

المختبر الثاني**عزل الفطريات Isolation of fungi**

ان دراسة الفطريات والتعرف عليها وعلى اسرارها يتطلب الحصول على مزرعة نقية من الفطر المراد دراسته. كما ان المزرعة النقية من هذا الفكر مهمه في تحديد الاطوار الخضرية والتكاثرية والتمرية التي تعود لنفس الفطر والتي تكونت من نفس المستعمرة الفطرية الناتجة من سبور مفرد Single spore والمزرعة النقية تستخدم في اثبات قدرة الفطر على اصابة الانسان او الحيوان او النبات بالاعتماد على الفرضيات المعروفة بفرضيات كوخ Koch's postulates ناهيك عن اهمية المزرعة النقية في التجارب والدراسات الفسلجية والوراثية لكل فطر .

وتختلف طرق عزل الفطريات باختلاف المجاميع الفطرية وبيئاتها والاوساط التي تتواجد فيها :-

- **عزل الفطريات من التربة soil**

تلعب فطريات التربة دورا كبيرا في عملية التوازن الاحيائي في من خلال قابليتها في تفسخ وتحليل المواد العضوية كذلك اهميتها للمشتغلين في الامراض النباتية فالكثير من الفطريات تسبب امراضا للنبات مثل امراض الذبول وموت البادرات والتعفن وغيرها ولذلك لابد من دراستها من حيث عزلها وتقدير كثافتها العددية وتوزيعها .

ومن الطرق الشائعة في عزل الفطريات من التربة

١. الطريقة المباشرة (طريقة الصب المباشر) Direct Plate method

وهي طريقة بسيطة تتطلب وجود اطباق حاوية على اوساط زرعية معينة وحسب طبيعة البحث وكعمل روتيني لشخص مبتدأ نستعمل وسط PCA (potato carrot agar) حيث يتم عمل عدة مكررات لكل عينة تربة وكلما زادت اعداد المكررات حصلنا على معدل ثابت من الفطريات وازداد التنوع .

بعد ذلك نزن (1غم) من التربة على اساس الوزن الجاف ثم ننشر بواسطة ملعقة مختبرية على سطح الوسط الزرع في اطباق بتري ثم تحضن بعد ان تعلم بالمعلومات والتاريخ ويكون الحضن على درجة حرارة 25 °م أو اي درجة حرارة اخرى وبعد الحضن تفحص للتعرف على الفطريات النامية. بهذه الطريقة يمكن عزل عدد كبير من الفطريات لان اي جزء فيها سوف يكون موجود في التربة وسوف ينمو ويعطي مستعمرة فطرية .

٢. طريقة التخفيف Dilution method

تستخدم هذه الطريقة لحساب عدد المستعمرات في وزن معين من التربة وبالتالي يمكن تقدير الكثافة العددية للفطريات المتواجدة في التربة .

تتطلب هذه الطريقة المواد التالية :-

أ- اطباق بتري معقمة وخالية

- ب- دوارق مخروطية معقمة
- ت- ماصات معقمة
- ث- اسطوانات زجاجية معقمة
- ج- ماء مقطر معقم
- ح- وسط زرعي جاهز للصب (درجة حرارته 50 ° م تقريبا)

تؤخذ عدة مكررات من عينات التربة بصوره عشوائية حسب الغرض من التجربة وتوضع في اكياس نايلون معقمة ثم تجلب الى المختبر وتخلط العينات جيدا ثم تجرى عملية العزل على اساس الوزن الجاف .

نعمل سلسلة من التخفيف من عينة التربة بأخذ (10gm) من التربة على اساس وزن جاف ويضاف لها (90ml) من ماء المقطر المعقم فيصبح التخفيف (1/10) توضع في دورق مخروطي الشكل ويوضع في الهزاز الكهربائي او يرج باليد حتى يتجانس المعلق ، ويؤخذ (10ml) من هذا التخفيف بواسطة ماصة معقمة وينقل الى (90ml) ماء مقطر معقم في دورق اخر فيصبح التخفيف (1/100) وتستمر العملية للحصول على سلسلة من التخفيف العشرية .

وتعلم الدوارق جيدا لكي لا تختلط . ينقل (1ml) من التخفيف الى طبق بتري معقم وخالي ويعمل لكل تخفيف عدد من المكررات وكلما ازداد العدد كلما قلت نسبة الخطأ وامكن الحصول على معدل ثابت لعدد المستعمرات النامية .

✓ غالبا ما تهمل التخفيف الاولي لان عدد المستعمرات سوف يكون كبير جدا فيها وبذلك يصعب عدّها وان هذه العملية تعتمد على طبيعة التربة فاذا كانت التربة غنية بالمواد العضوية مثل الترب الزراعية والترب الحاوية على الاسمدة العضوية فتعمل لها تخافيف كثيرة اما اذا كانت الترب فقيرة بالمواد العضوية كالترب الرملية والملحية فتعمل منها تخافيف اقل لان عدد المستعمرات المتوقع ظهورها قليل اي ان المجتمع الفطري فيها قليل الكثافة .

يصب الوسط الزرعي في الاطباق الحاوية على التخفيف ثم تحرك حركة رحوية (باتجاه وعكس اتجاه عقرب الساعة) حتى يتم توزيع المعلق بشكل متجانس .تترك الاطباق حتى يتصلب الوسط ثم تحضن بعد ان يتم تعليم الاطباق وتوضع الاطباق مقلوبة في الحاضنة على درجة حرارة 25 ° م وتفحص الاطباق بعد مدة معينة حسب طبيعة البحث وتعد المستعمرات ويضرب عددها في مقلوب التخفيف للحصول على عدد المستعمرات في 1غم من التربة .

عدد المستعمرات / 1 غم من التربة = متوسط عدد المستعمرات في المكررات × مقلوب التخفيف

● عزل الفطريات من الهواء Air

يكون الهواء محمل بأعداد كبيرة من سبورات الفطريات وتختلف اعدادها وانواعها من مكان الى اخر وكذلك من ارتفاع الى اخر وهذه السبورات قد تعود لفطريات مرضية للإنسان والحيوان او للنبات .

وهناك طرق عديدة لعزل الفطريات من الهواء :-

- ١- استخدام اجهزه خاصة (مضخة) لسحب الهواء الى حيز معلوم وتقدر اعداد السبورات للفطريات اعتمادا على الحجم المعلوم .
- ٢- استخدام مصائد هوائية للفطريات وهي عبارة عن صناديق ذات فتحات معينة توضع فيها شرائح زجاجية عليها غشاء رقيق من وسط PCA او اي وسط اخر او تغطى بمادة لاصقة وتترك لفترة زمنية معينة ثم تؤخذ الشرائح وتفحص تحت المجهر لتحديد الانواع الفطرية .
- ٣- الطريقة الروتينية :- تؤخذ اطباق بتري حاوية على اوساط زرعية وتعرض الاوساط الى الهواء لمدة زمنية معينة ثم تعلم وتوضع في الحاضنة على 25 ° م وبعد فترة الحضان تفحص وتشخص الانواع الفطرية .

● عزل الفطريات من الماء water

ان قسم من فطريات الماء هو بالأصل من فطريات التربة والتي انحدرت الى الماء ولكن هذا لا يعني عدم وجود فطريات هي بالأصل تعيش في الماء وتمتلك من التراكيب الخاصة التي مكنتها من المعيشة في هذه البيئة وهناك عدة طرق لعزل هذه الفطريات منها

١. طريقة pour plate method

في هذه الطريقة يضاف 2مل من العينة المائية الى طبق بتري ثم يصب فوقها الوسط الزراعي السائل ويحرك الطبق حركة رحيوية ثم يعلم ويحضان على درجة حرارة ملائمة .

٢. طريقة الطعم baiting method

تستخدم هذه الطريقة لعزل مجاميع فطرية معينة ومنها مجموعة اعفان الماء water mold التي تكثر في المياه العذبة .

✓ هناك طريقة لعزل الفطريات من الاغصان والاوراق والشعر ومخلفات الحيوانات وبقايا الثمار وغيرها من المواد العضوية تسمى بطريقة الغرفة الرطبة moist chamber وتتخلص هذه الطريقة بوضع المادة المراد العزل منها في طبق معقم حاوي على ورقة ترشيح معقمة ومرطبة بماء مقطر معقم ومن ثم تحضان بالحاضنة او بدرجة حرارة الغرفة حسب طبيعة البحث والفطر المراد عزله ويفحص الطبق بين الآونة والاخرى للتعرف على الفطريات النامية وعزلها .

فحص وتشخيص الفطريات Examination and identification of fungi

عندما تظهر الفطريات على سطح الوسط الزراعي يتم فحصها باستخدام مجهر التشريح Dissecting microscope حيث يوضع الطبق تحت المجهر لملاحظة نمو الفطر على الوسط الزراعي والشكل العام للنمو وفيما اذا كان الفطر ينمو على سطح الوسط الزراعي او تحت الوسط وملاحظة اشكال وترتيب السبورات على الحوامل الفطرية وفيما اذا كان الفطر يكون اجسام ثمرية fruiting- bodies او اجسام حجرية sclerotia وملاحظة لون المستعمرات او اي تراكيب اخرى موجودة .

يتم تشخيص الفطريات بصورة دقيقة وذلك عن طريق التعرف على المزيد من الصفات وذلك باستخدام وسط مناسب هو lactophenol cotton blue والذي يعتبر من افضل الاوساط الملائمة لفحص الفطريات حيث ان هذا الوسط مضاف اليه صبغة ال cotton blue يعمل هذا الوسط على تثبيت وتصبيغ الفطر ولا يؤثر على شكل الخلايا فلا يحصل فيها انكماش او بلزمة وبذلك تبقى محتفظة بشكلها الحقيقي .

• يحضر وسط lactophenol cotton blue (LPCB) من :-

1. حامض اللاكتيك	Lactic acid	20ml
2. فينول	phenol	20gm
3. كليسرين	Glycerin	40ml
4. ماء مقطر	Distal water	20ml

هذه المكونات تعطي المادة المثبتة وتكون شفافة اللون ويضاف لها صبغة ال cotton blue بنسبة 0.05 غم

طريقة العمل

ناخذ قطرة من الوسط وتوضع على الشريحة النظيفة ثم ينقل جزء من مستعمرة الفطر بواسطة ابرة معقمة ويوضع في القطرة (الاخذ يكون من الجزء الطرفي من مستعمرة الفطر) ثم تغطي الشريحة بغطاء الشريحة .ثم تفحص الشريحة بواسطة المجهر المركب وتستخدم القوة الصغرى 4X ثم تحول الى القوة الكبرى ويفحص الفطر للتعرف عليه باستخدام كتب مخصصة في مجال تصنيف الفطريات .

عند التشخيص يلاحظ الصفات الاساسية للفطر وهي :-

1- اللون 2- الشكل 3- الحجم

✓ اذا كان الفطر ملون Dematiaceous فلا يحتاج الى صبغة ويمكن فحصه باستخدام قطرة من الماء المقطر المعقم

اما اذا كان الفطر شفاف Hyaline فيفحص باستخدام قطرات من وسط الصبغة.

✓ بالنسبة للشكل فتلاحظ الخيوط الفطرية هل هي مقسمة septate او غير مقسمة Aseptate ،شكل السبورات هل هي كروية ، بيضوية ، اهليجية ، متطاولة ، ملساء ، مشوكة ، محززة.

✓ شكل الاجسام الثمرية هل هي كروية ، قرصية ، دورقية ، كاسية اضافة الى اشكال الاكياس في داخلها هل هي صولجانية ، اسطوانية ، خيطية ، دائرية الخ من الاشكال

✓ اما الحجم فيتم اخذ قياس كل التراكيب السابقة الذكر وذلك لان الاختلافات في حجم

السبورات التابعة لنفس الحجم يميزها الى انواع مختلفة