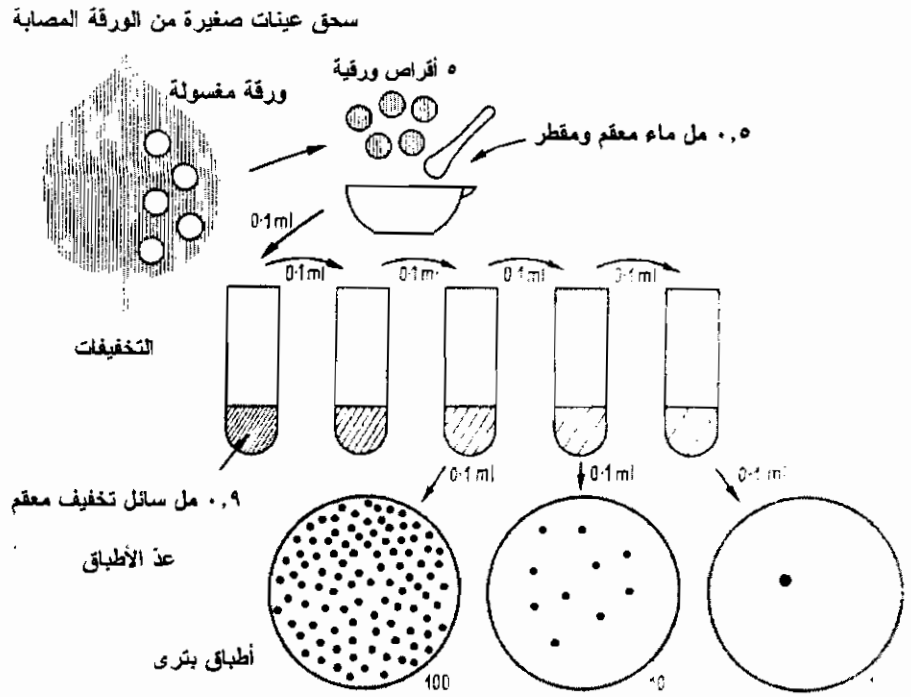

عدد الخلايا البكتيرية/قرص ورقى = عدد المستعمرات × ١٠

= ١ × ١٠^{١٠٠} = ١ × ١٠^{٦}

شكل (٢-٣): طريقة عدّ المستعمرات البكتيرية فى الأطباق لتقدير تركيز المعلقات البكتيرية.

طرق حفظ مزارع مسببات الأمراض

تحتاج دراسات التربية لمقاومة الأمراض إلى الإلمام بوسائل حفظ مزارع الفطريات والبكتيريا لفترات طويلة، لأن ذلك يفيد فى الأمور التالية:

١ - استخدام نفس السلالة فى الدراسات الوراثية فى أى وقت يكون الباحث فى حاجة إليها.

٢ - تجنب تكرار زراعة المسبب المرضى؛ وبذا .. تقل فرص تلوثه، وتغير تركيبه الوراثى بالطفور.

مزارع الفطريات والبكتيريا

من أهم طرق إدامة وحفظ المزارع الفطرية والبكتيرية ما يلى:

١ – النقل الدورى Periodic Transfer:

يُسمح بنمو المزارع الفطرية أو البكتيرية فى بيئة آجار بأنابيب اختبار، ثم تخزن بعد ذلك إما فى الثلاجة على ٥°م – وهو ما يحدث غالبًا – وإما فى درجة حرارة الغرفة بالنسبة ليعض المسببات المرضية.

وتتخذ أثناء فترة التخزين الاحتياطيات التى تمنع جفاف البيئات، أو تلوثها. فتغطى أنابيب البيئات جيدًا بورق الألومنيوم، أو بالورق المشمع، أو بالبارافين. ولكن يجب عدم إحكام الغطاء فى حالات المزارع التى تكون نشطة فى نموها. وتعقم السدادات القطنية جيدًا قبل تغطيتها إما بتعريضها للهب رمع سرعة إطفائها)، وإما ببلها ببضع نقاط من ١٪ كلوريد الزئبقيك فى مخلوط من كحول الإيثايل النقى والجليسرول بنسبة ٩٥:٥. يمنع هذا الإجراء تلوث البيئات بالفطريات، وبالأكاروس الذى يحمل معه عديدًا من الكائنات الدقيقة.

وتختلف الفترة التى تمر قبل تجديد زراعة المزارع، ونقلها إلى بيئات جديدة من مرة كل ٧–١٥ يومًا إلى كل ٦–١٢ شهرًا تبعًا لطبيعة الكائن الدقيق المستخدم. وتتطلب هذه الطريقة جهدًا كبيرًا، ولكنها تكون هى الطريقة المفضلة فى غياب أية معلومات عن مدى صلاحية الطرق الأخرى لتخزين وإدامة الكائنات الدقيقة التى يستعملها الباحث.

إن إعادة زراعة المزارع فى بيئات جديدة بصورة دورية periodic transfer تتطلب جهدًا دقيقًا. فضلاً عن أن كثيرًا من البكتيريا والفطريات تصبح متأقلمة على النمو الرمى saprophytic growth وتفقد قدرتها على إحداث الإصابة أو قدرتها على التجرثم. وقد تسبب التغيرات المورفولوجية التى تظهر عليها مشاكل فى تعريفها. وعلى الرغم من تلك العيوب، فإنها قد تكون الطريقة الوحيدة لحفظ المزارع أحيانًا.

تتوقف المدة قبل تجديد النمو على درجة حرارة التخزين والرطوبة النسبية؛ ذلك لأن الظروف التى تحفز سرعة فقد البيئات لرطوبتها تتطلب تجديد المزارع على فترات أقصر. هذا وتحتفظ المزارع التى توجد فى أوعية غير منفذة للرطوبة والتى تسمح بتبادل الغازات (مثل مزارع الأنابيب الزجاجية المغطاة بالسدادات القطنية) .. تحتفظ

بحيويتها لمدة ٦-٨ شهور فى الثلاجة على حرارة ٥-٨°م قبل أن يحتاج الأمر إلى إعادة تجديدها.

يتطلب حفظ الفطريات بالتجديد الدورى للمزارع، ما يلى:

أ - زراعتها - بالتبادل - على بيئات غنية وأخرى فقيرة فى المحتوى الكربوهيدراتى، يكون رقمها الأيدروجينى عند نقطة التعادل.

ب - استعمال بيئات تسمح بأقل قدر من النمو الميسيليومى مع أكبر قدر من التجرثم.

جـ - تجديد النمو من الجراثيم الفطرية فقط وقصر التجديد من الغزل الفطرى على الفطريات التى لا تتجرثم فقط.

د - إجراء التجديد من أحدث أجزاء المزرعة نموًا.

هـ - فى حالة غلق البيئات بأغطية ذات قلاووظ لا يجب إحكام غلقها.

و - حفظ الفطريات غير الحساسة للبرودة على حرارة ٤-١٠°م بعد اكتمال تغطية النمو الفطرى لسطح البيئة.

٢ - التخزين تحت الزيت:

تخزن بهذه الطريقة المزارع القوية النشطة التى تكون فى بيئات الآجار فى أنابيب الاختبار، حيث تغطى بزيت معدنى معقم مثل زيت البارافين الذى يمنع فقدان الماء من البيئة فلا تجف، ويمنع وصول الأكسجين إلى المزرعة فيحدّ من نشاطها الأيضى. تخزن أنابيب المزارع بعد ذلك عمودية على ٥°م غالبًا.

ويتطلب اتباع هذه الطريقة فى تخزين المزارع مراعاة ما يلى:

أ - أن يكون الزيت المعدنى ذا درجة نقاء عالية تماثل تلك المستخدمة فى الأغراض الطبية، وكثافة تتراوح بين ٠.٨٦ و ٠.٨٩.

ب - يجب تعقيم الزيت فى الأوتوكليف على ١٢١°م لمدة ساعتين، ثم تجفيفه فى الفرن على ١٧٠°م لمدة ساعة إلى ساعتين.

جـ – أن تكون تغطية البيئة بالزيت تامة، حتى لا تشكل الأجزاء غير المغطاة منفذًا لتبخر الماء منها.

هذا .. وتعيش معظم المزارع الفطرية والبكتيرية المحفوظة بهذه الطريقة لفترات أطول بكثير مما فى الطريقة الأولى، حيث لا يتطلب الأمر إعادة زراعتها إلا كل عدة سنوات. وتتراوح المدة بين سنتين وعشر سنوات حسب نوع الفطر.

٣ – التخزين فى الماء:

تخزن بعض الأنواع البكتيرية مثل *Pseudomonas solanacearum* فى الماء المقطر لفترات طويلة جدًّا تصل إلى تسع سنوات. وتتبع هذه الطريقة فى تخزين عديد من الأنواع البكتيرية حيث لا يتطلب الأمر أكثر من نقل جزء يسير من النمو البكتيرى إلى أنابيب الماء المعقم، ثم تخزن الأنابيب فى درجة حرارة الغرفة، أو على ٥°م. كذلك تنجح هذه الطريقة مع بعض الفطريات، حيث يُنْقَل إلى أنابيب الماء جزء متجرثم من المزرعة الفطرية. وتستعمل تلك الأنابيب فى عمل مزارع جديدة وتجديد النمو منها فى الوقت المناسب.

٤ – التخزين فى التربة أو الرمل:

تخزن المزارع الفطرية فى التربة، أو الرمل، أو الفيرميكيوليت المعقم بإضافة نحو ملليتر واحد من معلق لجراثيم الفطر الكونيدية إلى ٥ جم من الوسط المستخدم فى التخزين (التربة أو الرمل ... إلخ) فى أنبوبة اختبار، مع مراعاة تعقيم الوسط – وهو فى أنبوبة الاختبار – قبل إضافة المعلق الفطرى إليه. يلى ذلك التجفيف على درجة حرارة الغرفة، ثم التخزين فى الثلاجة. تفيد هذه الطريقة فى تخزين الفطريات التى تفقد ضراوتها عند تكرار زراعتها فى بيئات مغذية، مثل فطر الفيوزاريم *Fusarium*، لأنها لا تحفز حدوث أية تغيرات وراثية، ويمكن بواسطتها تخزين المزارع الفطرية بنجاح لمدة ٢–٦ سنوات.

٥ – التجفيف:

يفيد التجفيف السريع فى حفظ مزارع عديد من الفطريات لفترات طويلة يمكن أن تزيد على ١٥ عامًا. ويشترط لنجاح التخزين بهذه الطريقة ما يلى:

أ – أن يكون التجفيف سريعًا كأن يكون تحت تفريغ، أو فوق إحدى المواد المجففة.
ب – أن تحفظ المزرعة وهى مخلوطة مع مواد حامية لها مثل الحليب أو سيرم الدم.
جـ – التخزين فى الثلاجة بعد اكتمال التجفيف.

ويستخدم – لهذا الغرض – قطرة من المعلق الفطرى، تخلط مع قطرة من السيرم فى أنبوبة اختبار صغيرة توضع فى أنبوبة أكبر هى التى توضع بها المادة المجففة، مع إحكام إغلاق الأنبوبة الكبيرة.

٦ – التخزين فى السيليكا جل:

تستخدم السيليكا جل فى حفظ المزارع لفترات طويلة حينما لا يتيسر التجفيد أو النيتروجين السائل. وتكون المزراع الفطرية المتجرثمة المحفوظة فى السيليكا جل والتى تتم حمايتها باستعمال اللبن المنزوع الدسم .. تكون قادرة على الاحتفاظ بحيويتها لمدة ٤–٥ سنوات.

٧ – التجفيف مع التجميد freeze-drying أو التجفيد lyophilization:

يفيد التجفيد فى حفظ مزارع معظم الأنواع البكتيرية والخمائر، وكثير من الأنواع الفطرية.

إن الأساس ف عملية التجفيد هو خفض المحتوى المائى للجراثيم إلى ٢٪–٣٪ بالتجفيف تحت تفريغ، مع التخزين فى غياب الأكسجين وبخار الماء. يجرى التجفيف فى الحالة المتجمدة، ويعد التجميد قبل التجفيف ضروريًا لمنع تراكم تركيزات عالية ضارة من المواد الصلبة الذائبة فى البيئة الحاملة للمزرعة أو فى الخلايا ذاتها.

ويجرى التجفيد بوضع كمية صغيرة من المعلق الخلوى للمزرعة الفطرية أو البكتيرية فى أنبوبة زجاجية خاصة وتجميدها بسرعة. ويلى ذلك تجفيف العينة بتعريضها لتفريغ شديد حيث يتسامى الماء المجمد ويتبخر فى الحال، ثم تغلق الأنبوبة بإحكام وهى لاتزال تحت التفريغ الشديد. وتخزن الأنابيب بعد ذلك فى الثلاجة على ٣–٥ °م.

هذا .. ويتم التبريد الأولى السريع بوضع الأنابيب فى الأسيتون أو الإيثانول مع الثلج

الجاف، وتعلق المزارع فى محول ٢٠٪ جلوكوزًا أو سكروزًا. وقد يحتاج الأمر إلى عملية التبريد الأولى، لأن التفريغ الشديد يحدث هذا التأثير.

٨ – التبريد الفائق:

تحفظ مزارع الفطريات المسببة للأمراض فى الحرارة الشديدة الانخفاض cryopreservation إما فى النيتروجين السائل على –١٩٦°م، وإما فى الحالة البخارية للنيتروجين السائل على –١٥٠°م. وتتحسن قدرة معظم الفطريات على تحمل التخزين الفائق البرودة باستعمال المواد الحامية لذلك cryprotectants، مثل الجليسرول glycerol، والـ dimethyl sulfoxide. وبالتحكم فى سرعة التجميد والتفكك.

ونظرًا لأن النيتروجين السائل الذى تحتاجه عملية التبريد – والذى يلزم تجديده باستمرار – قد لا يكون متوفرًا فى كل المختبرات، ونظرًا – كذلك – لتوفر المجمدات التى يمكنها التجميد على –٩٥°م، فقد اتجه الباحثون إلى تخزين مزارع الفطريات فى تلك المجمدات. حيث تتميز بانخفاض تكلفتها مقارنة بتكلفة النيتروجين السائل، وبكونها أكثر تيسرًا من كل من النيتروجين السائل وأجهزة التجفيد.

ولقد أمكن بهذه الطريقة – سواء باستعمال المواد الحامية أو بدون استعمالها – تخزين عديد من المزارع الفطرية لفترات طويلة دون أن تتأثر خصائصها (Legard & Chandler ٢٠٠٠).

ونظريًا .. فإن أى مزرعة فطرية أو بكتيرية تتحمل عمليات التبريد والتجميد والتفكك يمكن أن تحتفظ بحيوتها فى النيتروجين السائل (على –١٩٦°م) إلى ما لا نهاية، ذلك لأن النشاط الحيوى يتوقف كلية – تقريبًا – عند تلك الدرجة (عن Dhingra & Sinclair ١٩٨٥).

تخزين الفيروسات

يلزم دائمًا الاحتفاظ بعينات من عزلات الفيروسات التى يستعملها المربى فى دراساته. ويتحقق ذلك بإحدى الوسائل التالية:

١ – العدوى الدائمة على فترات بالفيروسات – التى يُرغب فى إدامتها – لنباتات من عوائل مناسبة يحتفظ بها فى صوبة زجاجية. إلاّ أن هذه الطريقة تتطلب مساحة دائمة فى الصوبة وتكرار العدوى لنباتات جديدة بصورة دائمة. فضلاً عما قد تتعرض له النباتات المستعملة من تلوث بفيروسات أخرى. كذلك فإن تكرار العدوى بعزلة فيروسية معينة من نبات لآخر قد يؤدى إلى فقدها لخصائصها المميزة.

٢ – تجفيف أوراق مصابة جهازيًّا بالفيرس هوائيًّا وحفظها فى أكياس ورقية مناسبة، وهى طريقة تناسب الـ tobamoviruses.

يتم تجفيف الأوراق النباتية المصابة بالفيرس – بسرعة – وتخزن فوق كلوريد الكالسيوم على صفر–٤°م. يستخدم لذلك كلوريد كالسيوم محبب بقطر ٥–١٥ مم. يوضع فى قاع وعاء زجاجى. ثم يغطى بطبقة رقيقة من القطن أو المناشف الورقية (كلينكس)، ويوضع عليها من ٥–١٠ جم من عينة الأوراق المصابة بالفيرس بعد تجزيئها إلى قطع صغيرة باستخدام شفرة حلاقة نظيفة. ويلى ذلك إحكام إغلاق الوعاء الزجاجى بالبرافين. ولأجل تجفيف عينة الأوراق المصابة تمامًا .. يلزم فتح الوعاء الزجاجى عدة مرات، واستبدال بللورات كلوريد الكالسيوم الموجودة به بأخرى جديدة.

٣ – تقطيع أوراق كاملة مصابة إلى أجزاء صغيرة (وهى خضراء)، وتخزينها فى أكياس من البوليثيلين محكمة الغلق، أو فى زجاجات مقفلة على –٢٠°م. يمكن حفظ كثير من الفيروسات لعدة شهور بهذه الطريقة. لكن لا يجب تكرار تفكيك العينات المحفوظة ثم إعادة تجميدها؛ ولذا .. يتعين أن يكون الحفظ فى صورة عينات صغيرة تكفى للاستعمال فى كل مرة نحتاج فيها إلى الفيرس.

٤ – استخلاص العصير الخلوى لأوراق مصابة. ثم تعريضه للطرد المركزى أو تنقيته جزئيًّا للتخلص من الشوائب. ثم حفظه على –٢٠°م، أو على صفر إلى –١°م بالنسبة للفيروسات الأقل قدرة على الثبات. وبينما يحتوى العصير الخلوى غير المنقى على مثبطات تقلل من قدرة الفيرس على إحداث الإصابة، فإن العصير الخلوى المنقى جزئيًّا

لا يحتمل التخزين لفترة طويلة. وكما فى حالة الأوراق المحفوظة بالتجميد، فإنه يتعين تجنب تكرار التجميد والتفكيك.

٥ - يناسب الفيروسات غير الثابتة حفظها بطريقة التجفيد lyophilization (عن Hill ١٩٨٤).

إقامة الدليل على التطفل

يلزم لإقامة الدليل على أن كائنًا مرضيًّا معينًا هو المسئول عن الإصابة بمرض ما أن ينطبق على هذه الحالة أربعة شروط أو مبادئ تعرف باسم شروط أو مسلمات كوخ Koch's Postulates، وهى كما يلى:

١ - ارتباط جملة أعراض المرض دائمًا بوجود الكائن المرض.

٢ - ضرورة عزل الكائن الدقيق المرض، وزراعته مستقلاً عن النبات، وتعريف خصائصه.

٣ - ظهور نفس أعراض المرض عند عدوى نباتات سليمة بهذا الكائن الدقيق.

٤ - عزل الكائن الدقيق مرة أخرى من النبات المعدى، وإثبات أنه مطابق للكائن الذى استخدم فى العدوى.

وتستثنى القاعدة الثانية (الخاصة بضرورة عزل وزراعة الكائن الدقيق) - بالنسبة للمسببات المرضية الإجبارية التطفل - من شرط إقامة الدليل على التطفل. حيث يكتفى إما بدراسة الكائن الدقيق ميكروسكوبيًّا واستخدام جراثيمه - التى تجمع من النباتات المصابة - فى العدوى مباشرة، كما فى فطريات البياض الزغبى والبياض الدقيقى، وإما بتنقيته كما فى حالة الفيروسات، وإما بعزلة واستخدامه فى العدوى دونما حاجة إلى زراعته كما فى حالة النيماتودا.

ولتحقيق الجزء الأخير من الشرط الثانى من قواعد كوخ، وهو الخاص بدراسة خصائص المسبب المرضى بعد عزله بعيدًا عن النبات .. يلزم أن يكون المربى على دراية ببعض الاختبارات التى تجرى فى هذا الشأن، والتى يمكن الرجوع إليها فى المراجع المتخصصة مثل: