Isolation and Cultivation of Fungi

عزل وانماء الفطريات

Hiba Fouad Abdulfatah

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.

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.

اولا: 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 :

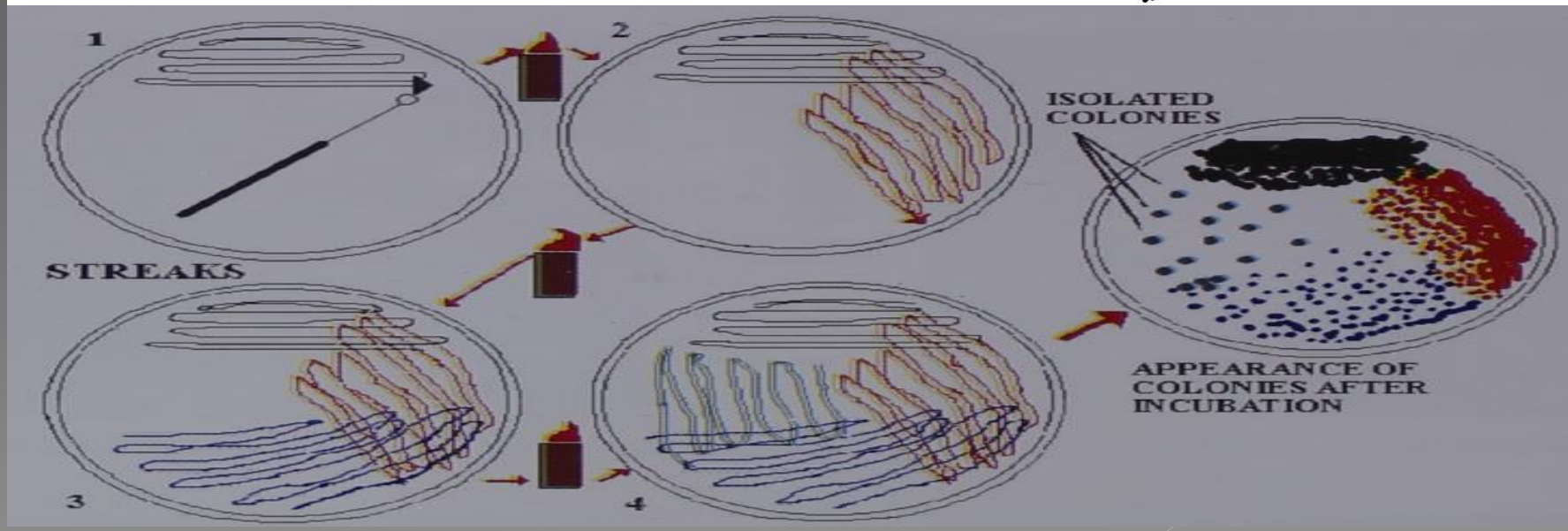
1- العزل المباشر Direct isolation

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.

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



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 للحصول على مزرعة نقية للفطر، كذلك يمكن حساب كمية الفطريات في النموذج من خلال حساب عدد المستعمرات على أساس حجم العينة والتخفيف.

2-عزل الفطريات على الشرائح واغطيتها الزجاجية
Isolation of fungi on slides and cover slips

يكون الجهاز البوغي في قسم من الفطريات دقيقاً ورهيفاً ما يصعب تحميله بنجاح لأغراض الدراسة والفحص، وفي مثل هذه الحالات تنمى الفطريات على الشرائح الزجاجية أو الأغطية والتي ينبغي أن تتم تحت ظروف معقمة مع تعقيم كافة الأدوات المستخدمة ، وهناك أكثر من أسلوب لإتمام هذا العمل ، منها ما يأتي:

أ- مزرعة الشريحة الزجاجية Slide culture

يمكن الحصول على شريحة زجاجية دائمية من مزرعة الشريحة الزجاجية وهي طريقة مفيدة وعملية جداً في دراسة الفطريات مختبرياً

المواد:

1- أبرة تشريح معقمة.
2- أطباق بتري حاوية على وسط زرعي مناسب.
3- قضيب زجاجي على شكل حرف V.
4- شرائح زجاجية وأغطيتها.
5- كليسيرين تركيز 20 %.
6- كحول اثيلي تركيز 95 %.
7- مزرعة فطرية لأحد الفطريات المتوافرة.

طريقة العمل

1- يصب 10 مل من الأكار الذائب في طبق بتري معقم.
2- يتم تقسيم الوسط بعد تصلب الأكار إلى مربعات صغيرة (1 سم^2)، باستخدام أبرة تشريح معقمة وقضيب زجاجي معقم (مررت على لهب).
3- ترفع قطعة مربعة من الوسط وتوضع على شريحة زجاجية معقمة (مررت على لهب).

4- تلقيح الجوانب الأربعة لقطعة الأكار بالأبواغ أو بأجزاء من غزل الفطر المطلوب دراسته.

5- يوضع غطاء شريحة زجاجية معقمة (مررت على لهب) على سطح قطعة الأكار.

6- توضع الشريحة على قضيب زجاجي بشكل حرف V موضوع فوق ورقة نشاف في طبق بتري رطبت بماء مقطر معقم وكليسرين لتأمين الرطوبة ومنع تكوين الضباب على الشريحة او تنقل مزرعة الشريحة إلى كابينة رطبة تحتوي على كمية قليلة من الكليسيرين (تركيز20 %) لمنع تكوين الضباب على الشريحة الزجاجية.

7- يتابع نمو الفطريات وتكوين الأبواغ على فترات زمنية ، وبعد تكوين الأبواغ يمكن تحضير نوعين من الشرائح الزجاجية الفطرية الملونة باستخدام الصبغات المناسبة.

أ- النوع الأول يحضر بإزالة غطاء الشريحة من قطعة الأكار وضع قطرة من الكحول 95 % على مركز غطاء الشريحة لغرض ترطيب الفطر. قبل أن يجف الكحول بلحظات تضاف قطرة من صبغة أزرق القطن بالاكتوفينول، ثم ينزل الغطاء على شريحة زجاجية نظيفة ويفحص.

ب- أما النوع الثاني فيحضر باستخدام الشريحة الزجاجية التي نمي عليها الفطر جراء وجود قطعة الأكار، تتبع نفس الطريقة في الفقرة (6) والفقر (7) أعلاه، ثم يوضع غطاء شريحة نظيف ويفحص النمو.

ملاحظة:

يمكن غلق غطاء الشريحة مباشرة باستخدام مادة صبغ الأظافر بعد سحب المواد الزائدة من حواف الغطاء باستخدام ورق النشاف، وأحياناً يتطلب ترك الشريحة إلى اليوم التالي لضمان التخلص من المواد الزائدة التي قد تؤثر على غلق الغطاء بشكل محكم.

Slide culture preparation

Acknowledgement
Dr. Deepa Patil

© www.microrao.com

المصادر : عبد الرضا طه سرحان ،الفطريات العملي