٥ – تنقل النيماتودا بعد ذلك إلى مزارع الكالوس ، أو إلى مزارع الجنور ، ويكون نقل النيماتودا إما مفردة باستخدام إبرة تشريح ، وإما متجمعة بواسطة ماصة . ويمكن تحضير نسيج الكالوس بتطهير بنور البرسيم الحجازى بواسطة محلول السليمانى ، ومعاملة البادرات بالمبيد 2,4 - D بتركيز ٤ مجم / لتر لمدة دقيقة واحدة ، ثم تنميتها لمدة أسبوع على بيئة White فى أنابيب اختبار .

بيئات زراعة مسببات الأمراض

البيئات الشائعة الاستخدام

١ – بيئة البطاطس والدكستروز والآجار Potato – Dextrose – Agar (PDA) :

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

المكـــون	الكمـيـة
شرائح بطاطس كاملة	٢٠٠ جم
دكستروز	٢٠ جم
آجارمطحون	١٧ جم
ماء	١٠٠٠ مل

تقطع البطاطس إلى شرائح وتوضع فى ٥٠٠ مل ماء على درجة الغليان لمدة ٤٠ دقيقة . يسخن ٥٠٠ مل أخرى من الماء إلى درجة الغليان ، ثم يضاف إليها الآجار المطحون مع التقليب . ويراعى تقليل اللهب أثناء إضافة الآجار حتى لا يحدث فوران . يستمر التقليب لحين ذوبان كل الآجار . يلى ذلك إضافة الدكستروز إلى الآجار ، ثم يضاف إليها مستخلص البطاطس ، ويكمل الحجم إلى ١٠٠٠ مل .

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

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

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

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

المكـــون	الكـمـيـة
مخلوط عصير ثمانية – خضروات V-8 (منتج تجارى)	٢٠٠ مل
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 . ونظرا لأن العصير يكون حامضياً 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 البطىء 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:

المكـون	الكمـيـة
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 خلطه مع الآجار والماء لمنع تجمدهما السريع . توضع البيئة فى زجاجات يمكن إحكام غلقها (لمنع الفوران) ، ثم تعقم فى الأوتوكليف على درجة ١٢١ °م لمدة ٧٥ دقيقة .

البيئات الانتخابية

يحتاج الأمر أحيانا إلى تحضير بيئات لا تسمح بنمو كائنات دقيقة معينة ؛ كأن تسمح بنمو الفطريات ولاتسمح بنمو البكتيريا أو العكس ، وهى التى تعرف باسم البيئات الانتخابية Selective Media ، فمثلا :

١ – يمكن تثبيط نمو الفطريات مع السماح بنمو البكتيريا بخفض pH البيئة . ويتحقق ذلك بإضافة حامض لا كتيك 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 البيئة 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 درجة 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) .

أوعية البيئات

تُفرّغ البيئات – بعد تحضيرها – إما فى أنابيب إختبار ، وإما فى دوارق مخروطية بأحجام مختلفة . تملأ أنابيب الاختبار إلى مايقرب 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 حجما فإنها تستخدم فى ملء أطباق بترى بالبيئة . ويكون تعقيم البيئات فى الأوتوكليف بعد تفريغها فى أنابيب الاختبار أو الدوارق المخروطية .

أنابيب البيئات المائلة Slants

لزيادة سطح البيئات فى أنابيب الاختبار(بغرض زيادة المسطح الذى تنمو عليه البكتيريا ، أو الفطريات) .. يسمح للبيئات – بعد تعقيمها – أن تتلصب وهى فى وضع مائل . 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 .

تعقيم البيئات

يكون تعقيم كل أنواع البيئات فى الأوتوكليف على ١٢١°م ، وتتوقف المدة اللازمة لاكتمال

التعقيم على حجم أوعية البيئات كما يلى :

الـوعاء	المـدة
دوارق مخروطية سعة ٢٠٠٠ – ٣٠٠٠ مل	٢٠ دقيقة
دوارق مخروطية سعة ١٠٠٠ – ١٥٠٠ مل	١٥ دقيقة
دوارق مخروطية سعة ٥٠٠ مل	١٢ دقيقة
دوارق مخروطية سعة ١٢٥ – ٢٥٠ مل	١٠ دقائق
دوارق مخروطية سعة ٥٠ مل	٣ – ٦ دقائق
أنابيب اختبار	٣ – ٦ دقائق

الماء المعقم

يطلق على أنابيب الاختبار التى يحفظ فيها الماء المعقم(ماء الصنبور أو الماء المقطر) اسم Water Blanks . ويوضع عادة نحو ١٠ – ١٥ مل من الماء فى كل أنبوبة اختبار ، ثم تغلق بالقطن وتعقم . كما قد تستخدم أحجام مختلفة من الدوارق المخروطية لنفس الغرض . وتفيد الـ Water Blanks فى تخفيف البيئات المعقمة ، وفى تحضير معقمات البكتيريا أو الجراثيم الفطرية ... إلخ .

عزل المسببات المرضية

عزل الفطريات

لعزل الفطريات من النباتات ، فإن الأجزاء المصابة تغسل أولا 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 سطحيا إما باستخدام هيبوكلوريت الصوديوم (الكلوراكس التجارى) بتركيز ٥ – ١٠ ٪ ، وإما باستخدام كلوريد الزئبقيك (محلول السليمانى) بتركيز ١ : ٥٠٠ ، أو ١ : ١٠٠٠ . وتتراوح مدة المعاملة من عدة ثوان إلى عدة