طرق التعقيم مختبرياً

من الضروري اجراء التعقيم داخل المختبر ، حيث يتم تعقيم كافة الادوات والمستلزمات المستخدمة مختبرياً عند اجراء عزل الفطريات على اوساط زرعية لتلافي حدوث التلوث بواسطة الاحياء المجهرية الاخرى (كالبكتريا) . اذ يتم تعقيم المناضد والاماكن التي تستخدم لهذا الغرض .

ومن طرق التعقيم هي :-

1- **التعقيم بالحرارة** : اذ تستخدم الحرارة الرطبة لتعقيم الاوساط الزرعية بواسطة الموصدة . والحرارة الجافة كاللهب والفرن الكهربائي لتعقيم الادوات المختبرية .

2- **التعقيم بالكحولات** : تستخدم مادة الايثانول (او مطهرات اخرى) لتعقيم المناضد وبعض المستلزمات الاخرى .

3- **التعقيم بالاشعة (UV)** : تستخدم الاشعة فوق البنفسجية احياناً لغرض التعقيم لاسيما في غرف الزرع .

ملاحظة : يتطلب على الطلبة ارتداء Lab coat في اوقات المختبر .

طرائق عزل الفطريات مختبرياً

اولاً : عزل الفطريات من الهواء (Air born fungi)

1- تحضير اوساط زرعية مناسبة مثل (PDA) في اطباق بتري معقمة وتترك لتتصلب .

2- تعرض اطباق بتري الحاوية على الوسط الزرعي الصلب الى الهواء الخارجي (بعد رفع غطاء الطبق) لفترة زمنية (15-20) دقيقة ثم يعاد الغطاء ، وتجلب للمختبر .

3- تحضن الاطباق في الحاضنة تحت درجة حرارة (25)مْ لمدة (7) ايام .

4- يتم فحص المستعمرات الفطرية النامية باستخدام المجهر التشريحي والمجهر الضوئي (بعد ان تحضر شرائح زجاجية لكل مستعمرة فطرية) .

5- تشخص الاجناس والانواع الفطرية ويتم رسم التراكيب الفطرية المطلوبة .

ثانياً : عزل الفطريات من التربة (Soil-Fungi)

أ- طريقة التخفيف (Dilution Plating technique)

1- يحضر وسط زرعي مناسب (Czapeks Agar) في دوارق زجاجية ويعقم بالموصدة .
2- تجلب عينات من تربة زراعية في اكياس نايلون الى المختبر .
3- يمزج (10) غم من التربة في (100) مل ماء مقطر معقم في دورق زجاجي لمدة (15) دقيقة وذلك برجها جيداً .
4- يوضع (2) مل من العالق بواسطة ماصة معقمة في طبق بتري ويصب الوسط الزرعي المحضر (وهو لازال سائلاً) الى الطبق ويحرك بهدوء (حركة رحوية) لتجانس العينة مع الوسط .
5- تحضن الاطباق في الحاضنة تحت درجة حرارة (25) مْ لمدة (7) أيام .
6- يتم فحص المستعمرات الفطرية النامية على الوسط الزرعي ويتم تشخيصها بعد ان تحضر شرائح زجاجية لكل مستعمرة فطرية .
7- يمكن ان يخفف عالق التربة بنسبة (1\1000 ، 1\10.000) .

ب – طريقة الصب المباشر (Direct Plating Method)

1- يحضر وسط زرعي مناسب مثل Czapeks Agar في اطباق بتري معقمة وتترك لتتصلب .
2- ينثر (1) غم من عينة التربة على سطح الوسط الزرعي الصلب .
3- تحضن الاطباق في الحاضنة لمدة (7) أيام وتحت درجة حرارة (25) مْ .
4- تفحص المستعمرات الفطرية النامية ويتم تشخيصها .

ثالثاً : عزل الفطريات من الماء (Water-Molds)

1- تجلب عينات مائية من بيئة نهر او بحيرة بواسطة قناني معقمة الى المختبر .
2- توضع كمية من عينة الماء في اطباق بتري معقمة ويضاف اليها بذور السمسم المغلية (عدد 5-10 بذرة لكل طبق) .
3- تحضن الاطباق في الحاظنة تحت درجة حرارة (18-20) مْ لمدة (3) أيام .
4- تفحص المستعمرات الفطرية النامية حول بذور السمسم بواسطة مجهر التشريح ثم تحضر شرائح زجاجية لفحص التراكيب الفطرية ويتم تشخيص الانواع الفطرية ، وتدعى طريقة العزل بطريقة الطعم (Baiting technique) .

رابعاً :عزل الفطريات من النباتات Phylloplane and Rhizoplane fungi

1- تجلب عينات من اجزاء النبات (جذور او اوراق) بعد وضعها في اكياس نايلون الى المختبر .
2- تقطع الاجزاء النباتية الى قطع صغيرة (1) سم وتغسل بالماء جيداً ثم تعقم سطحياً بواسطة الكحول (5% ايثانول) او بواسطة هايبوكلورات الصوديوم NaOCl بتركيز (3 %) ولمدة (5) دقائق .
3- توضع الاجزاء النباتية على وسط زرعي محضر في اطباق بتري (5) قطع لكل طبق .
4- تحضن الاطباق في درجة حرارة (25) مْ لمدة (7) أيام .
5- تفحص المستعمرات الفطرية النامية على الوسط الزرعي ويتم تشخيصها .

خامساً :عزل الفطريات من الحيوانات Zoophilic fungi

1- تجلب عينات من بعض اجزاء بعض الحيوانات (الابقار والاغنام وغيرها) وذلك بقطع اجزاء من الشعر او الصوف وتوضع في اكياس وتجلب الى المختبر .
2- تقطع اجزاء الشعر والصوف الى قطع صغيرة وتعقم سطحياً بالكحولات ، ثم تنقل الى وسط زرعي صلب محضر في اطباق بتري مثل وسط سابرود اكر (Sabouraud Agar) .
3- تترك الاطباق في الحاضنة تحت درجة حرارة 25 مْ لمدة اسبوعين او اكثر .
4- تفحص المستعمرات الفطرية النامية ويتم تشخيصها .

ملاحظة : يمكن اتباع الطريقة اعلاه في عزل الفطريات من المواد المتقرنة كالشعر والجلد والاضافر من الانسان ويمكن تشخيص انواع من الفطريات المعروفة بالفطريات المحللة للكيراتين (Keratinolytic fungi) .