جمهورية العراق

وزارة الزراعة

مديرية زراعة النجف الأشرف

مختبر وقاية النبات Plant Protection Laboratory

إعداد

مروة علوان منى

معاون رئيس مهندسين زراعيين

2022

المحتويات

المقدمة -- 3

الفصل الأول

أهمية المختبر -- 4

الفصل الثاني

كيفية التعامل مع المواد الكيميائية والأوساط الغذائية -- 6

الفصل الثالث

الأجهزة والأدوات المختبرية -- 15

الفصل الرابع

جمع وحفظ الحشرات Collecting and preserving insects -- 46

الفصل الخامس

عزل وتنقية وحفظ الأحياء المجهرية Isolation and preserving Microorganism ------------------------- 69

الفصل السادس

جمع وحفظ الحلم والعناكب Collecting and preserving Spider and Mites ---------------------------- 111

الفصل السابع

عزل وحفظ الديدان الثعبانية Isolation and preserving Nematodes ----------------------------------- 116

الفصل الثامن

الأدغال The Weeds --- 131

الفصل التاسع

نقص العناصر lack of elements in plants -- 137

المصادر --- 148

المقدمة :

ظلت فكرة إصدار هذا الدليل تراودني لسنوات إلى أن تم بعون الله وبتوفيقه أن يكون بين يدي المهتمين بمجال العمل في المختبرات وهو أول دليل مصور ومبسط عن ماهية العمل المختبري عموماً موضحة به أهم طرق العزل الشائعة للآفات التي تصيب النباتات والمحاصيل الإقتصادية المهمة ، وإعطاء مباديء أساسية في مجال الأمان لدى التعامل مع الكيميائيات . في هذا الدليل حاولت الإشارة إلى ضرورة حماية المختبر كونه الإطار الذي يحوي العمل الكيميائي والبايولوجي ونظراً لكون علوم الحياة أصبحت علماً يستهوي العديد من الناس كما أنها مرتبطة إرتباطاً وثيقاً بالحياة العملية ومواكبة بل ملازمة لروح العصر والتقدم .

يعتبر النبات مهدداً بالخطر منذ لحظة زراعة البذرة وحتى حصاد المحصول واستغلاله حيث يتعرض لأربعة عوامل مضادة وهي: (الحشرات Insects – الأمراض Diseases – الأدغال Weeds - الظروف البيئية Environmental Conditions والديدان الثعبانية Nematode).

لذلك سوف يتم التطرق في هذا الدليل إلى طرق عزل وحفظ المسببات المذكورة أعلاه بإعتبارها المشاكل الرئيسية التي تواجه النبات أثناء نموه وتطوره. وإن حالة المعاناة التي يتعرض لها النبات من جراء الإصابة بهذه المسببات تؤدي إلى التأثير في وظائفه الحيوية والفسيولوجية للأعضاء النباتية المختلفة.

كما إن أي مرض من الأمراض النباتية التي تظهر في منطقة ما لا يمكن التعرف عليه وتشخيصه بسهولة في الحقل إلا بإجراء بعض الدراسات المختبرية كالفحص المجهري للعينات المرضية أو عزل المسببات المرضية على أوساط غذائية أو دراسة المسبب مظهرياً وتشريحياً ، أو تحديد طرق المقاومة ، وغيرها من الدراسات المختبرية .

أخيراً أود أن ألفت النظر إلى إنني أشرت إلى موضوعات شتى بشكل مجمل وأظن إن الصواب أن يؤخذ كل موضوع منها على حدة بكثير من الشرح والتفصيل لكن غايتي هي تقديم مرجع ومرشد أول يستند إليه الطلاب والباحثون والعاملون فيه .

الفصل الأول

أهمية المختبر :

هو المكان الذي تجري فيه كثير من العروض العملية والتجارب ، وتوجد به مواد كيميائية صلبة وسائلة ، وقد توجد به غازات وأبخرة ويمكن أن يكون العمل في المختبر آمناً غاية الأمان لو كان جيد التصميم وتتوفر فيه إشتراطات الأمن والسلامة . كما إن للمختبر مكانة جليلة ، فهو المكان الحيوي الذي يستطيع فيه الطلاب والباحثين تفهم العلم طالما إنهم يمارسونه فعلياً ، والمختبر العلمي وحدة محكمة التنظيم لتحقيق الأهداف بتوجيهات من قبل إناس متمرسين متفهمين لقيمته أخلاقياً وللمسؤوليات الشرعية لسبل الأمان فيه ، إن أهم ميزة للمختبر هي إنه يخلق الشغف والرغبة لدى الطلاب والباحثين في تحصيل العلوم لذلك يجب تصميم المختبر بحيث يمكن إجراء أي عمل فيه وبشكل يتم فيه التقليل من نسبة الحوادث إلى الحد الأدنى .

ينشأ الخطر في المختبرات من :

1- الإهمال في الصيانة لتوصيلات الغاز أو المواقد أو الأجهزة والزجاجات .

2- الإهمال في الإستخدام مثل الإهمال في التأكد من نوعية وصلاحية المواد أو مقاديرها أو التراخي في إرتداء الملابس المناسبة .

الشروط الواجب توفرها في إنشاء مختبر

1- إعداد مختبر الأمراض النباتية إعداداً علمياً جيداً وذلك من حيث إختيار الموقع والتصميم المناسب الذي يسمح بإجراء التجارب المختبرية .

2- يجب أن يكون تصميم البناء وتجهيزه بمواد يسهل نظافتها وتعقيمها بسهولة و يفضل أن يبنى بمواد غير قابلة للإشتعال . كما يجب أن تكون جميع أسطح العمل كالكاونترات والمقاعد مقاومة للمواد الكيميائية . والتأكد من خلو دهان الجدران من مادة الرصاص ، حيث تتحول مركبات الرصاص إلى لون أسود عند تعرضها للغازات عند تشكل غاز كبريت الهيدروجين في هواء المختبر .

3- توفر مصدر للماء والغاز والإضاءة الكافية والتهوية الجيدة .

4- يجب أن يلحق بالمختبر غرفة صغيرة لإجراء تجارب العزل والتنقية والعدوى تعرف بغرفة العزل Isolation room بحيث يمكن تعقيمها بسهولة بواسطة مصباح أشعة فوق البنفسجية Ultra Violet (U.V.) كذلك ممكن تطهيرها بالمواد الكيميائية كالفورمالين أو الكحول المركز 100% قبل بدء العزل

بفترة كافية إضافة إلى وجود مروحة تعمل بإدخال هواء نقي عبر مرشحات إلى داخل الغرفة ودفع الهواء إلى الخارج وبصورة مستمرة من هذه الغرفة كي نضمن عدم دخول الهواء الملوث أثناء العمل فيها .

5- يلحق بالمختبر غرفة صغيرة خاصة بأعمال التصوير إن أمكن .

6- يجب أن تكون في المختبر دواليب لعرض النماذج المرضية وحفظها بصورة جيدة بعد تشخيصها لكي تكون مرجعاً للمشتغلين في علم الأمراض النباتية .

7- يجب أن يزود مختبر الأمراض النباتية ببعض الأدوات والتجهيزات الخاصة بالدراسة وهذه تختلف حسب الغرض والهدف من الدراسة .

8- من المستحسن وضع أبواب للمختبر ذاتية الفتح والإغلاق وذلك للحيلولة دون لمس الأبواب ومقابضها بالأيدي الملوثة .

9- يجب أن لا يقل عرض الممر عن 6 أقدام وذلك للسماح للمعدات الكبيرة للحركة بسهولة .

10- يجب فصل المكاتب عن المختبرات .

11- يجب توفير حواف للرفوف الحاملة للزجاجيات والمواد الكيميائية بقدر 1.5 بوصة والرفوف الحاملة للكتب 4/3 بوصة وذلك تجنباً لسقوطها .

12- يجهز المختبر بطفايات حريق وغسول للعين وأطقم إسعافات أولية كاملة وأغطية .

13- وجود لوحات علمية لها علاقة بالأعمال الفنية يمكن أن يضفي شيئاً من البهجة إلى المكان وإلى النفوس التي تعمل في هذا المكان .

14- يجب وضع ساحب الهواء للأدخنة الكيميائية في كل مختبر أو منطقة عمل تستعمل فيها مواد قابلة للإحتراق أو سامة .

15- تثقيف العاملين في المختبر على موقع وإستخدام جميع معدات الطوارئ والسلامة قبل ممارسة النشاط داخل المختبر . وتحديد إجراءات السلامة التي ينبغي إتباعها في حال وقوع حادث / الطواريء .

16- معرفة موقع وكيفية قفل صمامات الغاز والمياه والكهرباء في المختبر بالإضافة إلى معرفة كيفية إستخدام جميع المعدات في حالات الطواريء والسلامة (الدش وغسل العين ومجموعة الإسعافات الأولية وبطانية الحريق وطفايات الحريق و إلخ ....)

17- الحفاظ على قائمة أرقام هواتف الطواريء بالقرب من الهاتف .

الفصل الثاني

كيفية التعامل مع المواد الكيميائية والأوساط الغذائية

هناك بعض القواعد العامة للعمل في المختبرات الكيميائية ، وإتباعها يجعل من عملك وعمل زملائك الآخرين أكثر تنظيماً ودقة وأماناً ويمكن تلخيصها بالنقاط التالية :

1- النظافة : أنت المسئول عن إزالة كافة المواد الكيميائية التي تقع في موقع عملك أو حول الموازين أو حجرات الغازات . تأكد من تنظيف المكان المحدد لعملك قبل مغادرة المختبر وخطط لعملك المختبري بحيث يتوفر لديك الوقت الكافي للتنظيف .

2- لا تنقل حاويات المواد الكيميائية إلى مكان عملك ، حيث أن نقل هذه الحاويات يسبب في تأخير العمل نتيجة البحث عن المواد الكيميائية المفقودة ، وأفضل طريقة هو أخذ المادة المطلوبة للاستعمال في زجاجة صغيرة نظيفة إذا كان سائلاً أو صلباً وإرجاع الحاويات إلى مواقعها الأصلية في الدواليب أو المخازن الكيميائية .

3- لا تسرف في صرف المواد الكيميائية وحاول استخدام الكمية المناسبة التي لا تزيد عن حاجتك ، وتذكر أن المواد الكيميائية الفائضة عن الحاجة والتي ترمى خارجاً هي مصدر لتلوث الهواء والماء إضافة إلى الخسارة المادية .

4- لا ترجع المواد الكيميائية الفائضة إلى الحاويات الأصلية. إن الخطأ في هذه الحالة وارد جداً ويأتي من خلال إرجاع المواد الكيميائية الفائضة إلى حاوية أخرى مختلفة أو تلوث المادة الكيميائية أثناء استخدامها، وقد تكون المادة تلوثت بالماء أو بالكيماويات الأخرى . وقد تختلط هذه المادة مع المواد الأخرى الموجودة على طاولة العمل مما يسبب في تلوث المصدر الرئيسي للمواد الكيميائية . ويمكن تجاوز هذه المشكلة وذلك بالتخلص من المواد الفائضة بطريقة عملية مناسبة وحسب توجيهات المختصين.

5- لا تضع أي شيء داخل زجاجات المواد الكيميائية والسبب الرئيسي في هذا التحذير هو تقليل احتمالية التلوث بمواد أخرى. لذلك يفضل سكب Pour السائل من الحاوية الرئيسية إلى حاوية أخرى أو كأس زجاجي ولا تضع غطاء الحاوية على طاولة العمل الملوثة . وفي حالة تفريغ جزء من المادة الصلبة حاول قلب Tip الزجاجة ببطء مع التدوير ولا تحاول استخدام الملاعق فقد تكون مصدر التلوث .

6- يتوجب تعقيم المهملات بالحرق أو بالتعقيم الحراري بالأوتوكليف.

7- تنظيف وغسل الأدوات الزجاجية بواسطة مذيب عضوي مثل الأسيتون لإزالة بقايا المواد العضوية وإذا تطلب الأمر يمكن إستخدام حامض الكروميك لإزالة المواد الصلبة اللاصقة وكبيرة الكمية .

8- تحضير خطة البحث قبل البدء بالعمل بها .

9- لا تعمل وحيداً في المختبر .

10- عند تسخين المحاليل تأكد من عدم إرتفاع درجة حرارة المحلول لذلك يجب تحريكه بقوة لتجنب فورانه .

11- عند تخفيف حامض معين يجب إضافته إلى الماء البارد شيئاً فشيئاً وليس العكس كذلك يجب إضافة الحامض بشكل بطيء إلى أسفل القضيب الزجاجي مع التحريك الحذر للتقليل من أي عنف للتفاعل .

12- عدم غمس الماصة في المحاليل السامة والحوامض القوية والسوائل الحيوية وكذلك تجنب السحب بالفم لذلك إستخدم الماصة الأوتوماتيكية أو ذات المضخة .

13- السوائل المتطايرة السامة يجب التعامل معها تحت هود بخاري .

14- يجب تخزين السوائل القابلة للإشتعال مثل الإيثر والكحول والبنزين في أماكن بعيدة عن مصادر الحرارة واللهب .

15- عدم دخول المختبر في حال عدم وجود أي من العاملين فيه .

16- عدم نقل أي شيء من المختبر دون علم المسؤولين عن هذا المختبر . والتصريح عن كل المكسورات وعن الحوادث مهما بدت تافهة .

17- يجب تحديد منطقة لخزن وإستهلاك الطعام والشراب وعدم خزن أو إستهلاك أي طعام خارج هذه المنطقة . كما يشار للمناطق المسموح فيها بتناول الطعام بلوحة بارزة (مثلاً : منطقة طعام) حيث لا يسمح في هذه المنطقة بوجود أو إستخدام أي مادة كيميائية .

18- عدم إستعمال الزجاجيات أو الأدوات المختبرية في تحضير الطعام أو الشراب وكذلك عدم إستعمال البرادات المختبرية في حفظ الأطعمة .

19- عدم فحص الكيميائيات عن طريق شمها أو تذوقها .

20- عدم وضع المواد الكيميائية الصلبة مباشرة على طاولة العمل بل يوضع تحتها ورق ترشيح وعند إمتصاص ورق الترشيح للسائل توضع أسفلها زجاجة ساعة أو أي سطح عازل مشابه لها .

21- يجب وضع بطاقات لاصقة للتحذير مثل مواد مشعة ، سامة ، سموم حيوية ، سموم محرقة ، ليزر وغيرها وهناك إشارات أخرى تشير إلى مكان دوش الأمان ومحطة غسل العين ومخارج وأدوات إطفاء الحريق والأخيرة أيضاً يجب وضع بطاقات لاصقة عليها تحوي معلومات تشير فيها إلى أي من الحرائق يمكن إستعمالها .

22- يجب أن تحتوي حاويات الفضلات على بطاقات تشير فيها إلى نوع الفضلات وكيف يتم تصريفها بأمان ، وتوضع أيضاً بطاقات على الحاويات الكيميائية يشار فيها إلى السمية الناجمة عن إستعمال هذه الكيمياويات حيث توضع على حاوية حامض الكبريتيك لون أصفر وحامض الآزوت لون أحمر وماءات الأمونيوم (الصودا الكاوية) لون أخضر وحامض كلور الماء لون أزرق .

23- يزود كل مختبر أدوات سلامة مهنية مثل نظارات الأمان وواقيات الوجه وقفازات وبدلات أمان .

24- تنفيذ عمليات التفتيش العادية لجرد المواد الكيميائية .

25- تحديث المخزون للمواد الكيميائية سنوياً على الأقل .

26- عدم تجاوز مخزون المواد الكيميائية الخطرة الكميات المسموح بها .

27- الإحتفاظ بسجل لحصر المواد الكيميائية الخطرة المتداولة .

القواعد العامة في حالة حدوث الحوادث والإصابات :

أ- دخول مواد كيميائية للعين :

تفتح العين بإصبعي الإبهام والسبابة وتغسل بكمية كبيرة من الماء ، وأيضاً تغسل بمادة $NaHCO_3$ بتركيز 1% و حامض البوريك بتركيز 1% أيضاً على التوالي .

ب- الحروق :

لا تعامل بقع الحروق بالماء وإنما وضع ضمادات خاصة على المنطقة المصابة .

جـ - التسمم :

ينقل المصاب فوراً إلى المستشفى .

طرق التخلص من المواد الكيميائية :

لقد غدا التحكم بما ينسكب من المواد الكيميائية موضوعاً شائعاً جداً وعلى قدر كبير من الأهمية طالما أن المشاكل المترافقة مع التحرر المستفحل للكيميائيات الخطرة في غرف الكيميائيات بات يحدث بشكل كبير ويزداد يوماً بعد يوم . يحدث التفريغ إلى البيئة على مستوى محدد تماماً كما حين يتم التساقط من برميل يسرب إلى البالوعة مباشرة . لا يقتصر الحذر على الخزن اليومي للكيميائيات الخطرة غير المستعملة لكن كذلك على خزن كميات كبيرة من الفضلات الخطرة يمكن للكيميائيات المتساقطة أن تبدي تهديداً فورياً للصحة والحياة لأشخاص غرفة الخزن .

خزن المواد الكيميائية :

يمكن للخزن الجيد للكيميائيات أن يقلل من المخاطر التي تهدد أمان وصحة الأشخاص والأجهزة والأبنية والبيئة . كما يتطلب الخزن الآمن إجراءات مناسبة عن طريق تحديد الكيميائيات الواجب خزنها ومدى خطورتها ، كذلك إستخدام أجهزة معينة والتمرين على إستعمال هذه الأجهزة .

1- يجب خزن حاويات المواد الكيميائية في مكان جيد التهوية .

2- منع أي كسر أو تسرب من الممكن أن يسبب أي خطر لأي شخص يعمل في منطقة الخزن أو يسبب تلفاً للكيميائيات أو يلحق الأذى والضرر بالحاويات والأجهزة أو البناء .

3- يجب أن تفصل مناطق الخزن وتحمى من الحريق أو من تساقط أي من الكيميائيات .

4- يجب أن يتم الحصر ويمنع الإنتقال إلى أية بقعة خارج منطقة الخزن .

5- عدم إستعمال الأدراج والممرات كأماكن للخزن مما يؤدي إلى إغلاق المخارج وسبل الوصول لأدوات الإسعاف والتحكم .

6- عدم إستعمال المستودعات كمناطق للتحضير بسبب إمكانية حدوث أي حادث وإمكانية حدوث التلوث غير الضروري لكميات كبيرة من المواد حيث يتم التحضير والتعليب في منطقة منفصلة .

7- يجب أن تفتح مستودعات الخزن طيلة ساعات العمل النظامي فلا يضطر العمال لخزن المزيد من كميات المواد الكيميائية في مختبراتهم .

8- يجب أن توضع مسؤولية الأمان والتحكم بجرد المخزن في يد شخص واحد وإذا كان ذلك غير ممكن فلابد من توظيف موظف خزن بدوام كامل .

9- تخزن الحوامض في حاويات واقية من الإنفجار كما يجب تزويد مناطق خزن الكيميائيات بمطفئات حريق أوتوماتيكية وبأجهزة إنذار (كاشفات) للدخان وأجهزة تنفس ذاتي وأجهزة تحكم بالمتساقطات .

10- قبل تسلم أية مادة جديدة معروف عنها أو يفترض إنها خطرة تعطى معلومات عن طرق التعامل المناسب بما في ذلك إجراءات التصريف المناسبة .

الرموز العامة للأمن والسلامة :

هناك بعض الإشارات التحذيرية التي توضع على عبوات المواد الكيميائية والتي يجب معرفتها حتى نتمكن من التعامل مع هذه المواد بالشكل الصحيح.

وفيما يأتي جدول يبين بعض الإشارات التحذيرية التي توضع على عبوات المواد الكيميائية، وما تدل عليه، والتحذير الواجب إتباعه عند التعامل مع العبوات التي تحمل هذه الإشارات.

جدول رقم (1)

الإشارات التحذيرية ومدلولاتها، وخطورة المواد الكيميائية وكيفية التعامل معها

الإشارة التحذيرية ومدلولها	**خطورة المادة الكيميائية**	**التحذير**
مادة سامة جدا	تتمثل خطورة هذه المادة على الصحة في استنشاقها أو ابتلاعها أو ملامستها للجلد، حيث من الممكن أن تسبب الوفاة.	تعامل معها بحذر شديد، وتجنب ملامستها للجلد أو محاولة استنشاق أبخرتها، أو تذوقها، أو استخدام طريقة السحب بالفم عند أخذ كمية منها باستخدام الماصة، ويجب استدعاء الطبيب فوراً في حالة حصول ذلك.
مادة آكلة أو	إذا لامست المواد الكيميائية التي تحمل هذه الإشارة الأدوات أو الأنسجة الحية فإنها تؤدي إلى قرضها أو تآكلها وتخريبها.	ابتعد عن أبخرتها، وتجنب ملامستها للجلد والملابس، وسقوطها على الأدوات.

قارضة		
مادة مهيجة	يكون للمواد الكيميائية التي تحمل هذه الإشارة آثار مهيجة على الجلد والعين والأعضاء التنفسية.	ابتعد عن أبخرتها، وتجنب ملامستها للجلد أو العين.
مادة مؤذية وضارة	تسبب المواد الكيميائية التي تحمل هذه الإشارة تلفاً وضرراً لأنسجة الجسم في حال استنشاقها أو ملامستها.	تجنب الأبخرة المتصاعدة منها، وابتعد عن ملامستها للجلد والعين، وراجع الطبيب فوراً عند التأذي بها.
مادة متفجرة	يكون للمواد الكيميائية التي تحمل هذه الإشارة خاصية الانفجار إذا تعرضت لظروف معينة.	تعامل مع هذه المواد بحذر شديد، وتجنب الاحتكاك والصدمات والشرارات الكهربائية أو الحرارة، عند التعامل معها.
مادة قابلة للاشتعال بسرعة	مواد تشتعل تلقائياً.	تجنب وضعها بالقرب من اللهب أو ملامستها للنار، أو وضعها تحت أشعة الشمس المباشرة.
	غازات قابلة للاشتعال.	احفظها بعيدا عن مصادر الحرارة، وتجنب تكون مزيج من غازات مشتعلة.
	سوائل قابلة للاشتعال.	احفظها بعيدا عن النار ومصادر الحرارة، ومصادر الشرارة.
	يمكن أن تشكل المواد المؤكسدة مواد قابلة للاحتراق، وبالتالي تزيد من اشتعال النار في	احفظها بعيدا عن المواد القابلة للاشتعال، وعن مصادر الحرارة

مادة مؤكسدة	الحرائق، مما يجعل عملية إطفائها صعبة.	واللهب.
مادة مشعة	تسبب خطرا على الشخص الذي يتعامل معها، ومن الممكن أن تظهر أعراض هذا الخطر متأخرة بعض الشيء.	لا ترفعها من أوعية الحفظ الخاصة بها. لا تمسكها باليد، واستخدم ملقطاً لذلك، واغسل يديك جيدا بعد كل تجربة تستخدم فيها المواد المشعة. تجنب الأكل والشرب في الأماكن التي توجد فيها مواد مشعة. أبعد النظائر المشعة عن العين والفم وبثور الجلد المفتوحة.

كما توجد رموز وعلامات خاصة لتحذير العاملين في المختبرات هي :

1- **إشارات المنع :** عادة تكون هذه الإشارات بلون أحمر مثل :

2- **الإشارات الإجبارية :** تدل هذه الإشارات على الإحتياطات الواجب إتخاذها قبل البدء بالعمل المختبري وتكون ذات لون أزرق مثل :

3- **إشارات الإستدلال والمعلومات :** هي إشارات توجيهية لما يجب إتباعه في الحالات الطارئة وهي ذات لون أخضر مثل :

4- **إشارات خطورة المواد الكيميائية :** تدل هذه الإشارات على نوع الخطر المتوقع من المواد الكيميائية مثل :

5- **إشارات التحذير :** تدل الإشارات أدناه على إحتمالات الخطر الموجود في المنطقة المشار إليها :

علامات تحذيرية للمواد الكيميائية
Chemical Warning Signs

الرمز	نوع المادة الخطرة	أمثلة المواد الكيميائية
	مادة قابلة للاشتعال	بنزين، كيروسين، كحول
	مادة متفجرة	مخلوط من الهيدروجين والأكسجين
	مادة تساعد على التآكل	أحماض وقلويات قوية مثل: حمض الهيدروكلوريك، حمض الكبريتيك، حمض النيتريك، هيدروكسيد الصوديوم، هيدروكسيد البوتاسيوم
	مادة سامة	الزئبق، سيانيد، غاز الكلور، الزرنيخ
	مادة مهيجة ومنبهة للحواس	الكحول، كلوروفورم، بخار البروم، عوادم من حمض الكبريتيك المركز، الأمونيا
	مادة مشعة	كربون مشع، يورانيوم، بلوتونيوم

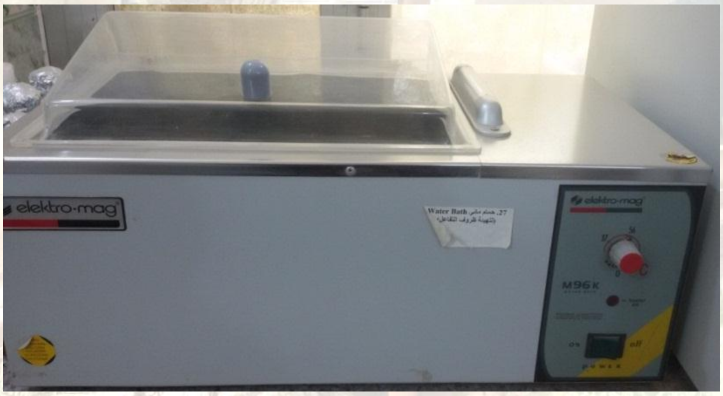
الفصل الثالث

الأجهزة والأدوات المختبرية

أولاً : الأجهزة

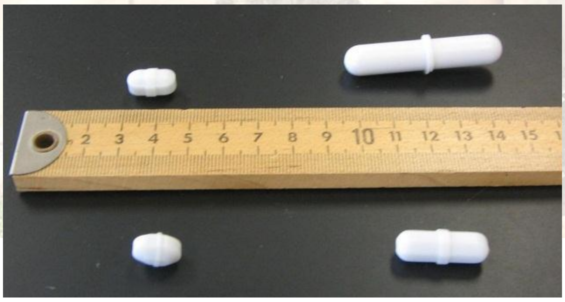
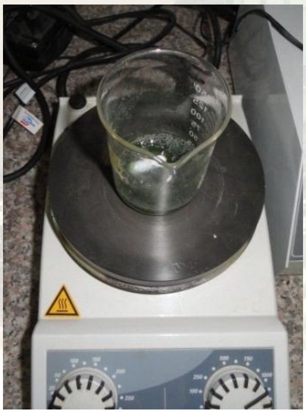
1- **فرن كهربائي Oven :** يستخدم في تجفيف العينات النباتية والتربة وتعقيم الأدوات الزجاجية والمعدنية

2- **حمام مائي Water Bath :** يستخدم في عمليات التسخين غير المباشر تفاديا للنتائج السلبية التي قد ترافق عمليات التسخين المباشرة مثلا انكسار الأوعية الزجاجية، أو انسكاب المواد كما يستعمل الحمام المائي للتسخين لفترات طويلة وهو يؤمن درجات حرارة أقل من 100 سيليزية .



3- **حاضنات Incubator :** وهي أجهزة يمكن التحكم في درجات حرارتها وتستخدم لتنمية الفطريات والبكتريا وتربية الحشرات، ويفضل إستخدام الحاضنات التي تعطي درجات حرارة ذات مدى واسع يبدأ من الصفر إلى +50 مْ لكي يمكن إستخدامها في كافة الدراسات التي تتطلب مدى حراري واسع ويفضل أن يكون بالمختبر أكثر من حاضنة .

4- **مازج مغناطيسي حراري :**عبارة عن جهاز خلط يستخدم في المختبرات الكيميائية. يتكون في الأساس من مغناطيس دوار بفعل مغناطيس أو مجال مغناطيسي آخر غير متصل معه. عادة يكون أحد المغناطيسين الدائمين متصلا بمحرك كهربائي بينما يغمر القضيب المغناطيسي الآخر في السائل. عند دوران المغناطيس السفلي يتأثر القضيب المغناطيسي المغمور في السائل ويحاول الدوران بنفس اتجاه المغناطيس المدار دون أي اتصال ميكانيكي بينهما. هذا النوع من الخلاطات مهم جدا في المعامل الكيميائية والأماكن التي تتطلب عزل تام بين الأجزاء الميكانيكية (تجنبا للاحتكاك، أو التأكسد، أو تسرب المادة السائلة عبر محاور الدوران). يشار إلى أن المحرك المغناطيسي كان قد اخترع عام 1917 في الولايات المتحدة الأمريكية ثم ظهر اختراع وتطبيق آخر له في الأربعينات ثم السبعينات حيث استخدمت المغانط المتعددة النقاط.

الأقضبة المغناطيسية بأحجام مختلفة

5- **المجاهر Microscopes :** المجهر هو جهاز يستخدم لتشخيص الأحياء المجهرية المنقولة على الشريحة أو ما يسمى (Slide) ويتم إستخدام بشكل خاص العدسة الزيتية Oil immersion من

خلال إستخدام زيت السدر Cedar oil الذي له خاصية هي معامل إنكساره يشبه معامل إنكسار الزجاج ويحوي على مادة عازلة بين الزجاجة والعدسة مما يسهل عمل الجهاز في تكبير الأحياء .

إن فائدة المجهر لا تقتصر على التكبير بل تتحدد بقدرة التمييز Resolving Power وتعرف بأنها أقل مسافة بين شيئين ممكن رؤيتهما منفصلين عن بعضهما . وهي تعتمد على نوعية العدسات وقوة التكبير وطريقة تحضير الشريحة كذلك تتحدد قوة التمييز عند التكبير العالي بالطول الموجي للضوء . إذ كلما كان الطول الموجي قصير كانت قوة التمييز أعلى وعلى هذا الأساس إن الحد الأعلى لقوة التمييز في المجاهر الضوئية تساوي 0.2 Micrometer وهي تكفي لدراسة المظهر العام للخلية ولكن لا تكفي للحصول على أعلى قوة تمييز بإستخدام العدسة الزيتية 100X

أنواع المجاهر :

1- المجهر البسيط Simple microscope :

وهو عدسة مفردة محدبة الوجهين ذات قوة تكبيرية بسيطة .

2- المجهر المركب compound microscope :

أو ما يعرف بالمجهر الضوئي حيث أنه يستخدم الأشعة الضوئية للتمكن من رؤية العينات وسمي بالمجهر المركب لأنه يتكون من عدة عدسات مركبة وذات خواص معينة . و يوجد له نظامان منفصلان من العدسات لتكبير الجزء المفحوص والمسماة بالعدسات العينية Eye-piece والعدسات الشيئية Objective كما ويحتوي على مصدر للضوء إما على شكل مرآة أو مصدر إضاءة كهربائي. ولفهم طريقة عمل كلا النظامين من العدسات يجب أن نفهم الأسس والعلاقات بين كل من التكبير

Magnification والقدرة التوضيحية Resolving power وكذلك الإضاءة Illumination والتي سنذكرها مفصلة لاحقا. ويعد هذا النوع من أكثر المجاهر استخداماً في معامل الأحياء الدقيقة .

3- المجهر ذو الحقل المظلم Dark-field microscope :

استعمال الحقل المظلم في الفحص المجهري يسهل رؤية العينة وهي في حالة إضاءة زاهية في حين أن باقي الحقل المجهري يظهر مظلماً . ويمكن الحصول على هذه الميزة بتزويد المجهر بمكثفات يمكنها توجيه الضوء الصادر من مصدر الإضاءة باتجاه العينة حيث تنعكس الأشعة منها وتمر خلال العدسة الشيئية فيبدو حقل الرؤية مظلماً والصورة شديدة الإضاءة لامعة.

ويمكن رؤية بعض الخلايا التي لا يمكن رؤيتها باستخدام المجهر الضوئي العادي ومن الإستخدامات الطبية لهذا المجهر رؤية *Treponema pallidum* المسبب لمرض الزهري وذلك لصعوبة رؤيته باستخدام المجهر الضوئي العادي .

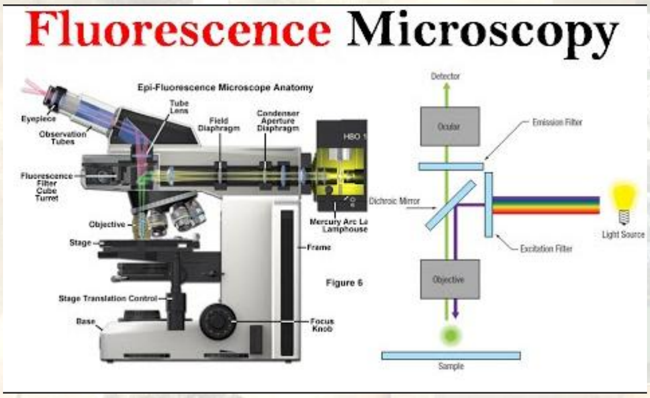
4- مجهر الأشعة فوق البنفسجية Ultra-violet microscope :

حيث يتم استخدام الأشعة فوق البنفسجية ذات الطول الموجي الأقصر من الطول الموجي للضوء المرئي فيعطي تكبيراً ووضوحاً للعينة بشكل أكبر بمرتين أو ثلاثة وهو لا يستخدم عدسات عينية بل

يكون مجهز بكامرات تصور العينات ثم تحمض وتكبر لاحقا . ويستعمل هذا المجهر عند استعمال أصباغ فلورسنتية لها قدرة على امتصاص الأشعة فوق البنفسجية.

5- المجهر الفلورسينتي Flurecence microscope :

حيث يعامل خليط من البكتيريا بمواد لها ميزة الإشعاع إذا ما تعرضت لأشعة فوق بنفسجية تكسبها البكتيريا وتصبح مشعة .



6 - المجاهر الإلكترونية: Electron microscope

تستخدم الإلكترونات بدلاً من الأشعة الضوئية في هذا النوع من المجاهر حيث أن الإلكترونات ذات طول موجي قصير فتعطي هذه المجاهر قوة تكبيرية عالية تصل لأكثر من نصف مليون مرة أي حوالي 1000 ضعف عن المجاهر العادية.

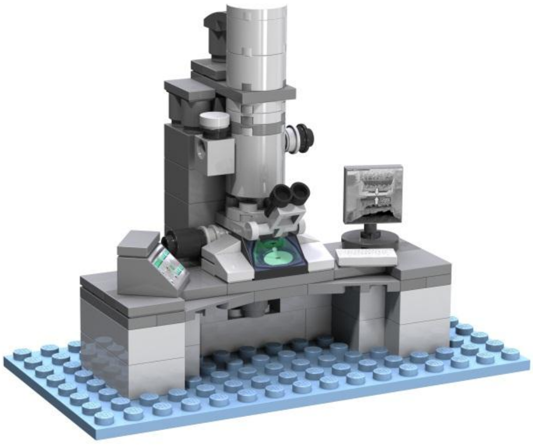
وفي الميكروسكوب الإلكتروني تمر الإلكترونات من خلال سلسلة من المجالات المغناطيسية تشبه في عملها نظام العدسات في المجهر الضوئي وبذلك فالإلكترونات التي تنعكس عن العينة والتي تنفذ من خلالها تبعاً لكثافة التراكيب في العينة المفحوصة يمكن استقبالها على لوحات حساسة أو مشاهدتها على شاشات خاصة مفسفرة تسمح برؤية الصورة لامعة. وهي على عدة أنواع منها:

المجهر الإلكتروني الماسح: Scanning electron microscope

تقوم كمية قليلة من الإشعاع الإلكتروني بمسح العينة فتتجمع الإلكترونات المنبعثة من العينة لتكون الصورة المنبعثة على أنبوبة أشعة المهبط

المجهر الإلكتروني النافذ: Transmission electron microscope

في حالة المجهر النافذ تتعرض العينة كلية للإشعاع الإلكتروني الذي ينفذ أو يمر من العينة ليكون الصورة على شاشة العرض ويأتي التباين في الصورة من الإختلافات في الكثافة الإلكترونية للعينة ، أو من كمية الإلكترونات التي تمر من خلال العينة.



ومما هو جدير بالذكر أن الفحص بالمجهر الإلكتروني يحتاج إلى معاملات خاصة سواءاً في تحضير العينة أو في إعداد المجهر للفحص.

7 ـ المجهر ذو الأطوار المتباينة:

يساعد هذا المجهر كثيراً في دراسة التراكيب الداخلية للخلية الحية على عكس المجاهر الأخرى التي يلزم قتل وصبغ الخلايا . وهذا المجهر له القدرة على زيادة التباين بين الجزيئات الشفافة داخل الخلية الحية حسب اختلاف كثافة هذه الجزيئات فتظهر إما زاهية مضيئة أو معتمة تبعا للكثافة لهذه التراكيب المكونة للخلية الحية واختلاف هذه الكثافة الضوئية ناتج من استخدام مكثفات خاصة تعمل على ترشيح الضوء المار خلال العينة.

وبالرغم من تعدد أنواع وأشكال المجاهر إلا أن المجاهر المستخدمة في مختبرات الأحياء الدقيقة تكاد تكون متشابهة ويعد المجهر المركب من أهم هذه الأنواع .

ونأتي الآن على توضيح هذه الأمور بالنسبة للمجهر المركب الأكثر انتشاراً في مختبرات الأحياء:

التكبير:Magnification

يتم التكبير في المجهر المركب من خلال نظامين من العدسات:

ا- **العدسات الشيئية : Objective Lens** وهي العدسات القريبة من العينة المراد فحصها وتكون قوة التكبير محفورة على حاملها المعدني وتعطي صورة حقيقية للعينة المكبرة.

وتشمل العدسات الشيئية على عدة أنواع منها : الماسحة scaning x4 و الصغرى low power X 10 والكبرى high power X40 والعدسة الزيتية . oil-immersion التي يستخدم فيها أحد أنواع الزيوت المستخرجة من خشب نبات Cedarwood Oil ليحل محل الهواء بين الشريحة والعدسة وفائدة هذا الزيت تكمن في أن معامل إنكسار الزيت يساوي معامل إنكسار الزجاج وبالتالي يمنع تشتت أو تغيير مسار الأشعة الضوئية أي إنه يعمل على تجميع الحزمة الضوئية المارة خلال العينة ويجب أن يكون

الزيت رائق خالٍ من التضبب ، ويمكن وضع العدسة الشيئية المناسبة بتدوير القطعة الأنفية للحصول على العدسة المناسبة. هذه العدسات تعمل معاً لتعطي تكبير يساوي حاصل ضرب تكبير العدسة العينية × تكبير العدسة الشيئية .

ب- العدسات العينية : Eye-piece وهي العدسات القريبة من العين تكبر الصورة الناتجة من العدسة الشيئية وتكون قوتها التكبيرية مكتوبة عليها وتتراوح بين x5 وx35.

ولحساب القوة التكبيرية للمجهر نستخدم المعادلة التالية:

التكبير الكلي= قوة تكبير العدسة الشيئية x قوة تكبير العدسة العينية

ويلاحظ وجود ضوابط تعمل على تعديل البعد بين العدسة الشيئية والعينة من خلال تحريك العمود الحامل للعدسات وهما الضابط التقريبي Coarse adjustment الذي يحرك أنبوبة الميكروسكوب بسرعة فنحصل على رؤية تقريبية وأيضا يوجد الضابط الدقيق Fine adjustment الذي يعمل على تحريك أنبوبة الميكروسكوب ببطء لضبط العينة عند البعد البؤري الصحيح.

تركيب المجهر:

يتركب المجهر من عدة أجزاء رئيسية وهي:

1- القاعدة : base تستخدم لتثبيت المجهر ويوجد عليها مفتاح الإضاءة وسلك لمرور التيار الكهربائي ومصباح للإضاءة.

2- ذراع المجهر : arm يثبت التركيبات العليا من المجهر كالعدسات و المسرح و منخار المجهر والضوابط وفي الجزء السفلي منه يحوي على مصدر الضوء ويساعد كذلك في حمل المجهر بشكل آمن وصحيح.

3- **مسرح المجهر : stage** توضع عليه شرائح العينات وتثبت بواسطة ملاقط خاصة ويوجد أسفله مسمارين يتم بهما تحديد الموضع المراد فحصه من العينة بتحريك العينة في جميع الإتجاهات بسهولة ، بالإضافة لوجود الحجاب القزحي والمكثف أسفل المسرح للتحكم في شدة الإضاءة.

4- منخار المجهر : Revolving nose-piece ويستخدم في تثبيت العدسات العينية والشيئية .

5- مصدر الإضاءة : يوجد في قاعدة الميكروسكوب ويتم التحكم في شدة الإضاءة بمفتاح للتحكم في شدة الإضاءة ويعطي كمية الضوء المناسبة للمساعدة على رؤية العينات بوضوح.

6- المكثف : condenser يعمل على إعطاء كثافة مناسبة من الضوء لتوضيح الرؤية عن طريق تجميع وتركيز الضوء على العينة المراد فحصها و يتكون من عدة عدسات.

7- الضابط الدقيق fine adjustment knob والضابط التقريبي (الكبير) coarse adjustment knob : يوجدان أسفل المسرح ومثبتان على ذراع المجهر ويعملان على ضبط رؤية العينة بدقة.

8- العدسة العينية : Eye-piece من خلالها يستطيع الإنسان رؤية العينة ، وهي مكونة من عدستين:

أ- العدسة السفلى (عدسة المجال).

ب-العدسة العليا (عدسة العين).

9- العدسات الشيئية : objective نتحكم بها في رؤية الشرائح وتنقسم إلى العدسة الماسحة وقوة تكبيرها 4 × و العدسة الصغرى 10 × والعدسة الكبرى 40 × أو 60 × والعدسة الزيتية 100 × و تكون قريبة من العينة.

10- الحجاب القزحي : iris diaphragm الموجود أعلى المكثف مباشرة ويعمل على التحكم بكثافة الضوء المار لإيضاح العينة.

ملاحظات هامة:

يتم التحكم في شدة الإضاءة كما يلي:

مفتاح التحكم في شدة الضوء.

خفض ورفع المكثف.

التحكم في فتحة المكثف.

المرشحات.

طريقة استخدام المجهر:

1- تضبط المسافة بين العدسات العينية بتحريكها لليمين أو اليسار بحسب البعد بين العينين للمستخدم

2- توضح الرؤية في العدسات العينية بتدويرها لتعديل الفارق البصري في العينين إلى أن تعطي أوضح صورة.

3- عند استخدام العدسة الشيئية الماسحة ×4 والعدسة الصغرى ×10 توضع في مكانها الصحيح وذلك بأن تسمع صوت عند ثبات العدسة وباستعمال الضابط الكبير توضح العينة ولكن بدرجة قليلة ثم يستخدم الضابط الدقيق للحصول على أفضل رؤية وتضبط شدة الإضاءة باستخدام المكثف وكذلك باستخدام الحجاب القزحي أو باستخدام مفتاح الإضاءة بزيادة كمية الضوء أو تقليلها.

4- عند استخدام العدسة الزيتية ×100 يوجد طريقتين لذلك:

أ- توضع قطرتين من الزيت (زيت السيدر Cedar oil) على الشريحة والذي له دور كبير في تجميع الضوء وتوضيح الرؤية بسبب حدوث تشتيت للضوء عند استخدام عدسات ذات تكبير عالي والزيت يكون له عامل انكسار مماثل لمعامل انكسار الزجاج ولهذه الخاصية يستخدم الزيت ثم تدار العدسة الشيئية الزيتية وتقرب بالضابط الكبير ببطء حتى تلامس العدسة قطرة الزيت ويجب الحذر بسبب قرب العدسة من الشريحة ، ثم تضبط الشريحة بواسطة الضابط الصغير حتى ترى العينة بوضوح.

ب- توضع قطرتين من الزيت (زيت السيدر) على الشريحة ثم تدار العدسة الشيئية الصغرى وتضبط بالضابط الكبير حتى ترى العينة ، ثم تدار العدسات إلى العدسة الزيتية وتضبط الشريحة بواسطة الضابط الصغير بحركة باتجاه الشخص الفاحص حتى تعطي أفضل رؤية.

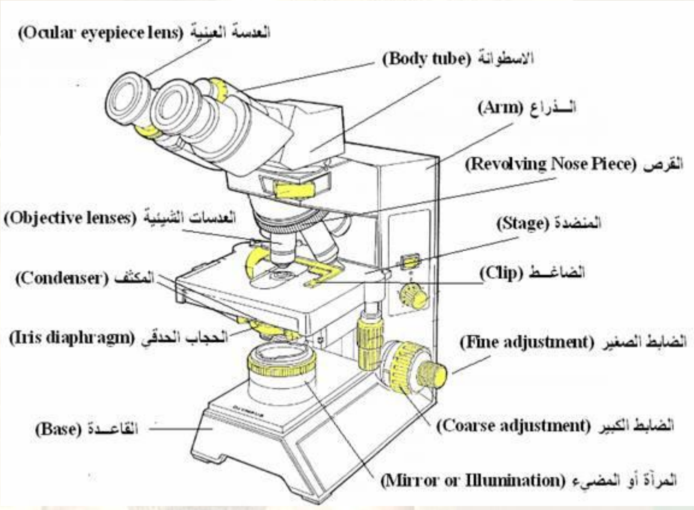
ملاحظة : تسمى المنطقة التي تظهر في الميكروسكوب بالحقل المجهري.

بعض الإجراءات الهامة لصيانة وحماية المجهر :

1- عند نقل المجهر من مكان إلى آخر يرفع المجهر من الذراع بيد وتوضع اليد الأخرى تحت القاعدة .

2- يحفظ في دولاب مغلق بعيداً عن الأتربة .

3- تنظف العدسات قبل وبعد الإستخدام بورق تنظيف العدسات والزايلين Xylene أو الأسيتون + الكحول[1] . كما يمكن إستخدام Cotton Swab بدلاً من ورق العدسات .



6- ميزان حساس Electric Balance : يستخدم في وزن الأوساط الغذائية والمواد الكيميائية الجافة ويكون بعدة مراتب .

[1] تحذير : الأسيتون لوحده مذيب قوي قد يؤذي المادة اللاصقة للعدسات لذلك يحذر من إستخدامه .

-7 طاحونة : تستخدم لطحن الأجزاء النباتية المجففة مسبقاً لغرض إجراء البحوث عليها .

-8 رجاج Shaker : يستخدم لرج الأوساط الغذائية والمستخلصات النباتية وغيرها من الإستخدامات .

9- كاميرا : لتصوير العينات المصابة والآفات

10- جهاز تقطير : يستفاد من الجهاز في الحصول على ماء منزوع الأملاح والعناصر المعدنية وذلك لإستخدامه في مختلف التجارب المختبرية وتحضير الأوساط الزرعية .

11- غرفة عزل : عبارة عن غرفة صغيرة تجرى فيها تجارب العزل والتنقية والعدوى تعرف بغرفة العزل Isolation room ويمكن تعقيمها بسهولة بواسطة مصباح أشعة فوق البنفسجية Ultra Violet U.V كذلك تطهر بالمواد الكيميائية كالفورمالين أو الكحول المركز 100% قبل بدء العزل بفترة كافية إضافة إلى وجود مروحة تعمل بإدخال هواء نقي عبر مرشحات إلى داخل الغرفة ودفع الهواء إلى الخارج وبصورة مستمرة من هذه الغرفة كي نضمن عدم دخول الهواء الملوث أثناء العمل فيها ومزودة بمصباح لهب ومصباح إضاءة .

12- المؤصدة Autoclave : جهاز تعقيم بالبخار تحت الضغط Steam under pressure وينظم على درجة حرارة 121 ْم وضغط 15 باوند / إنج ولمدة 15 دقيقة ، يستخدم لتعقيم السوائل والأوساط الزرعية وجميع المواد التي تتلف بالحرارة الجافة عدا المحاليل السكرية .

13- ثلاجة : تستخدم لحفظ العينات .

14- جهاز الإستخلاص بالكحول : جهاز سوكسلت (بالإنجليزية: Soxhlet extractor) هو جهاز مختبري اخترعه فرانز فون سوكسلت عام 1879. صمم الجهاز أصلا لإستخلاص الليبيدات من المواد الصلبة، ولكن السوكسلت ليس محدودا بإستخلاص الليبيدات. عادة ما يكون السوكسلت مطلوبا فقط عندما يكون المركب المرغوب محدود الذوبان في المذيب والشوائب غير ذائبة في هذا المذيب.

إذا كان المركب المطلوب له ذوبانية عالية في المذيب إذن يمكن استعمال الترشيح البسيط لفصل المركب من المواد غير الذائبة.

توضع المادة الصلبة المحتوية على المركب المرغوب داخل أنبوبة مصنوعة من ورق ترشيح سميك والذي يوضع في الغرفة الرئيسية لجهاز سوكسلت. يركب جهاز سوكسلت في دورق يحتوي على مذيب الإستخلاص. ثم يركب المكثف.يسخن المذيب لإعادة الإذابة يتصاعد بخار المذيب في ذراع تقطير، ثم يفيض إلى الغرفة المحتوية على المادة الصلبة المراد الإستخلاص منها. يضمن المكثف تبريد أي بخار للمذيب حيث يقطر على الغرفة المحتوية المادة الصلبة. تمتلئ الغرفة المحتوية على المادة الصلبة ببطء بالمذيب الدافئ. وذلك سوف يجعل بعض المادة المرغوبة تذوب في المذيب الدافئ. عندما تكاد أن تمتلئ غرفة سوكسلت، فأن الغرفة تفرغ تلقائيا بواسطة ذراع سيفون جانبية والمذيب يرجع مرة أخرى لدورق التقطير. ربما تترك هذه الدورة لتتكرر عدة مرات، تترك ساعات أو أيام.

خلال كل دورة فأن جزء من المركب غير الطيار يذوب في المذيب. بعد عدة دورات فأن المركب يكون تركز في دورق التقطير. ميزة هذا النظام أنه بدلا من إمرار عدة أجزاء من المذيب الدافئ خلال العينة فأنه يتم استعمال كمية ثابتة من المذيب يعاد تدويرها.

يزال المذيب بعد الإستخلاص، عادة يكون باستعمال المبخر الدوراني حيث يعطي المركب المستخلص. يتبقى الجزء غير الذائب من المادة الصلبة في الأنبوبة وعادة ما يتخلص منه.

15- جهاز الكثافة الضوئية Spectrophotometer : جهاز يستخدم لقياس الكثافة الضوئية للسوائل

16- جهاز الطرد المركزي Center Fudge : جهاز يستخدم في الترسيب حيث يتم فيه توليد قوى الطرد المركزي عن طريق الدوران فتتجه الجزيئات الأقل ثقلاً إلى الخارج بعيدا عن محور الدوران ، واما الجزيئات الأكثر ثقلاً فتبقى في قعر الأنبوب .

17- جهاز تحديد ملوحة وحموضة التربة والأوساط الزرعية pH meter و Ec

ثانياً : الأدوات الزجاجية

يتم إستعمال الأدوات الزجاجية في المختبر بشكل واسع يجعلنا ننسى في بعض الأحيان ضرورة الحذر عند إستعمال هذه الزجاجيات ومن أكثر الحوادث الشائعة بين العاملين في المختبرات هي الجروح الناجمة عن إستعمال الزجاجيات والتي تشكل 25% من جميع الحوادث بسبب الإستعمال الخاطيء أو إستعمال الزجاج غير السليم الذي يحوي كسراً أو ما شابه حيث الإهمال هو السبب الرئيسي في الإيذاء الحقيقي في المختبر .

إن العديد من أدوات المختبر المتوفرة الآن مصنوعة من البلاستيك وهي غالباً غير قابلة للكسر في درجات الحرارة العادية لذلك يمكن إستبدال الزجاج بها في كثير من الأحيان كما أن العديد من مركبات البلاستيك المستعملة في المختبر لها درجات إنصهار ومقاومة للكيميائيات مختلفة .

حفظ الزجاجات في المختبر وتنظيمها :

التنظيم والحفظ آلية يجب علينا إتباعها وهي دليل على المهارة العلمية والدقة في التوزيع الصحيح لما نمتلك وتجنبنا الكثير من الحوادث مستقبلاً ، لذا ينبغي علينا عند حفظ الأدوات الزجاجية إتباع الآتي :

1- حفظ الأدوات ذات الصنف الواحد معاً على رف واحد .

2- ترك حيز مناسب بين كل صنف وآخر .

3- وضع الزجاجيات ذات الأحجام الكبيرة في الخلف والصغيرة في المقدمة .

4- وضع الأصناف الثقيلة في الرف السفلي ، والأخف في الرف العلوي .

5- وضع الزجاجيات ذات الصنف الواحد المستخدمة بإستمرار في مقدمة الصف والزجاجيات الجديدة غير المستخدمة في الصفوف الأخيرة .

6- تغطية الزجاجيات الفارغة ذات الفوهة الواسعة بقطن لمنع تجمع الغبار فيها .

7- تجنب حفظ الزجاجيات في الرفوف وهي مليئة بالمحاليل حيث يفضل أن تكون ممتلئة إلى منتصفها فقط .

8- يجب ترك الزجاجيات بعد تنظيفها جانباً لتجف أو وضعها على حامل التجفيف .

9- لبس القفازات الواقية أمراً ضرورياً لتجنب مخاطر الجروح أثناء التعامل مع الزجاجيات .

10- وضع أنابيب الإختبار والماصات على الحوامل الخاصة بها لضمان سلامتها .

11- التأكد من عدم وجود شروخ أو كسور في الزجاجيات أثناء تعبئتها بالأحماض والمحاليل .

12- عدم ترك أي قنينة أو زجاجة مليئة بالمحاليل الكيميائية بدون غطاء فقد يعرضها ذلك للإنسكاب أو التبخر .

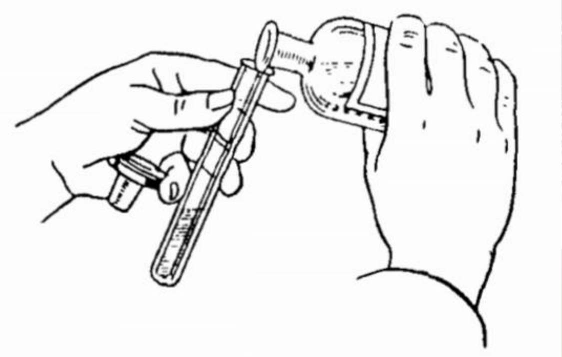
13- ترطيب فوهات الأنابيب والسدادات التابعة لها بالجليسرين والماء لتفادي عدم القدرة على فتحها .

14- إعادة الأدوات الزجاجية إلى المكان المخصص لها بعد الإنتهاء من إستخدامها وعدم تركها على منضدة العمل حتى لا تتعرض للسقوط والكسر .

15- عدم تكديس الزجاجيات مع بعضها البعض .

16- حفظ الشرائح الزجاجية الجاهزة داخل صناديق بلاستيكية أو خشبية مناسبة بوضعها متباعدة قليلاً عن بعضها بشكل جانبي لضمان سلامتها من الكسر ، وكذلك بالنسبة للمرايا والعدسات .

17- عدم حمل الزجاجة من عنقها لأسباب عديدة وواضحة بل يجب مسك جسمها بين الإبهام وبقية الأصابع دون لمس كف اليد لجسم الزجاجة حيث أن أي أذى يصيب كف اليد بحاجة إلى مدة معينة للشفاء.



18- يحمل أنبوب الإختبار بشكل سوي بين أصابع الإبهام والوسطى (وإذا أردت البنصر) تاركاً الأصبع الأول حر الحركة لأي عملية تحكم أو عملية بسيطة .

19- عند سكب بضعة قطرات لأي سائل من زجاجة ذات عنق ضيق إلى أنبوب إختبار تحمل الزجاجة باليد اليمنى بالطريقة المبينة بالرسم أعلاه وأنبوب الإختبار بين الإبهام والأصابع الأخرى على اليسار ، كما يجب وضع غطاء الزجاجة بين كرة الإبهام الأيسر والقسم اللحمي الأسفل للإصبع الصغير وإبقاء أنبوب الإختبار عالياً عند سكب السائل المطلوب ويعاد الغطاء حالاً .

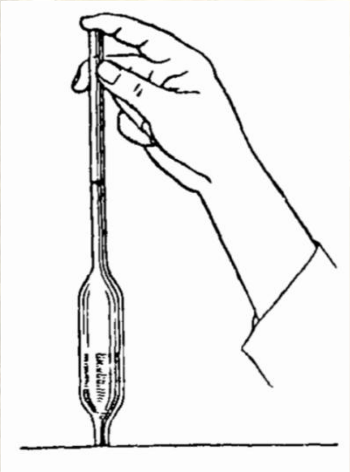
20- لدى السكب من إناء لآخر يجب إبقاء كلا الوعاءين بشكل بعيد عن الجسم لتجنب تساقط أي قطرة على الشخص .

21- من المفيد إستعمال قضيب زجاجي لتوجيه سيلان السائل لدى سكبه من الزجاجة خصوصاً لدى وضع الإناء على طاولة العمل فهذا يزيد من ميل السائل داخل الوعاء وتجنب الرشم .

22- عدم إعادة أية زجاجة إلى الرفوف ما لم تكن نظيفة بشكل تام . كما يجب عدم وضع أغطية الزجاجيات بعيداً عن الزجاجيات بل وضع الأغطية إلى جانب الزجاجيات العائدة لها بشكل مقلوب لضمان عدم تلوث الأغطية .

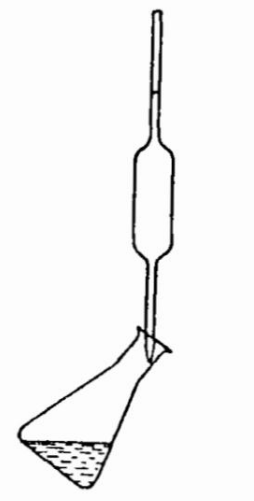
23- يجب حمل فوهة أنبوب الإختبار أخفض بقليل من الحنفية لدى ملئه أو ملء أي إناء آخر بالماء أو أي سائل آخر فهذا التصرف لا يؤدي إلى تلوث للحنفية فحسب بل إنه لدى سحب الإناء فإنه لا يكون منخفضاً بالشكل الكافي لتجنب الكسر وحدوث حادث .

24- تحمل الماصة بين الوسطى والإبهام ويكون التجويف بعيداً عن كف اليد والأصبع الأول حر ليستعمل بالتحكم في مستوى السائل لأنه أكثر مرونة من الإبهام .



25- تجنب مص السائل المطلوب بالماصة لأن هنالك خطر من مص زيادة من السائل ودخوله الفم إضافة إلى دخول القليل من اللعاب إلى الماصة وتلويث كل من الممص والسائل .

26- عند تفريغ السوائل من الماصة إلى وعاء ما ، ضع الوعاء بشكل مائل وضع فوهة الماصة بشكل يلامس العنق الجاف للوعاء وإستمر في ذلك لبعض الوقت تقريباً 5 ثوان إلى أن يتم النقل ولا تحاول النفخ بالماصة لتجنب التلوث .



27- لا ينصح بإستخدام أغطية زجاجية للزجاجات الحاوية على سوائل قلوية كاوية كماءات الصوديوم أو البوتاسيوم وذلك لصعوبة فتحها مما يؤدي إلى كسر عنق الزجاجة ، وإذا حصل هذا الشيء تمرر الأغطية على لهب خفيف أو بتغطيسها بماء حار . وفي حالة إستخدام السدادات المطاطية وأيضاً هناك صعوبة في فتحها تنقع بالماء لمدة 1-2 دقيقة وتعاد الكرة من جديد إذا لم تفتح . مع تجنب وضع السدادات على طاولة العمل للحفاظ عليها من التلوث ومنعاً لحدوث الإشتباه بين السدادات والزجاجات العائدة لها .

28- يحمل الوعاء أو الأنبوب الزجاجي بقطعة قماش مبللة لحماية اليد في حال كسر الزجاج .

29- في حالة وجود حافة زجاجية مكسورة توضع فوق مصدر حراري لإزالة الشقوق والحواف الجارحة.

30- توضع الزجاجيات الحاوية على الأحماض في شبك من البلاستيك لحمايتها وكذلك وضع حشوة على الأرض أو على الطاولة حيث يتم خزن أو إستعمال هذه الزجاجيات ويمكن إستعمال بلاستيك مثل بولي كاربونات عوضاً عن الزجاج لبعض الأنواع كما يجب عدم خزن الزجاجيات عالياً على الرف حيث من الممكن أن تكسر حين وقوعها على الأرض أو تجعل من الصعب على عامل المختبر الوصول إليها .

31- تستعمل عربة المختبر لدى حمل أكثر من زجاجة واحدة وعدم الجري في المكان الذي يتم فيه حمل الكيمياويات ويجب إستعمال الملاقط والماسكات العازلة لدى حمل الزجاجات الحارة لأنه من أحد أسباب تحطم وتناثر الزجاجيات مسكها وهي حارة جداً .

تنظيف الزجاجيات :

1- توضع الزجاجيات المتسخة في حوض به ماء ومسحوق أو سائل تنظيف ويتم تنظيفها بإستخدام الفرشاة .

2- تترك في حوض به ماء عادي لمدة ساعة وبعدها تشطف جيداً تحت الماء الجاري .

3- تشطف بالماء المقطر حسب الحاجة .

4- تجفف وذلك بوضعها في حامل التجفيف .

تنظف السحاحات والماصات جيداً بغسلها ومن ثم تشطف بالماء المقطر وتحفظ بعد الإستعمال بصورة عمودية على رفوف خاصة حيث توضع السحاحات بوضع الحنفية متجهة إلى الأعلى ونفس الشيء بالنسبة للإسطوانات المدرجة توضع رأساً على عقب على حوامل تحوي فوهات لحملها بعد غسلها بالماء المقطر بصورة جيدة .

أما بالنسبة للشرائح فإنها بعد غسلها بالماء المقطر تمسح بقليل من الكحول أو الزايلين وتجفف بورق خاص ، أو تترك لتجف . وفي حالة عدم فاعلية هذه الطريقة يجب إتباع بعض طرق التنظيف على حسب المادة العالقة بالزجاج ، أو نوع المواد المتسخة عليه ، كما في الجدول التالي :

جدول (1) المحاليل الكيميائية المستخدمة في تنظيف الزجاجيات المختبرية

ت	المركب أو المحلول المستخدم في التنظيف	طريقة التحضير	الإستعمال
1	حامض الهيدروكلوريك المركز	1- ضع 2 مل من حامض الهيدروكلوريك المركز في كأس زجاجي 2- أضف 100 مل من الماء المقطر	يوضع المحلول المحضر في حوض زجاجي ثم يتم نقع الزجاجات المتسخة به ثم تشطف بالماء المقطر.
2	الأسيتون	المتوفر في المختبرات	يستخدم في تنظيف الزجاجيات المتسخة بمواد عضوية بعدها تشطف بالماء المقطر .
3	حامض النتريك المركز	يخفف الحامض قليلاً	تنظيف الأدوات الزجاجية المتسخة بالشمع أو الرواسب الصعبة العالقة .

4	حامض النتريك المركز وثاني كرومات البوتاسيوم [2]	1- ضع حوالي 100 غم من ثاني كرومات البوتاسيوم في كأس زجاجي . 2- أضف 1 لتر من حامض النتريك .	تنظيف الأدوات الزجاجية المتسخة التي إستخدمت في التسخين فقط (يمكن إستخدام ثاني كرومات البوتاسيوم عدة مرات طالما لم يتغير لونه من البني المحمر إلى الأخضر الزيتوني)
5	حامض الهيدروكلوريك وفوق أوكسيد الهيدروجين	1- ضع 6% من حامض الهيدروكلوريك في كأس زجاجي . 2- أضف 5% من محلول فوق أوكسيد الهيدروجين . 3- سخن هذا المزيج قبل إستخدامه .	يستخدم في التنظيف السريع للأدوات الزجاجية لإزالة التلوث أو المواد العالقة ثم تشطف بالماء المقطر .
6	برمنغنات البوتاسيوم	1- ضع 100 مل من محلول برمنغنات البوتاسيوم بتركيز 5%. 2- أضف له (25-50) مل من حامض الكبريتيك المركز .	يستحسن سكبه في الأدوات الزجاجية المراد تنظيفها بعد غسلها بالماء الساخن ثم غسلها بالماء وتجفيفها .

1- Petry Dishes : طبق بتري هو وعاء مسطح دائري الشكل وشفاف مع غطاء، يصنع من الزجاج أو من اللدائن، ويستعمل من قبل علماء الأحياء لزراعة الخلايا ، ويستعمله علماء الكيمياء لحفظ بعض المركبات ووزنها. يأتي أصل التسمية من عالم البكتيريا الألماني يوليوس ريتشارد بتري الذي قام باختراعه عام 1887، عندما كان مساعداً لروبرت كوخ. طبق البتري المصنوع من الزجاج يمكن إعادة استخدامه بعد تعقيمه أما المصنوع من اللدائن فيجب رميه بعد الاستعمال.

[2] المحلول المتكون مادة ضارة بالإنسان والبيئة لذا يجب تقليل إستخدامه والحرص الشديد عند التعامل معه .

Conical flask -2 : دورق إرلنماير (بالإنجليزية: Erlenmeyer flask)، (يسمى في بعض الأحيان دورق مخروطي أو أرلينة)، وهو دورق له قاعدة مخروطية الشكل وعنق أسطواني يستعمل بكثرة في المختبرات الكيميائية، وهو يشبه الكأس الزجاجي ، إلا أن له عنقاً أضيق، مما يمكن من إحكام إغلاق الدورق باستخدام سدادة مطاطية.، ويستخدم في الخلط والمعايرة. يصنع دورق إرلنماير من زجاج البوروسيليكات، ويكون مدرجاً من الخارج لإعطاء تقدير تقريبي عن حجم المحتويات. سمي دورق إرلنماير بهذا الاسم نسبة إلى الكيميائي الألماني إميل إرلنماير Emil Erlenmeyer الذي ابتكر تصميم الدورق عام 1861

Volumetric flask -3 : دورق زجاجي شبه كروي مسطح من أسفله ذوعنق طويل يستخدم في المختبرات الكيميائية والكيمياء التحليلية لتجهيز المحاليل. يصنع الدورق عادة من الزجاج أو البلاستيك، ويكون العنق مزودا بمصد مصنوع من البروبلين بدلا عن الزجاج. كما ان عنق الدورق يحتوي على تدريج وملصق معنون فيه الحجم الاسمي ودرجة حرارة المعايرة.

4- Round-bottom flask دورق كروي :عبارة عن دورق اسفله كروي الشكل قد يكون بغطاء أو سدادة ويستعمل في المعامل الكيميائية. تصنع هذه الدوارق غالبا من الزجاج للأغراض الكيميائية وتوجد أنواع جديدة مصنوعة من البوروسيليكا المقاومة للحرارة. تتوافر الدوارق الكروية بأحجام مختلفة من 5 ميلي لتر إلى 5 لتر وتكون نهاية الدورق مخروطية الشكل لتمكين توصيلها بالانابيب والتوصيلات . يوضع الدورق الكروي فوق حلقة دائرية لضمان استقراره ويقبض من عنقه بواسطة كلابات خاصة بالمختبرات.

4- Beakers : الكأس الزجاجي أو البيشر (من الألمانية Becherglas) أو "البيكر" (من الإنجليزية Beaker)، وهو وعاء يصنع غالباً من الزجاج ويستخدم لتحريك وخلط ومزج السوائل في المختبرات الكيميائية. الكؤوس الزجاجية المستخدمة في المختبرات لها شكل أسطواني ذات قعر مسطح، ولها قياسات مختلفة من بعض الميلليلترات إلى العديد من الليترات. يتم صنع الكأس الزجاجي المختبري من زجاج البوروسيليكات الذي يمتاز أنه متين ومقاوم للحرارة وشفاف.

5- Fennels : القمع أو المِحْقَان أداة تتكون من قسم علوي مخروطي الشكل (فم القمع) ينتهي بقسم أسطواني ضيق .يسهل استخدام القمع عملية صب السوائل أو ملء حبيبات المواد المختلفة في الأواني والأوعية.تصنع الأقماع من الصلب غير قابل للصدأ أو من الزجاج أو من اللدائن المختلفة.

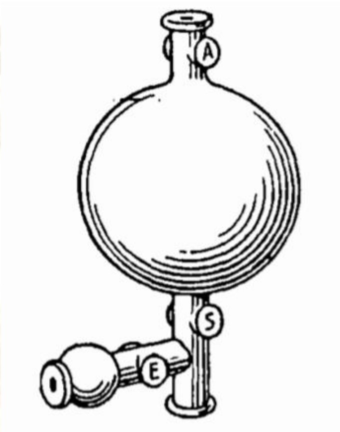
6- Pipette : الممص أو الماصة، (Pipette) هي أداة مختبرية يتم استخدامها في نقل أو قياس حجم سائل ما. تستخدم هذه الأداة غالباً في الكيمياء وعلم الأحياء العضوية إضافة إلى الصناعات الدوائية والطب. تتوفر هذه الأداة بعدة قياسات كما يمكن أن تصنع من عدة مواد كما تختلف في مدى دقتها في القياس. قد تكون شفافة أو غير شفافة. يعتمد مبدأ الماصة على تشكيل فراغ (عملية تفريغ) فوق الحجرة الحاوية على السائل، ومن ثم تحرير هذا الفراغ بشكل انتقائي لسحب السائل ونقله.

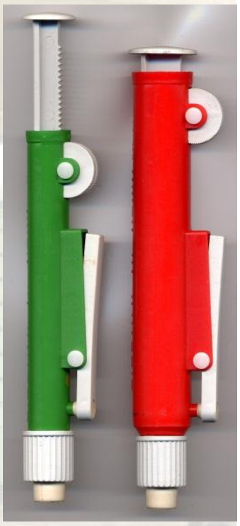
الماصات الزجاجية

أول ما ظهرت الماصات كانت مصنوعة من الزجاج. وهي عادة أكثر استعمالاً في الكيمياء في المحاليل المائية. يوجد هناك نوعين منها. الأولى لها انتفاخ في الوسط، له حجم معين ومحدد بدقة. يوجد منها

قياسات مختلفة، غالباً 10 مل أو 25 مل. أما النوع الثاني من الماصات فلا تكون حاوية على انتفاخ، إنما مستقيمة الجدران، وتكون مدرجة لحجوم مختلفة مثل 5 مل بتدريجات لكل 0.5 مل. الماصات ذات الانتفاخ أكثر دقة، حيث أن نسبة الخطأ فيها ± 0.1 إلى 0.2 مل.

يتم ملء الماصة بغمس رأسها المدبب في السائل المراد سحبه، ووضع (بصيلة مطاطية ، أي أداة بلاستيكية يودي الضغط عليها إلى توليد فراغ) على الطرف الآخر ثم بالضغط عليها حتى الحجم المطلوب ، حيث تركب البصيلة في أعلى الماصة وتحتوي على ثلاثة صمامات (A , E , S) وتعمل بالضغط عليها من قبل الإبهام والسبابة ، فعند الضغط على A يتم طرد الهواء من البصيلة بعدها يتم إغلاق A وفتح الصمام S بالضغط عليه أيضاً وأخذ الكمية المرغوبة من السائل (الشفط) أما عند الضغط على الصمام E سوف يدخل الهواء للبصيلة ومن ثم سكب الكمية المرغوبة من السائل . والبصيلة الصغيرة المجاورة للصمام E تستعمل لطرد آخر قطرة من السائل المتبقي في الماصة .ترتبط أحياناً بالماصات الزجاجية عتلات تستخدم في تفريغ السوائل دون إستخدام الفم كما موضح بالصور التالية

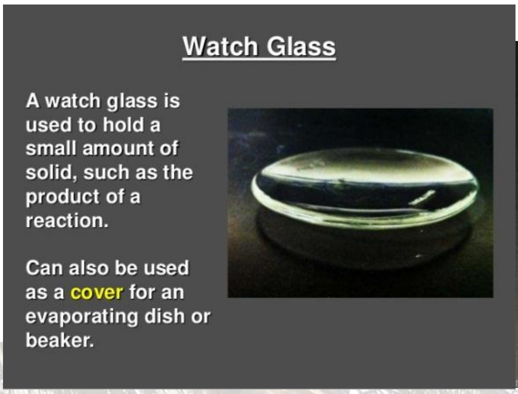




Micropipettes : هي نوع من الماصات القابلة للتعديل اعتمادا على حجم السائل المقاس ، يمكن أن يكون بين حوالي 0.1 ميكرولتر إلى 1000 ميكرولتر (1 مل). هذه الماصات تتطلب رؤوس بلاستيكية تغمس في السوائل يمكن التخلص منها.

رؤوس بلاستيكية تتصل بمقدمة Micropipette

7- Watch Glasses : زجاجة ساعة هي قطعة دائرية، مقعرة قليلا تستخدم عند الكيميائيين كسطح لتبخير السوائل و لوضع المواد الصلبة فيها لوزن هذه العناصر و تستخدم أيضاً كغطاء للأكواب في المختبرات. و الاستخدام الأخير يكون لمنع حبيبات الغبار أو أي مواد أخرى من دخول الكوب. و هذه الزجاجة لا تغلق الكوب الذي تغطيه تماما فهي تتيح تبادل الغازات بين الكوب و المحيط. عندما تستخدم هذه الزجاجة لتبخير السوائل، تسمح للخبراء بالتمعن و النظر و المراقبة بدقة عمليات الترسيب و التبلور التي تحدث أثناء التبخر. و يمكن أن تضع هذه الزجاجة على سطح له لون غامق لرؤية أوضح. وتدعى بهذا الاسم لأن شكلها مطابق لشكل الزجاج الأمامي للساعات القديمة.



8- Cylinders : الأسطوانة المدرجة أو المخبار المدرج أو المقياس المدرج هي إحدى تجهيزات المختبرات الكيميائية، تستخدم لقياس حجوم السوائل بدقة جيدة نسبياً تصل إلى 0.5 مل من أجل التطبيقات الكيميائية المختلفة، حيث أنها تعد أكثر دقة من الدوارق المختلفة، لكنها ليست بدقة الماصة .

كما يوحي الاسم فإن الأسطوانة المدرجة عبارة عن إناء زجاجي على الغالب له شكل أسطوانة عليها تدريجات من الخارج كل منها يساوي 1 مل، وله قاعدة متصلة. عند قراءة الحجم الموجود في الأسطوانة المدرجة يجب الانتباه إلى القراءة السليمة، وهي النظر إلى أسفل تقعر السائل الموجود في الأسطوانة.

9- Buchner Fennels : دورق تفريغ أو دورق بوخنر (بالإنجليزية: Büchner flask) وله مسميات أخرى مثل دورق تصفية، دورق ذراع جانبي - عبارة عن دورق مخروطي سميك الجدران مع انبوبة فرعية قصيرة بالقرب من العنق. يوصل أحد طرفي خرطوم بالانبوب القصير بينما الطرف الاخر للخرطوم بمصدر تفريغ (مضخة تفريغ مثلا) وكاحتياط امان يوضع محبس لمنع تسرب السائل من آلة التفريغ إلى الدورق وهذه وظيفة أخرى للدورق لمنع تسرب سوائل الات التفريغ إلى الأجهزة.

10- Burner أو مصباح بنزين : وهو من المعدات المختبرية الضروري وجودها في أي مختبر كيميائي، وهو موقد يعمل على الغاز ويصدر لهب ناري منفرد. يستخدم للتسخين أو للتعقيم. يعتبر موقد بنزن من أنظف الطرق العملية لحرق الغازات الطبيعية وغاز الفحم لإنتاج مصدر حراري ذو لهب ساخن تزيد حرارته عن 1000 درجة مئوية. سمي موقد بنزن بهذا الاسم نسبة إلى الكيميائي الألماني روبرت بنسن الذي ابتكر تصميمه في عام 1854.

11- spatula ملاعق : هي أدوات صغيرة تصنع من الفولاذ المقاوم للصدأ ، وتستخدم لكشط ، ونقل ، أو إضافة المساحيق للمواد الكيميائية أو العلاجات. العديد من ماركات الملاعق مقاومة أيضًا للأحماض والقواعد والحرارة والمذيبات ، مما يجعلها مثالية للاستخدام مع مجموعة واسعة من المركبات. النوع الشائع هو ملاعق الفولاذ المقاوم للصدأ ، والتي تستخدم على نطاق واسع لأنها متينة وميسورة التكلفة. فهي مقاومة للتلف عند وضعها في الماء المغلي والأحماض والقواعد ومعظم المذيبات.

12- Burette سحاحات : أداة مختبرية زجاجية ذات شكل اسطواني شاقولي مع تدريج حجمي على طول السحاحة وصنبور صغير محكم أسفلها. تستخدم السحاحة عادة في التجارب التي تتطلب نسبة عالية من الدقة في القياس مثل عمليات المعايرة في الكيمياء. يتم عادة تثبيت السحاحة بواسطة ملزمة موصولة بعمود وقاعدة معدنية خاصة حتى يتم الحفاظ على الشكل العمودي المطلوب للسحاحة خلال العمل المختبري.

إن تاريخ السحاحة هو مواز لتاريخ التحليل الحجمي وأول من قام بصنع السحاحة هو الفرنسي فرانسوا أنطوان هنري ديكروازيه (كان شكلها يشبه الأسطوانة المدرجة أكثر من السحاحة) وذلك في عام 1791. قام جوزيف لويس غاي لوساك بصنع نسخة محسنة من السحاحة كانت متضمنة لذراع جانبي، بعدها أضاف العالم الألماني كارل فريدرش مور إضافة مهمة جداً في أسلوب عملها بإضافة ملقط وبجعل نهايتها مدببة. وتوجد أنواع متطورة من السحاحات تسمى بالسحاحة الرقمية Digital burettes

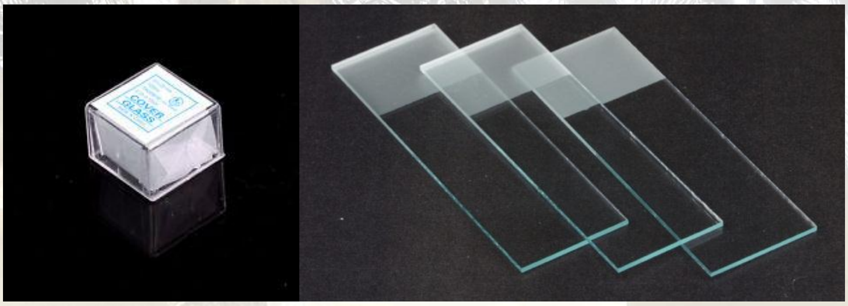
Burettes Digital burettes

13- قناني زجاجية حرارية : قناني مصنوعة من زجاج البوروسيليكات المتحمل للحرارة العالية وتستخدم لتعقيم السوائل والأوساط الغذائية .

14- Glass Rod : عصا زجاجية لخلط وتحريك السوائل وتكون ذو نهاية مستديرة .

15- Test Tubes أنابيب إختبار : هو أداة مختبرية زجاجية ذات فتحة من الأعلى تستخدم لصب أو نقل أو خلط المحاليل والمواد الكيميائية والسوائل. في بعض الحالات يكون أنبوب الاختبار مصنوعاً من البلاستيك. وتتوفر أنابيب الأختبار بأحجام وقياسات مختلفة.

16- Cover Slides and Slides شرائح زجاجية وأغطيتها : هي قطعة رقيقة من الزجاج المسطح يتراوح طولها و عرضها بـ 75 و 25 ملم (3 في 1 بوصة) وسمكها 1 ملم. عادة ما تصنع الشريحة المجهرية من الزجاج مثل الزجاج العادي Soda-lime glass أو زجاج البورسليكات Borosilicate glass وقد تطورت صناعتها إلى الشرائح المجهرية البلاستيكية. وفي حالات أخرى تستخدم شرائح الكوارتز المنصهرة عندما تكون شفافية الأشعة الفوق بنفسجية مهمة مثل المجهر الفلوري حيث يعمل هذا المجهر على تجميع وتركيز الأشعة على العينة لحث الأجزاء المضيئة فيها لانبعاث الضوء من العينة وتستخدم لفحص العزلات البكتيرية والفطرية والحلم مجهرياً



17- ملقط حديدي : لحمل الدوارق الساخنة

18- مدق خزفي : لسحق العينات وطحنها يدوياً

19- Wash Bottle قنينة غسل : أو الغاسلة البلاستيكية هي قنينة عصر مزودة بفوهة، تستخدم لشطف الأجزاء المختلفة من الزجاجيات المختبرية، مثل أنابيب الاختبار، والدوارق الكروية. تغطى بغطاء ملولب عند ضغط أو عصر القنينة باليد ينضغط السائل داخل القنينة فيندفع خارجًا عبر الفوهة تيار رفيع من السائل. تصنع معظم قناني الغسل من متعدد الإيثيلين، وهو مادة بلاستيكية مرنة ومقاومة للمذيبات العضوية ذات المصدر البترولي. معظم القناني تحتوي أنبوبًا داخليًا يسمح باستعمال القنينة منتصبةً.

تملء قناني الغسل بإحدى مذيبات المختبر المعروفة وفقًا للعمل المنجز في ذلك المختبر. وتشمل هذه المذيبات: ماء مقطر، محاليل المنظفات والمذيبات المستخدمة في الشطف مثل الأسيتون، وإيزوبروبانول أو إيثانول. في المختبرات الأحيائية، يستخدم محلول هيبوكلوريت الصوديوم من أجل التعقيم والقضاء على الأحياء المجهرية غير المرغوبة.

الفصل الرابع

جمع وحفظ الحشرات Collecting and preserving insects

إن من أحسن الطرق لدراسة الحشرات هو القيام بجمعها من بيئاتها الطبيعية التي تعيش فيها مما سيتيح للشخص الذي يقوم بالجمع معرفة أماكن تواجد كل نوع والعوائل النباتية التي يتغذى عليها وسلوك وعادات النوع المراد جمعه .

الوقت الذي تجمع فيه الحشرات :

1- في الصيف تكون درجات الحرارة عالية وهذا يلائم بعض الأنواع الحشرية ، كما أن الأمطار الصيفية تلائم نمو بعض الحشائش والنباتات البرية والتي تعتبر عوائل أساسية لتغذية هذه الأنواع الحشرية . أو أن هذه الحشائش والنباتات يتكاثر فيها نوع معين من الحشرات أي يضع فيها البيض ، ونتيجة لذلك يزداد تعداد هذا النوع من الحشرات خلال هذا الفصل .

2- في الربيع تظهر أنواع أخرى من الحشرات ، وفي معظم الحالات تكون هذه الأنواع قد قضت فصل الشتاء في سبات في أحد أطوارها كالبيض كما في دودة الحرير ، أو اليرقة كما في ثاقبة ساق الذرة ، فتخرج من السبات في الربيع كما في الحالة الأولى ، أو في الصيف كما في الحالة الثانية .

3- يمكن جمع الحشرات خلال ساعات معينة من اليوم أي في وقت نشاطها فنجد أن بعض الأنواع الحشرية تنشط نهاراً بينما البعض الآخر ينشط ليلاً .

الأماكن التي تجمع منها الحشرات :

1- النباتات والأشجار
2- في أوراق النباتات الجافة
3- تحت الأحجار أو الغلف أو كتل الأشجار
4- في المواد المتعفنة كجثث الحيوانات أو الفاكهة التالفة أو روث الحيوانات
5- في المنازل
6- في الماء
7- في التربة

الأدوات التي تستعمل في جمع الحشرات :

1- شبكة جمع الحشرات Sweep net :

وهي شبكة مصنوعة من القماش والذي يحاك بطريقة معينة ومقاسات مختلفة فالقماش بعد أن يحاك فإنه يركب على سلك دائري ويربط السلك على عصا من الخشب بحيث تعطي الشبكة في النهاية شكلاً مخروطياً كما في الشكل التالي .

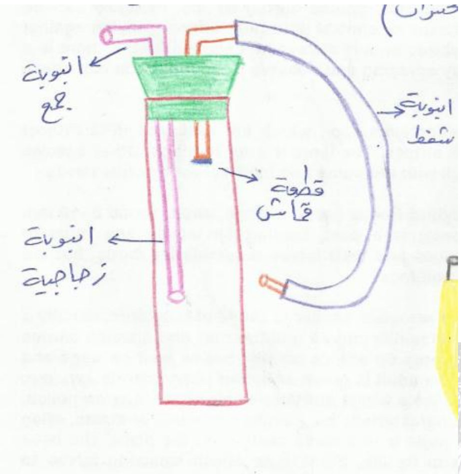
وتختلف أحجام الشبكات بإختلاف نوع الحشرة التي يراد جمعها فمثلاً الشبكات الكبيرة تستعمل لجمع الحشرات الكبيرة مثل الجراد بأنواعه أو أبو الدقيق والزنابير . كما أن هنالك أحجام صغيرة تستعمل لجمع الحشرات الصغيرة كالجاسيد والخنافس البرغوثية والذبابة البيضاء .

2- أنبوبة الشفط (شفاطة) Aspirator

تستعمل لجمع الحشرات الصغيرة مثل الجاسيد والذباب الأبيض وغيرها . وفي معظم الأحيان تستعمل لجمع الحشرات التي يراد جمعها حية بغرض تربيتها وإستعمالها في التجارب ، ويوجد منه أنواع عديدة إلا أن أشهرها الأنواع التالية :

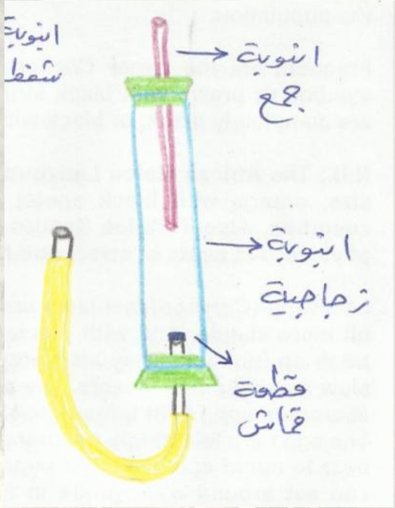
أ- النوع الأول : يتكون من الأجزاء التالية :

أنبوبة شفط – أنبوبة جمع – أنبوبة زجاجية ، والأنبوبة الأخيرة مغطاة بفلين به ثقبين يمر من خلالهما الإنبوبتين (الشفط و الجمع) وعند شفط الهواء خلال أنبوبة الشفط تدخل الحشرات خلال أنبوبة الجمع وتستقر في قاع الأنبوبة الزجاجية . تكون فتحة أنبوبة الشفط التي تقع داخل الأنبوبة الزجاجية مغطاة بقطعة من القماش لمنع وصول الحشرات إلى الفم أثناء عملية الشفط .



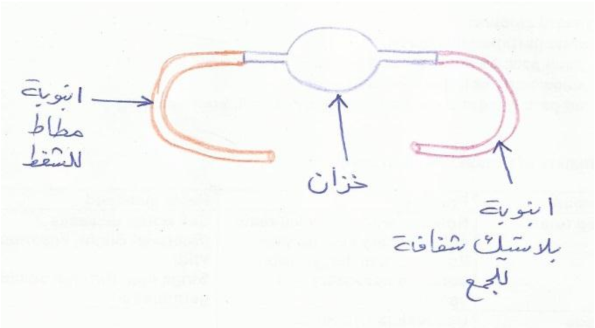
ب- النوع الثاني :

نفس النموذج أعلاه لكن هناك إختلاف بسيط حيث أن الإنبوبة الزجاجية مفتوحة في النهايتين الأمامية والخلفية وتقفل أحد النهايات بغطاء فليني به ثقب واحد تمر من خلاله أنبوبة الشفط ، كما تقفل النهاية الثانية بغطاء فليني مماثل به ثقب واحد أيضاً تمر من خلاله أنبوبة الجمع ويراعى أن تغطى فتحة أنبوبة الشفط الموجودة داخل الأنبوبة الزجاجية بقطعة قماش لمنع وصول الحشرات إلى الفم .



جـ - النوع الثالث :

يختلف قليلاً عن النوعين السابقين ويتكون من أنبوبة زجاجية مفتوحة في نهايتها الأمامية والخلفية .
يوجد في منتصف الإنبوبة خزان أو إنتفاخ يوضع في أحد النهايات أنبوبة من المطاط للشفط ، وتغطى أيضاً بقطعة من القماش . والنهاية الثانية يوضع فيها أنبوبة بلاستيك شفافة لجمع الحشرات . الخزان الموجود في منتصف الأنبوبة يمنع إصطدام الحشرات بجدار الأنبوبة أثناء عملية الشفط حيث تستقر الحشرات في هذا الخزان .



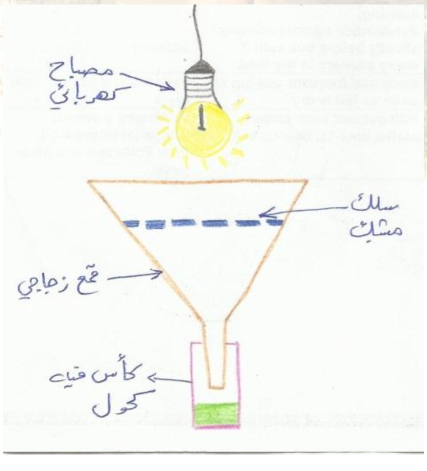
3- الغرابيل Sifters

بعض الحشرات الصغيرة والتي توجد في التربة أو الدقيق أو التبن أو الردة أو الأوراق النباتية الجافة يمكن جمعها بواسطة أنواع معينة من الغرابيل وذلك كما يلي :

يوضع قماش أبيض أسفل الغربال ، ثم تؤخذ كمية من المادة المحتوية على الحشرة التي يراد جمعها وتوضع في الغربال . وعند إجراء الغربلة تقع الحشرات في القماش أسفل الغربال وعندئذ يمكن جمعها بإستعمال جهاز الشفط أو بإستعمال فرشاة مبللة بالماء .

4- قمع برليز Berlese Funnel

يستعمل لجمع الحشرات متناهية الصغر ، الأكاروس والطفيليات الخارجية التي تصيب الطيور أو الحشرات الموجودة في التربة . ويتكون الجهاز من قمع زجاجي يثبت عليه من الداخل قطعة من القماش . وفي الفتحة السفلى للقمع يوضع إناء به كحول أو زجاجة قتل الحشرات . ووضع مصدراً للضوء في أعلى القمع .تؤخذ المادة المحتوية على الحشرات كالتربة مثلاً وتوضع في القماش أو سلك النملية المثبت على القمع . يلاحظ بعد فترة أن الحشرات التي تهرب من الحرارة المنبعثة من مصدر الضوء تزحف إلى أسفل القمع وتستقر أخيراً في الإناء المحتوي على الكحول .



5- المصائد Traps

تعتبر المصائد من أسهل وأكفأ الوسائل لجمع العديد من الأنواع الحشرية . والمصيدة في العادة تصمم بحيث تسمح بدخول الحشرة وتمنع خروجها . ويوضع بداخل المصيدة مادة جاذبة للحشرة . فالشكل العام للمصيدة والمادة الجاذبة للحشرة يختلفان بإختلاف نوع الحشرات التي يراد جمعها وأيضاً بإختلاف الغرض الذي من أجله ستجمع الحشرات .

أولاً : المصائد الضوئية Light Traps

إستعملت المصائد الضوئية لجمع الحشرات التي تنشط ليلاً مثل بعض أنواع الفراشات ومنها :

أ- المصائد التي تضاء بفوانيس الكيروسين

هي المصائد التي كانت تستعمل قديماً ، وكان مصدر الضوء فيها هو مصابيح مزودة بالكيروسين مثل الفوانيس وقد عرف منها نوعان :

1- يوضع الفانوس فوق قماش أبيض وعندما تنجذب الحشرات للضوء فإنها تسقط في القماش حول الفانوس ويمكن جمعها بشبكات جمع الحشرات العادية .

2- مصيدة ديميران Demeran : وهي عبارة عن صندوق قاعدته من الخشب ، يغطي سقفه بسلك من النملي ، أما جوانب الصندوق الأربعة فإنها تحاط بقماش أبيض ، يوضع الفانوس في داخل الصندوق ثم يوضع الصندوق فوق صينية بها ماء وعندما تنجذب الحشرات للضوء فإنها تسقط في الماء الموجود في الصينية وعندئذ تجمع وتحفظ .

ب- المصائد الضوئية الكهربائية Electric Light Traps

بدأ إستخدام هذا النوع في عام 1925 فقد إستخدمت لمبات كهربائية ذات ألوان خضراء أو زرقاء إلا أن مثل هذه اللمبات قد إستبدل بلمبات زئبقية تعطي أشعة فوق بنفسجية ULV ذات موجات قصيرة تجذب الحشرات أكثر من اللمبات ذات الموجات الطويلة .

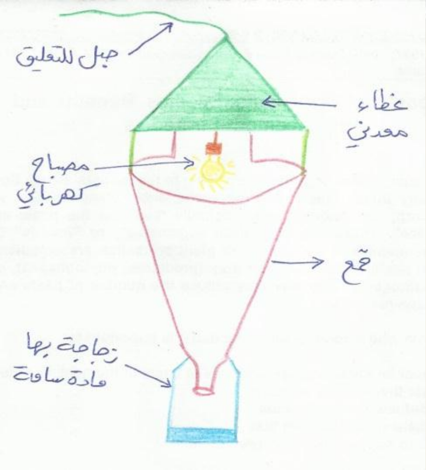
جـ - مصيدة الصندوق الضوئي

تتكون هذه المصيدة من صندوق قاعدته من الخشب مكشوف من أعلى وله ثلاثة جوانب مصنوعة من الخشب والجانب الرابع عبارة عن لوح من الزجاج . يوضع داخل الصندوق مصباح كهربائي وزجاجة

تحتوي على مادة سامة . عند إضاءة اللمبة فإن الحشرات تنجذب إلى الضوء المنبعث خلال الجانب الزجاجي وتسقط داخل الصندوق ويمكن جمعها بسهولة .

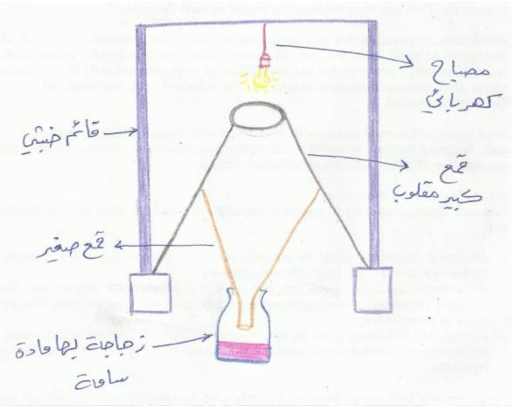
د- مصيدة هايستاند الضوئية

تتركب المصيدة من غطاء معدني في شكل مخروط توجد به ثلاثة أذرع (ريش) معدنية مثبتة أسفل الغطاء ومصباح كهربائي مثبت بين الريش الثلاثة يوضع الغطاء فوق قمع معدني ويوضع في نهاية القمع زجاجة بها مادة سامة . الحشرات التي تنجذب للضوء تصطدم بالريش وتقع في القمع وتستقر في الزجاجة المحتوية على المادة السامة وبذا يمكن جمعها بسهولة مثل هذه المصيدة يمكن أن تعلق على الأشجار بواسطة حبل .

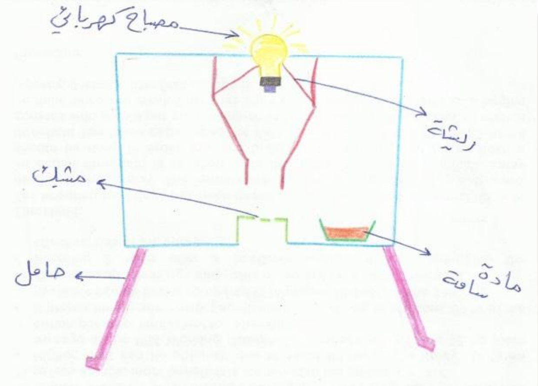


كل المصائد السابق ذكرها كانت كفاءتها في جمع الحشرات منخفضة ولا يمكن الإعتماد عليها في جمع الحشرات للأغراض البحثية أو العلمية وبهذا فقد طورت فكرة المصائد الضوئية وأدخلت بعض التعديلات على بعض المصائد السابقة وتم إختراع نوعين من المصائد :

1- مصيدة Rothamested : صممت لجمع الحشرات الصغيرة بطيئة الطيران مثل حشرات رتبة ثنائية الأجنحة .

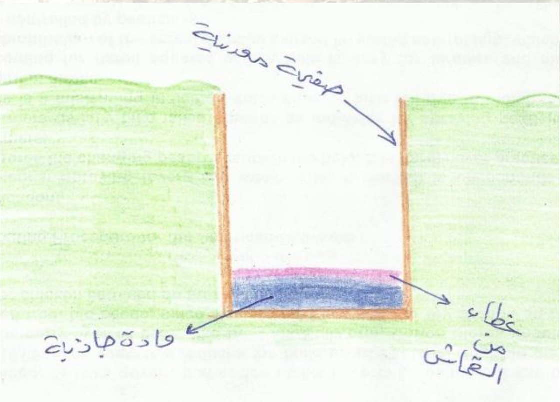


2- مصيدة Robinson : وهي ذات كفاءة عالية في جمع الحشرات ذات الحجم الكبير والتي تمتاز بسرعة الطيران مثل حشرات رتبة حرشفية الأجنحة .



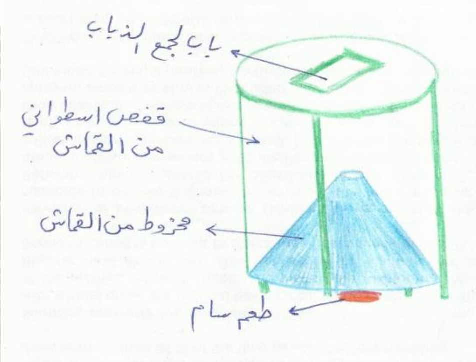
ثانياً : مصيدة جمع الخنافس

تتكون من صفيحة معدنية تدفن في الأرض بحيث تكون فوهتها في مستوى سطح الأرض ويوضع داخل الصفيحة مادة جاذبة للحشرات التي يراد جمعها مثل المولاس والفواكه المتخمرة تغطى بقطعة من الشاش وتستعمل لجمع الحشرات التي لا تقوى على الطيران مثل الخنافس مثلاً أو الحيوانات مثل الزواحف والفئران .



ثالثاً : مصائد الطعوم Bait traps

منها مصيدة الذباب Fly trap التي تتكون من قفص من القماش أسطواني أو مستطيل الشكل قاعدته من مخروط من القماش ، ويوضع الطعم في قاعدة المخروط يوجد في قمة المصيدة باب يمكن إستعماله لجمع الذباب الذي يدخل إلى المصيدة .



العوامل التي تؤثر على كفاءة المصائد الضوئية :

1- العوامل الخاصة بالمصيدة :

أ- المكان الذي توضع فيه المصيدة : توضع المصيدة في مكان مكشوف بعيداً عن العوائق كالمباني والأشجار وعند وضع المصيدة في الحقل يجب أن توضع على إرتفاع مستوى النبات .

ب- إرتفاع المصيدة : بعض أنواع الحشرات تطير على إرتفاع عالي بينما البعض الآخر يطير على إرتفاعات منخفضة لذا فإنه يتعين وضع المصيدة في إرتفاع يتناسب وطيران الحشرات التي يراد جمعها . لقد وجد أن أعلى كفاءة في جمع الحشرات عندما وضعت المصيدة على إرتفاع ثلاثة أقدام ونصف من سطح الأرض .

جـ - المسافة بين المصائد : يراعى أن تكون المسافة بين كل مصيدة وأخرى حوالي كيلو متر واحد وذلك لكي لا يتداخل ضوء كل مصيدة مع الأخرى وبالتالي تقل كفاءتها .

2- العوامل الخاصة بمصدر الضوء :

تزداد كفاءة المصيدة في جمع الحشرات حسب العوامل التالية :

أ- طول موجة الضوء والتي تكون في حدود 3650- 5660 أنجسترom .

ب- إستعمال لمبات تعطي أشعة فوق بنفسجية ولا تستعمل اللمبات العادية .

جـ - أن يستعمل حجم أكبر من اللمبات حيث أن ذلك يعطي مساحة سطح أكبر ولمعانها يكون أكثر مقارنة باللمبات الصغيرة .

د- وضع الضوء بالنسبة للمصيدة فإذا وضع الضوء في مستوى أعلى من المصيدة فإن ذلك سيجذب الحشرات الكبيرة سريعة الطيران كما هو الحال عند إستعمال مصيدة روبنسون أما إذا وضع الضوء في مستوى منخفض في المصيدة فإن ذلك يساعد على جذب وجمع الحشرات الصغيرة بطيئة الطيران كما هو الحال عند إستعمال مصيدة روثاميستد .

3- عوامل متعلقة بالحشرات :

تنجذب بعض أنواع الحشرات للضوء في فترة نشاطها والتي تكون في معظم أنواع الحشرات بعد مغيب الشمس أي في حوالي الساعة السادسة مساءاً حيث توجد علاقة طردية لأن أعداد الحشرات بدأت في الزيادة بتقدم الزمن ثم بدأت تتناقص بعد الساعة العاشرة مساءاً .

المواد الجاذبة التي تستخدم في المصائد :

إستخدمت أنواع مختلفة من المصائد بغرض وضع بعض المواد الجاذبة للحشرات فيها . هذه المواد الجاذبة تفرزها غدد توجد في الحشرة إستخلصت هذه المواد من غدد الحشرات وعندما عرف تركيبها الكيميائي حضرت هذه المواد صناعياً . وهنالك أنواعاً عديدة من المواد الجاذبة التي تستعمل في المصائد نذكر منها :

أ- المواد الجاذبة الجنسية (Sex Attractants (Pheromones : تفرز بواسطة غدد موجودة إما في ذكور أو إناث الحشرات ، أو إفراز هذه المواد بواسطة أحد الجنسين للحشرة لجذب الجنس الآخر للتزاوج من هذه المواد ما هو محضر صناعياً مثل الميدلور Medlure والسيقلور Siglure وتستعملان لجذب بعض أنواع ذباب الفاكهة من الجنس Ceratitis ومادة ميثيل ايوجينيول Methyl Eugenol لجذب ذبابة الفاكهة من الجنس Dacus .

ب- المواد الجاذبة للتغذية Feeding Attracants : تنجذب بعض أنواع الحشرات للروائح التي تنفرد من الغذاء الذي تتغذى عليه هذه الحشرة فنجد مثلاً ذبابة ثمار الفاكهة تنجذب إلى الفواكه المتخمرة وذبابة اللحم تنجذب للرائحة التي تنفرد من اللحم المتعفن وهكذا . فإذا وضعت هذه المواد داخل المصيدة فإنها ستجذب هذه الأنواع الحشرية .

جـ - المواد الجاذبة لوضع البيض Oviposition Attractants : تختلف هذه المواد بإختلاف نوع الحشرة فعلى سبيل المثال فإن الذبابة المنزلية تنجذب إلى المواد التي ينفرد منها النشادر (الأمونيا) .

رابعاً : مصائد الحشرات المائية

1- الشبكة المصنوعة من القماش : والتي تستعمل في العادة لجمع الحشرات الطائرة ولكن يمكن إستعمالها لجمع الحشرات المائية إلا أن كفاءتها في الجمع تكون منخفضة كما أن إستعمالها في الماء يؤدي إلى تلفها .

2- الشبكة المصنوعة من السلك : تشبه شبكة القماش إلا أن القماش أستبدل بسلك نملي مصنوع من النحاس والذي يدوم أطول .

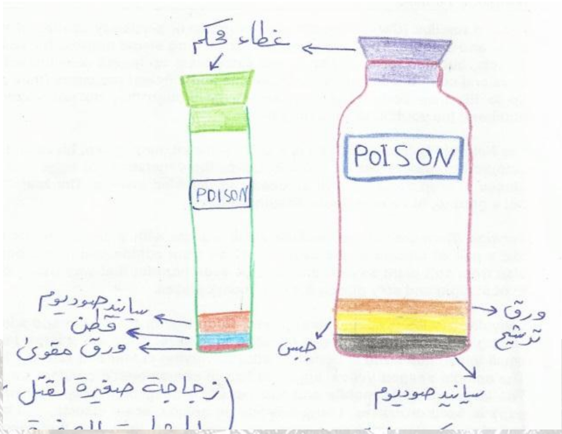
3- عبارة عن أنبوبة قطرها 21 بوصة وطولها متر يغطى إحدى فوهاتها بسلك مصمم على شكل قمع فوهته الضيقة تكون داخل الماسورة يوضع داخل الماسورة برطمان به بطارية ويقفل البرطمان لكي لا تتسرب المياه إلى البطارية داخل البرطمان يوضع ثقل داخل الماسورة لكي تغطس في القاع . تقفل الفوهة الثانية للماسورة بسلك نملي . توضع الماسورة في المياه وتربط إحدى نهايتيها بحبل يستعمل لجرها وإخراجها من الماء . إذا أضيئت البطارية ليلاً فإن الحشرات المائية تنجذب للضوء وتدخل من خلال القمع إلى الماسورة .

قتل الحشرات :

بعد أن تم جمع الحشرات من مختلف الأماكن في البيئة وذلك بالطرق المذكورة أعلاه يتم الإنتقال إلى الخطوة الثانية وهي عملية القتل حيث توجد عدة طرق لقتل الحشرات ليتسنى لنا تصبيرها وحفظها أو تشريحها وفيما يلي بعض طرق القتل وهي :

أ- زجاجة قتل الحشرات : Killing Jar

وهي عبارة عن زجاجة أو برطمان له غطاء محكم توضع بداخله مادة سامة لقتل الحشرات . ويختلف حجم الزجاجة بإختلاف الحشرات التي يراد قتلها . والمواد السامة التي تستعمل في القتل هي خلات الإيثايل Ethyl acetate وسيانيد الكالسيوم أو البوتاسيوم . يجب أن تحفظ مثل هذه الزجاجات بعيداً عن متناول الأطفال وأن يلصق على كل زجاجة ديباجة يكتب عليها سم **POISON** بخط واضح ، كما يراعى أيضاً عدم ترك الزجاجة مفتوحة مما يؤدي إلى تسرب الغاز منها وبالتالي يقلل من كفاءتها بالذات في حالة إستعمال السيانيد .



ب- الماء المغلي Boiling Water :

يوضع كأس زجاجي أو معدني مملوء بماء من الصنبور على صفيحة حرارية إلى حد الغليان ثم تغمر فيه الحشرات ذات الأجسام الصلبة فقط كالخنافس لمدة 3- 5 دقائق لغرض تليين أجسامها وسهولة تصبيرها .

جـ - التجميد Freezing :

توضع الحشرات الحية في علبة مغلقة وتوضع في الثلاجة لمدة 24- 48 ساعة بعد ذلك تستخرج وتصبر وتستخدم هذه الطريقة لحفظ الحشرات بصورة مؤقتة .

د- الكحول :

توضع الحشرات في كحول بتركيز 70% لعدة ساعات ثم تستخرج وتصبر مع ملاحظة إن هذه الطريقة لا تستخدم للحشرات الرهيفة والرقيقة كالفراشات والعث وأيضاً يجب أن لا تزيد مدة وضعها على 24 ساعة وذلك تجنباً لتهرئ أجسامها .

حفظ وعرض الحشرات :

أولاً : تحميل الحشرات

تحمل الحشرات التي جمعت على دبابيس من نوع خاص لا يصدأ أو تصلب بإستعمال صلابة Spreader صنعت خصيصاً لهذا الغرض ، حيث تدبس الحشرة في مكان خاص من جسمها حسب النوع وتفرد أجنحتها وتوضع أرجلها بحيث تكون واقفة بشكل معتدل كالحشرات الحية تماماً . أما الأطوار غير الكاملة للحشرات مثل اليرقات فإنها تحفظ في محاليل مثل الفورمالين أو كحول 70% .

1- التحميل على دبابيس (التدبيس Pinning) :

بعد جمع الحشرة فإنها تقتل وتوضع على الصلابة بحيث تثبت في مجرى الصلابة مع مراعاة فرد أجنحتها وأرجلها وقرني إستشعارها حتى تجف ومن ثم تحمل على دبوس بحيث يغرس الدبوس في معظم الحشرات في مناطق محددة من الجسم حسب الرتب الحشرية وكالآتي :

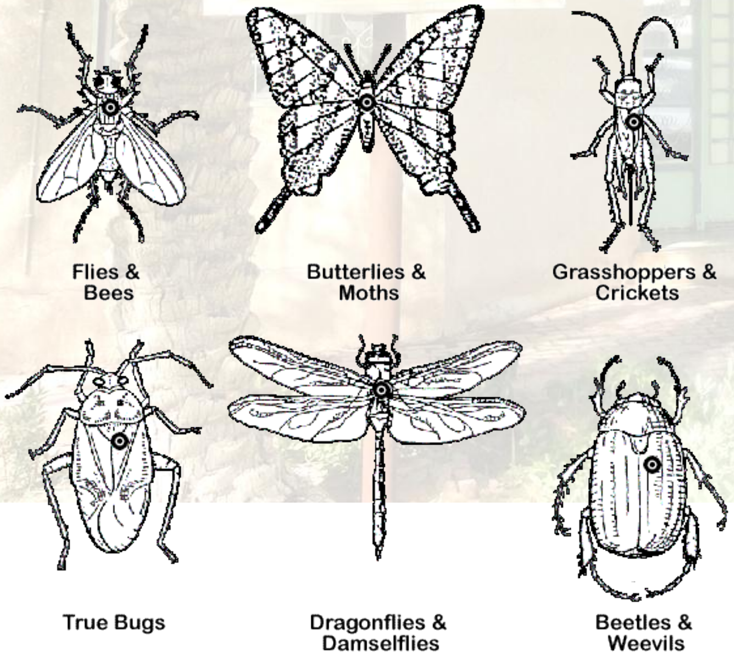
أ- رتبة حرشفية الأجنحة Lepidoptera : يغرز الدبوس في الحلقة الصدرية الثانية لأنها منطقة التوازن في الحشرة كالفراشات والعث .

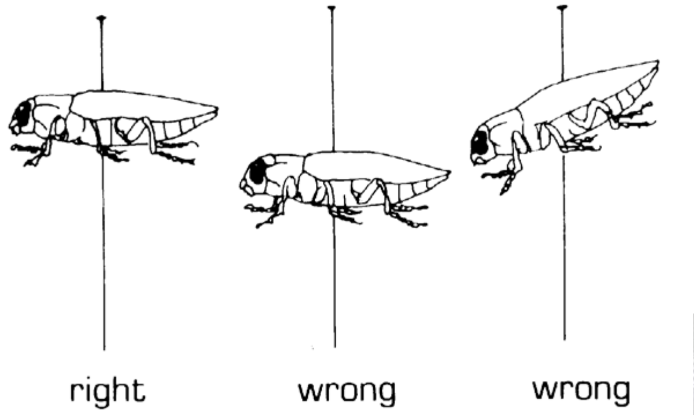
ب- رتبة مستقيمة الأجنحة Orthoptera : يغرز الدبوس في مؤخرة ترجة الحلقة الصدرية الأولى على يمين الخط الوسطي للترجة كالجراد والنطاطات.

جـ - رتبة نصفية الأجنحة Hemiptera : يغرز الدبوس في مؤخرة ترجة الحلقة الصدرية الثانية أي في المنطقة التي تسمى Scutellum على يمين الخط الوسطي للترجة كالبق والسونة .

د- رتبة ثنائية الأجنحة Diptera : كالذباب وتتبع نفس طريقة التدبيس في حرشفية الأجنحة .

هـ - رتبة غمدية الأجنحة Coleoptera : يغرز الدبوس في الغمد الأيمن قرب قاعدة الجناح لأن الحلقة الصدرية الثانية تكون غير ظاهرة كالخنافس .



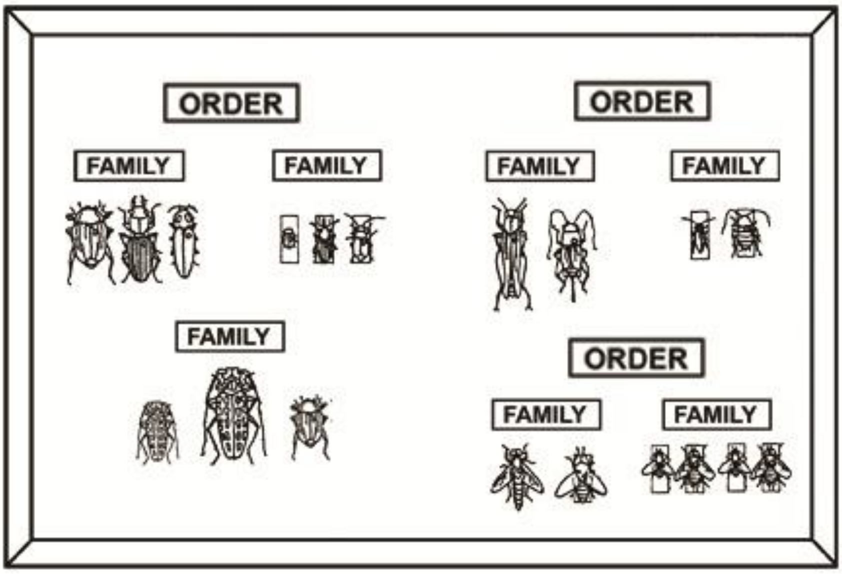


طريقة تدبيس الحشرة

2- تحميل الحشرات الصغيرة :

تحمل الحشرات الصغيرة جداً على ورق مقوى حيث يقطع هذا الورق بأشكال مختلفة (دائرية ومربعة ومثلثة) ثم توضع قطرة من الصمغ أو أي مادة لاصقة ويفضل مادة كندا بلسم وتثبت عليها الحشرة المراد تحميلها وتفرد أجنحتها وأرجلها تحت المجهر ومن ثم يغرز دبوس في أحد جوانب الورقة لتثبيت الورقة في الصندوق وتدبس ورقة مقوى أخرى في الدبوس ويكتب عليها بعض البيانات الهامة مثل (إسم الشخص الذي قام بالجمع وإسم المنطقة التي جمعت منها وإسم العائل النباتي الذي وجدت عليه الحشرة وتأريخ الجمع) ويراعى أن تكتب هذه البيانات بحبر ثابت Indelible Ink ثم توضع الحشرة في صندوق ويكتب إسمها العلمي تحتها. وهناك طريقة لتحميل الحشرات الصغيرة تدعى بطريقة (التحميل المزدوج) ومفادها هو غرز دبوس رفيع في صدر الحشرة ثم تغرز على طرف قطعة من الفلين ويحمل طرفها الآخر على دبوس عادي وتوضع قصاصة أو قصاصتين من الورق أسفل العينة لكتابة المعلومات الخاصة بالحشرة .

تحفظ كل الحشرات المحملة في صناديق خشبية أعدت خصيصاً لهذا الغرض بحيث يراعى وضع نفثالين أو بارادوكس في أنبوبة صغيرة تثبت في أحد جوانب أو أركان الصندوق ، وذلك لطرد الحشرات الأخرى ومنعها من الوصول إلى الحشرات داخل الصندوق وحفظها لفترات طويلة .



ثانياً : حفظ الحشرات في محاليل :

بعض الحشرات الرخوة كالمن وحوريات الحشرات واليرقات لا يمكن تدبيسها وحفظها جافة لأنها تنكمش وتتشوه ولهذا فإنها تحفظ في محاليل لحين الحاجة إليها . ويعتبر الكحول 75% مادة حافظة جيدة ليرقات الحشرات ، مع إضافة قطرات من الجلسرين لمنع تصلب زوائد جسم الحشرة .

1- الكائنات الحية التي تحفظ في المحاليل هي :

الحيوانات اللافقارية الصغيرة وأجزاء بعض الحيوانات وأجنتها وكذلك بعض الطحالب والفطريات حيث يختلف تركيز المحلول من كائن لآخر بعض الكائنات الحية التي يمكن حفظها في المحاليل

2- يمكن حفظ القشريات كجراد البحر والروبيان تبعاً للخطوات التالية :

أ- تسقط حية في كحول 70 % أو فورمالين 8%

ب- تحفظ في 70% كحول

3- يمكن حفظ الرخويات كما يلي :

تحفظ بعد غسلها في كحول 70% أو فورمالين 8%

4- يمكن إستخدام كحول 70% في حفظ كل من العناكب وأم 44 والعقارب والأسماك الصغيرة وبيوضها والبرمائيات ودورة حياتها .

5- يمكن حفظ أجنة الطيور الصغيرة وأجنة الثدييات كما يلي :

بنقلها بالتتابع في تراكيز من الكحول 70% و 80% و 90% على التوالي وذلك لمنع التقلص غير المرغوب فيه .

أ- حفظ الكائنات الحية في الفورمالين :

1- الكائنات الحية التي تحفظ في الفورمالين هي:-

جميع الحيوانات الفقارية واللافقارية الكبيرة وكذلك أجزاءها وبعض الطحالب والفطريات ويختلف التركيز من كائن حي إلى آخر حسب نوع الكائن وحجمه وعادة يتراوح التركيز بين 5- 10%

2- الخطوات التي تتبع قبل حفظ الكائن الحي في الفورمالين :-

أ- تدون اسم الجامع ، مكان الجمع ، تاريخ الجمع ، أي معلومات يحتاجها الحافظ مثل لون

الكائن الحي وقياساته .

ب- تنظيف الكائن الحي

يحفظ الكائن الحي في قارورة فيها فورمالين متعدد الإستخدام أولاً قبل نقله إلى قارورة خاصة به لترسيب بعض الأوساخ والقشور أو أي عالق بالكائن الحي

جـ - حقن الحيوان بالفورمالين المركز في الأحشاء يساعد على عدم تعفن أجزاءه الداخلية

د- يجب أن تكون قارورة حفظ الكائن الحي بالفورمالين محكمة الإغلاق لأن الفورمالين يتبخر في درجة حرارة الغرفة العادية.

المعلومات اللازمة التي توضع على قارورة الحفظ هي:-

(اسم الجامع، مكان الجمع ، التاريخ الميلادي للجمع ، اسم الكائن العلمي وتصنيفه إن أمكن)

ب- الحفظ بواسطة الشرائح المجهرية :

تستخدم هذه الطريقة في حفظ الحشرات الصغيرة جدا كالقمل والبراغيث والمن والثربس . او لحفظ بعض الاجزاء او الزوائد في جسم الحشرة مثل الارجل وقرون الاستشعار والاجنحة واجزاء الفم والثغور التنفسية والقصبات الهوائية وغيرها . يتم تحضير الشرائح المجهرية باتباع الخطوات التالية :

(أ) التفكك :

تغلى العينات (أجزاء الحشرة) في محلول ٥% او ١٥% من هيدروكسيد الصوديوم او هيدروكسيد البوتاسيوم ، وتعتمد مدة الغليان على مدى صلابة هذه الاجزاء اما بالنسبة لتحضير شرائح مجهرية لحشرة كاملة رهيفة مثل السمك الفضي او البعوض ، تنقع الحشرة في محلول هيدروكسيد الصوديوم او البوتاسيوم البارد او الدافئ لمدة ٢٠دقيقة . تنقل العينة من المحلول وتوضع في صحن به ماء للغسل وإزالة الشوائب المتفككة بعناية ، ثم تنقل العينة مرة اخرى إلى ماء يحتوي على قليل من حامض الخليك الثلجي .

(ب) إزالة الماء :

تتم عملية إزالة الماء من العينة بنقلها من الماء الحامض ووضعها في تركيزات تصاعدية من الكحول ، مع مراعاة تسلسل التركيزات والزمن المحدد لكل تركيز كالآتي :

1- كحول 30% لمدة 5- 10 دقائق

2- كحول 50% لمدة 8- 10 دقائق

3- كحول 70% لمدة 10- 15 دقيقة

4- كحول 85% لمدة 15- 20 دقيقة

5- كحول 95% لمدة 15- 20 دقيقة

6- كحول 100% لمدة 20- 30 دقيقة وينصح عند نقل العينة من تركيز كحولي الى اخر بالضغط بحذر على العينة بواسطة ملقط غير حاد ليتخلل الكحول انسجة العينة وفي حالة التحضير المجهري للحشرات الدقيقة او الرهيفة يجب تعريضها لتركيزات الكحول بزمن اقل . إذا أردنا صبغ العينات فإنها تترك في الصبغة بعد تمريرها في كحول 70% ثم تنقل لباقي التركيزات المذكورة .

(ج) الترويق :

يستعمل الزايلول في عملية الشفافية كما يستخدم البنزين وزيت القرنفل لنفس الغرض . تجفف العينات كبيرة الحجم من الكحول المطلق بوضعها على ورقة ترشيح ثم تنقل مباشرة الى الزايلول من 15- 20 دقيقة لتصبح رائقة او شفافة بعض الشي ويجب الا تبقى العينة لمدة طويله في محلول الزايلول قبل إعدادها حتى لا تتكسر أجزاؤها .

(د) إعداد العينة على الشريحة :

بعد عملية الترويق تنظف الشريحة الزجاجية جيدا بالكحول المطلق ويوضع في منتصفها كمية قليله من صمغ كندا بلسم على العينة وتغطى بماء الشريحة الزجاجي بوضع مائل بمساعدة إبرة لتجنب تكوين فقاعات هوائية في العينة ثم توضع الشرائح في فرن لتجف في درجة حرارة تتراوح بين 25- 35 مْ ، بعد ذلك تلصق بطرفي الشريحة بطاقة أو بطاقتين وتكتب البيانات ثم تجفف وتحفظ في علب أو إدراج خاصة بالشرائح .

جـ - حفظ البيض :

١-البيض الخالي من الجنين يتم حفظه كما يلي :

أ- يعمل في أحد طرفي البيضة ثقب مناسب

ب- يفرغ محتوى البيضة بواسطة حقنة كبيرة

ج- يغسل داخل البيضة بالماء

د- تطهر من الداخل بواسطة محلول الفورمالين 3%

2- البيض الذي به جنين يمكن حفظه بالطرق الآتية:

أ- الطريقة الأولى

١- عمل ثقب مناسب في أحد طرفي البيضة

٢- تقطيع الجنين بمقص مناسب

٣- استخرج القطع بواسطة ملقط

٤- غسل البيضة من الداخل بالماء

5- تطهر البيضة من الداخل بمحلول فورمالين3%

ب- الطريقة الثانية :

١- عمل ثقب مناسب في احد طرفي البيضة

٢- وضع ماء فيها وتترك مدة حتى يتحلل الجنين وتتفكك أجزاءه

٣- استخراج محتويات البيضة بواسطة ملقط

٤- غسلها من الداخل بالماء

٥- تطهيرها من الداخل بواسطة محلول الفورمالين 3%

حفظ البيض يهدف إلى:-

١- مقارنة بيض الحيوانات المختلفة ببعضها

٢- في دراسة وعرض دورات الحياة

٣- في دراسة بيئة الحيوانات

د- حفظ العظام :

الطريقة الأولى :

أ- غلي الحيوان غلياً مناسباً بحيث لا يؤثر على صلابة عظامه

ب-تنظيف العظام من العضلات بالملقط حسب الامكان

الطريقة الثانية :

أ- دفن الحيوان أو عظامه مثل الجمجمة في الأرض لمدة كافية

ب- تنظيف العظام أو الجمجمة من محتوياتها بالملقط

جـ - تغلى بالماء لفترة كافية (مناسبة)

الطريقة الثالثة :

توضع العظام والجمجمة في مكان به خنافس خاصة تتغذى على العضلات ، وهذه الطريقة تستخدم في الجامعات والمتاحف .

حفظ العظام يهدف إلى:

أ- دراسة عظام الحيوان ومقارنتها مع بعضها في الحيوان نفسه

ب- مقارنة عظام الحيوانات مع بعضها في علم يسمى التشريح المقارن

ج- تصنيف الحيوانات وخاصة بدراسة عظام جماجمها

د- تحديد نوع الحيوان الحي بدراسة عظامه

ملاحظة : قبل الشروع في تحضير الهيكل العظمي لحيوان ما ينبغي أن تكون هناك صورة توضيحية جيدة لهيكله العظمي للاعتماد عليها أثناء التحضير والتركيب .

هـ - حفظ بعض الحيوانات ذات الأجسام اللينة :

١- حفظ الديدان

تُغسل بمحلول ملحي ١% أو في الفورمالين ٥% ثم تُحفظ في محلول كحولي 70 %

2- حفظ الحيوانات الرخوية

بعد غسلها وتنظيفها تحفظ في كحول ٧٠% أو في فورمالين 8 %

3- حفظ المفصليات

حيث يمكن حفظها آما يلي:-

أ- تصبيرها كالحشرات

ب- بالمحاليل (حيث تحفظ في محلول بعد قتلها مكون من)

٩٠% كحول : جلسرين : ماء مقطر

3 : 1 : 2

٤ - حفظ قنافذ البحر

تقطع الأجزاء الفمية و تُسحب الأمعاء والأعضاء الداخلية المتصلة بها ثم يُجفف الحيوان في الشمس.

٥ - حفظ المرجان

أ - في ٥ % فورمالين

ب - بالتجفيف في الشمس بعد غسله

٦ - حفظ الإسفنج

أ - ينظف ويوضع في كحول ٧٠ % أو فورمالين ٨ % لمدة أسبوعين ثم يوضع في كحول 7%

ب - يزال ما علق به من شوائب ويُجفف بعد ذلك في مكان ظليل وجاف.

٧ - حفظ القواقع

١.توضع في ماء دافئ مضاف إليه كبريتات المغنيسيوم لكي تتمدد

2- .توضع في فورمالين ١٠%

3- .تُحفظ في فورمالين 8 %

و- حفظ الحيوانات بالتجميد :

الحفظ بالتجميد يهدف إلى:

١-التغلب على عدم توفر الوقت الكافي لحفظ الحيوانات بطرق الحفظ الأخرى

٢-التغلب على عدم توفر مواد الحفظ الأخرى

٣-الحفظ المؤقت

الحيوانات التي يمكن حفظها بالتجميد

جميع الحيوانات يمكن حفظها بالتجميد ، وتختلف مدة الحفظ حسب نوع الكائن الحي.

و للإستفادة منها يتم من خلال:

١-إخراجها من مكان التبريد (التجميد) بوقت كاف

٢- تترك لكي ينصهر منها الثلج ثم تُغسل بالماء

٣- يتم التعامل معها باستخدام قفازات

٤- يستفاد منها كما هو في جميع الحيوانات المحفوظة بالطرق المختلفة

العناية بالمحفوظات

١ -محفوظات الفورمالين والمحاليل الأخرى ، يجب أن تكون مقفلة جيداً وفي مكان آمن.

٢ -المحفوظات الجافة المختلفة يوضع معها النفالين وبعيداً عن وصول القطط والفئران إليها .

ثالثاً : نفخ اليرقات

يمكن حفظ الدور اليرقي للحشرات بلونه الطبيعي وذلك بعد التخلص من محتوياته الداخلية وأحشائه عن طريق ضغط جسم اليرقة بواسطة قلم رصاص ثم تدخل الأبرة الموجودة في نهاية أنبوبة النفخ (المنفاخ) في مؤخرة اليرقة ، ويمرر الهواء إلى داخل جسم اليرقة بواسطة المنفاخ . بعد ذلك تربط نهاية اليرقة بخيط رفيع ثم تجفف في فرن هاديء وعندما تجف يمرر سلك مثبت على دبوس إلى داخل اليرقة من الناحية الخلفية وتلصق اليرقة على السلك بمادة لاصقة ، ثم يوضع الدبوس ويثبت في ورق مقوى ويوضع داخل صندوق .

رابعاً : ترتيب المجموعات الحشرية :

أ- الحفظ في صناديق :

نماذج الحشرات التي جمعت ودبست يمكن ترتيبها في صناديق خشبية خاصة حسب رتبها وعائلاتها وأجناسها وأنواعها . فإذا كان الصندوق خاص بالرتبة فإنه يكتب إسم الرتبة في قمة الصندوق ، يليه إسم العائلة وتحت العائلة ثم توضع الحشرة ويكتب تحتها إسم الجنس والنوع . في بعض المجموعات نجد كل أطوار الحشرة كالبيض واليرقات (أو الحوريات) العذارى والكاملات قد حنطت ووضعت في المجموعة . ويزود الصندوق بكرات النفثالين لحمايته من الإصابة بحشرات المتاحف . والفائدة منه هو المحافظة على الحشرات من الهواء (لمنع تكسرها) والمحافظة على النماذج من الحشرات والآفات التي تتغذى عليها وسهولة نقل النماذج ومنع العبث بالحشرات ولمسها وسهولة عرضها .

ب- الراتنج Resin :

تستخدم حالياً طريقة حديثة لحفظ الحشرات وعرضها بأشكال مختلفة وهي طريقة الحفظ بالراتنج حيث توضع الحشرة في قالب من السليكون ويصب عليها الراتنج وتترك لتتصلب . لكن من مساويء هذه الطريقة هي مكلفة إقتصادياً لكنها تحافظ على الحشرة بشكل دائمي من التلف .

جـ - الورنيش :

تحفظ الحشرات في صندوق الحفظ الخاص بها لكن بعد رشها بمادة الورنيش (ملمع الأخشاب) للحفاظ عليها من التفسخ والإصابة بالآفات .

د- حفظ الحشرات في سائل معقم الأيدي :

تملأ علبة زجاجية صغيرة إلى منتصفها بالسائل ثم أدخل الحشرة ببطء وأكمل الحجم ويفضل عدم حفظ الحشرات ذات الأجنحة الكبيرة البارزة كالفراشات وغيرها لأن الكحول يتخلل داخل الأنسجة . أحياناً تتكون فقاعات هوائية في الزجاجة وللتخلص منها يجلب قدر ماء ويوضع على نار هادئة وضع فيه

الزجاجة بدون غطاء لمدة 15 دقيقة لتجنب الإنفجار وأكمل الحجم بإضافة المعقم وضع ملصق على الزجاجة .

الفصل الخامس

عزل وتنقية وحفظ الأحياء المجهرية

الاحياء المجهرية هي كائنات تتواجد بشكل خلايا مفردة أو متجمعة و تشمل: الفطريات fungi والبكتريا bacteria و البدائيات protozoa والفايروسات viruses جميع هذ الكائنات تشترك بكونها صغيرة للغاية لا ترى بالعين المجردة. ما عدا بعض الحالات مثل الطحالب وبعض mushroom التي قد يصل طولها إلى عدة امتار.

الأوساط الزرعية Culture media

وتعني البيئة التي تستعمل لزراعة وإنماء الأحياء المجهرية والتي يجب أن تحتوي على كل المقومات لحياة الأحياء المجهرية ، وتقسم الأحياء المجهرية من حيث محتوياتها إلى :

1- **الأوساط الصناعية Synthetic media :** تستخدم لزراعة أنواع خاصة ومعينة من البكتريا وتتركب من مواد عضوية وغير عضوية معقدة في مكوناتها معروفة بشكل ومضبوطة كماً ونوعاً

2- **الأوساط الطبيعية Natural madia** : تستخدم على مدى واسع من البكتريا والأحياء الأخرى ويدخل في تركيبها البكتونات ومستخلصات اللحم والخميرة Meat extract yeast إذ تكون هذه الأوساط غنية بالمقومات البيئية وتحضر بشكل جاف من حيث محتوياتها وتقسم من ناحية وظائفها وتطبيقاتها العلمية (تقسم نسبة إلى طبيعة الأحياء المجهرية والغرض من إستعمالها) إلى :

أ- **أوساط العزل Isolation media** : وهي أوساط تحتوي على جميع المقومات الأساسية للنمو

ب- **الأوساط المدعومة أو الغنية Enriched media** : وهذه أوساط تحضر بإضافة مواد غذائية غنية كالدم أو الأمصال الأخرى أو مستخلص أنسجة نباتية أو حيوانية إلى الوسط الزرعي البسيط بحيث إن الوسط الناتج يدعم نمو أفضل للبكتريا .

ت- **الأوساط الإنتقائية (الإختيارية) Selective media** : تحضر هذه الأوساط بإضافة مواد كيميائية معينة مثل Crystal violet أو الصبغة البنفسجية أو Rose Bengal لمنع نمو مجاميع معينة من البكتريا من غير أن تثبط الأنواع الأخرى من البكتريا .

ث- **الأوساط التفريقية Defferential media** : هذه الأوساط تحضر بإضافة مواد كيمياوية للوسط الزرعي لإنتاج تغيرات معينة في النمو يمكن من خلالها التمييز بين المجاميع البكتيرية مثل وسط الدم الذي يستخدم للتفرقة بين البكتريا المحللة للدم عن البكتريا التي لا تحلله

ج- **الأوساط الإختبارية (التحليلية) Assay media** : تكون هذه الأوساط لإختبار الفيتامين والـ Amino acid والمضادات وهي أوساط معرفة كيميائياً وصناعياً

ح- **أوساط لتعداد البكتريا Enuromation media** : وتستخدم لتعداد البكتريا في الحليب والماء

خ- **أوساط لتشخيص البكتريا Characterzation media** : وهي أوساط تستخدم لتحديد نوع النمو الحاصل بالإضافة إلى تحديد قابلية الأحياء على إحداث بعض التغيرات الكيميائية

د- **أوساط للحفاظ على البكتريا maintenance media** : وهي أوساط بسيطة تستخدم من أجل الحفاظ على حيوية البكتريا وصفاتها الفيزيولوجية لفترات طويلة ولا تشجع مثل هذه الأوساط على النمو المثالي الجيد

ومن أهم الأوساط التي يمكن تحضيره هو وسط (Potato Dextrose Agar (PDA الخاص بتنمية الفطريات

Agar : هو منتج بحري مجفف يؤخذ من الأشنات البحرية ، ويدخل في تركيب العديد من الأوساط منها Nutrient Agar , Agar Agar لغرض تصلبها .

ولتحضير الوسط الزرعي (PDA) نستخدم الطريقة التالية :

1- 200 غم من قطع البطاطا الصغيرة توضع في دورق زجاجي

2- يضاف 200 مل من الماء المقطر إلى الدورق .

3- تسخن على مصباح لهب إلى حد الغليان ولمدة 2/1 ساعة

4- تبرد وتوضع على قطعة قماش وتعصر ثم يؤخذ عصير البطاطا ويوضع في دورق ثانٍ

5- يضاف 17 غم من السكر الإعتيادي أو سكر الدكستروز

6- يضاف الآكار بحدود 17 غم أيضاً

7- ينقل إلى فلاسك ويغلق بقطن ثم يحفظ في الثلاجة إلى حين إستخدامه

أما إذا كان الوسط جاهز فيذاب منه 39 غم في لتر من الماء المقطر ويعقم بالأوتوكليف لمدة 15 دقيقة وبدرجة 121 مْ وبضغط 15 باوند / إنج 2 .

والوسط الزرعي السائل الخاص بالفطريات فهو PDB يتكون من نفس الكميات السابقة للوسط الصلب لكن بدون إضافة Agar ويعقم بنفس ظروف التعقيم للوسط الصلب لكن لمرتين متتاليتين .

بالنسبة لوسط Nutrient Agar الخاص بتنمية البكتريا فيتكون من :

ببتون 5 غم / لتر

كلوريد الصوديوم 5 غم / لتر

مستخلص لحم البقر Beef Extract 1.5 غم / لتر

مستخلص الخميرة 1.5 غم / لتر

آكار 15 غم / لتر

أما إذا كان الوسط جاهز فيذاب 28 غم من الوسط في لتر من الماء المقطر ويعقم بجهاز الأوتوكليف بنفس ظروف التعقيم للوسط السابق (PDA)

كما تنمى البكتريا على وسط سائل وهو .N.B يتكون من نفس مواد الوسط الصلب لكن بدون إضافة Agar ويعقم بنفس ظروف تعقيم وسط .N.A لكن لمرتين متتاليتين .

ملاحظة : 1- قبل وضع الأوساط في جهاز التعقيم توضع على جهاز المزج المغناطيسي الحراري لإذابتها وعدم تكتلها

2- ممكن تنمية الفطريات على وسط .N.A لكن بعد إضافة مضاد حيوي لقتل البكتريا

التعقيم Sterilization :

إن معظم الدراسات المايكروبيولوجية تعتمد على المزارع النقية أي التي بها نوع واحد من الكائنات الدقيقة وهذه تتطلب لنموها بيئات غذائية معقمة والتعقيم عبارة عن العمليات التي من شأنها قتل أو إزالة كل الكائنات الحية الدقيقة من الوسط المراد تعقيمه سواء كان الوسط بيئة غذائية أو محاليل مختلفة أو أماكن أو مسطحات محدودة في أبعادها وأحجامها وعادة يتم التعقيم بإتباع طرق تعتمد على أسس فيزيائية أو كيميائية أو ميكانيكية .

أ- التعقيم بالحرارة الجافة Dry Heat Sterilization :

1- أفران الهواء الساخن Hot Air Ovens :

يستعمل في هذا الغرض أفران تعرف بأفران الهواء الساخن يسخن فيها الهواء كهربائياً ، أو بإستعمال الغاز فترتفع درجة حرارة الهواء المحيط بالأدوات المراد تعقيمها حتى تصل درجة تتراوح بين 160-180 مْ ويترك هكذا لمدة تتراوح بين 2-3 ساعات يتم بعدها التعقيم .

ويتم قتل الكائنات الحية الدقيقة التي تكون ملوثة للأدوات المعقمة بالحرارة الجافة نتيجة التجفيف السريع الذي يطرأ على خلاياها وكذلك نتيجة لإكسدة المحتويات الخلوية الجافة . وتتبع هذه الطريقة في تعقيم الأدوات الزجاجية مثل أنابيب الإختبار والماصات والدوارق الفارغة وأطباق البتري وغيرها من الأدوات الزجاجية الأخرى التي يرغب في تعقيمها .

وعندما نتبع هذه الطريقة لتعقيم الأدوات الزجاجية يراعى أن توضع الماصات وأطباق بتري في أوعية معدنية أو نحاسية خاصة ذات غطاء يحكم غلقه قبل تعقيمها ، وتتلخص خطوات التعقيم بهذه الطريقة بأن توضع الأدوات الزجاجية أو العلب المعدنية المحتوية عليها بالفرن وهو على درجة حرارة الغرفة ثم يحكم قفله ، وترفع درجة حرارة الفرن إلى الدرجة المطلوبة ، وهنا نبدأ في حساب فترة التعقيم . وبإنتهاء الفترة المطلوبة يوقف التسخين ويترك الفرن لبرد تدريجياً حتى درجة حرارة الغرفة تجنباً لكسر الأدوات الزجاجية أو تلوثها بالهواء الجوي .

2- اللهب المباشر Incineration Heat :

عادة يستخدم اللهب المباشر من مصباح بنزن في تعقيم إبر التلقيح المستقيمة أو ذات العقدة ، وبذلك

بتسخينها حتى درجة الإحمرار. وعادة تصنع مثل هذه الإبر من أسلاك رفيعة من البلاتين أو خليط من النيكل والكروم . وهذه المعادن عادة تسخن بسرعة وتفقد حرارتها بسرعة فعندما تسخن لدرجة الإحمرار يهلك كل ما يلوثها من الكائنات الحية الدقيقة ، وبعد أن تترك لتبرد لفترة ثوان قليلة تستعمل في تلقيح البيئات المعقمة للحصول على المزارع النقية .

3- التلهيب الكحولي Alcohol Flaming :

يمكن تعقيم بعض الأدوات كالمشرط أو الملقط أو المقص وذلك بغمر الجسم المراد تعقيمه في كحول إيثانول ثم يعرض للهب المباشر فيشتعل ما يعلق به من الكحول ويعمل على قتل الكائنات الحية الدقيقة التي تكون عالقة به . وبتكرار هذه العملية أكثر من مرة تزداد كفاءة هذه الطريقة في التعقيم . وتتميز هذه الطريقة بسرعتها إلا أنه يجب استعمال الأدوات التي تعقم عن هذا الطريق مباشرة بعد تعقيمها .

ب- التعقيم بالحرارة الرطبة Moist Heat :

يقصد بالتقييم عن طريق الحرارة الرطبة استغلال بخار الماء في إجراء التعقيم بدلاً من الهواء الساخن .

وقد يستغل بخار الماء المباشر أو أن يضغط إلى درجة تصل إلى ضعف الضغط الجوي العادي حيث تزداد درجة حرارة البخار تحت الضغط المرتفع . وعادة تكون الحرارة الرطبة أكثر كفاءة في قتل الخلايا الحية من الحرارة الجافة وذلك لأنها أكثر قدرة من التغلغل داخل الخلايا ، كما أنها ذات قدرة أسرع على تجميع وتخثير البروتين الخلوي (تستخدم هذه الطريقة في تعقيم البيئات الغذائية للبكتيريا + السوائل) .

1- معقم أرنولد Arnold sterilizer :

عبارة عن وعاء معدني (شكل فرن الهواء الساخن) مبطن بطبقة عازلة للحرارة ذو أرفف مثقوبة لتسهل تسرب البخار إلى كل أجزاء الجهاز وله فتحة في قمته يوضع بها ترمومتر لقياس درجة الحرارة بداخل الجهاز أثناء التعقيم . ويتم التعقيم في هذا النوع من الأجهزة على ثلاث فترات في ثلاثة أيام متتالية ، ويعرف التعقيم في هذه الحالة بالتعقيم المتقطع . والفكرة الأساسية في التعقيم المتقطع هو أن الخلايا البكتيرية الخضرية وكذلك بعض الجراثيم الداخلية النابتة تهلك عندما تعرض لبخار الماء (١٠٠٫٥ م) لمدة ثلاثون دقيقة . أما الجراثيم الداخلية الناضجة وغير النابتة فإنها تقاوم هذه الحرارة حتى ولو تعرضت إليها لمدة طويلة تصل إلى عدة ساعات ، كذلك فإن ترك البيئة بالحضان أو بالغرفة لمدة ٢٤ ساعة يسمح لهذه الجراثيم المقاومة للحرارة بأن تنبت وتتحول إلى خلايا خضرية تهلك خلال فترة التعقيم في اليوم التالي .

2- الأوتوكليف Autoclave :

يستغل بخار الملء أيضاً في جهاز الأوتوكليف إلا أن زيادة الضغط بداخل الجهاز تزيد من درجة حرارة التعقيم . فمن المعروف أن الماء يغلي على درجة حرارة ١٠٠ ٥ م تحت الضغط الجوي العادي أما إذا زاد الضغط فوق الماء عن الضغط الجوي فإنه يغلي على درجات أكثر إرتفاعاً . ولما كانت فاعلية الأوتوكليف في التعقيم ترجع إلى الحرارة الرطبة للبخار تحت الضغط وليس إلى الضغط المرتفع بمفرده . لذا فإننا نلمس أهمية ارتفاع الحرارة بداخل هذا الجهاز وأن أي عامل يقلل من الحرارة يعتبر مقالاً لكفاءة التعقيم .

كذلك يجب أن نراعي أهمية وصول البخار إلى المادة المراد تعقيمها فإذا لم يصل البخار إلى المادة فإن عملية التعقيم لا تخرج عن كونها عملية تعقيم حراري (١٢١ مْ) لمدة عشرون دقيقة) الأمر الذي لا يكفي للتعقيم حتى بالحرارة الجافة كما سبق أن بينا ، ويحدث ذلك عادة إذا قفلت الأوعية بسدادات شديدة الإحكام أو قلت مسامية المواد المراد تعقيمها كالكميات الكبيرة من التربة فإن ذلك يعوق وصول البخار إلى داخلها ويشترط عدم إحكام غلق السدادات وأن تغطى الأوعية بسدادات مسامية من القطن أثناء تعقيمها .

ويستعمل الأوتوكليف عادة في تعقيم كثير من البيئات الغذائية السائلة أو المضاف إليها الآجار ومحاليل السكريات الحادية ومحاليل الأملاح المختلفة ، وكذلك يستعمل الأوتوكليف في قتل المزارع القديمة قبل التخلص منها ، وكذلك في تعقيم الملابس والقفازات وأدوات الجراحة .

وعند التعقيم باستعمال الأوتوكلاف يراعى الآتي:

1- أن تكون كمية الماء الموجودة بالجهاز كافية .

2- التأكد من خروج جميع الهواء الموجود بداخل الجهاز قبل قفل الصنبور

3- الوصول إلى الضغط المطلوب والمدة المطلوبة .

4- عدم فتح الصنبور أو الغطاء إلا بعد أن ينخفض ضغط الجهاز إلى الضغط الجوي العادي .

الطرق الميكانيكية المتبعة في التعقيم :

تعتمد هذه الطريقة على إزالة خلايا الكائنات الحية الدقيقة من الوسط الكامنة فيه بطريقة ميكانيكية كالترشيح حيث تحجز الثقوب الدقيقة للمرشحات المستعملة خلايا الكائنات الحية ذات الأقطار التي تزيد عن أقطار ثقوبها .

الترشيح Filtration :

يستعمل لذلك مرشحات بكتيرية يتراوح قطر ثقوبها بين أقل من ميكرون واحد إلى عدة ميكرونات . ويراعى أن التعقيم بالترشيح لا يتوقف فقط على قطر الثقوب ، بل يتوقف أيضاً على الشحن الكهربائية للمرشح وكذلك الشحنة الكهربائية للكائنات الحية الدقيقة المحتوى عليها السائل ، وكذلك على طبيعة ذلك السائل المراد ترشيحه .وهناك العديد من المرشحات تختلف في نوع المادة التي يصنع منها وهي كما يلي :

1- مرشح شمبرلاند Chamberland filter: وهو مصنوع من نوع معين من الخزف أو الصيني .

2- مرشح بيركفيلد Berkefeld filter : وهو مصنوع من الطين الدياتومي.

3- مرشح عجينة باريس Plaster of paris filter : وهو مصنوع من عجينة باريس وهو من الجبس يتكون من كبريتات كالسيوم مع كربونات كالسيوم وأكسيد ماغنيسيوم .

4- مرشح زايتس Seitz filter : عبارة عن أقراص مختلفة الحجم من مادة الأسبستس .

5- مرشح الزجاج المسامي sintered glass filter : والراشح مصنوع من الزجاج المسامي

6- المرشحات الغشائية أو الجزيئية Membrane filter or molecular filter : ومن أمثلتها ما يعرف Millipore filter والذي يتكون من أغشية رقيقة مصنوعة من استرات السليلوز .

الطرق الكيميائية المتبعة في التعقيم :

يمكن استعمال بعض المواد الكيماوية في أغراض التعقيم وهي في صورة محاليل للتعقيم السطحي للمواد التي لا يمكن تعقيمها بالطرق الحرارية .

كحول الإيثيل Ethyl alcohol :

يستعمل عادة كحول الأيثيل بتركيز يتراوح بين ٥٠-٧٠ % في تطهير الأيدي أو المناطق المختلفة في جسم الإنسان والسبب الأساسي للتأثير السام للكحول هو أنه يعمل على تجفيف الخلايا Dehydration

حيث يسحب الماء منها علاوة على قدرته على تجميع التخثرCoagulation البروتين الخلوي عندما ينفذ إلى داخل الخلايا وكلا التأثيرين يؤديان إلى موت الخلية .

الفينول أو حامض الكربونيك Phenol or Carbolic Acid

يستعمل محلول هذه المادة بتركيزات تتراوح بين 2- 5% للتعقيم السطحي لأرضيات الغرف والعيادات والمختبرات وكذلك في تعقيم أسطح المناضد التي تجرى عليها عمليات العزل والتنمية لمزارع الكائنات الدقيقة وبعض الأدوات والأجهزة .

كلوريد الزئبقيك Mercuric Chloride (HgCl2)

يستعمل محلول كلوريد الزئبقيك والذي يطلق عليه أيضاً السليماني بتركيز 0.1% في أغراض التعقيم السطحي لكثير من الأشياء مثل تعقيم أسطح المناضد وغيرها كما يستعمل هذا المحلول في التعقيم السطحي للأجزاء النباتية المصابة بأمراض نباتية توطئة لعزل الطفيل المسبب من أنسجة النبات الداخلية في حالة نقية .

أوكسيد الإيثيلين Ethylene Oxide

بعض المواد التي تستعمل في تحضير بيئات الزرع تكون حساسة للتعقيم بالطرق الحرارية فمثل هذه المواد يمكن أن تعقم بطريقة كيميائية والمادة التي تستعمل في التعقيم الكيميائي يجب أن تكون متطايرة وكذلك سامة للكائنات الحية الدقيقة وبذلك يمكن إزالتها من المادة المراد تعقيمها بعد المعاملة وأهم مادة إستعملت هي أوكسيد الإيثيلين وهي مادة سائلة تغلى على درجة 10.7 مْ يمكن أن تضاف إلى المحاليل في صورة سائلة (التركيز النهائي يصل إلى 0.5- 1 %) أو تستعمل في صورة غازية على حرارة أعلى من درجة الغليان وهي غير ثابتة كيميائياً فتتحلل في المحاليل المائية إلى جليكول الإيثيلين وهو غير متطاير وقد يكون له تأثيرات غير مرغوبة ويلاحظ أن أوكسيد الإيثيلين قابل للإنفجار وسام للإنسان ولذلك يجب أن تتبع إحتياطات خاصة في إستعماله ولهذه الأسباب لا يستعمل كوسيلة روتينية في المختبرات ولكن يستعمل في الصناعة في تعقيم أطباق بتري المصنوعة من البلاستيك أو أي مواد أخرى من البلاستيك كالمحاقن التي قد تنصهر بدرجات حرارة أعلى من 100 مْ .

أولاً : الفطريات The Fungi

الفطريات هي عبارة عن كائنات حية حقيقية النواة، غير متحركة، ولا تحتوي على صبغة الكلوروفيل الخضراء، مما يعني أنها كائنات متطفلة غير ذاتية التغذية، فهي تعيش متطفلة على بقايا الكائنات الحية، مثل: الحيوانات والنباتات، ولا بد من الإشارة إلى أنها كائنات تنتشر على نطاقٍ واسع، وتعيش في الظروف البيئية الرطبة. تُلحق الفطريات المتطفلة بالنباتات أضراراً عظيمة بها تؤدي إلى ذبولها، أو تلفها، أو موتها في بعض الأحيان، وذلك عن طريق إفراز هيدرولازات مذيبة لخلايا الأنسجة النباتية التي تتغذى عليها، وتتعدد أنواعها وتختلف تبعاً لاختلاف نوع النبتة، والتربة، والبيئة التي تنمو فيها

عزل وتنقية الفطريات :

تعتبر عملية عزل الفطريات ضرورية جداً لها ويأتي ذلك حفاظاً على نمو الفطريات ضمن بيئات نقية والاحتفاظ بها ضمن هذه البيئات وإجراء الدراسات عليها، كقياسات النمو واختبارات التجرثم والإنبات، بالإضافة إلى الكشف عن تاريخ حياة هذه الفطريات وطرق التطفل فيها. تتفاوت طرق عزل الفطريات من بيئاتها والحفاظ عليها في حالة النقاء وفقاً لنوع الفطر واحتياجاته البيئية للعيش فيه، كما تعتمد عملية العزل أيضاً على طريقة نمو الفطر، فمثلاً المتطفلة على النباتات الخارجية يسهل عزلها أكثر من تلك التي تنمو ضمن أنسجة النباتات، كما تختلف طرق العزل وفقاً لطور النمو سواء كان ميسيليوم، أو تراكيب ثمرية، واحتمالية حدوث التلوث بين الفطريات والكائنات الأخرى من أكثر الصعوبات التي تواجه الباحث عند الشروع بعملية العزل لذلك لا بد من تعقيم الغرفة والأدوات.

1- العزل من البذور Isolation from seeds

الغرض من العزل :

لمعرفة الفطريات الكلية المتواجدة على البذور أو الفطريات المرضية الخارجية والداخلية .

طرق العزل :

1- بإستخدام طريقة التخافيف (الفطريات على سطح البذور)

2- زراعة البذور مباشرة لمعرفة الأعداد الكلية للفطريات على البذور (سطح وداخل البذور)

3- تعقيم البذور بالفاست (هايبوكلورات الصوديوم NaOH) بتركيز 10% لمدة دقيقتين وذلك لمعرفة الفطريات الداخلية الموجودة في البذور ثم غسلها بالماء المعقم لكي لا ينفذ الفاست وغالباً ما تكون هذه الفطريات ممرضة (داخل البذور)

4- البذور الكبيرة كالباقلاء ممكن أن تكسر إلى أجزاء وتزرع على الأوساط الغذائية .

2- العزل من الأجزاء النباتية Isolation The Fungi From Plant Parts

تعزل الفطريات من الأجزاء النباتية لغرض معرفة الفطريات المتواجدة عليها سواء كانت رمية أو متطفلة

العزل من الأجزاء النباتية الكبيرة

1- الأفرع والجذور الكبيرة .

أ- الطريقة المباشرة : حيث يؤخذ الجزء النباتي وبواسطة مشرط حاد يقشط السطح الخارجي للنموذج ومن ثم يؤخذ من الداخل ويزرع على الوسط الغذائي بدون تعقيم .

ب- تعقيم الجزء النباتي عن طريق غمسه بالكحول وحرقه ثم أخذ جزء من النسيج النباتي أسفل الحرق ويزرع على الوسط الغذائي .

جـ - يؤخذ جزء من النسيج المراد زرعه على الوسط الغذائي إذ يعقم بالفاست ثم يغسل بالماء المعقم عدة مرات ثم ينشف على ورق ترشيح معقم ثم يزرع على الوسط الغذائي .

2- البادرات : يعزل من البادرات لمعرفة الفطريات التي أدت إلى موتها وتتم بالطرق التالية :

أ- تغسل تحت ماء جارٍ لمدة 6 ساعات ثم تغسل بماء معقم عدة مرات ثم تزرع أما على الوسط الغذائي أو على طبق يحوي طبقة مائية معقمة رقيقة وتعرف هذه الطريقة بالمزرعة المائية Water Culture وهي مهمة لعزل فطريات الـ Pythiaceae كالفطر *Pythium* أو *Phytophthora* وبعد 6-7 أيام أضعها في الوسط .

ب- تعقم البادرات بالفاست ثم تغسل بماء مقطر معقم عدة مرات ثم تزرع على الوسط الغذائي وهذه الطريقة تفيد في عزل الفطريات الممرضة الأخرى كالفطر *Fusarium* أو *Rhizoctonia solani* .

3- العزل من الثمار Isolation from the fruit

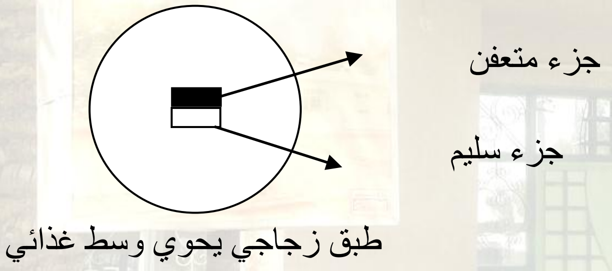
يتم العزل من الثمار لمعرفة الفطريات التي أدت إلى تعفنها ويتم العزل بالطرق التالية :

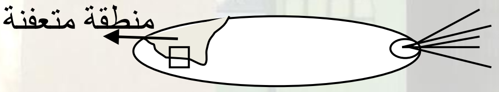
أ- الثمار المتعفنة كلياً :

والتي يلاحظ عليها النمو الفطري ، يؤخذ بواسطة Needle جزء من الغزل الفطري واضح النمو وغير الملوث ويوضع على وسط غذائي مضاف إليه قليل من حامض اللاكتيك أو Chloromphinicol (متخصص على البكتريا + و- صبغة كرام) لأن تعفن الثمار غالباً ما يكون ملوث بالبكتريا .

ب- الثمرة غير متعفنة كلياً :

يلاحظ على مثل هذه الثمار مناطق رخوة تبدو وكأنها مسلوقة إذ تؤخذ أجزاء من تلك المناطق بحيث تضم القطع المراد زراعتها جزء متعفن والآخر سليم وتزرع على وسط غذائي حاوي على مضاد حيوي أو حامض اللاكتيك إذا كان العزل عام لكل الفطريات أما إذا كان هناك شك إن الفطر المسؤول عن التعفن من الـ Pythiaceae فلا يفضل إضافة الحامض أو المضاد لأن هذه العائلة لا تنمو في الوسط الحامضي وكما موضح بالشكل الآتي :





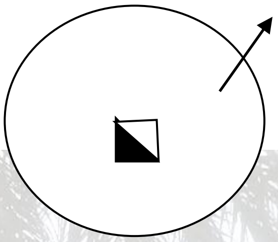
4- العزل من الأوراق : إن الهدف من العزل من الأوراق هو لمعرفة الفطريات المتواجدة عليها وتتم بالطرق التالية :

أ- طريقة التخافيف : إذ يؤخذ 1 غم من الأوراق ويغسل في 9 مل أو في 99 مل فيصبح التخفيف 10/1 أو 100/1 على التوالي ، يؤخذ 1مل ويوضع طبق معقم ويصب عليه 20 مل من الوسط الغذائي قبل التصلب ويحرك حركة رحوية لمدة دقيقة ثم يوضع في الحاضنة وبعد 3 أيام تلاحظ المستعمرات وتحسب أعدادها .

ب- العزل من مواقع محددة كما في التبقعات على الأوساط الغذائية إن هذه الطريقة مهمة لمعرفة الفطريات التي أدت إلى التبقع حيث أن البقع الناتجة عن الإصابات الفطرية أو البكتيرية غالباً ما تكون

محاطة بهالة صفراء لذلك عند العزل يجب أن تكون القطع المزروعة على الوسط الغذائي تحوي جزء من البقعة وجزء من الهالة وكما موضح في الشكل التالي :

وسط غذائي



3- العزل على ورق ترشيح معقم :

يؤخذ جزء من البقعة الموجودة على الورقة وتزرع على ورقة ترشيح مرطبة بالماء المعقم في طبق معقم ويفضل أن تعقم العينة المزروعة على ورق الترشيح بالفاست .

4- العزل من الهواء

إن الغرض من العزل بهذه الطريقة هو :

أ- معرفة مقدار التلوث البيئي (الهواء) بالفطريات خصوصاً بالقرب من محلات رمي القمامة .

ب- تقدير كثافة السبورات للفطريات المسببة لأمراض النبات وبناءاً على تلك الكثافات يمكن التنبؤ بظهور الأمراض .

جـ - لدراسة التواجد الفطري خلال الفصول أو حسب المواقع ..

وتتم هذه الطريقة بالوسائل التالية :

أ- الأوساط الغذائية : حيث ممكن أن تفتح الأطباق الحاوية على الأوساط لمدد معينة (دقيقة واحدة) ومن ثم تحضن في الحاضنة على درجة حرارة 25 مْ .

ب- الأشرطة اللاصقة : وتتم أما باليد أو من خلال الطائرات .

جـ - الشفط الهوائي .

5- العزل من التربة :

إن الغرض من هذه الطريقة هو :

أ- معرفة كثافة الفطريات المرضية في التربة وأنواعها .

ب- تلوث التربة بالفطريات المرضية وغير المرضية .

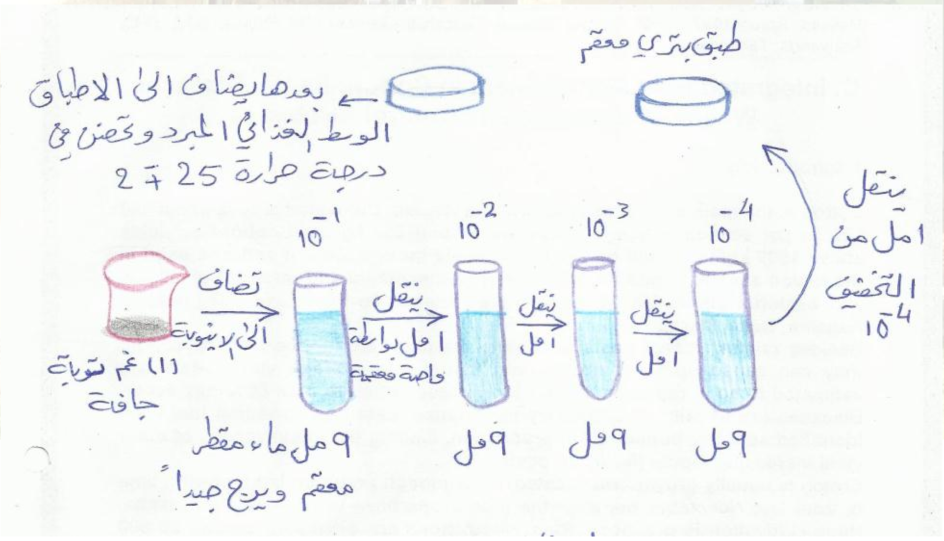
جـ - معرفة الفطريات المحللة للأنسجة النباتية والحيوانية في التربة .

وتتم هذه الطريقة بالوسائل التالية :

أ- إستعمال التربة مباشرة حيث يمكن أن تنثر بعض أجزاء التربة على الوسط الغذائي وتوضع في الحاضنة لمدة 3 أيام على درجة حرارة 25 مْ ثم تفحص وتشخص الفطريات .

ب- بإستخدام طريقة التخافيف ، إذ تخفف التربة بالماء المقطر المعقم إذ يمكن وضع 1 غم من التربة في 9 مل من الماء فيكون التخفيف 10/1ثم يؤخذ 1 مل من هذا التخفيف ويوضع في 9 مل ماء معقم ليصبح التخفيف 100/1 وهكذا حتى نصل إلى تخفيف 100000/1 والأفضل أن نأخذ 1000/1 أو 10000/1 . يؤخذ 1 مل من هذين التخفيفين كل على إنفراد ويوضع في طبق معقم ويصب عليه 20 مل من الوسط الغذائي PDA ويحرك الطبق حركة رحوية لمدة 2 دقيقة ثم يوضع في الحاضنة بعد تصلب الوسط بصورة مقلوبة على درجة حرارة 25 مْ وبعد ثلاثة أيام تحسب المستعمرات المتكونة ومن خلالها يمكن معرفة أعداد الجراثيم في 1 غم من التربة حسب المعادلة التالية :

عدد الجراثيم في 1 غم تربة = عدد المستعمرات في مقلوب التخفيف



جـ - إستخدام المصائد الحية ، تؤخذ بذور نباتات حساسة كالرشاد والسبانغ والطماطم والسلق وغيرها وتزرع في التربة المراد معرفة الفطريات المرضية فيها . إذ تسقى لمرة واحدة وتغلف بالنايلون المثقب ثم

تترك في جو درجة حرارته بحدود 25 مْ ± 3 وبعد 7-10 أيام تحسب أعداد البادرات الميتة والنباتات السليمة ، ومنها يمكن إستخراج البذور المتعفنة ضمن معادلات وحسابات بسيطة .

تزرع البادرات الميتة أما بطريقة المزرعة المائية أو على الأوساط الغذائية لمعرفة الفطريات المرضية وتشخيصها .

د- إستخدام ثمار الخيار والجزر والفلفل ، حيث يمكن عمل شقوق في هذه الثمار ووضع تربة فيها وتوضع في الحاضنة وبعد 3 أيام يمكن ملاحظة الفطريات النامية على تلك الثمار وهذه الطريقة مهمة لعزل فطريات الـ Phytophthora والـ *Pythium* .

هـ - غسل التربة وإستخراج الشعيرات الجذرية والأجزاء النباتية وزرعها على الأوساط الغذائية وهذه الطريقة مهمة لعزل الفطريات *Rhizoctonia* ، *Sclerotium* ، *Fusarium* و *Macrophomina* وغيرها .

و- طمر الأجزاء النباتية في التربة بعد ترطيبها كقرون البزاليا ، شرائح البطاطا وغيرها وهي تفيد في عزل فطريات *Pythium* والـ *Rhizoctonia* .

ز- طمر قوالب من الوسط الغذائي PDA المغلف بالنايلون المثقب إذ تفيد هذه الطريقة لعزل جميع الفطريات .

ملاحظة : العزل من التربة :

إذا كان العزل عام نستعمل التخافيف ستظهر المتطفلة لعزل المتطفلة إجبارياً نأخذ سنادين مملوءة بالتربة ونضع فيها بذور حساسة للفطريات بشكل صفوف ثم نعطيها رية خفيفة بعدها نغلف السنادين بالنايلون لكي نمنع تبخر الماء ويكون النايلون مثقب لدخول الأوكسجين أيضاً تظهر المتطفلة جزئياً نجلب ثمار نعمل فيها شق أو حفرة ثم ننثر فيها كمية قليلة من التربة ثم نغطيها بالجزء المأخوذ ثم نلفها بالكيس النايلون ونضعها في الحاضنة نجلب PDA بعدما نصلبه نقطعه إلى مكعبات نغمره في التربة بعد 24 ساعة نأخذه ثم نضعه في وسط غذائي.

إختبار القدرة الإمراضية للفطريات :

يستخدم الوسط الزرعي .W.A [3] لإختبار القدرة الإمراضية للفطريات المأخوذة من مزارع بعمر عشرة أيام ثم تحضن الأطباق في درجة حرارة (25±2)°م وبعد 48 ساعة تزرع الأطباق ببذور الفجل (المعقمة بهايبوكلورات الصوديوم بتركيز10 % من التركيز التجاري لمدة دقيقتين والتي تم غسلها بالماء المقطر المعقم مرتين في كل مرة و تركت البذور في الماء مدة دقيقتين ، جففت بوضعها على ورقة ترشيح معقمة) بعدها تتم زراعة البذور في الأطباق البترية 25 بذرة في كل طبق على بعد 1سم من حافة المستعمرة ، وبشكل دائري حول المستعمرة الفطرية مع معاملة السيطرة من دون فطر ، بعد سبعة أيام تحسب النسبة المئوية للبذور النابتة و البادرات السليمة ، وبعد أسبوعين يتم قياس طول البادرات السليمة ، و حساب الوزن الطري للبادرات السليمة.

اختبار القدرة التضادية بين فطريات المقاومة الأحيائية والفطريات الممرضة

تستعمل تقنية الزرع المزدوج Double culture technique في إطباق بتري حاوية على الوسط الغذائي .P.D.A المعقم ، ولاختبار القدرة التضادية يقسم الطبق على قسمين متساويين ، ويلقح مركز القسم الأول بقرص قطره (0.5) سم من الفطر الممرض بوساطة ثاقب فليني معقم من قرب حواف المستعمرة المنماة على الوسط .P.D.A بعمر7أيام أيضا ، أما مركز القسم الثاني من الطبق يُلقح بقرص قطره (0.5) سم من حواف مستعمرة فطر المقاومة الإحيائية بعمر7 أيام ، كررت كل معاملة ثلاث مرات ونفذت معامله للسيطرة ؛ وذلك بتلقيح مركز القسم الأول من الطبق بالفطر الممرض فقط ،وكذلك طبق آخر بفطر المقاومة الإحيائية فقط ، وكل على انفراد(Dewan،1989) . تحضن الأطباق جميعها في الحاضنة بدرجة حرارة (25±2)°م ،ثم يجري قياس معدل النمو القطري للفطريات الممرضة وفطريات المقاومة الإحيائية بعد 5 أيام من الزرع المزدوج ، وتتم حساب النسبة المئوية للتثبيط على وفق معادلة Abbot:

---

[3] **وسط الاكر المائي (W.A.) Water Agar**

يحضر الوسط باضافة (17) غم من الاكر الى 1لتر ماء مقطر ثم أضيف إلى الوسط المضاد الحيوي Chloramphenicol بواقع 250ملغم/لتر. ويعقم بجهاز الموصدة بدرجة حرارة 121 م° وضغط 15 باوند/انج^2 لمدة 20 دقيقة ، بعدها يترك الوسط ليبرد.

معدل أقطار النمو الفطري في المقارنة – معدل أقطار النمو

الفطري في المعاملة

% للتثبيط = ــ ×100

معدل أقطار النمو الفطري في المقارنة

اختبار لمعرفة توافق البكتريا مع فطريات المقاومة الإحيائية بعد خمسة أيام من زراعتها على وسط زرعي .P.D.A في درجة حرارة 25±2 م°

تستعمل تقنية الزرع المزدوج Double culture technique في الأطباق ، يقسم الطبق إلى قسمين متساويين ، ويلقح مركز الطبق بالبكتريا ، وذلك بأخذ قطرة من التركيز68 × 10^4 بطرف إبرة معقمة وبطريقة التخطيط المتعرج أما مركز كل قسم يلقح بقرص قطره (0.5) سم من فطر المقاومة الإحيائية بوساطة ثاقب فليني معقم من قرب حواف المستعمرة المنماة على الوسط .P.D.A بعمر7 أيام ، تكرر كل معامله ثلاث مرات و تنفذ معامله السيطرة ، وذلك بتلقيح مركز القسم الأول من الطبق بالفطر فقط ، وكذلك طبق آخر بالبكتريا فقط ، وكل على انفراد. تحضن الأطباق جميعها في الحاضنة بدرجة حرارة (25±2)°م ،ثم يجري قياس معدل النمو القطري للفطريات بعد 5 أيام من الزراعة وامتداد النموات البكتيرية ، ويتم حساب النسبة المئوية للتثبيط على وفق معادلة Abbot بحسب ما جاء به شعبان والملاح (1993)

معدل أقطار النمو الفطري في المقارنة – معدل أقطار النمو

الفطري في المعاملة

% للتثبيط = ــ ×100

معدل أقطار النمو الفطري في المقارنة

ومن ثم يتم حساب النسبة المئوية للتوافق وكما يأتي :

% للتوافق = 100 - % للتثبيط

إختبار قدرة الفطريات المعزولة في إذابة الفسفور :

إستخدم لهذا الغرض وسطي آكار مستخلص البطاطا PDA ومارتن Martin والمذكورة تراكيبها في الجدول الآتي ، مع إضافة قطرة من صبغة (Rose Bengal) إذ تم تحضير محلولين معقمين مكونين من 10% من كل من K2HPO4, Cacl2 . حيث أخذ 5 مل من المحلول الأول و10 مل من المحلول الثاني

وأضيفا إلى الوسطين الزرعيين المذكورين بعد مزجهما آنياً ثم صبت الأوساط في الأطباق وتركت لكي تتصلب وزرعت بنماذج الفطريات المراد إختبارها والمعزولة من منطقة الدراسة على تلك الأوساط بإستخدام الثاقب الفليني وحضنت على درجة حرارة 28 مْ ولمدة (24 ، 48 ، 72 ، 96 ، 120) ساعة وإستدل على قدرتها في إذابة الفسفور من خلال تكون هالة شفافة محيطة بمستعمرة الفطر .

ملاحظة : تضاف قطرات من صبغة (Rose – Bengal) إلى وسط مارتن وكذلك وسط (PDA) ليتحول لونه إلى الأحمر .

المكونات	الوزن	المكونات	الوزن
Glucose	10 غم	Potato	200 غم
Pepton	5 غم	D-Glucose	20 غم
K2HPO4	1 غم	Agar	15 غم
MgSO4.7H2O	0.5 غم		
Streptomycin	30 غم		
Agar	15 غم		
Rose Bengal	0.035 غم		
D.W.	1000 مل	D.W.	1.000 مل

حفظ الفطريات :

إن عملية حفظ الفطريات تعتبر عملية تخزين لبعض أنواع الفطريات لفترات زمنية متفاوتة تختلف مدتها بإختلاف نوع الفطر وطريقة الحفظ مع وجوب الإحتفاظ بالخواص الأساسية والفعالة قدر الإمكان وتحفظ الفطريات بعدة تقنيات منها :

1- الحفظ على البذور :

أ- الطريقة الأولى :

تحضر بذور نظيفة لنبات الدخن أو الشيلم أو غيرها وتنقع بالماء لمدة 6 ساعات ثم توضع على ورق نشاف بعد ترشيحها للتخلص من الماء الحر ، بعدها توزع البذور في قناني زجاجية بواقع (50) غم ، لكل زجاجة ثم تسد فوهاتها بسدادات قطنية ، وتدخل إلى جهاز الموصدة في درجة حرارة 121 م° وضغط 15 باوند/انج^2 لمدة ساعة ثم تخرج وتترك لتبرد ، يكرر التعقيم في اليوم التالي لمدة ساعة أيضا (Dewan، 1989) ، بعدها تخرج ،وتترك لتبرد ويستعمل هذا الوسط في تحضير اللقاحات الفطرية بكميات مناسبة وتبقى الفطريات في هذا الوسط لمدة شهر .

ب- الطريقة الثانية :

تغسل بذور أحد محاصيل الحبوب كالشعير أوالشوفان أو القمح ويضاف لها كلورامفينيكول 250 غم / مل ماء ومن ثم يزال الماء وتعقم الحبوب لمدة ساعة بدرجة 12 مْ على مدى يومين متتاليين وتلقح بالفطر وتحضن في 23 – 27 مْ لمدة 7 – 10 أيام وتخزن في 25^- مْ وتصل فترة الحفظ إلى 10 سنوات .

2- الحفظ بالكليسيرول Glycerol :

يتم تحضير وسط زرعي ملقح بالفطر ومن ثم تقطيعه إلى قطع صغيرة في جو معقم ووضعها في أنابيب إختبار تحوي على ماء مقطر وقسم تحوي على 15% كليسيرول و50% كليسيرول وتحضير وسط زرعي ملقح بالفطر في أنابيب بصورة مائلة وتغمر أيضاً بالماء المقطر و15 % كليسيرول و50% كليسيرول ويحفظ في درجة 4 مْ . ويتم إختبار نشاط الفطر كل 6 أشهر وحتى 30 شهر .

3- الحفظ بإستخدام الوسط الغذائي السائل :

حيث يحظر بنفس طريقة تحضير الوسط PDA لكن بدون إضافة الآكار ويفيد هذا الوسط في حفظ العديد من الفطريات مثل .Aspergillus spp و .Beauveria spp وغيرها .

4- الحفظ على الرمل :

أ- الطريقة الأولى :

يغسل الرمل لإزالة الملح والطين ويوضع في أكياس حرارية خاصة أو زجاجات 60 مل من الرمل أو الطمي ثم يعقم 20 دقيقة عند 120 مْ ويعقم مرتين ويضاف له 20% من الماء المقطر المعقم ثم يلقح بالفطر المطلوب

بكمية 1 مل من معلق الفطر إلى كل زجاجة أو كيس وبعد 2 – 14 يوم من النمو تغلق جيداً وتخزن في 4 مْ . وهذه الطريقة مهمة لحفظ أنواع عديدة من الفطريات كما في الفطر *Fusarium* spp. و *Rhizoctonia* spp. حيث يتم حفظ الفطريات بهذه الطريقة لعدة سنين .

5- الحفظ بالماء المقطر :

أ- الطريقة الأولى :

تغمس نهاية عصا زجاجية بالماء المقطر وتدحرج على سطح وسط زرعي نامي بالفطر المراد حفظه ، وتغمس العصا في أنبوب إختبار يحتوي على 3 – 5 مل ماء مقطر معقم ويسد بإحكام بغطاء بلاستيك ويحفظ في درجة حرارة الغرفة في مساحة خالية من الغبار . ولإعادة نمو الفطريات تغمس نهاية عصا زجاجية بالمعلق المائي ويلقح بها وسط زرعي ويحضن . يمكن للفطريات أن تحفظ بهذه الطريقة لمدة 10 سنوات أو أكثر عدا بعض الفطريات الزايكوتية التي يمكن أن تبقى لعدة أشهر فقط .

ب- الطريقة الثانية :

توجد طريقة أخرى للخزن بالماء المقطر وهي تنمية الفطر على وسط إلى أن يكون سبورات بعدها يضاف عليه 6 – 7 مل ماء مقطر معقم وتكشط الطبقة السطحية للوسط الزرعي ومن ثم يفرغ في قنينة زجاجية معقمة وتخزن في 25 مْ .

6- حفظ الفطريات بالزيوت :

تعتبر من أقدم وأبسط الطرق في الحفظ حيث تستمر فترة الحفظ بها لمدة 32 عام وتحفظ في درجة حرارة الغرفة (15-20) مْ ومن فوائد هذه الطريقة هي منع نمو بعض العناكب على العزلات الفطرية وأيضاً حماية العزلات من الجفاف . يتم تعقيم الزيوت المعدنية أو البارافين السائل بالأوتوكليف لمدة ساعتين وبضغط 15 باوند وإذا وجدت رطوبة في الزيت يوضع في فرن جاف عند 170 مْ لمدة 1 – 2 ساعة (هذه الطريقة إختيارية حسب وجود الرطوبة) . ثم تنمى فطريات على أوساط زرعية مائلة في أنابيب إختبار وتغطى بحوالي 10 ملم من الزيت وتحفظ الأنابيب بوضع رأسي عند حرارة الغرفة (15 – 20 مْ و 12 مْ لأنواع Pythium , Phytophthora) . ويجب فحص مستوى الزيت في الأنابيب أو القناني بشكل دوري ويضاف المزيد من الزيت إذا لزم الأمر . ولإستعادة نشاط الفطر تؤخذ قطعة صغيرة من المستعمرة الفطرية ووضعها على وسط زرعي آخر بعد زوال الزيت .

7- حفظ الفطريات على المخلفات النباتية :

تستخدم أيضاً المخلفات النباتية في حفظ الفطريات بنفس طريقة الحفظ على البذور حيث تغسل المخلفات وتنقع لمدة 6 ساعات ثم تعقم بجهاز الأوتوكليف لمدة ساعة وفي اليوم التالي أيضاً تعقم لمدة ساعة وبعد أن تبرد تلقح بالفطر المراد حفظه ثم تحضن وبعد نمو الفطر عليها تخزن في الثلاجة .

8- حفظ الفطريات بالوسط المائل :

يحضر وسط PDA ويوضع في أنابيب إختبار بصورة مائلة ويلقح بالفطر ثم يوضع بالحاضنة لنمو الفطر ثم ينقل في الثلاجة بدرجة 20- مْ وأيضاً هذه الطريقة تحفظ الفطر لعدة سنين .

9- الحفظ بالنيتروجين السائل :

بعد زراعة الفطر في أطباق بتري يحضن بدرجة 24 مْ لمدة 14 يوم ثم ينقل إلى الفريزر ويحفظ في 4 مْ بعد ذلك تنقل الأطباق إلى جهاز النايتروجين السائل للحفظ . تعتبر هذه الطريقة غير مرغوبة بسبب كلفتها الإقتصادية العالية والحذر الشديد عند التعامل مع النايتروجين السائل .

10- حفظ الفطريات بالتجميد :

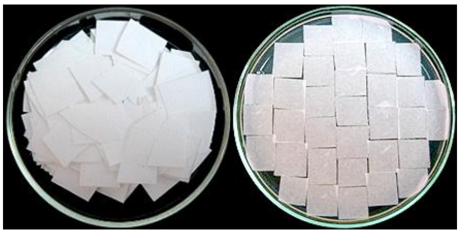
يحضر 20% من محلول الحليب الخالي من الدسم ويعقم بالأوتوكليف عند 116 مْ لمدة 20 دقيقة في أنابيب إختبار سعة 10 مل كل أنبوب ، ومن ثم يخزن عند 2 – 8 مْ . يحضر عالق بوغي وذلك بإضافة 2 مل من محلول الحليب للأنبوب أو الطبق الزرعي الحاوي على الفطر ، ومن ثم يضاف العالق مرة أخرى إلى الأنبوب الحاوي على ما تبقى من محلول الحليب ووزع 0.2 مل من المعلق في كل أنبوب .

ملاحظة : يجب أن لا تترك الأبواغ في محلول الحليب لأكثر من ساعتين وذلك لمنع إنباتها .

بعد غلق الأنابيب بالقطن توضع في أمبولات زجاجية خارجية مغلقة بإحكام وتوضع في جهاز التبريد – الجاف . ولإنبات الفطريات مرة أخرى أنقل العالق المحفوظ إلى 5 مل من الماء المقطر المعقم في أنبوب إختبار .

11- حفظ الفطريات بأوراق الترشيح :

أ- تقطع أوراق ترشيح إلى مربعات صغيرة وتعقم بالأوتوكليف وتوضع على سطح وسط آكار



ب- تؤخذ أقراص من وسط زرعي آخر نامي عليه فطر وتوضع فوق أوراق الترشيح . (يحتاج الفطر إلى 10 – 15 يوم لملأ الطبق)

جـ - بعد أن يبدأ الفطر بالنمو على ورق الترشيح يتم فصل الأوراق عن الوسط وتوضع في أطباق بتري جديدة خالية من الوسط .

د- تحضن الأطباق الحاوية على الأوراق في الحاضنة لمدة 20 – 30 يوم لغرض تجفيفها . وتعتبر عملية التجفيف مهمة جداً حيث إذا كانت سريعة تموت الفطريات وإذا بطيئة تتلوث الفطريات بفطريات أخرى أو بكتريا .

هـ - بعد جفاف الأوراق والفطر الذي عليها توضع 10 – 12 قطعة من ورق الترشيح في كيس شفاف لامع معقم ويخزن بدرجة 4 مْ وأحياناً ممكن أن يخزن بدرجة 20 مْ . تستمر فترة الخزن بهذه الطريقة 5 – 10 سنوات .

و- عند الحاجة إلى إكثار الفطر تؤخذ قطعة ورق ترشيح وتوضع على وسط زرعي جديد وتحضن لكي ينمو الفطر .

حفظ الأكياس في الثلاجة

12- حفظ الفطريات على الخشب :

تجلب قطع صغيرة من خشب الزان غير المعالج (بقطر 12 ملم وسمك 6 ملم) تضاف إلى وسط مستخلص الشعير السائل (60 قطعة من الخشب لكل 100 مل وسط) وتعقم لمدة 20 دقيقة بالأوتوكليف بدرجة 121 مْ ويكرر التعقيم مرة أخرى بعد مرور 24 ساعة . ثم تؤخذ 15 قطعة من الخشب في طبق بتري حاوي على وسط زرعي ويلقح بالفطر ويغلف بالبارافيلم ثم بعد 10 – 15 يوم تنقل قطع الخشب الملقحة إلى أنابيب إختبار معقمة تحتوي على 6 – 7 مل من 2% مستخلص الشعير المخمر وتغلق الأنابيب بالقطن وتحضن لأسبوع واحد تقريباً ويستبدل القطن بعد ذلك بالسليفان أو البارافيلم وتخزن في 4 مْ . ولإعادة تنمية الفطر تستخرج قطعة من الخشب وتوضع على وسط آكار ويغلق الأنبوب المخزون ويعاد للثلاجة .

13- الحفظ بطريقة شرائط الآكار :

يزرع فطر على وسط آكار ويقطع الوسط إلى شرائح بطول 1 سم ثم توضع في أطباق معقمة خالية وبعد أسبوع واحد في درجة حرارة الغرفة سوف تجف القطع ، تنقل بعد ذلك إلى أمبولات معقمة ومغلقة وتحفظ لمدة تصل إلى 3 – 5 سنة .

14- حفظ الفطريات على الحشرات أو الأنسجة النباتية :

تحفظ الحشرات والأنسجة المصابة بالفطريات وذلك بتجفيفها وتجميدها وخزنها عند الحاجة .

15- حفظ الفطريات بواسطة السيليكا جل :

تستخدم هذه الطريقة لحفظ السبورات عند عدم توفر النايتروجين السائل حيث وجد إن سبورات الفطر المحملة على هلام السيليكا والمضاف لها حليب خالي من الدسم تبقى حية لمدة 4 – 5 سنوات .

تملأ أنابيب ذو أغطية محكمة الإغلاق بـ 6 – 22 حبة من السليكا الخالية من الصبغات وتعقم بالحرارة الجافة لمدة 90 دقيقة عند 180 مْ وتخزن في حاويات مغلقة بإحكام . بعدها يتم عمل عالق سبوري 10% من بودرة الحليب خالي الدسم في ماء مقطر مبرد مسبقاً إلى 4 مْ كذلك تبرد السيليكا إلى 4 مْ وتوضع في حمام مائي – ثلجي . يضاف معلق الأبواغ إلى السليكا (0.5 مل / 4 غم سليكا) ويترك في الحمام لمدة 30 دقيقة ثم تخزن الأنابيب في حرارة الغرفة لمدة أسبوع إلى أسبوعين ثم ترج الأنابيب وتوضع في حاويات محكمة الغلق عند 4 مْ .

16- حفظ الفطريات بالتجفيد :

تحفظ الفطريات بهذه الطريقة لأكثر من ستة أشهر كما تستخدم أيضاً في حفظ الخمائر حيث تملأ أمبولات زجاجية بالوسط Sabouraud Glucose Agar وذلك بكمية 1 مل من Sabouraud و2% من G.A. ثم تعقم بالأوتوكليف وتلقح بالفطر المراد حفظه وتوضع في الحاضنة وعندما يملأ الفطر سطح الأمبولة تجمد الأمبولات بدرجة 70- مْ ومن ثم تجفد بتفريغ الهواء بـ 15 – 25 باسكال وتغلق فوهة الأمبولات جيداً وتخزن في درجة حرارة الغرفة .

حساب نسبة إنبات البذور :

س \ إحسب النسبة المئوية لحيوية البذور والنسبة المئوية لتعفن البذور وموت البادرات قبل البزوغ وموت البادرات بعد البزوغ والنسبة الكلية لموت البادرات علماً إنه لديك 75 بذرة طماطم فقط .

الحل \\ تؤخذ عينة من البذور ولتكن 10 بذرات وننميها في طبق بتري يحتوي على قطن مبلل أو ورق ترشيح لمعرفة النسبة المئوية لحيوية البذور وبعد ذلك نمت 8 فقط

8 10

× 100

---

800 \ 10 = 80 % النسبة المئوية لحيوية البذور

وعدد البذور التي نزرعها في الحقل من أصل 65 بذرة هو :

× 65

80 100

5200 \ 100 = 52 بذرة

نزرع 52 بذرة وبعد يومين نشاهد عدد البادرات فقط 40 بذرة و12 بذرة ماتت

12 52

× 100

1200 \ 52 = 23.07 % موت البادرات قبل البزوغ

وبعد مرور أسبوع شوهدت 15 بادرة متعفنة (ميتة) من أصل 40

15 40

× 100

1500 \ 40 = 37.5 % موت البادرات بعد البزوغ

إذن النسبة الكلية لموت البادرات وتعفن البذور هي :

15 + 12 = 27

27 52

× 100

2700 \ 52 = 51.9 % النسبة المئوية الكلية لتعفن البذور وموت البادرات

ثانياً : البكتريا The Bacteria

كائنات حية دقيقة وحيدة الخلية منها المكورات والعصيات و الحلزوني وهي تتجمع مع بعضها وتأخذ أشكالا متعددة مثل عقد أو سبحة فتسمى مكورات عقدية أو على شكل عنقود فتسمى مكورات عنقودية. تتراوح أبعاد البكتريا بين 0.5-5 ميكرومتر مع أن التنوع الواسع للبكتريا يمكن أن يظهر تعدد أشكال كبير جدا. تدرس البكتريا في ما يدعى علم البكتيريا أو الباكتريولوجيا الذي يعتبر فرعا من فروع علم الأحياء الدقيقة. كانت البكتيريا من أولى أشكال الحياة التي ظهرت على سطح الأرض وهي موجودة في معظم المواطن على هذا الكوكب. كما تستوطن التربة، الماء، ينابيع المياه الحارة الحمضية والكبريتية، المخلفات الإشعاعي، والأجزاء العميقة من القشرة الأرضية. أيضًا تعيش البكتيريا في النباتات والحيوانات كما تزدهر في المركبات الفضائية المأهولة بالبشر.

وصف المستعمرات البكتيرية Cultural Charactarization

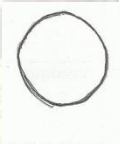
إن عملية وصف المستعمرات البكتيرية تتضمن دراسة مظهرية Morphological لهذه المستعمرات وحسب الوسط الذي تنمى عليه وكالآتي :

1- صفات المزارع البكتيرية في الأوساط الزرعية الصلبة Agar Plate Colonies :

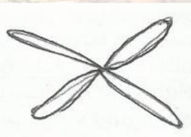
وتتضمن هذه الصفات ما يلي :

أ-الحجم Size : إذ تتراوح أحجام المستعمرات بين الصغيرة جداً (جزء من ملم) ومستعمرات كبيرة (5-10) ملم .

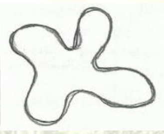
ب – الشكل Shape : ويمكن ملاحظة ذلك بالصفات فالمستعمرات أما أن تكون دائرية Circular



أو أن تكون خيطية Filimentous

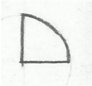


وغير منتظمة Irrigular

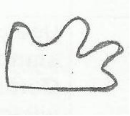


وأن تكون حبيبية Granular

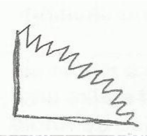
جـ - الحافة Edg / Margin : وتكون الحافات بالأشكال التالية :



a) حافة دائرية كاملة Entire



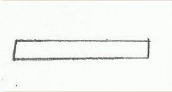
b) حافة متموجة Undulate



c) حافة مسننة Serrate

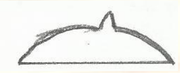
d) حافة خيطية Filimentous

ء – الإرتفاع Elevation أما أن يكون :

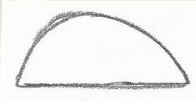


1- مرتفع Raised

2- محدب Convex



3- محدب ومرتفع من المركز Unbonate



4- عالي التحدب Pulvonate

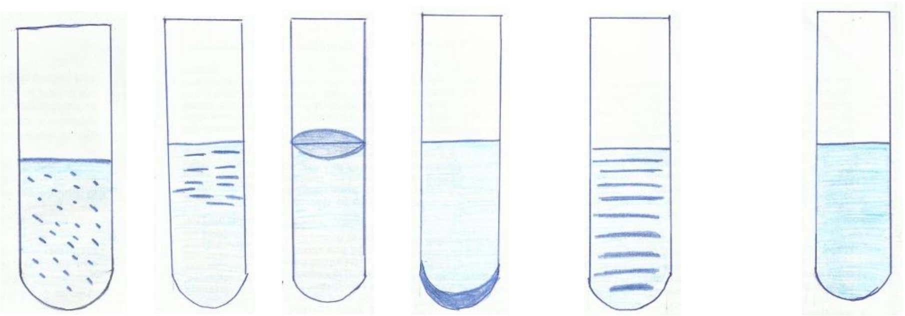
هـ - اللون Pigments / Color الصبغات : وتتراوح ألوان المستعمرات من اللون الأحمر والبني والأصفر والبنفسجي

و- الإضاءة Optical features : إذ تكون بعض المستعمرات لامعة أو شفافة أو معتمة

ز- القوامية Consistency : بعض المستعمرات تكون مائية أو لزجة أو غشائية أو صلبة

2- صفات المستعمرات في الأوساط السائلة Nutrient Broth :

ومن أهم صفاتها كمية النمو Amount of growth حيث يكون النمو متساوياً أو متوزعاً بشكل قشرة أو راسب أو حبيبي أو بشكل حلقة .



Granular Pelicle Ring Sedimet عكر Turpid Clear

حُبَيبِي قشرة حلقة راسب سحابي Cloudy No Growth

وبالإشارة للكمية نضع سالب إذا لايوجد نمو و + إذا النمو قليل و ++ إذا النمو متوسط و +++ إذا النمو كثير و ++++ إذا النمو كثيف .

عزل البكتيريا من البيئة

أ- طريقة القطرة المعلقة Hunging Drop Slide

1- تعقيم الايدي والمناضد بالمطهر قبل البدء بالعمل.

2- تنظيف شريحة القطرة المعلقة بالماء والصابون وتجفف جيدا مع الغطاء.

3- تتبع الخطوات التالية :

أ- بإستخدام عيدان خشبية ضع قطرات من الفازلين على زوايا الغطاء .

ب- ضع مرتين من Loop من المزرعة السائلة للبكتريا وسط الغطاء .

جـ - إقلب الشريحة ذات التقعر وثبتها على الغطاء .

د- إقلب الشريحة وإفحصها تحت العدسة الزيتية .

4- افحص تحت قوة التكبير 11 ثم حول على قوة التكبير الاعلى. ثم سجل ما تشاهد .

* يجب الاسراع في فحص العينة وذلك لان التاخير قد يؤدي إلى تكاثف الماء المحصور بين الغطاء والشريحة وبالتالي عدم وضوح الرؤية اضافة إلى تباطؤ حركة البكتريا مع مرور الوقت

ب- الفلورا الطبيعية للجلد :

1- تمسح منطقة الجلد بقطعة قطن مشبعة بالكحول بتركيز 71 % دقيقة ولتطهير المنطقة من الاحياء المجهرية غير المتوطنة Transient organisms والتي لا تشكل جزء من الفلورا الطبيعية

2- تترك لتجف

3- ترطب الـSwab بالسلاين ويمسح الجلد في منطقة محددة لمدة 15 ثانية.

4- يفتح الطبق تحت ظروف معقمة ويلقح سطح الاكار بواسطة مسحة القطني ويتم التخلص من المسحة بوضعها في بيكر يحتوي على ديتول.

5- يحضن الطبق في الحاضنة لمدة 24 ساعة عند درجة حرارة 37 ° م.

6- تفحص الاطباق وتدرس انواع المستعمرات واشكالها ما الوانها، قوامها.. اما لدراسة الفلورا في الهواء يترك الطبق مفتوح في المختبر لمدة نصف ساعة ثم يغلق ويحضن بنفس الطريقة.

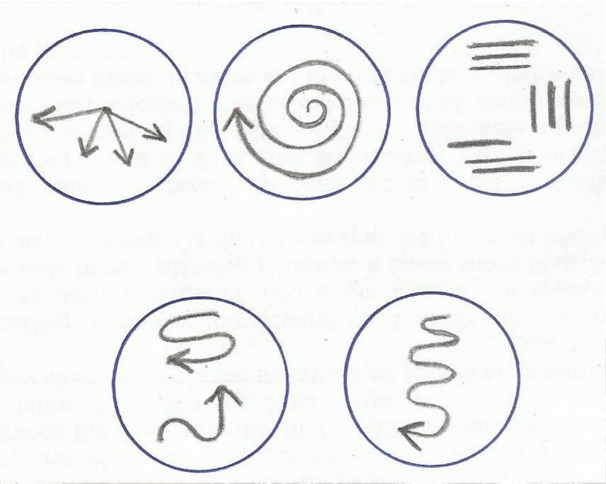
عزل البكتريا في المزارع النقية Isolation of pure culture

إن عملية عزل البكتريا بعد دراستها مظهرياً وتشخيصها هو العامل الأساسي في إنجاز البحوث المختبرية بشكل دقيق وتوجد تقنيات مختلفة خاصة بهذه العملية ومن أهم هذه الطرق :

1- العزل بعمل خطوط Streak – plate

2- العزل بواسطة النشر Spread – plate

وتستخدم في هذه الطريقة نقل عينات أو نماذج البكتريا بواسطة الناقل Loop المعقم إلى أطباق تحتوي على أوساط جاهزة Agar متصلب ويمكن إستخدام طريقة النشر حيث نستخدم عصا زجاجية على هيئة حرف L والغرض من عملية النشر والتخطيط هو تخفيف تركيز البكتريا بحيث تصبح البكتريا منعزلة عن بعضها البعض . وتوجد تقنيات مختلفة للحصول على مستعمرات معزولة إذ تعتبر كل مستعمرة معزولة هي عبارة عن جيل ناتج من خلية واحدة (مستعمرة نقية) وبذلك يمكن نقل أي جزء من هذه المستعمرة النقية إلى أطباق أخرى للحصول على مزارع بكتيرية أخرى .



عزل البكتيريا من التربة :

أخذ العينات :

1- نستعمل أنبوبة معدنية بطول 30 سم ويراعى تعقيم الأنبوبة قبل أخذ العينة وغالباً ما تكون العينات سطحية على بعد 10- 15 سم من سطح التربة وتوضع العينات مباشرة في أكياس بلاستيك أو أواني خاصة نظيفة .

2- تؤخذ 5 عينات بطريقة عشوائية لنوع واحد من الأراضي .

3- تجفف العينات في الهواء

4- تمرر خلال منخل سعة ثقوبه 5 سم لإزالة الحصى والأحجار وجذور النباتات ثم تمرر خلال منخل سعة ثقوبه 1 ملم ثم توضع في أوعية محكمة الغلق .

5- تحفظ العينات على درجات حرارة منخفضة أثناء التخزين وتحلل في أقرب وقت ممكن (أقل من أسبوعين)

6- تخلط العينات الخمس للأرض الواحدة جيداً ثم تقسم إلى قسمين أو ثلاث ويؤخذ منها 10 ملغم لتحضير معلق الأرض .

7- يرج المعلق لمدة 15 دقيقة بواسطة جهاز رج لضمان تفريق الأحياء الدقيقة عن حبيبات التربة .

8- يلزم أن تقدر في البيئة نسبة الرطوبة قبل تحضير المعلق حتى يمكن حساب النتائج على أساس الوزن الجاف للبيئة .

تحضير المزارع البكتيرية بإستخدام عملية التخافيف (الصب بالأطباق)

بعد جلب نماذج التربة من الحقل مباشرة يتم أخذ العينة الخاصة بالبحث وإجراء الخطوات التالية على هذه العينات من خلال حساب العدد الكلي للبكتريا بإستخدام تقنية Plate count Agar technique وكما يلي :

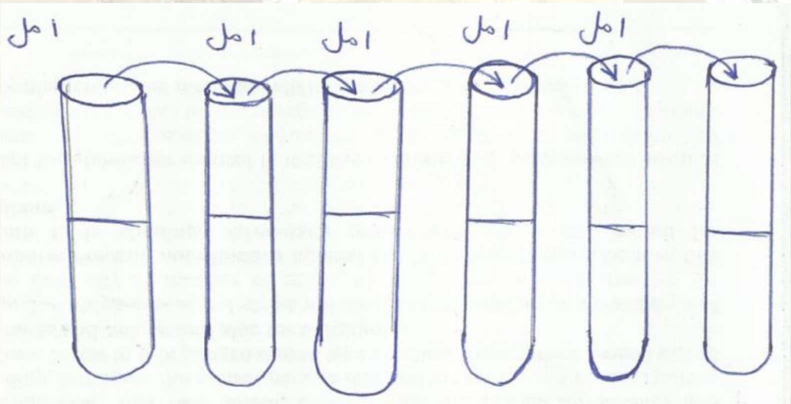
أولاً : تحضير الوسط الزرعي :

في البداية يبدأ العمل مختبرياً بتحضير الأوساط الخاصة بتنمية البكتريا وهو وسط N.A.

ثانياً : تحضير التخافيف :

أ- يؤخذ غم واحد من التربة الطازجة Freash وتوضع في test tube يحتوي على 10 مل من الماء المقطر والمعقم ومحكم الغلق

ب- بعد رج الأنبوب الأول بهدوء إلى أن يمتزج نموذج التربة ثم نسحب من وسطه 1 مل وننقله إلى الأنبوب الثاني الذي يحوي 9 مل من الماء المقطر والمعقم وهكذا نستمر بالعملية إلى الأنبوب السادس بحيث تصبح التخافيف كالتالي



ثالثاً : عملية الصب في الأطباق وحساب العدد الكلي للبكتريا :

أ- تحضر 6 أطباق نظيفة ومعقمة مقابل كل تخفيف

ب- يسحب 1 مل من كل تخفيف ويوضع في وسط الطبق

ت- يضاف 15 مل من الوسط إلى كل طبق من الأطباق الستة

ث- تحرك الأطباق بإتجاه عقارب الساعة حركة خفيفة وعكس إتجاه عقارب الساعة

ج- تترك الأطباق لمدة نصف ساعة إلى أن تتصلب ثم تقلب وتوضع وهي مقلوبة داخل الحاضنة وتترك لمدة (48 – 72) ساعة ثم تلاحظ النموات البكتيرية وتدون الملاحظات .

حساب البكتريا :

العدد البكتيري = عدد المستعمرات × مقلوب التخفيف

$$= 200 \times 10^{3} = 2 \times 10^{5}$$

$$= 40 \times 10^{4} = 4 \times 10^{5}$$

$$\frac{2 \times 10^{5} + 4 \times 10^{5}}{2} = 3 \times 10^{5} \ \text{cfu / g}$$

Colony forming unit / gm

وحدة مكونة للمستعمرات / غم

إذا كانت تربة فهو غم وإذا سائل مل وإذا حصلت هذه الحالة 10^{-4} / 0 فهي أقل من 1000

ملاحظة :

الطريقة السابقة هي لفحص الخلايا الحية فقط أما الطريقة الميكروسكوبية فهي لفحص الخلايا الميتة والحية دون تمييز .

تقدير بكتريا النايتروباكتر *Nitrobacter* والنايتروسوموناس *Nitrosomonas* (بكتريا النترجة) :

إن بكتريا النايتروسوموناس هي المسؤولة عن أكسدة الأمونيوم إلى نتريت كما في المعادلة :

$$\mathbf{NH_4} \xrightarrow[\text{nitrosomonas}]{\text{Oxid}} \mathbf{No_2}$$

حيث تم إستخدام أنابيب تحتوي على 3 مل من الوسط الغذائي Ammonium bicarbonate كما تم إستخدام أنابيب إختبار أخرى تحوي 9 مل من الماء المقطر (لغرض إجراء التخافيف) والمأخوذ

وإعداد تخافيف من 10^{-1} – 10^{-6} ثم تلقيح كل 5 أنابيب تحتوي على الوسط الغذائي بواحد مل من كل تخفيف وبذا يكون عدد الأنابيب الملقحة لكل نموذج تربة (20) وتوضع هذه الأنابيب في الحاضنة على درجة حرارة 28 مْ ولمدة 4 أسابيع مع نموذج للمقارنة (أنابيب تحتوي على الوسط الغذائي السائل بدون تلقيح للمقارنة) ويتم الكشف عن النتريت No2 بإستخدام كاشف (Gress – losvay) والذي يتألف من :

1- ∞ - napthalamin

2- Sulfo lonic acid

3- خلات الصوديم CH3CooNa.3H2O والذي تحضر في المختبر وتخلط آنياً أثناء التجربة وبكميات متساوية يضاف 3 قطرات من المزيج إلى كل أنبوبة حيث يلاحظ تحول اللون من الرائق إلى الأحمر الأرجواني وهذا يدل على وجود النتريت ويسمى بالكشف الموجب إلى بكتريا النايتروسوموناس أما الأنابيب التي تعطي كشف سالب يبقى لونها رائق وينظم جدول يستخرج منه العدد الأكثر إحتمالاً (MPN) حيث يضرب الرقم المستخرج من الجدول في مقلوب التخفيف الأوسط وبذلك نحصل على العدد الأكثر إحتمال ببكتريا النايتروسوموناس في غرام واحد تربة رطبة ثم يحول إلى غرام واحد تربة جافة .

يتم الكشف عن النترات بإستخدام كمية قليلة من كاشف آخر بشكل مسحوق من الخارصين والنحاس وأوكسيد المنغنيز إذا تطور اللون أرجواني موجب وإذا لا سالب أي لا توجد بكتريا .

عد بكتريا النترجة :

إعتمدت طريقة الإحتمال الأعظم (MPN) والموصوفة من قبل (Alexander and Clark, 1965) في عد بكتريا النترجة كل من *Nitrobacter, Nitrosomonas* وبإستخدام الأوساط الزرعية الآتية وتحضين الأنابيب الحاوية على تلك الأوساط الزرعية على درجة حرارة 28 مْ ولمدة أربعة أسابيع والكشف عن النترات بإستخدام كاشف Griss-losvay حيث عد تكون اللون الأحمر الأرجواني عند إضافة الكاشف دليلاً موجباً لوجود النترات ، كما وأضيف كاشف مكون من مسحوق خليط Zn وCu وأوكسيد المنغنيز MnO2 للكشف عن النترات المتكونة من تحول النتريت إذ عد تطور الوسط في الأنابيب إلى الأرجواني فحصاً موجباً لوجود النترات .

مكونات الوسط الغذائي Nitrate-calicium carbonate لتنمية بكتريا *Nitrobacter* ، والوسط الغذائي Ammonium – bicarbonate لتنمية بكتريا *Nitrosomonas*

المكونات	الوزن	المكونات	الوزن
KNO_2	0.06 غم	$(NH_4)_2SO_4$	0.5 غم
K_2HPO_4	1.0 غم	K_2HPO_4	1.0 غم
NaCl	0.3 غم	NaCl	0.3 غم
$MgSO_4.7H_2O$	0.1 غم	$MgSO_4.7H_2O$	0.03 غم
$FeSO_4.7H_2O$	0.03 غم	$FeSO_4.7H_2O$	0.3 غم
$CaCO_3$	1.0 غم	$CaCO_3$	7.5 غم
$CaCl_2$	0.2 غم		
D.W.	1.000 مل	D.W.	1.000 مل

عزل بكتيريا الرايزوبيوم Isolation of *Rhizobum*

من المعلوم إن بكتريا *Rhizobum* تنتشر في العقد الجذرية للنباتات البقولية والجت وعليه من الضروري عزل هذه البكتريا لأغراض

1- تقطع جذور نباتات الباقلاء ثم تغسل عدة مرات بالماء المقطر المعقم بعد إزالة دقائق التربة منها وتكرر هذه العملية عدة مرات .

2- توضع الجذور في دورق كبير ثم يضاف إليها محلول (0.001 $Hgcl_2$) وذلك لأجل تعقيم الجذور (كمطهر للجذور) أو بإستخدام الكحول ولمدة 10 دقائق .

3- تنقل العقد بعد فصلها من الجذور (لونها وردي) وتغمر بالماء المقطر المعقم لعدة مرات.

4- يستخدم الملقط العريض وذلك للضغط على العقد وإخراج محتوياتها من البكتريا (Rhizobum) وتبدأ عملية التشخيص.

5- يستخدم الوسط Manitol Yeast Extract Agar أو N. A. حيث نبدأ بنشر ما تم إستخراجه من العقد على الوسط أعلاه والذي يتم حضانته في 28 مْ ولمدة (3-4) أيام.

6- تؤخذ النموات بعد إخراجها من الحاضنة وتنقل بواسطة Loop على Slide ويتم تصبيغها بصبغة گرام Gram Stain صبغة تشخيصية وحسب الخطوات التالية :

1- 3 قطرات من صبغة Crystal Violet لمدة 30 ثانية .

2- 2-3 قطرات من صبغة Lughole's Iodine (محلول مثبت) لمدة 30 ثانية ولا يغسل بالماء .

3- إضافة أسيتون أو Al-cohol كمذيب 2-3 قطرات لمدة 30 ثانية ويغسل بالماء .

4- الصبغة المعادلة Sefranine (اللون الوردي) 2-3 قطرات لمدة 30 ثانية ويغسل بالماء فإذا ما أحتفظت الشريحة باللون البنفسجي فالبكتريا موجبة للصبغة وإذا تحول اللون وردي فالبكتريا سالبة للصبغة وهذه الطريقة تستخدم في تشخيص أعداد كبيرة من البكتريا .

الفحص المجهري للبكتريا

أ- تحضير المسحة Smear Preparation

اول واهم خطوة في طريق التصبيغ هو تحضير المسحة

تحضير المسحة وفائدة كل خطوة:

1- تنظيف الشريحة بالماء والصابون لإزالة الاوساخ والدهون العالقة وتجفف.

2- بواسطة قلم التاشير ترسم دائرة صغيرة أو مربع على احد جهات الشريحة وذلك لتحديد مكان عينة البكتريا على الشريحة.

3- في حالة اخذ عينة بكتريا من وسط سائل يعقم الـloop ثم تنقل قطرة من الوسط السائل (بعد رجه) وتوضع ضمن الدائرة المرسومة تفرش على شكل طبقة رقيقة وتترك لتجف في الهواء.

اما في حالة اخذ عينة من وسط صلب فينقل جزء من المستعمرة بواسطة الـloop الى قطرة من ماء الحنفية وتخلط جيدا وتفرش بشكل طبقة رقيقة ضمن الدائرة المرسومة ويعقم الـ Loop ثم تبرد على حافة

الوسط الصلب. تترك لتجف بالهواء لمدة 5- 11 دقيقة (مع مراعاة ان تكون المسحة رقيقة لكي تصبغ الخلايا بشكل متساو.

4- تثبت المسحة بتمرير الشريحة 3 مرات فوق لهب بنزين بحيث لا ترتفع حرارة الشريحة عند لمسها باليد بعد كل مرة تمرر على اللهب وهي اهم خطوة في تحضير المسحة إذ تعمل على :

1- تثبيت أو التصاق العالق بالبكتريا لكي لا نفقدها خلال الغسل عند التصبيغ.

2- إذا كانت البكتريا مرضية تفقد امراضيتها أي تفقد خطورتها وتصبح غير قادرة على الاصابة.

3- تبقى البكتريا محافظة على شكلها وحجمها عند اجراء التثبيت بالصورة الصحيحة

SMEAR : هو تحضير مجفف لخلايا البكتريا على الشريحة الزجاجية في نهاية عملية التثبيت تصبح الشريحة جاهزة للتصبيغ

يتم فحص البكتريا بإستخدام الميكروسكوب عن طريق تصبيغها بصبغات وهي :

أ- الصبغة البسيطة :

تعد طريقة التصبيغ البسيط من اسرع واسهل طرق تصبيغ البكتريا .سميت بهذا الاسم لاننا نستخدم نوع واحد من الاصباغ في خطوة واحدة فقط. ان معظم الصبغات التي تستخدم في الاحياء المجهرية تعد املاح من نوعين:

1- املاح حامضية وهي التي يكون فيها الايون الحامل للصبغة أو اللون (chromophore) سالب الشحنة (anion) مثال : sodium+ eosinate الصبغة في هذه الحالة هي الأيوسين

2- املاح قاعدية يكون فيها الكروموفور موجب الشحنة (cation) مثال : +methylene blue chloride الصبغة في هذ الحالة هي المثلين الازرق

النوع الاول من الاصباغ هي الحامضية بمعنى ان الكرومو فور الحامضي يتحد مع القاعدة مثل الـ NaOH لتكوين مركب ملحي هو الصبغة .

النوع الثاني من الاصباغ هي القاعدية إذ تتفاعل مع حامض مثل الـ HCl ليعطي المركب الملحي أو الصبغة. إذا الاصباغ الحامضية هي التي تحمل شحنة سالبة (على الكروموفور) والقاعدية هي التي تحمل شحنة موجبة (على الكروموفور ايضاً).

اما البكتريا فقد تحتوي بداخلها على العديد من المكونات الحامضية (سالبة الشحنة) مثل الحوامض النووية السكريات المتعددة الحامضية بروتينات ... الخ كما تحتوي ايضا على مكونات ذات طبيعة قاعدية (موجبة الشحنة) ولكن من المعروف ان الحصيلة النهائية للشحنات Net charge على جسم البكتريا ككل هي الشحنة السالبة أي تتصرف البكتريا بصورة عامة كجسم سالب تجاه الصبغات .

إذا الأصباغ القاعدية Positive Stains مثل Methylene blue و Crystal basic fuchsin ، violet .... الخ تنجذب إلى الخلايا البكتريا وبالتالي تصطبغ بها. أما الأصباغ الحامضية negative stains ذات الشحنة السالبة تتنافر مع الشحنة السالبة على الخلية البكتيرية ومن ثم ترفضها البكتريا لتصطبغ الخلفية فقط.

طريقة عمل Positive Stains :

1- تنظيف الشريحة بالماء والصابون

ملاحظة: حتى الشرائح غير المستعملة يجب تنظيفها لأنها مطلية بمواد حافظة.

2 - بواسطة قلم التأشير ارسم دائرتين في وسط الشريحة.

3- بواسطة ال Loop انقل قطرة ماء وضعها وسط كل دائرة.

4- يعقم الloop ثم يبرد. إذا كانت المزرعة صلبة انقل كمية قليلة جدا من مستعمرة لبكتريا عصوية وامزجها جيدا مع قطرة الماء. هذ العملية تعمل على تفكيك افراد المستعمرة المترابطة مع بعضها للحصول على خلايا مفردة. يعقم الloop مرة اخرى و كرر العملية نفسها لمزرعة بكتريا كروية. اما إذا كانت مزرعة البكتريا سائلة فلا داعي لقطرة الماء.

5- بواسطة ال loop يتم فرش عالق البكتريا ضمن الدائرة على شكل طبقة رقيقة. تترك لتجف في الهواء، ثم تمرر فوق لهب بنزين بالاستعانة بملقط لغرض التثبيت.

6 - تغمر الشريحة بأحد الصبغات القاعدية مثل المثلين الازرق لمدة دقيقة واحدة.

7- تغسل الشريحة بماء الحنفية وتجفف بوضع الشريحة بين ورقتي ترشيح والضغط الخفيف

عليهما. افحص تحت المجهر .

طريقة عمل Negative stain :

1- ضع قطرة ماء على شريحة نظيفة وامزج معها جزء قليل من البكتريا الى ان تصبح القطرة عكرة.

2- أضف حملة Loop من صبغة حامضية مثل نكروسين وامزجها مع الخليط اعلاه لكي تكون طبقة رقيقة.

3- جفف في الهواء وافحص تحت المجهر.

ملاحظة: عند فحص الشرائح المصبوغة يفضل البدء بالعدسة الشيئية X10 ثم X 40 وأخيراً العدسة الزيتية.

ب- الصبغات التفريقية Differential stains :

عند فحص قطرة عالق بكتريا سواء على شريحة اعتيادية (wet mount) أو بطريقة القطرة المعلقة لاحظنا (شكل البكتريا، حجمها، حركتها، و ترتيبها) ان كانت مسبحية ، ثنائية، عنقودية .... الخ .

ولكن من مساوئ هذ التحضيرات الحية هي ان الشريحة سريعة الجفاف تحت تأثير حرارة المصدر الضوئي للمجهر اضافة إلى خطورة تلوث اليدين بالبكتريا الحية. ممكن تلافي هذ الاخطاء باستخدام طرق التصبيغ حيث تقتل البكتريا عند تحضير المسحة خلال عملية التثبيت بالحرارة أو بفعل الاصباغ القاتلة للبكتريا. لذلك، عند الانتهاء من التصبيغ ممكن الاكتفاء بغسل الشريحة بالماء والصابون. واخيراً ممكن الاحتفاظ بالشريحة لفترات اطول.

1- صبغة كرام Gram Stain :

سميت هذ الصبغة بالصبغة العظيمة لانها من اهم واكثر الصبغات استخداما، يذكر ان التصنيف الحالي للبكتريا يشمل 1000 جنس مع 5000 نوع اضافة إلى الاعداد الجديدة التي تكتشف سنوياً. لذلك اعتمدت هذ الصبغة كخطوة اولى في تشخيص البكتريا ومنذ اكتشافها من قبل العالم Christian Gram عام 1883 تصنف هذه الصبغة الاجناس البكترية إلى مجموعتين كبيرتين هما:

1- بكتريا موجبة لصبغة كرام +G بنفسجية اللون مثل المكورات Cocci مثل *Staphylococcus aureus*

1- بعد تحضير الأطباق الجاهزة من المزارع البكتيرية تحضر مسحات للبكتريا ونقلها بإستخدام Loop معقم إلى Slid وبحجم 1 سم^2

2- توضع الشريحة بشكل مائل ونضيف الصبغة البنفسجية Crystal violet بحدود 5 قطرات وتترك لمدة نصف دقيقة

3- تغسل الشريحة بالماء المقطر جيداً

4- يضاف إلى الشريحة محلول اليود ولمدة نصف دقيقة Lugol`s Iodine

5- أسكب اليود بدون غسل الشريحة

6- ضع قطرات من الكحول المزيل للألوان لمدة 15 ثانية Alcohols

7- تغسل الشريحة بشكل جيد

8- ضع عدة قطرات أو 5 من صبغة السفرانين Safranin (الصبغة المعادلة) لمدة نصف دقيقة

9- إغسل الشريحة بشكل جيد بالماء وأتركها لتجف وذلك بإستخدام ورق النشاف

10- أنقل الشريحة إلى المجهر وضع عليها قطرة من زيت السدر Cedar وثم فحص البكتريا مجهرياً بإستخدام العدسة الزيتية

جـ - الصبغة السالبة :

1- ضع قطرة من المعلق البكتيري على الشريحة

2- ضع قطرة من صبغة النجروسين (أو الحبر الشيني) فوق المعلق ثم إخلطهم جيداً .

3- أفرد الخليط على الشريحة بإستخدام شريحة أخرى (مسحة) تكوين غشاء تدريجي .

4- يترك ليجف في الهواء ثم يتم الفحص .

د- تصبيغ الجراثيم :

1- تحضير الفلم البكتيري وتثبيته على الشريحة (يمكن الحصول عليه وذلك بوضع مزرعة البكتيريا المختلطة في حمام مائي بحيث يكون سطح الماء فيه أعلى من سطح الخليط في الأنبوبة وسخنها لدرجة 80 مْ محافظاً على هذه الدرجة لمدة 15 دقيقة حتى يتم قتل الخلايا الخضرية غير المكونة للجراثيم . أنقل مسحة من البكتريا بواسطة إبرة معقمة إلى سطح الوسط الغذائي الصلب . أحفظ الأطباق مقلوبة في الحاضنة عند درجة 30 مْ لمدة 24- 48 ساعة فتحصل على مجموعات من البكتيريا المكونة للجراثيم فقط . أعمل صبغة جرام لمستعمرة معزولة وعند التأكد من نقاوتها لقح أنبوبة آكار مائل وحضنها في درجة 30 مْ ليومين وبذلك تحصل على مزرعة نقية من البكتيريا المكونة للجراثيم).

2- نضيف أخضر الملاكيت لمدة 5 دقائق مع التسخين (مراعاة إضافة الصبغة كلما حدث تبخر للصبغة)

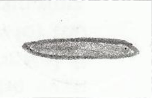
3- غسل الشريحة بتيار خفيف من الماء بعد التخلص من الزيادة من الصبغة .

4- إضافة صبغة السفرانين لمدة 30 ثانية ثم تغسل الشريحة

5- تجفف الشريحة ثم تفحص .

أشكال البكتريا The Bacterial forms

في العزلات البكتيرية النقية والمحضرة بطريقة النقل على أوساط جديدة أو بإستخدام الثاقب الفليني أو بإستخدام طريقة النشر أو الخطوط ومن الأشكال البكتيرية التي تشخص في تلك الأوساط النقية :



1- العصيات Bacilli

2- المكورات Cocci

3- المكورات الثنائية Diplococci

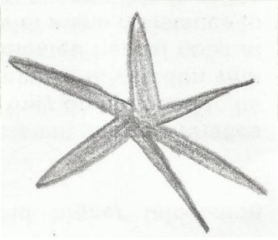
4- الحلزونيات Siprilla

5- الضمات Vibrious

6- المكورات المسبحية Streptococci

7- المكورات العنقودية Staphylococci

8- الحلزونيات الطويلة Spirochates



9- البكتريا الراقية (الخيطيات) Actinomycetes

الاختبارات الكيموية حيوية :

1-اختبار الكاتليز :

يجرى هذا الاختبار للتحري عن وجود أنزيم الكاتليز الذي يحلل بيروكسيد الهيدروجين H2O2 إلى أوكسجين وماء وتستعمل لهذا الفحص طريقة (Norris وآخرون ، 1981). إذ يتم نقل جزء من المستعمرة البكتيرية النامية على الوسط Nutrient Agar إلى شريحة زجاجية أضيف إليها 1-2 قطرة من محلول بيروكسيد الهيدروجين ، إن ظهور فقاعات غازية يدل على أن النتيجة موجبة.

2- اختبار تحلل النشأ :

يجرى هذا الاختبار للكشف عن تحلل النشأ بإضافة محلول اليود إلى الوسط الزرعي الملقح مسبقا باللقاح البكتيري للبكتريا وتحضن الأطباق بدرجة حرارة 27±1 م° لمدة 72 ساعة وتغمر الطبق بمحلول كاشف اليود ، إن ظهور مناطق شفافة حول المستعمرة يدل على تحلل النشأ (Symbert ، Krieg،1981).

3- اختبار أنتاج الاندول :

يحضر وسط الببتون لغرض التحري عن جذور الاندول من الحامض الاميني Tryptophan ،إذ تلقح الأنابيب الحاوية على الوسط باللقاح البكتيري وتحضن الأطباق بدرجة حرارة 27±1 م° لمدة 72 ساعة ،نضيف بعد ذلك بضع قطرات من كاشف كوفاكس ، إن تكون حلقة بلون وردي يدل على ايجابية الاختبار (Yokayama وCarlson،1974)

4- اختبار تحلل الجيلاتين :

يتم تلقيح الإطباق الحاوية على وسط الجيلاتين الصلب باللقاح البكتيري وتحضن الأطباق بدرجة حرارة 27±1 م° لمدة 72 ساعة ،يستعمل كاشف فرايزر لهذا الاختبار حيث يسبب عتمة الوسط ، إن ظهور مناطق شفافة حول المستعمرة دلالة على ايجابية الاختبار وإنتاج أنزيم (. Gelatinase) (Harrigan) .

حفظ البكتريا :

1- الحفظ في الوسط السائل :

ممكن حفظ البكتريا في الوسط السائل لمدة طويلة قد تصل إلى السنة حيث يحضر وسط زرعي سائل N.B. بنفس طريقة التحضير المذكورة سابقاً ويلقح بالبكتريا وبعد نمو البكتريا يحفظ في الثلاجة .

2- الحفظ في الوسط الصلب المائل :

تعد من أشهر الطرق لحفظ البكتريا والفطريات لمدة طويلة جداً حيث يحضر وسط زرعي صلب N.A. لكن يصب في أنابيب إختبار وتوضع بصورة مائلة إلى أن يتصلب الوسط جيداً وبعدها يلقح بالبكتريا ويحضن ومن ثم يحفظ في الثلاجة .

3- الحفظ بالجليسرول :

يمكن حفظ البكتريا بالكليسيرول 30% - 50% في 80 ⁻ مْ .

ملاحظة : يمكن إستخدام الطرق المذكورة في حفظ الفطريات وتطبيقها في حفظ البكتريا .

ثالثاً : الفايروسات The Viruses

الفيروس هو عامل ممرض صغير لا يمكنه التكاثر إلا داخل خلايا كائن حي آخر. الفيروسات صغيرة جدا ولا يمكن مشاهدتها بالمجهر الضوئي. تصيب الفيروسات جميع أنواع الكائنات الحية، من الحيوانات والنباتات إلى البكتيريا على الرغم من أن هناك الملايين من الأنواع المختلفة لم يتم وصف إلا حوالي 5.000 من الفيروسات بالتفصيل وذلك منذ الإكتشاف الأولي لفيروس تبرقش التبغ من قبل مارتينوس بيجيرينك عام 1898. الفيروسات موجودة تقريبا في كل النظم الإيكولوجية على الأرض، وتعتبر هذه الهياكل الدقيقة (الفيروسات) الكيان البيولوجي الأكثر وفرة في الطبيعة. دراسة الفيروسات معروفة بعلم الفيروسات، وهو تخصص فرعي في علم الأحياء الدقيقة.

الكشف عن الفايروسات :

تتم في مختبر وقاية النبات حالياً فقط تقنية النباتات الكاشفة للكشف عن الفيروسات المنتشرة في الحقول الزراعية وتكون هذه التقنية كالآتي :

تزرع بذور نباتات خاصة تستخدم في الكشف عن الفايروس وكما مبينة في الجدول اللاحق في أصص بلاستيكية (قطر 20 سم وإرتفاع 20 سم) بعد تعقيم البذور بالفاست (هايبوكلورات الصوديوم) 15% وتملأ الأصص بتربة مزيجية معقمة بجهاز التعقيم البخاري (Autoclave) وبتموس بنسبة 1:2 . وبعد نمو البادرات في مرحلة (3-5) ورقة تنقل إلى أصص أخرى بقطر 10 سم وتحضن في غرفة نمو بدرجة حرارة (22- 28) مْ وشدة إضاءة 800 لوكس وبمدة إضاءة (16 ساعة ضوء و8 ساعات ظلام) لحين إستخدامها في وقت لاحق .

ت	إسم النبات	الإسم العلمي
1	الطماطم	*Lycopersicon esculentum*
2	الداتوره	*Datura stramonium L.*
3	التبغ	*Nicotiana glotinosa L.*
4		*Nicotiana tabacum var. Samsun*
5		*Nicotiana tabacum var. Xanthi*

Nicotiana tabacum var. White Burley		**6**
Solanum nigrum L.	عنيب الذيب	**7**
Solanum melongena	الباذنجان	**8**
Physalis floridana	نبات المنطاد	**9**
Cucumis sativus		**10**
Chenopodium amaranticolor	الزريج	**11**
Chenopodium murale	الرغيله	**12**
Phaseolus vulgaris var. Battle	الفاصوليا	**13**
	القرع	**14**
Gomphrina globosa L.	ورد الدكمة	**15**

عملية العدوى :

تؤخذ أجزاء من النبات المصاب أو المشكوك بإصابته بالفايروس ويسحق بمدق خزفي ثم تمسح أوراق النبات الكاشف بعصير النبات المصاب بعد تعفيرها بمادة الكربوراندم ثم ترش الأوراق بالماء المقطر بعد 1-2 دقيقة من العدوى وتوضع في البيت البلاستيكي لملاحظة ظهور الأعراض .

الفصل السادس

الحلم والعناكب

مقدمة : الفرق بين العناكب والحشرات

تعتبر شعبة مفصلية الأرجل Arthropoda أكبر شعبة في عالم الحيوان والتي تضم عدد من الأصناف أحدها العنكبوتيات Arachnida والتي تميز عن باقي أصناف شعبة المفصليات وبالأخص الحشرات بأن جسمها يتكون من منطقتين عكس الحشرات التي تتكون من ثلاثة مناطق ولا تملك العنكوبتيات قرون إستشعار بعكس الحشرات التي لديها زوج من قرون الحشرات كما تملك العنكبوتيات أربعة أزواج من الأرجل بخلاف الحشرات التي تملك ثلاثة أزواج فقط . وتتنفس العنكبوتيات بواسطة الرئات الكتابية وجهاز الإخراج فيها هو أنابيب مالبيجي أو غدد حرقفية وأحياناً الإثنين معاً في حين الحشرات يكون تنفسها بالقصبات الهوائية وجهازها الإخراجي هو أنابيب مالبيجي فقط . تشمل العنكبوتيات العنكبوت والحلم والقراد وغيرها .

جمع الحلم من النباتات :

يجمع الحلم من النباتات بفرشاة ناعمة وبمساعدة عدسة يدوية وقد يساعد ترطيب طرف الفرشاة على إنتقالها من النباتات ومن ثم ينقل الحلم إلى وحدة التربية لإجراء الدراسات المختبرية عليه أو وضعه في قارورة تحوي مادة حافظة (70 – 80 % كحول) لإجراء الدراسات عليه . هذا إذا كانت الأجزاء النباتية المتواجد عليها الحلم صعبة الإزالة أما إذا تواجد على الأوراق مثلاً فبالإمكان قص الأوراق والأجزاء النباتية ووضعها في كيس بلاستيك ويفضل وضع هذه الأكياس الحاوية على الأوراق في صندوق حاوي على ثلج وذلك لتقليل حركة الحلم ومنع جفاف الأوراق وتقليل إفتراس الأعداء الطبيعية له .

تجمع أفراد الحلم سريع الحركة والكبير الحجم بواسطة شفاط صغير ، أما إذا كان الحلم صغير جداً ولا يمكن رؤيته في أوراق النبات نقوم بهز الورقة أو الغصن على صينية أو قطعة من الورق المقوى وتضرب عليها النباتات باليد أو بالعصا هذه الطريقة من مزاياها هو جمع أكبر عدد من الحلم لكن من مساوئها هو إختلاط مختلف أنواع الحلم المتواجد على مختلف النباتات .

يتم جمع حلم الصدأ والحلم الأريوفي حر المعيشة بواسطة سكب سائل رقيق من السوربيتول (25% كحول الآيزوبروبيل مع عدد قليل من بلورات اليود) على الورقة المصابة أو جزء من النبات المصاب في بقعة صغيرة والتي يمكن فحصها تحت المجهر ، يمكن جمع الحلم الغدي Gall من خلال إختيار أجزاء من النبات ووضعها في كيس ورقي صغير لفحصه في وقت لاحق . أفضل طريقة للحفاظ على

الحلم الغذي عن طريق تجفيفه في أكياس ورقية ويمكن إستعادة الحلم المحنط بسهولة ووضعه على شرائح حتى بعد مرور عدة سنوات . ويمكن جمع الحلم أيضاً عن طريق غسل النباتات المصابة بالماء الساخن . وبالإمكان إضافة بضع قطيرات من المنظفات إلى الماء .

عند رج الأجزاء النباتية المصابة في وعاء يحوي ماء يسقط الحلم من النبات في الماء ويفصل بواسطة مناخل مختلفة الأحجام إعتماداً على حجم الحلم .

جمع الحلم من / في الطبقة السفلية :

يمكن جمع أعداد كبيرة من الحلم من الطبقات السفلية للنباتات الأرضية بواسطة جهاز تفريغ يدوي . ويمكن فحص شباك التفريغ مباشرة تحت المجهر أو العدسة كما يمكن ضرب محتويات الشبكة في صينية سوداء أو بيضاء ويتم فرز الحلم بفرشاة شعرية ناعمة . أما إذا يوجد الكثير من الطمي وكتل التربة تغسل الصينية بماء ساخن وتفصل بالطرق السابقة . وتستخرج كميات كبيرة من الحلم من النباتات الأرضية والتربة بإستخدام قمع برليزي والذي يعد من أحسن الطرق لإستخلاص الحلم .

أشياء يجب ملاحظتها عند الجمع :

عند جمع الحلم لغرض التشخيص تجمع عينة كبيرة وبمختلف الأحجام والأعمار (الحوريات والكاملات ذكور وإناث) خصوصاً حلم الغبار الذي تكون ذكوره مطلوبة لتحديد الأنواع . كما يذكر الموقع وتأريخ الجمع وإسم الجامع والنبات العائل والإسم العلمي بدلاً من الإسم المحلي كما ينبغي ملاحظة أعراض الإصابة أو العادات الغذائية واللون وبالأخص الحلم النباتي .

قتل العينة :

يقتل الحلم الحي عن طريق سكب كمية صغيرة من الماء المغلي حيث تتمدد زوائد الحلم بالكامل وبالتالي تسهيل الدراسات المجهرية . وبالإمكان قتل الحلم بمحلول من الميثانول وحامض الخليك (جزأين لكل مادة وجزء ماء مقطر) حيث يساعد الحلم على مد أرجله ويفضل نقل الحلم الميت من المحلول إلى حافظة إعتيادية لتخزينه مدة أسبوع .

حفظ العينة :

يخزن الحلم في قوارير صغيرة تحوي على كحول 70 – 80% ، كما إن إضافة 5% من الغليسيرول ينصح بها لمنع الحلم من الجفاف إذا كان الكحول يتبخر . وتستخدم مادة حافظة أخرى هي سائل أودمانس Oudemans (وهو خليط من 87 جزء كحول و5 أجزاء جليسيرين و8 أجزاء من حامض الأسيتيك) .

تحضير الحلم للدراسة المجهرية :

1- ترويق العينات :

بعض أنواع الحلم تكون غامقة جداً حيث المحتوى الجسمي لها عالي لذلك من الضروري ترويق العينة قبل وضعها على الشريحة الزجاجية وفحصها . يستخدم اللاكتوفينول وهو عامل ترويق قوي مكون من (50 جزء حامض اللاكتيك و25 جزء من بلورات الفينول و25 جزء ماء مقطر) أما بالنسبة للحلم الرقيق فيستخدم حامض اللاكتيك فقط للترويق . وتروق العينات بوضعها في المواد السابقة أعلاه لمدة أسبوع بدرجة حرارة الغرفة وإذا كان الحلم كبير الحجم وصلب يستحسن ثقب جسمه بدبوس حشرات ناعم . ولتسريع عملية الترويق تسخن العينة في محلول الترويق على هيتر حيث يمكن ترويق أكثر من عينة بهذه الطريقة وبعدة ساعات أو دقائق إعتماداً على درجة حرارة اللوح وصلابة الحلم كما ينبغي الحرص على عدم ترويق العينة فوق الحد المقرر . وتنقل العينات الطرية إلى ماء مقطر لغسلها قبل وضعها على الشرائح .

توضع قطرة من المادة المثبتة في وسط الشريحة ويضاف لها الحلم بواسطة دبوس حشرات ناعم بحيث يتجه ظهر الحلم للأعلى والعينات الأخرى يقلب الحلم على الجانب الظهري بحيث تكون البطن للأعلى . في بعض أنواع الحلم تلتف الأرجل نحو الـ Idiosoma إذا لم تقتل بالطرق السابقة . وتغطى الشريحة الحاملة للنموذج بغطاء (قطر 13 ملم مناسب لأغلب العث) ويحرك الغطاء برفق لضبط العينة .

تحضير الشرائح الدائمة :

توجد عدة أوساط لعمل الشرائح الدائمية للحلم وهي :

أولاً : وسط Hoyer [4]:

يتكون من : ماء مقطر 25 مل

صمغ عربي 15 مل

كلورال هايدريت 100 غم

غليسيرين 10 مل

---

[4] هذا الوسط شديد السمية لذا ينبغي توخي الحذر عند إستخدامه .

يفضل أن يكون الصمغ العربي بشكل بلورات وليس مسحوق وتخلط المكونات بدرجة حرارة الغرفة ويصفى السائل الناتج بعدة طبقات من الشاش أو الحرير هذا الوسط سهل الإستخدام . إذا كانت العينات مغسولة بحامض اللاكتيك فيجب غسلها أو نقعها بالماء المقطر لإزالة الحامض والأنسجة الذائبة قبل وضع العينات في وسط هوير . يجب الأخذ بنظر الإعتبار إتجاه وضع النموذج فمثلاً توضع ذكور حلم الـ Tetranychus بشكل جانبي على الشريحة بحيث تكون آلة السفاد ظاهرة على الجانب .

خطوات تحضير الشريحة الدائمية :

1- ضع نقطة صغيرة جداً من وسط هوير على الشريحة وأنشرها إلى طبقة رقيقة إلى حد ما .

2- ضع الحلم فوق الوسط بمساعدة الدبابيس على الجانب كما يجب أن يكون هناك وسط كافي على الشريحة لطلاء الحلم .

3- قبل وضع الغطاء الزجاجي قم بتجفيف الشريحة لفترة قصيرة إلى أن يلتصق الحلم بقوة ويكون التجفيف في فرن درجة حرارته 40 مْ لمدة 3 ساعات أو في درجة حرارة الغرفة لكن لفترات أطول .

4- ضع قطرة من وسط هوير على قمة العينة وأنزل عليها الغطاء الزجاجي بلطف .

ثانياً : وسط لاكتوفينول Lactophenol

يتكون من : كحول بولي فينول 10 غم

ماء مقطر 40 – 60 مل

حامض اللاكتيك 85 – 92 % 35 غم

فينول 1% محلول مائي 25 مل

جيليسرين 10 مل

كلورال هايدريت 100 غم

يحضر بنفس طريقة تحضير الوسط السابق كما يجب تخزينه بزجاجة بنية اللون .

ثالثاً : الوسط المعتمد على الراتنج :

مثل كندا بلسم ويوبارال Euparal يمكن صناعة شرائح دائمية منها ولكن بصورة محدودة وليست شائعة ومن عيوبها يكون النموذج غير واضح في الفحص المجهري ولكن توجد دراسة لـ Saito *et al.* (1993) أظهرت إن كندا بلسم يعمل جيداً على عنكبوت الغبار وبعض أنواع الصغيرة .

تجفيف الشرائح :

تجفف الشرائح المصنوعة من المواد القابلة للذوبان في الماء تماماً وذلك في فرن ساخن 40 – 50 مْ لمدة أسبوع أو أسبوعين . ويغلف غطاء الشريحة بمادة عازلة مثل Glyceel و Euparal و Glyptal بواسطة فرشاة صغيرة تطوق الغطاء الزجاجي للشريحة .

الفصل السابع

الديدان الثعبانية

المقدمة :

بشكل عام هي حيوانات لافقارية دودية الشكل غالباً وتوجد في كل مكان على سطح الكرة الأرضية أينما توفرت الرطوبة وبذلك فهي تعتبر ثاني أكبر المجموعات الحيوانية عديدة الخلايا بعد مجموعة الحشرات . والنيماتودا المتطفلة على النبات على وجه الخصوص لا تشكل أكثر من 10% من المجموع العام للنيماتودا على وجه البسيطة ، وهي تتطفل إجبارياً على النباتات بإختلاف أنواعها وأغلبها متطفلات على المجموع الجذري ، والقليل منها يتطفل على المجموع الخضري .

طرق جمع العينات للفحص النيماتودي :

هناك أمور يجب أخذ النظر بها عند جمع عينات النيماتودا هي :

1- تجمع وإنتشار النيماتودا يعود بالأساس للنظام الجذري للنبات العائل والسلوك الموسمي للنيماتودا .

2- نوع المحصول وتأريخ زراعته .

3- المساحات النباتية لمختلف الأصناف .

4- رطوبة التربة .

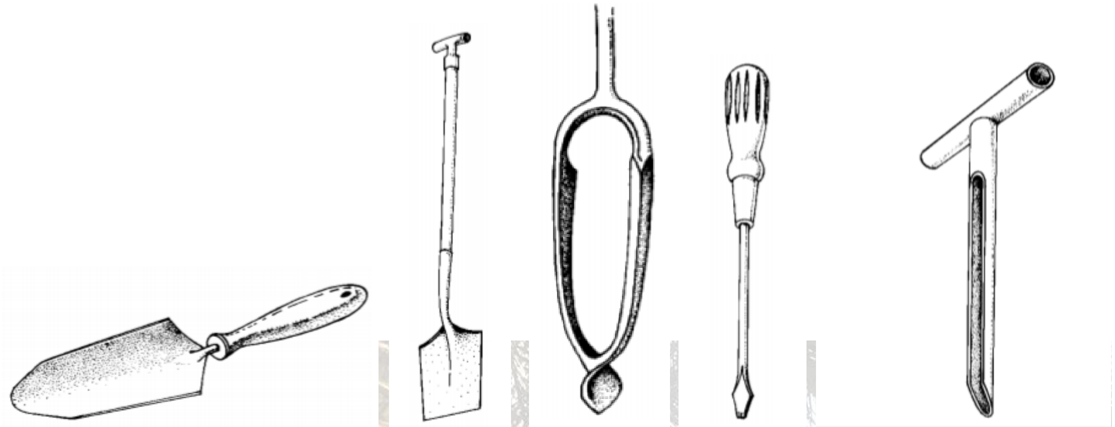
5- إجهاد التربة .

6- نوع التربة .

7- درجة الحرارة والتغييرات الموسمية .

أولاً : أدوات جمع العينات

يجب أن تشتمل أدوات جمع العينات بصورة أساسية على فأس وجاروف وأسطوانة أخذ العينات من التربة (أوكر) وأكياس بلاستيك وقلم للكتابة على البلاستيك ومقص تقليم ومن الضروري وجود صندوق مبرد لحفظ العينات ويفضل أيضاً وجود كاميرا لتصوير الأعراض في مكان ظهورها .



ثانياً : أخذ العينات

تؤخذ عينات التربة للفحص النيماتودي عندما تكون رطوبة الحقل بالدرجة التي تسمح بإنبات البذور ، ولا تصلح الأرض الجافة أو الغدقة لأخذ عينات منها للفحص النيماتودي . كما لا تؤخذ العينات من أطراف الحقل أو الأحواض ولا من المناطق الموبوءة بالحشائش أو المتاخمة لطرق السيارات ، إذ إن إعتلال صحة النباتات بهذه المناطق يعود في الغالب إلى أسباب غير طفيلية . ولا تؤخذ كذلك من تحت النباتات الميتة أو حولها أو من وسط البقع المصابة ، ولكن تؤخذ من تحت وحول النباتات الضعيفة أو المريضة ، ويفضل أن تكون من عند حواف البقع المصابة . ولا ننسى أن نأخذ عينات أخرى من تحت وحول النباتات السليمة للمقارنة والمساعدة في تأكيد التشخيص المرضي . ولا بد من أن تؤخذ العينات في الوقت المناسب ، وهو الوقت الذي تكون فيه النيماتودا في أوج نشاطها ، فقياساً على أجوائنا العربية عموماً نجد أن نيماتودا حوصلات الحبوب في أوائل فصل الشتاء .

هذا وتختلف طريقة أخذ العينات للفحص النيماتودي من التربة حسب نوع الأرض ، والمحصول المنزرع والأعراض المرضية الظاهرية كما يلي :

1- إذا كان الحقل غير مزروع أو مزروع بمسطح أخضر أو بمحاصيل عشبية في أحواض ، فيقسم إلى أقسام كل منها يساوي 2 هكتار تقريباً ويؤخذ من كل قسم عدد من العينات يتناسب مع المساحة المراد دراستها كما هو موضح بالجدول الآتي :

جدول رقم (2) عدد العينات الواجب جمعها من مساحات مختلفة

المساحة (م2)	عدد العينات
100	6 – 4
300	9 – 7

12 – 10	500
27 – 20	400
30 – 28	5000
50 – 45	10000

تؤخذ العينات بطريقة السير المتعرج (الزكزاك) داخل القسم المعين من الأرض ، ويستخدم لذلك إسطوانة أخذ العينات وعادة ما نتخلص من الجزء العلوي للعينة (5 سم العليا من الإسطوانة) لإحتوائه على بعض الحشائش والمواد الدبالية المتساقطة على سطح التربة . وفي النهاية تخلط العينات مع بعضها ، ويؤخذ منها عينة واحدة لتمثل القسم ككل وتسمى بالعينة المركبة . أما إذا لم يتوفر لدينا أسطوانة أخذ العينات فإننا نستطيع أن نستخدم الجاروف والفأس الصغير حيث نكشط الطبقة السطحية من التربة بعمق 5 سم لخلوها تقريباً من النيماتودا ، ونأخذ العينة العينة من عمق 15-20 سم بالإستعانة بالفأس والجاروف ثم نضعها في كيس بلاستيكي وندون عليها جميع المعلومات اللازمة ويجب ملاحظة ألا يقل وزن العينة عن نصف كيلو جرام .

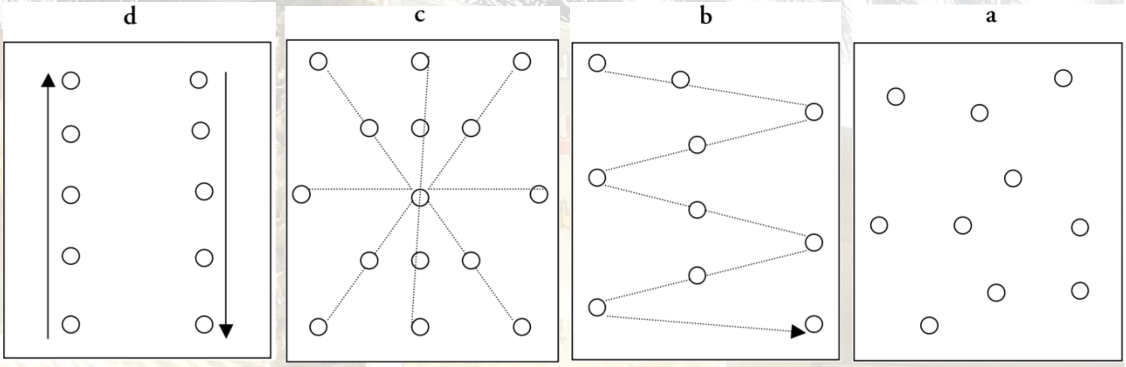
وعموماً يجب الوضع في الإعتبار أن العمق المناسب دائماً لأخذ عينات التربة هو عمق الجذور في حالة النباتات العشبية والحولية ، وعمق الجذور المغذية (الرفيعة) في حالة الشجيرات والأشجار ويفضل دائماً أخذ جزء من الجذور من عينة التربة أو إزالة التربة من حول الجذر برفق وأخذ الجذر بأكمله من التربة وذلك في حالة النباتات الحولية .

2- إذا كانت الأرض مزروعة بمحاصيل عشبية (حولية) في خطوط فإن العينات تؤخذ من بطن الخط حيث تزرع النباتات عادة وعلى بعد 5-10 سم من ساق النبات وبعمق الجذور ، وبنفس الكيفية السابقة .

3- إذا كانت الأرض المراد جمع العينات منها مزروعة بالأشجار والشجيرات فتتبع كل الشروط السابق ذكرها من حيث رطوبة التربة وخلافه مع مراعاة أن تكون الأشجار والشجيرات في حالة نمو ، وتؤخذ العينات من على مماس محيط دائرة نصف قطرها حوالي نصف متر من جذع الشجرة أو الشجيرة (أو من مماس محيط دائرة تعادل دائرة النمو الخضري للشجرة) ، مع الأخذ في الإعتبار أن العمق المحدد هنا هو عمق الجذور المغذية (الرفيعة) ، وأن السير بين الأشجار يكون أيضاً بطريقة السير المتعرج (الزكزاك) . ويجب الإنتباه إلى عدم الخلط بين جذور الأشجار وجذور الحشائش التي قد تكون موجودة حولها ، ففي حالة أشجار الموالح مثلاً يمكن ملاحظة رائحة الجذور الرفيعة والتي تشبه إلى حد كبير رائحة الأوراق .

4- عند جمع عينات من شجرة واحدة مصابة ، نقوم بعمل دائرتين متداخلتين حول جذع الشجرة بحيث يكون نصف قطر الداخلية منهما حوالي نصف المتر (من الجذع) ، والخارجية حوالي المتر ، ثم نأخذ العينات من عمق الجذور المغذية وبطريقة السير المتعرج حول الشجرة فنأخذ عينة من الدائرة الخارجية ثم عينة من الدائرة الداخلية وهكذا دواليك حول الشجرة . وفي النهاية تخلط العينات مع بعضها خلطاً جيداً ، ويؤخذ منها عينة واحدة مركبة تمثل الشجرة ككل .

5- إذا كانت العينة المراد فحصها من الجذور فتؤخذ مع التربة وتدمج معها في نفس الكيس لأن التربة تساعد على بقاء الجذور فترة أطول . وتكون حوالي 25-100 غم إعتماداً على نوع المحصول .



أشكال أخذ العينات من الحقل

توضع العينات في صناديق مبردة لعدم تعريضها لضوء الشمس المباشر أو لدرجات الحرارة العالية ، وإذا لم تستخلص النيماتودا منها مباشرة فإنها تحفظ في الثلاجة العادية على درجة حرارة 5-8 مْ لمدة لا تتجاوز الأسبوع . وتثبت عليها المعلومات التالية :

1- إسم المحصول والصنف

2- تأريخ أخذ العينة

3- الموقع (الإحداثيات)

4- المحصول السابق

5- عدد الألواح .

طرق إستخلاص النيماتودا من التربة والنبات :

أولاً : طرق إستخلاص النيماتودا من التربة :

هنالك طرق متعددة لإستخلاص النيماتودا من التربة تعتمد على إختلاف الظروف ونوع العينة ونوع النيماتودا وفق الجدول التالي :

الطريقة	عينة التربة		عينة الجذور والأوراق	
	المتنقلة	الثابتة	المتنقلة	الثابتة
طبق بيرمان	×		×	
المناخل	×	×		
النقع			×	×
الحضن			×	×

تحضير العينات :

تخلط التربة الجافة خلطاً جيداً وتزال كتل الأحجار والجذور عن طريق مناخل خشنة (1-2) ملم وتوزن 100 غم تربة .

1- طريقة طبق بيرمان :

وتسمى أيضاً بقمع بيرمان أو طبق وايت ، تصلح هذه الطريقة لإستخلاص النيماتودا النشطة من عينات التربة أساساً ، وكذلك من أجزاء الجذور التي تحتوي على بيض ويرقات نيماتودا تعقد الجذور وبعض أنواع نيماتودا الحوصلات ، وأيضاً النيماتودا الداخلية المتحركة من عينات الجذور .

المميزات :

1- لا تتطلب معدات خاصة وصعبة .

2- عملها بسيط .

3- تستخدم لإستخلاص أصناف واسعة من النيماتودا المتحركة .

المساويء :

1- لا تستخلص النيماتودا الكبيرة والبطيئة الحركة .

2- يكون الإستخلاص رديء إذا كان المحتوى الطيني للتربة عالي .

3- تستغرق فترة الإستخلاص 3-4 أيام .

الأدوات :

1- طبق عادي (بلاستيكي أو معدني من الحديد الذي لا يصدأ) ذو حافة مرتفعة قائمة .

2- طبق أو وعاء آخر مماثل ولكن أقل من السابق في القطر ، وله أربع أرجل بإرتفاع 2-5 ملم ، وذو قاع مثقب (يمكن إستخدام شبك من السلك يجهز على هيئة الطبق أو الوعاء المطلوب) على أن يكون قطر الثقوب سواء في الطبق أو الشبك حوالي 0.5 – 1 ملم .

3- مناديل ورقية غير معطرة أو شاش .

4- كأس زجاجي أو بلاستيكي .

5- ماصة زجاجية أو بلاستيكية .

طريقة العمل :

1- أخلط عينة التربة خلطاً جيداً ، وخذ منها وزناً أو حجماً معلوماً مناسباً وليكن 100-250 غم أو سم 3 .

2- بطن الطبق المثقب أو المشبك (أيهما توفر لديك) بواسطة قطعة من الشاش أو المناديل الورقية ، ثم ضع كمية التربة الموزونة فوقه .

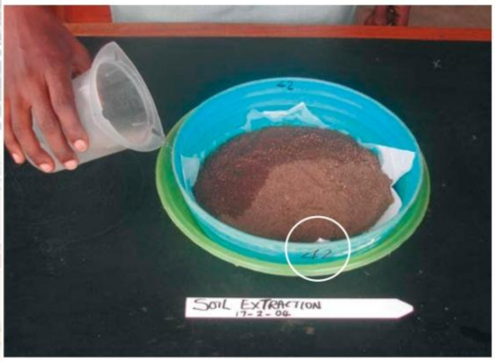
3- ضع الطبق أو الشبك بما يحتويه من تربة داخل الطبق العادي (الأكبر قطراً بقليل) ، وإذا كان الطبق المثقب أو الشبك ليس له أرجل فيمكنك أن تلحم به قطعتين من السلك المعدني (قطر 2-5 ملم) أو تضعهما تحته داخل الطبق العادي ليرتكز عليهما ، وهذا الإجراء ضروري جداً للحفاظ على قدر مناسب من التهوية بالجهاز .

4- أضف قدراً مناسباً من الماء إلى الطبق السفلي ببطء حتى يغمر الماء (بالكاد) سطح التربة ولا تزد عن ذلك ، وحافظ دائماً على هذا المستوى من الماء بإضافة ماء جديد بدلاً من الماء المتبخر .

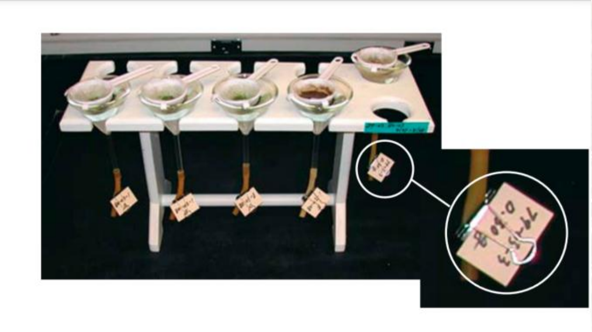
5- أحفظ الجهاز على درجة حرارة الغرفة (21-24) مْ وعظه بغطاء غير محكم من ورق القصدير أو بلاستيك لتقليل التبخر ، وراقبه يومياً لإضافة الماء كلما لزم الأمر (مع ملاحظة إن إضافة الماء تتم إلى الطبق السفلي فقط) .

6- يجمع الماء من الطبق السفلي والذي يحتوي على النيماتودا بعد ثلاثة أيام بواسطة تيار خفيف من الماء إلى كأس ، ويضاف ماء جديد وتكرر هذه العملية كل (2-3) أيام ولمدة أسبوعين حتى يمكن جمع أكبر قدر من النيماتودا بالعينة .

7- يقلب الماء المتجمع من الأطباق جيداً وذلك بنفخ الهواء خلاله بواسطة ماصة ، ثم يؤخذ منه 1 مل ويوضع في طبق زجاجي صغير أو شريحة العد النيماتودي ويفحص تحت المجهر .



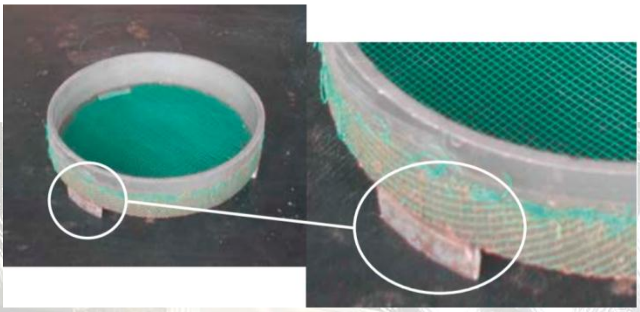
طريقة طبق بيرمان



نماذج مختلفة لأطباق بيرمان

إستخلاص النيماتودا من الجذور بطريقة طبق بيرمان

بالإمكان صناعة طبق بيرمان يدوياً وبشكل بسيط من خلال جلب مشبك بلاستيكي ووضعه على إطار من البلاستيك أو الألمنيوم بحيث يصبح أشبه بالمنخل لكن مع مراعاة رفعه بواسطة ثلاثة أو أربعة أقدام لضمان إنتقال النيماتودا من العينة إلى الطبق السفلي بواسطة الماء كما في الصورة أدناه .



2- طريقة الصب والمناخل :

تعتمد هذه الطريقة على إختلاف الوزن النوعي لكل من النيماتودا ومكونات التربة وهي تتطلب خبرة نوعاً ما ومناخل غالية الثمن قليلاً ، ولكنها من الطرق الشائعة خاصة عندما تجمع معها طريقة أطباق بيرمان لتنقية المعلق غير النظيف الناتج منها .

الأدوات :

1- عدد من السطول البلاستيكية أو المعدنية .

2- ثلاثة مناخل بقطر 20 سم وسعة ثقوبها 20 ، 100، 400 ثقب / البوصة الطولية .

3- كؤوس زجاجية أو بلاستيكية .

4- قارورة غسيل .

5- ملعقة معدنية أو أداة تقليب .

6- ماصة زجاجية .

طريقة العمل :

1- أخلط عينة التربة جيداً وخذ منها وزناً أو حجماً معلوماً مناسباً وليكن 100-250 غم أو سم3 .

2- ضع العينة في سطل وصب عليها كمية كافية من الماء حتى يصل الحجم النهائي إلى ثلاثة أرباع الإناء ، ثم قلب تقليباً جيداً حتى تتفتت كتل التربة المتماسكة ويصبح الماء والتربة في السطل عبارة عن معلق متجانس ثم أترك العينة لمدة 10-20 ثانية حتى ترسب حبيبات التربة الثقيلة .

3- مرر المعلق عدا حبيبات التربة الراسبة من خلال المنخل 20 ثقب / بوصة إلى سطل آخر نظيف ، ثم أغسل المحتويات فوق المنخل بتيار خفيف من الماء قبل أن ترفعه من فوق السطل وبعد ذلك أغسل المنخل بتيار من الماء من الخلف وأعده لمكانه .

4- قلب محتويات السطل السابق جيداً وأتركها لتترسب لمدة 30 ثانية وأثناء ذلك ضع المنخل سعة 100 ثقب / بوصة فوق المنخل 400 ثقب / بوصة ، وأمسك بهما بإحدى يديك جاعلاً الإصبع الوسطى أو السبابة لهذه اليد بينهما بحيث يميل المنخل العلوي على السفلي بزاوية حادة قدرها 35-40 درجة . ثم مرر المعلق باليد الأخرى عدا الراسب – بعد إنقضاء 30 ثانية بالضبط في المنخل العلوي (100 ثقب / بوصة) .

5- بينما لا تزال المناخل في وضعها السابق تماماً ، إغسل محتويات المنخل سعة 100 ثقب بواسطة تيار خفيف من الماء ، ثم أنقل هذه المحتويات نقلاً كمياً إلى كأس بواسطة تيار خفيف من الماء يسلط من خلف المنخل هذه المرة بإستخدام قارورة غسيل للبحث فيها عن حوصلات نيماتودا التحوصل إن وجدت .

6- إغسل محتويات المنخل 400 ثقب بتيار خفيف من الماء مع التحريك المستمر لمحتوياته بأنامل أصابعك حتى يصبح الماء المار من المنخل رائقاً ، حيث يعني ذلك أن حبيبات التربة التي مازالت على المنخل صغيرة الحجم بالدرجة التي لن تسمح لها بالمرور من ثقوبه ، وكن حريصاً جداً ورفيقاً في تعاملك مع شبكة المنخل في هذه الخطوة كي لا تمزقها وخاصة أن هذا المنخل أعلى سعراً من سابقيه .

7- أنقل المحتويات المتجمعة فوق المنخل 400 ثقب في الخطوة السابقة مع قليل من الماء نقلاً كمياً إلى كأس نظيفة بواسطة تيار خفيف من الماء يسلط من خلف المنخل تماماً كما فعلت في الخطوة رقم 5 .

8- إذا كانت المحتويات التي جمعتها في الخطوة السابقة رائقة فيمكنك أن تقلبها جيداً وتأخذ منها 1 مل للفحص أما إذا كانت غير رائقة (وهذا هو المتوقع في أغلب الأحوال) فيمكنك تنقيتها بإستخدام طريقة طبق بيرمان السابق وصفها مع مراعاة أنك ستضع محتويات الكأس في الطبق المبطن بالمناديل الورقية أو الشاش وستسمر في باقي العمل كما سبق تماماً وفي هذه الحالة تكون قد إستخدمت طريقة الجمع بين أطباق بيرمان والمناخل .

ثانياً : طرق إستخلاص النيماتودا من الأنسجة النباتية :

هنالك عدة طرق لإستخلاص النيماتودا من الأنسجة النباتية المصابة بها ولكننا سنقتصر على أبسطها :

1- طريقة تمزيق الأنسجة :

تفيد هذه الطريقة في الكشف عن جميع أنواع النيماتودا التي تتطفل داخل الأنسجة النباتية وفيها تمزق الأجزاء النباتية المصابة إلى قطع صغيرة جداً بواسطة أبرة ومشرط تشريح حاد أو أبرتي تشريح حادتين في طبق زجاجي صغير مع قليل من الماء ، ثم تفحص تحت مجهر التشريح (مجهر بسيط) ويفضل إجراء التمزيق أثناء الفحص تحت المجهر .

2- طريقة النقع :

تقطع الأجزاء النباتية المصابة كالجذور مثلاً بعد غسلها بالماء الجاري إلى قطع صغيرة بطول 1-2 سم وتوضع في طبق بتري مزود بورق ترشيح مبلل بالماء ثم يضاف قليل من الماء يكفي لتشبع جو الطبق بالرطوبة دون غمرها ، وتحفظ على درجة حرارة مناسبة لنشاط النيماتودا (30مْ) لمدة 24 ساعة . وبعد ذلك تزال كمية الماء المحتوية على النيماتودا بواسطة تيار خفيف من الماء بإستعمال زجاجة الغسيل إلى كأس وتضاف كمية جديدة من الماء إلى الطبق كما سبق ، وتترك لمدة 24 ساعة أخرى وهكذا ، وفي النهاية يؤخذ مل واحد من الماء المتجمع في الكأس للفحص . وتعتبر هذه الطريقة من أنسب الطرق لإستخلاص نيماتودا السوق والأبصال والنيماتودا الحافرة ونيماتودا التقرح .

3- طريقة التحضين :

توضع الأجزاء النباتية بعد غسلها بالماء الجاري وتقطيعها إلى قطع صغيرة في دوارق زجاجية نظيفة ، ويضاف إليها قليل من الماء يكفي لتغطيتها أو قليل من محلول مضاد حيوي إذا كان يخشى عليها من التحلل أو التعفن بفعل الكائنات الحية الدقيقة (يمكن إستخدام محلول من مادة الأريتان 10 ملغم / لتر ماء أو محلول من كبريتات الإستربتومايسين 50 ملغم / لتر ماء) .

توضع الدوارق بعد ذلك في مكان دافيء (30) مْ لمدة ثلاثة أيام لتنشط خلالها النيماتودا ، وتتحرك خارجة إلى الماء أو المحلول ، وعندئذ تنقل محتويات الدوارق نقلاً كمياً إلى كأس مع غسل الدوارق بالماء وإستقبال ماء الغسيل أيضاً في كأس التجميع وتمرر محتويات كأس التجميع من خلال منخلين متراكبين عدد ثقوب العلوي منهما 100 والسفلي 400 ثقب / بوصة ثم تنقل محتويات المنخل 400 ثقب /

بوصة إلى كأس نظيف بواسطة تيار خفيف من الماء يسلط من خلف المنخل بإستخدام قارورة غسيل ومن ثم تفحص مجهرياً .

الفحص المباشر للأنسجة النباتية :

بالإمكان فحص النيماتودا مباشرة تحت المجهر وتشخيصها وذلك بالخطوات التالية :

1- إغسل النسيج النباتي تحت ماء جارٍ بلطف أو وضع النسيج في ماء مغلي لدقائق معدودة وذلك لإزالة التربة والكتل الأخرى .

2- إقطع النسيج النباتي إلى قطع بحجم 2 سم .

3- ضع النسيج داخل طبق بتري مفتوح يحتوي على ماء .

4- إفتح أو مزق النسيج بإبرة وملقط لخروج النيماتودا من النسيج هذا إذا كانت النيماتودا ثابتة ومتطفلة داخلياً أما إذا كانت النيماتودا متحركة فيترك الطبق ليلة كاملة أو أكثر .

5- تفحص النيماتودا بعد ذلك تحت المجهر .

طرق أخرى للإستخلاص :

أ- طريقة جهاز الطرد المركزي Centrifugation Technique :

1- بعد التأكد من سلامة إجراءات أخذ العينة وطريقة الحفظ يتم خلط العينة خلطاً جيداً .

2- يؤخذ حوالي 50 سم3 من التربة .

3- يحضر دورق يوضع عليه مصفاة صغيرة .

4- توضع عينة التربة في المصفاة وتغسل بالماء .

5- تترك العينة لمدة 30 ثانية حتى تترسب حبيبات التربة الكبيرة .

6- تصفى محتويات الدورق في مصفاة ذات ثقوب 325 بوصة .

7- توضع العينة في أنبوبة جهاز الطرد المركزي ويشغل الجهاز لمدة 4 دقائق على سرعة 3600 دورة في الدقيقة .

8- يتم إستخراج العينة من الجهاز ويتم التخلص من الجزء العلوي من العينة بمنتهى الدقة .

9- يتم الإحتفاظ بالتربة الراكدة في قاع الأنبوبة .

10- يضاف محلول سكري (بتركيز 500 غرام سكر لكل لتر ماء) إلى أنبوبة الطرد المركزي التي تحتوي على التربة .

11- ترج الأنبوبة جيداً لخلط المحلول السكري مع التربة .

12- توضع في الجهاز لمدة 4 دقائق وبـ 3600 دورة في الدقيقة وتعاد الخطوة لجميع عينات النيماتودا .

13- تستخرج العينة من الجهاز وسوف نشاهد طبقتين هما طبقة الماء العلوية وهي التي تحتوي على النيماتودا عالقة في المحلول السكري وطبقة التربة .

14- يتم إضافة محتوى الأنبوبة في منخل النيماتودا الضيق 5000 ثقب في البوصة الطولية .

15- تغسل العينة وتضاف إلى طبق بتري لفحصها مجهرياً .

ب- طريقة الخلاط الكهربائي :

ملاحظة : تستخدم هذه الطريقة لعينة الجذور فقط

1- يتم الإكتفاء بحوالي 2 غرام من كل عينة ويفضل الجذور الرقيقة الرفيعة .

2- توزن العينة ويجلب طبق بلاستيكي عميق وسلك مشبك .

3- يوضع السلك داخل الطبق .

4- توضع ورقة كلينكس على المشبك والطبق .

5- يضاف ماء إلى الكلينكس .

6- توضع العينة في خلاط المنزل ويضاف إليها ثلث من حجم زجاجة الخلاط بالماء ويتم تشغيل الخلاط لمدة 2 دقيقة .

7- تصب العينة في المنخل المعد ويغسل الخلاط جيداً للتخلص من بقايا الجذور .

8- يغسل المنخل وتجمع العينة في أحد أركانه .

9- تضاف محتويات المنخل في الطبق الذي تم إعداده مسبقاً .

10- يتم إغلاق ورقة الكلينكس على العينة وتترك لمدة 24 – 48 ساعة في المختبر بعدها يتم التخلص من ورقة الكلينكس وعليها الجذور وتصب محتويات الطبق في المنخل ثم إلى طبق بتري وتفحص مجهرياً .

ملاحظات عامة :

1- تكون النيماتودا صعبة التصبيغ والمعاملة لكونها تتواجد في وسط سائل .

2- إن إستخدام مجهر التشريح أفضل بكثير من المجهر المركب في الفحص .

3- في حالة حساب أعداد النيماتودا توضع قطرات صابون في العينة لمنع طفوها على السطح .

قتل النيماتودا :

أفضل درجة حرارة لقتل النيماتودا هي 55 – 65 مْ أما إذا إرتفعت الحرارة أكثر فإن محتويات جسمها تتحل وتتشوه مما يؤدي إلى صعوبة تشخيصها وبعد قتل النيماتودا يمكن تصبيغها بصبغات خاصة وبالإمكان أيضاً قتلها وتصبيغها بنفس الوقت . ويضاف الماء الساخن بحجم مساوي لحجم العينة في الأنبوب أو وضع الأنبوب الذي يحوي العينة في ماء مغلي لمدة 1-2 دقيقة مع التأكد عدم إنقلاب العينة داخل الماء .

قتل وتصبيغ النيماتودا في وقت واحد :

ضع إحدى الصبغات المذكورة لاحقاً في كأس وسخنها إلى حد الغليان أو أغمر الكأس الحاوي على الصبغة بالماء المغلي ثم ضع حجم متساوي من الصبغة الحارة والعينة في أنبوب مثلاً 2مل صبغة + 2مل عينة أو ضع النيماتودا على شريحة زجاجية وأضف إليها 2-3 مل من الصبغة الحارة .

حفظ النيماتودا :

تحفظ العينات بوضع قطرات قليلة من الفورمالديهايد (الفورمالين) على العينة بعد قتلها بالحرارة (2-3 قطرات فورمالين لكل 7 مل من العينة) . وفيما يلي جدول بالصبغات المستخدمة في حفظ النيماتودا :

إسم الصبغة	المواد المكونة لها	الكمية	الملاحظات
TAF	Triethanolamine	2 مل	من مزايا هذه الصبغة هو بقاءها لفترة طويلة دون أن تجف العينة
	فورمالين 40%	7 مل	
	ماء مقطر	91 مل	

4:1 FA	فورمالين 40%	10 مل	تحافظ هذه الصبغة على تركيب النيماتودا بالرغم من إنها تفقد لونها بمرور الوقت
	حامض البروبونك Glacial acetic acid	1 مل	
	ماء مقطر	89 مل	
كليسيرول فورمالين	فورمالين 40%	10 مل	تفضل هذه الصبغة في حفظ النيماتودا من الجفاف حتى وإن خزنت العينة بصورة خاطئة .
	كليسيرول	1 مل	
	ماء مقطر	89 مل	

أما إذا كانت النيماتودا مستقرة في أنسجة الجذور أو الدرنات فتوضع عينة صغيرة من النسيج النباتي المصاب داخل وعاء زجاجي يحتوي على اللاكتوفينول أو اللاكتوغليسيرول . يمكن شراء اللاكتوفينول بصورة جاهزة أو يصنع بخلط أحجام متساوية من الكليسيرول وحامض اللاكتيك والماء المقطر (لاكتوغليسيرول) مع إذابة كمية قليلة من الفينول في المحلول (1%) .[5]

التصبيغ :

تكون النيماتودا المستقرة في الأنسجة النباتية أسهل في التصبيغ من النيماتودا الحرة وعند التصبيغ فإن الأنسجة النباتية لا تتصبغ النيماتودا هي التي تتصبغ فقط . تتكون صبغة النيماتودا من (لاكتوكليسيرول + 0.1 % من الصبغة الزرقاء أو 0.1 – 0.05 % حامض الفوشين) ثم توضع في دورق يحوي على محلول متساوي من الغليسيرول والماء المقطر + بضع قطرات من حامض اللبنيك (اللاكتيك أسيد) وذلك لإزالة اللون . وقبل البدء بعملية التصبيغ يتم القيام بالخطوات التالية :

1- غسل الأجزاء النباتية بلطف وتجفف عن طريق ضربها بمنديل ورقي .

2- تقطع الجذور السميكة أو الكبيرة والدرنات إلى قطع صغيرة وضع القطع في قطعة من الشاش وأربطها جيداً بشكل صرة .

3- ضع محلول الصبغة في كأس وسخنه لحد الغليان .

4- ضع أكياس الشاش داخل الصبغة المغلية وأتركها لمدة 3 دقائق إعتماداً على سمك الجذر .

---

[5] الفينول مادة سامة جداً لذلك يفضل إستخدام اللاكتوكليسيرول فقط بالرغم من عدم إحتفاظه بالعينة لفترة طويلة.

5- أخرج الأكياس وأشطفها بماء جاري .

6- ضع الأكياس في القاصر (محلول ترويق) وأتركها ليلة كاملة .

7- ضع الجذور جنباً إلى جنب على شريحة زجاجية وأضغط عليها برفق بإستخدام شريحة أخرى وشاهد تحت المجهر سوف ترى إن النيماتودا إصطبغت بالأحمر (الفوشين) أو بالأزرق (الصبغة الزرقاء) .

فحص ومشاهدة كتل بيض نيماتودا تعقد الجذور :

تصبغ الصبغة Phloxine B الكتلة الهلامية التي تحيط بالبيض فيزداد وضوحاً وبالإمكان حسابه وتتكون هذه الصبغة من 15 مل (قطرات صغيرة جداً) من الصبغة المذكورة + لتر من الماء ، حيث توضع الجذور المغسولة في صينية أو طبق (يفضل أبيض) حاوي على الصبغة وتترك الجذور لمدة 15-20 دقيقة ومن ثم إحسب كتل البيض (الوردية – الحمراء) .

الفصل الثامن

الأدغال

عبارة عن نباتات عشبية تنمو بصورة طبيعية دون تدخل الإنسان وتنافس المحاصيل الأقتصادية على متطلبات النمو المهمة (ماء، عناصر غذائية، ضوء، مكان......الخ) بحيث تسبب أضرار اقتصادية كبيرة لها .

إعداد عينات الأدغال للحفظ في المختبر :

1- الجمع :

يجب أن تكون العينة النباتية المختارة كاملة ما أمكن، حيث يجب أن تحتوي على المجموع الجذري ويحتوي المجموع الخضري على الأوراق والأزهار وعند جمع العينات يستعان ببعض الأدوات الخاصة بالحفر، فتستخرج العينة ثم توضع بأكياس للحفاظ على رطوبتها لحين الانتهاء من جمع كل العينات .

2- التجفيف والكبس :

يستحسن تجفيف العينة فور جمعها وتفرد على أوراق صحف أو ورق نشاف وترتب الأوراق

والأزهار بحيث يمكن التعرف على كل جوانبها عند الدراسة ثم ترص العينات بعناية داخل جهاز ضاغط لضغط العينات أو توضع داخل كتاب.

3- التحميل :

بعد جفاف العينة يتم لصقها على ورق مقوى حسب المقاس وتلصق بغراء ويوضع عليها ورق جرائد ثم يوضع عليها ثقل حتى تتم عملية اللصق وجفاف الغراء .

4- بطاقة البيانات :

توجد في الركن الأيمن السفلي لورقة التحميل بطاقة يكتب عليها تصنيف العينة في المملكة النباتية (الشعبة، القسم، الرتبة الفصيلة، الجنس والنوع) كما يكتب عليها المنطقة التي جمعت منها العينة وتاريخ ومكان الجمع.

5- الحفظ والتخزين :

بعد إتمام كل العمليات السالفة الذكر تصبح العينة معدة للتبويب ، حيث توضع العينات النباتية ضمن فصائلها ثم أجناسها وأنواعها وترتب تبعاً للفلورا ، ثم توضع في دواليب خاصة حيت يتم نقلها بعناية حتى لا تتهشم وتتكسر .

المكونات الفعالة في النباتات :

تعد الكثير من نباتات الأدغال نباتات طبية وذلك لإحتوائها على مجموعة من المواد التي يعزى إليها التأثير الطبي أو الفسيولوجي والذي بوجوده يعتبر النبات نبات طبي . وقد قسمت محتويات النبات على أساس فاعليتها إلى قسمين رئيسين هما :

أولا : المكونات غير الفعالة Inert Constituents :

وهي المواد التي ليس لها تأثير طبي أو فسيولوجي مثل السليلوز واللجنين والسوبرين ومعظم مكونات خلايا النبات .

ثانياً : المكونات الفعالة Active Constituents :

وهي المواد التي يعزى إليها التأثير الطبي أو الفسيولوجي للنبات ولها قيمتها الدوائية . وقد قسمت المواد الفعالة على أساس صفاتها الكيميائية أو الطبيعية إلى مجموعات كل مجموعة تتشابه في معظم هذه الصفات ومجموعات المواد الفعالة هي :

1- الزيوت الطيارة Volatile Oils

2- الجليكوسيدات Glycosides

3- الصابونيات Saponins

4- التانينات Tannins

5- القلويدات Alkaloids

6- الشحميات Lipids

7- الكربوهيدرات Carbohydrates

8- الراتنجات Resins and Resin Combinations

9- الستيرولات Sterols

طريقة إستخلاص المركبات من النبات :

جمع عينات النبات

تجمع أوراق النبات المراد إستخلاص المركبات منه و تجفف في ظروف المختبر ،ثم تطحن للحصول على مسحوق ناعم ويحفظ المسحوق في أكياس نايلون في الثلاجة لحين.

ملاحظة : عند جلب العينة النباتية للمختبر توضع في ماء دافيء وبعدها يجفف النبات ويؤخذ الوزن الجاف له ثم يطحن بهاون خزفي أو عقيق ثم تنخل الأجزاء المطحونة بمنخل بلاستيك بعدها تجرى عمليات الإستخلاص على المادة .

تحضير المستخلصات المائية :

1- مستخلص الماء البارد :

لتحضير مستخلص الماء البارد لأي نبات وذلك حسب طريقة المنصور(1995). المحورة عن Harborne (1973). مع أجراء بعض التحوير بزيادة مدة الاستخلاص الى 24ساعة، حيث اخذ 10غم من المسحوق الناعم للأوراق المجففة ووضعت في دورق سعة (500) مل يحتوي على (200) مل ماء مقطر ثم جرى خلط المحتويات بواسطة الرجاج المغناطيسي Magnatic stirrer لمدة 10دقائق بعدها ترك المزيج لمدة 24ساعة بعد تغطيته ،ثم رشح المحلول بوساطة طبقتين من قماش التول ثم ورق الترشيح .أهمل الراسب واخذ الراشح ووضع في جهاز الطرد المركزي وبسرعة 3000دورة/دقيقة ولمدة 15دقيقة للحصول على محلول رائق ،ثم وضع المحلول في الفرن الكهربائي على درجة حرارة 45 مْ لتبخير الماء والحصول على المادة الخام الجافة.اخذ 2غم من المادة الخام الجافة وأذيبت في 100مل/ماء مقطر وبذا اصبح تركيز المحلول الناتج 2 % أو ما يعادل 20ملغم/مل ومنه حضرت التراكيز (10,5,2.5) ملغم/مل التي عوملت بها الحشرة فضلا عن الماء المقطر الذي يمثل معاملة السيطرة وهو تركيز(0) .

2- مستخلص الماء الحار :

أ- الطريقة الأولى :

يحضر مستخلص الماء المغلي بنفس خطوات الاستخلاص السابقة ولكن يستبدل الماء المقطر البارد بماء مغلي.

ب- الطريقة الثانية :

تم تحضير المستخلص المائي الحار بالطريقة التالية تؤخذ عينة من النبات بوزن 250 غم وخلطها بـ 250 مل ماء مقطر معقم مغلي، وتترك لمدة 10 دقائق ، ثم يمزج الخليط بالخلاط الكهربائي لمدة 3 دقائق ويرشح المزيج بوساطة قطعة قماش الململ وبعدة طيات ويجمع الراشح بقنينة زجاجية (الحيدر،1996).

3- 4 تحضير مستخلص المذيبات العضوية

يحضر مستخلص المذيبات العضوية لأي نبات حسب طريقة Ladd وجماعته (1978) ، حيث تم اختيار ثلاثة مذيبات عضوية مختلفة القطبية وهي (الكحول الاثيلي كمذيب قطبي ، وخلات الاثيل كمذيب متوسط القطبية والهكسان كمذيب لاقطبي) (Harborne، 1984) .

تؤخذ 10غرام من مسحوق اوراق النبات، وتوضع في جهاز الاستخلاص (السكسوليت)، ثم تسكب 200 مل من الكحول الاثيلي ويستمر استخلاص العينة النباتية لمدة 24 ساعة . يؤخذ الراشح ويركز بالمبخر الدوار بدرجة حرارة 45-40 مْ ثم تجفف العينة بالفرن الكهربائي بدرجة حرارة 45-40 مْ ، وتكرر العملية نفسها بالنسبة لمذيبي خلات الاثيل والهكسان كلاً على حدة وللعينة نفسها . ولغرض اختبار تأثير مستخلص المادة الجافة الناتجة من الاستخلاص بالمذيبات العضوية ، اتبعت طريقة الربيعي(1999) وذلك باخذ 2 غرام من المادة الجافة المستخلصة بالكحول الاثيلي وأذيب في 3 مل من الكحول الاثيلي وأكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر، فأصبح تركيز المحلول الأساس Stock Solution 2 % أو ما يعادل 20 ملغم / مل ، ومنة تم تحضير التراكيز 2.5 و5 و10 ملغم / مل أما معاملة السيطرة فكانت 3 مل من كحول الاثيلي وأكمل الحجم إلى 100مل بالماء المقطر. أما العينة المستخلصة بخلات الاثيل، تم اخذ 2 غرام من المادة المستخلصة بهذا المذيب وأذيب في 1.5مل خلات الاثيل مع 1.5مل كحول اثيلي لإذابة العينة النباتية التي استخلصت بمذيب خلات الأثيل ثم أكمل الحجم إلى 100مل بالماء المقطر فاصبح تركيز المحلول الاساس2% او ما يعادل 20 ملغم /مل ومنة تم تحضير التراكيز السابقة، أما معاملات السيطرة تمت بأخذ 1.5 مل خلات الاثيل مزج مع 1.5مل كحول الاثيلي وأكمل الحجم إلى 100مل بالماء المقطر. اخذ أيضاً 2غم من المادة الجافة المستخلصة بمذيب الهكسان وأذيب في 1.5مل هكسان مع 1.5مل كحول اثيلي وأكمل الحجم إلى 100مل بالماء المقطر، ، فأصبح تركيز المحلول الأساس Stock Solution 2 % أو ما يعادل 20 ملغم / مل ومنه تم تحضير التراكيز السابقة نفسها . أما معاملة السيطرة فكانت 1.5مل كحول اثيلي مزجت مع1.5 مل هكسان وأكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر .

طريقة إستخلاص الزيوت الطيارة بطريقة التقطير بالبخار :

في هذه الطريقة توضع النباتات المراد تقطيرها في أوعية شبكية بطريقة تسمح لبخار الماء أن يتخللها ويستخلص منها الزيوت الطيارة فيحملها إلى أنابيب التكثيف فتتحول إلى الحالة السائلة وتنفصل من الماء بسهولة . في هذه الطريقة تستعمل غلايات خاصة لتوليد بخار الماء الذي يندفع بضغط معين من خلال أنابيب خاصة إلى وعاء التقطير .

طريقة إستخلاص المركبات الفينولية :

تتبع طريقة Gayon (1972) في إستخلاص المركبات الفينولية حيث يؤخذ 20 غم من أي جزء نباتي جاف ومطحون ويوضع في دورق زجاجي سعة 1000 سم3 ثم يضاف إليه 400 مل من 2% من حامض الخليك ويربط الدورق بجهاز المكثف العاكس Reflex Condenser ويوضع في حمام مائي بدرجة 70 مْ لمدة 8 ساعات وبعد الإنتهاء يترك المحلول ليبرد ثم يرشح بإستخدام قماش التول ويوضع الراشح في قمع الفصل ويضاف إليه حجم مساو له من n – propanol ثم يضاف كمية مناسبة من كلوريد الصوديوم Nacl إلى القمع مع الرج إلى أن يصل إلى حالة التشبع حيث تتكون طبقتان في قمع الفصل . تؤخذ الطبقة العليا التي تحتوي على الفينولات المذابة بالبروبانول ويجرى لها عملية تركيز بواسطة المبخر الدوار تحت حرارة 70 مْ .

إن المحلول المركز يتضمن مواد فينولية بالإضافة إلى بلورات ملحية لكلوريد الصوديوم ويتم حساب وزن المواد الفينولية وذلك بإيجاد وزن العينة المجففة بعد التركيز (F1) ثم إذابتها بحجم مناسب من مذيب AE عندها سوف تذوب المواد الفينولية وتتكتل البلورات الملحية (لأنها لا تذوب بالمذيبات العضوية) بعدها ينقل المحلول الفينولي الذائب بالماصة إلى قنينة أخرى أما الباقي فيجفف ويستخرج وزنه (F2) فيكون وزن المواد الفينولية يساوي F2 – F1 .

طريقة إستخلاص المركبات القلوانية :

تتبع طريقة السامرائي (1983) في إستخلاص القلوانيات من أوراق النباتات ، حيث وضع 10 غم من الجزء النباتي الجاف والمطحون في حاوية الإستخلاص Thimble ويدخل في جهاز السكسوليت ثم يضاف له 200 مل من الكحول الأثيلي ويجرى الإستخلاص لمدة 24 ساعة .وبعد إنتهاء المدة يجفف المستخلص بالمبخر الدوار ثم تذاب المادة الجافة الناتجة في 5 مل من الكحول الأثيلي بعدها يضاف إلى المستخلص الكحولي 30 مل من حامض الكبريتيك 2% ثم يستخدم المبخر الدوار مرة ثانية للتخلص من الكحول الأثيلي فيتبقى المحلول الحامضي والذي يعدل إلى pH = 9 بإضافة هيدروكسيد الأمونيوم

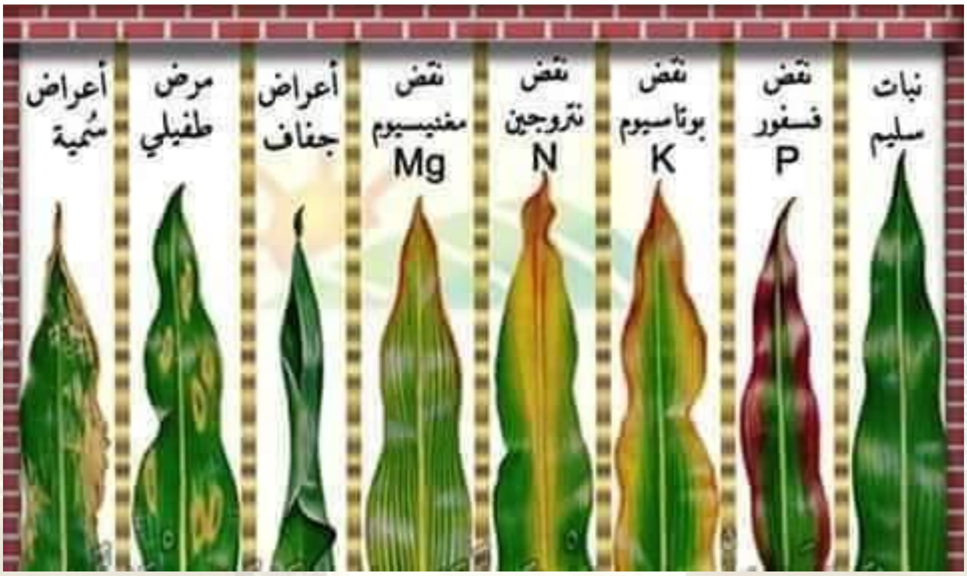
10%. بعدها ينقل المحلول إلى قمع الفصل ويجرى إستخلاص القلوانيات بإستخدام مذيب الكلوروفورم لأربع مرات متوالية وبعد كل مرة (والتي يستخدم فيها 10 مل من الكلوروفورم) تجمع الطبقة السفلى من قمع الفصل والتي هي طبقة الكلوروفورم القلوانية وتجفف مرة أخرى بالمبخر الدوار للحصول على المستخلص الجاف القلواني الخام .

طريقة إستخلاص المركبات التربينية :

يتم إعتماد طريقة Harborne (1984) لغرض إستخلاص المركبات التربينية . إذ يوضع 20 غم من الجزء النباتي الجاف في حاوية الإستخلاص ويدخل في جهاز السكسوليت ويضاف له 200 مل من الكلوروفورم ويجرى الإستخلاص لمدة 24 ساعة. بعدها يجفف المستخلص الناتج بالمبخر الدوار وينقل إلى الفرن الكهربائي بدرجة 50 مْ ليجف ثم تحفظ العينة الجافة في الثلاجة لحين الإستعمال .

الفصل التاسع

نقص العناصر



دور العناصر الكبرى والصغرى في تغذية النبات :

تختلف الأراضي بدرجة خصوبتها حسب عوامل عديدة، والتغذية الجيدة تعتمد أساساً على التوازن ما بين العناصر الغذائية التي يحتاج إليها النبات سواء أكانت هذه العناصر متوفرة أصلاً في التربة أو مضافة على شكل أسمدة. وكلما اقتربت درجة التوازن ما بين هذه العناصر الغذائية بالكم والكيف من الحد الأمثل لحاجة النبات كلما حصلنا على إنتاج أفضل شرط توفر العوامل اللازمة الأخرى. وعند نقص كمية أحد هذه العناصر الغذائية، فإن تأثيره يكون واضحاً على النبات سواء بمظاهر خارجية مرئية على النبات (تغير لون الأوراق مثلاً) أو بشكل غير مباشر بتأثيره على الإنتاج.

طرق تشخيص نقص العناصر:

تحليل التربة :

يفيد تحليل التربة ومعرفة محتواها من العناصر الغذائية لمعرفة نقص العناصر الكبرى الذي ظهرت أعراضه على النبات أو التي قد تظهر بعد فترة من حياة النبات. إن الحد الحرج Threshold limit والشكل الذي يوجد به كل عنصر منها أصبحا معروفين، وكذلك التداخلات بين هذه العناصر وتأثير بقية العوامل عليها. أما بالنسبة للعناصر الصغرى فإن هذه الطريقة لا يمكن الاعتماد عليها كلياً لمعرفة نقص العناصر نظراً لعدم معرفة الحد الحرج والشكل الذي يوجد به العنصر بشكل صالح للامتصاص في التربة كذلك كل التأثيرات الأخرى عليه بشكل كامل وقد ظهرت أعراض نقص بعض العناصر على

نباتات نامية على تربة تحتوي كميات من هذه العناصر أكبر بكثير من تربة أخرى لم تظهر على مزروعاتها أية أعراض.

تحليل النبات :

حتى اليوم لا يمكن الاعتماد على هذه الطريقة بشكل كامل لتشخيص أعراض نقص العناصر وخاصة الصغرى منها وذلك لأن الحد الحرج من كل عنصر ضمن النبات ما زال غير معروف بشكل كامل كما أن الشكل الذي يوجد به العنصر في النبات ونسبة كل عنصر إلى غيره ما زال يكتنفه الكثير من الغموض، فقد تظهر كميات من عنصر ما في أوراق مصابة أكبر من الكميات الموجودة في أوراق سليمة. إضافة إلى أن المتطلبات النباتية لأي من العناصر هذه تختلف من نبات لآخر ومن فترة لأخرى ضمن النبات الواحد خلال فترة حياته.

المظاهر الخارجية :

رغم التطور الكبير في أجهزة التحليل المخبري، لا تزال هذه الطريقة تعتبر من أهم الطرق لتشخيص نقص العناصر الغذائية على النباتات، وذلك لأن لكل عنصر تأثير معين أو مجموعة من التأثيرات على كل نبات وعند غياب هذا العنصر أو انخفاض مستواه عن الحد الحرج لعدم توفره في التربة أو بسبب التداخلات مع عناصر أخرى فإنه تظهر على النبات علامات نقص خاصة به متميزة في كثير من الأحيان من الأعراض التي يسببها عنصر آخر. وقد تختلط الأمور في بعض الأحيان وخاصة في المراحل الأولى لظهور الأعراض كالاصفرار مثلاً الذي يلاحظ أحياناً في بداية النمو قد يكون سببه أكثر من عنصر إلا أنه لا يلبث أن يتمايز بعد فترة وجيزة وهذه الطريقة تحتاج إلى تدريب جيد وممارسة طويلة.

تنقسم العناصر إلى قسمين:

العناصر الكبرى :

وتشمل تسعة عناصر وهي : الكربون والأوكسجين والهيدروجين والنيتروجين والفسفور والبوتاسيوم والمغنيسيوم والكبريت والكالسيوم . يحصل النبات على الكاربون والأوكسجين من الهواء والهيدروجين من الماء بينما تزود التربة النبات بالعناصر الأخرى .

العناصر الصغرى :

وتشمل تسعة عناصر هي :البورون، الحديد، النحاس، الزنك، المنغنيز، الموليبدينوم، الكلور، النيكل . يضاف الكوبالت أحياناً لهذه المجموعة نظراً لاستعماله في تثبيت النيتروجين.

مفتاح تشخيص أعراض نقص العناصر الكبرى في النبات

الأوراق القديمة أو السفلى مصابة

كلا ←

نعم ↓

تكون الإصابة على النبات بشكل عام لون النباتات أخضر فاتح أو غامق :

كلا ← الأعراض المتمركزة وغالباً ما تكون شحوب بالكلوروفيل ووجود بقع أو بدون بقع

نعم ↓ (من: تكون الإصابة على النبات بشكل عام)

لون النباتات أخضر غامق وفي كثير من الأحيان تتطور للون الأرجواني أو الأحمر

نعم ↓ نقص عنصر الفسفور (P)

كلا ↓ لون النباتات أخضر فاتح ولون الأوراق أصفر أو أخضر فاتح ولا توجد بقع متنخرة

نعم ↓ نقص عنصر النايتروجين (N2)

كلا ↓ لون النباتات أخضر فاتح ووجود بقع متنخرة على الأوراق في بعض الأحيان وتكون الأوراق شاحبة محترقة كوبية الشكل أو ملتفة

نعم ↓ (من: الأعراض المتمركزة)

شحوب كلوروفيلي وشحوب بين العروق وأحياناً تكون الأوراق حمراء وعليها بقع ميتة

نعم ↓ نقص عنصر المغنيسيوم (Mg)

كلا ↓ لا يوجد شحوب بين العروق لكن هناك إحتراق في حافات الأوراق ووجود تبقعات على طول حافة الورقة

نعم ↓

كلا ↓

كلا

نعم

نعم

نقص عنصر المولبيبدينيوم (Mo)

نقص عنصر البوتاسيوم (K)

لا يوجد شحوب بين العروق فقط يوجد شحوب عام للورقة وبقع متنخرة كما توجد حدود متقطعة بين الأنسجة الحية والميتة

نعم

نقص عنصر الكلور (Cl)

مفتاح تشخيص أعراض نقص العناصر الصغرى في النبات

تصاب الأوراق الجديدة أو الصغيرة وتكون الأعراض متمركزة

نعم

كلا

يموت البرعم الطرفي

البرعم الطرفي يبقى حي

نعم

نعم

تصبح الأوراق الفتية للبرعم الطرفي خضراء فاتحة عند القاعدة وتكون ملتوية وهشة وتموت عند نقطة النمو وشحوب

يظهر شحوب عام للورقة وليس بين العروق

نعم

كلا

نعم

كلا

الأوراق الفتية خضراء

نقص عنصر البورون (B)

الأوراق الفتية في البرعم الطرفي معقوفة عند البداية وتتحول للون البني وتموت

نعم

نقص عنصر الكالسيوم (Ca)

فاتحة وبدون تبقع أو تخطيط وشحوب

نعم

نقص عنصر الكبريت (S)

كلا

الأوراق الفتية خضراء شاحبة وأطرافها ذابلة وتموت في نهاية المطاف

نعم

نقص عنصر النحاس (Cu)

Chlorosis بين عروق الأوراق الفتية

نعم

تمييز حاد بين العروق والمناطق التي فيها شحوب

نعم

نقص عنصر الحديد (Fe)

كلا

لا يوجد تمييز حاد بين العروق والمناطق التي فيها شحوب ومظهرها متبقع

كلا

شحوب بين عروق الأوراق الوسطية وحدوث تقزم في النمو

نعم

نقص عنصر الخارصين (Zn)

(تحدث الأعراض في البدء في الأوراق الوسطية والأوراق

نعم **القديمة والفتية تصبح شاحبة في المرحلة التالية من النقص)**

نقص عنصر المنغنيز (Mn)

أعراض نقص العناصر في النبات :

العناصر الكبرى :

1- النايتروجين (N2) :

يدخل النايتروجين في بناء المواد البروتينية ويعتبر أهم مكونات البروتوبلازم كما يدخل في تركيب اليخضور ويدخل في تركيب أكثر مكونات الأزهار والثمار وأيضاً يتحكم في قدرة النبات على امتصاص الفوسفور والبوتاسيوم. وتظهر أعراض النقص على الأوراق السفلية للنبات بشكل تقزم وبطء نمو وتنخر الأوراق القديمة في حالات النقص الشديدة . أما النقص في محاصيل الحبوب فيظهر على الأوراق لون أصفر يبدأ من طرف الورقة ويمتد إلى الخلف على شكل حرف V .

إن نقص كميات النايتروجين في محاصيل الحبوب سوف يحصل قلة في عدد الأشطاء وتكون السيقان نحيلة ورؤوس السنابل قليلة وكمية البروتين منخفضة في الحبوب . أما النقص الحاصل في حقول البطاطا فيظهر تجعد على الأوراق ويقل حجم الدرنات . إن الحقل الذي يعاني من نقص في عنصر النايتروجين يظهر عليه النقص بالكامل .

أعراض نقص عنصر النايتروجين

2- الفسفور (P) :

تحتاج النباتات لعنصر الفسفور لإنتاج الطاقة ATP والسكريات والأحماض النووية . وعادة ما تظهر الأعراض على النباتات الصغيرة التي تحتاج الفسفور بصورة أكثر من الناضجة . تتحول النباتات التي تعاني من النقص بشكل عام إلى اللون الأخضر الداكن (الأوراق والسيقان) وتصاب بالتقزم . تتأثر الأوراق القديمة أولاً وقد تكتسب اللون الأرجواني بسبب تراكم السكريات وتصبح قمة الورقة بنية اللون وتموت . وتكون النباتات ضعيفة وتتأخر في النضج كما تتمدد الورقة وسطح الورقة أيضاً مما يتسبب في إلتفاف الأوراق وصغر حجمها .تكون أعراض النقص في الجت إستطالة الأوراق بإتجاه الأعلى وفي البطاطا تلتف الأوراق للأعلى أيضاً وعلى الدرنات بقع داخلية بنية اللون غالباً ما تظهر من قلب الدرنة أما في نبات الذرة تظهر الأعراض على النباتات الصغيرة حيث تتحول الأوراق إلى اللون الأرجواني .

أعراض نقص عنصر الفسفور

3- البوتاسيوم (K) :

تستخدم النباتات البوتاسيوم في تنشيط الإنزيمات والتمثيل الضوئي وتكوين البروتين ونقل السكر . لا يتسبب نقص البوتاسيوم المباشر في ظهور أعراض واضحة ، في البداية لا يوجد سوى إنخفاض في معدل النمو أما في المراحل المتأخرة يحدث شحوب في الكلوروفيل وتنخر . يظهر على الأوراق القديمة تبرقش مركزي أو مساحات شاحبة مع حرق حواف الأوراق . تبدأ أعراض الشحوب عادة على طرف الأوراق لكن خلافاً للأعراض الناجمة عن نقص عنصر النايتروجين حيث يتقدم شحوب الكلوروفيل في حالة نقص عنصر البوتاسيوم على طول حواف الأوراق نحو قاعدة الورقة وعادة ما يترك الضلع الأوسط حي وأخضر . ومع تقدم النقص تصبح الورقة صفراء بالكامل . قد تظهر بقع متنخرة صغيرة بيضاء أو صفراء على طول حواف الورقة . وهناك مؤشر آخر على نقص البوتاسيوم هو قلة القش أو ضعف في سيقان الذرة وصغر حجم الحبوب مما يؤدي إلى ظهور مشاكل في النبات وإنخفاض مقاومته للأمراض ،

وعند إصابة المحاصيل الشتوية المعمرة والحولية بالنقص تقل صلابتها في تحمل ظروف البرد . وعند إصابة الشعير يقل عدد الأشطاء وتنخفض نسبة البروتين في الحبوب وتبدو النباتات ذابلة . أما في الجت تظهر بقع بيضاء على حواف الأوراق بسبب تراكم السكر ، وبالنسبة للمحاصيل الجذرية كالبنجر والبطاطا تكون درناتها صغيرة الحجم .

أعراض نقص عنصر البوتاسيوم

4- الكلور (Cl) :

يحتاج النبات إلى عنصر الكلور لإنتفاخ الأوراق ودخوله في عملية البناء الضوئي . تظهر أعراض النقص بشكل شحوب في الكلوروفيل وتنخر بقعي على طول الأوراق وظهور خطوط حادة بين الأنسجة الحية والميتة ، وتآكل حواف الأوراق والنظام الجذري متفرع بشدة في محاصيل الحبوب المصابة .
أعراض نقص عنصر الكلور محددة للغاية ويمكن أن تختلط بسهولة مع أمراض الأوراق .

5- المغنيسيوم (Mg) :

هو الجزيء المركزي في الكلوروفيل وهو عامل مشترك مهم لإنتاج الطاقة ATP . تشمل أعراض نقص المغنيسيوم شحوب كلوروفيلي بين عروق الورقة وتصبح حواف الأوراق صفراء أو ضاربة إلى الأحمر – البنفسجي في حين يبقى العرق الوسطي أخضر اللون . عند حصول نقص في نبات القمح تظهر لطخ خضراء مصفرة مبرقشة ، أما في الجت فتلتف الأوراق ويصبح السطح السفلي لها ضارب للحمرة ، وبالنسبة للبطاطا تكون قاسية وعروقها ملتوية .

أعراض نقص عنصر المغنيسيوم على الطماطم

6- الموليبدينيوم (Mo) :

يعتبر كإنزيم فعال في النبات وله دور في تثبيت النايتروجين في البقوليات لذلك بسبب هذا الترابط الوثيق بين العنصرين تكون أعراض نقص الموليبدينيوم في النبات أشبه بأعراض نقص النايتروجين مع حدوث تقزم في النمو وشحوب كلوروفيلي في البقوليات . تتضمن الأعراض الأخرى لنقص الموليبدينيوم شحوب الأوراق التي قد تكون محترقة وملتفة بشكل كوب . كما تظهر الأوراق أيضاً سميكة وهشة وفي النهاية تسقط ولا يبقى منها سوى العرق الوسطي .

العناصر الصغرى :

1- الكبريت (S) :

بما إن الكبريت هو مكون أساسي لبعض الأحماض الأمينية والبروتينات فإن نقصه يؤدي إلى تثبيط البروتين وتصنيع الكلوروفيل . من الصعب تشخيص أعراض نقص الكبريت لأنها تتشابه مع أعراض نقص عنصري النايتروجين والموليبدينيوم . تظهر أعراض النقص على الأوراق الفتية مما يتسبب ذلك في تحويلها إلى اللون الأصفر ، عند تقدم النمو يكون النبات بأكمله أخضر شاحب ولا توجد بقع مميزة أو خطوط وتكون النباتات ضعيفة وصغيرة والسيقان رقيقة .

2- البورون (B) :

الوظيفة الأساسية للبورون هي تكوين جدار الخلية والأنسجة النباتية وتكون الأعراض بهيئة شحوب الأوراق الفتية وموت البراعم الطرفية وتصبح الأوراق بتقدم الوقت بنية غامقة وتتطور الأعراض إلى تنخر الأوراق في بعض الحالات . قد تتكون بقع صفراء مبيضة في قاعدة الأوراق وبسبب الخلل في نمو

جدار الخلية تصبح الأوراق والسيقان مشوهة وهشة والأوراق الطرفية سميكة وملتفة . تنمو النباتات التي تعاني من النقص ببطء وتكون متقزمة نتيجة لقصر المسافة بين العقدتين حيث توجد الأوراق ، كما إن البورون يميل إلى التراكم في الأنسجة التكاثرية فقد تفشل البراعم الزهرية في التكوين أو تكون مشوهة إذا تكونت وإذا حدث تلقيح تكون قابلية البذور على الإنبات ضعيفة . عند إصابة الجت بنقص البورون تكون الأعراض بشكل تورد الأوراق وإصفرار الأوراق العليا وضعف في التزهير . أما البنجر السكري يتوقف نمو الأوراق وتلتف الأوراق الفتية وتتحول إلى اللون البني أو الأسود وفي المراحل المتأخرة من النقص يبدأ التاج والجذور بالتعفن مما يؤثر على جميع النبات والجزء السليم من البنجر يكون قليل السكر.

3- الحديد (Fe) :

يلعب الحديد دوراً مهماً في تنفس النبات وتفاعلات البناء الضوئي ونقصه يقلل من إنتاج الكلوروفيل ويمكن تمييز الأعراض عن طريق شحوب بين عروق الورقة ، وهناك تمييز واضح بين العروق والمساحات الشاحبة في الأوراق الفتية وبتطور النقص تصبح الأوراق صفراء مبيضة بالكامل وتتنخر وينمو النبات ببطيء كما إنه عند مشاهدة الحقل من بعيد تظهر مناطق صفراء غير منتظمة .

4- الزنك (Zn) :

تحتاج النباتات إلى الزنك لإنتاج هرمون النمو وخصوصاً إستطالة السلاميات . حيث تظهر الأعراض في البداية على الأوراق الوسطى بشكل شحوب بين العروق خصوصاً عند المنتصف بين حافة الورقة والضلع الوسطي مما يؤدي إلى ظهور تخطيط وتشوهات . وظهور مساحات خضراء شاحبة صفراء أو بيضاء كما يسبب النقص الشديد في الزنك إلى تحول أوراق الأشجار للون الرمادي وتسقط قبل أوانها . ولأن الخارصين يلعب دور مهم في إستطالة العقد لذلك فإن النباتات يحدث فيها تقزم شديد . كما يضعف الإزهار وتكوين البذور . عند النقص في نبات الجت يصغر حجم الأوراق وتظهر عليها أشرطة برونزية أو رمادية ، وفي محاصيل الحبوب يقل إنتاج الأشطاء ويكون شكل الحبوب غير طبيعي ، وعند رؤية الحقل من مسافة بعيدة تظهر أعراض الإصابة في مناطق محددة وليس جميع الحقل وتقل الكفاءة التناسلية للماشية المتغذية على نباتات تعاني من نقص الخارصين .

5- الكالسيوم (Ca) :

هو أحد مكونات جدران الخلايا النباتية وينظم بناء جدار الخلية لذلك فإن نقصه يؤدي إلى تشوه الأوراق وتحولها إلى اللون الأخضر الداكن وتصبح أطرافها جافة أو هشة وتموت في النهاية والسيقان نحيلة والإنبات ضعيف .

6- النحاس (Cu) :

يحتاج النبات لهذا العنصر إنتاج الكلوروفيل وفي التنفس وتخليق البروتين وبالتالي فإن نقصه يعرض النباتات إلى شحوب كلوروفيلي في الأوراق الفتية وتوقف نموها والتأخير في النضج ، وعند إصابة محاصيل الحبوب يحدث تأخر في تكوين الأشطاء وتصبغ للحبوب باللون البني وصغر حجمها ويكون إنتاج الحبوب ضعيف وعند النقص الشديد لا تتكون رؤوس السنابل كما إن النباتات تكون عرضة للإصابة بالأمراض خصوصاً مرض الأرغوت . عند بداية النقص تكون الأعراض محيرة في الحقل حيث تكون عبارة عن لطخ غير منتظمة مع وجود تصبغ باللون البني وهو أكثر الأعراض وضوحاً خصوصاً على حوامل القمح . ويحدث نفس الشيء في نقص النحاس كما في نقص الزنك تقل الكفاءة التناسلية للماشية عند تناولها نباتات مصابة بنقص النحاس .

7- المنغنيز (Mn) :

إن أكثر العضيات الخلوية حساسية لنقص المنغنيز هي البلاستيدات الخضراء ومن الأعراض الشائعة لهذا العنصر هي شحوب بين العروق في الأوراق الفتية وبخلاف نقص الحديد لا يوجد تمايز حاد بين العروق والمساحات التي بينها ولكن الشحوب منتشر أكثر . هناك عدة أعراض نقص المنغنيز في الأراضي المزروعة بالمحاصيل هما نقط رمادية في الشوفان وبقع رطبة في البزاليا وخطوط بيضاء في القمح وبقع بنية بين العروق في الشعير .

8- النيكل (Ni) :

تحتاج النباتات للنيكل لإنبات البذور بشكل صحيح وأيضاً يدخل في أيض البقوليات والنباتات الأخرى . تشمل أعراض النقص في النباتات شحوب بين العروق في الأوراق الفتية وتتطور إلى تنخر الأنسجة النباتية كما أن إنبات البذور ضعيف وإنخفاض في إنتاجية المحاصيل .

المصادر :

- **البرناوي ، عمر .** المعشبة النباتية . مركز البحث العلمي والتقني للمناطق الجافة . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية . **www.crstra.dz** .

- **بيرقدار ، نصرت . 1994.** الأمان والسلامة في مختبرات الكيمياء . المركز العربي للدراسات الأمنية والتدريب – المملكة العربية السعودية – الرياض . 367 صفحة .

- **الحيدر ، حامد جعفر أبو بكر . 1996 .** تأثير المستخلصات النباتية لبعض نباتات الأدغال (الأعشاب) في زراعة الأنسجة ونمو النبات . رسالة ماجستير- كلية الزراعة – جامعة بغداد – العراق.

- **خفاجي** ، رضوان محمد توفيق . 2010. أساسيات تصنيف الحشرات . الطبعة الأولى – الخرطوم – مطبعة الجزيرة . المكتبة الوطنية – السودان .

-**الربيعي ، هادي مزعل . 1999 .** تأثير مستخلصات نبات الداتورة *Datura innoxa* في بعض جوانب الأداء الحياتي للذبابة المنزلية *Musca domestica* أطروحة دكتوراه . كلية العلوم / جامعة بابل 126 صفحة.

- **السامرائي ، خلود وهيب عبود . 1983.** توزيع القلويدات وأهميتها التصنيفية في بعض الأنواع البرية من العائلة الباذنجانية Solanaceae في العراق . رسالة ماجستير . كلية العلوم / جامعة بغداد .

- **الطائي ، أنمار أحمد و شبابة عبد اللطيف بهجت . 2007.** الأحياء المجهرية العملي – المرحلة الثانية . جمهورية العراق – وزارة التعليم العالي والبحث العلمي – جامعة الموصل – كلية العلوم – قسم علوم الحياة .

- **عبد القادر ، عمر حامد محمد . 2012.** التحضيرات المجهرية Microtechniques عملي مقرري 261-261 جين الضوئي والإلكتروني . المملكة العربية السعودية – جامعة الملك سعود – كلية العلوم – قسم الحيوان .

- **قنش ، ماجدة .** مادة علم تحضير العينات الحيوانية – الجزء العملي BIO 356 . المملكة العربية السعودية – جامعة الملك عبد العزيز – كلية العلوم – قسم الأحياء .

- **مشهور ، وجدي عبد المنعم و مجدي إسماعيل مصطفى . 2007** . الميكروبيولجيا الزراعية . مركز التعليم المفتوح . كلية الزراعة – جامعة عين شمس . جمهورية مصر العربية . 229 صفحة.

-**المنصور ، ناصر عبد علي . 1995** . تأثير مستخلصات مختلفة من نبات قرن الغزال *Ibicella lutea* في حياتية الذبابة البيضاء *Bemisia tabaci*. اطروحة دكتوراه/كلية العلوم/جامعة البصرة.124صفحة.

- **النعماني ، وليد بن الحبشي ، يسرى بنت ناصر الجوية و جميلة بنت خميس الأبروية . 2012**. الزجاجيات في مختبر العلوم . وزارة التربية والتعليم – سلطنة عمان . الطبعة الأولى .

- **هارون ، سناء** . أطلس الأمراض النيماتودية . كلية الزراعة (الفيوم) – جامعة القاهرة – جمهورية مصر العربية .247 صفحة .

- **ونس ، أحمد لطفي إبراهيم .** . دليل إحتياطات الأمن والسلامة في المختبرات الكيميائية . جمهورية مصر العربية ـ كلية الزراعة – جامعة دمياط .

- **Bunse, T. & G. K. Steigleder. 1991.** The Preservation of fungal cultures by Lyophilization. Mycoses 34, 173 – 176 .

- **Coyne, D.L. ; J.M. Nicol and B. Claudius- Cole . 2014.** Practical Nematology : A field and Laboratory Guide. International Institute of Tropical Agriculture. Oyo State, Nigeria.

- **Diogo, Hilda Conceiçáo ; Aldo Sarpieri & Mário Cezar Pires. 2005.** Fungi Preservation in Distilled Water. An Bras Dermatol. 80 (6) : 591-4. Brazll.

- **Gayon, P.R. 1972.** Plant Phenolics. Oliver and Boyd. Edinburgh, 254 pp.

- **Harborne, J. B. 1973.** Phytochemical method.Halsted prees.John Wiely and Sons,New York.

- **Harborne,J.B. 1984 .** Phytochmicals methods : A guide to modern

techniques of plant analysis . 2nd ed . Chapman and Hull . London , Uk.

- **Harris, James. 2016**. How to Preserve Fungal Cultures. http://hardydiagnostics.com/wp-content/uploads/2016/05/Saving-fungal-Cultures-Sterile-Water-By-Harris.pdf

- **Homolka, Ladislav. 2013**. Methods of Cryopreservation in Fungi. Laboratory Protocols in Fungal Biology. Current Methods in Fungal Biology. Springer Science + Business Media. 604 P.

- **Laboratory Biosafety Manual. 3rd ed. 2004.** World Health Organization Geneva.

- **Laboratory Safety Design Guide. 2015.** September.

- **Ladd , J. L. ; Jacobson , M. and Buriff , C. R. 1978 .** Japanese beetles extracts from neem tree seeds as feeding deterents . J. Econ. Entomol . (71) : 810-813 **.**

- **McCauley, Ann ; Clain Jones & Jeff Jacobsen .2011.** Plant Nutrient Functions and Deficiency and Toxicity Symptoms . Montana State University Extension. June 2011.

- **Mueller, Gregory M. ; Gerald F. Bills & Mercedes S. Foster. 2004.** Biodiversity of Fungi. Inventory and Monitoring Methods. Elsevier Academic Press.

Norris , J.R.R. Berkeleg , C. W. Longan, N. A. and. A. G. Donnel .1981. the general Bacillus and spores Lactobacillus In the prokaryotes starr M,P. stop J.Tuber HG Balows A .And schelgel , HG ,eds springer verlag co , Berlin Heidelbrg , Newyoerk vol (2):174-1772.

- **Paul, Jai Shankar ; K. L. Tiwari & S. K. Jadhav. 2015**. Long Term Preservation of Commerical Important Fungi in Glycerol at 4 C . International Journal of Biological Chemistry 9 (2) : 79 – 85 .

- **School Chemistry Laboratory Safety Guide. 2007**. U.S. Consumer safety Product Commission. Department of Health & Human Services .

- **S-Laboratory Environmental Good Practice Guide For Laboratories. October 2011**. S-Lab (Safe, Successful and Sustainable Laboratories) initiative of HEEPI (Higher Education for Environmental Performance Improvement)

- **Symbert, R.M. and N.R. Krieg . 1981.** General characterization in manual of methods for bacteriology. Gerhard, P murry , R.G.E, costilow , R.N. Nester, E.w, Wood, W.A. Krieg. N.R. and Phillps, G.W(eds) . American Society of microbiology Washignton. 410-443.

- **Yokayama, M.T. and J.R. Carlson . 1974.** Dissimition of trypophan and related Indole compound by ruminal microorganisms in vitro .Appl. Microbiol. 27:540.