*عـزل وتنميـة الفطريـات Isolation and Cultivation of Fungi

تتطلب دراسة الفطريات وجود مزرعة نقية للفطر لتحديد الاطوار الخضرية والتكاثرية والثمرية المتكونة من نفس المستعمرة الفطرية الناتجة من بوغ مفرد (Single spore) وإثبات قدرة الفطر على اصابة الانسان أو الحيوان أو النبات بالاعتماد على فرضيات كوخ (Koch's postulates).

Isolation and Cultivation of Fungi

*فـرضيـات كـــوخ :-

1- وجـود الميكروب في جميع الكائنات التي تعاني من المرض، ولا يوجد في الكائنات السليمة.

2- عـزل الميكروب من الكائن المصاب وزراعته على مزرعة نقيـة.

3- الميكروب الذي تم زراعته، ينبغي ان يسبب المرض عندما يتم تعريضه لكائن سليم.

4- يجـب أن تتم إعـادة عـزل الميكروب من الكائـن الذي تم عمـل التجربـة عليه ويكون نفس الميكـروب الاول (الذي تم عزله في الفرضية الاولى).

تواجه عمليـة عزل الفطريات احتمالية تلوث المزرعة بكائنات أخرى، لذا يجب تعقيم الادوات المستعملة كالمشارط والملاقط والزجاجيات وأبر التلقيح أو الحقن

والعزل في أماكن معقمة أو كابينات أو صناديق (inoculating chamber or box).

تنتشر الفطريات في الطبيعة وعلى سطوح الاجسام الحية والميتة، وتنتشر أبواغها بالهواء لصغر حجمها تتواجد الفطريات في جميع البيئات مثل الهواء والماء والتربة سواء في المناطق القطبية أو الاستوائية وحتى في المناطق المرتفعة والجبلية لتواجدها في جسم النبات،الحيوان والانسان.كذلك تصّيب الفطرّيات الاغذية المحفوظة كالخضراوات والفواكه والحبوب وحتى المعجنات المختلفة ، وقد تفرز هذه الفطرّيات أثناء إصابتها للاغذية السموم التيً قد تكون خطرة وربما تؤدي إلى **الاصابة بمرض السرطان (Cancer) ومن هذه السموم (Aflatoxin) و (Ochratoxin).**

ان الهدف الاساسي لعزل الفطريـات قد يعزى الى عدة اسبـاب:-

1. التعرف الحقيقي على المحتوى الكمي والنوعي للفلورا الفطرية وتنوعها.
2. تشخيص الفطريات المرضية عن الفطريات المترممة الاخرى.
3. الحصول على مزارع نقية Pure culture للفطريات المعزولة من المكان المراد العزل منه.
4. لاجراء العديد من الدراسات العلمية عليها كالحساسية والامراضية وغيرها.

وفي هذا المختبر سنحاول التعرف على طرق عزل الفطرّيات من الكائنات المختلفة ، وكذلك طرق العزل من التربة وماء البركة والمواد الغذائّية وغّير ذلك.

*عـزل الفطريـات Methods for isolating fungi

يعتمد عزل الفطريات من البيئات المختلفة التي تنمو فيها مثل الهواء والماء والتربة سواء كانت مترممة على المواد المتحللة او متطفلة على الكائنات الحية، ومن الاماكن التي تعزل منها الفطريات هي:-

1- عـزل فطريـات الهـواء Isolation of air borne fungi

يلعب الهواء دورا أساسيا في نقل الفطريات المرضية وغير المرضية التي تسبب الأمراض للإنسان والحيوان والنبات، حيث تنتقل الابواغ محمولة في انوية الرذاذ Droplet nuclus أو على ذرات الغبار العالقة في الهواء. تنتشر معظم الفطريات

بواسطة الابواغ او الكونيدات خلال الطبقات الهوائية المتحركة الحاملة لها ثم استقرارها في الأماكن المختلفة.

ان انتقـال الابـواغ والكونيدات بالهـواء له دور كبير في انتشار الإصابة والوقاية منها إلا انه من غير الممكن الحد من عملية انتشار الابواغ والكونيدات وخاصة عندما يكون الهـواء هو الناقـل لهـا، وبذلك يكون وسيلة لانتشـار الأمراض الفطرية بين الكائنات الحيـة وما تسببه من تلف للمواد الصناعية الخـام وتعفن المواد الغذائية فضلا عـن كونها ملوثات أساسية للهـواء.

*طريقـة عـزل الفطريـات من الهـواء

المـواد:-

- **أطبـاق بتري تحتوي على وسط أكـار مغذي.**
- **أقـلام شمـع.**

***طـريقـة الـعمـل:-**

- تقسم الأطبـاق إلى ثلاثة مجاميع وكل مجموعة تتكون من ثلاثة أطباق كمكررات، المجموعة الأولى للعزل من هواء المختبر والثانية للعزل من هواء الجو العادي خارج المختبر والمجموعة الثالثة للعزل من مكان قريب من مزرعة أو حقل قريب من كان العمل.
- يـرفع غطـاء الطبق ويعرض للهـواء لمدة 3-5 دقائق ثم يعاد الغطاء وتثبت المعلومات الخاصة بمكان العـزل أسفل الطبق.
- تترك ثلاثة أطبـاق دون تعريضها للهواء كمعاملة مقارنه وتدعى أطباق سيطرة Control agar.
- تحضـن جميع الأطبـاق في الحاضنة عند درجـة حرارة 25°م لمدة 3-6 يوم.
- تفحص الأطبـاق للتعرف على أنواع الفطريـات التي نمت من كل مصدر والاختلافات فيما بينها وتدون المعلومات عن أعداد وأنواع الفطريات في كل مصدر.

2- عــزل الفطريـــات المائيـــة Isolation of aquatic fungi

أن عدد أنواع الفطريات المائية قليل جدا بنسبة 2% إذا ما قورن مع أنواع الفطريات التي تعيش في بيئات اخرى، وان اغلبها تتكاثر بواسطة السبورات السوطية (Zoospore) حيث يعتبر هذا النوع بدائي في طبيعته، وتكون اغلبها فطريات مترممة على بقايا الحيوانات والنباتات المائية والقليل منها اختياري التطفل.

كما تتميز الفطريات المائية بأنواعها المتحركة فبعضها تتحرك بسوط واحد كما في الفطريات الكتريدية كالفطر *Alomces sp* و *Monoblepharis sp* وبعضها الأخر تتحرك بسوطين كما في الفطريات البيضية مثل *Lagenidium sp* و *Saprolegnia sp* .

من السهل عزل الفطريات المائية من بيئاتها بواسطة بذور القنب المغلي او الذباب الميت. القنـــب: هو الاسم الشائع لنباتات من القنب الهندي يعود لشعبة مغطاة البذور ويكون ثنائي الفلقة، تحتوي بذوره على بروتين مغذي اكثر من البروتين المغذي في فول الصويا.

المـــــواد:-

- عينـات مياه عذبـة من الأنهـار أو السواقي أو البرك
- أطبـاق بتـري معقمـة
- بـذور نبـات القنـب
- حشـرات ذبـاب ميتـة

طـريقـــة العمـــل:-

1- نضـع بـذور القنب في المـاء وتسخينها حتـى الغليان.
2- نضع 15-20 مـل مـن عينات المـاء في كـل طبـق.

3- تحضير مجموعتين من الأطباق: المجموعة الأولى للعزل على بذور القنب والثانية للعزل على الحشرات لذباب ميت، وبواقع ثلاثة أطباق لكل معاملة (3 مكررات).

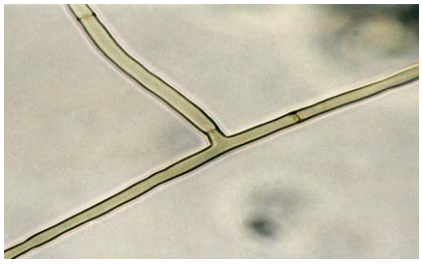
4- نضع كمية من بذور القنب المغلي في كل طبق من أطباق المجموعة الأولى وعدد من حشرات الذباب الميت في كل طبق من أطباق المجموعة الثانية.

5- تحضن الأطباق عند درجة حرارة 25°م لمدة 5-7 يوم ثم تفحص الإطباق ونلاحظ النمو الفطري المتكون على بذور القنب او الحشرات والتي تمثل الفطريات المائية.

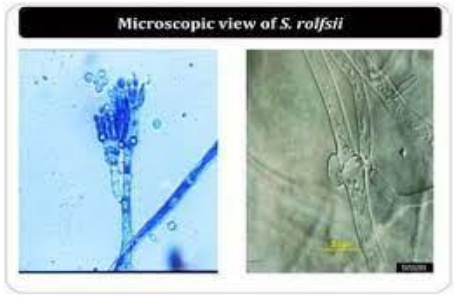
6- فحص البذور و الحشرات التي ظهر عليها النمو الفطري وتحدد أنواع الفطريات المائية، والتي غالبا ما تعود إلى الفطريات البيضية و الفطريات الكتريدية.

3- عـزل الفطريـات مـن التربـة Isolation of soil borne fungi

تعيش بعض الفطريات في التربة إما مترممة على البقايا النباتية والحيوانية او متطفلة على جذور النبات او كطفيليات حيوانية تستهدف الديدان الثعبانية. اعتبر جنس *Fusarium sp* اول الفطريات المكتشفة في التربة، وتوالت الدراسات لتحديد الفطريات المستوطنة في التربة ومنها *Rhizoctonia sp* و *Sclerotium sp* وخاصة الفطريات الممرضة للنبات.



Rhizoctonia solani



Sclerotium rolfsii

هناك عدة طرق لدراسة فطريات التربة، إن تفضيل طريقة على الأخرى تعود بالدرجة الأساس على نوع وهدف الدراسة. عند اخذ عينة التربة يجب ذكر بعض التفاصيل الخاصة بالعينة مثل الموقع الذي أخذت منه العينة والنباتات الموجودة ونوع العينة وغيرها. إذ تؤخذ كمية العينة في الغالب (50-100غرام) بعد رفع الطبقة العلوية للتربة من الموقع المراد اخذ العينة منه بحدود (10-15 سم). توضع العينة في وعاء

بلاستيكي نظيف وتكتب التفاصيل على قصاصة ورقية وتوضع داخل الكيس ثم يغلق وينقل إلى المختبر لغرض الدراسة.

سنذكر هنـا طريقتين لعـزل فطريـات التربـة:-

1- العـزل المباشـر Direct method

تؤخذ أجزاء صغيرة من عينات التربة المراد زراعتها باستعمال ملقط معقم او ملعقة معقمة بالكحـول ومعرضة للهب، وتوزع على أطباق بتري حاوية على أوساط مغذية ثـم توضع في الحاضنة تحت درجة حرارة 25°م لمـدة 5 ايـام لغـرض نمـو الفطريـات.

2- العـزل بطريقـة التخافيـف Dilution plate method

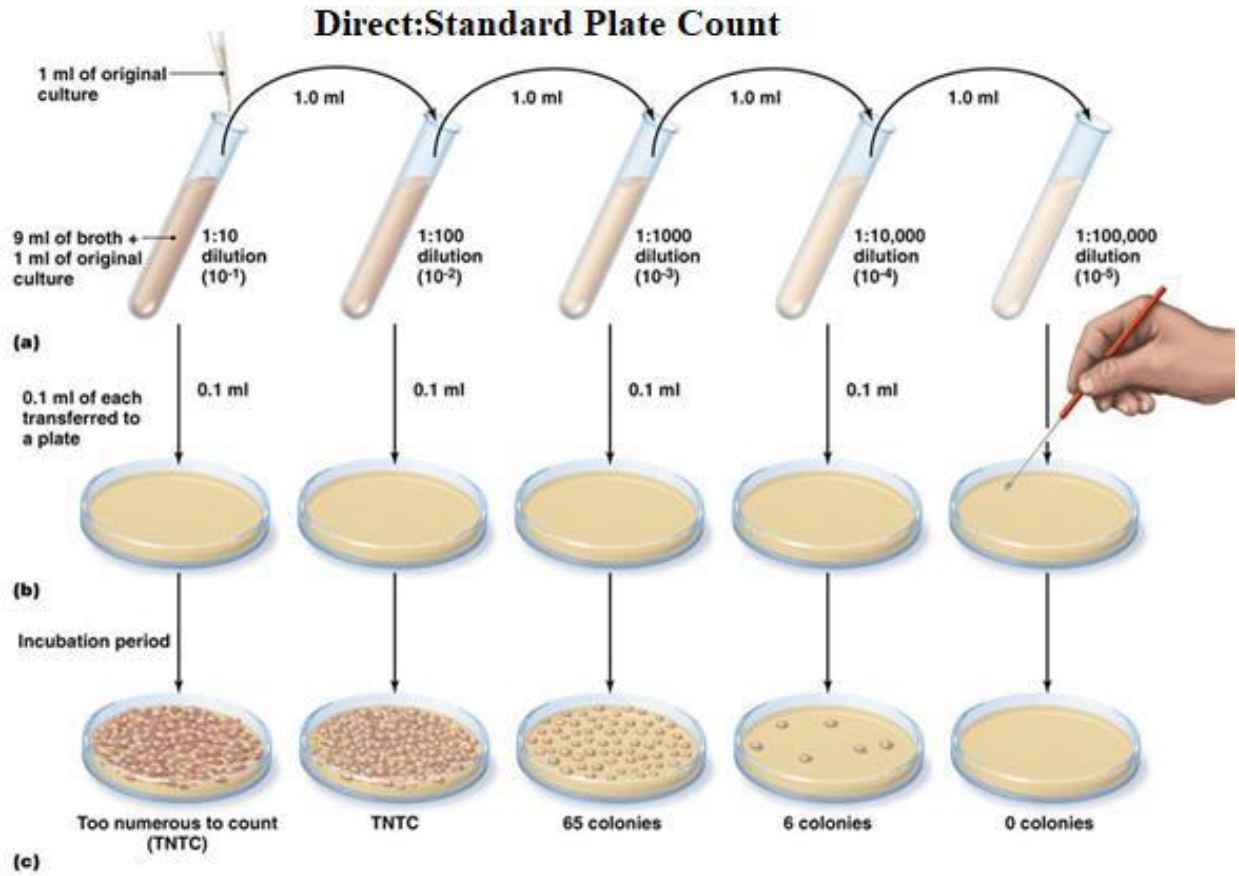
تحتـاج هـذه الطريقـة لبعض المواد منهـا :-

- عينـات تربـة من عـدة مواقع زراعية (تربة حديقة) وغير زراعية (تربة رملية طينية).
- أطباق بتـري معقمة.
- وسط أكـار المـاء water ager.
- انابيب اختبـار .
- مـاء مقطـر معقم .
- ماصـات معقمة باحجام 0.5مل و 1مل.
- بيكـرات بحجم 250 مل.

***طـــريقـــة العمـــــل:-**

1- نضع 10غم من كل عينة من العينات في بيكر حجم 250مل مع 90مل ماء مقطر وتمزج جيدا بتحريكها لمدة 5-10 دقائق ،وبذلك نحصل على تخفيف 10/1 .
2- تحضير تخفيفات عشريـــة من معلق عينات التربة الذي تم تحضيره في الخطوة الاولى وبعد ذلك تخفيفات 100/1 و 1000/1 و 10000/1.
3- نضع 1مل من معلق العينات لكل تخفيف في أطباق بتري (ثلاثة أطباق /معاملة)، ثم إضافة أكـار المـاء مع تحريـك الطبق قبل تصلبـه لضمان توزيع حبيبات التربـــة في الـــوسط.
4- تـترك ثلاثـة إطبـــاق بـدون تلقيـح كمقارنـــة.

تحضن الأطبـاق بدرجة 25°م لمـدة 3-5 أيـام ثم تفحص لمعرفـة أنـواع الفطريات الناميـة في عيـنة التربـة والتخفيف وتسجيل النتـــائج.



العـزل بطريقـــة التخفيف Dilution plate method