الفصل الثالث

زراعة الفطريات

● خطوات تحضير البيئات ● الطرق العامة في زراعة فطريات التربة

الدرس العملي السادس

تتم زراعة الفطريات وفقًا للخطوات التالية: (Steven, 1974, Hanlin and Ulloa, 1979)

أولاً : خطوات تحضير البيئات الغذائية

١ ـ تحضير البيئات الغذائية

يتوقف اختيار البيئة الغذائية إلى حد كبير على نوعية الكائن الذي يراد تنميته، إلا أن الطريقة المعتادة عمومًا متشابهة في معظم البيئات الغذائية. هذا، وهناك بيئات غذائية جاهزة تشترى من الأسواق، وهي بيئات جافة على هيئة مسحوق ألصقت طريقة تحضيرها على الوعاء الذي يحتويها، بيد أن البيئات التي تحضر في المختبر يتطلب تحضيرها وزن الكميات المطلوبة، ثم إذابتها في كمية مناسبة من الماء المقطر في دورق، ثم توضع في حمام مائي لتتجانس، ثم توزع البيئة بأحجام تعادل ١٠ ـ ١٢ مل في أنابيب اختبار، وبعد ذلك تقفل الأنابيب بسدادة من القطن، ومن ثم تعقم، وإذا أريد تحضير بيئة بكمية كبيرة ليتسنى استخدامها لفترات طويلة توضع البيئات في:

ا) قوارير كبيرة تتسع لكميات وافية من الماء ومن ثم تقفل بإحكام وتعقم.

ب) أكياس بلاستيك تحفظ في ثلاجة وبذا تحول دون تعرض البيئة إلى الجفاف.

٢ ـ التعقيم Sterlization

لما كان تحضير البيئات الغذائية يعد أصلاً لتنمية الفطريات في مزارع نقية لزم استبعاد الكائنات الدقيقة الأخرى غير المرغوب فيها، مثل البكتيريا والجراثيم الفطرية، الأمر الذي يقتضي أن تعقم البيئات قبل استخدامها، ويكون التعقيم في جهاز الأوتوكليف أو في القدور البخارية لمدة ١٥ ـ ٢٠ دقيقة عند درجة ١٢١°م وضغط ٦ر٨ كجم/سم٢، يلجأ في تعقيم البيئات المتضمنة سكرًا قابلاً للتحلل في القدور البخارية ذات درجات الحرارة العالية (١٢١°م) ـ يلجأ إلى تعقيمها عند درجة حرارة ١٠٠°م لمدة ساعة كل يوم على مدى ثلاثة أيام متوالية تحت الضغط الجوي العادي.

كذلك يمكن تعقيم الأواني الزجاجية (أطباق بتري) في الأوتوكليف لتوفير الوقت أو عن طريق الهواء الجاف داخل فرن، وتلف الأواني الزجاجية بورق لف أو جرائد، ومن الأفضل وضعها داخل حاويات معدنية قبل وضعها داخل الفرن، ويكتفى بدرجة حرارة تتراوح بين ١٥٠ و ١٦٠°م لمدة ٣ إلى ٤ ساعات لتعقيم الأواني الزجاجية.

٣ ـ صب البيئات الغذائية في أوعية

ا) الصب في أطباق

يمكن بعد تعقيم الأطباق والبيئات صَب البيئة في الأطباق وفقًا للكمية المطلوبة، إلا أنه ينبغي تنظيف سطح المائدة بمنظف أو مطهر أو بالماء العادي، ومن ثم تقفل نوافذ وأبواب المختبر لخفض التيارات الهوائية إلى أقل حد ممكن، وتوضع الأطباق على المائدة بعد أن يعقم سطحها بأحد المطهرات، ثم يشعل لهب موقد بنزن وتتبع الطريقة التالية:

- يؤخذ الدورق الذي يحتوي على البيئة الغذائية المسالة.
- تنزع سدادة القطن باليد اليسرى من فوهة الدورق.
- تعرض فوهة الدورق على اللهب.
- يرفع جانب من جوانب غطاء الطبق باليد اليسرى ويكون رفعه إلى حد يتسع لإدخال فوهة الدورق ومن ثم التمكين من عملية الصب.

- يرجع الغطاء إلى وضعه الأصلي في الحال ثم يدار الطبق بلطف لتتوزع البيئة توزيعًا متساويًا في قاع الطبق.
- تترك البيئة تبرد قبل استخدامها كي تصير صلبة.
- تحفظ هذه الأطباق آنفة الذكر في أكياس لدنة (بلاستيكية) وذلك منعًا لجفافها.

ب) **الصب في أنابيب لتحضير الأجار المائل** Agar slant

حينما تسكب البيئة الحارة (المسالة) في أنابيب، توضع هذه الأنابيب مائلة، مع مراعاة أن تكون كمية البيئة المصبوبة فيها لا تصل إلى فوهة الأنابيب، ثم تترك الأنابيب في هذا الوضع لتبرد حتى تتصلب.

ثانيًا : الطرق العامة في زراعة فطريات التربة

هناك عدة طرق تستخدم لزراعة فطريات التربة (Hanlin and Ulloa, 1979)

١ ـ الطريقة المباشرة

خذ قليلاً من تربة (حفنة) Crumb بوساطة مقبض معقم إلى وسط طبق بتري يحتوي على بيئة أجار، فينمو الغزل الفطري الموجود في التربة على سطح البيئة الغذائية المناسبة، الأمر الذي يمكن من نقله إلى أجار مائل.

٢ ـ طريقة أطباق التربة

عند استخدام هذه الطريقة تنقل كمية قليلة من التربة المعنية إلى طبق بتري بوساطة ملقط، ثم يضاف إلى الطبق البتري ٨ ـ ١٠ مل من بيئة الأجار المناسبة المسالة وتنشر أجزاء التربة على البيئة بكاملها. ولا بد إزاء ذلك من تبريد الأجار إلى درجة حرارة لا تصل إلى الدرجة التي تتماسك البيئة عندها وتصير صلبة (نحو ٤٥°م)، والغرض من ذلك تجنب قتل الكائنات الحية الدقيقة المتوافرة في التربة، ومن الأهمية

بمكان خلط التربة الثقيلة Heavey soil بقطرات قليلة من الماء المقطر داخل الطبق قبل إضافة الأجار وذلك ليسهل توزيعها في الأجار.

٣ ـ طريقة التخفيف

طريقة التخفيف من الطرق الواسعة الانتشار، وتستخدم في تحديد العدد النسبي للكائنات كما تستخدم في الحصول على المزارع النقية. والطريقة المذكورة أدناه عبارة عن طريقة عامة يمكن تعديلها حسب ما تقتضي الحالة.

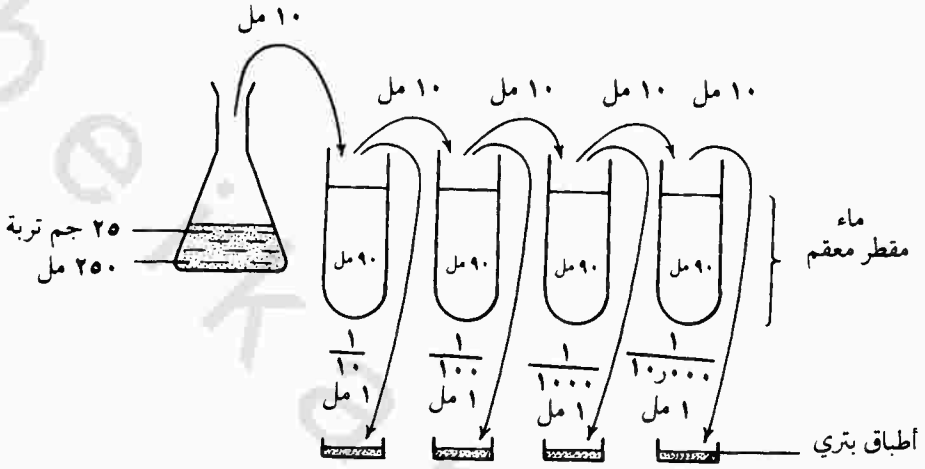
أ) غربل ثلاثة أوزان مختلفة بين ٥ و ١٠جم من التربة المراد تخفيفها بوساطة غربال سعة كل فتحة من فتحاته ٩ ميكرون، ويوضع ما تم غربلته في أوان ذات أوزان معلومة، ثم تجفف داخل فرن (١٠٥ ـ ١١٠°م) لمدة ١٢ ساعة ثم أعد وزن التربة فيحدد بذلك مقدار الرطوبة في التربة.

ب) خذ عينة من التربة ثم جففها هوائيًا وزن منها ٢٥جم (على أساس الوزن الجاف)، وذلك بعد التخلص من مقدار الرطوبة الذي تم تقديره في الخطوة (ا)، ثم ضعها في مخبار مدرج ثم أضف الماء حتى يصل المحلول الكلي إلى ٢٥٠ مل، يحرك المعلق هذا ويسكب في دورق سعة لتر واحد ثم يهز باستخدام هزاز ميكانيكي لمدة ٣٠ دقيقة.

جـ) خذ ١٠ مل من هذا المعلق فورًا وخلال التحريك بوساطة ماصة لتصب في ٩٠ مل ماء مقطر موجود في زجاجة طبية مدرجة ذات غطاء محكم.

د) خذ ١٠ مل من العينة آنفة الذكر أضف إلى ٩٠ مل ماء مقطر، ومن هذه العينة الجديدة تؤخذ ١٠ مل كذلك وتضاف إلى ٩٠ مل ماء مقطر، وهكذا تتكرر العملية حتى يغدو التخفيف المطلوب، ومما يجدر ذكره في هذا الصدد أنه ينبغي على الطالب ألا يترك العينة المخففة أكثر من ١٠ دقائق قبل أن يجري عليها تتمة التجربة حتى لا يرسب المعلق من التربة في القاع.

هـ) ويعطي اتباع الطريقة السابقة في عمل تخفيفات للتربة تراكيز مختلفة كالتالي: ١/١٠، ١/١٠٠، ١/١٠٠٠، ١/١٠٠٠٠، . . . . الخ (انظر الشكل ٣ ـ ١).



شكل ٣ ـ ١ شكل يوضح طريقة التخفيف

أما إذا أريد الحصول على تخفيفات متوسطة فعلى الطالب أن يغير حجم الماء وكمية محلول التربة المنقول فيه للحصول على تخفيف ١/٢٠٠٠٠ ، على سبيل المثال ينقل ٥ مل من التخفيف ١/١٠٠٠ إلى ٩٥ مل ماء.

و) خذ ملليتر واحد من التخفيف المناسب إلى كل طبق ثم تصب بيئة الأجار المناسبة (يمكن استخدام أكثر من نوع من البيئات في هذه الطريقة، ونخص من هذه البيئات بيئة مارتن الحاوية على البنقال الوردي والاستربتوميسين) بمعل ١٣ ـ ١٥ مل لكل طبق على أن يحرك الطبق باليد بما يتفق وشكل (8) ليتسنى لحبيبات التربة المخففة أن تنتشر داخل بيئة الأجار، وبعد فترة تحضين عند درجة ٢٤ ـ ٣٠°م تتراوح بين ٥ و ٧ أيام تعد المستعمرات على أن يضرب متوسط عدد المستعمرات في مقلوب عامل التخفيف.

مثال يوضح عملية العد والحساب:

١ ـ عد المستعمرات في كل طبق (فقط بين ٣٠ و ٣٠٠ مستعمرة)، ثم احسب متوسط المستعمرات لكل تخفيف.

٢ ـ اضرب متوسط المستعمرات في مقلوب عامل التخفيف.

مثال:

متوسط عدد المستعمرات	عامل التخفيف	عدد الفطريات لكل جرام من التربة
١٨٧	١ : ١٠	١٨٧٠
٣٨	١ : ١٠٠	٣٨٠٠
١٩٤	١ : ١٠٠٠	١٩٤٠٠٠
٦٩	١ : ١٠٠٠٠	٦٩٠٠٠٠

تحديد تركيز أيون الهيدروجين pH في التربة: ومن المفضل عند القيام بالدراسات البيئية أن يحدد تركيز أيون الهيدروجين في التربة Soil pH ، ويكون ذلك بإضافة ١٠٠ مل ماء مقطر إلى ٢٠جم تربة، أي بنسبة ٥ : ١ ، ويحرك المزيج هذا بعض الوقت ثم يترك ٢٠ دقيقة، ويحرك مرة ثانية ثم يقدر تحديد تركيز أيون الهيدروجين pH في التربة.