

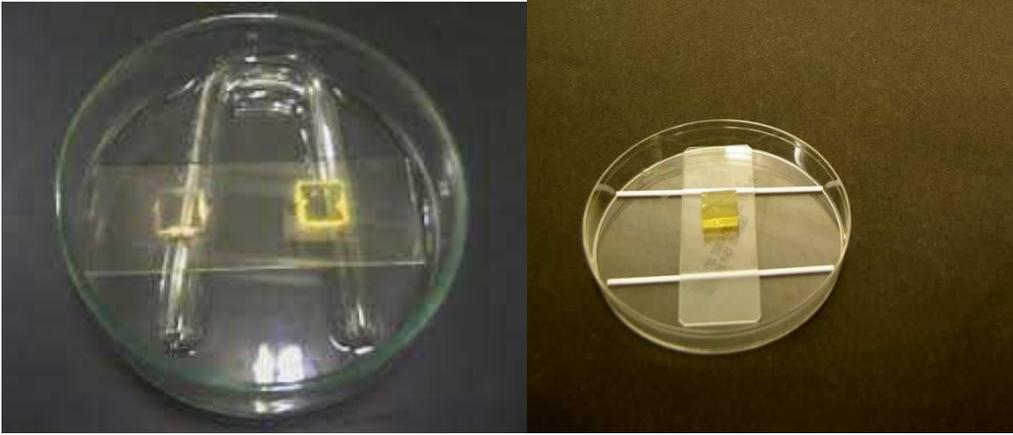
مزرعة الشريحة الزجاجية الصغيرة للفطريات

Micro-Slide Fungal Culture

د. محمد عبد الخالق الحمداني

M.A.AL-Hamdany

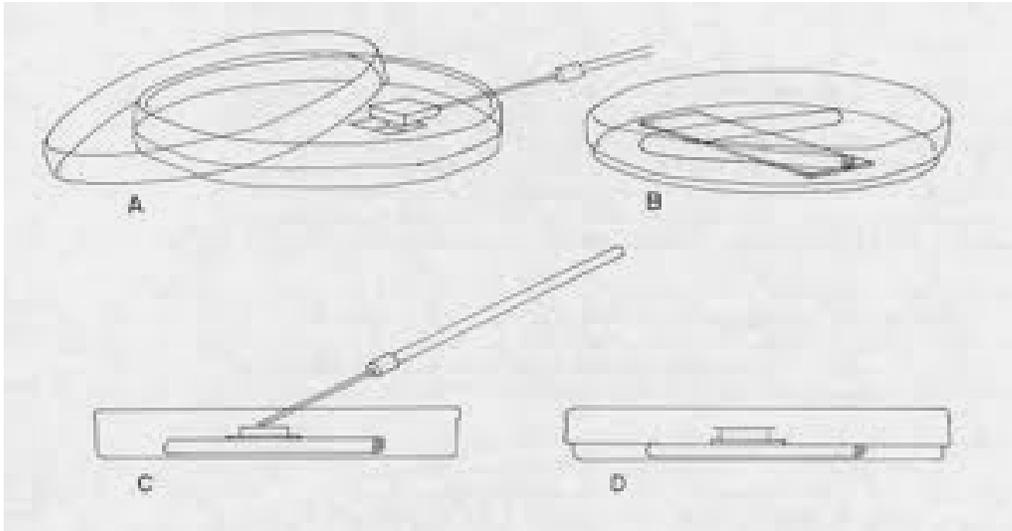
ma_alhamdany@yahoo.com



تعتبر مزرعة الشريحة الزجاجية مزرعة فطرية حديثة مصغرة داخل حاضنة صغيرة مناسبة جدا لإنبات وتطور نمو الفطريات والممرضات البيضية . يمكن فحص مكونات المزرعة الحديثة تحت المجهر وبأي قوة تكبيرية في جميع مختبرات الأمراض النباتية والفطريات سواء في المراكز البحثية أو في مختبرات الكليات الزراعية . يمكن توضيف هذه المزرعة كذلك في دراسة بعض المؤشرات أو المعايير التصنيفية التي قد تشكل أهمية كبيرة في تشخيص الأجناس الفطرية وبعض الأنواع .وبسبب طبيعة المزرعة الفطرية ، فإن فحص الغزل الفطري (Mycelium) والخيط الفطري (Hyphae) فضلا عن النمو الفطري تحت المجهر العادي أو المركب سيساهم بدون شك في توصيف الحوامل البوغية (Conidiophores) وطرائق جلوس أو ترتيب الأبواغ على حواملها (Spore arrangement) . كادوات تصنيفية....

يمكن عمل المزرعة المذكورة وفق الخطوات التالية:

1. كجزء أساسي من مستلزمات العمل في مختبرات الفطريات والأمراض النباتية تواجد أطباق زجاجية أو بلاستيكية تحوي على الوسط الزرعي الأكر المائي (Water Agar) أو أي وسط زرعي متوفر على أن لا يتجاوز سمك الوسط في الطبق بضع مليمترات . تخصص هذه الأطباق لعمل مقاطع من الوسط لدراسات عديدة منها على سبيل المثال تراكيز الوحدات اللقاحية المستخدمة في تلوين النباتات.. أو دراسة حيوية أي وحدات لقاحية (Spore Viability) أو لغرض تشخيص أجناس الفطريات وبعض الأنواع... يمكن حفظ الأطباق في الثلاجة (Refrigerator) على درجة 4-8 م° لحين الإستعمال....



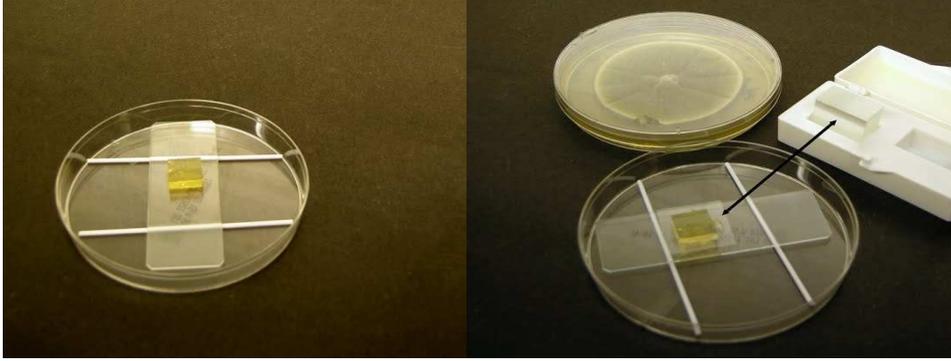
خطوات عمل مزرعة الشريحة الزجاجية

2. تهيئة أطباق زجاجية تحوي على ورق ترشيح (Filter paper) مرطب بعد تعقيمها بالموصدة (Autoclave) أو تعقيم الأطباق وأوراق الترشيح والقضبان الزجاجية التي تجلس عليها الشرائح الزجاجية داخل الأطباق في فرن كهربائي. على أن ترطب أوراق الترشيح عند الإستخدام.. تحفظ الأطباق المعقمة في المختبر لحين الإستعمال... وكما ذكرنا فهذه المجموعة من الأطباق تحوي على:

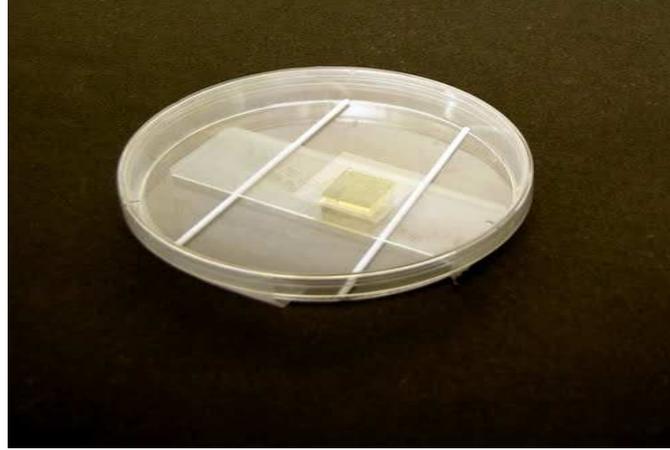
أ. رود زجاجي رفيع على شكل حرف V أو U ..يوضع على ورق الترشيح

ب. شريحة زجاجية نظيفة توضح على الرود الزجاجي....

ت. كما يتوفر في المختبر الأدوات الأخرى التي نحتاجها أن تكون معقمة ... مثل أغلفة
فحص الشرائح الزجاجية (Cover Slip) ، أبر وسكاكين وملاقط معقمة
(Sterilized Needles, Knives and forceps)



3. يقطع وسط الآكر المائي على شكل مربعات بمساحة 1 سم² ...
4. تنتقل قطعة واحدة إلى كل شريحة زجاجية في الطبق المخصص ليكون لدينا حاضنة صغيرة
...
5. ترطب ورقة الترشيح بـ 4-5 مليلتر من الماء المقطر المعقم...مع ضرورة تجنب وضع
كميات كبيرة من الماء
6. تستخدم إبرة معقمة لنقل أصغر كمية من الوحدات اللقاحية (أبواغ كونيدية) من مستعمرة
فطرية...
7. يتم ملاسة طرف الإبرة لأركان قطعة الآكر المائي الأربعة...
8. تغطي قطعة الآكر المائي بعد تلويث أركانها بالأبواغ بغطاء الشريحة ... مع ضغط قليل
جدا على الغطاء....
9. تغطية الطبق ... وحفظه على درجة 20-25م° داخل حاضنة وبوجود الضوء لفترة لاتقل
عن 12 ساعة باليوم الواحد...



10. يتم مراقبة تطور النمو بعد 48 ساعة ...
11. تجهز المستعمرة الجديدة للفحص والاختبار من خلال الأتي:
- أ. بعد التأكد من حدوث نمو في أركان قطعة الوسط.. يزال الغطاء بشكل تدريجي من قطعة الوسط....
- ب. وضع قطرة من صبغة اللاكتوفينول الزرقاء (Lacto phenol Cotton Blue) بحيث تكون القطرة صغيرة جدا حتى لا تنتسرب الأبواغ خارج محيط الوسط
- ت. إعادة وضع الغطاء فوق قطرة الصبغة....
- ث. **كما يمكن إزالة غطاء الشريحة أولا...** وإزالة قطعة الآكر من الشريحة...ثانيا ثم....
- ثالثا.. وضع قطرة صغيرة من صبغة اللاكتوفينول في وسط موقع قطعة الآكر... تغطية القطرة بغطاء شريحة جديد.. ثم يفحص النمو المتواجد على الشريحة الزجاجية.... (في حالة إختيار قطعة آكر غير سميكة... أما إذا كان سمك القطعة كبير (أكثر من 5 ملليمتر ، فيتم وضع القطرة في وسط غطاء الشريحة لتصبغ نموات الفطر الملتصقة به. هي المستهدفة في الفحص ..
- ج. وضع الشريحة تحت المجهر لفحص طبيعة النمو والتراكيب المتكونة حيث تفحص النموات على تكبير 40 ثم 100 وقد تستخدم قوة التكبير 400 في بعض الأحيان... تستخدم صبغة اللاكتوفينول الزرقاء في تحديد ألوان الغزل الفطري والحوامل البوغية

والأبواغ... حيث تكون عديمة اللون إن تلوئت باللون الأزرق... بينما تكون غامقة اللون إن تلوئت باللون البني....



ح. يمكن عمل شريحة ثابتة (Permanent Slide) للفطر بعد تشخيصه وذلك بإحاطة حافات غطاء الشريحة الزجاجية ببلسم كندا (Canada Balsam) وهي عبارة عن مادة راتنجية صفراء اللون... أو يمكن إستخدام طلاء أظافر النساء....
خ. تعليم الشريحة الزجاجية بإسم الفطر المشخص أو إستخدام شفرة رقمية للدلالة عليه في سجل خاص....

وعلى الرغم من الفوائد الكبيرة التي يمكن إكتسابها من هذه التقنية البسيطة، إلا إن أهم الأخطاء التي قد يرتكبها العاملون عليها هي عدم نقل النموذج المناسب من المستعمرة الأصلية أي عدم نقل أبواغ الفطر المراد تشخيصه أو النقل من أماكن لا تتواجد فيه أبواغ الفطر .. وكذلك نقل كميات كبيرة من الأبواغ الكونيدية مما يسبب إرباكا في الفحص نتيجة لغزارة النمو. تتصف التقنية المذكورة بمميزات عديدة أهمها سرعة الحصول على مستعمرة حديثة للفطر وتقليص فرص حصول تلوين للمزارع الفطرية في حالة إعداد أكثر من شريحة زجاجية... وكذلك التخلص من التداخل الذي غالبا ما يحصل عند فحص نموذج من المزرعة الرئيسية على شريحة زجاجية حيث غالبا ما تكون هناك أعداد كبيرة من الأبواغ التي قد تعيق وضوح كيفية جلوسها أو توزيعها على الحوامل البوغية نتيجة لضغط غطاء الشريحة الزجاجية وتوزيع النموذج في قطرة الصبغة... لذلك فإن التقنية هذه توفر

للباحث ملاحظة النمو الطبيعي للفطر من خلال نقل أقل عدد ممكن من الأبواغ الكونيدية... وأخيرا يمكن بهذه الطريقة التعرف على نقاوة المزرعة الأصلية من خلال تلويث كل ركن من أركان قطعة الأكر بأبواغ المستعمرة الأصلية لأربعة مناطق مختلفة... ويمكن عمل قطعتين على شريحة زجاجية واحدة... لتأكيد نقاوة المزرعة الفطرية... من خلال فحص نموات ثمان مواقع مختلفة من المزرعة الأصلية...