عزل وتنمية الفطريات (2)

Dr.Hiba Fouad Abdulfatah

3-عزل فطريات الهواء Isolation of air 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.

4- عزل الفطريات المائية Isolation of Aquatic fungi

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 ومعظمها لا يحتاج إلى إضافة الفيتامينات ومن السهل عزل أنواع من الفطريات المائية من بيئاتها بواسطة بذور القنب المغلي أو الذباب الميت.

المواد:

1- عينات مياه عذبة من الأنهار أو السواقي أو البرك.
2- أطباق بتري معقمة.
3- بذور قنب.
4- حشرات ذباب ميتة.

طريقة العمل:

1- توضع بذور القنب في الماء وتسخن حتى الغليان.

2- تؤخذ كميات قليلة من عينات الماء وتوضع في الأطباق بواقع 15- 20 مل لكل طبق.

3- تقسم الأطباق إلى مجموعتين الأولى تخصص للعزل على بذور القنب والثانية تخصص للعزل على حشرات الذباب الميتة، وبواقع ثلاثة أطباق لكل معاملة كمكررات.

4- توضع في كل طبق من أطباق المجموعة الأولى عدداً من بذور القنب المغلي، وفي كل طبق من أطباق المجموعة الثانية عدد من حشرات الذباب الميتة.

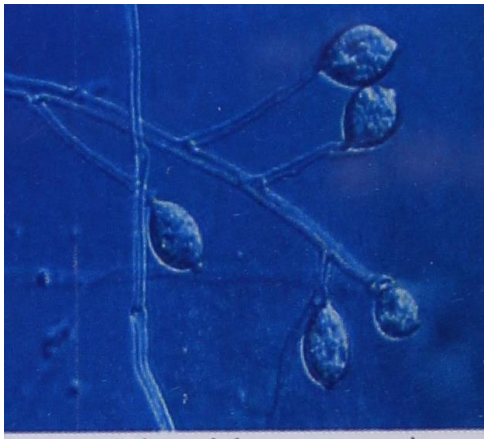
5- تحضن الأطباق في الحاضنة عند درجة حرارة 25 مْ لمدة 5-7 أيام ثم تفحص الأطباق وتلاحظ النموات الفطرية المتكونة على البذور أو الحشرات والتي تمثل الفطريات المائية.

6- تفحص البذور والحشرات التي ظهرت عليها نموات فطرية وتحدد أنواع الفطريات المائية، التي غالباً ما تعود إلى الفطريات البيضية وأحياناً إلى الفطريات الكتريدية

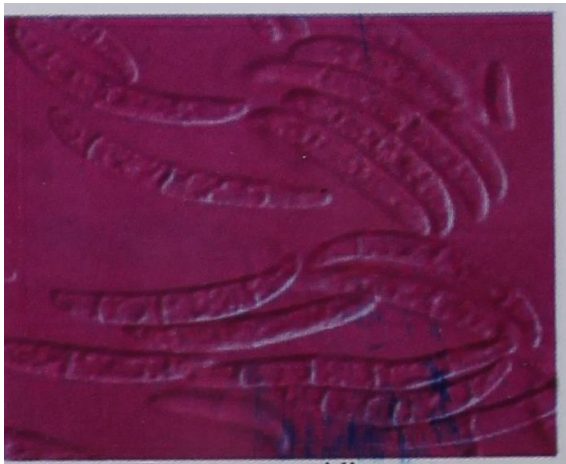
7- عزل فطريات التربة Isolation of soil borne fungi

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*, *Synchytrium* و *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Spongospora*



Phytophthora , sporangia



Fusarium, conidia

Rhizoctonia, hyphae

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

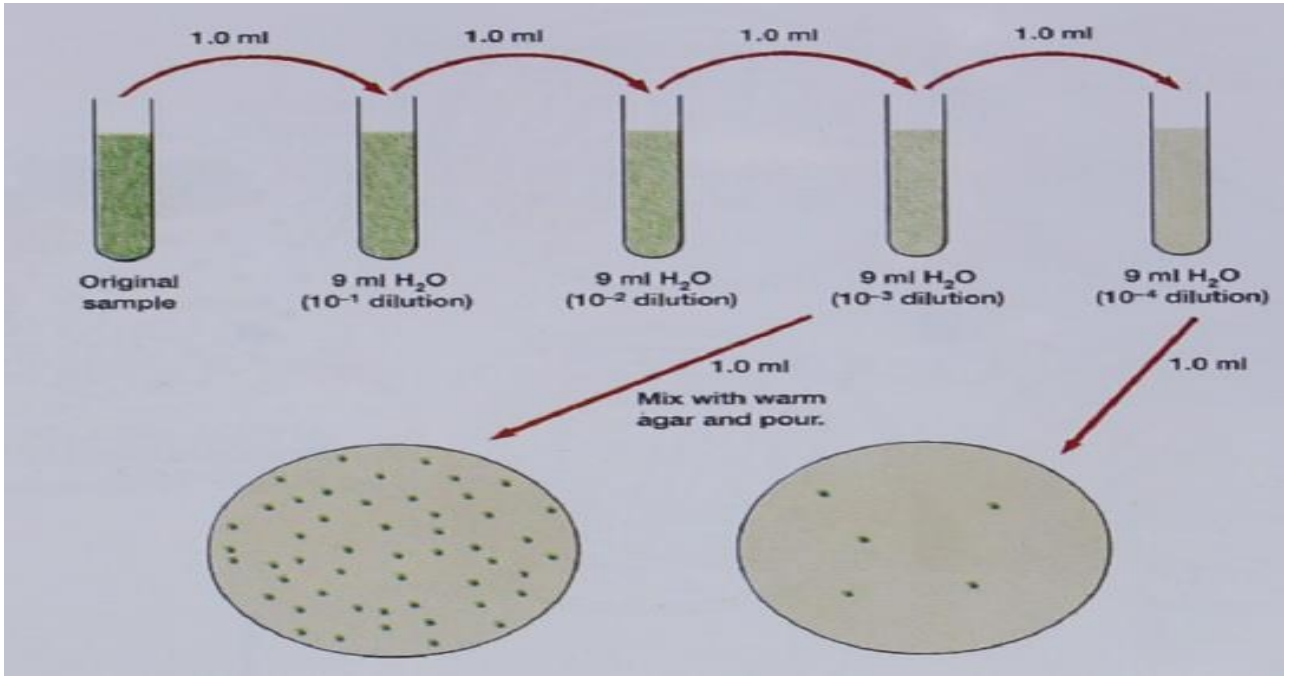
1- عينات تربة من عدة مواقع زراعية (تربة حديقة) وغير زراعية (تربة رملية طينية).
2- أطباق بتري معقمة.
3- وسط اكار ماء Water agar.
4- أنابيب اختبار.
5- ماء مقطر معقم.
6- ماصات معقمة وباحجام 0.5 مل و1.0 مل.
7- بيكرات بحجم 250 مل.

طريقة العمل:

تستخدم هنا طريقة التخفيف Dilution method وتتلخص بالتالي :

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 1/100، 1/1000 و1/10000



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- تخضن 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 العزل المباشر 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 الاطباق 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.

هذه الطريقة يمكن تنفيذها بأسلوب آخر يطلق عليه أطباق التربة soil plates، وفيها يتم توزيع عينات صغيرة معلومة من التربة في أطباق بتري لا تتجاوز كميتها عن 20 ملغم / طبق، توضع في قعر طبق البتري المعقم، يضاف إليه أكار مائي Water agar معقم ومبرد قبل تصلبه، ثم يتم تحريك محتويات الطبق رحوياً من أجل توزيع حبيبات التربة ضمن كامل الوسط الزرعي. تحضن الأطباق وتتابع بنفس الطريقة أعلاه.

ح- الطعوم Beating

تعتمد هذه الطريقة على استخدام الطعوم من مواد نباتية وحيوانية في عزل الفطريات، والتي تشمل أجزاء من السيقان، الأوراق، الجذور، الثمار، بذور الكتان، بذور القنب، حبوب اللقاح، أجنحة الحشرات، الشعر، جلد الأفاعي والريش وغيرها من المواد الأخرى. وفي حالة المواد الكيتينية يفضل وضع الطعوم الجافة على سطح التربة في أطباق بتري معقمة، والذي يجب أن يبقى رطباً، وفي حالة الرغبة في عزل الفطريات ذات الأبواغ السابحة تضاف كمية من الماء إلى الطبق الحاوي على التربة ثم يضاف الطعم إلى الماء الذي يغطي التربة. تحضن الأطباق عند درجة حرارة 25 مْ وبعد 48 ساعة يتم متابعة نمو الفطريات على الطعوم يومياً.

هذه الطريقة معتمدة أيضاً في عزل الفطريات المحبة للمواد الكيراتينية Keratinophilic fungi، وهي المواد الموجودة في الجلد والشعر والأظافر والريش، تجمع نماذج من التربة من أماكن مختلفة تشمل: مناطق حقول الدواجن، حقول تربية الحيوانات، مزارع أو حدائق تحتوي على بقايا نباتات وحيوانات، ويتم العزل باتباع الخطوات التالية:

طريقة العمل:

1- توضع كمية قليلة من عينة التربة في طبق بتري (الكمية لا تتجاوز نصف الطبق)، يضاف إليها 15 – 20 مل ماء مقطر معقم بحيث تبقى كمية زائدة من الماء فوق سطح التربة داخل الطبق، ثم يتم عمل مناطق في التربة بحيث يمكن تمييزها عبر الطبق.

2- تؤخذ أجزاء من شعر الإنسان أو الخيل المعقم سلفاً وتقطع فوق سطح التربة، سوف يكون بالإمكان ملاحظة قطع الشعر التي تظهر عليها نموات الفطريات عند فحص الأطباق تحت المجهر باستخدام القوة الصغرى من خلال المناطق التي تم عملها في التربة بعد عدة أسابيع من الحضن. يفضل أن يتم حضن الأطباق في الظلام عند درجة حرارة 20-25 مْ لمدة 4-6 أسابيع. تفحص قطع الشعردورياً خلال هذه المدة لملاحظة النموات الفطرية على جانبي قطع الشعر.

3- تنقل قطع الشعر التي نما عليها غزل فطري إلى وسط زرعي مائل في أنابيب اختبار culture slants أو إلى أطباق بتري تحتوي على وسط سابرود Sabouraud agar، المضاف إليه أحد مضادات البكتريا (السايكلوهكسمايد أو الكلورامفنيكول).

4- تفحص الأطباق بعد أسبوع واحد أو أكثر للتأكد من نمو الفطريات، ثم تفحص الفطريات للتعرف على الأجناس والأنواع النامية، ويمكن الحصول على مزارع نقية منها باستخدام طريقة البوغ المفرد single spore method.