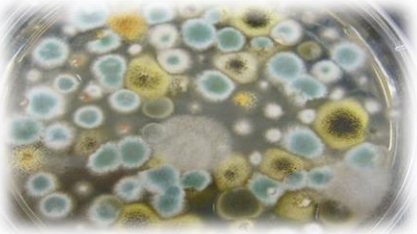
بسم الله الرحمن الرحيم

علم الفطريات العملي

الدراسة الاولية

م.م. افراح طالب عبدالله

المرحلة الثالثة



المحاضرة الثانيه

الأوساط الزرعية Culture Media

الصفات العامة للفطريات

١- كائنات حقيقية النواة غير ذاتية التغذية وحيدة الخلية كما في الخمائر او خيطية

٢- تحتوي على جدار خلوي متكون من الكايتين

٣- متباينة المعيشة Heterotrophic حيث تكون اما رمية تقوم بتحليل المواد العضوية الموجودة في الوسط لتحصل على المواد الغذائية او متطفلة تتطفل على النباتات والحيوانات مسببة امراض كثيرة او تكون علاقة تكافلية مع النباتات مثل فطريات Mycorrhiza

٤- تتكاثر جنسيا عن طريق تكوين السبورات الجنسية ولا جنسيا عن طريق التكوين الكونيديات والسبورات اللاجنسية

٥- الخيوط الفطريات اما تكون مقسمة كما في الفطريات البازيدية والكيسية او غير مقسمة عبارة عن مدمج خلوي كما في الفطريات اللاقحية

الاوساط الزرعية Culture media

تزرع الفطريات على اوساط غذائية Nutrient media او تسمى اوساط زرعية Culture media تختلف هذه الأوساط تبعاً لطبيعة الفطر وتبعاً للغرض من زراعته وتعرف الأوساط الزرعية على انها البيئة الغذائية الملائمة لنمو الكائن الحي الدقيق (البكتيريا والفطريات) الذي يحصل على غذائه منها وهذه البيئة تحتوي على الكاربون والنايتروجين والأملاح المختلفة وقد تضاف اليها بعض الفيتامينات اما على هيئة مستخلص نباتي او مواد جاهزة كما تضاف اليها بعض المضادات الحياتية من أجل منع نمو البكتيريا وافساح المجال لنمو الفطر فقط او العكس و من هذه المضادات هي : Cyclohexamide , Chloramphenicol , Ampecilline , Streptomycin

تقسم الأوساط الغذائية حسب مكوناتها الكيمياوية الى ثلاثة انواع هي:

١ـ الأوساط الطبيعية Natural media :

وهي عبارة عن مستخلصات طبيعية نباتية او حيوانية معقدة غير معروفة التركيب كماً ونوعاً و تحضر غالباً من الأنسجة النباتية او الحيوانية مثل الثمار والخضروات والبيض والحليب ومستخلصات الخميرة والشعير وسوائل الجسم وغيرها. وتمتاز هذه الأوساط بأنها تماثل في تركيبها الوسط الذي ينمو عليه الفطر في الطبيعة علاوة على احتواءها على الفيتامينات و العناصر الأخرى غير الموجودة في باقي الأوساط، كذلك هي رخيصة الثمن وسهلة التحضير كما ان معظم الفطريات تنمو وتتجرثم جيداً في مثل هذه الأوساط. ومن امثلتها مستخلصات الأجزاء النباتية كالبطاطا والجزر والفاصوليا والشعير والرز وغيرها.

٢ـ الأوساط التركيبية (المحضرة أو الصناعية) Synthetic media :

وهي تتكون من مواد كيمياوية عضوية او غير عضوية معروفة التركيب كماً ونوعاً وقد يراعى في مثل هذه الأوساط انها تشابه قدر الإمكان تركيب الأنسجة والأعضاء النباتية التي تنمو عليها الفطريات كما يجب مراعاة المواد المستعملة في تركيب مثل هذه الأوساط وحسب الغرض الذي يستخدم من أجله هذه الأوساط وغالباً ما تستعمل هذه الأوساط في الدراسات العلمية التي يقصد منها تأثير التغذية على نمو الفطر وتجرثمه ومثل هذه الأوساط وسط براون Brown’s media ووسط ريتشارد Richard’s media ووسط زابكس دوكس اكار CZapek Dox Agar .

٣ـ الأوساط شبه التركيبية Semi Synthetic media:

وهي خليط من النوعين السابقين وذلك لاحتوائها على واحدة او اكثر من المواد الطبيعية غير معروفة التراكيب بالإضافة إلى مركبات كيماوية معروفة التراكيب الكيماوي لذلك تمتاز باكتسابها ميزات كل من النوعين السابقين وتستخدم في الدراسات الفسلجية للفطريات ومن امثلتها وسط البطاطا والدكستروز Potato Dextrose Agar ويرمز له (PDA) والذي يستخدم بشكل شائع في تنمية أغلب الفطريات وعزلها .

كما تقسم الأوساط الغذائية حسب حالتها الفيزيائية الى ثلاثة انواع هي :

ا-الأوساط الصلبة Solid media:

وهي نوع من الأنواع الثلاثة السابقة مضافاً اليها مادة الأكار (Agar) والاكار مادة عضوية معقدة التراكيب تستخرج من بعض الطحالب البحرية ويوجد منها عدة انواع تجارية تمتاز فيما بينها بدرجة نقاوتها يضاف الى الأوساط الغذائية لكي يساعد على تصلبها عند درجة حرارة اقل من ٤٥°م ويصبح سائلاً عند الدرجات الحرارية العالية يضاف الى الوسط بنسبة ٢٠ -١٥% من الوسط اي ٢٠ – ١٥ غم لكل لتر من الوسط الغذائي. تمتاز الأوساط الصلبة بسهولة الاستعمال والنقل واكتشاف التلوث كما تستخدم بنجاح في عزل وتنقية الفطريات كذلك في حفظ مزارع الفطريات المختلفة كأصول في الثلاجة لفترات طويلة وتحضر هذه الاوساط اما في انابيب اختبار مائلة او عميقة او يصلبها في اطباق بتري .

ب ـ الاوساط السائلة liquid media :

وهي الاوساط المحضرة بدون اضافة مادة الاكار لذلك يجب الاحتياط عند نقلها لتفادي وصول الوسط الى السدادات القطنية ومن فوائد هذه الاوساط انها تسمح بتهوية المزارع ويمكن من وزن الغزل الفطري وتحليل المنتجات الايضية بسهولة وتستخدم في الدراسات الغذائية كنقص العناصر الغذائية والفيتامينات وتأثير اضافتها للفطريات كما تستخدم هذه الاوساط في الدراسات الايضية الثانوية من قبل الفطريات مثل افراز المضادات الحياتية والسموم والانزيمات وغيرها وتحضر هذه الاوساط في دوارق مخروطية مختلفة الحجم وحسب نوع الدراسة .

ج- الأوساط شبه الصلبة semi solid media. :

وهي أوساط ذات قوام جيلاتيني وتحتوي على كميه قليلة من الأكار أو بعض العوامل المصلبة الاخرى كالجيلاتين وتستخدم هذه الاوساط لأغراض خاصة منها دراسة التراكيب التكاثرية المتحركة للفطريات او البكتريا .

وتقسم حسب الاستخدام الى

١- الاوساط الروتينية Routing media

وهي اوساط تحضر من مواد طبيعية ذات اصل نباتي او حيواني وتستخدم هذه الاوساط لغرض زراعة او ادامة الفطريات مثل وسط الشعير malt extract agar و مستخلص الخميرة yeast extract agar .

٢ـ الاوساط المدعمة Enriched media

وهي اوساط روتينية يتم اضافة بعض المواد اليها لتلبية المتطلبات الغذائية لبعض الفطريات مثل وسط روتيني يضاف اليه الببتون .

٣ـ الاوساط الانتخابية Selective media

وهي اوساط تحتوي على مواد تثبط نمو جميع الفطريات ماعدا الانواع الفطرية المطلوبة مثل اضافة Cyclohexamide لوسط Sabouraud dextrose agar .

٤ـ الاوساط التفريقية Differential media

وهي اوساط تحتوي على كواشف يمكن بواسطتها التفريق بين مختلف انواع الكائنات المجهرية على اساس فروق مرئية في انماط نموها

٥ـ اوساط القياس Assay media

وهي اوساط تستخدم لقياس المنتجات التي تكونها الفطريات في الوسط مثل المضادات الحيوية والانزيمات .

نماذج من الأوساط الزرعية الشائعة :

ان جميع الفطريات غير الاجبارية التطفل قد يمكن زراعتها وإكثارها على لأوساط الزرعية . فالوسط الزرعي الصلب عادة ما يكون مفضلا في عمليات العزل Isolation والاكثار Cultivation والتنقية Purification وكما هو معروف ان المصدر الذي يعطي صفة الصلابة الزرعية هو الاكار agar ونستعرض هنا بعض الاوساط الزرعية الشائعة الاستخدام في مختبر الفطريات :

ا- الأوساط الطبيعية Natural Media :

وتشتمل على مواد مشتقة من نواتج طبيعية مثل الحنطة وبقية الحبوب البطاطا وغيرها ومن أهم مكوناتها هي :-

١- وسط أكار مستخلص الشعير Malt extract Agar

* Malt extract 20g

* Agar 15g

* Distill water 1000 ml (1L)

٢- وسط أكار الماء Water Agar

* Agar 20g

* Distill water 1000 ml

٣- وسط أكار البطاطا Potato Agar

* Potato 200g

* Agar 15-20g

* Distill water 1000 ml

ب- الأوساط الصناعية Synthetic Media :

١- وسط زابك دوكس CZapek Dox Agar

*NaNO3 3g نترات لصوديوم

*K2HPO4 1g فوسفات ثنائي البوتاسيوم

* KCl 0.5g كلوريد البوتاسيوم

MgSO4.7H2O 0.5g * كبريتات المغنسيوم

*FeSO4.7H2O 0.01-0.03g كبريتات الحديدوز

* Sucrose 30g

* Agar 15-20g

* Distilled Water 1000 ml

٢- وسط ريتشارد Richards medium

* KNO3 10 g نترات البوتاسيوم

* KH2PO 5g فوسفات البوتاسيوم

* MgSO4.7H2O 2.5g كبريتات المغنيسيوم

*FeCl3 0.02g كلوريد الحديديك

* Sucrose 50 g

* Agar 15-20 g

* Distilled water 1000 ml

ج- الاوساط شبه الصناعية Semi Synthetic Media :

١-وسط أكار البطاطا و الدكستروز Potato Dextrose Agar

* potato extract 200g

*Dextrose 20 g

* Agar 15-20 g

* Distilled water 1000 ml

ج- الاوساط شبه الصناعية Semi Synthetic Media :

١-وسط أكار البطاطا و الدكستروز Potato Dextrose Agar

* potato extract 200g

*Dextrose 20 g

* Agar 15-20 g

* Distilled water 1000 ml

٢- وسط أكار مسحوق الذرة Corn Meal Agar

* Corn Meal 20g

* Peptone 20g

* Dextrose(if desired) 20 g

*Agar 15_20g

* D .w. 1000 ml

٣- وسط سابرويد Sabouraud Media

* Peptone 10 g

* Glucose or dextrose or maltose 20 g

*Agar 20 g

* D. water 1000 ml

طريقة تحضير وسط PDA :

١.تؤخذ درنات البطاطا بمقدار200 g وتغسل جيدا ثم تقطع الى قطع صغيره وتطبخ في دورق لمدة نصف ساعه مع نصف لتر من الماء المقطر .

٢.ترشح البطاطا المسلوقة خلال قطعة قماش شاش .

٣.ياخذ الراشح ويضاف له سكر الدكستروز (٢٠g ثم يضاف الاكار تدريجيا الى الراشح حتى لا يتكتل الاكار) .

٤.يكمل الحجم الى لتر بإضافة النصف المتبقي من الماء المقطر ثم يضاف مضاد حيوي مثل Chloromphenicol بمقدار ٢٥٠ ملغم في اللتر الواحد ثم يعقم الوسط بجهاز التعقيم autoclave .

المواد المستعملة في تحضير وسط أكار البطاطا والدكستروز Potato Dextrose Agar

كلورامفنيكول 0.5g (لتثبيط نمو البكتريا)

أكار البطاطا والدكستروز 39g

الماء المقطر 1000ml

الاجهزة والادوات المستعملة

-Autoclave جهاز التعقيم (المؤصدة)

– Cylinder اسطوانه مدرجة

- Filter papers اوراق ترشيح

– Flask conical دورق مخروطي

--Petri Dishes اطباق بتري

- Sensitive balance ميزان حساس

- Magnetic bar مازج مغناطيسي

- Hot blate صفيحة حرارية

طريقة العمل

١. وزن ٣٩ gm من الوسط المراد تحضيره بأستخدام الميزان الحساس.

٢. بواسطة الاسطوانة المدرجة قياس ١٠٠٠ ml من الماء المقطر.

٣. وزن 0.5g من المضاد الحيوي الكلورامفنيكول (لتثبيط نمو البكتريا).

٤. وضع الوسط في الدورق المخروطي ثم يضاف اليه المضاد الحيوي ويوضع ايضاً المازج المغناطسيي.

٥. وضع الماء المقطر الى الوسط (يصب بالتدريج لمنع تكتل الوسط)

٦. يرجع جيداً بواسطة اليد.

٧. يوضع الوسط ومحتوياته على Hot blate لمدة عشر دقائق تقريباً.

٨. يوضع الوسط في الاوتوكليف للتعقيم.

٩. يصب الوسط تحت ظروف التعقيم

المحاضرة الثالثة

عزل الفطريات

عزل الفطريات Isolation of fungi

ان الهدف الحقيقي لعزل الفطريات قد يعزى إلى عدة أسباب:

١-التعرف الحقيقي على المحتوى الكمي والنوعي للفلورا الفطرية وتنوعها وترددها وسيادة أنواعها وخصوصاً في الترب الزراعية.

٢-تشخيص الفطريات المرضية عن الفطريات المترممة الأخرى.

٣- دراسة الفطريات والتعرف على صفاتها وتصنيفها والجوانب البايلوجيه الفسلجية والمرضية .

٤-لأجراء العديد من الدراسات العلمية عليها كالتضاد والحساسية والأمراضية وغيرها.

ومن أهم الصعوبات التى تواجه الباحث عند إجراء العزل هي احتمال التلوث بكائنات أخرى يختلف عن الكائن الذى يراد عزله ولذلك يجب أن يكون هناك مراعات قبل إجراء عملية العزل مثل تعقيم الحجرة التى يقوم الباحث بعزل الفطريات فيها وذلك باستخدام الفورمالين وكذلك تعقيم جميع الأدوات المستخدمة فى العزل من مشارط وملقط وابر وأدوات زجاجية وغيرها كما يجب أن تتم جميع إجراءات العزل والتنقية فى أماكن معقمة لجنب حدوث تلوث.

١- عزل الفطريات من النبات Isolation From Plants

يتم عزل الفطريات من النبات من خلال اتباع الخطوات الاتيه :

١- جلب عدد من الأجزاء النباتيّة المصابة إلى المختبر (الأوراق ، السّيقان ، الثمار ، الجذور ، الدرنات) ونقطعها إلى قطع صغيّرة (١ سم) من المناطق المصابة.

٢- نضع القطع فَي محلول التعقيم لمدة (١-٢ سم) لتعقّيمها سطحّيا.

٣- نخرج القطع بملقط رفّيع ومعقم ثم نغسلها بماء مقطر معقم Distell Water عدة مرات لإزالة تأثيّر المعقم.

٤- ثم ننقلها إلى أوراق ترشّيح ونتركها حتى تجف

٥- بعد ذلك ننقل القطع الجافة إلى عدد من أطباق بتري المحتوّية على وسط مغذي ومضاد بكتّري ، ثم تحفظ الأطباق بدرجة حرارة ٢٥ م لمدة ٥ أّيام لغرض نمو الفطريات

٢- عزل الفطريات من التربة Isolation From Soil

عند اخذ عينات من التربة لابد من ذكر بعض التفاصيل عن الموقع الذي تجمع منه العٌينات ، كالنباتات الموجودة ونوع التربة ، فًي الغالب تأخذ كمية بمقدار(٥٠-١٠٠) غم بعد رفع الطبقة العلوٌية للتربة من الموقع المراد اخذ العيٌنة منه وبحدود (١٠-١٥سم). توضع العٌينة فًي وعاء بلاستٌكً نظٌيف وتكتب التفاصٌيل على قصاصة من الورق توضع داخل الكيٌس ثم ٌيغلق وٌينقل إلى المختبر لغرض الدراسة . وهناك عدة طرق لعزل الفطريات من التربة منها.

١- العزل بالطريقة المباشرة Direct Method

تؤخذ أجزاء صغٌيرة من عينات التربة المراد زراعتها وتوزع على أطباق بتري حاوٌية على الأوساط المغذٌية ثم توضع فًي الحاضنة تحت درجة حرارة ٢٥ م لمدة ٥ أٌيام لغرض نمو الفطريات وتتم بالطرق الاتية:

الطريقة المباشرة لزراعة التربة

أ- طريقة اطباق التربة (طريقة الصب Pour method):

ب-وفيها يتم توزيع معلقات عينات صغيرة من التربة (من 0.05-0.15 جم) على قعر طبق بتري معقم ثم يضاف الية اجار مائي مصهور و مبرد 0 ثم يحرك محتويات الطبق روحيا قبل تصلبة للعمل على توزيع حبيبات التربة ضمن كامل الوسط الغذائي وفي حالة التربة الثقيله يجب خلطها بقليل من الماء المقطر المعقم داخل الطبق قبل اضافة الاكار وذلك ليسهل توزيعها في الوسط الغذائي

الطريقة الصب لزراعة التربة

ج. طريقة التخفيف dilution method : وهي من اكثر الطرق استخداما حيث يمكن بهذة الطريقة حساب عدد المستعمرات في وزن معين من التربة وبالتالي تقدير الكثافة العددية للقطريات المتواجدة في التربة اضافة لذلك نستطيع الحصول على مستعمرات فطرية نقية و تتطلب الطريقة المواد التالية :

1. اطباق بتري معقمة وخالية
2. انابيب اختبار
3. ماء مقطر معقم
4. وسط زرعي جاهز للصب

تتلخص طريقة العمل كما يلي:

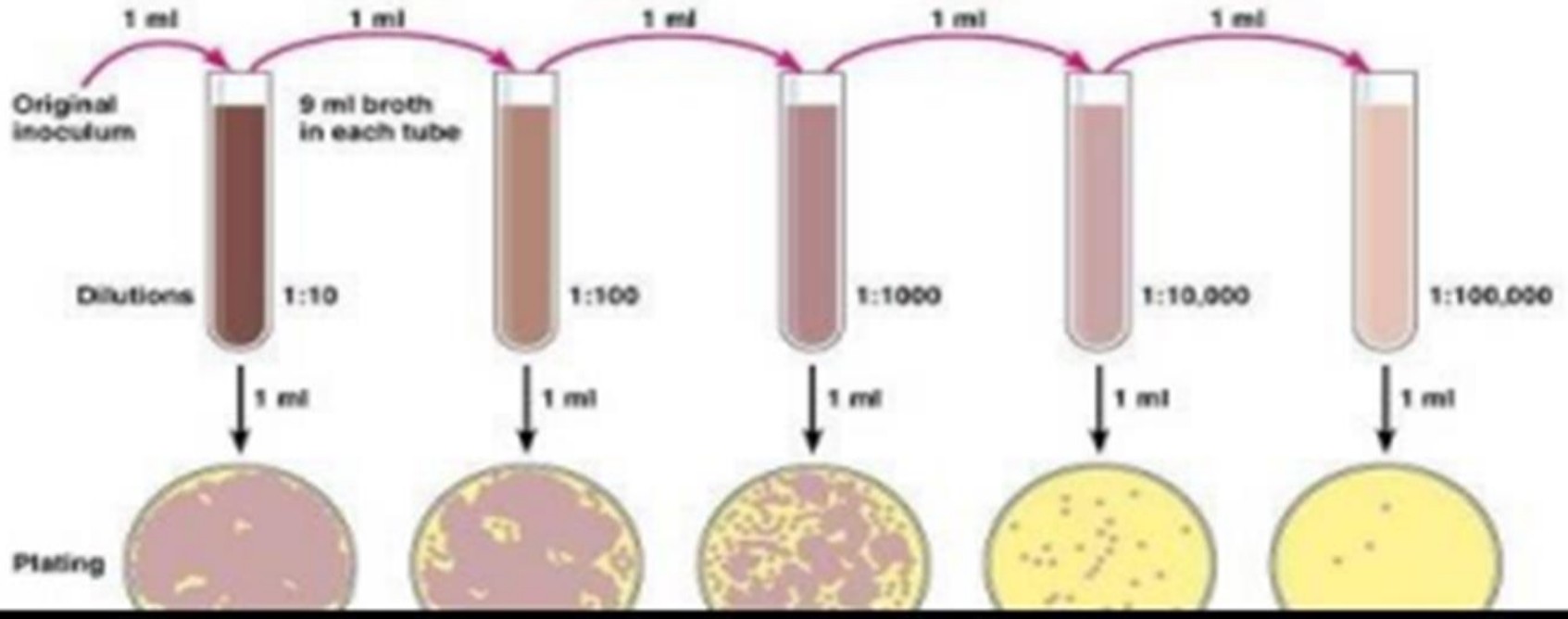
1. يؤخذ عينة من التربة المراد العزل منها ثم تجفف هوائيا
2. يؤخذ 1 غم من هذه التربة في أنبوب يحوي 9 مل ماء مقطر معقم (نحصل على تخفيف 10:1)
3. يؤخذ 1 مل من العينة السابقة وتضاف الى 9 مل ماء مقطر معقم (تخفيف 100:1) ومن هذه العينة الجديدة تؤخذ الجديدة 1 مل و تضاف الى 9 مل ماء مقطر معقم (1000:1)وهكذا حتى نحصل على التخيف المطلوب.
4. يؤخذ 1 مل من التخفيفات المناسبة الى كل طبق بتري ويصب الوسط الزرعي على هذه التخافيف ثم يحرك الطبق باليد على شكل الرقم 8 ليتسنى لحبيبات التربة المخففه ان تنتشر داخل الوسط الزراعي او يؤخذ 1 مل من كل تخفيف ويوضع على وسط زرعي ويحرك بواسطة L-shap.
5. تحضن الاطباق بعد تعليمها على 25 م لمدة 5-7 ايام ثم تفحص و تعد المستعمرات النامية وللحصول على عدد المستعمرات في الغرام الواحد من التربة وحسب القانون التالي:

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

ملاحظة:**غالبا ما تهمل التخافيف الاولى لان اعداد المستعمرات سوف يكون كبير جدا فيها** وبذلك يصعب عدها وان هذه العملية تعتمد على طبيعة التربة فاذا كانت غنية بالمادة العضوية كالترب الزراعية او حاوية على السماد فنعمل منها تخافيف كثيرة اما اذا كانت التربة فقيرة كالتربة الرملية او الملحية فنعمل منها تخافيف اقل لان عدد المستعمرات المتوقع ظهورها قليل الكثافة.

نأخذ بواسطة اداة التلقيح loop قطرة من كل تخفيف ونوزعها على الوسط الزرعي بواسطة التخطيط Streakingاو يأخذ ١مل من التخفيف المطلوب عزل الفطريات منه بواسطة ماصة معقمة ويوضع في طبق معقم ثم يصب عليه الوسط الزرعي ثم يرج الطبق بحركة دائرية

Serial dilution



عزل الفطريات من الماء isolation of fungi from water

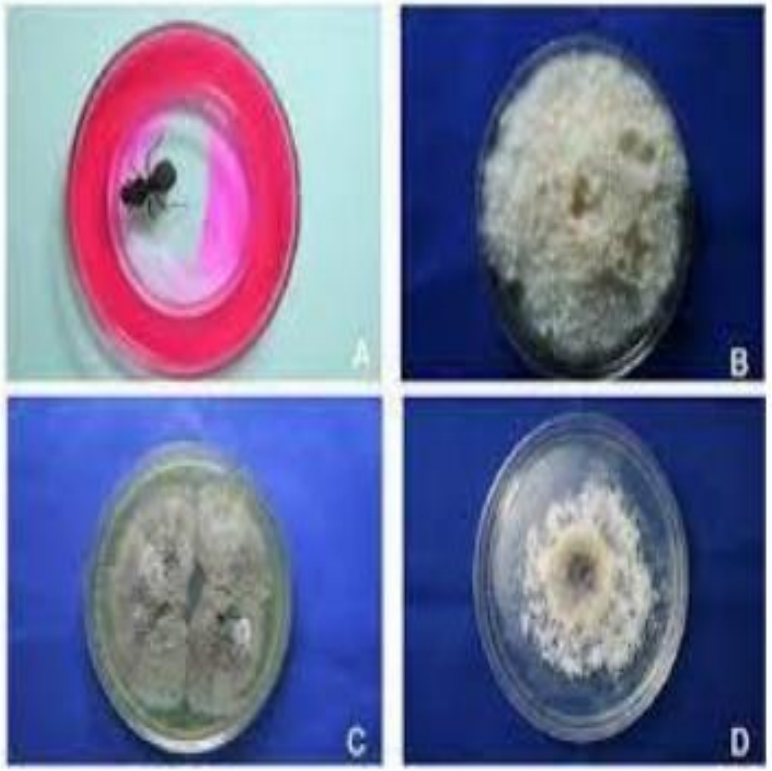
ان قسم من فطريات الماء هو بالاصل من فطريات التربة والتي انحدرت الى الماء ولكم هذا لا يعني عدم وجود فطريات هي بالاصل تعيش في الماء و تمل من التراكيب الخاصة والتي مكنتها من المعيشة في هذه البيئة وهناك عدة طرق لعزل هذه الفطريات منها:

- طريقة pour plate method او ما تسمى ب gradient plate method

بهذه الطريقة يضاف 2 مل من العينة المائية الى طبق بتري ثم يصب فوقها الوسط الزرعي السائل ويحرك الطبق حركة رحوية ثم يعلم و يحضن على درجة حرارة ملائمة

- طريقة الطعم baiting method: تستخدم هذه الطريقة لعزل مجاميع فطرية معينه ومنها مجوعة اعفان الماء water mold وغالبا ما تستخدم بذور القنب كطعم او ذباب وهكذا يختلف الطعم حسب نوع الفطريات المراد عزلها .

وهناك طريقة لعزل القطريات من الاغصان والاوراق والشعر ومخلفات الحيوانات وبقايا الثمار وغيرها من المواد العضوية تسمر بطريقة الغرفة الرطبة moist chamber وتتلخص هذه الطريقة بوضع المادة المراد العزل منها في طبق معقم حاوي على ورقة ترشيح معقمة و مرطبة بماء مقطر معقم ثم تحضن بالحاضنه او بدرجة حرارة الغرفة حسب طبيعة البحث والفطر المراد عزله ويفحص الطبق بين الاونه والاخر للتعرف على الفطريات النامية وعزلها .



طريقة الطعم

نستخدم بذور القنب او الذباب معقم وماء غير معقم او العكس وتوضع في طبق وتحضن وتتابع الفطريات وتعزل

طريقة الغرفة الرطبة

نستخدم ورق ترشيح معقم و قطن وماء مقطر و قطعة ساق او ورقة نبات تبلل القطن بالماء كل يوم وتفحص الفطريات

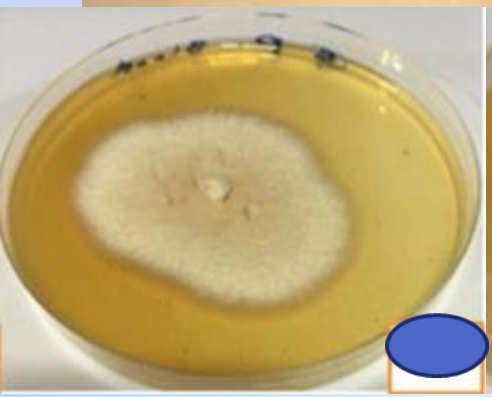
٤- عزل الفطريات من الهواء Air-Borne Fungi

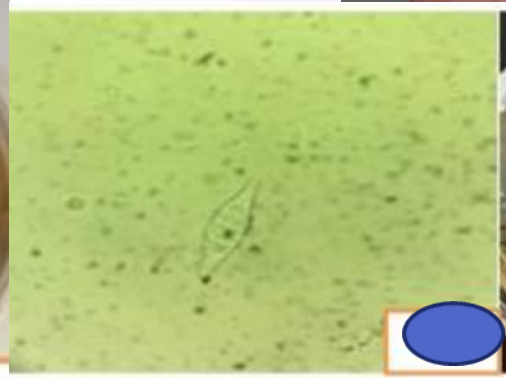
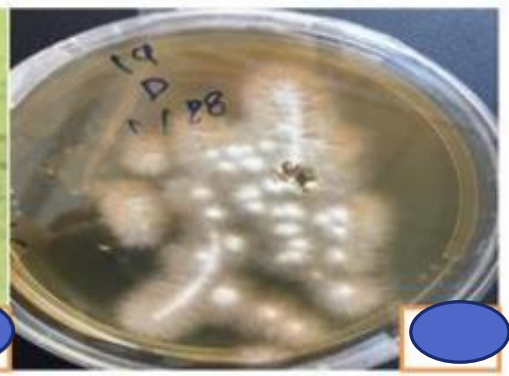
لصعوبة تجميع عينات من الهواء وخزنها لفترة زمنية طويلة كما في جمع عينات التربة والماء فأن عملية عزل الفطريات من الهواء تتم بتعريض الأوساط الزرعية الى الهواء مباشرة وذلك بفتح الطبق الحاوي على الوسط الزرعي PDA في جو المختبر مثلاً او أي مكان يراد العزل منه ولمدة (٢-٥ دقائق) ثم يغلق وبذلك سوف يتعرض الوسط الزرعي الى الوحدات التكاثرية (الأبواغ) لبعض الفطريات الموجودة في الهواء الجوي، ثم ينقل الطبق الى الحاضنة بدرجة (٢٥-٢٨°م) لمدة (٥-٧ أيام) بعدها تفحص الفطريات الموجودة في الطبق.

عزل الفطريات من الهواء

٥- عزل الفطريات من الإنسان Isolation From Patients

تجمع العينات من المناطق المصابة من خلال كشط المنطقة المصابة بواسطة شفرة جراحية معقمة او بواسطة الملقط عند جمع العينات من فروة الراس ، اما الإصابات النسيجية فيتم اخذ خزعات من الأنسجة المصابة وتوضع في علب معقمة لنقلها الى المختبر وزراعتها على الأوساط الزرعية المناسبة.



عزل الفطريات من الهواتف الخلوية

ازدادت في الآونة الأخيرة ظاهرة تلوث الهواتف الخلوية بالمايكروبات وباتت تشكل خطر انتقال عدوى او إصابة للإنسان لذا من المهم عزل الفطريات من الهواتف وخاصة في المختبرات التي تتعامل مع المكروبات مثل مختبرات قسم علوم الحياة ويمكن عزل الفطريات من الهواتف كالاتي:-

1-استعمال مسحات معقمة وترطب بماء مقطر معقم او محلول مغذي ملحي ويتم تمرير المسحات على الهواتف من عدة جهات ومن ايدي الحاملين للنقال وزراعتها على أوساط زرعية وحضنها بدرجة حرارة 25 م وبعد 2-3 أيام يتم فحص الاطباق والتعرف على الفطريات النامية وتشخيصها

تلوث الهواتف الخلوية بالمايكروبات

المحاضرة الرابعة

فحص وتشخيص الفطريات

فحص الفطريات

هناك عدة طرق تستعمل لفحص الفطريات للتأكد من وجود الفطر او عدم وجوده منها:

١- الفحص المظهري المباشر للعينات: يقوم به الباحث او الطبيب المختص

٢- **الفحص المجهري المباشر للعينات:** يتم الفحص المجهري المباشر في المختبر للعينات المأخوذة تحت المجهر الضوئي Light microscope بتحضير شرائح زجاجية نظيفة ومعقمة وتوضع عليها قطرة من صبغة اللاكتوفينول ازرق القطنوهذه الصبغة جُيدة لتوضُيح سبورات الفطريات والحواجز العرضُية خاصة فًي الفطريات الكُيسُية. بأستعمال عدسة بقوة x١٠ ثم عدسة x٤٠ لتأكيد وجود او عدم وجود الفطريات

Lactophenol Cotton Blue Stain

Cotton blue	1 g
Phenol crystals	20 g
Glycerol	30 ml
Lactic acid	15ml
Distal water	20ml

ثم تتبع الخطوات التالية فًي التحضٌر

- يذاب ازرق القطن فًي الماء المقطر
- تضاف بلورات الفينول إلى حامض اللاكتيك ، وتسخن قليلا لإذابة البلورات ، ثمٌفضاف الكلٌيسٌيرول ، وأخٌيراٌيخلط المحلولٌين وٌيرجان جٌيدا
- تحفظ الصبغة بدرجة حرارة الغرفة

تعمل هذه الصبغة كمحلول مركب وصبغة فًي ذات الوقت ، فحامض اللاكتيك يعمل على حفظ التراكيٌب الفطرٌية ، والفينول يعمل على قتل خلايا الفطريات ، والكلٌيسٌيرول يمنع التحلل ، وأخيراً يعمل أزرق القطن على صبغ التراكيب الفطرية ليسهل تمييزها.

تشخيص الفطريات :

١- الفحص المظهري للمستعمرات Morphology Examination of the colony

يعد الفحص المظهري أحد الوسائل المهمة التي يجب الاخذ بها للتفريق بين الفطريات ، ويشمل عدة أمور يجب أن تؤخذ بنظر الاعتبار منها ، عدد الأيام التَّي يستغرقها الفطر لبدء النمو ، وبعد ظهور النمو على سطح الوسط الزرعَي يتم فحص شكل المستعمرة الظاهري ولونها ونسجتها (مسحوقيّه ، قطنية ، زغبية) ، ويتم فحص لون المستعمرة من الجهة المعاكسة Reverse side، كما يتم قياس قطر المستعمرة بعد توقف النمو ، وتوجد هناك مفاتيح تصنيفية خاصة لتشخيص الأنواع الفطرية .

ـ الفحص المجهري للمستعمرات Microscopial Examination of the colony

يتم إجراء هذا الفحص لدراسة الصفات المجهرية للفطريات وأشكالها وتفرعاتها ، وكذلك الكونيديات بأنواعها وأشكالها وأحجامها وعددها وثخن جدارها ، وكذلك ملاحظة السبورات الكلاميدية Chlamydospores والسبورات المفصلية Arthospores .

يتم هذا الفحص بوضع قطرة من صبغة اللاكتوفُينول أزرق القطن على شريحة زجاجية نظّيفة بواسطة إبرة التلقيح المعقمة Needle وينقل جزء من الخيوط الفطرية من المنطقة الواقعة بين المركز والحافة إلى الشريحة الزجاجية ، وتمزج مع الصبغة ، ثم يوضع عليها غطاء الشريحة ونضغط عليها بلطف بواسطة Loop لغرض فرش العينة على هذه القطرة ، تفحص الشريحة المحضرة تحت القوة الصغرى 10X اولا ثم تحت القوة الكبرى 40X، لملاحظة الخيوط الفطرية وأشكالها وتفرعاتها ، والكونيديات بأشكالها وأحجامها المختلفة Micro conidia and Macroوطريقة ترتيبها على الخيوط الفطرية ، وأُيضا يعتمد على المفاتيح التصنيفية في التشخيص

مثال على التشخيص المظهري والمجهري في الفطريات (المبيضات):

فحص الاطباق بعد يومين من عملية الزرع ، تهمل الاطباق غير المحتوية على نموخميري بعد اسبوع . تفحص الاطباق اولاً بأستعمال المجهر التشريحي Dissecting microscope، ثم تفحص بعدها تحت المجهر الضوئي Light microscope بأستعمال عدسة بقوة X١٠ ثم عدسة X٤٠. لرؤية الخلايا الخميرية مجهرياً تحضير شرائح زجاجية نظيفة ومعقمة وتوضع عليها قطرة من صبغة اللاكتوفينول ازرق القطن ثم تنُقل جزء من مستعمرة الخميرة النامية الى الشريحة الزجاجية بأستخدام الحلقة المعقمة Loop، ووضع عليها غطاء الشريحة cover slide.**للتعرف على الفطر تستخدم كتب متخصصه في مجال تصنيف الفطريات .** إذا أردنا حفظ الشريحة المحضرة لفترات طويلة فيجب تنظيف حواف غطاء الشريحة بحذر باستعمال مناديل ورقية أو أوراق ترشيح ، ثم نصبغ الحواف بطبقة سميكة من طلاء الأظافر ، ثم نضع الشريحة في مكان جيد التهوية لتجف تماما

التشخيص الكيموحيوي والفسيولوجي Biochemical and physiological identifiecation لبعض انواع الفطريات:

-اختبار النمو على وسط الكروم اكار كانديدا Growth test on *Candida* Chrom Agar

- اختبار الفايتك viteck 2

تشخيص العزلات بأستخدام تقنية تحديد تتابع القواعد النتروجينية للقطعة الجينية ITS DNA sequencing

تتم بواسطة

١- استخلاص DNA ٢- إختبار تفاعل سلسلة البلمرة PCR

٣- تحديد التتابعات للقواعد النتروجينية للمنطقة الجينية ITS ٤-التحليل الجيني لتتابعات الـ DNA