إعداد مختبر أمراض النبات.

- من المعروف أن علم أمراض النبات هو العلم الذي يختص بدراسة النبات المريض والعوامل المختلفة التي تؤثر علي تطور المرض ، ويشمل بالطبع دراسة مسببات أمراض النبات وطرق مكافحتها أو الحد من انتشارها. وتختلف مسببات أمراض النبات، فقد يكون المرض ناتجا عن ظروف بيئية غير مناسبة (حرارة - رطوبة - نقص العناصر الغذائية ..... الخ) وقد يكون ناتجا عن الإصابة بكائن حي . وهنا يلزم عزل الكائن المسبب للمرض وتنقيته وذلك بعمل مزارع نقية Pure culture ومن ثم تعريفه Identification ، ثم أخيرا العمل علي مكافحته أو الحد من انتشاره. ولدراسة ذلك يجب التعرف علي الظروف البيئية الملائمة لنمو الكائن من درجة حرارة وتركيز أيون الهيدروجين والمواد الغذائية وغير ذلك من الظروف البيئية .

- ولإجراء مثل هذه الدراسات يجب إعداد مختبر مجهز لدراسة الأمراض النباتية تتوفر فيه بعض المواصفات والاحتياطات ، فلابد أن يكون هذا المختبر في مكان مناسب ومصمم بحيث يضمن نظافته قدر المستطاع من الملوثات المختلفة ، ولذلك يجب أن يكون بعيدا عن التيارات الهوائية والغبار والأتربة . وعادة ما يشتمل مختبر أمراض النبات علي حجرة صغيرة معقمة Sterile chamber تستخدم لعزل وتنقية المسببات المرضية ومساحتها حوالي 2×3 م وبارتفاع 3م وتكون مزودة بمنضدة صغيرة وبمصدر للماء والكهرباء والغاز وبها فتحة لدخول الهواء عليها مرشح من القطن أو طبقات من الشاش المعقم ، كما تزود هذه الغرفة بمصباح للأشعة فوق البنفسجية لتعقيمها .

كذلك يجب أن يشتمل مختبر أمراض النبات على كثير من الأدوات والأجهزة والمحاليل التي منها :-

1- الأدوات الزجاجية : ومن أهمها أطباق بتري - أنابيب اختبار- دوارق - كؤوس - ماصات - أقماع - شرائح - أغطية شرائح - بيكرات- اسطوانات مدرجة .....الخ .

2- أدوات غير زجاجية : ومنها أدوات التشريح (أبر التلقيح ذات النهاية المدببة والسهمية وذات العقدة ، ملاقط ، مشارط ، موس تشريح) علب ألمونيوم أو نحاس لتعقيم أطباق بتري وأخري لتعقيم الماصات - حوامل معدنية وخشبية - سلال من الحديد .....الخ .

3- الأجهزة : ومن أهمها أفران الهواء الساخن والأوتوكليف كأجهزة للتعقيم ، مجاهر ، حاضنات ، ثلاجات ، حمامات مائية ، أجهزة طرد مركزي ، موازين .....الخ .

4- محاليل للتعقيم : وذلك لتعقيم أسطح المناضد ، وكذلك لتعقيم الأجزاء النباتية المصابة سطحيا تمهيدا للعزل منها (كلوركس 10% ، سليماني 1,. %) ولتطهير الأيدي (كحول إيثانول 70%) ولتطهير جو المختبر والأرضيات (الفينول) .

5- محاليل التثبيت : والغرض منها قتل الخلايا بسرعة حتى تثبت محتوياتها علـي الوضع الذي كانت عليه قبل إجراء عملية التثبيت .

ويجب أن تتميز محاليل القتل والتثبيت بعدة صفات منها :-

ا- تتخلل الأنسجة بسرعة وتعمل علي قتل الخلايا سريعا .

ب- تكسب البروتوبلازم صلابة ، ليتحمل المعاملات التالية دون تغيير.

ج- ألا تسبب هذه المحاليل أي تغيير للبروتوبلازم أو تعمل علي إتلاف معالمه ، كما لا تؤثر علي قابليته للصبغ .

ومن محاليل التثبيت المستخدمة محلول اللاكتوفينول ، حامض الخليك ، الكحول ، محلول F.A.A. .

ويستخدم محلول اللاكتوفينول لتثبيت وتحميل وفحص أجزاء الفطر المختلفة ، ويتميز بأنه لا يؤثر علي التحضيرات بالانكماش أو التلف ويحضر من المواد التالية :-

فينول	:	حامض لاكتيك	:	جلسرين	:	ماء مقطر
1	:	1	:	2	:	1

أما محلول الـ F.A.A فيستخدم لحفظ العينات النباتية ويحضر كالتالي :-

فورمالين تجاري	:	حامض خليك ثلجي	:	كحول إيثانول 50%
5	:	5	:	90

6.محاليل للحفظ : وهي محاليل تستخدم لحفظ العينات النباتية ، ومن هذه المحاليل محلول F.A.A ومحلول الفورمالين التجاري ، وهناك محلول آخر يتميز بكفاءة عالية ويحضر كالتالي :-

يحضر محلول مشبع من خلات النحاس في 50% حامض خليك ، ثم يخفف بالماء بنسبة 1 : 4 ، ثم تغمر العينات المراد حفظها في المحلول المخفف وتسخن حتى الغليان (خلال ذلك يتحول لون النسيج النباتي إلي اللون الأخضر الباهت ثم يقوم ملح النحاس باستعادة اللون الأخضر) ، ترفع العينات بعد ذلك ، ثم تحفظ في محلول فورمالين 5 % .

7.صبغات : وهى تستعمل في صبغ الأنسجة النباتية والخلايا الفطرية والبكتيرية .

والصبغة هي أي مادة ملونة لها القدرة علي الدخول والثبات في الأنسجة التي تعامل بها، حتى لوعوملت فيما بعد بمواد مذيبة للصبغات .

وهناك عدة أنواع من الصبغات تستخدم لصبغ الأنسجة النباتية مثل صبغة الهيماتوكسلين ، أخضر الملاكيت ، السفرانين ، فحم القطران .

ولصبغ الفطريات يستخدم صبغة ازرق القطن Cotton blue (أو أزرق التريبان) حيث تضاف إلي محلول اللاكتوفينول الرائق (الأبيض) بنسبة 0,1 - 5, 0جم / لتر محلول لاكتوفينول، كذلك يمكن استخدام

صبغة الإريثروسين Erythrothin للتحميل الوقتي وهذه الصبغة توضح تفاصيل الخيط الفطري والخلايا المولدة للجراثيم في الفطريات الشفافة بشكل واضح . وتتركب صبغة الإريثروسين من :-

إريثروسين	1 جم
أمونيا (10%)	100 مل

ومن الصبغات المستخدمة لصبغ الخلايا البكتيرية صبغة الكريستال البنفسجي والسفرانين ، أزرق الميثلين ، نجروسين .

المجهر الضوئى

المجهر جهاز يستخدم لفحص وتكبير الأجسام الدقيقة التي لا يمكن رؤيتها بالعين المجردة ، والتي تقاس أقطارها بالمليمتر والميكرون . ولذلك يجب أن يتميز المجهر بقوة تكبير بدرجة تكفى لرؤية التفصيلات الدقيقة للأشياء المفحوصة بدرجة عالية من الوضوح وقوة التمييز .

ويمكن تعريف قوة التمييز بأنها أقصر مسافة ممكنة للرؤيا الواضحة بين نقطتين بحيث تبدو كل نقطة منفصلة عن الأخرى بوضوح وليست مندمجة معها .

تركيب المجهر الضوئى :-

يتكون المجهر من قاعدة مثبت عليها ذراع Limb ، ومثبت على الجزء العلوي من الزراع أنبوبة Tube يمكن تحريكها حركة رأسية بواسطة ضابطين :

أ - ضابط تقريبي Course adjustment

ب- ضابط دقيق Fine adjustment

وتعتبر أنبوبة المجهر هي الجزء الرئيسي فيه ، حيث يثبت فـي طرفها العلوي العدسات العينية Ocular lens ذات قوة التكبير 10 مرات عادة (X 10) ، ويثبت في طرفها السفلي العدسات الشيئية Objective lens الذي يتراوح عددها بين 2-5 عدسات ، ولكن يوجد في العادة ثلاث عدسات شيئية هي :-

الأولى : قوة صغرى ذات تكبير 10 مرات (X 10) 0

الثانية : قوة كبرى وقوة تكبيرها 40 مره (X 40)0

الثالثة : تكبيرها 95 -100 مره (X 100) وتعرف بالعدسة الزيتية 0Oil immersion

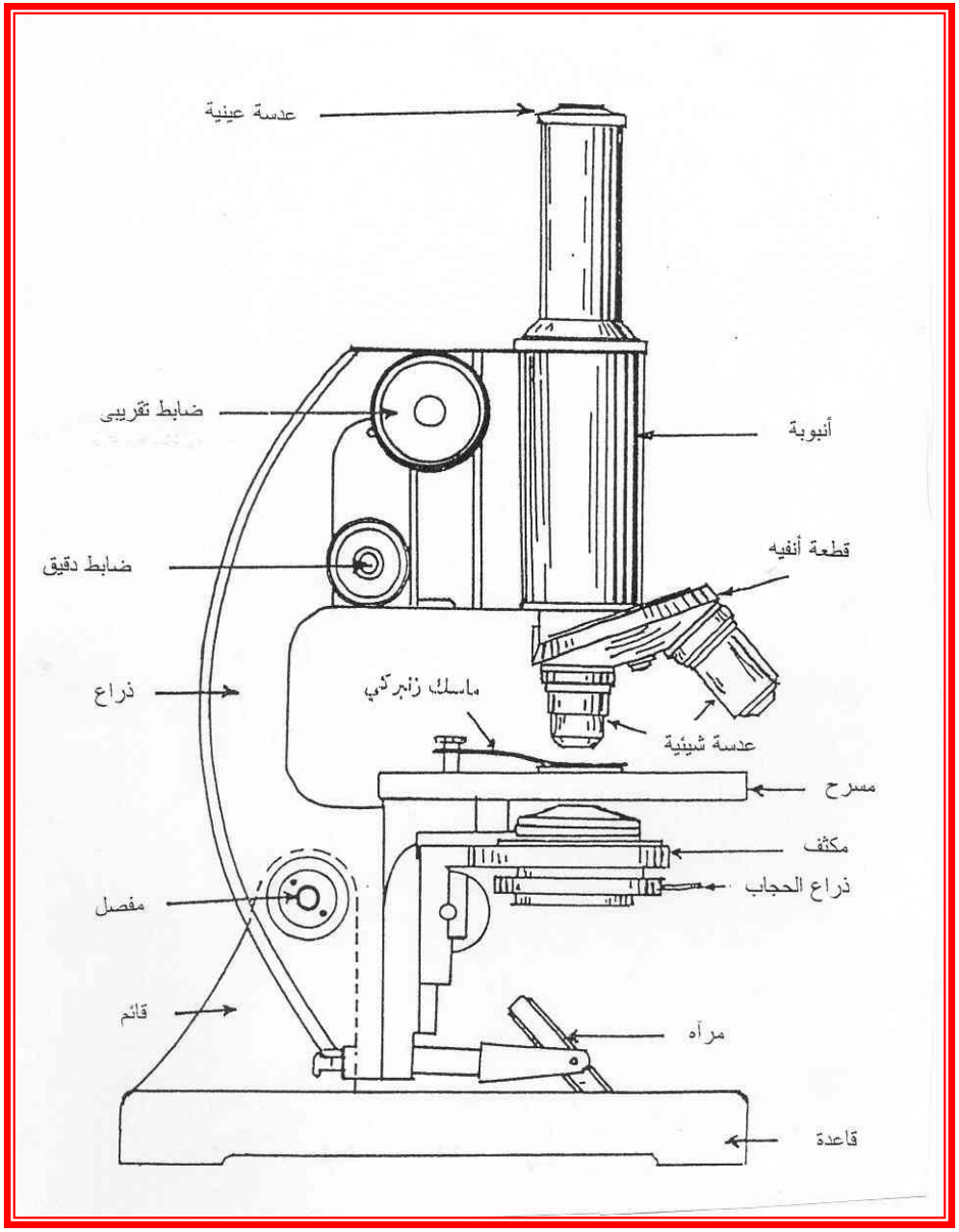
وتركب العدسات الشيئية على قرص يعرف بالقطعة الأنفية Nose piece يتحرك حركة دائرية بحيث يجعل إحدى العدسات الشيئية على امتداد أنبوبة المجهر وفوق مصدر الضوء بحيث تكون العدسة جاهزة لفحص العينة في الشريحة.

أما مسرح المجهر Stage فيوجد على الجزء السفلي من الذراع ، ويوجد في منتصف المسرح فتحة تسمح بمرور الضوء إلى الشريحة . كما يوجد على المسرح ماسكين Clips لتثبيت الشريحة الزجاجية عند الفحص ، أو أن يزود المسرح بمحرك ميكانيكي يمكن تحريكه في أربع اتجاهات مختلفة .

ويوجد أسفل المسرح مصدر ضوئي موجه إلى داخل أنبوبة المجهر ، وكذا مكثف لتوجيه الضوء باتجاه العينة ، وهذا الأخير مزود بحجاب Diaphragm للتحكم في كمية الضوء المتجه إلي العينة وذلك بواسطة ضابط خاص 0

ويمكن حساب قوة تكبير المجهر من المعادلة :-

قوة تكبير المجهر = قوة تكبير العدسة العينية × قوة تكبير العدسة الشيئية



شكل (1) : المجهر الضوئي

الاحتياطات الواجب مراعاتها عند استعمال المجهر :-

1- التأكد من نظافة جميع العدسات 0

2- الاحتراس من اتساخ أجزاء المجهر وخاصة العدسات بأي من محاليل التحميل أو الصبغ المستعملة ، وإذا حدث واتسخت العدسات الشيئية فيمكن تنظيفها باستخدام الزيلول ثم تجفف بسرعة0

3- تستخدم العدسة الشيئية الصغرى (10 X) في ضبط الضوء ، وتوضع الشريحة على مسرح المجهر بحيث يكون التحضير في مسار الضوء من المكثف إلى الشيئية 0

4- يتم تحريك أنبوبة المجهر إلى أسفل باستخدام الضابط التقريبي ببطء ، بحيث تكون العدسة الشيئية الصغرى على بعد حوالي 5ملم من التحضير ، ثم يستخدم الضابط الدقيق في رؤية معلم التحضير ، يمكن بعد ذلك استبدال العدسة الصغرى بالعدسة الكبرى وذلك بإدارة القطعة الأنفية واستعمال الضابط الدقيق فقط لرؤية تفاصيل التحضير.

5- يجب التأكد من وضع غطاء الشريحة (Cover) على التحضير عند الفحص بالعدسة الشيئية الكبرى .

6- يجب وضع قليل من زيت خشب السيدر Cedar - wood oil في حالة استخدام العدسة الشيئية الزيتية (100 X) وبحيث تكون العدسة ملامسة للزيت . حيث أن زيت السيدر يزيد من مقدار الفتحة العددية .

تجنب غمض إحدى العينين عند الفحص المجهري لأن ذلك يضعفها.

الأوساط المغذية(الأوساط الغذائية)

تعتمد غالبية الدراسات والبحوث الميكروبية علـى استعمال اوساط غذائية مختلفـة ، وهذه الأوساط إن لم تكن متماثلة تماما مع الأوساط التي تعيش فيها أو عليها هذه الكائنات في الطبيعة فيجب أن تكون قريبة الشبه منها من حيث توفير الاحتياجات والمتطلبات الغذائية اللازمة لتنميتها .وعلي ذلك تعرف الوسط الغذائية Medium بأنها المادة أو مجموعة المواد التي يمكن أن تنمو عليها الكائنات الحية الدقيقة .

وعلية يجب أن تحتوي الوسط المغذية على العناصر الضرورية واللازمة لنمو وتكاثرالكائنات الحية الدقيقة (مثل الفطريات والبكتيريا) ومـن أهم هذه المواد الكربون والنيتروجين وبعض العناصر المعدنية مثل الصوديوم ، البوتاسيوم ، الكالسيوم ، المغنسيوم، المنجنيز ، الحديد ، الزنك ، النحاس ، الفسفور ، والكوبالت . كمـا يجب أن تحتوى الوسط في بعض الحالات الخاصة علـي عوامل النمو كالفيتامينات أو المـواد الشبيهة بهـا ، وبالطبع يجب أن لا نغفل أهميه المـاء وكـذلك تركيز أيـون الأيدروجين بالوسط ليتناسب مـع نوع الكائن المراد تنميته .

هذا ولقد وجد أن معظم البكتيريا تفضل الأوساط الغنية بالبروتين والتي تميل إلى القلوية أو المتعادلة (pH 7-8) بينما تفضل الفطريات الأوساط الغنية بالكربوهيدرات والتي تميل إلى الحموضة (pH 6-7).

ومن هنا نجد أن الأوساط المغذية تختلف في تركيبها بما يتلائم مع طبيعة وحاجـة الكائن الحي المنمى فيها أو عليها ، غير أن هنـاك بعض الفطريات التي لا يمكن تنميتهـا على اوساط غذائية صناعية حتى لو توفر بها كل الاحتياجات الغذائية وهذه تعرف بالكائنات الإجبارية والتي لا تنمو إطلاقا إلا علي الأنسجة الحية لعائلها.

وتقسم الأوساط الغذائية على أساس مكوناتها إلى :-

1- أوساط طبيعية Natural media :

وهذه يكون المصدر الغذائي بها أجزاء نباتية أو حيوانية أو كلاهما ، لذلك يطلق عليها اوساط غير محددة التركيب الكيماوي لأن التركيب الكيماوي الدقيق للأجزاء النباتية أو الحيوانية غير محدد ويختلف باختلاف المادة الطبيعية المستعملة، ويتم تجهيز هذه الوسط بعدة طرق ، فقد تكون على شكل قطع من النسيج المستعمل مثل قطع البطاطا أو الجزر ، أو قد تكون علي صورة مهروس حيث يتم تفتيت النسيج المستخدم كما في حالة مهروس الطماطم أو الموز ، وقد تكون في هيئة منقوع حيث يتم نقع النسيج المستخدم لمدة محددة ثم يؤخذ المنقوع لتنمية الكائن الحي الدقيق عليه ، كما قد تكون في صورة مستخلص حيث يتم غلي وزن معين من النسيج النباتي أو الحيواني ثم يستخلص الرائق بواسطة قطعة من قماش الموسلين كما في مستخلص البطاطا والجزر والفاصوليا .

ومن أهم الأوساط الطبيعية المستخدمة :-

ا ـ وسط أجار دقيق الذرة Corn meal agar

وتتركب من : دقيق ذرة 30جم

أجار 20جم

ماء 1 لتر

حيث يوضع الدقيق والأجار في كمية من الماء ثم يكمل الحجم إلي لتر، وتقلب المحتويات جيدا ثم تسخن وتغلي ببطء لمدة ساعة ، ثم تعبأ وتعقم بجهاز الاوتوكليف ولمدة 20 دقيقة .

ب- وسط أجار عصير ثمان خضروات V- 8 agar

وتتركب من :

عصير الثماني خضروات 200 مل

أجار 20 مل

ماء 800 مل

حيث يذاب الأجار في الماء ثم يضاف عصير الخضروات ثم يضبط رقم الحموضة (pH) إلي 6 باستخدام محلول هيدروكسيد الصوديوم 10 % ، ثم يعبا الوسط ويعقم 0

2- اوساط تركيبية Synthetic media :

وهذه تعرف أحيانا باسم الأوساط محددة التركيب الكيماوي ، حيث أنها تتكون من مخلوط من مركبات عضوية وأملاح غير عضوية أو أحدهما وتضاف بنسبة معينة وتذاب في الماء ، وبالتالي فإن التركيب الكيماوي لهذه الأوساط معروف ومحدد 0

ومن أهم هذه الأوساط :

أ ـ وسط تشابك دوكس Czapec (dox) agar

وتتركب من :-

نترات صوديوم	2 جم
فوسفات بوتاسيوم ثنائي الأيدروجين	1 جم
كبريتات مغنسيوم	5,. جم
كلوريد بوتاسيوم	5,. جم
كبريات حديدوز	1,. جم
سكروز	20 جم
ماء	1 لتر

وإذا كان المحلول سيترك لليوم التالي ، تذاب فوسفات البوتاسيوم ثنائية الأيدروجين منفصلة وتخلط عند التجهيز للتعبئة، ثم التعقيم على 15 رطل / بوصة2 لمدة 20 دقيقة .

ب- وسط براون Browen, s media

ج- وسط الأجار المائي Plain agar

3- اوساط طبيعية تركيبية Natural synthetic media :

وهي عبارة عن اوساط تحتوي على مكونات طبيعية مضاف إليها بعض المواد الكيماوية المعروفة التركيب . ومن هذه الأوساط :

أ- وسط مستخلص البطاطا والدكستروز " P. D.A "

وتتركب من :-

مكعبات بطاطا	200 جم
دكستروز	20 جم
أجار	20 جم
ماء	1 لتر

وفيها تغسل درنات البطاطا وتقطع إلي مكعبات صغيرة ويوزن منها 200جم وتوضع في حوالي 500مل ماء ثم تغلي لمدة ساعة ، ثم يستخلص الرائق من خلال قطعة من قماش الموسلين ، ثم يضاف الأجار ويقلب حتى الذوبان ثم يضاف الدكستروز ويقلب حتى يذوب تماما ويضبط الحجم عند 1 لتر ثم تعبأ وتعقم كالمعتاد .

ب- وسط المرق المغذى

وتتكون من :-

مستخلص لحم	3 جم
ببتون	5 جم
ماء	1 لتر

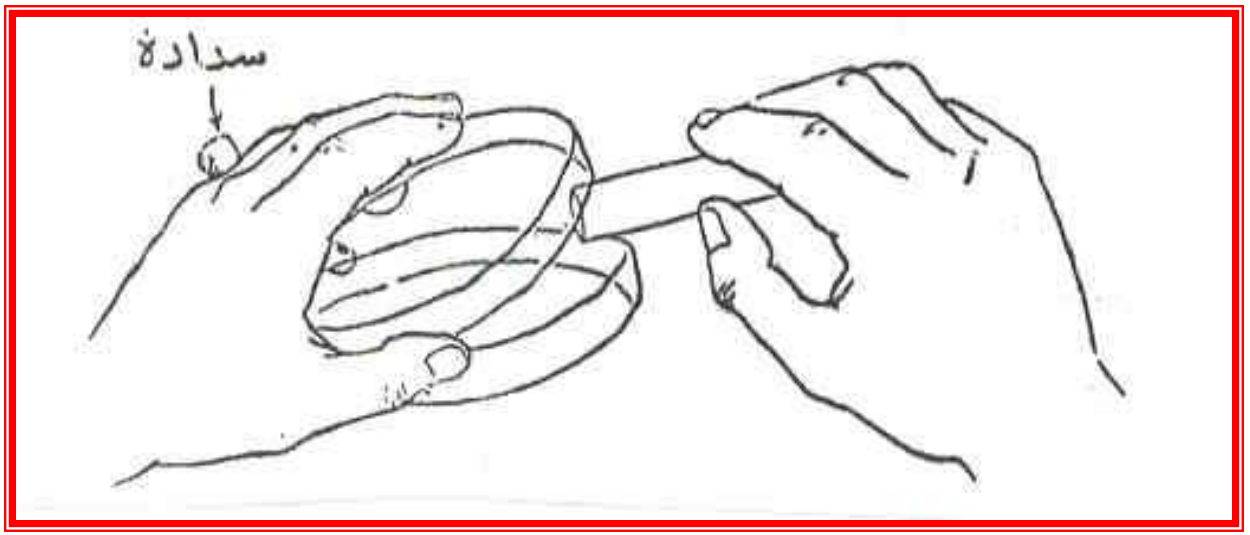
يذاب مستخلص اللحم والببتون في كمية من الماء وتخلط جيدا ، ثم يكمل الحجم بالماء إلى لتر ثم يضبط رقم الحموضة (pH) عند 7.2 ثم تعبأ وتعقم .

ج- وسط الأجار المغذي Nutrant agar

وهي نفس تركيب الوسط السابقة مع إضافة 15-20 جم أجار / لتر .

كذلك يمكن تقسيم الأوساط على أساس قوامها إلى :-

1. اوساط صلبة Solid media : مثل شرائح البطاطا أو الجزر0
2. اوساط صلبة قابلة للإسالة Solid-reversible to liquid : مثل الأوساط التي يدخل في تركيبها الأجار أو الجيلاتين0
3. اوساط نصف صلبة Semisolid media : وهى اوساط تحتوي على كمية من الأجار لا تزيد عن ربع الكمية التي تضاف إلى الأوساط الصلبة القابلة للإسالة0
4. اوساط سائلة Liquid media : وهى اوساط لا يضاف إليها الأجار أو الجيلاتين0



شكل (2) : طريقة صب وسط الأجار في طبق بتري 0

التعقيم Sterilization

يعتبر الحصول على مزارع نقية من الكائن الحي الممرض للنبات من أهم الأسس التي تعتمد عليها الدراسات الميكروبية (فطريات - بكتيريا) ويقصد بالمزرعة النقية تلك المزرعة التي ينمو بها نوع واحد فقط من الكائنات الحية الدقيقة . ويتطلب لنمو هذه الكائنات الحية الدقيقة اوساط غذائية معقمة واستخدام أدوات معقمة وفي أماكن معقمة. ويمكن أن نعرف التعقيم بأنه عبارة عن العملية أو العمليات التي تعمل على قتل أو إزالة كل الكائنات الحية الدقيقة من الوسط المراد تعقيمه ، سواء كان هذا الوسط ، وسط غذائي أو محاليل أو أماكن . وتختلف طرق التعقيم المستخدمة حسب طبيعة المادة المراد تعقيمها .

وعادة يتم التعقيم بأتباع طرق تعتمد على أسس فيزيائية أو كيميائية أو ميكانيكية

أولا : الطرق الفيزيائية Physical methods:

وفيها تستخدم الحرارة أو الإشعاع في أغراض التعقيم ، غير أن التعقيم الحراري هو أكثر أنواع التعقيم شيوعا .

الحرارة :

وهى قد تكون حرارة جافة مثل اللهب المباشر والتلهيب بالكحول وأفران الهواء الساخن ، وقد تكون حرارة رطبة كما في حالة استخدام جهاز الأوتوكليف ومعقم أرنولد .

أ- التعقيم بالحرارة الجافة :

1- استعمال اللهب المباشر :

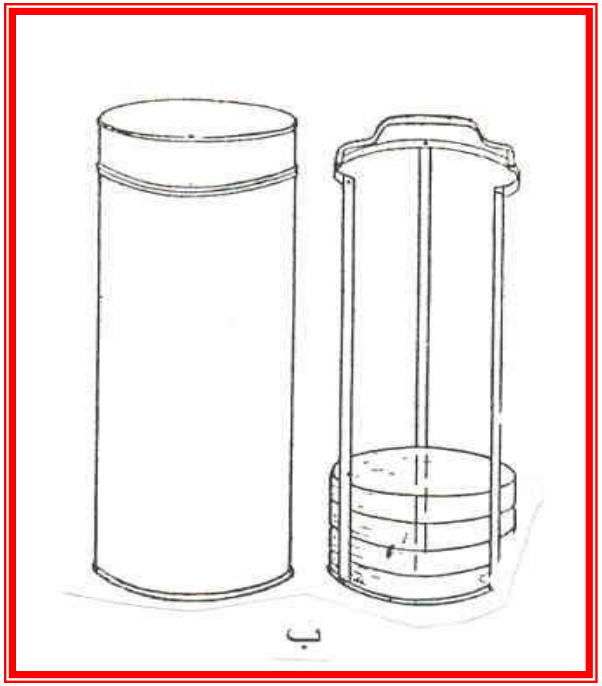
حيث يستخدم لهب موقد بنزن المباشر لتعقيم الهواء المحيط بمكان العزل والتنقية للكائنات الحية الدقيقة ، وكذلك لتعقيم إبر التلقيح بالتسخين لدرجة الاحمرار لقتل كل الكائنات العالقة بها ثم تترك لفترة ثوان قليلة تستخدم بعدها في تلقيح المزارع النقية .

2- التلهيب الكحولي :

وفيه تغمر الآلة المراد تعقيمها في كحول إيثايل تركيزه 80-90 % ثم تعرض للهب المباشر فيشتعل ما بها من كحول ويعمل على قتل الكائنات الحية الدقيقة التي تكون عالقة بها وتمتاز هذه الطريقة بسرعتها ، إلا أنه يجب استعمال الأدوات التي تعقم بهذه الطريقة مباشرة بعد تعقيمها .

3- التعقيم بالهواء الساخن :

ويستخدم لذلك الفرن الكهربائي ، وهو عبارة عن جهاز له ثلاثة جدر معدنية ، يوجد بينها فراغات يمر فيها الهواء الساخن ، ويغطى الجدار الخارجي بمادة عازلة كالأسبستوس لتقليل الفقد الحراري . ويستخدم الفرن الكهربائي لتعقيم الأدوات الزجاجية مثل أنابيب الاختبار والماصات وأطباق بتري ، كما يستخدم في تعقيم بعض الزيوت المعدنية مثل زيت البراقين والزيوت النباتية المختلفة. وعند الاستعمال ترفع درجة حرارة الهواء داخل الفرن إلي 160- 180م ويترك هكذا لمدة 2-3 ساعات ، بعدها يوقف التسخين ويترك الفرن ليبرد تدريجيا حتى درجة حرارة الغرفة تجنبا لكسر الأدوات الزجاجية أو تلوثها. هذا ويراعى أن توضع أطباق بتري والماصات في علب معدنية أو نحاسية خاصة ذات غطاء يحكم غلقه قبل تعقيمها كما في الشكل رقم (3) .



شكل (3) : ا- فرن الهواء الساخن للتعقيم الحراري الجاف .
ب- علبة معدنية والحامل الذي ترص به الأطباق .

ب- التعقيم بالحرارة الرطبة Moist heat

ويقصد بذلك استخدام بخار الماء في التعقيم بدلا من الهواء الساخن ، وقد يستخدم بخار الماء مباشرة أو يضغط إلي ضعف الضغط الجوي العادي . ومن الأجهزة المستخدمة في التعقيم بالحرارة الرطبة ما يلي :-

1- معقم أرنولد Arnold sterilizer :

عبارة عن جهاز معدني ، مبطن بطبقة عازلة للحرارة وبه أرفف مثقوبة تساعد على مرور البخار إلي كل أجزاء الجهاز ، ويوجد في أعلى الجهاز فتحة يوضع بها ترمومتر لقياس درجة الحرارة داخل الجهاز أثناء التعقيم .

وعند تشغيل الجهاز يجب أن يكون مستوى الماء عند الارتفاع المناسب في الخزان، وتوضع المواد المراد تعقيمها على الأرفف ثم يقفل الباب وترفع درجة الحرارة ليغلي الماء تحت الضغط الجوي العادي وعندما تصل الحرارة داخل الجهاز إلي 001ْم يحسب الوقت اللازم للتعقيم وهو من 5,.-1 ساعة حسب طبيعة وحجم المادة المراد تعقيمها .

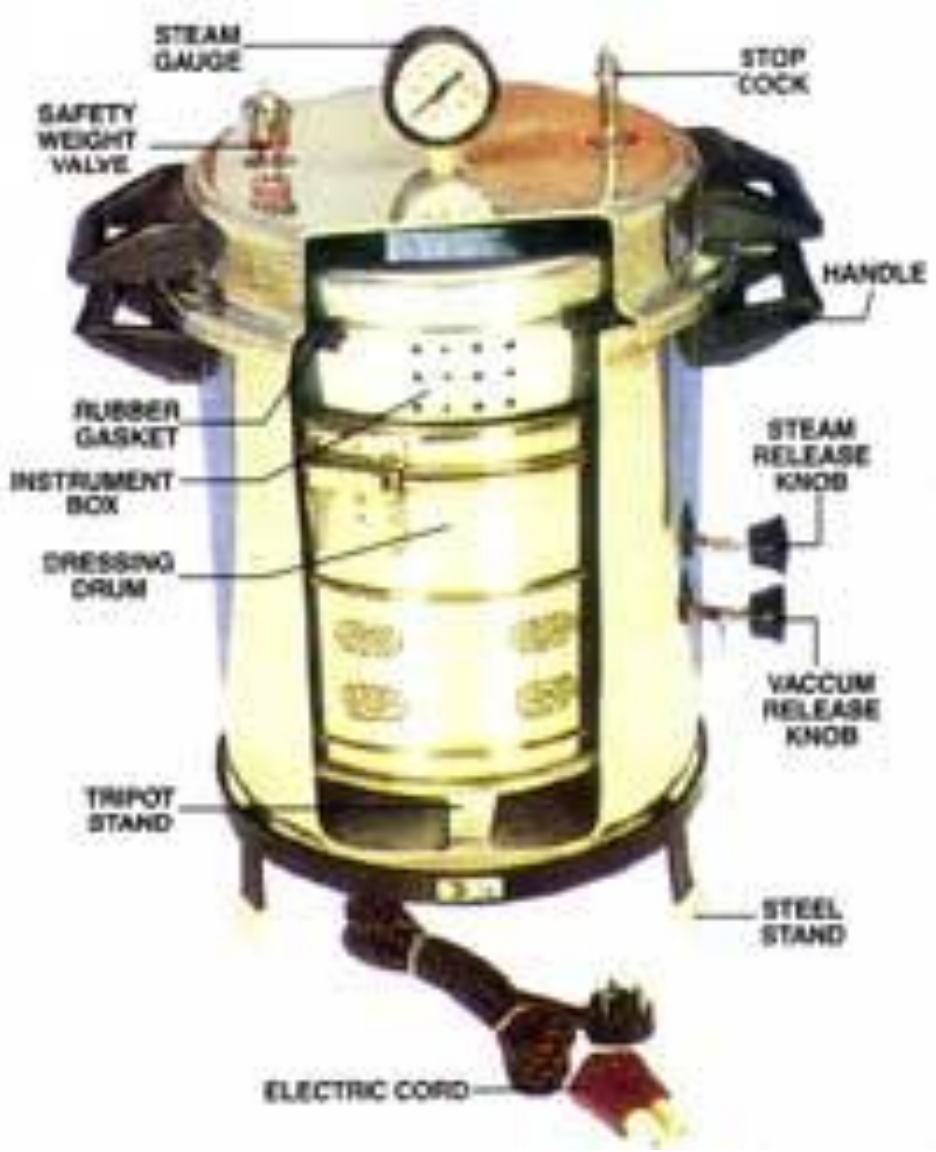
والتعقيم في هذا الجهاز يتم علي ثلاث مرات في ثلاثة أيام متتالية ، لذلك يعرف هذا التعقيم بالتعقيم المتقطع ، حيث يعقم بهذه الطريقة الأوساط التي يدخل فيها الجيلاتين واللبن والسكريات التي يخشى من تحللها إذا عقمت تحت ضغط مرتفع0

شكل (4) : معقم أرنولد

2- الأوتوكليف Autoclave :

عبارة عن جهاز له اسطوانة معدنية وغطاء يقفل بإحكام بعد أن توضع به المواد المراد تعقيمها . ويوضح الشكل رقم (5) تركيب الجهاز ومكوناته المختلفة . وقبل تشغيل الجهاز يجب التأكد أن مستوى الماء عند الارتفاع المناسب وأن الصنبور -أ- مفتوحا ، بعدها يبدأ في تشغيل الجهاز سواء أكان بالغاز أو الكهرباء . وعندما يبدأ خروج البخار من الصنبور -أ- يغلق هذا الأخير لأن ذلك يعنى طرد كل الهواء من داخل الجهاز وامتلاءه بالبخار . يترك البخار ينضغط داخل الجهاز حتى يصل إلى الضغط المطلوب وهو 15رطل / بوصة2 ويعرف ذلك من المانومير المتصل بالجهاز ، وعند هذا الضغط تكون درجة حرارة البخار داخل الجهاز 6.121ْم وعندها يبدأ حساب الوقت اللازم للتعقيم وهو عادة من 15-20دقيقة . بعد انقضاء هذا الوقت يوقف مصدر التسخين ويترك الجهاز حتى ينخفض الضغط ودرجة الحرارة تدريجيا حتى يصل مؤشر المانومتر إلى درجة الصفر، بعدها يفتح الصنبور -أ- ثم يفتح غطاء الجهاز وتخرج الأدوات المعقمة .

يستخدم الأوتوكليف في تعقيم كثير من الأوساط الغذائية ، ومحاليل السكريات الأحادية ومحاليل الأملاح ، وكذلك في تعقيم الملابس والقفازات والتربة ، وفي قتل المزارع الفطرية والبكتيرية القديمة قبل التخلص منها .



شكل (5) : قطاع طولي في الأوتوكليف

الإشعاع Radiation

من المعروف أن لبعض الإشعاعات تأثير ضار علي خلايا الكائنات الحية الدقيقة ، ويستغل هذا التأثير الضار في تعقيم غرف العمليات الجراحية ، وغرف التلقيح الملحقة عادة بمعامل الفحص الميكروبي ، وفي محطات الحجر الزراعي لتطهير المنتجات الزراعية مما قد تحتويه من كائنات ممرضة يخشى انتقالها من مكان إلى آخر ، كما يمكن تعقيم أطباق بتري أو الماصات المصنوعة من البلاستيك .

ومن الإشعاعات المستخدمة في هذا المجال :-

الأشعة فوق البنفسجية : وهى أكثر استخداما في تعقيم المواد السابق ذكرها ، وذلك بطول موجه من 260-270 n m وهو النطاق الفعال في إبادة الأحياء الدقيقة ، وهذه الأشعة قدرتها ضعيفة على التغلغل داخل المواد ، لذلك فإن تأثيرها يكون سطحي غالبا .

الإشعاعات الأخرى : مثل الأشعة السينية x-ray ذات الموجات القصيرة ، وكذلك أشعة جاما ذات طول موجه بين 005, - 1 n m ، وهذه الإشعاعات لها قدرة عالية على اختراق والتغلغل داخل الأجسام الصلبة .

ثانيا : الطرق الكيميائية Chemical methods

وفيها يستخدم بعض المواد الكيماوية التي لها تأثير سام أو مميت أو موقف لنمو الكائنات الحية الدقيقة ، وتستخدم هذه المواد الكيماوية في صورة محاليل لتعقيم المواد التي لا يمكن تعقيمها بالحرارة .

ومن المواد الكيماوية المستخدمة في التعقيم :

كحول الإيثايل : يستخدم بتركيز 50-70% لتطهير الأيدي 0

الفينول : يستخدم بتركيز 2-5 % لتعقيم أرضيات الغرف والمعامل ، وكذلك تعقيم أسطح المناضد التي يجرى عليها عمليات العزل والتنمية للكائنات الحية الدقيقة ، وأيضا في تعقيم بعض الأدوات والأجهزة .

الكلوركس : والمادة الفعالة فيه هي صوديوم هيبوكلوريت ، ويستخدم بتركيز 10% في التعقيم السطحي للأجزاء النباتية المصابة تمهيدا للعزل منها ، ويستخدم كذلك في تعقيم أسطح المناضد وغيرها .

كلوريد الزئبقيك : ويطلق عليه "السليماني" ويستخدم بتركيز 1, % في تعقيم المواد السابق ذكرها في الكلوركس .

أكسيد الإيثلين : ويستخدم في تعقيم أطباق بتري البلاستيكية أو في تعقيم أي مواد قد تنصهر على درجة حرارة أعلى من 001ْم .

ثالثا : الطرق الميكانيكية Mechanical methods :

تعتمد فكرة التعقيم بالطرق الميكانيكية على حجز أو إزالة الكائنات الحية الدقيقة من الوسط الموجودة فيه ، وذلك باستخدام مرشحات ذات ثقوب أقطارها تقل عن حجم الكائنات المراد عزلها ، وتستخدم هذه الطريقة عند تعقيم المواد التي يخشى عليها من التحلل بالحرارة مثل الإنزيمات والمضادات الحيوية وسيرم الدم والفيتامينات . ويستخدم في ذلك مرشحات يتراوح قطر ثقوبها بين أقل من ميكرون إلي عدة ميكرونات ، وفي الواقع لا يتوقف التعقيم بالترشيح على قطر الثقوب فقط بل يتوقف أيضا على الشحنة الكهربائية لكلا من المرشح والسائل المراد ترشيحه بما فيه من كائنات دقيقة .

ومن المرشحات المستخدمة في ذلك :

مرشح زايتس Seitez filter : وهو يحتوى على أقراص مختلفة القطر والسمك من مادة الأسبستوس ويراعى ضرورة تعقيم الجهاز قبل استعماله وذلك بوضعه كاملا في الاوتوكليف بعد تغليفه بالورق وسد الفتحة الجانبية للدورق بسدادة من القطن شكل (6) 0

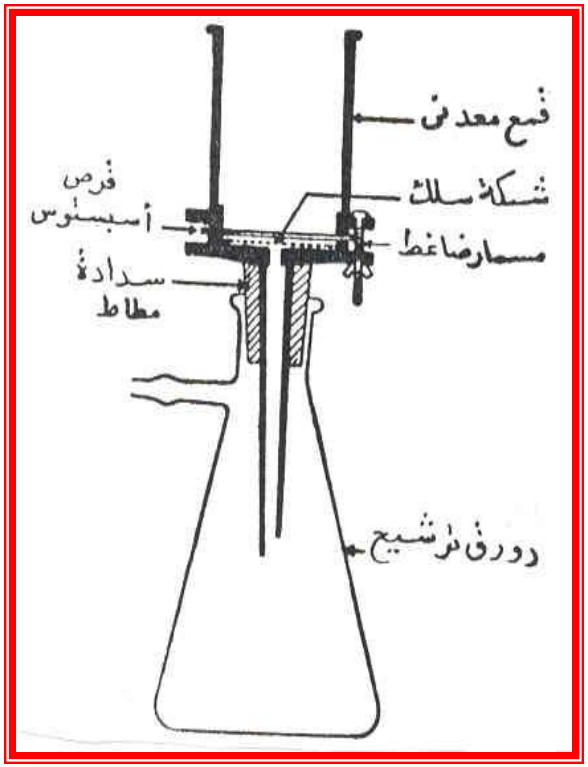
مرشحات الزجاج المسامي Sintered glass : والمرشح عبارة عن قمع زجاجي مثبت به طبقة من الزجاج المسامي ، ويوجد من هذه المرشحات خمس درجات تبعا لقطر ثقوبها، والنوع رقم 5 ذو قطر مسامي أضيق من الأنواع الأخرى شكل (7) 0

المرشحات الغشائية : ومن أمثلتها ما يعرف بمرشح المليبور Millipore filter والذي يتكون من أغشية رقيقة مصنوعة من استرات السيليولوز .

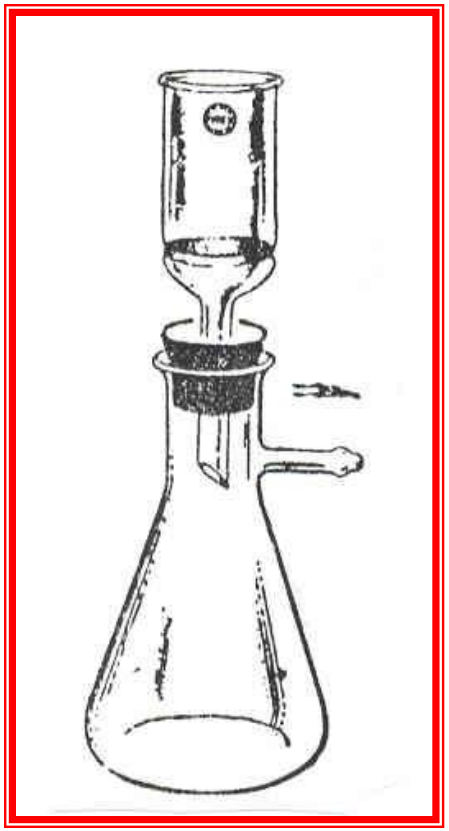
مرشح عجينه باريس : وهو مصنوع من عجينه باريس ، وهي نوع من الجبس يتكون من كبريتات كالسيوم مع
كربونات كالسيوم وأكسيد مغنسيوم .

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

مرشح بيركفيلد Berkefeld filter : وهو مصنوع من الطين الدياتومي .



شكل (6) : قطاع طولي في مرشح زايتس



شكل (7) : مرشح الزجاج المسامي

علم أمراض النبات Plant Pathology أو Phytopathology

☺هو علم تطبيقي يهدف إلى حل مشكلة المرض النباتي ، فهو يعنى بدراسة الأمراض النباتية و كافة الظروف المؤثرة عليها بهدف مكافحتها.

☺تعتمد دراسة علم أمراض النبات على دراسة علوم أخرى بحتة وتطبيقية. وتشمل علوم الكائنات الدقيقة والنبات والأراضي والأرصاد الجوية، وإنتاج المحاصيل، والبساتين، والاقتصاد الزراعي، والكيمياء الحيوية، والوراثة، والتكنولوجيا الحيوية.

المرض النباتي Plant Disease

- عبارة عن نشاط فسيولوجي ضار ينشأ داخل النبات مما يعيق النبات عن القيام بوظائفه الحيوية نتيجة لإصابة النبات بكائنات حية , فيروس , أو نتيجة لتعرض النبات لظروف بيئية غير مناسبة وهذا بدوره ينعكس علي النبات في صورة أعراض ظاهرية.

مصطلحات أساسيه فى أمراض النبات

- المرض Disease – الأمراض المعديه .
- اضطراب Disorder – الاضرار المتسببة عن عوامل غير معدية .
- الأذى Injury – وهو ما تسببه الحشرات والقوارض للنباتات.
- الممرض Pathogen – هو مسبب المرض.
- القدره المرضية – Pathogenicity – هى قدرة الكائن على إحداث مرض معين .
- العائل – Host – هو النبات الذى يهاجمه الممرض .
  - عائل قابل للإصابة – Susceptible host.
  - عائل مقاوم للإصابة – Resistant host.

- يستخدم تعبير مرض disease لوصف الخلل الناتج عن الإصابة بأحد العوامل الحية أو الفيروسات .

- توصف أنواع الخلل الراجعة إلى العوامل غير الحية بأنها" اضطرابات disorders " أو "اضطرابات فسيولوجية physiological disorders"

- هناك عوامل أخرى تحدث الضرر بالنبات ولكنها ليست بأمراض **pathogens** ، ومن الأمثلة على ذلك مهاجمة الآفات الحشرية والحيوانية **insect and animal pests** أو إلى الظروف البيئية القاسية.

- يعرف ما تسببه هذه العوامل بأنه " أذى **injury** " .

- يكمن الفارق بين المرض **disease** والأذى **injury** ، فى أن الأخير يحدث ضرر ميكانيكى و ليس فسيولوجى للنبات كما أنه يحدث خلال فترة و جيزة من الزمن .

الخسائر المتسببة عن الأمراض النباتية

LOSSES DUE TO PLANT DISEASE

يعتبر تقدير الخسائر المتسببة عن الأمراض هاما للأسباب التالية :

- المساعدة على وضع الأولويات لبرامج المكافحة، والتى يجب أن توجه البحوث إليها.
- مساعدة الزراع والمنتجين على اتخاذ قرار المكافحة فى الوقت المناسب للحفاظ على الموارد .
- تقنين مدى إنفاق المعاهد البحثية و الشركات لحل مشكلة المرض.

رغم ذلك فإنه يصعب الحصول على تقدير دقيق للخسائر .

الخسائر الناشئة عن الأمراض النباتية

- **أولا: خسائر مباشرة:**

وهى الخسائر التى تترتب على حدوث المرض مباشرة .

- **ثانيا خسائر غير مباشرة:**

و تتضمن التأثيرات الى تنعكس على المجتمع .

أولا:الخسائر المباشرة:

وهى الخسائر المترتبة عن حدوث مرض ما فى نفس موسم الزراعة وتتضمن الآتى:

- الخسارة فى كمية المحصول
- الخسارة فى جودة المحصول
- تكاليف المكافحة
- تكاليف إعادة الزراعة
- تكاليف الفرز و التدريج الإضافية
- غرامات عدم توريد السلعة أو تصديرها
- تلوث الوسط

ثانياً: الخسائر غير المباشرة :

وتتضمن التأثيرات الى تنعكس على المجتمع مثل:

- التأثيرات الاقتصادية و الاجتماعية و الصحية التى تحدث على مستوى المزرعة والعاملين بها .
- التأثيرات الاقتصادية و الصحية التى تنعكس على المستهلك
- التأثير على التجارة
- الأعباء التى تتحملها الدولة