الباب الأول

اعداد معمل لدراسة أمراض النبات

تستهدف دراسة المرض النباتى تحديد المسبب المرضى والتعرف عليه لاختبار الطرق الفعالة لمقاومته ، وقد يستلزم ذلك عزل الكائن المسبب وتنميته فى مزرعة نقية والتعرف عليه من الناحية التقسيمية ، وتحديد الظروف المناسبة لنموه ثم اختبار قدرته على الاصابة .

وتتطلب تلك الدراسة اعداد معمل يختار موقعه بحيث يكون بعيدا عن الاتربة والتيارات الهوائية الشديدة ، كما يراعى فى تصميمه وشكل نوافذه الاقلال من تلوث جو المعمل ، وتيسر نظافة جدرانه وأرضيته . وبالنسبة الى احتمال عدم توفر جميع هذه الشروط فى اعداد معمل أمراض النبات فيلحق بالمعمل حجرة صغيرة لاجراء عمليات العزل والتنقية ابعادها حوالى ٢×٢×٣ متر ، وتحتوى على منضدة صغيرة سهلة التنظيف عليها مصباح غاز الاستصباح ويوجد بالحجرة فتحة دائرية تسمح بدخول الهواء المعقم، ويوجد بالسقف لمبه تعطى أشعة فوق بنفسجية فى المدى من ٢٠٠٠ ــ ٢٥٠٠ أنجستروم وهذا المدى من الاشعة يقتل جميع الكائنات الحية ، وتعمل اللمبة بواسطة مفتاح من خارج الحجرة حتى لا يتعرض الطالب أو الباحث للاشعة حيث أنها ضارة للانسان أيضا ، كما توجد لمبة أخرى بيضاء فلوسنت للاضاءة أثناء عمليات العزل وغيرها ، وللحجرة باب مزدوج بكل منه شباك صغير زجاجى مربع أو مستطيل الشكل ليظهر اللون البنفسجى للاشعة أثناء تعقيم الحجرة . يستغرق تعقيم الحجرة حوالى عشر دقائق ثم تترك لمدة خمس دقائق أخرى ، يدخل بعدها الطالب أو الباحث من الباب

الخارجى ويغلقه ثم من الباب الداخلى ويغلقه أيضـــا ويضىء أيضـــا لمبة الفلورسنت البيضـــاء ، ويبـــدأ فى عمليات العـــزل أو التنقية أو النقل أو غير ذلك •

الادوات اللازمة :

أهم الادوات اللازمة هى أطباق بترى وأنابيب اختبار وغيرها وهى التى تستخدم دائما فى أغـــراض العـــزل والتنقية ، ويستحسن أن تكون الانابيب والاطباق من الزجاج البيركس الذى يتحمل المعاملات الحرارية •

الانابيب الزجاجية :

تعمل سدادات الانابيب من القطن غير المـــاص لتنقية الهـــواء من الكائنات الملوثة ويجب أن تعمل بالسمك المناسب بحيث تحافظ على شكلها عند اخراجها أو ادخالها من الانبوبة ، وذلك بلف شرائط من القطن بعرض ٥ سم تقريبا وثنى الجانبين للداخل حتى يصبح العرض حـــوالى ٣ سم وتلف الى السمك المناسب لقطر الانابيب •

أطبـــاق بـــترى Petri dishes

وهى أطباق مستديرة مسطحة ذات أغطية مشابهة وأوسع قليلا •

تصنع أطباق بترى بأقطار مختلفة ولكن الاطباق الاكثر اســـتعمالا ذات قطر ١٠ سم من الخارج وارتفاع ١٫٥ سم ، وحيث أن الكائنات النامية بالاطباق تحتاج الى هواء فان الهواء الخارجى يدخل الى الداخل خـــلال جزء الطبق ولكن يكون الهواء غير مرشح — وليس كما هـــو الحـــال فى الانابيب التى تكون مغطاة بســـدادات قطنية — ولذلك يفضـــل أن تترك الاطباق التى بها كائنات دقيقة مقـــلوبة الوضـــع حتى تسقط الـــكائنات

الخارجية المحمولة بالهواء على السطح الداخلى لغطاء الطبق ولا يحـدث تـلـوث .

زجاجات البيئـات :

يستعمل لذلك زجاجات تسع حوالى ٢٥٠ مل وتملأ بالبيئة المغذية الى حوالى نصفها وتسد بسدادة من القطن مثل الانابيب .

أدوات زجاجية أخرى : وذلك مثـل الدوارق المخـروطية والكروية والمخابير المدرجة والمـاصات والسحاحات والاقماع والنواقيس الزجاجية وزجاجات التنقيط وأوعيـة كوبلين وأنابيب العينات والشرائـح وأغطية الشرائح وغيرها .

أدوات غير زجاجية :

تشمل أدوات التشريح أبر مختلفة الاشكال منها المـدببة والسهمية ذات الحواف الحـادة وأفضلها ما يكون مصنوعا من الكروم ومثبتة فى يد ألومنيوم أو خشبية ، ومنها الابر الرفيعة المصنوعة من سلك من البلاتين وذات عقدة طرفية ، وأيضا من أدوات التشريح والمقصات والمشارط غير القابلة للصدأ والملاقط المدببة والعريضة الطرف .

ومن الادوات الاخرى المطلوب توفرها أسبتة سـلك مستديرة أو مربعة لحمل أنابيب الاختبار أثناء التعقيم وحوامل من السلك أو الخشب لحمل الانابيب أثناء الدراسة ، وعلب اسطوانية من النحاس لتعقيم أطباق بترى ، ومصابيح بنزن وحوامل مثلثة وأقلام للكتابة على الزجاج .

الاجهـــزة :

يلزم أن يتوفر فى معمل أمراض النبات أفـران كهربائية تصـل الى

٢٠٠°م لتعقيم أطباق بترى وغيرها من الادوات الزجاجية ، وأوتكلاف وهو معقم بالبخار تحت ضغط مرتفع لتعقيم البيئات المغذية والسوائل ، وكذلك غلاية Steamer وهى معقم بالبخار تحت الضغط الجوى ، وحضانات incubators وهى أجهزة خاصة يمكن التحكم فى درجة حرارتها وذلك لغرض تنمية الكائنات الدقيقة على الدرجة المناسبة لنموها وتكاثرها •

ومن الاجهزة الاخرى ميكروسكوبات وموازين حساسة وجهاز قوة مركزية طاردة وجهاز رج Shaker وخلاط وخلافه •

الحضانات : incubators

وهى أجهزة يمكن التحكم فى درجة حرارتها حيث تضبط أوتوماتيكيا على درجة حرارة معينة ، وهى ضرورية للحصول على نمو سريع للكثير من أنواع الفطريات عند تنميتها على درجة حرارة ملائمة لنموها حيث تنمو معظم الفطريات جيدا على درجة حرارة ٢٥°م والبكتريا من ٣٠–٣٥°م • ويلزم استخدام الحضانات فى دراسة تأثير درجات الحرارة على النمو الميسيليومى وتكوين جراثيم الفطريات ، وفى هذه الحالة توضع المزارع الفطرية فى مدى واسع من درجات الحرارة ولذلك توفر عدة حضانات يضبط كل منه على درجة حرارة معينة طوال مدة التجربة • ومن المستحسن أن يكون بالمعمل عدة حضانات صغيرة عن وجود حضان واحد كبير •

الغلاية Steamer

معقم بالبخار تحت الضغط العادى ، وهى عبارة عن وعاء نحاسى مستطيل أو أسطوانى الشكل ، الجزء السفلى منه حمام مائى ويوجد فوق مستوى سطح الماء رف نحاسى مثقب توضع عليه الادوات المراد تعقيمها •

يقفل الوعاء النحاسى بغطاء غير محكم لخـروج البخار ولوضـع ترمومتر لقراءة درجة الحرارة •

الاوتوكـلاف Autoclave

معقم بالبخار تحت ضغط يفوق الضغط الجوى ، ويستخدم فى تعقيم البيئات المغذية والادوات الزجاجية والتربة المستخدمة فى تجارب الاصص• تصنع الاوتوكلافات من مادة فـولاذية فتتحمل الضغط المرتفع ، وتعمـل بالكهرباء أو بغاز الاستصباح • يوجد بداخل الاوتوكلاف وعاء نحـاسى توضع به المواد المراد تعقيمها ويقفل بغطاء محكم ، والجهاز مزود بفتحة لخروج الزائد وصمام أمن ، ويمكن معرفة ضغط البخار بواسـطة مقياس ضغط Pressure gauge ، والضغط المعتاد فى تعقيم البيئات هو ١٥ رطل/البوصة المربعة وتصل درجة الحرارة الى ١٢١°م •

ويمكن استخدام الاوتوكلاف فى التعقيم بدون ضغط مرتفع أى يعمل كالغلاية فى هذه الحالة ، وذلك اذا لم يحكم غلـق الغطاء وسمح بخـروج الغطاء خلال الفتحة •

الافـــران Ovens

وهى أجهـزة كهـربائية لتعقيم أطباق بترى وغـيرها من الادوات الزجاجية بالهواء الساخن الجاف على درجة حـرارة ١٦٠°م لمـدة ثلاث سـاعات •

يترك الفرن ليبرد حتى تصل درجة حرارته الى درجة حرارة الغرفة ثم يفتح الفرن وتستخدم الاطباق والادوات الزجاجية •

obeikandl.com

التعقيم

STERILIZATION

من الضرورى عند استخدام مزارع لتنمية الفطريات والبكتريا تعقيم جميع الادوات والبيئات المستخدمة منعا لحدوث تلوث بكائنات أخرى •

وتتباين طـرق التعقيم تبعا لطبيعة المـواد المراد تعقيمها ، فتعقم الادوات الزجاجية فى هواء جاف ساخن داخل فرن كهـربائى على درجة حرارة ١٦٠°م لمـدة ثلاث ساعات ، أما البيئات المغذية فتعقم فى هواء رطب ساخن داخل الاوتوكلاف •

وقبل اجراء تعقيم الادوات الزجاجية يجب غسـلها أولا بمحـلول تنظيف وشطفها بماء الصنبور ثم بماء مقطر ، ويسـد الطرف العـريض للماصات ـ الذى يوضع بالفم ـ بقطعة من القطن الجاف بحيث لا يبرز جزء من القطن خارج المـاصة أو يلمس الفم ، ثم توضع الماصات فى علب نحاسية اسطوانية طـويلة ، أما أطباق بترى فترتب فى علب اسـطوانية نحـاسية أيضـا •

وبعدما يتم تعقيم الاطباق يجب عدم فتح الفرن الى أن تصل درجة حرارته الى درجة حرارة الغرفة ثم يفتح الفرن وتستخدم الادوات •

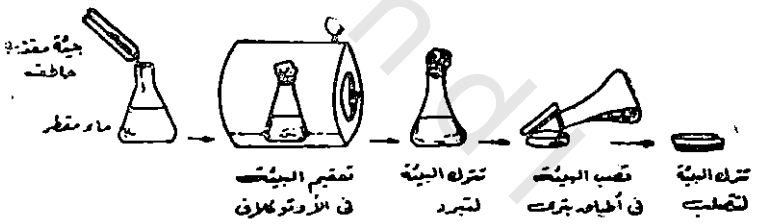
ويراعى تعقيم الادوات الزجاجية المتصلة بأنابيب أو سـدادات من الكاوتشوك فى الاوتوكلاف مع سد الانابيب أيضا بسـدادات قطنية ولف جميع الادوات الزجاجية بالورق •

وتعقم البيئات المغذية فى الاوتوكلاف تحت ضغط ١٥ رطل/البوصة المربعة (= ١٢١°م) لمدة عشرين دقيقة ، أما البيئات المحتوية على سكريات

أو فيتامينات أو مواد منشطة للنمو فانها تتأثر بالحرارة المرتفعة ولذلك يفضل تعقيمها تحت ضغط ٥ رطل/البوصة المربعة (= ١٠٧°م) لمدة عشرين دقيقة يوميا وذلك على ثلاث أيام متتالية •

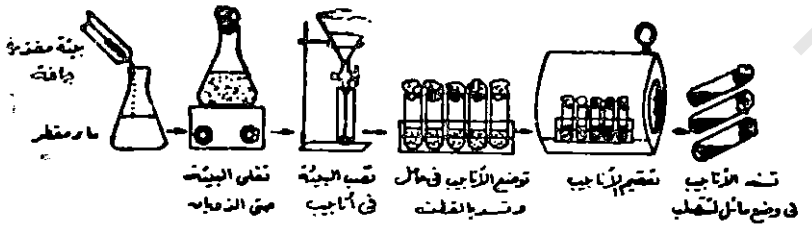
ولتطهير الاجزاء النباتية واستخدامها كبيئة طبيعية لنمو بعض الفطريات تستخدم مادة أكسيد بروبيل Propylene oxide ، وذلك بتقطيع الجزء النباتى على هيئة شرائح رقيقة ترطب قليلا بالماء وتوضع فى اناء زجاجى محكم الغطاء ، ثم يوضع فى الوعاء مادة أكسيد بروبيل بنسبة ١ مل/لتر فراغ • ويغلق الوعاء جيدا ويترك لمدة ٢٤ ساعة ثم يفتح الغطاء قليلا ليسمح للغاز بالتسرب لمدة عدة ساعات ، ثم توضع الشرائح بواسطة ملقط معقم على بيئة الاجار المغذية المعقمة وهى لا زالت سائلة مما يساعد على التخلص من بقايا مادة التبخير •

شكل ١



تحضير البيئة المغذية الصلبة فى أطباق بترى

شكل ٢



تحضير البيئة المغذية الصلبة على هيئة أجار مائل فى أنابيب

ويراعى أنه قبل البدء فى عمليـــة صب البيئات فى الاطباق المعقمـــة (شكل ١) والانابيب (شكل ٢) غلق النوافذ لتلافى حدوث تيارات هوائية وتطهر المنضدة التى عليهـــا الاطباق بمحـــلول مائى (٥٪) من الفينول ، وتعقيم الهواء المحيط برشة برذاذ من محلول الفينول بواسطة رشاشـــة دقيقة الثقوب وتطهير الايدى بالكحول .

obeikandl.com

obeikandl.com

البيئـــات المغـــذية

CULTURE MEDIA

البيئات المغذية هى الوسط الذى تنمو عليه الفطـريات والبكتريا فى المعمل ، وعند تنمية الفطريات أو البكتريا فى المعمل فمن المعتاد تنميتها على هيئة مزارع نقية بخلاف ما يحدث فى الطبيعـة حيث تختلط مـع بعضها البعض فى هضم المواد الغذائية التى توجد فى الوسط الذى تنمو عليـه ، وعلى ذلك فانه من غير الممكن حفظها جميعا على بيئة واحدة قياسية ، ولكن اذا لم تنمو بعض الكائنات الدقيقة جيدا على بيئة معينة فقـد تنمو عليها البعض الاخر نموا جيدا ، وعلى ذلك فهناك العديد من البيئات التى تتباين فى طبيعة مكوناتها • ويحدد اختيار البيئة الغرض من استعمالها فاذا كان الغرض هو عزل الفطر أو البكتريا فقط يجب أن توفر البيئة سرعة النمو وأن تكون شفافة ، واذا كان الغرض هو تشـجيع تكوين جـراثيم الفطر فيفضل أن تكون البيئة ضعيفة فى مكوناتها الغذائية ، ولغرض الاختبارات الكيميائية الحيوية يلزم أن تكون مكونات البيئة من المواد الكيميائية فقط • وتستخدم البيئات وهى فى حالة سائلة أو فى حالة صلبة ، وعند استخدامها فى حالة صلبة يضاف اليها الاجار Agar بمعـدل ١٥ــ٢٠ جم/لتر • يلزم أن تحتـوى البيئة على عناصر ضرورية أهمها الكربون والايدروجين والاكسجين والازوت والفوسـفور والكبريت والبـوتاسيوم والمغنسيوم والحديد ، ويفضل استخدام ماء الصنبور عن المـاء المقطر حيث يحتوى ماء الصنبور على كميات ضـئيلة من العناصر الصـغيرة التى تحتاج اليها معظم الفطريات • تفضل الفطريات الوسط الذى يميل قليلا الى الحموضة فيضبط pH البيئة من ٦ــ٦ر٥ ، وتفضل البكتريا الوسط الذى يميـل قليلا الى القلوية فيضبط pH البيئة من ٧ر٢ ــ ٧ر٤ •

وتقسم البيئات المغذية الى ثلاثة أنواع كما يأتى :

أولا ــ البيئات الطبيعية Natural Media

تتكون هذه البيئات من مواد طبيعية معقدة غير معروفة التركيب مثل الاجزاء النباتية المختلفة من الخضر والفاكهة ومثل الخبز والمولت والسماد العضوى وغيرها • استخدمت البيئات منذ القدم فقد استعملها المشتغلون الاوائل بعلوم الفطريات وأمراض النبات •

تستخدم بعض من هذه البيئات على هيئة قطع بشكل نصف اسطوانة كما فى حالة البطاطس والجزر أو على هيئة حبوب كاملة مثل حبوب القمح والشعير والارز والذرة أو على هيئة جريش مثل جريش الذرة أو على هيئة مستخلصات • تتميز البيئات الطبيعية بأنها رخيصة الثمن وسهلة التحضير حيث يتم تحضيرها باضافة الماء ثم التعقيم ، ومن تلك البيئات الطبيعية ما يأتى :

١ ــ مستخلص المولت Malt Extract Agar

وتتركب من المكونات الآتية :

مستخلص المولت	٢٠جم
آجار	٢٠جم
ماء	١ لتر

يغلى مستخلص المولت فى الماء حتى الذوبان ويضاف الاجار ويستمر الغليان حتى الذوبان ثم تعقم •

٢ ــ بيئة آجار دقيق الذرة Corn Meal Agar

دقيق ذرة	٣٠جم
آجار	٢٠جم
ماء مقطر	١ لتر

٣ ــ بيئة آجار دقيق الشوفان Oatmeal Agar

وفى هذه البيئة يستبدل دقيق الذرة بدقيق الشوفان •

٤ ــ بيئة آجار البطاطس والجزر Potato carrot Agar

وتتكون من الآتى :

بطاطس	٢٠جم
جـــزر	٢٠جم
آجار	٢٠جم
ماء	١ لتر

تغسل درنات البطاطس وتقطع دون تقشـير الى مكعبات صـغيرة ويوزن منها ٢٠جم ، وتغسل جذور الجزر وتقطع أيضا الى قطع صـغيرة ويوزن منها ٢٠جم • تغلى قطع البطاطس وقطع الجزر فى دورق سعة لتر مع المـاء ثم تصفى وتكمل الى لتر وتعبأ فى زجاجات أو دوارق وتعقم فى الاوتوكلاف •

٥ ــ بيئة مستخلص ثمـانى خضر V-8 Agar

وتتكون من الآتى :

مستخلص ثمانى خضر	٢٠٠ مل
آجار	٢٠ جم
ماء	٨٠٠ مل

يمكن الحصول على المستخلص جاهزا واذا لم يتـوفر المستخلـص المحضر فيمكن اختيار بعـض الخضر المتـوفرة فى السـوق كالبطاطس والفاصوليا والجزر • يغلى ٥٠جم من بذور الفاصوليا الجافة و ١٠٠جم من

الجـــزر و ٢٠٠جم من البطاطس لمـــدة ساعة فى لتر من المـــاء ثم يرشـــح المستخلص •

يذاب الاجار بمفرده فى الماء ويضاف الى المستخلص • يضـــبط رقم pH الى ٦ بواسطة أيدروكسيد الصوديوم • تعقم البيئة تحت الضغط ١٥ رطل/البوصة المربعة ٢٠ دقيقة • تصلح هذه البيئة لتنميـــة كثير من الفطريات ، كما أنها تصلح أيضا لتنمية الاكتينوميسيتات باضافة كربونات كالسيوم ٤ر٠جم/١٠٠ مل من البيئة ويضبط رقم pH الى ٣ر٧ بواسطة أيدروكسيد البوتاسيوم •

ثانيا : بيئات طبيعية تركيبية Natural Synthetic Media

تتكون البيئات الطبيعية التركيبية من مواد طبيعية مضافا اليها مواد معروفة التركيب،ومن أفضل تلك البيئات بيئة آجار البطاطس والدكستروز Potato Dextrose Agar وتعرف فى معامل أمراض النبات باسم *PDA* ولكن من عيوب تلك البيئات أنها غير ثابتة التركيب أيضا حيث يدخـــل فى تركيبها مواد طبيعية •

١ ــ بيئة آجار البطاطس والدكستروز :

وتتكون من الآتى :

بطاطس	٢٠٠ جم
دكستروز	٢٠ جم
آجار	٢٠ جم
ماء	١ لتر

تغسل درنات البطاطس وتقطع دون تقشير الى مكعبات صـــغيرة • يوزن ٢٠٠جم وتشطف تحت ماء جار لمدة دقيقة وتوضع فى دورق به لتر ماء وتغلى الى أن تصبح طرية •

ترشح خلال قمع به موسلين • يضـاف الى الراشـح ٢٠جم آجار ويغلى ثانية الى أن يذوب الاجار • يضاف ٢٠جم دكستروز ويقلب حتى الذوبان وتكمل البيئة الى لتر وترج جيدا حتى تصبح متجانسـة ثم تعبأ البيئة وتعقم •

بيئة آجار البطاطس والدكستروز من أكثر البيئات الفطرية شيوعا فى معامل أمراض النبات وتصلح لاغراض العزل والدراسة المورفولوجية •

٢ ــ بيئة آجار البطاطس والسكروز Potato Sucrose Agar (PSA)

تشبه البيئة السابقة ما عـدا اسـتبدال الدكستروز بالسـكروز • تستخدم هذه البيئة فى تسمية أنواع فطر فيوزاريوم *Fusarium*

٣ ــ بيئة آجار كـون Conn's Agar

تتكون من الآتى :

نترات بوتاسيوم	٢ر جم
كبريتات مغنسيوم	١ر٢ جم
فوسفات بوتاسيوم ثنائى الايدروجين	٢ر٧ جم
مالتـوز	٢ر٧ جم
نشـا بطاطس	١٠ر جم
آجار	١٥ر جم
ماء	١ لتر

٤ ــ بيئة الاجار المغـذى Nutrient Agar

تتكون من الآتى :

مستخلص لحم	١ جم
مسخلص خميرة	٢ جم

obeikandl.com

ببتـــون	٥ جم
كلوريد صـــوديوم	٥ جم
آجار	١٥جم
ماء	١ لتر

وتستخـــدم هـــذه البيئة لتنمية البكتريا • تذاب المكونات فى المـــاء يضبط رقم pH الى ٧ر٣ • يضاف الاجار ويذاب وتعقم البيئة •

ثالثا : بيئات تركيبية Synthetic Media

البيئات التركيبية بيئات معروفةالتركيب وكذلك التركيز وتتكون من مركبات كيماوية فقط ، ومن تلك البيئات ما يأتى :

١ ــ **تشـــابك دوكس** Czapek Dox Agar

تذاب المركبات الآتية فى ٥٠٠ مل ماء :

نترات صـــوديوم	٢ جم
كلوريد بوتاسيوم	٥ر٠جم
كبريتات مغنسيوم	٥ر٠جم
كبريتات حديدوز	١ر٠جم

ثم تذاب المركبات فى ٥٠٠ مل أخرى من المـــاء •

فوسفات بوتاسيوم ثنائى الايدروجين	١ جم
ســـكروز	٣٠جم

يضاف المحلول الثانى الى الاول تدريجيا مع التقليب ويضاف اليهما ٢٠جم آجار • يذاب الاجار وتعقم البيئة • تستخدم هذه البيئة فى تنمية فطريات اسبرجلس *Aspergillus* وبنسيليوم *Penicillium*

٢ ــ **بيئةكرنيســـكى** Krainsky's Medium

تتكون من الآتى :

جلوكوز	١٠ر جم
اسباراجين	٥ر٠ جم
فسفات بوتاسيوم (أحادى الايدروجين)	٥ر٠ جم
آجار	١٥ جم
ماء	١ لتر

تذاب هذه المركبات فى الماء • يضبط رقم pH الى ٧ وتعقم •
تستخدم هذه البيئة لتنمية الاكتينوميسيتات •

٣ — بيئة جليسرول الاسباراجين Glycerol Asparagine

تتكون من الآتى :

جليسرول	١٠ر جم
اسباراجين	١ر جم
فوسفات بوتاسيوم (أحادى الايدروجين)	١ر جم
آجار	٢٠جم
ماء	١ لتر

وتستخدم هذه البيئة أيضا لتنمية الاكتينوميسيتات •

obeikandl.com