جامعة الموصل
كلية التربية للعلوم الصرفة
قسم علوم الحياة
المرحلة الثالثة

محاضرات
الفطريات العملي
2025 - 2024

مدرسو المادة

م.د. رافع قاسم محمد
م.د. زينة وجيه حميد

م. محمد زغلول سعيد
م.د. نور عامر محمد علي

التعقيم Sterilization

هي عملية إزالة او قتل جميع الاحياء المجهرية الموجودة في او على سطح مادة معينة. والغرض منها هو الحصول على مزارع نقية لكائنات حية معينة ودراسة خصائصها المتعددة تجنبا للنتائج الخاطئة التي ممكن ان تحدث نتيجة التلوث بكائنات حية مجهرية اخرى .

هناك ثلاث طرائق للتعقيم هي :

1. طرائق فيزيائية
2. طرائق كيميائية
3. طرائق ميكانيكية

1)الطرائق الفيزيائية

تقسم الى قسمين اساسيين :

أ. التعقيم بالحرارة Heating: تعد من أكثر الطرائق استخداما في التعقيم وهناك علاقة بين درجة الحرارة والزمن فعند اختيار أي وسيلة تعقيم بالحرارة يجب استخدام درجة الحرارة والزمن المناسبين لقتل جميع الاحياء المجهرية .

من وسائل التعقيم بالحرارة :

1. استخدام الهواء الساخن الرطب المضغوط Moist hot air under pressur
الجهاز المستخدم في هذه الطريقة هو المعقام (المؤصدة) Autoclaveويعتمد هذا الجهاز على اساس زيادة ضغط بخار الماء بحيث ترتفع درجة الحرارة فوق درجة الغليان وعند وصول الضغط الى درجة 15 باوند / انج2 تكون الحرارة قد وصلت الى درجة 121 مْ وهي كافية لقتل جميع الكائنات الدقيقة وابواغها الموجودة في او على العينات المراد تعقيمها ، وكي يبقى الضغط ثابتا عند 15 باوند / انج2 هناك صمام يفتح تلقائيا عند وصول الضغط الداخلي الى الحد المطلوب .
ويفضل ان تكون فترة التعقيم من 15-20 دقيقة تحت هذه الظروف ويقطع التيار الكهربائي عن الجهاز بعد الانتهاء من التعقيم ويفتح صمام الامان ويترك الجهاز ليبرد تدريجيا الى ان يصل الضغط الداخلي الى درجة الصفر (الضغط الداخلي يساوي الضغط الخارجي) .

2. استخدام الهواء الساخن الجاف Dry hot air
يستخدم في هذه الطريقة جهاز الفرن Oven وهو جهاز معزول عن المحيط الخارجي بشكل جيد ونستطيع التحكم بدرجات الحرارة فيه اذ يعطي درجات حرارة عالية ويفضل النوع ذو المروحة الداخلية ، وتستخدم هذه الطريقة في تعقيم المواد الزجاجية والمعدنية إذ تغسل المواد الزجاجية جيدا (كأنابيب الاختبار واطباق بتري والماصات والدوارق والبيكرات) ثم تترك لتجف وبعدها توضع داخل الفرن بشكل غير مرصوص لتسمح للهواء الساخن بالدوران داخل الفرن وان يتخللها جميعا، لايمكن استخدام هذه الطريقة لتعقيم السوائل او المواد العضوية التي تتلف بالحرارة.
تعد درجة 160 – 170 مْ ولمدة ساعتين كافية لقتل جميع الاحياء المجهرية وان الوقت اللازم للتعقيم يحسب من فترة وصول درجة حرارة الفرن الى الدرجة المطلوبة , عند الانتهاء من التعقيم يطفئ الجهاز ويجب تجنب فتحه بشكل مفاجئ الإ بعد انخفاض درجة حرارة الفرن ووصولها الى درجة حرارة الغرفة .

3. استخدام اللهب المباشر Flame
تستخدم هذه الطريقة في تعقيم المواد التي لاتتلف عند تعريضها للحرارة المباشرة كإبر التلقيح ذات النهاية المستقيمة Needleاو الناقل ذو العروة Loop إذ يتم تعريضها الى اللهب مباشرة حتى درجة الاحمرار ويستخدم مصباح بنزن او المصباح الكحولي لهذا الغرض .
إبر التلقيح تصنع عادة من معدن البلاتين او الكروم إذ تمتص الحرارة بسرعة وتفقدها بسرعة.

4. التلهيب الكحولي Alcohol flame
بهذه العملية يتم غمر المواد المعدنية كالملاقط والمقصات بالكحول ثم تلهيبها بلهب مصباح بنزن وتكرر العملية مرتين او ثلاث.

ب. التعقيم بالاشعاع Radiation
هناك اطوال موجية ضمن اشعة الطيف تكون فعالة في قتل الاحياء المجهرية ومنها الاشعة فوق البنفسجية Ultraviolet raysوالتي تقع اطوالها الموجية بين 210 – 320 نانوميتر وتستخدم هذه الطريقة في تعقيم المساحات الواسعة كصالات العمليات وغرف الزرع والمختبرات وتعقيم الاغذية في مصانع التعليب والادوية، ويستخدم لهذا الغرض اجهزة فيها مصابيح خاصة ينبعث منها هذا النوع من الاشعة.
كما تستخدم الاشعة السينية X raysواشعة كاما Gamma rays في هذا النوع من التعقيم ولكن بنطاق محدود لما لها من تأثيرات ضارة على صحة الانسان.

2) الطرائق الكيميائية :
تستخدم الكثير من المواد الكيميائية في تعقيم الارضيات والمناضد والجدران والايدي وتعد من الطرائق الغير كفوءة في التعقيم لان الكثير منها لاتقتل الجراثيم وانما تثبطها كما ان البعض منها تقتل الاشكال الخضرية للجراثيم ولا تؤثر على ابواغها كما انها تترك مخلفات على المواد المعقمة بها.

ان أساس عمل المواد الكيميائية كمواد معقمة يعتمد على عدة نقاط :
1. ان تكون آمنة الاستخدام وغير مؤثرة على الانسان.
2. ان تكون ذات فعالية عالية في قتل الاحياء المجهرية .
3. ان تكون متوفرة ورخيصة الثمن وسهلة الاستعمال .
من المواد الكيميائية المستخدمة في التعقيم الكحول الاثيلي والكحول المثيلي والكلوروفورم والفورمالين .
وتسمى المادة التي تقتل الفطريات Fungicidalاما المادة التي تثبط الفطريات فتسمى Fungistatic.

3) الطرائق الميكانيكية
من أهمها طريقة الترشيح Filteration، ان مبدأ هذه الطريقة يعتمد على الحجز الميكانيكي للاحياء الدقيقة على النقيض من الحرارة التي يعتمد مبدأ عملها على قتل الاحياء الدقيقة. وتستخدم مرشحات خاصة غشائية عملها يشبه عمل المنخل المجهري وهناك انواع كثيرة من هذه المرشحات منها الياف الزجاج والسيليلوز ومرشح زايتس Seitz filterوهو مرشح قرصي مصنوع من مادة الاسبستوس وجميع هذه المرشحات قطر مساماتها اصغر من قطر الاحياء المجهرية فهناك مرشحات يصل قطر مساماتها الى حدود 0.2 مايكرون وهو اصغر من قطر البكتريا وابواغ الفطريات. ويمكن اختبار دقة الطريقة وضمان تعقيم السوائل المرشحة قبل استخدامها وذلك بتلقيح وسط زرعي مناسب بقليل من السائل المرشح ويحضن الطبق عند درجة حرارة مناسبة ولفترة كافية والتأكد من عدم ظهور اي نمو للاحياء المجهرية على سطح الطبق.
وتستخدم هذه الطريقة في تعقيم المواد السائلة التي تتلف بالحرارة مثل الدم والمصل والبروتينات والانزيمات والمضادات الحيوية . يمكن استخدام الضغط الموجب او السالب في هذه الطريقة فالضغط الموجب يسلط على سطح المحلول من الاعلى فيدفعه للمرور من خلال المسامات الى الاسفل. اما الضغط السالب فيكون من خلال تفريغ الهواء من اسفل الغشاء مما يؤدي الى سحب المحلول الى الاسفل ويتم التفريغ بأستخدام مفرغات هواء مناسبة.

الاوساط الغذائية The media

ويعرّف الوسط الغذائي Medium بانه المادة التي يمكن للكائن الحي المجهري ان ينمو ويتكاثر عليها وتحضّر مختبريا وتحوي خليط من المركبات وبتراكيز مختلفة.
ويجب ان تتوفر في الوسط الغذائي او الوسط الزرعي Culture mediumعناصر التغذية والتي تعرف بالمغذيات Nutrientsمثل الكاربوهيدرات والنايتروجين والكبريت والفوسفات واملاح معدنية مثل البوتاسيوم والمغنيسيوم والحديد والصوديوم وغيرها.
وتختلف الاوساط التي تنمى فيها الفطريات عن تلك التي تنمى فيها البكتريا إذ تفضل الفطريات احتواء الوسط الغذائي على كاربوهيدرات وان تكون درجة حموضة الوسط (pH)بين (5 – 6) بينما تفضل البكتريا احتواء الوسط على بروتينات ودرجة حموضة بين (7 – 8)، وعلى الرغم من اختلاف البيئات المستخدمة في تنمية البكتريا والفطريات الا انها تكون متشابهة من حيث عمليات تحضيرها وتعقيمها وصبها في أطباق بتري او أنابيب اختبار او دوارق زجاجية.

ويتم تنمية بعض انواع الفطريات الرمية والطفيلية الاختيارية في مختبرات بحوث الفطريات لاغراض علمية مختلفة منها دراسة طبيعة تلك الانواع وتشخيصها وتصنيفها او لمعرفة العوامل البيئية التي تحدد نموها وتكاثرها او لغرض الحصول على بعض المشتقات الايضية ذات الاهمية الاقتصادية مثل الفيتامينات والاحماض العضوية والمضادات الحياتية او اجراء بعض العمليات التقنية كأن تعزل الاجناس والانواع المختلفة ثم تنمى بصورة نقية لدراسة الصفات المظهرية والفسلجية للمزرعة الفطرية وكذلك تستخدم الاوساط الزرعية لحفظ المزارع الفطرية.

تقسم الأوساط الغذائية من حيث القوام الى :

1. أوساط غذائية صلبة Solid

وهي نوع من الاوساط الغذائية مضافاً اليها مادة الأكار Agarالتي تعطي للوسط الزرعي صفة الصلابة، تمتاز الأوساط الصلبة بسهولة الإستعمال والنقل وسهولة كشف التلوث فيها، كما تستخدم بنجاح في عزل وتنقية انواع الفطريات كذلك في حفظ مزارع الفطريات المختلفة لفترات زمنية طويلة وتحضر هذه الاوساط اما في اطباق بتري او انابيب اختبار.

2. أوساط غذائية شبه صلبة Semi solid

وهي أوساط ذات قوام جيلاتيني وتحتوي على نصف او اقل من كمية الأكار التي تحتويه الاوساط الصلبة وتستخدم هذه الاوساط لأغراض خاصة منها دراسة التراكيب التكاثرية المتحركة للفطريات.

3. أوساط غذائية سائلة Liquid

وهي الاوساط المحضرة بدون اضافة مادة الاكار، تستخدم الاوساط السائلة عندما تكون الفطريات منتجة للابواغ المتحركة Zoospores وكذلك في الدراسات الوزنية والحجمية، اذ يكمن وزن الغزل الفطري كما تستخدم هذه الاوساط في الدراسات الايضية الثانوية للفطريات مثل افراز المضادات الحياتية والسموم والانزيمات وغيرها وتحضر هذه الاوساط عادة في دوارق مخروطية مختلفة الاحجام وحسب نوع الدراسة.

ولتصليب الوسط الغذائي السائل فانه يضاف الى الوسط مادة الأكار او الجيلاتين .

الأكار Agar

مادة كاربوهيدراتية معقدة التركيب تستخرج من الطحالب الحمراء التي تعيش في البحار ويوجد منها عدة انواع تجارية وتستخدم لتصليب الوسط الغذائي وهو بشكل مسحوق يميل لونه للاصفرار وليس له قيمة غذائية ولايستطيع الكائن الحي ان يحلله ويضاف الاكار بنسبة 1.5 – 2% من الوسط الغذائي ويذوب بدرجة حرارة 95 – 100مْ ويبقى سائلا بدرجة 45 – 50 مْ ويتصلب بدرجة 32 – 42 مْ .

الجيلاتين Gelatin
مادة بروتينية ذات قيمة غذائية ناقصة تضاف بنسبة 10 – 15% من الوسط الغذائي المراد تحضيره ، من مساوئه انه يذوب بدرجة 30 – 35 مْ وهو عرضة للتحلل من قبل بعض انواع البكتريا وبذلك يفقد خاصية التصليب بمرور الزمن ولهذين السببين لايفضل استعماله في التصليب.

انواع البيئات او الاوساط الغذائية من حيث مكوناتها :

1) البيئات او الاوساط الغذائية الطبيعية Natural media
وهي الاوساط التي تتكون من مواد او مركبات غير معروفة وغير محددة التركيب الكيميائي وغير معروفة الكمية ايضا فالمصدر الغذائي عبارة عن مادة غذائية نباتية او حيوانية مثل خلاصة الذرة او خلاصة الجزر او خلاصة البطاطا او خلاصة الشعير او التفاح او خلاصة اللحم او خلاصة الكبد او وسط سدادات البطاطا .

2) البيئات او الاوساط التركيبية Synthetic media
وهي الاوساط التي تتكون من مواد او مركبات معروفة التركيب الكيميائي ومعروفة الكمية ايضاً وقد يضاف اليها الاكار عند تحضير وسط صلب او لايضاف عند تحضير وسط سائل. وقد امكن تحضير عدد من هذه الاوساط واخذت اسماء العلماء الذين قاموا بتحضيرها ومن هذه الاوساط :
وسط زابكس دوكس Czapecks Dox,s mediumو وسط ريتشارد Richard's medium

3) البيئات او الاوساط الشبه تركيبية Semi synthetic media
وهي الاوساط التي يدخل في تركيبها مواد طبيعية غير معروفة التركيب الكيميائي ومواد اخرى معروفة التركيب الكيميائي والكمية.

من اشهر هذه الاوساط واكثرها استخداماً:
وسط مستخلص البطاطا والدكستروز والاكار Potato Dextrose Agar Medium (PDA)ويعد من اكثر الاوساط استخداما في مختبرات الفطريات فهو مناسب لنمو عدد كبير من انواع الفطريات، ويتكون من :

المادة	الكمية
بطاطا	200 غرام
دكستروز	20 غرام
اكار	20 غرام
ماء مقطر	1 لتر

طريقة التحضير :
تغســـل درنات البطاطا جيداً ثم تقشر وتقطع الى شرائح او مكعبـات صغيرة ويوزن 200 غرام منها ويضاف اليها 500 مليلتر من الماء المقطر في اناء زجاجي (Beaker)ومن ثم يـتم غليـــها (20-30 دقيقة) حتى النضج، بعدها ترشح خلال قطعة من الشاش ثم يؤخذ الراشح ويضاف اليه الدكستروز والاكار ثم تسخن مع التحريك المستمر الى حين ذوبان مكونات الوسط ثم يكمل الحجم الى لتر واحد بالماء المقطر وتعقم بعدها بجهاز المعقام ثم توزع في اطباق بتري او انابيب اختبار.

طريقة تحضير الاوساط الغذائية الصلبة المائلة Slants

لغرض الاحتفاظ بالمزارع النقية للفطريات لحين الاستخدام يوزع الوسط الغذائي الصلب بعد تحضيره في قناني زجاجية صغيرة Vialsباستخدام قمع زجاجي وبكمية مناسبة (ثلث حجم القنينة) ثم تسد جيداً وتعقم ثم توضع بعد التعقيم بشكل مائل على مسند لغرض تصليب الوسط بشكل مائل من اجل زيادة المساحة السطحية لنمو الفطريات. ويفضل استخدام القناني الزجاجية على انابيب الاختبار لدورها في الحفاظ على مزارع الفطريات نقية لفترة طويلة من الزمن، وعند الرغبة بإستخدام المزرعة الفطرية النقية يُفتح غطاء القنينة بعناية ثم تعقم فوهة القنينة عن طريق فتح الفوهة قرب لهب مصباح بنزن وتدخل إبرة التلقيح المعقمة ويؤخذ جزء قليل من اللقاح (الغزل الفطري) ويفضل ان يؤخذ من حافة المستعمرة الفطرية لان الحافة تحوي نموات نشطة حديثة العمر ومستمرة في الانقسام وينقل الجزء المأخوذ الى اطباق بتري حاوية على وسط غذائي وتحت ظروف معقمة.

عزل الفطريات Isolation of Fungi

تتميز الفطريات في قدرتها على العيش في بيئات مختلفة اذ تتواجد في كل مكان من اليابسة والماء والمناطق المتجمدة في القطبين الشمالي و الجنوبي كما هي موجودة في خط الاستواء والمناطق المعتدلة وتوجد على ارتفاعات مختلفة في الجو وعلى اعماق مختلفة تحت سطح التربة وتوجد ملتصقة أو متطفلة على الأجزاء النباتية والحيوانية .

إن الهدف الحقيقي لعزل الفطريات قد يعزى إلى عدة أسباب منها :

1- الحصول على مزارع نقية Pure cultures لانواع الفطريات المعزولة من مصادرها المختلفة من اجل تشخيصها وتصنيفها .
2- التعرف على المحتوى الكمي والنوعي للفلورا الفطرية وتنوعها وترددها وسيادة أنواعها في البيئات المختلفة.
3- تشخيص الفطريات المرضية ودراسة حساسيتها للمضادات الفطرية.
4- تحديد الأنواع الصالحة للاكل او ذات الأهمية الطبية وتمييزها عن الأنواع السامة او المنتجة للسموم.
5- لاجراء العديد من الدراسات العلمية عليها كالتحري عن قدرتها على انتاج مركبات ايضية ثانوية مثل الاحماض العضوية وغيرها.

يمكن عزل الفطريات من مواقع مختلفة وبطرائق عدة منها :

1. عزل الفطريات من الهواء air Isolation from

لغرض التعرف على الفطريات الموجودة في الهواء وعزلها فانه يترك طبق بتري حاوي على وسط غذائي معقم مكشوفا لفترة معينة من الزمن (5-10 دقائق) في مكان الاختبار بصورة افقية وعلى ارتفاع 1 متر أو تحرك اليد الحاملة لقاعدة طبق بتري بصورة افقية من اليمين الى اليسار او عموديا من الاعلى الى الاسفل وبالعكس ثم يغطى الطبق بالغطاء ويوضع في الحاضنة عند درجة حرارة 25-27 مْ لمدة 5 أيام ثم تفحص الاطباق يوميا لملاحظة نمو الفطريات، ويوضع الطبق في الحاضنة بشكل مقلوب لتلافي نشوء قطرات الماء على السطح الداخلي لغطاء طبق بتري وبالتالي تجنب سقوطها على الوسط الغذائي واتلاف النمو الفطري.

2. عزل الفطريات من الماء Isolation from water

الطريقة المستخدمة لعزل الفطريات من الماء هي طريقة التخافيف Dilution methodاذ يؤخذ حجم معين من المصدر المائي (بركة او نهر او مستنقع ، .....) الذي يراد عزل الفطريات منه بواسطة قناني خاصة ومعقمة ثم يؤخذ 10 مل من العينة وتنقل الى دورق مخروطي معقم يحوي 90 مل من الماء المقطر المعقم فنحصل على التخفيف 10-1 ويرج المحلول ثم ينقل 1 مل من التركيز الاول وباستخدام ماصة معقمة الى انبوبة اختبار تحوي 9 مل من الماء المقطر المعقم فنحصل على التخفيف 10-2 ، نكرر العملية عدة مرات باستخدام ماصات معقمة مع رج الانبوبة في كل مرة لتتجانس محتويات الانبوبة وباستخدام جهاز الرج Vortexفنحصل على مجموعة تخافيف (10-3، 10-4، 10-5، ....) ثم ينقل 0.1 مل من التخفيف المطلوب (الاخير) الى طبق بتري معقم يحوي وسط غذائي ويفرش على سطح الوسط باستخدام الناشر Spreaderلتوزيع اللقاح بالتساوي على سطح الوسط الغذائي ويتم عمل ثلاث مكررات منها، كما تترك ثلاثة اطباق بدون تلقيح كمعاملة مقارنة، ثم تنقل الاطباق الى الحاضنة عند درجة حرارة 25-27 مْ لمدة 5 أيام وتفحص الاطباق بعدها لملاحظة نمو الفطريات ليتم عزلها وتنقيتها.

3. عزل الفطريات من التربة Isolation from soil

هناك طريقتان للعزل :

أ. طريقة التخافيف Dilution method

يؤخذ نموذج من التربة المراد عزل الفطريات منها وتزال الشوائب منها باستخدام منخل ثم يؤخذ 10 غم من التربة الجافة وتضاف الى دورق مخروطي حاوي 90 مل من الماء المقطر المعقم وترج ثم تترك لمدة 20 ثانية لتترسب دقائق التربة فنحصل على التخفيف 10-1 ثم ينقل 1 مل من التركيز الاول وباستخدام ماصة معقمة الى انبوبة اختبار تحـوي 9 مل من الماء المقطر المعقم فنحصل على التخفيف 10-2 ، نكرر العملية عدة مرات باستخدام ماصات معقمة مع رج الانبوبة في كل مرة لتتجانس محتويات الانبوبة وباستخدام جهاز الرج Vortexفنحصل على مجموعة تخافيف (10-3، 10-4، 10-5، .....) ثم ينقل 0.1 مل من التخفيف المطلوب الى طبق بتري معقم يحوي وسط غذائي ويفرش على سطح الوسط باستخدام الناشر Spreaderلتوزيع اللقاح بالتساوي على سطح الوسط الغذائي ويتم عمل ثلاث مكررات منها، كما تترك ثلاثة اطباق بدون تلقيح كمعاملة مقارنة، ثم تنقل الاطباق الى الحاضنـــة عند درجة حرارة 25-27 مْ لمدة 5 أيام وتفحص الاطباق بعدها لملاحظة نمو الفطريات ليتم عزلها وتنقيتها.

ب. الطريقة المباشرة Direct method

يؤخذ 0.1 غم من التربة (كمية قليلة جدا) نظيفة وناعمة على حافة مشرط معقم وتوضع على سطح وسط في طبق بتري معقم وبثلاث مكررات ثم يوضع عليها قطرة من الماء المقطر المعقم (لتوفير الرطوبة وتشجيع نمو الفطريات) وتفرش على سطح الوسط باستخدام الناشر Spreader كما تترك ثلاثة اطباق بدون تلقيح كمعاملة مقارنة، ثم تنقل الاطباق الى الحاضنة وتفحص بعد 5 ايام من التحضين.

4. عزل الفطريات من الانسجة النباتية المصابة

تقطع الانسجة النباتية المصابة الى قطع صغيرة بحدود 0.5 سم 2 من حافة البقعة المصابة بحيث تشتمل كل قطعة على النسيج المرضي والنسيج الذي يبدو سليما ثم توضع القطع في احد المحاليل المعقمة سطحيا مثل محلول هايبوكلورات الصوديوم NaOClبتركيز 1 % او كلوريد الزئبقيك $HgCl_2$ بتركيز 0.1 % لمدة 1- 3 دقائق وللتخلص من اثار المادة المعقمة تغسل بالماء المقطر المعقم ثم تجفف بوضعها على اوراق ترشيح معقمة ثم تنقل بواسطة ملقط معقم الى طبق بتري حاوي على وسط غذائي ويتم ترتيب القطع بحيث يحوي الطبق الواحد من 3- 5 قطع ثم تحضن الاطباق عند درجة حرارة 25-27 مْ لمدة 7 أيام وبعدها يتم ملاحظة نمو الفطريات لعزلها.

5. عزل الفطريات الداخلية Endophytic fungi من النباتات

الفطريات الداخلية Endophytic fungi هي الفطريات التي تغزو الانسجة الداخلية للنباتات الحية او الاجسام الثمرية للفطريات كالعراهين من دون ان تسبب اي اعراض مرضية عليها.

طريقة العمل :

تغسل الاجزاء النباتية (جذور او سيقان) او اجزاء من الجسم الثمري لفطر معين بماء الحنفية الجاري لاستبعاد حبيبات التربة العالقة بها او الانسجة النباتيــة المتأكلة، ثم تغمر في محلول هايبوكلورات الصوديوم NaOCl بتركيز5% لمدة 3 دقائق من اجل تعقيمها سطحياً، وللتخلص من اثار المادة المعقمة تغسل بالماء المقطر المعقم مرتين ثم تجفف بوضعها على اوراق ترشيح معقمة، تقطع الى قطع صغيرة بقياس 1 سم وتنقل الى اطباق بتري حاوية على وسط البطاطا والدكستروز والاكار PDA، ويتم ترتيب القطع بحيث يحوي الطبق الواحد من 3- 5 قطع ثم تحضن الاطباق عند درجة حرارة 25-27 مْ لمدة من 7 أيام الى اسبوعين او ثلاثة ويتم متابعة النمو بشكل يومي.

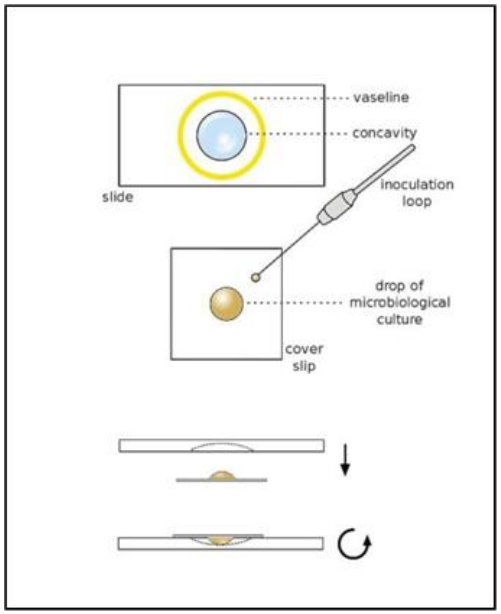
دراسة إنبات الابواغ الفطرية Spores germination

البوغ Spore
هو وحدة تكاثرية لخلية واحدة مفردة او لمجموعة من الخلايا ذات نشاط حيوي واضح وله وظائف تكاثرية وممكن ان ينبت وينمو الى غزل فطري جديد تحت ظروف مناسبة.
الهدف من تكوين الابواغ :
1. المحافظة على حيوية الفطر ليتحمل الظروف البيئية غير الملائمة.
2. انتشار الفطر من مكان نموه الى مكان اخر قد يكون اوفر وافضل في ظروفه البيئية.

مراحل انبات الابواغ الفطرية :
يمكن ان ينمو البوغ وينبت الى فطر جديد وتحت ظروف مناسبة وتجري عملية الانبات بثلاث مراحل:
1. الانتفاخ Swelling
يتضاعف حجم البوغ الى عدة اضعاف حجمه الاصلي (قد يصل 16 مرة) نتيجة لامتصاصه الماء وامتلائه وزيادة كمية السايتوبلازم.
2. ظهور انبوب الانبات Germination tube
يبدأ ظهور انبوب الانبات بشكل نتوء او بروز صغير جدا في احد مناطق جدار البوغ.
3. الاستطالة Elongation
يعاني انبوب الانبات استطالة من النهاية الطرفية ويزداد طوله ثم يعطي في النهاية خيوطا فطرية.

طريقة القطرة المائية المعلقة Hanging drop method

ان الهدف من اجراء هذه الطريقة هو لدراسة انبات الابواغ الفطرية، وتستعمل فيها شريحة زجاجية مقعرة من الوسط وغطاء شريحة، تجرى الطريقة بوضع قطرة من الماء المقطر المعقم في وسط غطاء الشريحة ثم تنقل كمية من الابواغ الفطرية من مزرعة فطرية نقية وبعناية الى تلك القطرة، نضع قليل من الفازلين Vaseline على حافة التقعر في الشريحة الزجاجية ويمسح حول الحافة بواسطة ممسحات قطنية Cotton swab لمنع تبخر القطرة المائية ثم تقلب الشريحة ذات التقعر فوق الغطاء وتكون قطرة الماء وسط التقعر ومن ثم بهدوء تقلب الشريحة ذات التقعر الى وضعها الطبيعي بحيث تصبح القطرة مدلاة بإتجاه التقعر ثم تنقل الشريحة الى طبق بتري نظيف ومعقم (فيه قليل من المـاء المقطر المعقم لتوفيـر الرطوبـة) ويوضـع داخله قضيب زجـــاجي على شـــكـــل حرف (V) ومن ثم توضع فوقه الشريحة ثم يغطى الطبق (كما موضح في الشكل) ثم يوضع الطبق في الحاضنة عند درجة حرارة مناسبة ولفترة تحضين لاتتجاوز 10-15 ساعة، يتتبع خلالها مراحل انبات البـوغ.



حفظ الفطريات Preservation of Fungi

ان عملية حفظ الفطريات من الامور المهمة جدا لبقاء وديمومة الفطريات التي تم عزلها وتشخيصها مع ضمان الاحتفاظ بحيوتها لفترة طويلة من الزمن قد تصل من 10- 20 سنة او اكثر وامكانية الحصول على مزارع فطرية بكامل حيويتها بعد هذه الفترة الطويلة من الحفظ. وقد اعتمدت عدة طرائق لحفظ الفطريات ويتوقف اختيار الطريقة المناسبة على اساس نوع الفطر وعدد المزارع وفترة الحفظ والامكانات المتاحة والظروف البيئية والمناخية السائدة.

اولا : حفظ المزارع الفطرية

ان اغلب الفطريات المجهرية يمكن الاحتفاظ بها حية على عدد من اوساط الاكار الصلبة ولفترة تتراوح ما بين ستة اشهر الى سنة واحدة قبل نقلها الى وسط زرعي جديد بينما هناك فطريات اخرى يتطلب نقلها الى مزارع جديدة كل شهر او كل ثلاثة اسابيع لضمان بقائها حية، فالفطريات والابواغ الفطرية تختلف في مطاولتها Longevityاي قدرتها على البقاء حية على الوسط الزرعي الذي تنمو عليه لفترات زمنية طويلة قبل نقلها الى وسط جديد ولكن عموما فان العوامل الاكثر اهمية في تحديد مطاولة الفطريات او الابواغ هي الرطوبة والحرارة وعادة تستخدم الرطوبة المنخفضة والحرارة الواطئة لحفظ المزارع الفطرية حية لفترات زمنية طويلة وقد اعتمدت عدة طرائق لتحقيق هذا الغرض منها:

1- التجفيد (تجفيف – تجميد) Lyophilization (Freeze – drying)

تعد من اكثر الطرائق كفاءة وقد تصل مدة الحفظ بهذه الطريقة الى 20 سنة او اكثر، تعتمد هذه الطريقة على سحب الماء من الابواغ او الخلايا او الخيوط الفطرية بواسطة التجميد السريع، اذ يتم تجميد الفطريات او ابواغها عند درجة -70م º، ثم يتم نزع الماء بالتبخير المباشر للثلج المتكون بواسطة التفريغ تحت ضغط منخفض باستخدام جهاز التجفيد Lyophilizer و توضع المزارع او معلقات الابواغ Spores suspensions المجفدة في انابيب محكمة الغلق لتفادي خطورة التلوث ثم تحفظ في الثلاجة عند درجة حرارة 4ºم. ان غالبية الفطريات وخصوصا المكونة للابواغ بكميات كبيرة يتم حفظها بهذه الطريقة وبما ان الخلايا لاتكون بالحالة السائلة اثناء التبخير فان هذه الطريقة لاتسبب اضرار كبيرة للخلايا وشكلها.

2- الحفظ في النتروجين السائل Liquid nitrogen

تعتمد هذه الطريقة على مبدأ خفض النشاط الحيوي للابواغ او الخلايا الفطرية بتأثير درجات الحرارة الواطئة جدا، اذ تعامل المزارع الفطرية او معلقات الابواغ بمادة مضادة للتجمد مثل مادة الكليسيرول 10% وتوضع في قناني زجاجية صغيرة الحجم (Ampoules)وتجمد في النتروجين السائل عند درجة حرارة فائقة الانخفاض تصل الى -196ºم ، ويفضل ان تتم العملية ببطء من خلال التبريد او الخفض التدريجي لدرجة الحرارة والتي قد تصل الى -35ºم ثم تنقل الى النتروجين السائل. هذه الطريقة تجعل المزارع تعمر لفترة اطول مما لو عوملت مباشرة بالنتروجين السائل لانها قد لا تتحمل صدمة التجميد البدائية. يمكن اعتماد هذه الطريقة لحفظ الفطريات النامية على الاوساط الزرعية او على الاوساط الطبيعية ولكن هذه الطريقة تكون مكلفة ولا تناسب المزارع الفطرية التي يتم نقلها من مكان لاخر وخاصة للاماكن البعيدة.

3- الحفظ تحت الزيت المعدني Under mineral oil

تنمى الفطريات على وسط صلب مائل Slantوبعد نموها تغمر بزيت معدني معقم بحيث يرتفع الزيت بمقدار 1 سم فوق قمة الاكار المائل عندما تكون قناني الزرع بوضع قائم، ويفضل ان تكون المزارع الفطرية قد نمت جيدا وكونت كمية جيدة من الابواغ، من فوائد هذه الطريقة وخاصة في المناطق الحارة انها تمنع الجفاف الذي غالبا ما يهدد مزارع حفظ الفطريات، كما انها سهلة التنفيذ ولا تحتاج الى اجهزة ومعدات، كما انها تتميز بامكانية اخذ جزء من النمو المغمور في الزيت بواسطة ابرة تلقيح وتجديد نموها مع الاحتفاظ بالمزرعة الاصلية.

4- استخدام هلام السليكا Silica gel

ان هذه الطريقة مفيدة في حفظ معلقات الابواغ وتنفذ بالطريقة الاتية :

يتم تحضير معلق من ابواغ الفطر باستخدام حليب معقم خالي الدسم (بتركيز 10 %)، كما يتم تحضير هلام السليكا النقي المبرد والمعقم بالفرن عند 180ºم لمدة 90 دقيقة في دوارق ذات اغطية حلزونية ثم يضاف المعلق البوغي وبنسبة (0.5 مل/ 4 غم) الى هلام السليكا ومن ثم توضع الدوارق في حمام ثلجي لمدة 30 دقيقة، بعدها تترك الدوارق مفتوحة تحت درجة حرارة الغرفة لمدة اسبوعين تقريبا حتى تجف وتنفصل البلورات، ثم تسد الدوارق بشكل محكم وتحفظ في الثلاجة عند درجة حرارة 4ºم. تستخدم النماذج المحفوظة عند الحاجة لتنمية الفطريات من جديد بنشر بضع بلورات فوق سطح الوسط الزرعي المناسب في اطباق بتري، وتعد هذه الطريقة بسيطة وغير مكلفة ومناسبة للكثير من انواع الفطريات.

5- استخدام التربة او الرمل Soil or sand

تستخدم التربة او الرمل في حفظ الكثير من اجناس الفطريات مثل *Aspergillus* و *Penicillium* ويتم ذلك بعد تنظيف التربة او الرمل من الشوائب وتعقيمها بجهاز المعقام، يضاف 1مل من العالق البوغي للفطر الى كل 5غم من التربة او الرمل في انابيب اختبار او قناني صغيرة معقمة وتمزج جيدا، ثم تترك التربة لتجف عن درجة حرارة الغرفة، بعدها تغلق انابيب الاختبار او القناني الصغيرة بإحكام وتحفظ في الثلاجة عند درجة حرارة 4°م. تعد من الطرائق الفعالة والغير مكلفة في حفظ انواع الفطريات المكونة للابواغ بكميات كبيرة وان مدة الحفظ تصل الى 8 سنوات.

ثانياً : حفظ نماذج الفطريات

ان موضوع دراسة الفطريات على مدار السنة يتطلب الاحتفاظ بالفطريات الموسمية وحفظها بالطريقة المناسبة لتبقى تحت متناول اليد عند الحاجة لها ومن الامثلة على ذلك الفطريات التي تكون اجسامها الثمرية ذات قوام لحمي والتي يعود قسم منها الى الفطريات البازيدية مثل العراهين Mushrooms والقسم الاخر يعود للفطريات الكيسية مثل الكمأ Truffles والعديد من الفطريات الملونة والانواع الأخرى من الاجسام الثمرية الفطرية، تحفظ مثل هذه النماذج في مواد ومحاليل حافظة تبقي الفطريات بهيأتها وشكلها الطبيعي طيلة فترة حفظها. هناك العديد من محاليل حفظ النماذج الفطرية منها مايأتي:

1- حافظ عام

يمثل هذا المحلول والذي يرمز له (FAA)احد اهم محاليل حفظ نماذج الفطريات ومن اهم مميزاته هي امكانية استخدامه لحفظ النماذج لفترة زمنية غير محددة وفي نفس الوقت يستخدم كمثبت جيد لمكونات الخلية الحية ويتكون هذا المحلول من :

Formaldehyde (40%)	50 ml
Glacial acetic acid	50 ml
Alcohol (50 or 70%)	900 m

2- حافظ كبريتات الزنك Zinc sulphate

يستخدم هذا المحلول لحفظ الاجسام الثمرية الملونة للفطريات، ويتكون المحلول من :

Zinc sulphate	25 gm
Formaldehyde (40%)	10 ml
Distilled water	1000 ml