## عد وعزل الاحياء المجهرية في التربة Enumeration and isolation of soil microorganism

تتكون بيئة التربة من جزء عضوي وجزء لاعضوي واخر حيوي , يشكل الجزء العضوي واللاعضوي المصدر الرئيسي للكاربون والطاقة والنيتروجين والعناصر الغذائية الاخرى الضرورية لنمو الجزء الحيوي وتكاثره في التربة . لذلك يلاحظ ان تعداد الاحياء المجهرية يكون اكبر في في الترب المزروعة مقارنة مع اعدادها في الترب غير المزروعة نتيجة زيادة كثافة الجذور وزيادة المحتوى العضوي والرطوبة , كذلك تزداد البكتيريا في المناطق الدافئة والرطبه في الطبقة السطحية من ( 0 – 30 سم ) حيث تتوافر نسبة عالية من المواد العضوية والاوكسجين والرطوبة وتقل الاعداد كلما تعمقنا في التربة .

ويزداد نشاط الاحياء الدقيقة في مختلف انواع التربة في فصل الربيع والذي يعود الى غنى التربة بالبقايا النباتية الميتة اثناء فصل الخريف والشتاء الى جانب توافر الرطوبة والحرارة , كما لسرعة نمو هذه الاحياء اهمية في تحديد سيادة مجموعة على اخرى.

لا توجد الاحياء المجهرية حرة في محلول التربة عادة وإنما ملتصقة بحبيباتها او متجمعة في المواقع المناسبة الدقيقة داخل التربة او ملتصقة بالإفرازات المخاطية للبكتيريا على سطح التربة.

**تقسم الاحياء المجهرية في التربة الى مجاميع هي :**

1- البكتريا Bacteria
2- البكتريا الخيطية Actinomycetes
3- الفطريات Fungi
4- الطحالب Algae
5- الابتدائيات Protozoa

## جمع العينات Samples collection

يجب أن تخضع عملية جمع عينات التربة ألمعده لعزل الأحياء ألمجهريه منها إلى عدة نقاط هي:

1. العشوائية Randomization:
يجب أن تجمع عينة التربة بطريقه عشوائية لكي تعطي تمثيلا حقيقيا للمجتمع الميكروبي في موقع محدد لان عملية الاختيار وتحديد موقع محدد لا يعين المجتمع الميكروبي بشكل حقيقي.

2. الحجم Size:
يجب أن يكون حجم العينة المراد دراسة المحتوى الميكروبي لها بحجم مناسب (1-2 كغم) من كل موقع من المواقع الخاصة بالدراسة لاحتمال حصول تلف في أكياس الحفظ أو حصول خطأ في التجربة أو غيرها من الأسباب.

3. الحفظ Preserving:
يجب أن تحفظ العينات بدرجة حرارة واطئه وينقل بدرجة حرارة (4م) أو بدرجة حرارة الغرفة.

4. الموقع Location:
إن عملية اختيار الموقع عمليه مهمة وهي واحده من النقاط الاساسيه التي من خلالها يتم إعطاء بيانات تعزز المجتمع الميكروبي لذلك الموقع وبعكسها سوف تصبح عديمة ألجدوى لأنها لا تمثل موقعا محددا.

5. التعليم والتاريخ Labeling & Date:
تعد عملية تعليم العينات ووضع تاريخ على الحاويات التي تحتوي على النموذج (التربة) مهمة جدا لكي لاتختلط العينات الماخوذه من مناطق مختلفة وفي أزمان مختلفة.

## عد وعزل البكتيريا Isolation of bacteria

تحتل البكتيريا كمجموعة رئيسية من كائنات التربة مكانا بارزا ,فهي أكثر المجموعات تواجدا في التربة وتتفوق عددا على باقي المجاميع مجتمعة.

الخلية البكتيرية المفردة صغيرة في الحجم حيث نادرا ما يتجاوز طولها عدة مايكرونات.من المعروف أن سيادة نوع من الأحياء تتحدد تبعا للظروف البيئية السائدة ,فالبكتيريا والفطريات تصبح سائدة في التربة عندما تتوفر ظروف تهوية مناسبة ,أما في حالة نقص الأوكسجين فان البكتيريا تكون هي المسئوولة عن التغيرات الحيوية والكيميائية دون الاعفان.

تتميز البكتيريا عن باقي المجاميع التي تشترك معها في نفس العمليات الحيوية في التربة بسرعة تكاثرها وقدرتها الفائقة على تحليل أنواع كثيرة من المواد الطبيعية. يمكن تقسيم بكتيريا التربة إلى قسمين رئيسيين: -

أ- البكتيريا المتأصلة في الموطن

وهي التي تستوطن التربة بصورة طبيعية ودائمة وتساهم بفعالية في النشاطات الكيميائية الحيوية فيها .وتتميز بقدرتها على مقاومة الظروف غير المناسبة لفترات طويلة وبسرعة استجابتها لإضافة العناصر المغذية العضوية.

ب- البكتيريا الدخيلة على التربة

وهي التي تصل التربة مع الأمطار أو الأنسجة المريضة أو مخلفات الإنسان والحيوان .هذه الأنواع تظل حية لفترات قصيرة ولا تشارك بفعالية في عملية تحويل العناصر في التربة,كما لا تشارك في أي نوع من العلاقات مع غيرها من كائنات التربة.

توجد عدة طرق لعد الاحياء المجهرية في التربة وذلك لعدم وجود طريقة مثلى تهيئ جميع متطلبات النمو , الا ان هذه الطرق تعطي فكرة تقريبية عن العدد التقريبي , وعدد الاحياء المجهرية الموجودة في التربة من هذه الطرق :

- **طريقة العد بالاطباقPlate count method**

تستعمل الطريقة لحساب اعداد الاحياء المجهرية الحية فقط Viable count

**المواد والادوات المطلوبة**

- عينات تربة ( مزروعة , غير مزروعة , رملية )
- انابيب اختبار حاوية على 9 مل ماء مقطر معقم .
- اطباق بتري وماصات معقمة
- وسط الاكار المغذي Nutrient agar معقم , لغرض عزل البكتريا
- وسط اكار البطاطا والدكستروز Potato Dextrose agar معقم , لغرض عزل الفطريات .

**طريقة العمل**

1- تؤخذ نماذج التربة من عمق 5 – 10 سم , وتجلب بسرعة الى المختبر واذا طال الوقت عن الـ3 ساعات فيجب ان تحفظ العينة في الثلاجة او في صندوق خاص معد لتبريد وحفظ العينات .
2- وزن 1 غرام من التربة وتعلق فيانبوب زجاجي حاوي على9 مل ماء مقطر معقم وبذلك يتم الحصول على التخفيف $10^{-1}$يرج جيداً مدة 5 دقائق ويترك فترة من الزمن كي تترسب دقائق التربة .
3- ينقل 1 مل من راشح التخفيف $10^{-1}$ويضاف الى انبوبة حاوية على 9 مل ماء مقطر معقم للحصول على التخفيف $10^{-2}$ , وهكذا يتم عمل التخافيف الى $10^{-5}$.
4- في حالة استخدام **طريقة الصب في الطبق** , ينقل 1 مل من التخافيف $10^{-2}$ , $10^{-3}$, $10^{-4}$ الى اطباق بتري معقمة وفارغة ثم يصب وسط الاكار المغذي بدرجة حرارة 45 م ويحرك الطبق على شكل الحرف 8 لمزج المكونات وتترك الى ان تتصلب , **اما في حالة طريقة النشر في الطبق** ينقل 0,1 مل من التخافيف السابقة الى اطباق بتري معقمة وحاوية على وسط الاكار المغذي وتنشر العينة بواسطة الناشر الزجاجي المعقمL- shape , تحضن الاطباق عند درجة حرارة 30 – 35 م لمدة 24 – 48 ساعة .
5- في حالة عزل البكتريا الهوائية والمكونة للابواغ توضع أنابيب التخفيف في حمام مائي عند درجة 62.9 درجة مئوية لمدة 30 دقيقة .
6- لعزل الفطريات تتبع نفس الطريقة كما في الخطوة ( 4) , مع فرق استخدام الوسط PDAوتحضين الاطباق عند درجة 28 م لمدة 3 – 5 ايام .
7- تسجل النتائج بملاحظة اشكال المستعمرات ( البكتريا والفطريات ) حسب القانون .

| | | |
|---|---|---|
| عدد الخلايا / 1 غرام تربة | = | متوسط عدد المستعمرات × مقلوب التخفيف<br>وزن نموذج التربة ( غرام) |

## عزل البكتريا الخيطية Actinomycetes

تحتل البكتريا الخيطية مكانة مهمة في البيئة فهي مسؤولة عن انتاج نصف المواد الايضية الفعالة والتي لها تطبيقات واسعة في مجالات مختلفة منها الزراعة والطب والصيدلة اذ لها القدرة على انتاج المضادات الحيوية ومضادات الاورام وانتاج الانزيمات . تعد البكتريا الخيطية من المجاميع الموجبة لصبغة كرام , حرة المعيشة , رمية وتكون مستعمراتها جلدية القوام هشة ، طباشيرية شمعية او متميعة او مخاطية . وتكون غزلا هوائيا وارضيا ، تظهر المستعمرات بالوان مختلفة منها العسلي والرمادي الغامق والفاتح والاحمر والبرتقالي .

تنتشر البكتريا الخيطية وخصوصا الجنس Streptomyces في الماء والهواء والتربة ولاسيما المنطقة المحيطة بالجذر . ولها دور مهم في تحليل المواد العضوية في التربة واذابة الفوسفات .

### المواد والادوات المطلوبة

1- عينة تربة مضاف لها كاربونات الكالسيوم بنسبة ( 10 تربة: 1 كاربونات ) .
2- انابيب اختبار حاوية على 9مل محلول ملحي معقم , واطباق بتري معقمة .
3- وسط اكار مستخلص الخميرة والكليسيرول

### طريقة العمل

1- بعد مزج عينات التربة مع كاربونات الكالسيوم حضنت في الحاضنة عند درجة حرارة 40 م لمدة 4 ايام .
2- بعد التحضين عمل سلسلة تخافيف من التربة بوضع 9 مل محلول ملحي في كل تيوب زجاجي وكما مذكور سابقا حسب طريقة الصب في الاطباق .
3- حضن الاطباق المزروعة عند درجة حرارة 28 م لمدة 7 – 14 يوم
4- قراءة النتائج يعتمد على ملاحظة شكل المستعمرات الطباشيري او الشمعي ورائحة المستعمرات المشابه لرائحة نزول الامطار على التربة .
5- ملاحظة شكل الخلايا اعتمادا على صبغة كرام .