٢ – بيئة البطاطس والدكستروز Potato-Dextrose-Broth (PDB):

تتشابه تمامًا مع بيئة الـ PDA، ولكن ينقصها الآجار، وبذا .. فهى بيئة سائلة.

٣ – بيئة الآجار المغذى Nutrient Agar (NA):

تستخدم هذه البيئة لمزارع البكتيريا بوجه عام، وتحضر من المكونات التالية:

المكون	الكمية
مستخلص اللحم Beef Extract	٣ جم
بيبتون Peptone	٥ جم
آجار	١٧ جم
ماء	١٠٠٠ مل

يسخن الماء إلى درجة حرارة الغليان، ثم يضاف إليه الآجار ببطء مع التقليب إلى أن يذوب، ثم تضاف بقية المكونات وتقلب إلى أن تذوب كذلك. ويلى ذلك إكمال حجم المخلوط (البيئة) إلى ١٠٠٠ مل.

٤ – بيئة المرق المغذية Nutrient Broth (NB):

تتشابه تمامًا مع بيئة الآجار المغذى، ولكن ينقصها الآجار، وبذا .. فهى بيئة سائلة.

٥ – بيئة شورية الخضار Vegetable Juice (V-8):

تفيد هذه البيئة فى تحفيز تجرثم عديد من الفطريات، وتحضر من المكونات التالية:

المكون	لكمية
مخلوط عصير ثمانية خضروات V-8 (منتج تجارى)	٢٠٠ جم
آجار	١٧ جم
ماء	٨٠٠ مل

يسخن الماء إلى درجة حرارة الغليان، ثم يضاف إليه الآجار ببطء مع التقليب إلى أن يذوب، ثم يضاف العصير. ونظرًا لأن العصير يكون حامضيًّا بدرجة عالية (pH = ٤.٠) .. فإنه يجب رفع الـ pH إلى ٦–٧ باستخدام أيدروكسيد الصوديوم (1N).

٦ – بيئة الآجار المائى:

يحتوى الآجار على كميات صغيرة من العناصر الغذائية التى يمكن أن تسمح بالنمو البطئ لبعض الفطريات. وتفيد بيئة الآجار والماء فى إنبات الجراثيم المفردة، وتحضر بإذابة ١٧ جم من الآجار فى ١٠٠٠ مل ماء عند درجة حرارة الغليان.

٧ – بيئة الآجار ودقيق الشوفان Oatmeal Agar:

تفيد هذه البيئة فى زراعة بعض الفطريات التى تصعب زراعتها مثل الفطريات التى تتبع الجنس *Phytopthora*، وهى تحضر من المكونات التالية:

المكون	الكمية
دقيق الشوفان	٧٥ جم
آجار	٢٠ جم
ماء مقطر	١٠٠٠ مل

يخلط الدقيق مع ٦٠٠ مل من الماء لمدة خمس دقائق فى خلاط. ويذاب الآجار فى ٤٠٠ مل من الماء، ثم يخلط الجزآن. ويراعى رفع درجة حرارة مخلوط الشوفان مع الماء قبل خلطة مع الآجار والماء لمنع تجمدهما السريع. توضع البيئة فى زجاجات يمكن إحكام غلقها (لمنع الفوران)، ثم تعقم فى الأوتوكليف على ١٢١°م لمدة ٧٥ دقيقة.

البيئات الانتخابية

يحتاج الأمر أحيانًا إلى تحضير بيئات لا تسمح بنمو كائنات دقيقة معينة، كأن تسمح بنمو الفطريات ولا تسمح بنمو البكتيريا أو العكس. وهى التى تعرف باسم البيئات الانتخابية Selective Media، فمثلاً:

١ – يمكن تثبيط نمو الفطريات مع السماح بنمو البكتيريا بخفض pH البيئة. ويتحقق ذلك بإضافة حامض لاكتيك ٥٠٪ بمعدل نقطة واحدة لكل ١٠–١٥ مل من البيئة قبل صب البيئة فى أطباق بترى مباشرة.

٢ – يمكن تثبيط نمو البكتيريا مع السماح بنمو الفطريات بإضافة الـ Cristal Violet

إلى بيئة الآجار المغذى – قبل تعقيمها – بمعدل ١ : ٥٠٠٠٠. كذلك يمكن تحقيق نفس الهدف بإضافة أى من مضادات الحيوية التجارية مثل الاستربتومايسين، والأوريوميسين، والبنسلين ... إلخ، بتركيز يتراوح عادة من ١٠-٣٠٠ جزء فى المليون. ويفيد خلط إثنين أو ثلاثة من مضادات الحيوية بالبيئة فى زيادة أعداد الأنواع البكتيرية التى يوقف نموها. ويجب تعقيم محاليل مضادات الحيوية بالترشيح، وإضافتها إلى البيئات المعقمة عندما تصبح حرارتها حوالى ٤٥°م؛ أى قبل تصلبها.

هذا .. ويحتاج عديد من المسببات المرضية إلى بيئات خاصة لعزلها وزراعتها، وتتوفر المئات من أمثلة هذه البيئات التى يمكن الرجوع إليها فى Dhingra & Sinclair (١٩٨٥).

مزارع الجذور كبيئات لنمو النيماتودا

تستخدم مزارع الجذور root cultures كبيئات لنمو النيماتودا، وللتعرف على تفاصيل تحضير تلك المزارع واستخدامها .. يراجع Butcher (١٩٨٠).

أوعية البيئات

تُفرَّع البيئات – بعد تحضيرها – إما فى أنابيب اختبار، وإما فى دوارق مخروطية بأحجام مختلفة. تملأ أنابيب الاختبار إلى ما يقرب من ربعها أو ثلثها فقط، وتغطى بسدادات قطنية. وتستخدم الدوارق المخروطية الصغيرة كمزارع للفطريات والبكتيريا، حيث يوضع فى قاعها طبقة رقيقة من البيئة. أما الدوارق الأكبر حجمًا فإنها تستخدم فى ملء أطباق بترى بالبيئة. ويكون تعقيم البيئات فى الأوتوكليف بعد تفريغها فى أنابيب الاختبار أو الدوارق المخروطية.

أنابيب البيئات المائلة

لزيادة سطح البيئات فى أنابيب الاختبار (بغرض زيادة السطح الذى تنمو عليه البكتيريا، أو الفطريات) .. يسمح للبيئات – بعد تعقيمها – أن تتصلب وهى فى وضع مائل Slants. ويجرى ذلك إما بوضع أنابيب البيئات على لوح خاص مائل لهذا

الغرض. وإما بوضع السلال المملوءة بأنابيب البيئات فى وضع مائل. ويراعى فى كلتا الحالتين عدم بل سدادات القطن بالبيئة؛ لأن ذلك يجعل من الصعب تحريك السدادات من مكانها، ويزيد من فرصة تلوث البيئات.

عزل المسببات المرضية

عزل الفطريات

لعزل الفطريات من النباتات، فإن الأجزاء المصابة تغسل أولاً فى الماء مع مسحوق الصابون، ثم تجفف بين مناشف ورقية. ويراعى أن تكون عملية الغسيل لفترة قصيرة بالنسبة للأعضاء النباتية الرهيفة كالأوراق الرقيقة وبتلات الأزهار، بينما قد يستمر الغسيل لمدة ساعة إلى ساعتين فى ماء جار بالنسبة للجذور.

ويلى غسيل الأجزاء النباتية تطهيرها سطحيًّا إما باستخدام هيبوكلوريت الصوديوم (الكلوراكس التجارى) بتركيزه ٥٪-١٠٪، وإما باستخدام كلوريد الزئبقيك (محلول السليمانى) بتركيز ١ : ٥٠٠، أو ١ : ١٠٠٠، وتتراوح مدة المعاملة من عدة ثوان إلى عدة دقائق حسب العضو النباتى وتركيز المحلول المطهر. كما يمكن تطهير الأنسجة الخشبية بغمسها فى كحول إثيلى ٧٠٪ ثم إشعال الكحول. تنقل أجزاء صغيرة من الأنسجة النباتية المصابة إلى سطح بيئة مغذية فى أطباق بترى، ثم توضع فى الحضان على ٢٠-٢٥°م لمدة ٥-١٠ أيام. تستخدم بيئة البطاطس والدكستروز والآجار بصورة روتينية لهذا الغرض، بينما تستخدم بيئات خاصة لفطريات معينة؛ فمثلاً تستخدم بيئة الآجار والماء لعزل فطر الـ *Pythium*.

هذا .. ويمكن نقل التراكيب الفطرية التى توجد على النباتات المصابة - كالأجسام الحجرية، والميسيليوم، والجراثم - مباشرة إلى بيئة الآجار. فمثلاً يمكن التقاط الأجسام الحجرية وتعقيمها سطحيًّا، والتقاط الجراثيم الكبيرة بإبرة تشريح معقمة، أو أخذ جزء من الجراثيم الكلاميدوسبورية لفطريات التفحم وتخفيفها بالماء قبل نقلها إلى المزارع فى أطباق بترى.