



كلية العلوم

القسم : علم الحياة

السنة : الرابعة

المادة : فيروسات وجراثيم

المحاضرة : الخامسة / عملي /

{{ مكتبة A to Z }}

مكتبة A to Z : Facebook Group

كلية العلوم ، كلية الصيدلة ، الهندسة التقنية ، تكنولوجيا المعلومات والاتصالات

5

يمكنكم طلب المحاضرات برسالة نصية (SMS) أو عبر (What's app-Telegram) على الرقم 0931497960

# الفحص الميكروبيولوجي للتربة

## الجلسة العملية الخامسة بيولوجيا الجراثيم والفيروسات

### مجموعات الأحياء الدقيقة في التربة :

يتنوع محتوى التربة من الأحياء الدقيقة، ويضم بشكل أساسي البكتيريا المشكلة للأبواغ ( المتبوعة ) الأكتينومييسيس Actinomycetes ، الملتويات Spirochetes ، والأرشوباكتر Archeobacter ، والأوليات و الأشنيات الزرقاء والخضراء ، الفطور والفيروسات .

يتأثر المحتوى أو التركيب النوعي والكمي للأحياء الدقيقة للتربة بعدد من العوامل أهمها :

نوع التربة ومستوى الاستزراع : فكلما كان مستوى الاستزراع أكبر كان محتوى الأحياء الدقيقة أكبر التركيب الفيزيائي والكيميائي للتربة : البنية ، التهوية ، الرطوبة ، نفوذيتها للماء ، وجود الأوكسجين الحر والأوكسجين المرتبط .

العمر والتوضع الجغرافي للتربة : يقل محتوى المواد العضوية في التربة بالإتجاه من الجنوب إلى الشمال على سطح الكرة الأرضية وبالتالي يقل محتوى الأحياء الدقيقة فيها .

الشروط المناخية والفصول : تسيطر أو تغلب البكتيريا اللاهوائية والبكتيريا المشكلة للأبواغ في الصيف ، وبنهاية الصيف يتضاعف محتوى التربة من الأكتينوميستس ، ويتضاعف النشاط البيولوجي لجميع الأحياء الدقيقة في التربة في الخريف وينخفض بشكل ملحوظ طيلة فترة الشتاء .

**عمق طبقة التربة:** يمكن تمييز ثلاث طبقات أساسية تتوضع بشكل عمودي:

A من ( ٠ ← ١٠ ) سم .

B من ( ١٠ ← ٢٠ ) سم .

C من ( ٢٠ ← ٣٠ ) سم .

تكون الأحياء الدقيقة على السطح وفي الطبقة ( A ) قليلة بسبب الرطوبة المتدنية وكذلك التأثير المعقم لضوء الشمس المباشر .

إن محتوى الطبقة ( A ) من الأحياء الدقيقة في التربة غير المستزرعة يكون أكبر ما يمكن على عمق ( ٥ - ١٠ ) سم ، أما في التربة المستزرعة فإن محتوى التربة من الأحياء الدقيقة يكون كبير وبشكل خاص بالقرب من حدود الطبقتين ( B و C ) .

يمكن عزل عدد قليل من الأحياء الدقيقة على عمق ١ متر ، أما الأنواع التي يمكن عزلها على عمق ٤ أمتار وأكثر فإنه يُنظر لها أنها لا تملك قيمة أو أهمية حيوية للتربة وإنما قيمة وأهمية جيولوجية .

تبلغ كمية الأحياء الدقيقة في التربة عدة مليارات خلية في ١ غ ، وتكون أكبر ما يمكن في التربة المسمدة بالروث والدبال ، وفي التربة المستزرعة، حيث يصل من ٤.٨ - ٥.٢ مليار خلية في ١ غ تربة.

تحتوي التربة الرملية على كميات أقل من الأحياء إذ تتراوح بين ٠.٩ - ١.٢ مليار خلية في ١ غ تربة. وبشكل عام تبلغ كتلة الأحياء الدقيقة في ١ هكتار من التربة وسطياً بحدود ١٠٠٠ كغ.

بينت نتائج دراسة المحتوى النوعي من الأحياء الدقيقة في التربة أنه تعيش فيها بكتريا وفطور من الأجناس التالية:

*Azotobacter , Clostridium , Pseudomonas , Bacillus , Streptococcus , Myxococcus , Rhizobium , Cellovibrio , Aspergillus , Trichoderma* وأجناس أخرى .

## ٢ - مجموعات الأحياء الدقيقة الممرضة للإنسان والحيوان في التربة

لا تعيش الأحياء الدقيقة الممرضة - كقاعدة عامة - في التربة طويلاً ، ولكن البعض من أنواعها قد ينضم إلى مجموعات الأحياء الدقيقة المختلفة في التربة والتي تقسم إلى ثلاث مجموعات رئيسية هي:

- الأحياء الدقيقة التي تتخذ من التربة مكان للعيش مثل : *Actinomycetes* ، *Aspergillus* .

- الأحياء الدقيقة التي تصل إلى التربة عن طريق فضلات الإنسان والحيوان وتبقى لفترة طويلة ( سنوات وعشرات السنين ) مثل *anthraces Bacillus* .

- الأحياء الدقيقة التي تصل إلى التربة عن طريق فضلات الإنسان والحيوان وتبقى فيها لفترة قصيرة نسبياً ( أسابيع ، شهور ) مثل *Escherichia. coli* ( ٨ شهور ) ، *Sallmonella* ( حتى عام بدرجة حرارة تحت الصفر ) ، *Shigella* ( حتى ١٠٠ يوم ) ، الكوليرا ( ١٢ شهر ) ، الحمى المالطية ( عدة شهور ) .

## أهم الأحياء الدقيقة الممرضة في التربة .

الأحياء الدقيقة الواصلة للتربة عن طريق الفضلات		الأحياء الدقيقة المقيمة
المتبقية لفترة قصيرة	المتبقية لفترة طويلة	
<p>أنواع جنس : Sallmonella , Shigella - Vibrio Brucella - Francisella , Mycobaterium - Leptospira - Pseudomonas مجموعة الانتروفيروس</p>	<p>- Bacillus anthracis Clostridium tetani أنواع جنس : Clostridium اللاهوائية المسببة للأوبئة</p>	<p>- Clostridium botulinum بعض أنواع الجنس : - Actinomycetes الفطور مسببات الأمراض الجلدية للحيوان والإنسان بعض مسببات التسممات الفطرية</p>

## – التحليل الميكروبيولوجي للتربة :

### – ١ – التحليل الميكروبيولوجي المختصر للتربة :

يأخذ التحليل الميكروبيولوجي للتربة بالحسبان الحالة الصحية للتربة، وذلك من خلال تحديد التعداد العام للأحياء الدقيقة وكذلك تعداد بكتريا Escherichia. coli ، وتعداد Enterococcei ، وتعداد Clostridium perfringens والبكتريا المحبة للحرارة العالية ، وبكتريا النترا ، و بحصولنا على جميع المؤشرات يمكننا التعرف على مدى تلوث التربة بالفضلات العضوية، ويمكننا كذلك تحديد حالة عمليات التنقية ( التطهير ) الذاتي في التربة من مجموعة ال- Enterobacteria الممرضة والتلوث العضوي ، يُجرى هذا التحليل بحسب مخطط مدروس لمعرفة الحالة الصحية للتربة.

## مؤشرات نظافة التربة من الناحية الميكروبيولوجية

نوع التربة	أقل كمية من التربة تتواجد فيها عصية واحدة من العصيات المعوية غ	أقل كمية من التربة تتواجد فيها عصية واحدة من مجموعة بكتريا النترات غ	أقل كمية من التربة تتواجد فيها عصية واحدة من مجموعة Clostridium perfringens	كمية البكتريا المحبة للحرارة العالية في ١ غ من التربة
نظيفة	0.1 غ وأكثر	0.1 غ وأكثر	0.1 غ وأكثر	1000 - 100
قليلة التلوث	0.01 ← 0.9	0.001 ← 0.01	0.0001 ← 0.009	1001 ← 100000
ملوثة	0.009 وأقل	0.0001 وأقل	0.00009 وأقل	100001 ← 4 × 10 <sup>6</sup>

## ٢ - التحليل الميكروبيولوجي الكامل للتربة:

يتضمن هذا التحليل تحديد كافة مؤشرات التحليل الميكروبيولوجي المختصر للتربة وأيضاً التعداد العام للأحياء الدقيقة الرميّة ، وكذلك تحديد نسبة احتواء الأحياء الدقيقة المشكلة للأبواغ ، نسبة البكتريا الهوائية ، نسبة البكتريا المحللة للسليلوز ، بكتريا النشدة ، بالإضافة لدراسة التأثير السمي للتربة في الأحياء الدقيقة ، وتُجرى هذه التحاليل عند اختيار المواقع لبناء صروح معينة ( سدود ، مصانع ) وكذلك عند التحري عن مواقع شديدة التلوث .

## ٣ - التحاليل الدورية :

تُجرى هذه التحاليل بشكل دوري لتربة مواقع معينة كمناطق الاستجمام والمدارس ودور الحضانة وبواقع مرتين في السنة ، في الربيع والخريف ، وفي مواقع أخرى يُجرى هذا التحليل بشكل دوري مرة واحدة في السنة على الأقل ، لدراسة ديناميكية عملية التنقية الذاتية للتربة من التلوث تُؤخذ العينات للتحاليل يومياََ لفترة شهر من إصابة التربة ، بعدها تُجرى التحاليل بواقع مرة إلى مرتين شهرياً . ويتم أخذ العينات بتقسيم المنطقة المدروسة على شكل مربعات ( ليس أقل من ٥×٥ متر ) ، وتُؤخذ العينات من عمق ٢٠ - ٣٠ سم من زوايا المربعات ومن مراكزها أيضاً، ويجب ألا يقل حجم العينة عن ١ كغ .

## ٤ - طرق التحليل الميكروبيولوجي للتربة

### ١ - طريقة العد المباشر للخلايا باستخدام المجهر :

وضعت هذه الطريقة من قبل العالم فينو غرادسكي ( ١٩٢٤ ) وتتلخص في حل ١ غ من عينة التربة في ماء معقم ومن ثم يُحضر محضر ملون للبكتيريا على شريحة زجاجية ويتم دراسته تحت المجهر الضوئي . من مزايا هذه الطريقة معرفة الصفات المورفولوجية ( الشكلية ) للأحياء الموجودة في التربة وأنواعها .

### سلبيات هذه الطريقة :

عدم ظهور بعض أنواع الميكروبات بسبب التصاقها الشديد بحبيبات التربة . صعوبة التمييز بين البكتيريا وبين حبيبات التربة وبعض المواد العضوية الدقيقة . ليس لها أي قيمة عند احتواء التربة على عدد قليل من الميكروبات . ظهور الميكروبات الحية والميتة على الشريحة واستحالة التفريق بينها .

## طريقة العمل :

- نزن عينة من التربة بمقدار ٠.٥ - ١ غ ونحلها بحجم ثابت ٣٠ - ٤٠ مل من الماء المعقم أو محلول مائي %٠.٥ لكلوريد الصوديوم.
- نأخذ بماصة مدرجة معقمة ونظيفة مقدار ٠.١ مل من المعلق الميكروبي للتربة وننقله إلى شريحة زجاجية مدرجة خاصة ، يُفرش المعلق بانتظام على الشريحة .
- تجفف اللطاخة بالهواء بدرجة حرارة الغرفة وتثبت بواسطة الكحول الايتيلي %٩٦ ، يلوّن المحضر بمحلول الفوكسين الكربولي أو بمحلول الإريثروزين الكربولي لمدة ٣ - ٤ دقائق .
- يتميز الفوكسين الكربولي بتلوينه للبكتريا باللون الأحمر ، بنفس الوقت تتلون المواد العضوية وحببيات التربة المعدنية أيضاً باللون الأحمر .
- يغسل المحضر بشكل جيد بالماء ويجفف بالهواء ، تبقى البكتريا ملونة بأحمر قاتم بينما المواد العضوية وحببيات التربة المعدنية غير ملونة أو ملونة بلون أحمر فاتح جداً .
- يُدرس المحضر تحت المجهر وتُعد الخلايا البكتيرية ثم تحسب لكل ١ غ من التربة على أساس الوزن الرطب وعلى أساس الوزن الجاف .

## ٢ - طريقة العد بواسطة الأطباق

- تعد طريقة الزراعة للمعلق البكتيري لعينات التربة على أوساط مغذية صلبة ومن ثم القيام بعملية تعداد المستعمرات الناتجة الطريقة الأكثر اعتماداً لدراسة كمية الأحياء الدقيقة ( التعداد العام ) في التربة وإظهار التركيب النوعي له ، وتحديد الأنواع ( التصنيف النوعي ) .

## طريقة العمل :

نأخذ عينة من التربة بوزن ٠.٥ - ١ غ ونحلها بحجم ثابت ٣٠ - ٥٠ مل من الماء المعقم أو محلول مائي معقم % ٠.٥ من كلوريد الصوديوم ، ثم نقوم بإجراء التمديدات المناسبة .

نأخذ بواسطة ماصة معقمة ومدرجة مقدار ٠.١ مل من المعلق الميكروبي المحضر سابقاً ونزرعه على طبقين بترى يحوي أحدهما وسط مغذي صلب مرق اللحم مع البيبتون ( MBA ) والآخر وسط آغار مغذي ، ثم يُوزع المعلق على سطح الوسط المغذي بواسطة ماسحة معقمة .

تُحضن أطباق بترى المزروعة بالحاضنة بدرجة حرارة °C ٣٧ لمدة ١ - ٢ يوم ، .  
بنهاية فترة الحضانة تجري عملية العد للمستعمرات النامية على سطح الأوساط المغذية ، عملية العد تتم باستخدام جهاز عد المستعمرات دون رفع غطاء طبق بترى ، إذا كان عدد المستعمرات كبير ، عندها يمكن تقسيم قعر طبق بترى إلى عدة أقسام وفي النهاية نجمع التعداد الناتج لكل الأقسام .

باستخدام المكبرة أو باستخدام المجهر نقوم بوصف ودراسة المستعمرات المميزة من حيث الشكل واللون والحواف والمميزات الأخرى .

نقوم بأخذ عينات من المستعمرات الموصوفة سابقاً بواسطة لاقحة معقمة وننقلها إلى شريحة ( نظيفة وخالية من الدهون ) . على قطرة من الماء المعقم ونقوم بتحضير أكثر من لطاخة ، تُلَوَّن اللطاخة بصبغة غرام ، بعدها يُغسل المحضر بالماء ويُجفف ويدرس بالتكبير المناسب ، تُرسم أشكال البكتريا الناتجة وتُسجل النتائج السابقة كلها في جدول منفصل .



الوسط المغذي المستخدم	عدد المستعمرات	رقم المستعمرة	صفات المستعمرات						شكل الخلايا	صبغة غرام
			الشكل	الانتشار	اللون	الشفافية	الارتفاع	الحواف	القوام	
MBA	1									
	2									
	3									
	.									
	.									
نشابك	1									
	2									
	3									
	.									
	.									

على الرغم من أن الأحياء الدقيقة في التربة توجد في بيئة غذائية واحدة وظروف بيئية واحدة، إلا أنه باستخدام طريقة العد بالأطباق لا يمكننا إظهار جميع الأنواع البكتيرية الموجودة في التربة وذلك للأسباب التالية :

عدم وجود بيئة حتى الآن تُلائم نمو جميع الميكروبات في التربة ، فمثلاً البكتيريا المحللة للسيللوز وذاتية التغذية لا تظهر على وسط ( MBA ) .

تفرز بعض البكتيريا مضادات حيوية Antibiotic تُسبب عدم ظهور بعض الأنواع الأخرى من البكتيريا ، كما أن البكتيريا اللاهوائية لا تظهر على الأطباق .

تحد درجة الـ pH في البيئة المستعملة من نمو بعض الأحياء الدقيقة ، فمثلاً إذا ضُبِطت الـ pH عند القيمة ٧ فإن معظم الفطريات والخمائر لا تنمو وهكذا

تتأثر بعض الأجناس البكتيرية بدرجة حرارة الحضان ، فمثلاً لا تظهر البكتيريا المحبة للحرارة Thermophilic بدرجة حرارة ٢٢ °C – ٢٥ .



مكتبة أ إلى ز