفيعة ولامعة. عدّل وضع الشريحة المجوفة بحيث ترى حافة النقطة في وسط المجال المايكروسكوبي.
5. افحص بالعدسة العينية البكتريا الجافة تحت قوة 40x مع استعمال الضابط الدقيق بحرص شديد. عدّل الإضاءة بحيث ترى حافة النقطة بوضوح وعندها تجد حركة البكتريا مزدحمة ويمكن تمييز حركتها بوضوح إذا كانت متحركة.

التجربة الثالثة
تكوين السبورات Spore – formers Bacteria

قسم من البكتريا يمكن تمييزها من حيث قابليتها على تكوين السبورات. إذ نجد أن السبورات تقاوم درجات الحرارة العالية بعكس الخلايا الخضرية التي تموت بدرجات الحرارة العالية ويمكن استغلال هذه الظاهرة في عزل البكتريا المكونة للسبورات من البكتريا التي لا يمكنها تكوين السبورات.

1. ضع المزرعة البكتيرية المختلطة (الحاوية على بكتريا مكونة للسبورات وغير المكونة للسبورات) والموجودة في أنبوبة اختبار في حمام مائي في بيكر على درجة حرارة 80˚c ولمدة 10 mint.
2. (مع مراعاة ظروف التعقيم) لقح انبوبة الاختبار الحاوية على الوسط الغذائي وليكن Nutrient broth مثلاً أو تلقيح طبق بتري حاوي على وسط غذائي وليكن Nutrient agar مثلاً وحضن لمدة 48 h على درجة حرارة (35 - 37˚c).

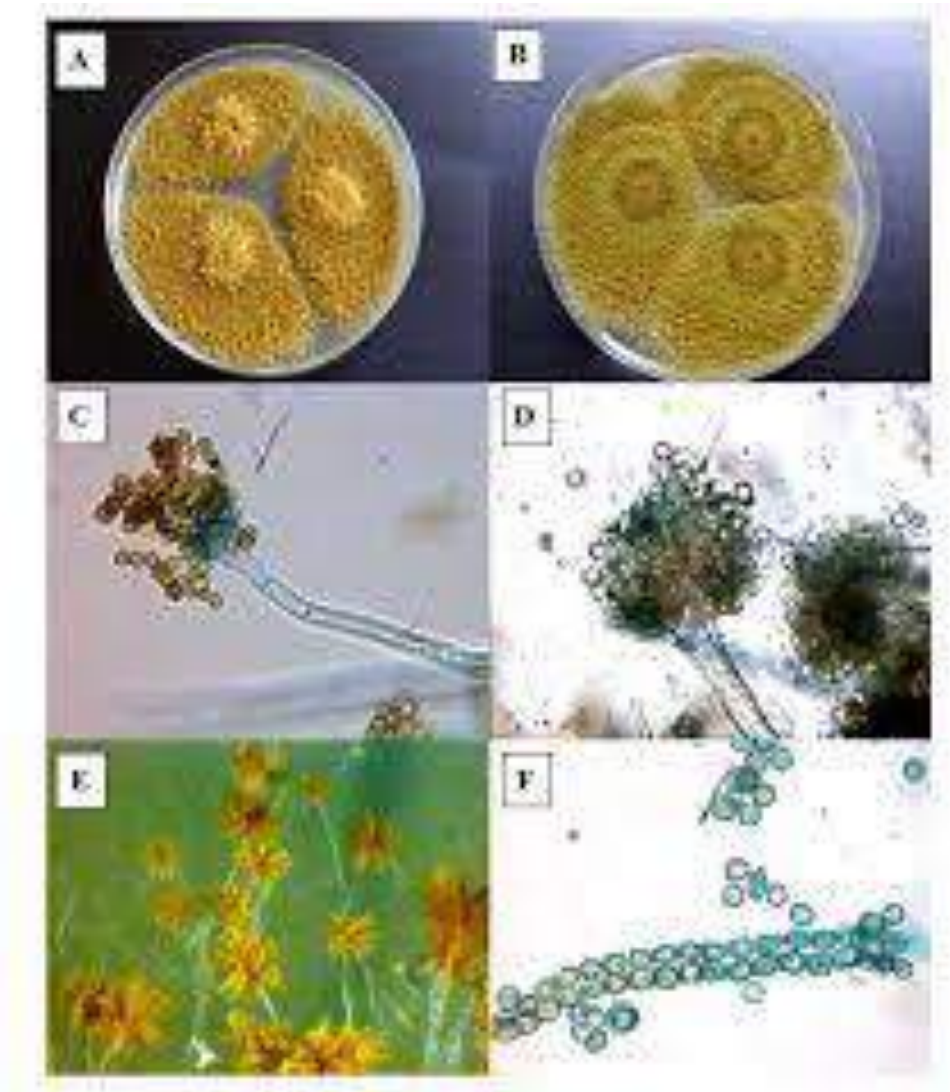
ملاحظة: البكتريا التي نمت هي ناتجة من السبورات التي قاومت درجات الحرارة العالية أما الخلايا الخضرية فقد تلفت بالحرارة.

3. لعد الخلايا البكتيرية المكونة للسبورات في تربة معينة يمكن أخذ غرام واحد من التربة ووضعها في 9ml من الماء المعقم في انبوبة اختبار. سخن على درجة 80˚c ولمدة 10 mint. برد واعمل تخافيف ولتكن 1/100 ، 1/1000 ، 1/10000 واتبع نفس خطوات تجربة العد بطريقة التخافيف المتسلسلة، وحضن على درجة حرارة 37˚c ولمدة 72 h – 48 .

التجربة الرابعة

فحص الفطريات بطريقة الـ Well mount

1. أدرس الصفات المورفولوجية للعفن الذي نما على سطح الوسط الغذائي بالعين المجردة ومن ثم باستعمال الميكروسكوب بأخذ جزء من النمو باستعمال ابرتين من أبر التلقيح ووضعها على شريحة زجاجية نظيفة عليها قطرة من الـ Locto – phenol ومن ثم غطِ بغطاء الشريحة مع مراعاة عدم تكوين فقاعات هوائية.
2. أفحص الشريحة تحت العدسة الصغرى 10x وعند الحاجة استعمل العدسة الكبرى الجافة 40x .
3. أرسم وصف ما تشاهده مبيناً الخواص المورفولوجية لكل من الأنواع المختلفة من العفن.



التجربة الخامسة
قياس أعداد الاكتينومايسيتات في التربة
Enumeration of soil Actinomycetes

الهدف من التجربة:

تقدير أعداد الاكتينومايسيتات في التربة غير مزروعة ومقارنة ذلك مع تربة مزروعة بنباتات بقولية وتربة أخرى مزروعة بنبات الحنطة.

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

بما أنه يمكن اعتبار الاكتينومايسيتات بكتريا وليست فطريات لذلك يمكن استعمال الوسط الغذائي الخاص بتنمية البكتريا لتنمية الاكتينومايسيتات Nutrient agar ولكن وجد بالتجربة أن هذا الوسط يساعد على نمو نسبة قليلة من الاكتينومايسيتات لذلك سوف نستعمل وسط غذائي آخر أكثر ملائمة وهو Glycerol Yeast Extract Agar ويتكون من

Glycerol	5 ml
Yeast Extract	2 gm
K_2HPOH	1 gm
Agar – Agar	18 gm
Distell water	1000 ml

عقم على درجة حرارة 121˚c وضغط 15 pound/A^2 باستعمال جهاز الاوتوكليف ولمدة 20 mint .

المواد التجربة :

- تربة حقل من مواقع معينة.
- ماصة معقمة حجم 1 ml .
- أنابيب اختبار تحوي 9 ml من الماء المقطر المعقم عدد (6).
- أطباق بتري معقمة عدد (9).
- وسط غذائي Glycerol Yeast Extract Agar معقم.

طريقة العمل :

1. ضع علامة واضحة تشير إلى نسبة التخفيف عن كل انابيب الاختبار وعلى أطباق بتري المعقمة.
2. زن 1 gm تربة في 9ml ماء معقم في انبوبة اختبار ورج جيداً للحصول على تخفيف (1/10).

3. أنقل 1 ml من التخفيف السابق بعد الرج إلى انبوبة اختبار أخرى تحوي 9 ml من الماء المعقم وذلك باستعمال ماصة معقمة (تخفيف 1/100).
استمر بعمل التخافيف التالية بنفس الطريق (1/1000 , 1/10000 , 1/100000 , 1/1000000) مع مراعاة تغيير الماصة عند الانتقال من تخفيف إلى آخر مع الرج الجيد للتجانس .
4. أنقل باستعمال ماصة معقمة 1 ml من كل من التخافيف (1/10000 , 1/100000 , 1/1000000) إلى كل من ثلاث أطباق بتري المعقمة (عمل ثلاث مكررات من كل نخفيف) مع مراعاة تغيير الماصة عند الانتقال من تخفيف إلى آخر.
5. أضف حوالي 15 ml من الوسط الغذائي المعقم الخاص بالاكتينومايسيتات إلى كل من هذه الاطباق. حرك الطبق جيداً لتجانس 1 ml من التخفيف مع الوسط (حرك على شكل 8) وقبل أن يتصلب الوسط الغذائي. اتركه بعد ذلك لكي يتصلب ومن ثم ضع جميع الاطباق مقلوبة في الحاضنة لمدة خمسة أيام وعلى درجة حرارة (25 - 28°c).
6. عد المستعمرات في الاطباق التي يوجد فيها نمو وبضرب عدد المستعمرات في مقلوب التخفيف يمكن معرفة عدد الخلايا الموجودة في 1 gm من التربة الرطبة ومن ثم تعديلها إلى 1gm من التربة الجافة بعد حساب نسبة الرطوبة.
7. قارن احصائياً بين اعداد الاكتينومايسيتات في كل تربة من الترب المعطاة ثم سجل النتائج.

التجربة السادسة
طريقة كوني لفحص التربة المباشر بواسطة المايكروسكوب
Connie method for direct microscopy of soil

في عام 1962 كور العالم Con طريقة وينغراد سكي للفحص المباشر للأحياء الدقيقة الموجودة في التربة بواسطة الميكروسكوب وأعطت هذه الطريقة على مر السنين الكثير من المعلومات القيمة عن علاقة الاحياء بعضها ببعض في التربة ومن مساوئ هذه الطريقة :

1. إن بعض الاحياء لا تظهر ولا يمكن رؤيتها أو عدها بواسطة هذه الطريقة.
2. صعوبة التفرقة بين اشكال الخلايا البكتيرية الدقيقة جداً أو بين بعض أجزاء المادة العضوية.
3. صعوبة التفريق بين خلايا البكتريا الحية وخلايا البكتريا الميتة.
4. إن أهمية هذه الطريقة قليلة في حالة وجود الأحياء الدقيقة بأعداد صغيرة في بعض أنواع الترب.

ومع ذلك فإنه عند اتباع هذه الطريقة بصورة دقيقة وصحيحة فإن المساوئ المشار إليها أعلاه لا أهمية لها من الناحية العلمية.

مواد التجربة :

- عينة تربة من مواقع مختلفة .
- مسحوق الجت ، النشأ.
- ببتون ، نترات الامونيوم
- شرائح زجاجية نظيفة ، شريحة مايكرومترية
- أنابيب اختبار تحوي 9 ml محلول مثبت من (0.1% Agar أو 0.015% جيلاتين في ماء مقطر و 4% acetic acid على التوالي).
- صبغة كربول ايريثروسين.

الحسابات :-

قطر المجال = عدد الخطوط × المسافة بين الخطوط

مساحة المجال = نق^2 × π

$$\text{مساحة المجال (1سم}^2\text{) او (0.01 مل)} = \frac{10000 \times 10000}{\text{مساحة المجال}}$$

عدد البكتريا في (1 سم^2) او (0.01 مل) = مساحة المجال (1سم^2) × متوسط عدد البكتريا

عدد البكتريا في (1 مل) = عدد البكتريا في (1 سم^2) × 100

مثال :- احسب اعداد البكتريا في عينة حليب حجمها 250 مل إذا علمت أن عدد الخطوط (16 خط) وأن متوسط عدد البكتريا (12 مايكرون)؟

قطر المجال = عدد الخطوط × المسافة بين الخطوط

قطر المجال = 16 × 10 = 160 مايكرون

مساحة المجال = نق^2 × π

مساحة المجال = $(80)^2$ × 3.14 ثابت = 20000

مساحة المجال (1سم^2) او (0.01 مل) = $\frac{10000 \times 10000}{\text{مساحة المجال}}$

مساحة المجال (1سم^2) او (0.01 مل) = $\frac{10000 \times 10000}{20000}$ = 5000

عدد البكتريا في (1 سم^2) او (0.01 مل) = مساحة المجال (1سم^2) × متوسط عدد البكتريا

عدد البكتريا في (1 سم^2) او (0.01 مل) = 5000 × 12 = 60000

عدد البكتريا في (1 مل) = عدد البكتريا في (1 سم^2) × 100

عدد البكتريا في (1 مل) = 60000 × 100 = 6000000

التجربة السابعة

تحلل المواد العضوية في التربة

Decomposition of organic matter in Soil

أهداف التجربة

1. تحرر العناصر الغذائية المضافة لتكون جاهزة للامتصاص من قبل النبات.
2. تحرر غاز ثاني اوكسيد الكاربون CO_2 الذي يستعمل من قبل النبات في عملية التركيب الضوئي.

تقاس كمية غاز ثاني اوكسيد الكاربون الذي يستعمل كمؤشر لقياس فعالية ونشاط الكائنات الدقيقة في التربة. إن إضافة المركبات العضوية في التربة سيؤدي إلى الزيادة في كمية غاز ثاني اوكسيد الكاربون المتحرر ومقدار التحلل يعتمد على أعداد ونوع الكائنات الحية الدقيقة في التربة التي تعمل على تحلل المادة العضوية المضافة إلى عناصرها المعدنية الأصلية من الكاربون ونيتروجين وكبريت وعناصر أخرى وكذلك نوع المادة العضوية المضافة إلى التربة أضف إلى ذلك درجة الحرارة والتهوية ودرجة تركيز ايون الهيدروجين.

اثناء عملية التحلل قسم من الكاربون سوف يستعمل في بناء اجسام الخلايا التي تقوم بعملية التحلل والقسم الآخر سوف يستعمل كمصدر للطاقة وهناك قسم آخر يبقى في التربة على شكل مركبات عضوية غير متحللة.

مواد التجربة

- عينات من التربة
- المواد العضوية المرد دراستها.
- علب بلاستيكية حجم 250 مل و 50 مل
- تحضير: 1 عياري من هيدروكسيد الصوديوم
  1 عياري من كلوريد الباريوم
  1 عياري من حامض الهيدروكلوريك
  دليل الفينولفثالين

طريقة العمل

1. زن 100 غم تربة ووضعها في علب بلاستيكية حجم 250 مل (لكل معاملة من المعاملات المستخدمة في التجربة) وبثلاث مكررات.
2. تعامل التربة 100 غم مع الخلط الجيد بـ
   - عدم اضافة شيء (معاملة مقارنة).
   - كلوكوز Glucose 0.5 غم
   - نشأ Starch 0.5 غم
   - سليلوز Cellulose 0.5 غم
   - ببتون Peptone 0.5 غم

   التأكد من نسبة الرطوبة ان تكون 55 – 60 % من التشبع.
3. أضف 15 غم من هيدروكسيد NaOH " 1 عياري " في علب بلاستيكية حجم 50 مل وتوضع داخل العلب حجم 250 مل الحاوي على 100 غم تربة مع التأكد بعدم سكبه في التربة.
4. غط العلب الحاوية على التربة وهيدروكسيد الصوديوم
5. حضن على درجة حرارة 28 ± 2 . في الاسبوع الاول من التحضين يم اخذ محلول هيدروكسيد الصوديوم ووضعها في فلاسكات حجم 100مل واضافة 2 مل من كلوريد الباريوم $BrCl_2$ مع عدة قطرات من دليل الفينولفثالين يتغير اللون من الابيض الى الوردي الغامق
6. سحح باستعمال حامض الهيدروكلوريك الى لحين ظهور اللون الابيض وهنا يتم ايقاف التسحيح.
7. عند ايقاف التسحيح يحسب حجم الحامض من السحاحة لكل معاملة.

ملاحظة : يمكن تكرار العملية 4 – 5 اسابيع (بواقع مرة في اسبوع). يحسب عدد ملغرامات الكاربون التي تحررت على شكل غاز ثاني اوكسيد الكاربون من كل تربة ولكل معاملة وكالآتي:

الحسابات

بالنسبة لعينة المقارنة

حجم الحامض × عيارية الحامض = ملي مكافئ NaOH الزائدة (التي بدأنا بها التفاعل) ..... س

بالنسبة لعينة المعاملات

حجم الحامض × عيارية الحامض = ملي مكافئ NaOH الزائدة (بعد التفاعل) ..... ص

ملي مكافئ NaOH المستعملة في التفاعل ..... ع = ملي مكافئ NaOH الزائدة (التي بدأنا بها التفاعل) - ملي مكافئ NaOH الزائدة (بعد التفاعل)

ع = س – ص

ملغم CO_2 = ملي مكافئ NaOH المستعملة في التفاعل ..... (ع) × 22

$$\text{ملغم C} = \frac{\text{ملغم } CO_2 \times 12}{44}$$

مثال:

في تجربة لحساب عدد ملغرامات الكاربون المتحرر من التربة كان حجم حامض الهيدروكلوريك عند تسحيح عينة المقارنة (7.3 مل) والمعاملات ببتون و دكتروز و نشأ كان حجم الحامض لها (3.9 ، 5.3 ، 4.8) على التوالي ؟

الحل:

حجم الحامض × عيارية الحامض = ملي مكافئ NaOH الزائدة (التي بدأنا بها التفاعل) ..... س

س= 7.3 * 1 = 7.3

حجم الحامض × عيارية الحامض = ملي مكافئ NaOH الزائدة (بعد التفاعل) ..... ص

1. **ببتون ص= 3.9 * 1 = 3.9**
2. **دكتروز ص= 5.3 * 1 = 5.3**
3. **نشأ ص= 4.8 * 1 = 4.8**

ملي مكافئ NaOH المستعملة في التفاعل ..... ع = ملي مكافئ NaOH الزائدة (التي بدأنا بها التفاعل) - ملي مكافئ NaOH الزائدة (بعد التفاعل)

ع= س – ص

1. **ببتون ع= 7.3 – 3.9 = 3.4**
2. **دكتروز ع= 7.3 – 5.3 = 2**
3. **نشأ ع= 7.3 – 4.8 = 2.5**

ملغم CO_2 = ملي مكافئ NaOH المستعملة في التفاعل ..... (ع) × 22

ملغم CO_2 = ع × 22

1. ببتون 3.4 *22 = 74.8
2. دكتروز 2 * 22 = 44
3. نشأ 2.5 *22 = 55

$$\text{ملغم C} = \frac{\text{ملغم } CO_2 \times 12}{44}$$

1. ببتون (74.8 * 12) / 44 = 20.4
2. دكتروز (12*44)/ 44 = 12
3. نشأ (55 * 12) / 44 = 15

التجربة الثامنة
التحولات الحيوية للنتروجين في التربة
Biological Transformation of Nitrogen in Soil

Ammonification :-

النتروجين في معظم النباتات والحيوانات يكون بشكل بروتين . عندما تموت هذه الكائنات الحية سوف يتحلل البروتين الى احماض امينية والتي بدورها تتحلل لتعطي الامونيا . وتسمى عملية انتاج الامونيا من المركبات العضوية (النتروجينية) بعملية الـ Ammonification وبما انه الكائنات الحية الدقيقة والنبات يمكن ان يستعمل الامونيا كمصدر معدني من النتروجين والتي بدروها سوف تتحول الى مركبات عضوية نتروجينية داخل جسم الكائنات الدقيقة او النبات ويمكن اعتبار هذه العملية مهمة جدا في دورة النتروجين في الطبيعة. عملية الـ Ammonificationتتم بعدد كبير من البكتريا التي هي من نوع Heterotrophic والموجودة في التربة بأعداد كبيرة.

في هذه التجربة سوف نلقح الوسط الغذائي Peptone broth بعينة من التربة ونضع في الحاضنة لعدة ايام وبعد ذلك سوف نكشف عن انتاج الامونيا وكذلك سوف نستعمل طريقة العد الاكثر احتمالا لمعرفة إعداد البكتريا في التربة والتي يمكن ان تقوم بعملية الـ Ammonification.

طريقة العمل

البيئة المستعملة : بيئة الـ Peptone broth ومكوناتها :

عقم بجهاز

Pepton	10 gm
K_2PO_4	1 gm
$MgSO_4$	0.5 gm
Distilled water	1000 ml

الاوتوكليف Autoclaveعلى درجة حرارة 121° C وضغط 15 Paund/A^2 لمدة 20 mint

الخطوات:

1. قدر نسبة الرطوبة في التربة بالطريقة الاعتيادية
2. لقح انبوبة اختبار تحوي على البيئة الغذائية السابقة بكيمة قليلة جداً من التربة (3 mgm) . اترك انبوبة اخرى تحوي على نفس البيئة من دون تلقيح (كونترول)
3. حضن الانبوبتين على درجة حرارة 30° C لمدة اسبوع
4. اكشف عن انتاج الامونيا بالطريقة التالية وفي كلتا الانبوبتين.

خذ قطرة من دليل نسلر Nesslers reagent وضعها في التقعر للـ spot plate وقطرة اخرى في تقعر اخر . أضف لكل قطرة من القطرتين عقدة باستعمال ابرة التلقيح من الانبوبة الملقحة وعقدة اخرى من الانبوبة غير الملقحة فوق القطرة الاخرى. قارن تكون اللون في كلتا الحالتين فتكون لون اصفر باهت يدل على وجود كمية قليلة جدا من الامونيا. تكون لون اصفر عميق يدل على ان الامونيا موجودة بكمية أكبر. وتكون ترسبات رمادية او صفراء عميقة جدا يدل على ان الامونيا موجودة بكميات كبيرة جداً.

5. قارن الاختلاف بدرجة الـ pH في كلتا الانبوبتين الملقحة وغير الملقحة بالطريقة اللونية او باستعمال جهاز الـ pH meter

6. لقياس اعداد البكتريا التي تقوم بعملية الـ Ammonification نقوم بتحضير التخفيفات التالية في الماء المعقم 10^5 ... 10^4 ... 10^3
7. لقح من كل تخفيف خمسة انابيب حاوية على الوسط الغذائي السابق وذلك بإضافة 1 مل لكل انبوبة.
8. حضن على درجة حرارة 30° C ولمدة اسبوع
9. اكشف عن تكون الامونيا بالطريقة السابقة باستعمال دليل نسلر في كل انبوبة من الخمسة انابيب لكل تخفيف وسجل عدد الانابيب الموجبة من كل تخفيف واستعمل طريقة العدد الاكثر احتمالا Most Probale Number Technique.
10. في حالة تقدير اعداد الميكروبات المتجرثمة يجب بسترة التخفيفات قبل تلقيح البيئة وذلك بالتسخين على درجة حرارة 80° C ولمدة خمسة عشر دقيقة.
11. في حالة تقدير اعداد الميكروبات اللاهوائية يغطي سطح البيئة بعد التلقيح مباشرة بطبقة من الفلسبار المنصهر (2-3 مل لكل انبوبة). مع عدم ترك فقاعات بين سطح البيئة وطبقة الفلسبار.

Nitrification

عملية تحول الامونيا إلى نترات تسمى Nitrification وهي عملية تأكسد وتتم بخطوتين وبواسطة جنسين مختلفين من البكتريا وكما يلي :

$$NH_4^+ \xrightarrow{\text{Nitrosomonas}} NO_2^- \xrightarrow{\text{Nitrobacter}} NO_3^-$$

Ammonium ion — Nitrite ion — Nitrate ion

البكتيريا المسؤولة عن هذه العملية هي من نوع Autotrophic التي تقوم بصورة رئيسية بهذه العملية. هناك بعض البكتريا التي من نوع Heterotrophic والتي يمكن ان تقوم بهذه العملية ولكن تنتج كميات قليلة جدا من النتريت والنترات. البكتيريا Nitrobacter و Nitrosomonas هي بكتيريا صغيرة جدا وسالبة لصبغة كرام وذات شكل اسطواني (Rod) وتعتمد كلياً على Co_2 كمصدر رئيسي للكاربون واكسدة المواد المعدنية كمصدر رئيسي للطاقة لذلك فوجود المادة العضوية في الوسط الغذائي تعتبر سامة لهذه الأنواع من البكتريا ويجب ان يكون الوسط الغذائي في هذه الحالة معدني فقط.

طريقة العمل

- البيئة المستعملة لقياس الخطوة الاولى من التحلل نستعمل البيئة التالية (بيئة رقم 1).

كبريتات الامونيوم	2 gm
كبريتات المغنسيوم	0.5 gm
كبريتات الحديدوز	0.03 gm
كلوريد الصوديوم	0. 3 gm
كاربونات المغنسيوم	10 gm
فوسفات ثنائي البوتاسيوم	1 gm
Distilled water	1000 ml

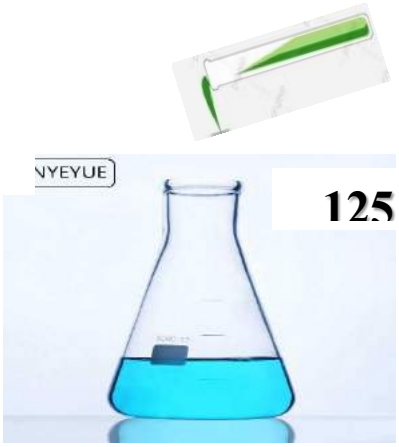
- **البيئة المستعملة لقياس الخطوة الثانية من التحلل نستعمل البيئة التالية (بيئة رقم 2).**

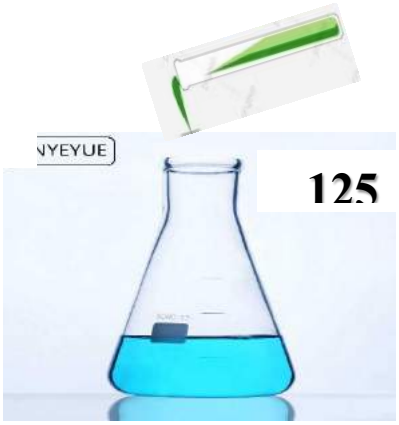
نترات الصوديوم	1 gm
كبريتات المغنسيوم	0.5 gm
كبريتات الحديدوز	0.03 gm
كلوريد الصوديوم	0. 3 gm
كاربونات الصوديوم	1 gm
فوسفات ثنائي البوتاسيوم	1 gm
Distilled water	1000 ml

عقم على درجة حرارة 121°C وضغط 15 باوند/ انج^2 لمدة 30 دقيقة.

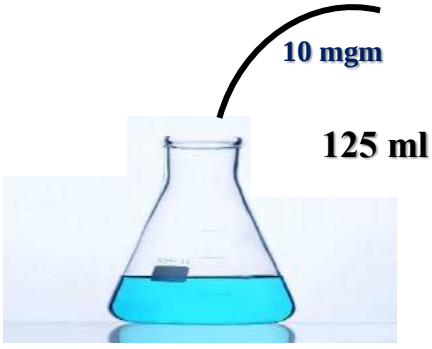
قارن بين هذان النوعان كم البيئة والمناسبة لكل نوع من البكتريا السابقة والبيئة الأولى تلائم البكتريا Nitrosomonas والبيئة الثانية تلائم بكتريا Nitrobacter

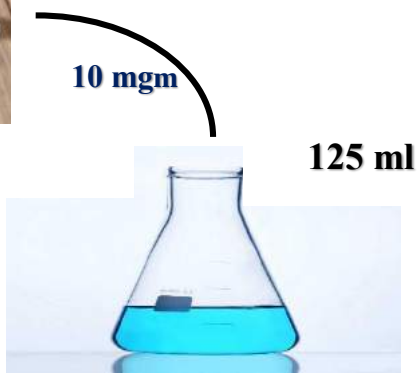
1. **ضع في فلاسك (حجمه 125 مل) حوالي 20 مل من الوسط الغذائي الأول (بيئة رقم 1) وسجل عليه. وحوالي 20 مل اخرى من الوسط الغذائي الثاني (بيئة رقم 2) في فلاسك اخر وسجل عليه .**





2. **لقح كل فلاسك بكمية قليلة من التربة (حوالي 10 ملغرام تربة).**





3. **حضن الفلاسكين بصورة مائلة على درجة حرارة 30° C ولمدة اسبوع واكشف عن وجود الـ No_2 والـ No_3 بالطريقة التالية . كمل عملية التحضين بعد ذلك لأسبوع اخر او اكثر.**

الكشف عن النتريت No_2^- والنترات No_3^-

المواد المطلوبة

- دليل نسلر Nessler's reagent
- دليل تروموسدورف Trommsdorf 's reagent
- دليل الدايفينايل امين
- حامض الكبريتيك المركز
- حامض الكبريتيك المخفف (جزء مركز من الحامض مع ثلاث اجزاء ماء)
- ملعقة زجاجية
- Spot plate او سلايد مقعر حسب المتوفر في المختبر.

طريقة العمل

الكشف عن انتاج النتريت من الامونيوم

أ- امزج ثلاث قطرات من دليل تروموسدورف Trommsdorf reagent مع قطرة من حامض الكبريتيك المخفف في صفيحة ذات تقعرات Spot plate.

ب- باستعمال القضيب الزجاجي انقل قطرة من الوسط الغذائي الاول (بيئة رقم 1) الى المخلوط السابق وامزج بالقضيب الزجاجي. تكون لون كثيف اسود مزرق يدل على وجود النتريت (No_2^-).

ج- افحص نفس الوسط للكشف عن الامونيوم باستعمال دليل نسلر Nessler reagent كما في التجربة السابقة . عدم تكون اي لون في هذه الحالة يدل على ان جميع الامونيوم قد تأكسدت الى No_2.

د- اعمل صبغة كرام Gram staining لفحص البكتريا في هذا الوسط وسجل النتيجة.

الكشف عن انتاج النترات من النتريت

يمكن الكشف عن النترات باستعمال دليل الـ diphenylamine reagent ولكن المشكلة هنا هي انه بوجود هذا الدليل سوف يتكون لدينا لون اسود مزرق لوجود النترات او النتريت لذلك سوف نقوم اولاً بالكشف عن وجود النتريت في الوسط الغذائي الثاني (الخاص بالخطوة الثانية). فعند عدم وجود النتريت يدل على ان كل النتريت قد تحول الى نترات وان اللون الاسود المزرق الذي نتج باستعمال دليل diphenylamine هو نتيجة لوجود النترات فقط ولانجاز ذلك نتبع الطريقة التالية :

1. افحص الوسط الغذائي الحاوي على النتريت (بيئة رقم 2) الخاص بالخطوة الثانية من عملية الـ Nitrification باستعمال دليل ترموسدورف Trommsdorf reagen للتاكد من عدم وجود نتريت والذي يدل على ان كل النتريت قد تحول الى نترات.
2. بعد ذلك اكشف عن وجود النترات بخلط قطرتين من حامض الكبريتيك المركز وقطره من الـ diphenylamine reagent مع قطرة من المزرعة في الوسط الغذائي الثاني. ظهور لون اسود مزرق يدل على وجود النترات.
3. اعمل صبغة كرام Gram staining للبكتريا في هذا الوسط وسجل النتيجة.

طرق تحضير الدلائل المستعملة في التجربة السابقة

- **دليل نسلر Nessler reagent**

أ- **أذب 50 غم من ايوديد البوتاسيوم (KI) في 35 مل من الماء البارد الخالي من الامونيوم (يفضل ماء مقطر).**
ب- **أضف محلول مشبع من كلوريد الزئبق (مادة سامة قاتلة) الى المحلول السابق والى ان يتكون لدينا راسب بسيط ثابت .**
ج- **للمحلول السابق أضف 400 مل من 50% من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم في الماء.**
د- **اكمل الحجم الى 1 لتر بإضافة ماء مقطر واستعمل المحلول الرائق الخالي من الترسبات.**

- **دليل تروموسدورف Trommsdorf reagent**

أ- **اخلط 4 غم نشأ مع كمية من الماء (50 مل ماء).**
ب- **أضف ببطُ مع الرج المستمر 100 مل من محلول 20 % كلوريد الزنك بالماء الى المخلوط السابق.**
ج- **سخن على النار الى ان تذوب اكبر كمية من النشأ ويكون المحلول تقريبا رائق.**
د- **أضف 2 غم من ايوديد البوتاسيوم.**
ه- **اكمل الحجم الى لتر باضافة الماء المقطر.**

- **تحضير دليل Diphenylamine reagent**

أ- **أذب 0.7 غم من Diphenylamine في مخلوط من 60 مل من حامض الكبريتيك المركز و 28.8 مل من الماء المقطر (يتم التسخين عن الحاجة).**
ب- **برد ومن ثم أضف ببطُ 11.3 مل من حامض الهيدروكلوريك المركز.**

التجربة التاسعة

عزل الرايزوبيا من العقدة الجذرية

Isolation of Rhizobia from Nodules

من الفوائد الاقتصادية المهمة لبعض البكتريا هي تحويل النتروجين الحيوي الى مصدر جاهز للنبات (تثبيت النتروجين). أما تعايشيا مع النبات التابعة للعائلة البقولية عن طريق تكوين العقدة الجذرية بواسطة البكتريا التابعة للجنس Rhizobium أو بصورة حرة في التربة بواسطة البكتريا التابعة للجنس Azotobacter او التابعة للجنس Clostridium أو بواسطة بعض الطحالب الخضراء المزرقة (Blue Green Algae).

تختلف الرايزوبيا في كفاءتها في تثبيت النتروجين تبعا لنوعها ونوع النبات البقولي. إذا تعد الرايزوبيا تخصصية في عملها على النبات العائل ألبقولي فمثلا R.meliloti تصيب نبات الجت . و R.japonicum تصيب نبات فول الصويا ..... الخ.

ويمكن تقسيم العقد الجذرية المتكونة على جذور إي نبات بقولي الى قسمين تبعا لكفاءة التثبيت . العقد الجذرية الفعالة تتميز في إن المقطع العرضي لها ذو لون احمر أو وردي والعقد الجذرية غير الفعالة التي يكون المقطع العرضي لها ابيض.

عملية تكوين العقد الجذرية سوف تشرح لكم بصورة مفصلة في الدرس النظري . ولكن الهم ذكره هنا هو انه عند دخول الخلية البكترية إلى داخل خلايا الجذر عن طريق الشعيرات الجذرية سوف تتحول الى اشكال مختلفة تماما عن الشكل الأصلي للخلية الأصلية كان تكون بشكل X او بشكل Y او أي شكل اخر وتكون غير متحركة بخلاف الخلية الأصلية التي تكون متحركة ويطلق على هذه الإشكال أسم (Bacteroids). وهو ماسنشاهده داخل العقدة الجذرية عند فحصها تحت الميكروسكوب . حيث سوف نقوم بعزله من العقدة الجذرية تحت ظروف التعقيم ، وتحضير غشاء منه وتثبيته وصبغه وفحصه وكذلك سوف نقوم بتنميته على وسط غذائي خاص (Yeast extract manitol Agar) حيث سوف يتحول إلى Rhizobia والتي يمكن استعمالها كلقاح للتربة أو على جذور النباتات البقولية الخاصة بها لكي تكون عقدة جذرية جديدة.

<u>مواد التجربة : لكل مجموعة</u>

عقد جذرية لنبات بقولي متوفر

أطباق بتري صغيرة معقمة (لتعقيم سطح العقد الجذرية)

أطباق بتري معقمة للوسط الغذائي عدد 5

كلوريد الزئبق محمض تركيز 0.1 % ($Hgcl_2$ 1غم ، Hcl مركز 5 مل ، ماء مقطر 1000 مل).

كحول (Ethanol) تركيز 95%

ماء مقطر

قضيب زجاجي

الوسط الغذائي المستخدم مكون من المواد التالية :

Manitol	10 غم
K_2HPO_4	0.5 غم
$MgSo_4.7H_2o$	0.2 غم
Nacl	0.1 غم
Yeast extract	0.65 غم
Agar – Agar	18 غم
Distilled H_2o	1000 مل

عقم على درجة حرارة 121 م وضغط 15 باوند / انج ولمدة 15 دقيقة.

خطوات العمل

Æ طريقة الحصول على مزرعة نقية

1. أعمل مقطع عرضي في عقدة من العقدة الجذرية المتوفرة ولاحظ اللون . وقارن شكل وحجم وموقع العقد الجذرية على جذور النباتات المختلفة
2. خذ مجموعة من العقد الجذرية على جذر احد النباتات المتوفرة وضعها في طبق بتري يحوي على ماء معقم وذلك لغسل التربة العالقة بها (أقطع العقد الجذرية مع جزء صغير جداً من الجذر).

3. خذ عقدة جذرية واحدة وضعها في طبق بتري اخر يحتوي على $HgCl_2$ المحمض ولمدة 3-6 دقائق . رج جيدا بملقط معقم (لاحظ ان الهدف من استعمال الـ $HgCl_2$ المحمض هو لتعقيم سطح العقد الجذرية).
4. أنقل العقد الجذرية بعد انتهاء المدة الى طبق بتري اخر يحوي على كحول تركيزه 95% باستعمال ملقط معقم ولمدة 3 دقائق (رج جيداً).
5. أنقل العقدة الجذرية الى طبق أخر يحتوي على ماء معقم لتخليصها من بقايا المواد السامة. أغسل جيداً بتبديل الماء خمس الى ست مرات
6. أضف 1 مل من الماء المعقم الى كل من 5 اطباق بتري المعقمة.
7. أنقل العقدة الجذرية الى طبق بتري رقم (1) واسحق العقدة الجذرية بنهاية إبرة التلقيح المعقمة أو قضيب زجاجي معقم . اخلط محتويات العقدة مع الماء المعقم.
8. أنقل قطرة من المحلول المعلق في طبق رقم (1) بابرة التلقيح المعقمة الى طبق رقم (1) واخلط مع الماء المعقم.
9. انقل قطرة من الطبق رقم (2) الى رقم (3) ومن ثم رقم (3) الى رقم (4) ومن ثم الى رقم (5). لاحظ اننا خففنا اعداد البكتريا من طبق إلى أخر وذلك للحصول على مستعمرات منفردة ومعزولة عن بعضها.
10. أضف لكل طبق حوالي 15 مل من الوسط الغذائي الذائب والمبرد الى درجة حرارة 20 م وحرك كل طبق على شكل حرف S لخلط المحتويات مع الوسط الغذائي.
11. حضن الإطباق بصورة مقلوبة على درجة حرارة 28 م ولمدة اسبوع .
12. بعدها يمكن عزل مستعمرة من المستعمرات النامية على سطح البيئة والمعزولة عن بعضها إلى أنبوبة اختبار تحوي نفس الوسط الغذائي بصورة مائلة (Agar slant) وعند تنميتها في الحاضنة سوف تصبح مزرعة نفية من الرايزوبيا (البكتريا العقدية) ويمكن استعمالها في تلقيح التربة لزيادة اعدادها في التربة.
13. اعمل Gram staining ولاحظ نتيجة الصبغة ولاحظ ايضا حركة البكتيرا بالقطرة المعلقة.

خطوات العمل

ب. الفحص تحت الميكروسكوب

1. لتحضير سلايد من البكتريا وفحصه تحت الميكروسكوب توخذ عقد جذرية وتعقيم سطوحها بنفس الطريقة السابقة الذكر .
2. توخذ عقد جذرية او اكثر وتوضع داخل انبوبة اختبار ويضاف لها قطرة ماء معقم وتسحق بالقضيب الزجاجي المعقم.
3. توخذ قطرة من المحلول المعلق السابق وتوضع على سلايد نظيف وتفرش جيداً وتجفف في الهواء ومن ثم تثبيتها وذلك من خلال تمريرها من اعلى مصباح بنزن وتصبغ بعد ذلك باحدى الصبغات البسيطة بنفس الطريقة التي اخذت في الدروس السابقة.

4. أفحص تحت الميكروسكوب باستعمال العدسة الصغرى اولا ومن ثم باستعمال العدسة الزيتية بعد وضع قطرة من الزيت . لاحظ الاشكال المحتلفة للـ Bacteroids قارن ذلك مع الـ Bacteroids الماخوذة من عقد جذرية من محصول اخر ثم ارسم ماتشاهده.

أسئلة:

- أحسب عدد ملغرامات الكاربون المتحررة للمعاملات (فركتوز، سكروز، ببتون) إذا علمت أن حجم حامض الهيدروكلوريك HCl لعينة المقارنة (6.5 مل) وحجم الحامض للمعاملات (4.4 ، 3.2 ، 2.5 مل) على التوالي، علماً أن عيارية الحامض HCl (2 عياري)؟

- في تجربة لحساب عدد ملغرامات الكاربون المتحرر من التربة كان حجم حامض الهيدروكلوريك عند تسحيح عينة المقارنة (7.1 مل) والمعاملات ببتون و دكتروز و نشأ كان حجم الحامض لها (3.7 ، 5.2 ، 3.8) على التوالي، علماً أن عيارية الحامض HCl (1.5 عياري)؟

- أخذت تربة من منطقة الغابات وعوملت بمعاملات مختلفة من المواد العضوية (سكروز ، فركتوز ، ببتون) وبعد الوصول الى التسحيح بحامض الهيدروكلوريك HCl كان الحجم لعينة المقارنة (6.8 مل) والحجم للمعاملات (4.5 ، 4.2 ، 3.1) على التوالي .