جامعة الأنبار
كلية العلوم
قسم علوم الحياة

احياء مجهرية تربة ومياه عملي

المحاضرة الثانية: عزل الفطريات Isolation of fungi

م.م. ليث لطيف حامد

عزل الفطريات Isolation of fungi :

الفطريات هي كائنات حية حقيقية النواة (Eukaryotic) تمتلك كل خلية فطرية نواة واحدة على الأقل محاطة بغشاء نووي ثنائي الطبقة وسايتوبلازم يحوي على الشبكة الاندوبلازنية والمايتوكوندريا وجهاز كولجي والعضيات السايتوبلازمية الأخرى. تفتقد الفطريات إلى البلاستيدات وهذا ما يميزها عن الخلايا النباتية لذلك تكون غير ذاتية التغذية (Heterotrophic) بل تعتمد في حصولها على الغذاء على مصادر خارجية إما تكون مواد عضوية متفسخة أو كائنات حية أخرى كالنباتات والحيوانات ومن هذا الأساس نشأت أساليب التغذية والمعيشة الفطرية فهي إما تكون رمية التغذية Saprophytic **أو** طفيلية Parasitic **أو** متعايشة Symbiotic.

لا تكون الفطريات الجزء الاكبر من كائنات التربة الحية، الا انها تمثل جزءا كبيرا من الكتلة الحية للاحياء المجهرية في كثير من الترب جيدة التهوية. ويعود ذلك الى غزارة نموها الخيطي السميك المتشابك. تعتبر العامل الاول المسئول عن تحليل المواد العضوية في الاوساط الحامضية.

تنمو الفطريات على هيئة هايفات تتشابك مع بعضها مكونة نسيجا يعرف بالمايسيليوم، والمايسيليوم اما ان يقسم بجدران عرضية أو يبقى بدون تقسيم ، ويكون سايتو بلازم هايفات الفطر غير المقسمة كتلة واحدة مستمرة محتوية على عديد من الانوية. تتميز هايفات الفطر عن مثيلاتها في البكتيريا الخيطية بسمكها الواضح. والهايفات اما ان كون خضرية أو تكاثرية ،فالتكاثرية هي التي تحمل السبورات الجنسية أو اللاجنسية ، والاولى تكون محددة الانتشار بينما تكون الكونيديات أو السبورات اللاجنسية وفيرة وواسعة الانتشار في الطبيعة. الميسيليوم عديم اللون في المزارع عادة في حين تأخذ السبورات اللاجنسية الوانا واضحة وبعكس البكتيريا فان للصفات المورفولوجية للفطر مثل الحجم والشكل والتركيب والخواص المزرعية اهمية كبرى في التقسيم.

تتعرض عملية تقدير كثافة الفطريات بطريقة الاطباق الى نقد شديد وذلك لان المجاميع التي تظهر تنشا من السبورات أو من اجزاء من المايسيليوم الخضري لذا يصعب تمييز ما إذا كان الكائن في حالة نشطة ام ساكنة في التربة. بالاضافة الى ان الاجناس التي تنتج اعدادا غزيرة من السبورات مثل *Fusarium* و *Aspergillus* تظهر باعداد كبيرة على الاطباق وبذلك تكون هي الاجناس السائد عزلها. كما ان عملية رج تخفيفات التربة تفتت المايسيليوم والسبورات ما يؤدي الى زيادة الاعداد الناتجة.

هناك عدة طرق لتقدير اعداد الفطريات دون الحاجة الى تخفيفها كما انها تساعد على دراسة خصائصها. فتستخدم طريقة العد المجهري المباشر لتقدير اعداد الفطريات في طبقة التربة السطحية،كما تستخدم طريقة الشريحة المطمورة للعالمين Rossi-Cholodny لمشاهدة الهايفات وطرق توزيعها وانتشاره في وضع اقرب للطبيعي في التربة.

تأثير العوامل البيئية:

تؤثر العوامل البيئية التي ذكرت سابقا في انتشار الفطريات في التربة. تزداد اعداد اجناس *Fusarium* , *Mucor* , *Penicillum* , *Aspergillus* , *Trichoderma* عند إضافة المواد العضوية.

تسود الفطريات في البيئات الحامضية ولا يعود ذلك الى كونها تفضل تلك البيئات وانما الى كون الوسط الحامضي لا يوجد فيه تنافس يذكر معها على المواد الغذائية.

تفضل الفطريات النمو في الأوساط الرطبة الى حد ما حيث يلاحظ انخفاض مستوى نشاطها عند الانخفاض الملحوظ في مستوى الرطوبة كما ان الرطوبة الزائدة تثبط نموها لتأثيرها على عملية نقل الأوكسجين.

تعتبر الفطريات الخيطية أحياء هوائية رغم وجود شواذ تنمو بدرجة بسيطة عند نفاذ الاوكسجين، وهذا ما يفسر وجود المايسيليوم في الطبقات السطحية للتربة وغيابه في اعماق التربة وفي الاراضي ذات الرطوبة العالية.

معظم انواع الفطريات وسطية الحرارة ونادرا ما تنمو في درجات الحرارة العالية . والفطريات التي تنمو بدرجة 37م تتمركز على سطح التربة ، اما المحبة للحرارة فتنمو بين 50-55م وتوجد في الاسمدة العضوية حيث ترتفع الحرارة بفعل عملية التخمر.

من الفطريات المحبة للحرارة انواع تابعة للاجناس *Aspergillus, Mucor ,Humicola* اما المحبة للبرودة فتابعة للاجناس *Mucor* , *Cladosporium* , *Pinicillum* , *Cylendrocarpon* تنمو في درجة 6م ويزداد نموها بزيادة عمق التربة.

الغرض من التجربة:

عزل وعد وتشخيص الاعفان الموجودة في عينة التربة ودراسة صفاتها المظهرية.

المواد المستخدمة:

1.يستخدم الوسط (**Potato Dextrose Agar PDA** أو**Rose Bengal Media**)

2. أنابيب اختبار، ماء مقطر معقم ، محلول اللاكتوفينول ، أطباق زجاجية، سلايدات زجاجية، أغطية الشريحة cover slip .

طريقة العمل:

1. تحضر التخافيف المطلوبة من نماذج التربة المختلفة لغاية التخفيف $10^5/1$ وينقل 0.1 مل من التخفيف المطلوب إلى طبق زجاجي معقم (ثلاث أطباق لكل تخفيف).

2. يصب الوسط الغذائي المختار (وسط الروز بنكال Rose Bengal Media) أو (وسط أكار البطاطا دكستروز Potato Dextrose Agar PDA) ثم يمزج الوسط مع العينة مباشرة ويترك ليتصلب.

3. احضن الأطباق في حاضنة عند درجة حرارة 30ºم مدة أسبوع وتلاحظ مستعمرات الاعفان النامية على الوسط (النمو خيطي، المستعمرات هشة وذات ذات حبيبات صبغيه مختلفة منها البيضاء والخضراء والسوداء) وتقاس أقطار المستعمرات وتفحص نماذج من مستعمرات مختلفة تحت المجهر. وذلك بوضع قطره من محلول **اللاكتوفينول** (فينول وحامض اللاكتيك وكليسيرول وماء مقطر) على شريحة زجاجيه نظيفة ثم ينقل جزء من مستعمره العفن بواسطة إبرة التلقيح ويوزع هذا الجزء برفق على قطرة اللاكتوفينول ثم يوضع غطاء الشريحة على العينة ثم تفحص الشريحة وتسجل الملاحظات التالية:

- تشعبات خيوط العفن Hyphae.
- أشكال الكونيدات وحواملها Conidia & Conidiaphore .
- أشكال حافظات الابواغ وحواملها Sporangia & Sporangiaphore.
- أشكال الابواغ.
- رسم الأجناس المعزولة

المصادر:

1- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer,A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller,W., and Lipman,D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**, 3389–3402.

2- Eden, P.A., Schmidt, T.M., Blakemore, R.P., and Pace, N.R. (1991) Phylogenetic analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA. *International Journal of Systematic Bacteriology* **41**, 324–325.

3- Mullis, K.B., and Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* **225**, 335–350.

4- Saiki, R.K., Scarf, S., Faloona, F.A., Mullis, K.B., Hoen,G.T., Erlich, H.A., and Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globulin genomic sequences and restriction size analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350–1354.

5- Wilson, D.H., Blitchington, R.B., and Green, R.C. (1990) Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* **28**, 1942–1946.