عزل الفطريات

يقسم الطلبة الى مجموعات وتقوم كل مجموعة بعزل فطريات من بيئة مختلفة، ويقوم الطلبة بتهيئة الادوات المختلفة الخاصة بالعزل فضلا عن تهيئة الوسط الذي تنمو عليه الفطريات كما تم شرحه سابقا، ويكون العزل من البيئات التالية :

عزل الفطريات : Isolation of fungi

تصيب الفطريات الكائنات المختلفة (الإنسان ، الحيوان ، النبات) إضافة إلى إصابتها الأغذية المحفوظة كالخضراوات والفواكه والحبوب وحتى المعجنات المختلفة ، وقد تفرز هذه الفطريات أثناء إصابتها للأغذية السموم التي قد تكون خطرة وربما تؤدي إلى الإصابة بمرض السرطان (Cancer) ، ومن هذه السموم الافلاتوكسين والاوكراتوكسين .

وفي هذا المختبر سنحاول التعرف على طرق عزل الفطريات من الكائنات المختلفة ، وكذلك طرق العزل من التربة وماء البركة والمواد الغذائية وغير ذلك .

١. عزل الفطريات من الإنسان : Isolation From Patients

تعزل الفطريات المرضية للإنسان Pathogenic Fungi من المرضى الذين تشخص إصابتهم سريريا بها ، بعد أن تعقم مناطق الإصابة بكحول أثيلي 70% لأجل التعقيم (التخلص من البكتريا) وإزالة المواد العالقة والأدوية التي من شأنها عرقلة الفحص المجهري المباشر Direct examination والنمو . وتعزل الفطريات من ثلاثة مناطق من الجسم هي :

- من الجلد : The Skin

تجمع القشور الجلدية من الحافة المتقشرة لمنطقة الإصابة Active border لكونها حاوية على الخيوط الفطرية Hyphae التي يكونها الفطر المسبب للإصابة ويتم ذلك بكشط المنطقة Scrape باستخدام شفرة جراحية Surgical blade معقمة ، وتوضع القشور الجلدية بين شريحتين زجاجيتين ثم تغلف بورق ترشيح وتوضع داخل طبق زجاجي معقم لحين زراعتها في المختبر .

- من الرأس : The Head (Hair)

تجمع عينات الشعر والقشور من الحافة المتقشرة لمنطقة الإصابة في فروة الرأس باستخدام ملقط Forceps معقم ، وتوضع العينات بين شريحتين زجاجيتين ثم تغلف بورق ترشيح وتوضع داخل طبق زجاجي معقم لحين زراعتها في المختبر .

- من الأظافر : The nail

تجمع عينات الأظافر بقص الحافات العليا للأظافر المصابة ، و تجمع أيضاً البقايا المتقرنة المتجمعة تحت الأظفر المصاب ، وتوضع العينات بين شريحتين زجاجيتين ثم تغلف بورق ترشيح وتوضعا داخل طبق زجاجي معقم زراعتها في المختبر .

وهناك إصابات فطرية في الأنسجة العميقة للجسم كإصابة الرئة Pulmonary Fungal Infection والدماغ cerebral Fungal Infection وغيرها ، وهناك إصابة فطرية للدم تسمى Fungemia .

والجدير بالذكر إن الإصابات العميقة للأنسجة يصعب عزل الفطريات منها إذ تكون طرق العزل معقدة (زراعة الأنسجة) وتحتاج إلى ظروف خاصة .

٢. عزل الفطريات من النبات : Isolation From Plants

إن عدد الفطريات المسببة للأمراض كثيرا إذا ما قورن بعدد الكائنات الحية الأخرى ، بعض هذه الفطريات إجباري التطفل Obligate parasites Fungi بينما البعض الآخر اختياري التطفل Facultative parasites Fungi . وهناك طرق متعددة لعزل الفطريات المرضية من عوائلها النباتية ولكننا سنكتفي بطريقة واحدة وهي الأكثر شيوعا في الاستخدام .

نُحضِر عدد من الأجزاء النباتية المصابة إلى المختبر (الأوراق ، السيقان ، الثمار ، الجذور ، الدرنات) ونقطعها إلى قطع صغيرة ($1cm^2$) من المناطق المصابة ، ثم نضع القطع في محلول التعقيم (القاصر) لمدة (1-2 min) لتعقيمها سطحيا ، نلتقط القطع بملقط رفيع ومعقم ثم نغسلها بماء مقطر معقم Distell Water عدة مرات لإزالة تأثير المعقم ، ثم ننقلها إلى أوراق ترشيح ونتركها حتى تجف .

بعد ذلك ننقل القطع الجافة إلى عدد من أطباق بتري المحتوية على وسط مغذي ومضاد بكتيري ، ثم تحفظ الأطباق بدرجة حرارة ٢٥° لمدة ٥ أيام لغرض نمو الفطريات .

٣. عزل الفطريات من التربة : Isolation From Soil

هناك عدة طرق لدراسة فطريات التربة ، وان تفضيل طريقة على الأخرى يعود بالدرجة الأساس إلى نوع وأهداف الدراسة . والجدير بالإشارة هنا إلى انه لابد ذكر بعض التفاصيل عن الموقع الذي تجمع منه العينات ، كالنباتات الموجودة ونوع التربة وغير ذلك ، والكمية التي تؤخذ في الغالب هي (50 -100 gm) بعد رفع الطبقة العلوية للتربة من الموقع المراد اخذ العينة منه وبحدود (10 -15 cm) . توضع العينة في وعاء بلاستيكي نظيف وتكتب التفاصيل على قصاصة من الورق توضع داخل الكيس ثم يغلق وينقل إلى المختبر لغرض الدراسة . وسنذكر هنا طريقتين لعزل فطريات التربة :

١. العزل بالطريقة المباشرة : Direct Method

تؤخذ أجزاء صغيرة من عينات التربة المراد زراعتها وتوزع على أطباق بتري حاوية على الأوساط المغذية ثم توضع في الحاضنة تحت درجة حرارة ٢٥° لمدة ٥ أيام لغرض نمو الفطريات .

٢. العزل بطريقة تخفيف الطبق Dilution Plate Method

تستعمل هذه الطريقة بكثرة في الدراسات الكمية لكائنات التربة الدقيقة ، إلا انه قد يكون من الصعب تحليل النتائج تحليلا عادلا حيث إن الفطريات تتكاثر بطرق مختلفة وبأعداد متفاوتة ، وهي مع ذلك تعتبر طريقة جيدة لدراسة أعداد الفطريات التي تنتج الأبواغ .

نحضر عينة التربة وننخلها (نغربلها) بمنخل دقيق لنتخلص من الشوائب العالقة ، ثم نأخذ عينة بوزن 25 gm من عينة التربة ونضعها في وعاء بسعة 500 ml ثم نضيف إليها 225 ml من الماء المقطر ، ونخلط التربة بالماء جيدا ، وبذلك نكون قد أجرينا تخفيف بنسبة ١٠/١ . ثم نسحب بماصة معقمة 1 ml من هذا المعلق وننقله إلى أنبوبة اختبار تحوي على 9 ml من الماء المقطر ثم نرجها فنحصل على تخفيف ١٠٠/١ . نكرر العملية السابقة إلى أن نحصل على التخفيف ١٠٠٠٠٠/١ . بعد ذلك نأخذ بواسطة أداة التلقيح Loop قطرة من كل

تخفيف ونوزعها على سطح الوسط المغذي بطريقة التخطيط streaking ، ونعمل لكل تركيز مكررين أو ثلاث للتأكد من وجود النمو الفطري . بعد ذلك نحضن الأطباق تحت درجة حرارة ٢٥° لمدة ٥ أيام ، وبعد فترة الحضانة نحاول التعرف على الفطريات مستعينين بالخصائص المجهرية Microscopic Appearance إلى جانب صفات المستعمرات Macroscopic Appearance . وان أهم فطريات التربة هي *Aspergillus* و *Penicillium* و *Fusarium* و *Mucar* و *Alternaria* . إن وجود هذه الأنواع بشكل كبير في التخافيف المختلفة قد يكون نتيجة لقدرة هذه الفطريات على العيش في ظروف المختبر وليس لكثرة تواجدها في التربة . ولهذا السبب قد لاتظهر بعض الأنواع كثيرا مثل أنواع من الفطريات البازيدية Basidiomycetes مع العلم أنها شائعة جدا في التربة .

٤. عزل الفطريات المائية : Aquatic Fungi

إن عدد أنواع الفطريات المائية قليلا جدا (2%) إذا ما قورن بباقي أنواع الفطريات التي تعيش في بيئات أخرى ، وان اغلبها تتكاثر بواسطة تكوين السبورات السوطية (Zoospore) حيث يعتبر هذا النوع من الفطريات بدائي في طبيعته . توجد اغلب الفطريات المائية مترممة على بقايا الحيوانات والنباتات والقليل منها يكون اختياري التطفل .

تعزل هذه الأنواع الفطرية بنفس الطريقة التي ذكرت في عزل الفطريات من التربة حيث نعمل عدد من التخافيف ولكن بدل أن نزن 25 gm من التربة نضع 25 ml من الماء المراد عزل الفطريات منه إلى 225 ml من الماء المقطر ، ثم نعمل التخافيف الأخرى . ونزرعها بنفس طريقة عزل الفطريات من التربة .

٥. عزل الفطريات القاطنة في الهواء : Air-Borne Fungi

من المعروف إن الفطريات تتواجد في الهواء الجوي على هيئة سبورات ، وقد تتواجد قطع من الغزل الفطري أيضا Hyphae . وهناك عدد من الطرق وبعض الآلات الخاصة لاصطياد وعزل الفطريات . إن أسهل طريقة للحصول على الأبواغ من الهواء الجوي هي بتعريض طبق بتري يحتوي على وسط مغذي للهواء لفترة من الزمن ، ثم تحضن تحت درجة حرارة ٢٥° لمدة ٥ أيام .

في جميع طرق العزل السابقة لابد من وجود طبق المقارنة (Control) والغرض من وجوده هو لقياس دقة العمل وسلامته ، حيث إن طبق المقارنة يجب أن يكون خال من أي نمو،وطبق المقارنة يختلف باختلاف طرق العزل :

- طبق المقارنة في تجارب العزل من أجزاء نباتية هو طبق حاوي على الوسط الغذائي المعقم فقط ، وكذلك في حالة العزل من الجو .
- طبق المقارنة من تجارب العزل من التربة هو طبق معقم نضع فوقه 1 ml من ماء معقم ونحركه حتى يتوزع على سطح الوسط المغذي .
- طبق المقارنة في تجارب العزل من الماء هو ماء معقم في طبق معقم مع وضع أجزاء نباتية أو حشرية معقمة .