

المستنباتات الغذائية (Culture Media)

المستنبات أو الوسط الغذائي Medium or Culture Medium للكائنات الحية الدقيقة (فطور, بكتيريا) هو الوسط الذي تنمو عليه أو ضمنه تلك الكائنات وتحصل منه على كافة احتياجاتها من الماء والغذاء، يشترط عند تحضير المستنبات الغذائية مراعاة احتوائها على مصدر للطاقة ومصدر للكربون والأزوت والأملاح المعدنية والماء ودرجة PH مناسبة. تختلف الكائنات الحية الدقيقة في متطلباتها حيث تراعى هذه المتطلبات ودرجة الـ PH لتناسب الكائنات الحية المراد دراستها فالبكتيريا تفضل الأوساط المتعادلة المائلة إلى القلوية وتتراوح درجة الـ PH المناسبة بين 7.4-7 في حين تفضل الفطور الأوساط المائلة إلى الحموضة، قيمة الـ PH بين 6.5-6. ويعتبر الآغار من أفضل المواد المستخدمة في تصليب المستنبات الغذائية لامتيازه بأمر عديدة فهو يضاف بنسبة قليلة تتراوح بين 1-2% ويتصلب على درجة حرارة أقل من 45.

أولاً – أنواع المستنبات الغذائية:

يمكن تقسيم المستنبات الغذائية المستعملة في تنمية الكائنات الحية الدقيقة تبعاً لاعتبارات عديدة:

(1) تقسم المستنبات حسب منشئها إلى:

- مستنبات طبيعية: وهي المستنبات ذات المنشأ الطبيعي (بطاطا, حليب, تربة..... إلخ).
- مستنبات اصطناعية: وهي المستنبات التي تحضر في المختبر.

(2) تقسم المستنبات حسب استعمالها إلى:

- مستنبات عامة: تنمى عليها كثير من الأحياء الدقيقة.
- مستنبات خاصة: تنمى عليها أنواع محددة من الأحياء الدقيقة.

(3) تقسم المستنبات حسب عملها إلى:

- مستنبات اختيارية: وهي التي يمكن أن نتحكم بأحد مكوناتها.
- مستنبات غير اختيارية: وهي التي لا نستطيع التحكم بأي من مكوناتها.

(4) تقسم المستنبات حسب الطبيعة الكيميائية لمكوناتها إلى:

- مستنبات عضوية: يدخل في تركيبها مكونات عضوية.
- مستنبات معدنية: تخلو من المواد العضوية.

(5) تقسم المستنبات حسب تركيبها إلى:

- مستنبات محددة: وهي التي يعرف بالضبط كمية ونسبة كل مكوناتها.

- مستنبتات غير محددة: وهي التي لا يعرف كمية أو نسبة مكوناتها.

(6) تقسم المستنبتات حسب قوامها إلى:

- مستنبتات صلبة: حيث يضاف إليها مواد صلبة كالأغار أو الجيلاتين Gelatin

- مستنبتات نصف صلبة: حيث يضاف إليها مادة مصلبة بكمية قليلة فيصبح قوامها نصف صلب أو رجراجاً.

- مستنبتات سائلة: لا يضاف إليها مادة مصلبة.

ثانياً – أشكال المستنبتات الغذائية:

1- مستنبتات سائلة تتصف بعدم احتوائها على مادة صلبة وتستخدم في دراسات خاصة كدراسة زيادة أو نقص أحد العناصر في نمو الكائن الحي الدقيق كما تستخدم في إنتاج الأنزيمات والتوكسينات وتتميز بإمكانية تهويتها باستمرار بواسطة الرج ومن أهم مساوئها صعوبة نقلها.

2- مستنبتات صلبة وتتميز باحتوائها على مادة صلبة كالأغار وتتميز بسهولة الاستعمال والنقل وتستخدم في إجراء الدراسات المورفولوجية للمستعمرات المكونة من قبل الأحياء الدقيقة ودراسات أخرى كما يعتمد عليها في حفظ المستعمرات والمزارع المختلفة من الفطور والبكتيريا في المختبر.

3- أجزاء نباتية مثل قطع البطاطا وقطع الجزر وأغصان التفاح.....إلخ.

ثالثاً – تحضير المستنبتات الغذائية:

يراعى عند تحضير المستنبتات الغذائية بعد إضافة مكونات المستنبت إلى الماء المقطر وتسخينها النقاط التالية:

1- ضبط درجة الحموضة للمستنبت الغذائي بما يتناسب مع الكائنات الحية الدقيقة المراد دراستها حيث يعمل على تعديل درجة حموضة المستنبت قبل تعقيمه بإضافة مادة حامضية مثل حمض كلور الماء 0.1 نظامي أو مادة قلوية مثل ماءات الصوديوم 0.1 نظامي وتقاس درجة الـ PH بواسطة ورقة عباد الشمس أو جهاز قياس درجة الحموضة PH meter.

2- تعقيم المستنبتات الغذائية بعد صبها في دوارق زجاجية خاصة وإغلاقها بشكل محكم على درجة حرارة 120 درجة مئوية لمدة 20 دقيقة تحت ضغط وتفرغ.

3- صب المستنبتات الغذائية بعد وصول درجة حرارتها إلى 50 درجة مئوية إما في أطباق بتري بمعدل 10-15 مل في الطبق وتحريكه حركة رحوية لتوزيع المستنبت بشكل متجانس أو في أنابيب اختبار بحدود 5 مل وإغلاقه بسدادة قطنية ووضعه بشكل مائل لزيادة السطح المستفاد منه من قبل الكائنات الحية الدقيقة.

ونورد فيما يلي بعض الأمثلة عن طرائق تحضير المستنبتات الغذائية :

أ – مستنبت البطاطا ديكستروز آغار PDA الأكثر استخداماً في تنمية الفطور.

250 غ بطاطا مقشورة- 20 غ آغار Agar - 20 غ ديكستروز Dextrose في لتر ماء مقطر.

طريقة التحضير :

يسلق 250 غ بطاطا مقشورة ومقطعة إلى قطع صغيرة على نار هادئة لمدة 20 دقيقة في 400 مل ماء مقطر وبحسب الزمن من بدء الغليان ثم يرشح مسلوقة البطاطا عبر الشاش وتكمل الرشاحة إلى 1000 مل ثم يضاف الديكستروز و الآغار على التسلسل, بعد ذلك يصب المستنبت بعد ضبط درجة حموضته في حوجلات خاصة سعة 250 مل وتغلق بإحكام ويكتب عليها كافة المعلومات الخاصة بالمستنبت وزمن التحضير ثم يعقم بالأوتوكلاف على درجة 120 درجة مئوية لمدة 20 دقيقة. بعد التعقيم يصب المستنبت الغذائي في أطباق بتري أو أنابيب اختبار عند وصول درجة حرارته إلى 50 درجة مئوية.

ب – مستنبت الآغار المغذي والمرق (و هو الأكثر استخداماً في تنمية البكتيريا).

3 غ مستخلص لحم- 10 غ ببتون- 20 غ آغار – 1000 مل ماء مقطر.

طريقة التحضير:

يذاب الآغار في 500 مل ماء مقطر وتذاب المواد الأخرى في النصف الآخر من الماء لمقتر. تسخن حتى تمام الذوبان ثم يخلط المزيجان ويكمل الحجم إلى 1000 مل ثم يوزع في أوعية زجاجية سعة 250 مل, تغلق وتعقم كما ورد سابقاً.

تقنيات عزل الكائنات الحية الدقيقة والحصول على مزارع نقية

هناك طرق عديدة تستخدم لعزل الكائنات الحية الدقيقة تهدف بمجملها إلى عزل المسبب المرضي والتعرف عليه والتأكد من أنه المسبب الفعلي للمرض النباتي وسوف نستعرض فيما يلي أهم الطرائق المتبعة في عزل الكائنات الحية الدقيقة من التربة والأجزاء المختلفة:

أولاً – عزل الكائنات الحية الدقيقة من التربة:

تعتبر معرفة الحمولة الميكروبية للتربة ضرورية قبل القيام بالزراعة أو أثناء نمو النبات في حال ظهور أعراض مرضية على النباتات المزروعة ويفيد ذلك في انتقاء المحاصيل الزراعية المراد زراعتها بحيث تكون مقاومة أو متحملة لبعض المسببات المرضية الموجودة في التربة.

طريقة أخذ العينة:

تؤخذ العينات من الطبقة السطحية للتربة أي من عمق 10- 15سم حيث تتميز هذه الطبقة بالحمولة الميكروبية العالية لتهويتها الجيدة وتوافر المادة العضوية وانتشار جذور النباتات الحولية فيها، ويستخدم عند أخذ العينة مجموعة من الأدوات مثل أنابيب اختبار معقمة ومرقمة ومغلفة بسدادات – مشرط أو سكين حاد لعمل المقاطع في التربة – مصباح كحولي.

نعمل مقاطع في التربة على العمق المراد أخذ العينة منه، يؤخذ أنبوب اختبار معقم ويوضع بشكل عمودي على المقطع في العمق المطلوب ويضغط على التراب فيدخل جزء منه إلى الأنبوب، يغلق الأنبوب بعد تعقيم فوهته باللهب بسدادة قطنية معقمة ويسجل عليه كافة البيانات عن العمق والمنطقة ثم ينقل إلى المختبر، تؤخذ العينات بشكل عشوائي من عدة أماكن في الحقل مع مراعاة الابتعاد عن المناطق المشبوهة والملوثة في الحقل مثل المواقع التي يوجد فيها شحم أو زيت أو مازوت وفي المختبر تجرى عملية العزل بطرائق متعددة تختلف عن بعضها البعض وكلها تمكن من التقدير الكمي أو النوعي للكائنات الحية الدقيقة في التربة ومن أهمها:

1- طريقة المحاليل المخففة:

تتميز هذه الطريقة بأنها دقيقة إلا أنها طويلة ومعقدة وتحتاج إلى زمن طويل وأدوات زجاجية مختلفة وتعتمد هذه الطريقة على مبدأ تخفيف التركيز عدة مرات لتأمين العزل الجيد للكائنات الحية الدقيقة في التربة وتقديرها كميًا.

الأدوات اللازمة:

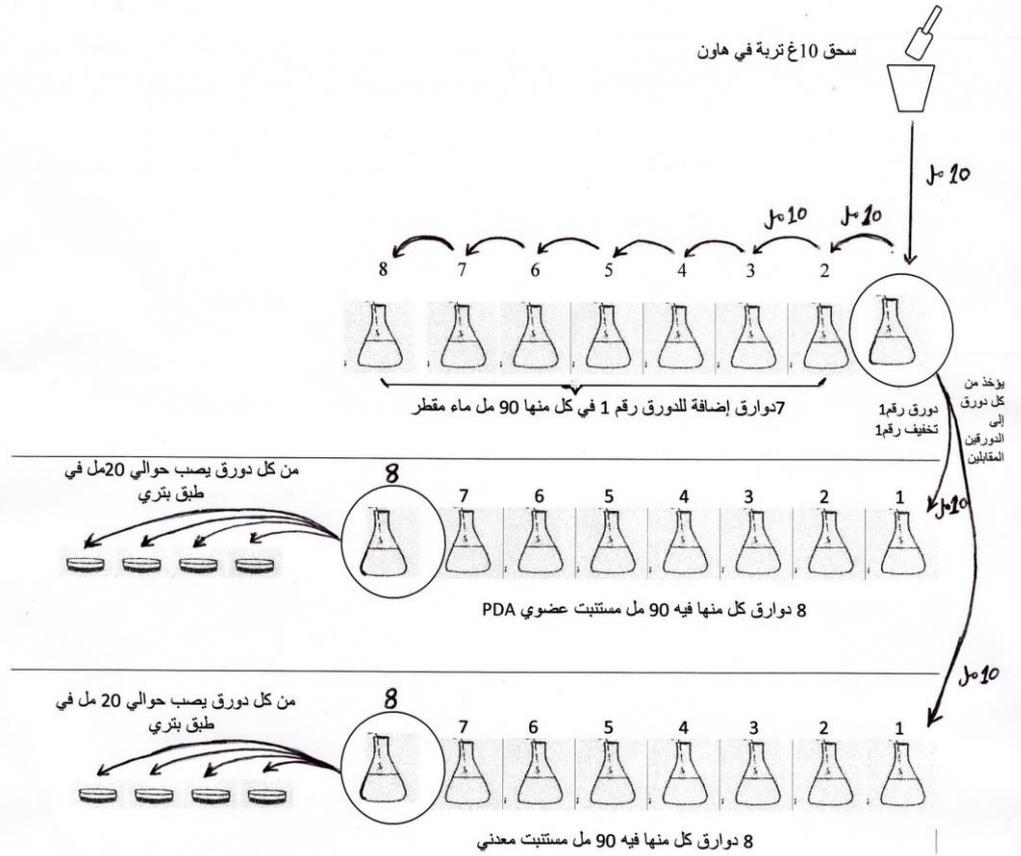
- هاون بورسلان معقم
- دورق زجاجي مخروطي سعة 250 مل يحوي 90 مل من الماء المقطر والمعقم (رقم 1).
- دوارق مخروطية زجاجية سعة 250 مل عدد 7/ يحوي كل منها (90) مل ماء مقطر ومعقم.
- دوارق مخروطية زجاجية سعة 250 مل عدد (8) يحوي كل منها (90) مل مستنبت غذائي عضوي PDA.
- دوارق مخروطية زجاجية سعة 250 مل عدد (8) يحوي كل منها (90) مل مستنبت معدني وتجدر الإشارة إلى أن تعدد المستنبتات الغذائية المستخدمة في العزل يهدف إلى تأمين وسط مناسب لأكبر عدد ممكن من الكائنات الحية الدقيقة الموجودة في التربة.
- أطباق بتري معقمة عدد (40) أو أكثر بحيث يستخدم حوالي ست أطباق لكل تخفيف.
- أنابيب اختبار معقمة ويكون الصب بوساطة ماصة مباشرة إلى أسفل الأنبوب لمنع تلوث حواف الأنبوب العليا.
- ماصات معقمة مختلفة الأحجام.

طريقة العمل: الشكل رقم (1)

يؤخذ 10 غ تربة وتوضع في هاون معقم وتسحق العينة بلطف حتى لا تتخرب البنيات الخاصة بالفطر وخاصة الأجسام الحجرية ويضاف مع السطح ماء مقطر من الدورق المخروطي الأول الحاوي على (90) مل فنحصل على معلق نحركه بلطف ثم نصب المزيج في الدورق المخروطي رقم (1) فنحصل على التخفيف رقم (1).

يرج المحلول رقم (1) لمدة 30 دقيقة لفصل الكائنات الحية الدقيقة عن بقية التربة وجعله في المعلق. يؤخذ 10 مل من التخفيف رقم (1) ويضاف إلى الدورق رقم (2) فنحصل على التخفيف رقم (2) وتكرر عملية الرج لمدة 30 دقيقة كما تكرر عملية النقل إلى الدوارق المخروطية الموجودة فنحصل على التخفيفات المطلوبة. من هذه التخفيفات يتم نقل 10 مل إلى كل من المستنبتات الغذائية العضوية والمستنبتات الغذائية المعدنية وذلك من كل تخفيف. بعدها يتم صب المستنبتات الغذائية المعلقة في أطباق بتري معقمة حيث يوضع في كل طبق حوالي العشرين مل ويتم الصب بهدوء لمنع تشكل فقاعات بعدها يوضع الطبق على سطح مستو ويحرك حركة رحوية لتوزيع المستنبت بشكل أفضل أو يتم الصب في أنابيب اختبار.

بعد ذلك يتم التحضين Incubation على درجة حرارة 20-22 مئوية وبعد أربع إلى خمسة أيام من التحضين تفحص المستعمرات النامية وتفحص وتعزل كل واحدة في أنبوب اختبار يحوي مستنبت غذائي ويتم العزل من طرف المستعمرة بواسطة إبرة تلقح ويكتب على أنبوب الاختبار كافة البيانات. يؤخذ على هذه الطريقة أنه لا يمكن بواسطتها عزل كافة الفطور الموجودة في التربة حيث أن بعض هذه الفطور لا يتبوغ في التربة كما أنه من الصعب الحصول على معلق متجانس للتربة داخل الوسط الغذائي.



الشكل رقم (1): عزل الكائنات الحية الدقيقة من التربة بطريقة المحاليل المخففة

2 - طريقة Johnson:

تعتمد هذه الطريقة على الغسيل المتكرر للتربة حيث يوضع وزن معلوم من التربة على منخل معدني وتغسل بكمية معروفة من الماء المقطر والمعقم ويتم الغسيل حوالي 40 مرة متتالية حيث يمثل كل غسيل للتربة تركيزاً جديداً يستخدم جزء منه في الزراعة على وسط مغذٍ أما الأجزاء المتبقية من التربة فتوزع على أطباق بتري معقمة ويصب عليها مستنبت غذائي مناسب.

3 – طريقة النباتات الصائدة:

تستخدم هذه الطريقة لعزل الكائنات المجبرة على التطفل والكائنات الضيقة التطفل والبطيئة النمو حيث تزرع النباتات الحساسة في التربة المراد دراستها وعندما تصاب هذه النباتات بالمرض يعزل منها المسبب المرضي مثال على ذلك يتم عزل الفطر الكاذب المسبب لمرض الجذر الصولجاني على الصليبيات *Plasmodiophora brassicae* بوساطة نبات الخردل الأبيض *Sinapis alba* ويؤخذ على هذه الطريقة أنها تحتاج إلى فترة زمنية طويلة وأنها تتأثر بالظروف الجوية السائدة ومدى قابلية النباتات الصائدة للإصابة.

ثانياً – عزل الكائنات الحية الدقيقة من الأجزاء الخضرية:

تهدف هذه العملية إلى الحصول على تشخيص دقيق للمسبب المرضي والتأكد بشكل نهائي أن هذا المسبب المرضي هو المسؤول عن إحداث المرض النباتي حيث يعزل على وسط غذائي مناسب ونلجأ عادة لعملية العزل عند تعذر معرفة المسبب من الأعراض الظاهرية التي تظهر على النبات المريض أو عند وجود أكثر من إصابة عليه وتتم عملية العزل هذه بطريقتين تبعاً لمكان وجود المسبب المرضي:

1- عزل الكائنات الحية الدقيقة بدون تطهير:

يؤخذ الجزء المصاب من النباتات سواء كان ورقة أو ساقاً على أن يحتوي على نسيج سليم ثم يغسل بالماء العادي ثم بالماء المقطر والمعقم بعد ذلك يقطع الجزء النباتي المصاب إلى قطع صغيرة بوساطة مشرط أو مقص معقمين وتنقل هذه القطع وتوضع في أطباق بتري تحتوي وسطاً غذائياً مناسباً بعدها تحضن على درجة 20-22 درجة مئوية وتستخدم هذه الطريقة بحالة الإصابة السطحية للتعرف على الكائنات الحية الدقيقة الموجودة على سطح النبات.

2- عزل الكائنات الحية الدقيقة مع تطهير:

تستخدم هذه الطريقة عندما نرغب بالتخلص من الكائنات الحية الدقيقة الموجودة على سطح النبات والتي تعيق التشخيص الدقيق للمسبب المرضي الحقيقي الموجود داخل النبات وتؤخذ كافة الاحتياطات اللازمة التي تحول دون الإضرار بالمسبب المرضي وذلك باستخدام مواد التطهير بتركيز ملائمة ونلخص فيما يلي هذه الطريقة :

الغسيل بالماء الجاري – الغسيل بالماء المقطر المعقم – التطهير السطحي - الغسيل مرة أخرى بالماء المقطر والمعقم لعدة مرات للتخلص من كل أثر للمطهر – تقطيع الجزء النباتي المصاب الحاوي على جزء سليم إلى قطع صغيرة بوساطة مشرط أو مقص معقمان – زرع هذه القطع

على أطباق بتري تحوي مستنبت غذائي مناسب – التحضين على درجة حرارة بين 20-22 درجة مئوية.

أهم المحاليل المستخدمة في التطهير:

- محلول ثاني كلوريد الزئبق $HgCl_2$ وهو محلول سام جداً يجب توخي الحذر عند استعماله في التطهير يستخدم بتركيز من 1 إلى 0,005 على ألا تتجاوز مدة التعقيم من دقائق لأن تجاوز هذه الفترة يؤدي إلى تجاوز هذه الفترة يؤدي إلى قتل المسببات الممرضة الموجودة داخل النبات (هذا المحلول منع استخدامه).
- محلول نترات الفضة $AgNO_3$ وهو يستخدم بتركيز 1/1000.
- كحول يستخدم بتركيز 70-80% ويتم التطهير بوساطة قطع قطنية مبللة بالكحول تمسح بها سطوح الأجزاء النباتية المصابة، لأن وضع النبات بالكامل أو لأجزاء منه في كحول يؤدي إلى قتل النبات والمسببات المرضية الموجودة فيه.

ثالثاً – عزل الكائنات الحية الدقيقة من الجذور:

- نغسل الجذور المراد فحصها بتيار مائي عادي للتخلص بشكل كامل من الأتربة العالقة بها.
- تغسل الجذور بالماء المعقم والمقطر كون الماء العادي قد يحتوي على بعض الكائنات الممرضة.
- تجفف الجذور بوساطة ورق ترشيح معقم.
- تطهر الجذور سطحياً بنقعها في محلول هيبو كلوريت الصوديوم.
- تغسل الجذور بالماء المقطر والعادي لعدة مرات لإزالة كل أثر للمطهر.
- تجفف الجذور بوساطة ورق ترشيح معقم.
- تقطع الجذور بوساطة مقص أو مشرط معقمن إلى قطع صغيرة وتوزع على أطباق بتري تحتوي مستنبت غذائي وذلك بمعدل من 3 إلى 5 قطع بكل طبق. على أن تحتوي هذه القطع على نسج مصاب وآخر سليم. تجري كافة العمليات في ظروف معقمة ضمن غرفة العزل وقرب اللهب.

تحضن الأطباق على درجة 22 درجة مئوية وبعد فترة التحضين تظهر نموات بعض الفطور على المستنبت الغذائي ومنها أنواع *Fusarium, Rhizoctonia, Alternaria*.

رابعاً – عزل الكائنات الحية الدقيقة من الثمار المتعفنة:

تؤخذ قطع صغيرة من الجزر أو البطاطا وتعقم بوساطة الأوتوكلاف وتوضع في أطباق بتري ويوضع عليها بوساطة حربة أو إبرة تلقح معقمة جزء من النسيج الثمري المتعفن ثم تحضن فتنمو الكائنات الحية الدقيقة على هذه الأجزاء النباتية ولتوجيه النمو بالنسبة للكائنات الحية الدقيقة نلجأ في حالة الرغبة في الحصول فقط على الفطور إلى معاملة هذه القطع النباتية

ببعض المضادات الحيوية كالنتراسكلين أو البنسلين أو الستروبتومايسين وفي حال استخدام المستنبتات الغذائية يمكن التحكم بذلك عن طريق رفع درجة الحموضة بإضافة قطرات من حمض اللبن ليصبح الوسط حامضياً.

خامساً – عزل الكائنات الحية الدقيقة من البذور:

قد تكون البذور ملوثة سطحياً أو داخلياً فعند الإصابة السطحية لا تطهر البذور وإنما يتم وضع وزن معلوم من البذور في حوالة ويضاف إليها كمية معلومة من الماء المقطر والمعقم وترج للحصول على معلق يؤخذ مقدار معين من هذا المعلق ويزرع على مستنبت غذائي مناسب ثم يتم التحضين على درجة 22 درجة مئوية. أما في حالة كون الحمولة الميكروبية مرتفعة نلجأ إلى إجراء عملية تخفيف. كما تفحص الإصابات بأمراض التفحم مباشرة بالمجهر (من المعلق السابق) كون المسببات المرضية إجبارية التطفل (لا تنمو على مستنبت غذائي).

أما إذا كانت إصابة البذور داخلية تتم عملية العزل وفق التالي :

تغسل البذور بالماء العادي ثم الماء المقطر والمعقم ويعاد غسلها مرة ثانية بنفس الطريقة بعد التطهير. بعد انتهاء عملية التطهير والغسيل تزرع البذور مباشرة في طبق بتري ولتسهيل خروج الفطر يتم فتح البذور ذوات الفلقتين، أما البذور وحيدات الفلقة كحبوب القمح فتوضع بحيث يكون الشق الطولي للحبة ملاسماً لسطح المستنبت الغذائي.

سادساً – عزل البكتيريا من الأجزاء النباتية:

تتميز البكتيريا بالتطفل الداخلي لذلك تغسل العينات النباتية المصابة بالماء المقطر والمعقم وتهرس أو تطحن حتى تخرج البكتيريا مع العصارة النباتية ويتبع هذه العملية أخذ جزء من العصارة بواسطة إبرة تلقيح معقمة وزرعها في طبق بتري يحوي مستنبت غذائي بطريقة التخطيط أو التشطيب على سطح المستنبت ثم التحضين.

سابعاً – عزل الفطور من الأجسام الحجرية:

يعزل الفطر من الجسم الحجري عن طريق شق الجسم الحجري بعد تطهيره وأخذ جزء من الميسيليوم الداخلي بواسطة إبرة تلقيح معقمة وزرعها على مستنبت غذائي موجود في طبق بتري معقم ثم تحضن على درجة 20-22 درجة مئوية. تصلح معظم الطرائق السابقة إلى عزل الكائنات الحية الدقيقة إجبارية الترمم واختيارية التطفل والترمم ولا تصلح لعزل الكائنات إجبارية التطفل.

طرائق عزل الكائنات الحية الدقيقة إجبارية التطفل:

1 – طريقة مورل (زراعة الأنسجة):

يعتمد مبدأ هذه الطريقة على أنه يمكن الحصول على نبات كامل اعتباراً من خلية نباتية واحدة وأنه من الممكن الحصول على نبات كامل من زراعة القمة النامية للنبات. تستخدم هذه

الطريقة في إنتاج نباتات خالية من الفيروسات حيث أن الميريستيم القمي خال عادة من الفيروسات.

2 – طريقة إجراء العدوى الاصطناعية على النباتات الحساسة:

توضع النباتات الحساسة في المختبر والبيت الزجاجي الذي غالباً ما يكون مجهزاً بوسائل خاصة للتهوية والتبريد والتدفئة ووسائل إنارة إضافية لنمو النبات بشكل أفضل. تجري عملية نقل المسبب المرضي إلى النبات الحساس بطرائق متعددة. تستخدم هذه الطريقة بشكل واسع في دراسة الأمراض الفيروسية كما تستخدم لعزل الفطور إجبارية التطفل مثل فطر البياض الدقيقي، وذلك بتنميتها على نبات مشابه للعائل الأصلي حيث تعدى النباتات الصغيرة بطور من 2 إلى 4 وريقات بالعامل الممرض، وتنفذ هذه العملية بالنسبة لفطر البياض الدقيقي برش النباتات المراد إعدادها بالماء بشكل جيد، وبعد ذلك يتم هز نباتات مصابة فوقها وتوضع النباتات المعدة في البيت الزجاجي تحت رطوبة كافية وإنارة جيدة. بعد 8 إلى 10 أيام تظهر الأعراض المرضية على هذه النباتات.

3 – طريقة العزل على أوراق نباتية معزولة وموضوعة ضمن أوساط معينة:

تتميز هذه الأوساط بتركيب خاص يحوي عادة على بعض الهرمونات التي تساعد على بقاء الأجزاء النباتية حية لفترة من الزمن تكفي لتنمية الكائنات الحية مجبرة التطفل عليها ومنها على سبيل المثال هرمون (الكينيتين Kinetine).

الحصول على مزارع نقية:

إن عزل الكائنات الحية الدقيقة بالطرائق المذكورة سابقاً لا يعني أبداً أنه قد تم الحصول على مستعمرات نقية للمسبب المرضي، فقد تختلط المستعمرات مع بعضها البعض أو تتلوث وتتم تنقية مستعمرات الفطور و الحصول على مستعمرات نقية بإحدى الطريقتين التاليتين :

1 – طريقة التخفيف :

تحضر ثلاث أنابيب اختبار معقمة تحتوي مستنبت نباتي رائق تعقم وتترك لتبرد وتصل درجة حرارتها إلى 50 درجة مئوية ونحافظ عليها ثابتة ليبقى المستنبت سائلاً ثم يتم تحضير معلق من الأبواغ المراد عزلها بصورة نقية في ماء مقطر ومعقم ترقم الأنابيب السابقة من 1 – 3 وتحضر ثلاثة أطباق بتري معقمة فارغة وترقم أيضاً من 1 – 3 تتم عملية تلقیح الأنوب الأول بنقل نقطة من المعلق إليه ويرج جيداً ثم ينقل نقطة منه إلى الأنوب الثاني وتتم عملية الرج ويتبعها نقل نقطة من الأنوب الثاني إلى الأنوب الثالث الذي يرج جيداً بعد ذلك تصب الأنابيب الثلاثة كل في طبق البتري الموافق له في الرقم ثم تترك ليتصلب المستنبت ويحضن بعدها على درجة الحرارة المناسبة، بعد التحضين يمكن ملاحظة المستعمرات منفردة في الطبق الثاني أو الثالث ثم تعلم أوضح المستعمرات وتفصل مع قطعة من الأغار التي تحملها وتنقل إلى أنبوب اختبار أو طبق بتري جديد يحوي مستنبت غذائي ثم يحضن فنحصل بعد التحضين على مزرعة فطرية نقية.

2 – طريقة طرف الهيفا :

تستخدم هذه الطريقة عند تعذر استخدام الطريقة الأولى حيث يتم تحديد طرف هيفا فطرية بوساطة العدسة الشبئية الصغرى للمجهر أو المكبرة (البابنيكولار)، ثم يغرس طرف أنبوبة شعرية معقمة في المستنبت الصلب حول الهيفا وينقل إلى وسط غذائي في طبق بتري آخر بالنفخ في الطرف الثاني للأنبوبة الشعرية.

حفظ العينات النباتية المصابة

تحفظ العينات النباتية المريضة في المختبر لاستخدامها كوسائل إيضاح للأعراض الظاهرية التي يبيدها المسبب المرضي على النباتات المصابة وذلك بمقارنة العينات المدروسة مع عينات مماثلة محفوظة في المختبر ويتوقف التشخيص الدقيق للعوامل الممرضة للنبات على أمرين أساسيين:

1- الدراسة المجهرية .

2- مقارنة الأعراض الظاهرية للمسبب المرضي مع عينات مريضة معروفة ومصنفة سابقاً.

ومن الطرائق المستخدمة في حفظ العينات:

1 – طريقة حفظ العينات بالتجفيف:

تتم هذه الطريقة بوضع الأوراق النباتية المصابة بشكل مستو بين أوراق الجرائد أو ورق الترشيح مع الضغط الخفيف عليها بوساطة كتاب مثلاً ويشترط تبديل الأوراق كل يومين على الأقل حتى لا تتعفن العينات النباتية المراد حفظها. وتستمر هذه العملية حتى تمام جفاف الأوراق أو العينات النباتية. بعد ذلك تثبت العينات النباتية على ورق مقوى وتغلف بالنايلون ويسبق ذلك كتابة اسم المرض واسم العامل الممرض وتصنيفه واسم الجامع ومكان الجمع وتاريخه.

2 – طريقة حفظ العينات بالمحاليل:

تستخدم هذه الطريقة لحفظ الثمار المتعفنة والدرنات حيث تحفظ هذه الأجزاء النباتية في محاليل خاصة ضمن أوعية زجاجية محكمة الإغلاق يكتب عليها المعلومات الخاصة بالعينة والمسبب المرضي ويستخدم في عملية الحفظ عادة المحاليل التالية:

أ – محلول يتكون من حمض الخل 2,5 مل + فورم ألدهيد 6,5 مل + ماء مقطر 100 مل.

ب – الكحول الإيثيلي تركيز 70 %.

ج – الفورمالين تركيز 5 %.

د – الفورم ألدهيد مع الكحول الإيثيلي : ويتكون من الفورم ألدهيد 25 مل + كحول إيثيلي 150 مل + ماء 1000 مل.

تجدر الإشارة إلى أنه قد يتعكر سائل الحفظ للعينات لذا يعمل على تبديل السائل بآخر جديد كلما لوحظ ذلك للمحافظة على وضوح العينة بشكل جيد. وبشكل عام عندما نريد فحص جزء نباتي مجفف مجهرياً يفضل نقعه في محلول ماءات البوتاسيوم تركيز 1% الذي يعمل على إعادة انتاج الخلايا مرة ثانية لأن عملية التجفيف للأجزاء النباتية تؤدي إلى تجدها وتشوه بنيات الفطر غالباً، وذلك بسبب فقدها لجزء كبير من الماء. وتجدر الإشارة إلى أنه عند استعمال محلول ماءات البوتاسيوم يجب الحذر من ملامسة هذا المحلول لعدسات المجهر لفعله المخرش.