الأوساط الزرعية لتنمية الفطريات

Culture Media for Growing Fungi

تنمو الفطريات على بيئات وأوساط زرعية مختلفة قسم منها سائلة والقسم الآخر صلبة نتيجة لإضافة مادة الأكار Agar إليها. تنمو غالبية الفطريات نمواً جيداً في البيئات والأوساط الغنية بالكاربوهيدرات ودرجة أس هيدروجيني pH تتراوح ما بين 5 – 6 ، ومن المعروف انه لا يوجد وسط زرعي يناسب جميع الفطريات في الحصول على نمو مثالي بسبب المتطلبات الغذائية المختلفة من قبل الفطريات وخصوصاً حاجتها من العناصر الغذائية المختلفة. بعض الفطريات تنمو في أية بيئة أو وسط غذائي يحتوي على بعض المواد العضوية مع كمية من الرطوبة ودرجة حرارة مناسبة. ان معظم البيئات الغذائية الخاصة بالفطريات تحتوي على المواد الأساسية للنمو وهي الكاربوهيدرات والبروتينات والدهون والفيتامينات والأملاح وعلى الرغم من ذلك لا توجد بيئة غذائية معينة يمكن اعتبارها بيئة غذائية جيدة لجميع الفطريات ليس فقط من أجل النمو وإنما لإظهار صفاتها الشكلية والفسيولوجية سواء في البيئات السائلة أو الصلبة. قسمت الأوساط الزرعية إلى ثلاثة أقسام اعتماداً على تركيبها والمواد التي تتكون منها وهي أما من مواد طبيعية أو كيميائية أو من الاثنين معاً وكما يأتي:

1- الأوساط الطبيعية **Natural media**

2- الأوساط التركيبية - الطبيعية **Natural- synthetic media**

3- الأوساط التركيبية (الصناعية) **Synthetic media**

وقبل البدء في التعرف على الأوساط الزرعية وطرق تحضيرها يجب الانتباه إلى الملاحظات التالية:

1- تنمو الفطريات بشكل جيد في الأوساط الغنية بالكاربوهيدرات، علماً بأن هذه المواد قد تقلل من قدرة بعض الفطريات على تكوين الأبواغ خصوصاً عند حفظها على الوسط لفترة طويلة.

2- هناك أوساط غذائية تستخدم لأغراض خاصة غير النمو الخضري مثل تشجيع تكوين الأبواغ او تكوين بعض الايضات الثانوية secondary metabolites من قبل الفطريات.

3- الفطريات تفضل النمو في الأوساط الحامضية قليلاً (pH :6.5 – 5.5).

4- لمنع تلوث الأوساط الغذائية بالبكتريا تضاف إليها بعض المواد المثبطة لنمو البكتريا كالمضادات الحيوية لإفساح المجال لنمو الفطريات فقط والحصول على مزرعة نقية من الفطر.

5- تتحلل الكاربوهيدرات والبروتينات، الموجودة في الوسط الغذائي، بالحرارة في المحاليل الحامضية والقلوية لذا يجب عدم الإفراط في تعقيمها.

6- الأكار بطيء الذوبان، ويفضل إذابة الأكار في نصف كمية الماء المخصصة لتحضير الوسط وتسخينه مع التحريك المستمر حتى الذوبان، وإذابة المواد الغذائية في النصف الآخر ثم مزجهما.

7 - الأكار لا يتصلب جيداً في الأوساط او المحاليل عالية الحموضة أو القلوية.

8- يجب استخدام الماء المقطر في تحضير الأوساط الغذائية لأنه خالي من العناصر وخصوصاً النادرة التي قد تكون سامة للفطريات في حالة استخدام ماء الحنفية.

أولاً: الأوساط الطبيعية Natural media

تحضر هذه الأوساط من مستخلصات نباتية أو حيوانية معروفة التركيب مثل الأجزاء النباتية المختلفة أو الفواكه والبذور، وتمتاز هذه الأوساط بأنها تماثل إلى حد كبير البيئات او العوائل الطبيعية التي تنمو عليها الفطريات كما أنها سهلة التحضير ورخيصة الثمن، ومن أمثلتها:

وسط اكار البطاطا Potato agar medium

يعتبر هذا الوسط من بين الأوساط الغذائية الشائعة الاستخدام في مختبر الفطريات ويتركب من:

Potato	200g
Agar	15g
Distilled wate	1000ml

طريقة العمل:

1- تغسل البطاطا جيداً وتقشر ثم تقطع إلى قطع صغيرة.

2- يوزن 200 غم من قطع البطاطا ويضاف إليها 500 مل من الماء المقطر وتطبخ لدرجة الغليان في بيكر زجاجي لمدة نصف ساعة.

3- يؤخذ راشح البطاطا باستخدام الشاش ويفضل أن تعصر البطاطا أيضاً خلال قطعة شاش وتضاف العصارة إلى الراشح.

4- يذاب الأكار في 500 مل من الماء المقطر ويسخن بهدوء حتى الذوبان.

5- يمزج محلول الأكار مع راشح البطاطا ويكمل الحجم إلى 1000 مل.

6- يعقم الوسط باستخدام الموصدة تحت ضغط 15 باوند / انج^2 لمدة 15-20 دقيقة.

وسط اكار البطاطا والجزر Potato carrot agar medium

وهو وسط ضعيف جداً يلائم أغراض حفظ المزارع الفطرية، ويتركب من المواد التالية:

Potato	20g
Carrot	20g
Agar	15g
D.water	1000ml

طريقة العمل:

يحضر الوسط بتهيأة البطاطا والجزر بنفس الطريقة المذكورة أعلاه في تحضير وسط اكار البطاطا.

المواد:

1- مجموعة خضراوات من الأنواع المتوافرة.

2- اكار

3- بيكرات حجم 500 مل.

4- أطباق بتري.

طريقة العمل:

1- توزن كمية من كل نوع من الخضراوات المتوافرة بمعدل 10غم/لتر لكل نوع.

2- توضع الخضار في خلاط كهربائي ويضاف إليها كمية قليلة من الماء المقطر وتخلط جيداً ثم يرشح باستخدام شاش طبي أو يترك حتى يركد ثم يصفى.

3- يذاب الأكار في كمية كافية من الماء المقطر ويسخن فوق حمام ماني حتى الذوبان.

4- تمزج 200 مل من خلاصة العصير مع الأكار ويكمل الحجم إلى 1000 مل.

5- تضبط درجة الاس الهيدروجيني على درجة pH 6.0 باستخدام NaOH بتركيز 10%.

ثانياً: الأوساط التركيبية - الطبيعية Natural- synthetic media

تتكون هذه الأوساط من مواد طبيعية نباتية أو حيوانية مضافاً إليها مواد معروفة التركيب، ومن أهم هذه الأوساط أو البيئات هي:

وسط أكار الدكستروز البطاطا Potato dextrose agar (PDA)

هذا الوسط من أكثر الأوساط الزرعية والبيئات الفطرية استخداماً في مختبرات الفطريات وهو يشابه أكار البطاطا الذي مر ذكره في الأوساط الطبيعية مع إضافة الدكستروز، ويعتبر من الأوساط المناسبة جداً لنمو عدد كبير من

الفطريات وخاصة الفطريات التي تسبب الامراض للنبات، ويتكون الوسط من المواد التالية:

Potato	200g
Dextrose	20
Agar	15g
Distilled water	1000ml

طريقة العمل:

1- يوجد الوسط جاهزا بشكل مسحوق يتكون من المواد الثلاث أعلاه وبالنسب ذاتها وفي هذه الحالة يحضر الوسط بإذابة 40 غم من مسحوق الوسط PDA في 1000 مل من الماء المقطر، ثم يعقم الوسط بالبخار باستخدام الموصدة لمدة 15 دقيقة.

2- وفي حالة عدم توفره بشكل جاهز فيحضر الوسط من المواد أعلاه بشكل مباشر بنفس الطريقة التي ورد ذكرها سابقاً في تحضير وسط أكار البطاطا ضمن الأوساط الطبيعية، مع إضافة الدكستروز إلى مزيج البطاطا والاكار، وفي حالة عدم توفر الدكستروز يمكن استخدام الكلوكوز بنفس التركيز 20 غم/لتر أو السكروز بمعدل 10 غم/لتر.

وسط أكار دقيق الذرة Corn meal agar medium خير مطلوب

يستخدم الوسط في تنمية عدد غير قليل من الفطريات، وغالبا ما يستخدم لتحفيز الفطريات على تكوين الأبواغ بشكل جيد، ويتركب من:

Corn meal	20g
Peptone	20g
Dextrose	20g
Agar	15g
Distilled water	1000ml

طريقة العمل:

يحضر الوسط باتباع طريقة تحضير وسط أكار ليوينان فيما عدا الأكار.

ملاحظة:

أحياناً يتم تحوير وسط الفاسيل وذلك بإضافة عصير الطماطة بتركيز 10غم، يتم تنظيم درجة الأس الهيدروجيني إلى (pH 5.5)، ثم يعقم الوسط لمدة 20 دقيقة تحت ضغط 15 باوند/انج2.

ثالثاً: الأوساط التركيبية (الصناعية) Synthetic media

وهي الأوساط التي تتكون من مواد كيمياوية معروفة التركيب والتركيز، قسم من هذه الأوساط تنتجها شركات متخصصة على هيأة مساحيق جافة يحتاج تحضيرها إضافة الماء فقط حسب النسب المثبتة على العلبة، وبعكسه يمكن تحضيرالأوساط في المختبر من إذابة المواد العضوية وغير العضوية المكونة للوسط في الماء حسب النسب المحددة لكل مادة. ومن أهم هذه الأوساط والبيئات هي:

وسط أكار زابكس Czapek's agar medium

هذا الوسط من أكثر الأوساط الصناعية استخداماً في عزل وتنمية الفطريات، ويمكن استخدامه كوسط سائل مغذي للفطريات عند حذف الأكار، الوسط مناسب جداً للتعرف على الأنواع المختلفة التابعة للفطر *Penicillium* والفطر *Aspergillus*. أما الفطر *A. glaucus* والفطريات التابعة له يمكنها أن تنمو افضل عند زيادة كمية السكر في الوسط من 1.5 إلى 5%، واشارت بعض الدراسات والبحوث ضرورة إلى إضافة بعض المواد مثل الفيتامينات أو الحوامض الأمينية إلى الوسط، ويتركب الوسط أساساً من المواد التالية:

NaNO3	3.0g
K2HPO4	1.0g
KCl	0.5g

MgSO4.7H2O	0.5g
FeSO4.7H2O	0.01g
Sucrose	30.0g
Agar	15.0g
D.water	1000ml

طريقة العمل:

1- تذاب الكميات المقررة من المواد أعلاه في 500 مل من الماء المقطر المعقم، ويفضل ان تذاب مادة بعد أخرى وليس جميعها مرة واحدة لمنع تكوين مركب معقد غير ذائب، أما بالنسبة للسكر فيجب أن يكون آخر مادة تضاف وبدون تسخين لتحاشي عملية الكرملة caramelization.

2- أحياناً يفضل إذابة السكر في كمية قليلة من الماء ومن ثم يعقم باستخدام مرشحات زايتس Sietz filter، ويضاف إلى الوسط بعد تعقيمه.

3- يعقم الوسط باستخدام الموصدة تحت ضغط 15 باوند / انج^2 لمدة 15 دقيقة.

وسط أكار واكسمان Waksman's agar medium

وهو وسط صناعي تركيبي حامضي acidic medium، صمم خصيصاً لعزل الفطريات من التربة، ويتركب من المواد التالية:

Glucose	10.0g
Peptone	5.0g
KH2PO4	1.0g
MgSO4.7H2O	0.5g
Agar	15.0g
D. water	1000ml

FeCl3	0.02g
Sucrose	30.0g
D.water	1000ml

طريقة العمل:

يحضر الوسط بإذابة المواد في الماء المقطر ويعقم بالموصدة.

رابعاً: إضافة مضادات البكتريا Antibacterial supplements

عند عزل وتنمية الفطريات قد يحصل تلوث بالمستعمرات البكتيرية مما يؤثر على نمو الفطريات وعلى إمكانية فحصها وتشخيصها ولذلك تضاف بعض مضادات البكتريا إلى الأوساط الزرعية المستخدمة لتنمية وزراعة الفطريات والتي تمت الإشارة إلى قسم منها في بعض الأوساط وتشمل مضادات حيوية ومواد أخرى مثل:

الستربتومايسين Streptomycin

وهو مضاد حيوي معروف بتأثيره على نمو ونشاط البكتريا، يحضر الوسط الزرعي ويضاف المضاد الحيوي إلى الوسط الزرعي بعد تعقيمه وقبل صب الوسط في الأطباق حيث يبّرد الوسط إلى درجة حرارة 45 مْ، تذاب 500 ملغم من المضاد الحيوي في 500 مل من الماء المقطر المعقم ثم يضاف إلى الوسط بمعدل 1 مل لكل 10 مل من الوسط الزرعي.

البنسلين Penicillin

وهو من المضادات الحيوية التي لها تأثير على طيف واسع من البكتريا، يحضر الوسط الزرعي ثم يضاف المضاد الحيوي إلى الوسط الزرعي بعد تعقيمه عندما يبرد إلى درجة حرارة 45 مْ، يحضر محلول مائي من المضاد بإذابة 250 ملغم/ لتر ماء مقطر معقم ويحفظ في الثلاجة، يضاف 1 مل من المحلول لكل 10 مل من