التعقيم على حجم أوعية البيئات كما يلى :

الـوعاء	المـدة
دوارق مخروطية سعة ٢٠٠٠ – ٣٠٠٠ مل	٢٠ دقيقة
دوارق مخروطية سعة ١٠٠٠ – ١٥٠٠ مل	١٥ دقيقة
دوارق مخروطية سعة ٥٠٠ مل	١٢ دقيقة
دوارق مخروطية سعة ١٢٥ – ٢٥٠ مل	١٠ دقائق
دوارق مخروطية سعة ٥٠ مل	٣ – ٦ دقائق
أنابيب اختبار	٣ – ٦ دقائق

الماء المعقم

يطلق على أنابيب الاختبار التى يحفظ فيها الماء المعقم(ماء الصنبور أو الماء المقطر) اسم Water Blanks . ويوضع عادة نحو ١٠ – ١٥ مل من الماء فى كل أنبوبة اختبار ، ثم تغلق بالقطن وتعقم . كما قد تستخدم أحجام مختلفة من الدوارق المخروطية لنفس الغرض . وتفيد الـ Water Blanks فى تخفيف البيئات المعقمة ، وفى تحضير معقمات البكتيريا أو الجراثيم الفطرية ... إلخ .

عزل المسببات المرضية

عزل الفطريات

لعزل الفطريات من النباتات ، فإن الأجزاء المصابة تغسل أولا فى الماء مع مسحوق الصابون ، ثم تجفف بين مناشف ورقية . ويراعى أن تكون عملية الغسيل لفترة قصيرة بالنسبة للأعضاء النباتية الرهيفة كالأوراق الرقيقة وبتلات الأزهار ، بينما قد يستمر الغسيل لمدة ساعة إلى ساعتين فى ماء جار بالنسبة للجذور .

ويلى غسيل الأجزاء النباتية تطهيرها سطحيا إما باستخدام هيبوكلوريت الصوديوم (الكلوراكس التجارى) بتركيز ٥ – ١٠ ٪ ، وإما باستخدام كلوريد الزئبقيك (محلول السليمانى) بتركيز ١ : ٥٠٠ ، أو ١ : ١٠٠٠ . وتتراوح مدة المعاملة من عدة ثوان إلى عدة

دقائق حسب العضو النباتى وتركيز المحلول المطهر . كما يمكن تطهير الأنسجة الخشبية بغمسها فى كحول إيثيلى ٧٠ ٪ ثم إشعال الكحول . تنقل أجزاء صغيرة من الأنسجة النباتية المصابة إلى سطح بيئة مغذية فى أطباق بترى ، ثم توضع فى الحضان على درجة ٢٠ – ٢٥ °م لمدة ٥ – ١٠ أيام . تستخدم بيئة البطاطس والدكستروز والآجار بصورة روتينية لهذا الغرض ، بينما تستخدم بيئات خاصة لفطريات معينة ؛ فمثلا تستخدم بيئة الآجار والماء لعزل فطر الـ Pythium .

هذا .. ويمكن نقل التراكيب الفطرية التى توجد على النباتات المصابة – كالأجسام الحجرية ، والميسيليوم ، والجراثيم – مباشرة إلى بيئة الآجار . فمثلا يمكن التقاط الأجسام الحجرية وتعقيمها سطحيا ، والتقاط الجراثيم الكبيرة بإبرة تشريح معقمة ، أو أخذ جزء من الجراثيم الكلاميدوسبورية لفطريات التفخم وتخفيفها بالماء قبل نقلها إلى المزارع فى أطباق بترى .

عزل البكتيريا

لعزل البكتيريا من النباتات تغسل الأجزاء المصابة بالماء ، وتجفف كما سبق بيانه بالنسبة للفطريات . يلى ذلك قطع أجزاء صغيرة من الأنسجة المصابة لعمل سلسلة من التخفيفات ، ويتم ذلك إما بوضع الجزء المصاب فى عدة نقاط من الماء المعقم فى طبق بترى، ثم تنقل نقطة منه إلى عدة نقاط من الماء المعقم فى طبق بترى آخر ، وإما بإجراء التخفيف باستخدام سلسلة من أنابيب الاختبار التى يوضع بكل منها ٩ مل من الماء المعقم يضاف إليها مل واحد من المعلق البكتيرى للتخفيف السابق . تستخدم هذه التخفيفات فى زراعة البكتيريا على بيئة الآجار المغذية ، ثم تحضن المزارع على درجة ٢٠ – ٢٥°م لمدة ٥ – ٧ أيام .

هذا .. وقد تغسل الأجزاء النباتية المصابة وتعقم سطحيا ، ثم تزرع مباشرة على بيئة الآجار المغذية كما أسلفنا ، أو قد يؤخذ النمو البكتيرى Bacterial Ooze مباشرة – إن كان ظاهرا – ويخفف ، ثم يزرع على البيئة .

عزل سلالات مفردة من الفيروسات

يمكن الحصول على سلالات مفردة من الفيروسات بعمل عدوى من البقع الصفراء اللون – فى الأوراق المصابة بالموزايك – أو من البقع المحلية Local Lesions ، لتوفُّر عديد من الأدلة على أن كل بقعة محلية تنشأ من جزىء واحد من الفيرس ، وبذا .. فإن استخدام البقع المحلية فى عدوى نباتات تحدث بها إصابات جهازية يعد طريقة عملية لإكثار سلالات الفيرس . ويتعين عند اتباع هذه الطريقة أن تكون البقع المحلية واضحة ومحددة ، وأن يتم اختيار أفضل العوائل لهذا الغرض ، فمثلا : نجد أن N. glutinosa وبعض أصناف الفاصوليا تكون صالحة لعزل سلالات فيرس موزايك التبغ (عن Smith ١٩٧٧) .

ويقدم Kiraly وآخرون (١٩٧٤) عرضا للأسس العامة التى تراعى عند تنقية الفيروسات النباتية ، مع شرح مفصل لطرق تنقية فيرس موزايك الدخان .

عزل النيماتودا

تعزل النيماتودا من التربة والنبات بأخذ عينات من الجذور النباتية والتربة المحيطة بها تمثل الأربعين سنتيمتراً العلوية من التربة . وتحفظ العينات فى أكياس بلاستيكية ، ويراعى عدم تعرضها للجفاف ، أو للحرارة العالية لحين عزل النيماتودا منها ، وهو الأمر الذى يتعين إجراؤه فى غضون ٢٤ ساعة من جمع العينات .

أولا : عزل النيماتودا من التربة

تتبع عدة طرق لعزل النيماتودا من التربة ، وهى تعتمد على أحجام النيماتودا التى تتباين حسب نوعها ، وحسبما إذا كانت ذكرا أم أنثى ، كما فى جدولى (٣-١) ، و (٣-٢) .

١ – الحوصلات Cysts :

تمر حوصلات (الإناث البالغة) للجنس Heterodera خلال مناخل مقاسها ٢٥ مش mesh (أى المناخل التى توجد بها ٢٥ ثقباً فى البوصة الطولية) ، ولكنها تبقى على المناخل التى يكون مقاسها ٦٠ مش . هذا .. وتطفو الحوصلات الجافة على سطح الماء ، ولذا .. يتم أحيانا فصل الحوصلات بتجفيف عينة التربة ، ثم تقليبها جيدا فى كمية كبيرة من الماء ، ثم تفريغها على منخل مقاس ٢٥ مش ، مثبت على منخل آخر مقاس ٦٠ مش ،

حيث تتجمع الحوصلات على المنخل الأخير . ويمكن تجميع الحوصلات غير الجافة بتفريغ معلق التربة فى الماء خلال المنخلين .

جدول (٣ -١) : أحجام مراحل النمو المختلفة لبعض أنواع النيماتودا .

النيماتودا	الأبعـــاد			
	البيض	اليرقات	الإناث البالغة	الذكور البالغة
Meloidogyne spp.	١١٥ × ٥٥	× (٦٠٠ - ٥٠٠)	× (٤٠٠ - ٢٢٠)	—
نيماتودا تعقد الجذور	ميكرون	(٢٠ - ٢٥) ميكرون	(٥٠٠ - ٨٠٠) ميكرون	
Belonolaimus spp.			١٫٥ ٢ مم × ٤٠	١٫٧ مم ×
النيماتودا الواخذة			ميكرون	٣٥ ميكروناً
Paratylenchus minutus	١٥ × ٤٠		× (١٢ - ١٥)	× (٩ - ١٠)
النيماتودا الدبوسية	ميكروناً		(٢٤٠ - ٣١٠) ميكروناً	(٢٢٠ - ٢٧٠) ميكروناً
Xiphiena index			٣٫٤٠ مم	٤٫٦ مم ×
النيماتودا الخنجرية				٧٥ ميكروناً

جدول (٣-٢) : مقاسات وسعة ثقوب المناخل المستخدمة فى عزل النيماتودا .

المقاس : رقم الشبكة mesh(أ)	سعة الفتحات (ميكرون)	الاستخدامات
٢٠	٨٤٠	تحجز عليها المخلفات النباتية وحبيبات التربة الكبيرة
٦٠	٢٥٠	تحجز عليها حوصلات النيماتودا
١٠٠	١٤٧	تحجز عليها النيماتودا الكبيرة الحجم
٢٠٠	٧٤	تحجز عليها النيماتودا من معظم الأحجام ماعدا الصغيرة جداً
٢٧٠	٥٣	تحجز عليها النيماتودا من جميع الأحجام ، ويمر السلت المعلق فى الماء من خلالها بسهولة
٣٢٥	٤٤	تحجز عليها النيماتودا من جميع الأحجام ، ويمر السلت المعلق فى الماء من خلالها ببطء .

(أ) عدد الفتحات فى البوصة الطولية .

٢ – الديدان الثعبانية :

تعزل الديدان الثعبانية من عينات التربة باستخدام الطرق والأجهزة التالية :

أ – قمع بارمان Baermann Funnel :

يتكون قمع بارمان من قمع زجاجى ذى ساق زجاجية قصيرة مثبت بها أنبوبة مطاطية قصيرة يمكن فتحها أو إغلاقها بواسطة مشبك ، و يثبت فى فوهة القمع شبكة سلكية أو بلاستيكية واسعة الفتحات ، يوضع عليها نسيج مسامى رقيق كالحرير أو الكلينكس . توضع عينة التربة على النسيج المسامى ، ويضاف الماء بالقدر الذى يكاد يبلل هذا النسيج . حينئذ تتحرك النيماتودا النشطة من العينة لتنفذ من خلال المسام إلى ساق القمع ؛ لتستقر – بفعل حركتها والجاذبية الأرضية – فوق مستوى المشبك فى الأنبوبة المطاطية . وبذا .. فإنها تتجمع فى معلق مركز خال تقريبا من حبيبات التربة والشوائب . تسحب النيماتودا من هذا المعلق حسب الحاجة ، حيث تؤخذ العينات بعد مرور ٦ – ٧٢ ساعة من البداية .

تؤثر درجة حرارة الماء ومحتواه من الأكسجين فى نشاط وحركة النيماتودا ، ولذا .. فإن إضافة أزرق الميثيلين تزيد من كفاءة عملية عزل النيماتودا بزيادة توفيره للأكسجين .

يوضع فى كل قمع بقطر ١٠ سم ملء ملعقتين صغيرتين من عينة التربة . وإذا سقطت بعض حبيبات التربة فى قاع الأنبوبة المطاطية فى بداية العمل يمكن التخلص منها بفتح المشبك .. وجدير بالذكر أن النيماتودا غير النشطة والنيماتودا الميتة لا تمر من خلال النسيج المسامى .

ب – الترسيب والنخل Decanting and Sieving :

يجرى عزل النيماتودا من عينات التربة بطريقة الترسيب والنخل كما يلى :

(١) توضع عينة تربة تقدر بنحو ٣٠٠ – ٤٠٠ سم٣ فى دلو .

(٢) يضاف نحو لترين من الماء إلى العينة وتقلب جيدا ، مع تكسير كل القلاقيل .

(٣) يترك المخلوط لمدة ٣٠ ثانية حتى تترسب حبيبات التربة الكبيرة الحجم .

(٤) ينخل الرائق خلال منخل مقاس ٢٠ – ٢٥ مش فى دلو آخر ، ويتم التخلص من البقايا التى تتجمع عليه .

(٥) تكرر الخطوات من ١ – ٤ مرتين إلى خمس مرات حسب الحاجة إلى عزل كل النيماتودا الموجودة فى العينة .

(٦) يتم التخلص من الرواسب الموجودة فى الدلو الأول و يغسل بالماء .

(٧) يفرغ المعلق الموجود فى الدلو الثانى خلال منخل مقاس ٦٠ مش فى الدلو الأول .

(٨) تغسل المتبقيات المحجوزة على المنخل (مقاس ٦٠ مش) ، وتنقل إلى كأس زجاجى . يحتوى هذا الجزء على الحوصلات التى قد تكون موجودة فى عينة التربة .

(٩) يفرغ المعلق الذى مر خلال المنخل (مقاس ٦٠) ببطء خلال منخل مقاس ٢٠٠ أو ٢٧٠مش ، مع جعله مائلا ليتسنى جمع النيماتودا عند حافته .

(١٠) يمكن غسيل المتبقيات على المنخل (مقاس ٢٠٠ أو ٢٧٠ مش) فى كأس زجاجية برذاذ خفيف من الماء يوجه نحو الجانب الخلفى للمنخل ، أو قد يمكن تصريف الماء الزائد الذى تتجمع فيه النيماتودا على حافة المنخل ثم نقل النيماتودا باستخدام ملوق .

جـ – الترسيب والنخل مع قمع بارمان :

توضع النيماتودا – بعد تجميعها بالترسيب والنخل – فى قمع بارمان ، وبذا .. يمكن عزل نيماتودا خالية من السلت بدرجة أكبر مما لو اتبعت أى من الطريقتين منفردة .

ثانياً : عزل النيماتودا من العينات النباتية

يمكن عزل النيماتودا من الأنسجة النباتية بأى من الطرق التالية :

١ – الفحص المباشر بالمنظار الثنائى binocular ، وإخراج النيماتودا من النسيج المصاب .

٢ – باستخدام قمع بارمان .

٣ – بنقع الجذور المصابة فى طبقة رقيقة من الماء لا تغطى الجذور ، ثم جمع النيماتودا – التى تخرج إلى الماء – بعد نحو ١٢ ساعة ، ويستمر ذلك لعدة أيام .

٤ – برش الجذور المصابة برذاذ من الماء على فترات ، واستقبال ماء الرش على منخل مقاس ٢٠ ، ثم فى إناء واسع .تترسب النيماتودا فى قاع الإناء؛ حيث يمكن تصريف الجزء العلوى واستقبال الراسب السفلى – الذى يحتوى على النيماتودا – فى كأس زجاجية .

ويمكن جمع أعداد كبيرة من بيض ويرقات نيماتودا تعقد الجذور لاستخدامها فى العدوى

واختبارات التقييم ، وتتباين الطريقة المتبعة لذلك حسبما إذا كانت كتل البيض الظاهرة من الجذور قليلة ، أم كثيرة ، كما يلى :

١ – عندما تكون كتل البيض الظاهرة من الجذور قليلة :

تغسل الجذور المصابة وتقطع إلى أجزاء صغيرة بطول حوالى ٥مم . يوضع ٥ جم من هذه القطع فى خلاط كهربائى منزلى مع ٥٠٠ مل من الماء ، ويشغّل الخلاط على سرعة منخفضة لمدة ١٥ ثانية . يرشح المعلق الناتج خلال منخل ذى ثقوب بقطر ملليمتر واحد ، ثم فى منخل آخر ذى ثقوب قطرها يتراوح من ٠١ر – ٠٣ر مم ، يلى ذلك غسيل الجزء المتبقى على المنخل الثانى جيدا بالماء ، ثم ينقل بالماء أيضا إلى أنبوبة جهاز طرد مركزى ، ويضاف إليه نحو واحد سنتيمتر مكعب من مسحوق الكولين Kaolin ، وبعد الخلط الجيد ، يعرض المخلوط للطرد المركزى لمدة ٥ دقائق ، ثم يفرغ الجزء الرائق العلوى ، ويضاف للراسب محلول سكر (سكروز) ذو كثافة نوعية ١٥ر١ ، ويقلب المخلوط جيدا ، ثم يعرض للطرد المركزى لمدة ٤ دقائق . يتجمع البيض فى قمة الأنبوبة ؛ حيث يمكن استقباله على منخل دقيق .

٢ – عندما تكون كتل البيض الظاهرة من الجذور كثيرة :

تقلب الجذور المصابة فى الماء جيدا مع الطرق عليها لإسقاط ما بها من كتل بيض فى الماء . وتجمع كتل البيض والشوائب الأخرى على منخل مقاس ٦٠ مش (ذى فتحات ٢٤٢ر٠مم) . يلى ذلك ضرب كتل البيض فى خلاط كهربائى مع ٥٠٠ مل من محلول ١ ٪ هيبوكلوريت الصوديوم لمدة ٤٠ ثانية بغرض فصل البيض من كتل البيض . يفصل البيض بعد ذلك عن الشوائب الكبيرة بإمرار المعلق المحتوى على البيض خلال منخل مقاس ١٠٠ مش (ثقوب قطرها ١٤٩ر٠ مم) ، ثم خلال منخل آخر مقاس ٤٠٠ مش (ثقوب قطرها ٠٣٧ر٠مم) . ويلى ذلك جمع البيض من على المنخل الأخير بالماء ، ثم تعريضه للطرد المركزى بالماء ، ثم مع محلول السكروز (٤٥٤ جم سكروز / ١٠٠٠ مل ماء) ، ثم الغسيل ، وإزالة الشوائب الصغيرة (عن Taylor & Sasser ١٩٧٨) .

ولمزيد من التفاصيل عن عزل الأنواع المختلفة من النيماتودا من التربة والأنسجة النباتية

يراجع Goody (١٩٦٣) ، و Mckenry & Roberts (١٩٨٥) .

نمو الكائنات الدقيقة فى المزارع

يتخذ منحنى النمو growth curve مع الزمن فى مزارع الكائنات الدقيقة – خاصة الوحيدة الخلية كالبكتيريا – الوضع المبين فى شكل (٣ – ١) . فبعد فترة قصيرة من التوقف عن الانقسام والنمو lag- phase (أ) .. تكون الزيادة فى أعداد الخلايا – مع الوقت – لوغاريتمية Logarithmic (أوأُسّية exponential ، ب) ، و يلى ذلك فترة (جـ) تكون فيها العلاقة خطية Linear بين أعداد الخلايا والوقت ، ثم تتبعها فترة (د) ينخفض فيها معدل الزيادة . وتعرف المرحلة الأخيرة أحيانا باسم الشيخوخة Senescence ، وهى تحدث نتيجة لاستهلاك الغذاء ، أو بسبب تراكم مركبات سامة للنمو . ويعرف المنحنى (١) فى شكل (٣ –١) بالاسم Sigmoid (على شكل حرف S) ، وهو شكل النمو الطبيعى الغالب فى جميع الكائنات الحية وأعضائها المفردة .

وجدير بالذكر أنه إذا أخذت عدة خلايا من مزرعة فى مرحلة شيخوخة ، ونقلت إلى مزرعة جديدة .. فإنها تبدأ مرحلة جديدة من النمو السيجمويد . أما المنحنى (٢) فى شكل (٣ –١) فيوضح العلاقة بين الزيادة فى أعداد الخلايا فى وحدة الزمن ، مع تقدم المزرعة فى العمر .

ويمكن التعبير عن الزيادة فى أعداد الخلايا خلال مرحلة النمو اللوغاريتمى بالمعادلة التالية :

$$\log n_t = \log n_o + Kt$$

حيث :

n_o = عدد الخلايا فى البداية .

n_t = عدد الخلايا بعد زمن t .

K = ثابت (عن Birkett ١٩٧٩) .