عزل وإنماء الفطريات

Isolation and Cultivation of Fungi

أن دراسة الفطريات والتعرف عليها وعلى اسرارها يتطلب الحصول على مزرعة نقية من الفطر المراد دراسته. كما ان المزرعة النقية من هذا الفطر مهمة في تحديد الأطوار الخضرية والتكاثرية والثمرية التي تعود لنفس الفطر والتي تكونت من نفس المستعمرة الفطرية الناتجة من بوغ مفرد single spore ، والمزرعة النقية تستخدم أيضاً في إثبات قدرة الفطر على اصابة الإنسان أو الحيوان أو النبات بالاعتماد على الفرضيات المعروفة بفرضيات كوخ Koch's postulates، ناهيك عن أهمية المزرعة النقية في التجارب والدراسات الفسلجية والوراثية لكل فطر.

تعد عملية عزل الفطر بمزرعة نقية وتنميته على الوسط والبيئة المناسبة طيلة الفترة المطلوبة لاتمام ما ورد أعلاه من متطلبات فهم واقع حال كل فطر على حدة. أن أكثر الصعوبات التي تواجه عملية العزل هي احتمال تلوث المزرعة بكائنات أخرى غير تلك المراد عزلها ودراستها، لذا لابد من أخذ الاحتياطات اللازمة لتعقيم جميع الأدوات المستعملة كالمشارط والملاقط والزجاجيات وأبر التلقيح أو الحقن، بالإضافة إلى ضرورة إجراء العزل في أماكن معقمة أو في غرف صغيرة أو كابينات أو صناديق inoculating chamber or box خاصة لأغراض العزل.

تتواجد الفطريات بكثرة في الطبيعة فهي تنتشر في كل مكان وعلى سطوح الاجسام الحية والميتة، ويسهل حمل غالبيتها بالهواء ونشر أبواغها إلى أماكن بعيدة لصغر حجمها. تتواجد الفطريات في جميع البيئات مثل الهواء والماء والتربة سواء في المناطق القطبية أو الاستوائية وحتى في المناطق المرتفعة والجبلية، إضافة إلى قدرتها على التواجد في جسم النبات، الحيوان والإنسان. وتختلف مستويات ومعدلات تواجد الأنواع المختلفة من الفطريات بسبب تأثرها بالظروف

البيئية والطبيعية مثل درجات الحرارة، درجة الأس الهيدروجيني (pH)، الإضاءة، التهوية، الملوحة والبعض منها قادر أن يعيش تحت ظروف غير اعتيادية مثل انعدام الهواء، زيادة الملوحة إلى أكثر من 25 %، زيادة الحموضة إلى pH 2.0 أو أقل والقاعدية إلى pH 11.0 أو أكثر، إضافة إلى الارتفاع الحاد أو الانخفاض الحاد في درجات الحرارة.

أولاً: طرق العزل Methods of isolation

هناك طرق عديدة لعزل الفطريات اعتمادا" على البيئات المختلفة التي تنمو وتتواجد فيها مثل الهواء أو الماء أو التربة ، سواء" كانت مترممة على المواد المتحللة أو متطفلة على الكائنات الحية، ومن هذه الطرق ما يأتي :

1- العزل المباشر Direct isolation

تستخدم هذه الطريقة عندما يكون الفطر متجرثماً على سطح الوسط الزرعي أو سطح العائل على هيأة مسحوق من الأبواغ أو مكوناً تراكيب ثمرية فيمكن عزله أما بتلقيح أطباق بتري حاوية على وسط غذائي معقم بنقل كمية من الأبواغ من مصدر الفطر باستخدام أبرة تلقيح عقمت باللهب وتبرد قبل ملامستها للمستعمرة الفطرية، يجب أخذ كافة الاحتياطات أثناء نقل الفطر إلى الوسط الغذائي وفي ظروف معقمة، أو بعمل معلق من أبواغ الفطر في الماء المقطر المعقم ثم تنمية الفطر في حالة نقية باستخدام أما طريقة التخطيط streaking method ، أو طريقة التخفيف Dilution method ، وكما يلي:

أ- العزل بطريقة التخطيط Streaking method

في هذه الطريقة يحضر معلق الأبواغ من البيئة التي ينمو فيها الفطر المراد تنقيته، يخفف المعلق حسب الحاجة، تنقل قطرة واحدة من المعلق باستخدام الناقل Loop المعقم وذلك بغمسه في المعلق ثم نقله إلى مركز سطح الوسط الزرعي المهيء لهذا الغرض، ويفضل أن يسحب الناقل على الوسط لمسافة

قصيرة من مكان ملامسته للوسط، ثم يترك الوسط تحت الحضن عند درجة حرارة 25 مْ ، سوف يلاحظ ظهور نمو للفطر باتجاه نهاية الخط الذي عمل على الوسط ويمكن أن يكون على شكل مستعمرات منفردة، يمكن نقل المستعمرة المنفردة إلى وسط زرعي جديد للحصول على مزرعة نقية للفطر. إلا أن التخطيط streaking يمكن أن ينجز باسلوبين، أما بعمل خطوط متعرجة zigzag line على الوسط الزرعي بواسطة الناقل الحامل لقطرة من معلق الفطر، وهو الأسلوب الأكثر استخداماً، أو بعمل ثلاثة خطوط قصيرة موازية لبعضها على الوسط الزرعي بواسطة الناقل الحامل لقطرة من المعلق ثم تعمل ثلاثة خطوط أيضاً موازية لبعضها تبدأ من الخط الأول وتكون بزوايا منفرجة مع هذا الخط ، وتكرر هذه الخطوط مرة أخرى على أن تبدأ من الخط الأول من المجموعة الثانية، ان الأسلوب الثاني يختزل كثيراً من عدد الأحياء المجهرية مقارنة مع الأسلوب الأول الذي يعتمد الخطوط المتعرجة فقط (شكل 6-1).

ب- العزل بطريقة التخفيف Dilution method

أن هذه الطريقة مفيدة ومناسبة للأغراض الكمية والنوعية بخصوص الفطر المدروس، فإذا كانت كمية المادة المفحوصة معروفة يمكن حساب كمية الفطر في النموذج.

طريقة العمل:

تحضر تخافيف لهذا الغرض تبدأ من 1 : 10، 1 : 100، 1 : 1000 وهكذا، ثم يؤخذ 1.0 مل من كل تخفيف باستخدام ماصة معقمة ويوضع على سطح الوسط الزرعي في أطباق بتري، أو بمزج 1.0 مل مع كمية معلومة من الوسط الزرعي 10-15مل في طبق بتري وذلك قبل تصلبه ، أي عندما تكون درجة الحرارة ما بين 42-45 مْ ، وبذلك يمكن الحصول على مستعمرات قليلة في التخافيف العالية، ويمكن نقل المستعمرات المنفردة إلى وسط زرعي جديد .

افحص مزرعة فطرية نامية على وسط SDA للفطر *R.stolonifer* ولاحظ أن لون المستعمرة الناضجة (بعد تكوين الحوافظ البوغية) يكون بني غامق، اعمل شريحة زجاجية وافحص التراكيب الفطرية.

1. عزل فطريات الهواء Isolation of air borne fungi

يلعب الهواء دوراً أساسياً في نقل الفطريات غير المرضية والمرضية التي تسبب الأمراض للإنسان والحيوان والنبات، حيث تنتقل الأبواغ محمولة في أنوية الرذاذ droplet nuclei أو على ذرات الغبار العالقة هي الأخرى في الهواء. تنتشر معظم الفطريات بواسطة الأبواغ أو الكونيدات خلال الطبقات الهوائية المتحركة الحاملة لها ثم استقرارها في الأماكن المختلفة. ان عملية انتقال الأبواغ والكونيدات بواسطة الهواء لها دور كبير في انتشار الإصابة بالأمراض الفطرية، ومن الممكن التخلص من مصادر الإصابة والوقاية منها إلا أنه من غير الممكن الحد من عملية انتشار الأبواغ والكونيدات وخاصة عندما يكون الهواء هو الناقل لها، وبذلك يكون وسيلة لانتشار الأمراض الفطرية بين الكائنات الحية وما تسببه من تلف للمواد الصناعية الخام وتعفن المواد الغذائية فضلاً عن كونها ملوثات أساسية للهواء، ويمكن إجراء تجربة مختبرية لعزل الفطريات من الهواء.

المواد:

1- أطباق بتري تحتوي على وسط اكار مغذي.

2- أقلام شمع.

طريقة العمل:

1- تقسم الأطباق إلى ثلاث مجاميع وبواقع ثلاثة أطباق لكل مجموعة كمكررات، الأولى للعزل من هواء المختبر والثانية للعزل من هواء الجو العادي خارج المختبر والثالثة من مكان قريب من مزرعة أو حقل قريب من مكان العمل.

2- يرفع غطاء كل طبق ويعرض للهواء لمدة 3-5 دقائق ثم يعاد الغطاء وتثبت عليه المعلومات الخاصة بطبيعة الهواء.

3- تترك ثلاثة أطباق دون تعريضها للهواء كمعاملة مقارنة.

4- تحضن جميع الأطباق في الحاضنة عند درجة حرارة 25 مْ لمدة 3- 6 أيام.

5- تفحص الأطباق للتعرف على أنواع الفطريات التي نمت من كل مصدر والاختلافات فيما بينها وتدون المعلومات عن إعداد وأنواع الفطريات في كل مصدر.

تتميز هذه الفطريات بصورة رئيسية عما عداها من الفطريات بأن أبواغها تكون متحركة أما بسوط واحد كما في الفطريات الكتريدية التي يعيش العديد منها بصورة كلية في الماء، وتنمو مترممة على بقايا النباتات والحيوانات المائية الصغيرة ومن أهمها الفطر *Allomyces* والفطر *Monoblepharis*، والنوع الثاني متحركة بسوطين كما في الفطريات البيضية والتي تضم عددا أكبر من الفطريات التي تعيش في الماء العذب وتتطفل على الفطريات المائية أو على الطحالب مثل الفطر *Lagenidium* والفطر *Saprolegnia* الذي تتطفل بعض أنواعه على الأسماك والأحياء المائية وأنواع أخرى منه تترمم على البقايا النباتية والحيوانية.

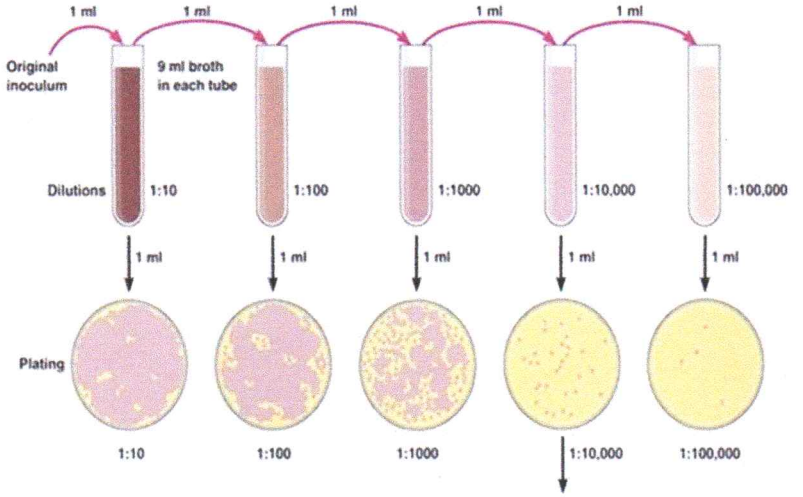
ويتكون جسم الفطر أما من خلية واحدة أو من خيط ضعيف قد يكون متفرع أو غير متفرع. وقد أمكن عزل وزراعة بعض الأنواع المترممة في مزارع غذائية كونها تنمو على بيئات بسيطة مكونة من أملاح معدنية ومصدر كاربوني

لغرض التعرف على الفطريات الموجودة في الهواء يترك طبق بتري حاوي على وسط غذائي معقم مكشوفا لفترة معينة من الزمن في مكان الاختبار بصورة افقية او تحرك اليد الحاملة لقاعدة طبق بتري بصورة افقية من اليمين اليسار او عموديا من الاعلى الى الاسفل 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 تلافي سقوطها على الوسط الغذائي وعلى الفطر النامي خلال الوسط .

2. عزل الفطريات من الماء Isolation from water

الطريقة المستخدمة لعزل الفطريات من الماء هي طريقة التخافيف Dilution method حيث يؤخذ حجم معين من المصدر المائي (بركة ، نهر ، .....) 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 فنحصل على مجموعة تخافيف (10^{-3}، 10^{-4}، .....) ثم ينقل 1 مل من التخفيف المطلوب (الاخير) الى طبق بتري معقم ثم يصب مقدار مناسب من البيئة السائلة (45م) في طبق بتري الحاوي على العينة وبثلاث مكررات لمقارنة النتائج ويحرك الطبق حركة دورانية بسيطة بصورة افقية كي يختلط اللقاح مع البيئة ثم تترك الاطباق ليتصلب الوسط ثم تنقل الى الحاضنة وتفحص الاطباق لملاحظة نمو الفطريات وعزلها .

عزل الفطريات من الماء بطريقة التخافيف



Calculation: Number of colonies on plate × reciprocal of dilution of sample = number of bacteria/ml
(For example, if 32 colonies are on a plate of $^{1}/_{10,000}$ dilution, then the count is 32 × 10,000 = 320,000 bacteria/ml in sample.)

Copyright © 2007 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

3. عزل فطريات التربة Isolation of soil borne fungi

تعيش أنواعا مختلفة من الفطريات في التربة أما مترممة على البقايا النباتية والحيوانية أو متطفلة، ويعتمد دورها كطفيليات نباتية تستهدف جذور النبات او كطفيليات حيوانية تستهدف الديدان الثعبانية على عوامل عديدة منها الكثافة العددية لوحدات التكاثر وظروف التربة. أن اول الفطريات التي اكتشفت في التربة هو الجنس *Fusarium* ، بعد ذلك توالت الدراسات لتحديد الأنواع الأخرى من الفطريات المستوطنة في التربة soil borne fungi وتضمنت مجموعة من الفطريات منها:

Verticillium, *Fusarium*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Plasmodiophora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Spongospora* و *Synchytrium* (لوحة 6 - 4).

ان الدراسات التي أجريت على توزيع الفطريات في التربة قد ركزت في الغالب على علاقة الفطريات بأمراض النبات ولذلك فإن الأراضي الزراعية غالباً ما تحتوي على عدد أكبر من الأنواع الفطرية مقارنة بالترب الأخرى غير الزراعية، ويمكن إجراء تجربة مختبرية لعزل الفطريات من أكثر من نوع من الترب.

المواد:

1- عينات تربة من عدة مواقع زراعية (تربة حديقة) وغير زراعية (تربة رملية طينية).

2- أطباق بتري معقمة.

3- وسط اكار ماء Water agar.

4- أنابيب اختبار.

5- ماء مقطر معقم.

6- ماصات معقمة وباحجام 0.5 مل و1.0 مل.

7- بيكرات بحجم 250 مل.

طريقة العمل:

تستخدم هنا طريقة التخفيف Dilution method وتتلخص بالآتي:

1- يوزن 10 غم من كل عينة من عينات التربة وتوضع في بيكر 250 مل ويضاف إليها 90 مل ماء مقطر معقم وتمزج جيداً بتحريكها لمدة 5-10 دقائق.

2- تعمل تخافيف عشرية من معلقات عينات التربة أعلاه وهي 100/1، 1000/1 و10000/1 ( )

3- توزع معلقات عينات التربة على قعر أطباق بتري وبواقع 1.0 مل لكل طبق وثلاث أطباق لكل معاملة كمكررات، ثم يضاف إليها وسط اكار ماء المذاب والمبرد إلى درجة حرارة 42 - 45 مْ مع تحريك محتويات الطبق رحوياً قبل تصلبه لغرض توزيع حبيبات التربة ضمن كل الوسط الزرعي.

4- تترك ثلاثة أطباق بدون تلقيح كمقارنة.

5- تحضن جميع الأطباق عند درجة حرارة 25 مْ لمدة 3-5 أيام ثم تفحص وتدرس أعداد وأنواع المستعمرات الفطرية النامية التي تعود للأجناس المشار إليها في أعلاه وتحسب في كل تربة وكل تخفيف وتسجل النتائج. وهناك طرق أخرى للعزل من التربة هي:

أ- طريقة الزراعة المباشرة Direct planting method

في هذه الطريقة يوضع على الوسط الزرعي الأساسي في أطباق بتري كمية قليلة من التربة المراد عزل الفطريات منها وذلك باستعمال ملقط معقم أو ملعقة معقمة بعد غسلها بالكحول وتعريضها للهب، ثم تحضن عند درجة حرارة 25 مْ ويتابع النمو الفطري الذي يحصل على الوسط يومياً بعد 48 ساعة من الحضن.

ب- طريقة صب الأطباق Pour plate method

والتي تتلخص بمزج كمية قليلة معلومة من التربة مع الوسط الزرعي المعقم والمبرد إلى درجة حرارة 42-45 مْ ثم يصب الوسط الممزوج مع التربة في الأطباق، ثم تحضن وتتابع بنفس الطريقة أعلاه.