الفصل الثالث

طرق تداول المسببات المرضية

نتناول بالدراسة فى هذا الفصل بعض الطرق العملية لأمراض النبات التى يتعين على المشتغل بالتربية لمقاومة الأمراض أن يكون ملما بها . وإلى جانب هذه الطرق العملية .. فإن على المربى أن يكون ملما كذلك بكثير من الحقائق المتعلقة بالمرض الذى يعمل عليه ؛ من حيث المسبب المرضى ، وأعراض المرض ، والتفاعل بين العائل والطفيل ، وتأثير العوامل البيئية فى كل منهما .

فبداية .. يتعين على المربى أن يتعرف على الطرق التى تمكنه من إنتاج اللقاح (المسبب المرضى أو مصدر العدوى) Inoculum بكميات تكفى لإجراء اختبارات التقييم ، وفى الوقت المناسب لإجراء العدوى . ولذا .. يلزم أن يكون المربى ملما بطرق زراعة المسببات المرضية المختلفة فى البيئات الصناعية ، وطرق تحضير هذه البيئات ، وتأثير مختلف العوامل البيئية على نمو المسببات المرضية بها . كذلك يلزم التعرف على طرق تقدير معدل النمو فى هذه البيئات الصناعية ، وكيفية استخلاص اللقاح وتجهيزه فى صورة صالحة للحقن (العدوى) به ، دون حدوث أى تسمم للنباتات Phytotoxicity من البيئة ذاتها .

ومن المعلوم أن الطفيليات الإجبارية Obligate Parasites (مثل : فطريات الأصداء ، والبياض الدقيقى ، والبياض الزغبى ، وكل النيماتودا ، و الفيروسات التى تسبب أمراضا نباتية) لا يمكنها النمو فى البيئات الصناعية ، ولذا .. كثيرا ما يلجأ المربى إلى استخدام أجزاء نباتية مصابة كمصدر للعدوى بها . ومع ذلك .. فقد أمكن زراعة عديد من فطريات

الأصداء فى بيئات صناعية ذات مواصفات خاصة ، كما أمكن تربية النيماتودا المسببة للأمراض النباتية فى مزارع الأنسجة .

كذلك يتعين على المربى الإلمام بطرق الحصول على مزارع نقية من جراثيم أو خلايا مفردة Monospore Cultures ؛ ليمكن تحديد التركيب الوراثى للقاح المستخدم فى التقييم.

كما يتطلب العمل بعزلة معينة من المسبب المرضى المحافظة عليها لفترة طويلة دون أن تفقد حيويتها ، أو تتعرض لتغيرات وراثية ، وهو ما يتطلب إلمام المربى بأفضل الطرق لتحقيق هذا الهدف .

ومن الأهمية بمكان إلمام المربى بطرق عزل المسببات المرضية من التربة أو من الأنسجة المصابة ، وتوفر طرق عديدة لتحقيق ذلك ، تختلف من مسبب مرض لآخر ، وتركز جميعها حول محاولة عزل المسبب المرضى منفردا ، وبعيدا عن الكائنات الدقيقة الأخرى التى تكون موجودة معه .

وبعد عزل وإنتاج المسبب المرضى .. يتعين إلمام المربى بطرق قياس تركيز اللقاح المستخدم Inoculum فى صورة عدد معين من الخلايا البكتيرية ، أو الجراثيم الفطرية ، أو الأجزاء المعدية من المسبب المرضى فى كل ملليلترمن المعلق المستخدم فى الحقن ، سواء أكان التقدير مباشرا ، أم بطرق غير مباشرة .

وإلى جانب ما تقدم .. فإن على المربى أن يكون ملما بالحقائق العلمية المتعلقة بحدوث الإصابة ، والطرق التى يُحدث بها المسبب المرضى الإصابة ، والكيفية التى تحدث بها الأعراض المرضية ، ليتسنى فهم طبيعة المقاومة للمرض .. فمثلا .. يجب أن يكون المربى ملما بالخطوات والتغيرات التى تصاحب إنبات الجراثيم فى التربة ، وتأثير إفرازات الجذور Root Exudates ، والكائنات الدقيقة التى تعيش بالقرب من الجذور Rhizosphere Microflora فى هذا الشأن . كما يلزم التعرف على الطريقة التى يحدث بها الاختراق Penetration ، والخطوات التى تسبق وتصاحب عملية الإصابة Infection ، وكيف يتمكن المسبب المرضى – بالوسائل الميكانيكية والكيميائية – من التغلب على العقبات

التى يضعها العائل فى طريقه .

وفى هذا الفصل .. نلقى الضوء على الأمور الهامة التى يتعين على المربى الإلمام بها؛ بخصوص كيفية تداول مسببات الأمراض . أما التفاصيل الخاصة بهذا الموضوع .. فيمكن الرجوع إليها فى أحد المصادر المتخصصة ؛ مثل :

المرجع	الموضوع
Alexopoulos & Beneke (١٩٦٢)	الطرق المعملية لدراسة الفطريات
Maramorosch & Koprowski (١٩٦٧)	الطرق العملية لدراسة الفيروسات
Kadd & Agrawal (١٩٧٢)	أساسيات وطرق دراسة الفيروسات
Commonwealth Agr. Bur. (١٩٨٣)	أساسيات وطرق دراسة مختلف مسببات الأمراض
Hill (١٩٨٤)	الطرق العملية لدراسة الفيروسات
Green (١٩٨٤)	مختصر للطرق العملية لدراسة الفيروسات
Dhingra & Sinclair (١٩٨٥) .	الطرق المعملية لدراسة البكتيريا والفطريات ، مع شرح مئات من بيئات الزراعة .

طرق التطهير والتعقيم

المصطلحات المستخدمة

١ – التعقيم Sterilization :

يقصد بالتعقيم التخلص من جميع مظاهر الحياة فيما يتم تعقيمه من بيئات ، أو مواد ، أو أدوات ، أو تربة ... إلخ ، ويطلق على المواد التى تستخدم فى التعقيم اسم معقمات .

٢ – التخلص من الإصابة Disinfection :

يعنى بذلك تخليص الكائن الحى مما يوجد به من إصابات بكائنات أخرى باستخدام ما يعرف باسم Disinfectants . وإذا استخدم المصطلح مع أشياء غير حية كالأدوات ، والحوائط ، والأرضيات – وهو استخدام غير دقيق – فإنه يعنى تخليصها مما قد يوجد بها من كائنات دقيقة ممرضة .

٣ – مضادات الكائنات الدقيقة Antiseptics :

يعنى بذلك المواد التى تمنع ، أو توقف نشاط الكائنات الدقيقة ، أو تقتلها ، وتستخدم هذه المواد – عادة – مع الأنسجة الحية .

٤ – المطهرات Disinfestants :

يستخدم هذا المصطلح للدلالة على المركبات أو العوامل الفيزيائية التى تستخدم فى التخلص من الكائنات الدقيقة التى توجد على الأسطح النباتية ، أو فى بيئة النبات ، أو على الأشياء غير الحية .

وتستخدم اللاحقة cide فى آخر الكلمات لتعنى القاتل (مثل : bactericide ، و Fungi-cide) ، بينما تستخدم اللاحقة stat لتعنى موقف النمو أو مانع النمو (مثل : bacteristat، وfungistat) .

إجراءات النظافة والوقاية من التلوث

يتعين توخى إجراءات النظافة العامة فى مختبر التربية لمقاومة الأمراض ؛ لتجنب تلوث مزارع المسببات المرضية بكائنات غير مرغوب فيها ، حيث تلزم مراعاة ما يلى :

١ – النظافة العامة المستمرة للمختبر .

٢ – منع دخول الهواء المحمل بالأتربة بغلق النوافذ واستعمال أجهزة تكييف الهواء عند الضرورة.

٣ – ارتداء ملابس وأحذية نظيفة أثناء العمل فى المختبر .

٤ – استعمال هواء مرشح فى حجرات عزل المسببات المرضية .

٥ – تعقيم مزارع مسببات الأمراض التى يرغب الباحث فى التخلص منها – فى الأوتوكليف – قبل فتحها لغسيلها .

٦ – الحرص عند تداول العينات ، أو البقايا النباتية ، أو التربة الحاملة لجراثيم الفطريات ؛ لمنع تلوث المختبر بها .

٧ – تنظيف الزجاجيات جيدا بالماء والصابون والفرشاة قبل استخدامها . ويعتبر حامض الكروميك Chromic Acid أكثر المحاليل استخداما لتنظيف الزجاجيات لأغراض

الدراسات الكمية ، وللتخلص مما قد يوجد بها من صبغات . يحضر الحامض بوضع ٢٥٠ مل من حامض الكبريتيك المركز فى دورق مخروطى سعة ٥٠٠ مل ، ووزن ٢٠ – ٣٠ جم من ثانى كرومات البوتاسيوم ، ثم إضافتها ببطء مع التقليب بقضيب زجاجى إلى أن يتفاعل كل حامض الكبريتيك مع الملح المضاف ، ويتبقى ما يزيد منه مترسبا فى قاع الدورق . يخزن حامض الكروميك فى زجاجة حامض ، ويغلق جيدا بسدادة زجاجية ، ويوضع على قاعدة خشبية لاستقبال قطرات الحامض التى قد تنزلق على جانب الزجاجة .

المطهرات

من أكثر المحاصيل المطهرة Disinfecting Solutions استخداماً مايلى :

١ – محلول كلوريد الزئبقيك Mercuric Chloride بتركيز واحد فى الألف :

يستخدم هذا المحلول لتطهير الأيدى ، والأسطح التى يجرى العمل عليها ، والعينات النباتية ، ويحضر بإذابة جرام واحد من كلوريد الزئبقيك فى لتر ماء . وتتوفر أقراص من كلوريد الزئبقيك موزونة سلفا ، وتحتوى على صبغة مميزة للتحذير .

٢ – محلول الهيبوكلوريت Hypochlorite Solution :

يستخدم هذا المحلول فى تطهير العينات النباتية ، ويحضر بإضافة ٣٠ جم من هيبوكلوريت الكالسيوم إلى ٤٢٠ مل ماء ، مع الرج جيدا ، ثم الترشيح فى دورق مخروطى وإغلاقه بإحكام . كما يمكن استخدام الكلوراكس التجارى فى تحضير محلول الهيبوكلوريت بعد تخفيفه بالماء بنسبة ١ : ١٠ ، ويحضر المحلول أولا بأول حسب الحاجة إليه .

ويراعى عند الرغبة فى تطهير العينات النباتية – التى يصعب بلّها تماما بالمحلول المطهر غسلها – بكحول إيثيلى ٧٠ ٪ ، أو بمحلول لمادة مبللة مثل التوين ٢٠ Tween 20 (نقطة أو نقطتان فى لتر ماء) قبل معاملتها بالمطهر .

المعقمات ومعاملات التعقيم

فيمايلى بيان بأهم المركبات الكيميائية ، والمعاملات الفيزيائية التى تستخدم فى التعقيم:

١ - السوائل والمحاليل

أ - الكحولات Alcohols :

إن أهم الكحولات التى تستخدم لأغراض التعقيم هى كحول الإيثيل Ethyl ، والأيزوبروبيل Isopropyl ، والبتريل Benzyl . ويعاب على الكحولات أنها ليست قاتلة للجراثيم البكتيرية . ويعتبر كحول الإيثيل المطلق (١٠٠ ٪) أقل فاعلية - فى قتل البكتيريا - من الكحول المخفف ببعض الماء . وأفضل تركيز لهذا الغرض بتراوح من ٦٠ - ٨٠ ٪ . وتزداد سمية الكحولات كمعقمات كلما ازداد وزنها الجزيئى ، ولذا .. فإن كحول الأيزوبروبيل أكثر سمية من كحول الإيثيل .

ب - الفينولات Phenols :

تعمل الفينولات إما كمعقمات Germicides ، أو كموقفات لنشاط الكائنات الدقيقة Germistatic ويتوقف ذلك على تركيزها . وتكون بعض الفينولات شديدة الفاعلية ضد الفطريات . وتزداد فاعلية الفينولات عند احتوائها على الكلور أو الهالوجنيات الأخرى . تستخدم الفينولات بتركيزات منخفضة ، وهى سامة للإنسان ويلزم تجنب ملامستها أو استنشاقها .

جـ - المعادن الثقيلة وأملاحها :

إن أهم المعادن الثقيلة هى : الزئبق ، والفضة (وكلاهما قاتل للبكتيريا والفطريات) ، والنحاس (وهو قاتل للفطريات فقط) . تكون هذه العناصر فعالة بتركيزات منخفضة للغاية، تصل فى حالة الفضة إلى جزء واحد فى كل ١٠٠ مليون جزء ، وتكون هذه العناصر مثبطة فقط لنمو الكائنات الدقيقة فى التركيزات الأقل من ذلك .

د - الهالوجينات Halogens :

يعتبر الفلورين أكثر الهالوجنيات سمية ، يليه الكلورين والبرومين ، بينما يعد الأيودين أقلها سمية . وبينما لا يشيع استخدام البرومين لما يسببه من مضايقات للعاملين به ، فإن الكلورين يعد أكثرها استخداما ، ويستخدم لذلك هيبوكلوريت الصوديوم (الكلوراكس

التجارى) ، وهو يتبخر ، لذا .. يلزم تحضيره أولا بأول حسب الحاجة .

٢ - الغازات والأبخرة

إن أكثر المعقمات استخداما على صورة غازات ، أو أبخرة هى تلك التى تستعمل للتخلص من البكتيريا ، وهى : الفورمالدهيد ، والأوزون ، وأكسيد الإيثيلين ، وأكسيد البروبلين، وجميعها تستخدم فى تعقيم العينات النباتية أيا كانت ، حيث توضع فى حيز مغلق مع كمية معينة من المركب (مثلا .. يستعمل ملليلتر واحد من أكسيد البروبلين / لتر من الحيز الذى تجرى فيه عملية التعقيم) ، علما بأن أكسيد البروبلين يتبخر على درجة ٩ر٣٣°م ، بينما يتبخر أكسيد الإيثيلين على ٧ر١٠°م ، و بينما يكون الأول قابلاً للإشتعال ، فإن الثانى متفجر، ولذا .. فإنهما يحفظان دائما فى الثلاجة .

ويحافظ التعقيم بالغازات على المركبات الحساسة للحرارة التى قد تفقد خصائصها المميزة إذا ما عقمت بالحرارة .

٣ - الحرارة

تعتبر " الحرارة الرطبة " Wet Heat (مثل : بخار الماء أو الماء) أكثر فاعلية من الحرارة الجافة Dry Heat (مثل الأفران) فى التخلص من الكائنات الدقيقة عند تساوى درجة الحرارة المستخدمة فى كليهما .

ويكفى - عادة - التعقيم لمدة ١٠ دقائق فى ماء يغلى للتخلص من الطرز الخضرية للكائنات الدقيقة ، ولكن ذلك لايكون كافيا للتخلص من الجراثيم البكتيرية وبعض الجراثيم الفطرية . ويمكن التخلص من غالبية الجراثيم بتعريض البيئة التى يراد تعقيمها لماء يغلى لمدة ٢٠ - ٣٠ دقيقة يوميا خلال ثلاثة أيام متتابعة . كذلك يتم التخلص من معظم الجراثيم لدى التعرض لحرارة ١٢١°م لمدة ١٥ - ٢٠ دقيقة ، وهو ما يجرى فى الأوتوكليف .

ويلزم - عند استخدام الأوتوكليف - التخلص تماما مما يوجد فيه من هواء قبل السماح بزيادة الضغط بداخله ، لأن الهواء يعد عازلا حراريا جيدا . وتحسب الفترة اللازمة للتعقيم - على درجة الحرارة المرغوبة - بعد وصول الحرارة داخل الأوتوكليف إلى تلك الدرجة . وتتوقف فترة التعقيم المناسبة على حجم الدوارق أو الأجسام التى يراد تعقيمها ، حيث تزيد

الفترة طرديا مع الزيادة فى الحجم ؛ لضمان وصول جميع أجزاء المادة المعقمة إلى درجة الحرارة المرغوبة .

هذا .. ويكون التعقيم باستخدام " الحرارة الجافة " – أى فى الأفران – على درجات حرارة أعلى مما يكون عليه التعقيم باستخدام " الحرارة الرطبة " ، فمثلا .. يكون التعرض لدرجة حرارة ١٦٠ ° م لمدة ٦٠ دقيقة فى الفرن مساويا – تقريبا – للتعريض لدرجة حرارة ١٢١°م لمدة ١٠ – ١٢ دقيقة فى الأوتوكليف . وتعقم الزجاجيات ، والزيوت ، والأدوات فى الأفران على درجة ١٦٠ – ١٧٠ °م لمدة ساعة ونصف الساعة إلى ساعتين . ويشترط أن تكون الزجاجيات جافة قبل إدخالها فى الأفران ، وأن يكون تعقيمها قبل الحاجة إليها بوقتٍ كاف ، لكى تنخفض حرارتها إلى درجة حرارة الغرفة .

٤ – الترشيح Filtration

يمكن فصل البكتيريا والكائنات الدقيقة الأكبر منها حجما عن معظم السوائل بالترشيح . وإذا ما أريد الإبقاء على السائل المرشح معقما ، فإنه يتعين تعقيم جهاز الترشيح والإناء الذى يستقبل فيه السائل المرشح قبل إجراء عملية الترشيح . وتعقم بهذه الطريقة جميع السوائل التى يتغير تركيبها إذا ماعقمت بالحرارة أو بالكيماويات .

ويستخدم فى تعقيم السوائل عدة أنواع من المرشحات ، منها ما يلى :

Chamberland Filter .

Diatomaceous Earth Filters.

Asbestos Pad Filter (Seitz) .

Sintered Glass Filters.

Millipore Filters.

Plaster - of - Paris Filters.

تختلف هذه المرشحات فى الشحنة الكهربائية التى تحملها ، وفى سعة ثقوبها ، وفى قدرتها على ادمصاص جزيئات معينة – مثل الإنزيمات والفيروسات – من السوائل التى تمر من خلالها ، و فى صلاحيتها لتكرار استعمالها ، وكذلك فى الوسائل المناسبة لتنظيفها

عقب استخدامها .

٥ – التعريض للإشعاع Irradiation

يتميز التعقيم بالإشعاع بإمكان تجنب التأثير السلبى للحرارة العالية ، وكثير من التغيرات الكيميائية التى يحدثها التعقيم بالحرارة ، أو بالكيماويات . . وتقسم الأشعة التى تستخدم فى التعقيم إلى نوعين كما يلى : –

أ – الأشعة المؤينة Ionizing Radiations :

من أمثلتها أشعة X ، وأشعة جاما Gamma ، وبيتا Beta ، والنيترونات ، والبروتونات ، والديوترونات Deuterons ... إلخ . تستخدم هذه الأشعة فى تعقيم البيئات والأدوات التى يخشى عليها من الحرارة العالية ، وهى تختلف من حيث قدرتها على اختراق الأجسام التى تكون فى طريقها ، وتعد أشعة جاما أكثرها قدرة ، يليها أشعة X .

ب – الأشعة الكهرومغناطيسية والأشعة فوق الصوتية Utrasonic Rays :

من أمثلتها الأشعة فوق البنفسجية Ultraviolet ، وتحت الحمراء Infra Red ، والموجات فوق الصوتية . وليس للأشعة تحت الحمراء تأثير قاتل على البكتيريا باستثناء تأثيرها الحرارى . وأكثر موجات الأشعة فوق البنفسجية تأثيرا هى التى تتراوح من ٢٤٠ – ٢٨٠ ملى ميكروناً . ونظرا لأن قدرتها على اختراق الأجسام محدودة .. لذا فإنها تستخدم فى تعقيم الأسطح والهواء .

طرق تعقيم البذور

يجب أن تكون البذور التى يراد تعقيمها سليمة تماما ، وخالية من الجروح والإصابات الميكانيكية . وتعقم البذور بإحدى الوسائل التالية :

١ – غمر البذور فى مخلوط من الكلوراكس Chlorax ، والإيثانول ٩٥ ٪ بنسبة ١ : ١ لمدة دقيقة ونصف إلى دقيقتين ، على أن تغسل بعد ذلك مباشرة – عدة مرات – بالماء المعقم، ثم تجفف باستخدام ورق ترشيح معقم .

٢ – وضع البذور فى طبقة رقيقة فى طبق بترى ، ويوضع بجانبها زجاجة ساعة بها ورقة ترشيح مطوية يوضع عليها أربع نقط من البانوجن Panogen (وهو مركب Methyl Mercury dicyandiamide بتركيز ٢ر٢ ٪) . يغطى الطبق ويترك داخل كيس بلاستيكى فى حرارة الغرفة لمدة ٤٨ ساعة ، حيث تصبح البذور بعد ذلك معقمة تماما .

٣ – غمر البذور فى حامض الكبريتيك المركز لمدة ٣٠ دقيقة فى حرارة تقل عن ٢٥°م مع التقليب كل عدة دقائق ، ثم يصفى الحامض ، وتغسل البذور بعد ذلك مباشرة من ثمانى مرات إلى تسع مرات بالماء المقطر المعقم ، على أن تستخدم كميات كبيرة من الماء – خاصة فى المرة الأولى – لتجنب أى ارتفاع حاد فى درجة حرارة البذور . ويلى ذلك غسيل البذور فى ١٠٠ مل من الماء المقطر المعقم المضاف إليه ٢ –٣ مل من ٣٠ ٪ فوق أكسيد الأيدروجين.

تعقيم النيماتودا

يلزم تعقيم النيماتودا عند الرغبة فى نقلها إلى الآجار فى أنابيب الاختبار ، أو عند الرغبة فى إكثارها على مزارع الجذور أو الكالس ، وتتم عملية تعقيم النيماتودا كما يلى :

١ – يحصل على النيماتودا المرغوبة من التربة أو النباتات المصابة باستخدام قمع بيرمان Baermann ، وتبدأ إجراءات التعقيم بعد ذلك مباشرة وهى مازالت فى حالة نشطة.

٢ – تغسل النيماتودا ٤ – ٥ مرات بماء مقطر معقم ، مع ترسيب النيماتودا – بعد كل مرة غسيل – باستخدام جهاز طرد مركزى ، والتخلص من ماء الغسيل (الرائق العلوى) باستعمال ماصة .

٣ – توضع النيماتودا بعد ذلك فى محلول Hibitane diacetate بتركيز ١ر٠ – ٥ر٠ ٪ ، لمدة ٥ – ٢٠ دقيقة ، حيث يستخدم التركيز المنخفض – لفترة طويلة – مع النيماتودا الحساسة للمركب .

٤ – تعقيم النيماتودا الحساسة لـ Hibitane بتعريضها ٤ – ٥ مرات لمخلوط ، مكون من ٢٠٠ جزء فى المليون malachite green ، و١٠٠٠ جزء فى المليون من كبريتات الاستربتومايسين Streptomycin sulfate .

٥ – تنقل النيماتودا بعد ذلك إلى مزارع الكالوس ، أو إلى مزارع الجنور ، ويكون نقل النيماتودا إما مفردة باستخدام إبرة تشريح ، وإما متجمعة بواسطة ماصة . ويمكن تحضير نسيج الكالوس بتطهير بنور البرسيم الحجازى بواسطة محلول السليمانى ، ومعاملة البادرات بالمبيد 2,4 - D بتركيز ٤ مجم / لتر لمدة دقيقة واحدة ، ثم تنميتها لمدة أسبوع على بيئة White فى أنابيب اختبار .

بيئات زراعة مسببات الأمراض

البيئات الشائعة الاستخدام

١ – بيئة البطاطس والدكستروز والآجار Potato – Dextrose – Agar (PDA) :

تستخدم هذه البيئة لمزارع الفطريات بوجه عام ، وتحضر من المكونات التالية :

المكـــون	الكمـيـة
شرائح بطاطس كاملة	٢٠٠ جم
دكستروز	٢٠ جم
آجارمطحون	١٧ جم
ماء	١٠٠٠ مل

تقطع البطاطس إلى شرائح وتوضع فى ٥٠٠ مل ماء على درجة الغليان لمدة ٤٠ دقيقة . يسخن ٥٠٠ مل أخرى من الماء إلى درجة الغليان ، ثم يضاف إليها الآجار المطحون مع التقليب . ويراعى تقليل اللهب أثناء إضافة الآجار حتى لا يحدث فوران . يستمر التقليب لحين ذوبان كل الآجار . يلى ذلك إضافة الدكستروز إلى الآجار ، ثم يضاف إليها مستخلص البطاطس ، ويكمل الحجم إلى ١٠٠٠ مل .

٢ – بيئة البطاطس والدكستروز Potato – Dextrose – Broth (PDB) :

تتشابه تماما مع بيئة الـ PDA ، ولكن ينقصها الآجار ، وبذا .. فهى بيئة سائلة .

٣ – بيئة الآجار المغذى Nutrient Agar (NA) :