

تأثير بعض العوامل البيئية في نمو وتجرثم الفطر *Trichophyton* في الظروف المختبرية

جواد كاظم عبود الجنابي

مهند جواد كاظم الجبوري

كلية العلوم - جامعة بابل

الخلاصة

أجريت دراسة مختبرية لبيان تأثير بعض العوامل البيئية مثل نوع الوسط الغذائي ودرجة الحرارة والرقم الهيدروجيني ومدة الحضانة في نمو وتجرثم ثلاثة أنواع من الفطريات الجلدية التابعة لجنس *Trichophyton* وهي *T. rubrum* و *T. mentagrophytes* و *T. verrucosum*. أظهرت نتائج الدراسة أن أفضل وسط غذائي لنمو الأنواع الفطرية المعزولة هو PDA مقارنة مع وسطي OMA و RTA في حين كان أفضل وسط للتجرثم هو OMA مقارنة بوسطي PDA و RTA. أما تأثير درجات الحرارة فقد وصلت معدلات أقطار مستعمرات الأنواع الفطرية إلى ذروتها عند درجة حرارة ٣٠ م° على وسط PDA ولمدة ١٤ يوم مقارنةً بالدرجات الحرارية ٣٥ و ٢٥ و ٢٠ م° بينما أظهرت درجة الحرارة ٢٠ م° تأثيراً واضحاً في خفض معدلات أقطار مستعمرات الفطريات مقارنة بدرجاتي الحرارة ٢٥ و ٣٥ م°. وبالنسبة لتأثير الرقم الهيدروجيني فقد بينت النتائج إن أفضل رقم هيدروجيني للنمو هو ٦ على وسط PDA عند درجة حرارة ٣٠ م° ولمدة ١٤ يوم يليه الرقم الهيدروجيني ٧ و ٥ وفي المقابل انخفضت معدلات أقطار مستعمرات الأنواع الفطرية المعزولة بصورة كبيرة عند الرقم الهيدروجيني ٨. أوضحت نتائج تأثير مدد الحضانة على وسط PDA برقم هيدروجيني ٦ ودرجة حرارة ٣٠ م° زيادة معدلات أقطار مستعمرات الأنواع الفطرية بزيادة مدة الحضانة، إذ بلغ أقصى معدل لأقطار مستعمرات الأنواع الفطرية المعزولة في اليوم ١٤ من الحضانة.

Abstract

Laboratory experiments were achieved to explore the effect of some environmental factors such as medium composition, temperature, pH and incubation period on the growth of three species of *Trichophyton*, (*T. rubrum*, *T. mentagrophytes* and *T. verrucosum*). The results showed that PDA was the best medium gave support to the fungal growth compared with OMA and RTA, while the sporulation of isolated species in OMA was better than in RTA and PDA. Optimum temperature for growth was ٣٠ °C on PDA for ١٤ days, while the temperature ٢٠ °C showed great reduction in the growth compared with the other temperature. The optimum pH for growth was ٦ on PAD at ٣٠ °C for ١٤ days followed by pH_v and pH_s, but the growth was greatly reduced at pH_a compared with the other pH levels. The effect of incubation period on PDA at pH_v and ٣٠ °C showed substantially increased in growth along the incubation time, where, the optimum growth for isolated species was at the end of incubation (١٤ days).

المقدمة Introduction

الفطريات الجلدية هي فطريات خيطية لها القدرة على مهاجمة الأنسجة الكيراتينية للإنسان والحيوانات كالشعر والجلد والأظافر وتنتج الحالة المرضية التي تسمى بالـ Dermatophytosis. تضم هذه الكائنات ثلاثة أجناس هي *Trichophyton* و *Epidermophyton* و *Microsporum* (Larone, ١٩٩٦; Weitzman & Summerbell, ١٩٩٥). تتكيف هذه الفطريات للعيش على الطبقة المتقرنة Stratum Corneum أو التراكيب الكيراتينية، وهناك عدد من العوامل المهمة لتحديد طريقة الانتقال الناجح للفطر واختراقه للطبقة المتقرنة منها حيوية وأمراضية الفطر ونوع النسيج المعرض للإصابة ووراثية المضيف وتركيب الزهم Sebum ووفرة ثنائي اوكسيد الكربون CO₂ على سطح الجلد (Hay, ١٩٨٦). والفطريات الجلدية التي تصيب

الانسان والتي تنتشر بواسطة الاتصال المباشر تعرف *Anthropophilic fungi* والتي تصيب الانسان ومصدرها الحيوان تعرف *Zoophilic fungi* أما التي تصيب الانسان ومصدرها التربة تعرف *Geophilic fungi*. يختلف معدل النمو الأمثل للفطريات الجلدية الخيطية باختلاف الأوساط الغذائية (Meletiadiis *et al.*, ٢٠٠١)، كما إن مكونات الأوساط الزرعية التي تنمو عليها الفطريات تؤثر بصورة مباشرة في نمو تلك الأحياء المجهرية فسرعة النمو تتناسب طردياً مع تراكيز المواد المغذية للأحياء المجهرية الموجودة في تلك الأوساط (السعد، ١٩٩٠). وبعد الكربون والنيتروجين من أهم مكونات الأوساط الزرعية الضرورية لنمو الأحياء المجهرية وممن ضمنها الفطريات باختلاف أنواعها (Meletiadiis *et al.*, ٢٠٠١; Cuenca-Estrella *et al.*, ٢٠٠١). يؤثر نقص المصادر الغذائية على معدل نمو الفطريات وقد يتغير شكلها إذ تتحول الفطريات ثنائية الشكل *Dimorphism* من شكل الخميرة *Yeast form* إلى الشكل الخيطي *Filamentous form* في الحالات التي تعاني فيها الفطريات من النقص أو التجويع في مصادر الكربون (Palecek *et al.*, ٢٠٠٢). تنمو الفطريات المحبة للكبريتات بصورة جيدة عند وجود السكريات مثل الكلوكوز كمصدر للكربون مع البروتينات بالإضافة إلى أنها تستغل البروتينات مصدراً للكربون والنيتروجين معا (Kunert, ٢٠٠٠).

تقسم الأحياء المجهرية إلى ثلاثة مجاميع بالنسبة لمتطلبها الحراري هي الأحياء المحبة للحرارة العالية *Thermophilic* والتي تنمو بصورة جيدة في درجة حرارة أعلى من ٤٠ م°، والأحياء المحبة للحرارة المتوسطة *Mesophilic* وهذه تنمو بشكل أفضل بين درجتى الحرارة ٢٥-٤٠ م° وأخيراً الأحياء المحبة للبرودة *Psychrophilic* فإنها تنمو في درجة حرارة أقل من ٢٥ م° (السعد، ١٩٩٠). تنمو الفطريات المحبة لدرجات الحرارة المتوسطة بصورة جيدة بين درجتى ٣٢-٣٠ م° (Bull & Bushnell, ١٩٧٦). تعد الفطريات الجلدية من الأحياء المجهرية متوسطة التحمل الحراري *Moderately thermophilic* ومعظمها تنمو جيداً بدرجة حرارة ٣٧ م° خارج الجسم الحي، وإن درجة الحرارة المثلى لنمو الفطريات الجلدية تتراوح بين ٢٥-٣٥ م° ولا تتمكن من النمو بدرجة حرارة ٤٠ م° وهناك أنواع أخرى من الفطريات الجلدية لا تستطيع النمو بدرجة ٣٧ م° (Weitzman and Summerbell, ١٩٩٥). يتأثر نمو الفطريات والعديد من فعاليتها الحيوية الأخرى بالرقم الهيدروجيني للوسط الزرعى، إذ انه يؤثر في الحالة الأيونية لمكونات الوسط الزرعى وجاهزية الأحماض الامينية والمغذيات الأخرى في الوسط وإمكانية استغلالها من قبل الفطريات (Danew & Klossek, ١٩٨٩). كما وجد إن الرقم الهيدروجيني يؤثر في عملية التعبير الجيني لبعض الجينات المسؤولة عن تغير الشكل في خميرة *Candida spp.* (Ramon *et al.*, ١٩٩٩). أشار Kunert (١٩٨٨) إلى أن نمو الفطريات الجلدية في وسط غني بالسكريات يؤدي إلى جعل الوسط حامضياً مما يؤدي إلى تثبيط نموها لذلك تضاف بعض محاليل الدوايرى للأوساط الزرعية للمحافظة على الرقم الهيدروجيني للوسط ضمن المدى الأمثل للنمو.

تؤثر مدة الحضانة في نمو الفطريات الجلدية وإنتاج الكونيدات، فقد ذكر Jessup وجماعته (٢٠٠٠) أن النوع *T. rubrum* ينتج عدداً كبيراً من الكونيدات في وسط *Heinz oatmeal cereal agar* بعد مدة حضانة ٤ أيام إلا انه لا ينتج إلا عدداً قليلاً من الكونيدات في وسط *Potato dextrose agar* ووسط *Mycoseal agar* بعد مدة حضانة ٧ أيام. تتباين مدة الحضانة اللازمة لنمو الفطريات باختلاف أنواعها، إذ تحضن الفطريات الجلدية مدة لا تقل عن

١٥ يوماً عند عزلها، وتتلف الأوساط الزرعية التي لا يظهر فيها نمو بعد مدة أربعة أسابيع (Kwon- Chung & Bennett, ١٩٩٢).

ونظراً لأهمية جنس *Trichophyton* في مجال الإصابات الجلدية ولقلة الدراسات حول هذا الجنس في القطر خاصة في ما يتعلق بالظروف البيئية الملائمة لنموه وقدرته على إنتاج الأبواغ الكونيدية فقد تم إجراء هذه الدراسة.

المواد وطرق العمل

١- جمع العينات السريرية وعزل الفطريات:

تم جلب العينات من وحدة الأمراض الجلدية في مستشفى مرجان التعليمي في الحلة، إذ تم عزل فطر *T. rubrum* من شخص مصاب بسعفة الفخذ *Tinea cruris* وفطر *T. mentagrophytes* من طفلة مصابة بالسعفة الرأسية *Tinea capitis* بينما تم عزل فطر *T. verrucosum* من شخص مصاب بالسعفة الحلقية *Tinea corporis* في الذراع.

بعد الفحص المجهرى المباشر للعينات تم زرع العينات على وسط سابرويد دكستروز أكار مع كلورامفينيكول ٠.٠٥ غم لمنع نمو البكتيريا وكذلك تم إضافة هيدروكسيد الامونيوم تركيز ٣٠ % إلى الوسط الزرعى بدلا من السايكلوهكسامايد لمنع نمو الفطريات الملوثة إذ تم إضافة قطرة واحدة من هيدروكسيد الامونيوم تركيز ٣٠ % إلى حافة الأطباق الزرعية م حُركت حركة رجوية أو دائرية وتركت لمدة ٢٠ دقيقة قبل زراعتها، حضنت الأطباق بدرجة حرارة 30 ± 2 م لمدة ٧-١٤ يوماً (Larone et al., ١٩٩٩).

٢- تأثير بعض العوامل البيئية في نمو الأنواع الفطرية المعزولة *T. rubrum* و *T. mentagrophytes* و *T. verrucosum*
(A) الوسط الغذائي:

١- تحديد الوسط الملائم لنمو الأنواع الفطرية:

تم حساب نمو الأنواع الفطرية المعزولة *T. rubrum* و *T. mentagrophytes* و *T. verrucosum* على ثلاثة أوساط زرعية هي (PDA) Potato Dextrose Agar و (OMA) Oatmeal Cereal Agar و (RTA) Rice Tween Agar. وذلك بأخذ قرص بقطر ١٠ ملم من حافة المستعمرة الفطرية بعمر ٧-١٠ أيام ووضع في مركز الطبق الذي يحوي الوسط الغذائي، كررت العملية بالنسبة للأنواع الفطرية الثلاث ولجميع الأوساط الزرعية المستخدمة. حضنت الأطباق لمدة ١٤ يوماً وبدرجة 30 ± 2 م. حُسب النمو بقياس قطرين متعامدين من ظهر المستعمرة الفطرية يمران بمركز القرص كل ٤٨ ساعة وسُجّل معدل أقطار المستعمرات لثلاثة مكررات (Aubaid, ١٩٩٧).

٢- تحديد الوسط الملائم لتجرثم الأنواع الفطرية:

تم تنمية الأنواع الفطرية المعزولة *T. rubrum* و *T. mentagrophytes* و *T. verrucosum* على ثلاثة أوساط غذائية هي PDA و OMA و RTA بدرجة 30 ± 2 م ولمدة ٧ أيام وبقاع ثلاثة مكررات لكل فطر ولكل وسط. وفي نهاية مدة الحضانة تم حساب أعداد الأبواغ الكونيدية، إذ تم إضافة ٥ مل من محلول الملح الفسيولوجي لكل طبق وقشطن الأبواغ باستخدام الناقل الجرثومي ثم سحب بواسطة ماصة معقمة ووضع في أنبوبة معقمة وتم إضافة قطرتين من سائل الصابون liquid soap. حُسبت أعداد الأبواغ الكونيدية لكل نوع في خمسة حقول بواسطة

Haemocytometer بأنتباع طريقة Jessup وجماعته (٢٠٠٠). سُجل معدل إنتاج الابواغ الكونيدية لثلاثة مكررات بالنسبة للأأنواع الفطرية الثلاثة وعلى الأوساط الغذائية الثلاثة.

(B) درجة الحرارة:

تم حساب تأثير درجة الحرارة على نمو الأأنواع الفطرية المعزولة *T. rubrum* و *T. mentagrophytes* و *T. verrucosum* على مدى يتراوح بين ٢٠-٤٠ م° وعلى درجات حرارية هي ٢٠ و ٢٥ و ٣٠ و ٣٥ وذلك بأخذ قرص قطره ١٠ ملم من حافة مستعمرة فطرية حديثة بعمر ٧-١٠ أيام ووضع في مركز الطبق الذي يحتوي على PDA ولمدة ١٤ يوماً. تم حساب معدل أقطار مستعمرات الأأنواع الفطرية الثلاث بنفس الطريقة المتبعة في الفقرة (١) وبواقع ثلاثة مكررات لكل نوع فطري ولكل درجة حرارية. وقد تم استبعاد نتائج تأثير درجة الحرارة ٤٠ م° وذلك لعدم ظهور أي نمو للأأنواع الفطرية المعزولة عند هذه الدرجة الحرارية.

(C) الرقم الهيدروجيني:

تم حساب نمو الأأنواع الفطرية المعزولة *T. rubrum* و *T. mentagrophytes* و *T. verrucosum* في أرقام هيدروجينية مختلفة هي ٥ و ٦ و ٧ و ٨ و ٩ وذلك بأخذ قرص بقطر ١٠ ملم من حافة المستعمرات الفطرية بعمر ٧-١٠ أيام ووضع في مركز طبق بتري حاو على PDA ولمدة ١٤ يوماً وبدرجة ٣٠ م° وبواقع ثلاثة مكررات لكل نوع من الفطريات الثلاث ولمستويات الحموضة الخمسة. حُسب معدل أقطار مستعمرات الأأنواع الفطرية بالطريقة السابقة نفسها. وأيضاً تم استبعاد الرقم الهيدروجيني ٩ وذلك لحدوث تثبيط كامل لنمو الأأنواع الفطرية المعزولة عند هذا الرقم الهيدروجيني.

(D) مدة الحضان:

تم حساب نمو الأأنواع الفطرية المعزولة *T. rubrum* و *T. mentagrophytes* و *T. verrucosum* بعد مدة حضان هي ٤-١٤ يوم وذلك بنقل قرص بقطر ١٠ ملم من حافة المستعمرات الفطرية بعمر ٧-١٠ أيام إلى مركز الطبق الحاوي على PDA برقم هيدروجيني ٦، وحضنت الأطباق للأأنواع الفطرية المعزولة بدرجة حرارة ٣٠ م°. حُسب معدل أقطار مستعمرات الأأنواع الفطرية لثلاثة مكررات بالطريقة السابقة نفسها.

التحليل الإحصائي

حُللت نتائج التجارب بواسطة اختبار تحليل التباين ANOVA والاستعانة بجداول النسب المثلثية عند مستوى احتمالية (٠.٠١) وتم استخدام اختبار اقل فرق معنوي (L.S.D) Least Significant Difference لبيان معنوية النتائج. (الراوي وخلف الله، ٢٠٠٠).

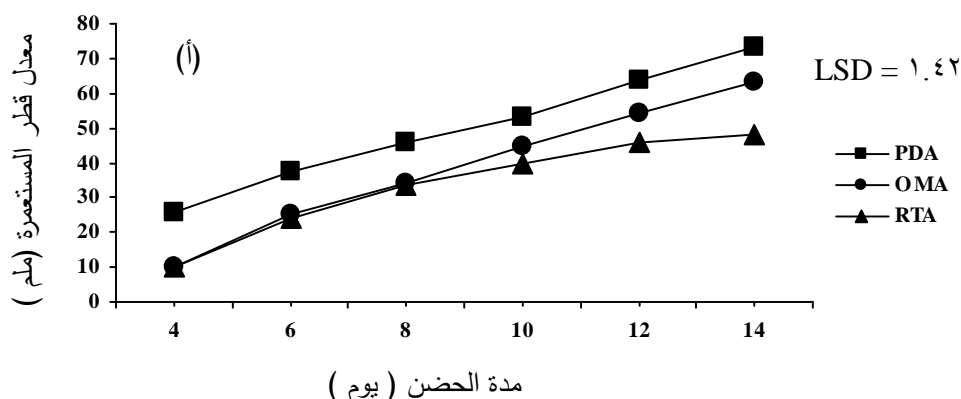
النتائج

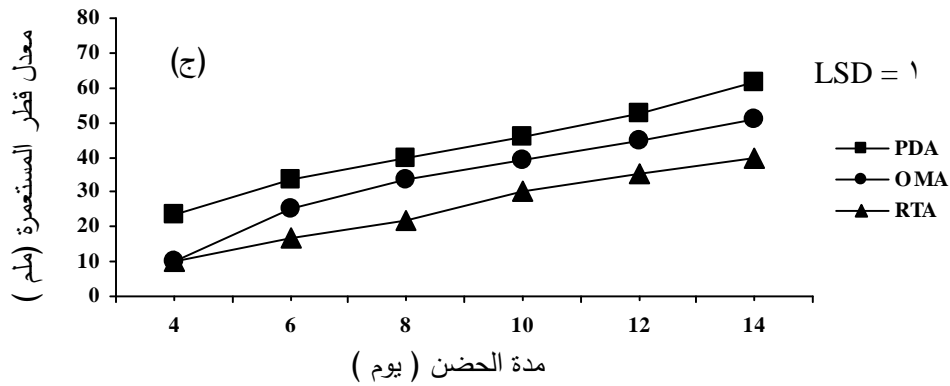
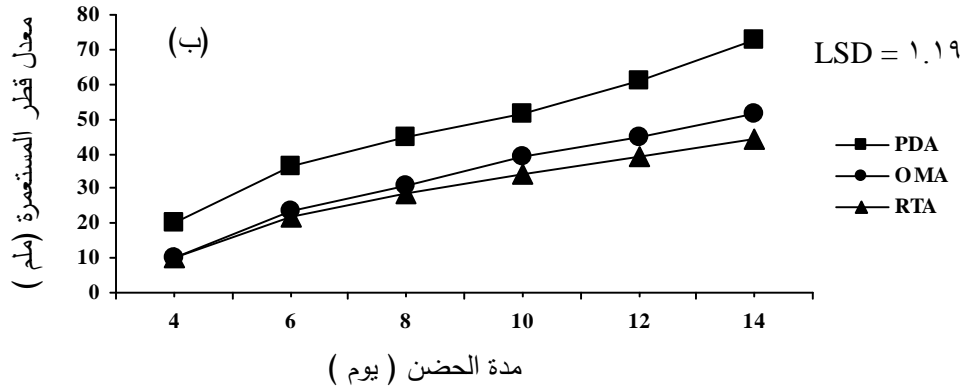
تأثير بعض العوامل البيئية في نمو أنواع جنس *Trichophyton*

١- الوسط الغذائي

(A) الوسط الغذائي الملائم لنمو الأنواع الفطرية المعزولة

أظهرت نتائج التجربة (الشكل ١-أ-ب-ج) حصول زيادة معنوية (>0.01) في معدلات أقطار المستعمرات للأنواع الفطرية المعزولة *T. rubrum* و *T. mentagrophytes* و *T. verrucosum* بزيادة مدة الحضانة وللأوساط الغذائية الثلاثة PDA و OMA و RTA عند درجة حرارة 23 ± 2 م° إلا أن معدلات أقطار مستعمرات الأنواع الفطرية المعزولة على الوسط الغذائي PDA قد تفوقت معنوياً (>0.01) على مثيلاتها بالنسبة للوسطين OMA و RTA طيلة مدة الحضانة إذ بلغت 73.3 و 72.0 و 61.6 ملم على وسط PDA و 63.3 و 51.6 و 50.8 ملم على وسط OMA و 48.3 و 44 و 40 ملم في نهاية مدة الحضانة بالنسبة للأنواع الفطرية المعزولة *T. rubrum* و *T. mentagrophytes* و *T. verrucosum* على التوالي. كما بينت نتائج التجربة أن الفروقات في معدلات أقطار المستعمرات للأنواع الفطرية المعزولة بين وسطي OMA و RTA لم تكن معنوية (>0.01) إلا بعد اليوم الرابع من الحضانة إذ تفوقت معنوياً (>0.01) معدلات أقطار المستعمرات على وسط OMA مقارنة بمثيلاتها وسط RTA واستمرت إلى نهاية مدة الحضانة.





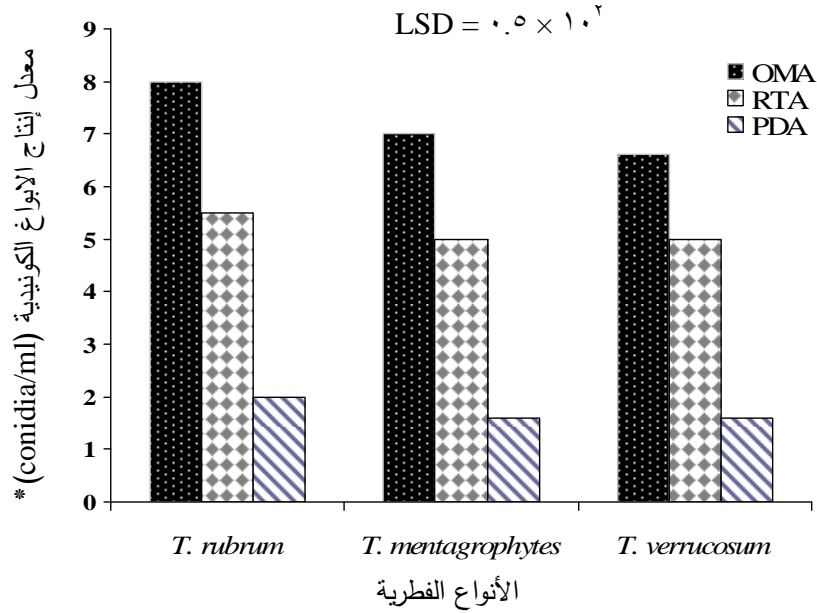
الشكل (١) تأثير نوع الوسط الغذائي في معدلات أقطار مستعمرات الأنواع الفطرية المعزولة على درجة حرارة ٣٠ ± ٢ م ولمدة حضانة ١٤ يوماً.

T. verrucosum (ج) ، *T. mentagrophytes* (ب) ، *T. rubrum* (أ)

(B) الوسط الغذائي الملائم لتجرثم الأنواع الفطرية المعزولة

بينت نتائج هذه التجربة (الشكل ٢) وجود فروقات معنوية (>٠.٠١) في معدل إنتاج الابواغ الكونيدية للأنواع الفطرية المعزولة *T. rubrum* و *T. mentagrophytes* و *T. verrucosum* النامية على ثلاثة أوساط غذائية هي PDA و OMA و RTA و لمدة حضانة ٧ أيام بدرجة حرارة ٣٠ م إذ لوحظ أن معدل إنتاج الابواغ الكونيدية على وسط OMA قد تفوق معنوياً (>٠.٠١) مقارنة بمثيلاتها على الوسط PDA و RTA، إذ بلغ معدل إنتاج الابواغ الكونيدية 8×10^2 و 7×10^2 و 6.6×10^2 (conidia/ml) على وسط OMA للأنواع الفطرية المعزولة *T. rubrum* و *T. mentagrophytes* و *T. verrucosum* على التوالي في حين كان معدل إنتاج الابواغ الكونيدية 5.5×10^2 و 5×10^2 و 5×10^2 (conidia/ml) على وسط RTA و 1.6×10^2 و 1.6×10^2 و 1.6×10^2 (conidia/ml) على وسط PDA بالنسبة للأنواع الفطرية المعزولة *T. rubrum* و *T. mentagrophytes* و *T. verrucosum* على التوالي. كذلك أظهرت النتائج تفوقاً معنوياً (>٠.٠١) في معدل إنتاج الابواغ الكونيدية للفطر *T. rubrum* مقارنة بالفطر *T. mentagrophytes* و *T. verrucosum*.

T. verrucosum على وسطي OMA و RTA ولم تظهر فروقات معنوية (>0.01) في معدل إنتاج الابواغ الكونيدية على وسط PDA بين الأنواع الفطرية المعزولة.

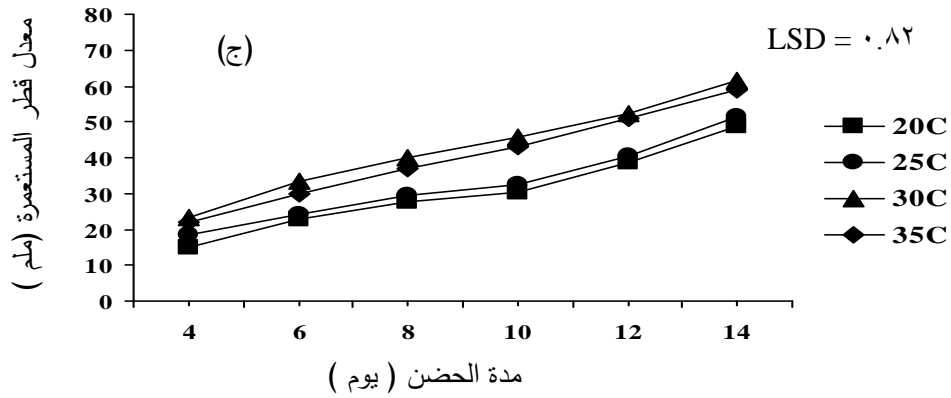
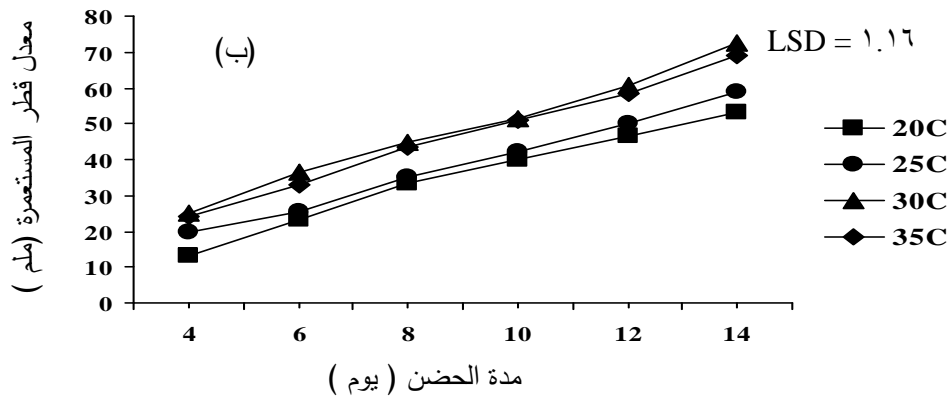
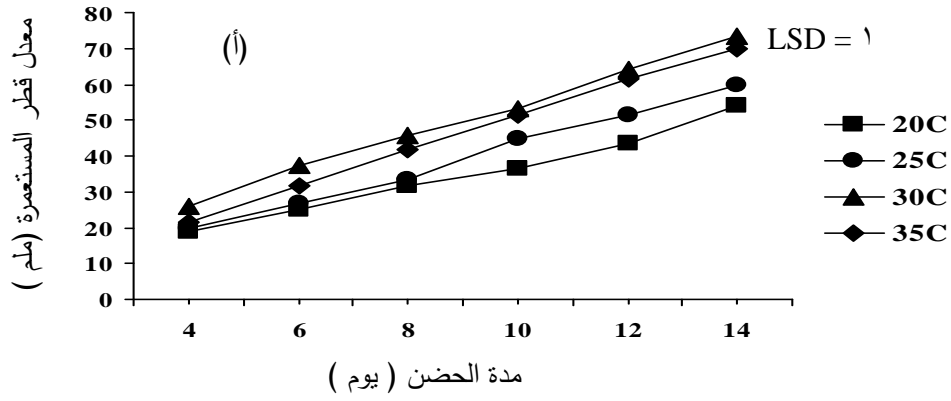


* معدل إنتاج الابواغ الكونيدية مضروب $\times 10^2$

الشكل (٢) تأثير نوع الوسط الغذائي في معدل إنتاج الابواغ الكونيدية للأنواع الفطرية المعزولة بعد مدة حضن ٧ أيام ودرجة حرارة ٣٠ م.

٢- تأثير درجات الحرارة في معدلات أقطار مستعمرات الأنواع الفطرية المعزولة

أوضحت نتائج هذه التجربة (الشكل ٣-أ-ب-ج) حصول زيادة معنوية (>0.01) في معدلات أقطار المستعمرات للأنواع الفطرية المعزولة *T. rubrum* و *T. mentagrophytes* و *T. verrucosum* النامية على وسط PDA طيلة ١٤ يوماً من الحضن و لجميع المستويات الحرارية ٢٠ و ٢٥ و ٣٠ و ٣٥ م إلا أن معدلات أقطار المستعمرات الفطرية عند درجة ٣٠ م قد تفوقت معنوياً (>0.01) عن مثيلاتها عند درجة ٢٠ و ٢٥ و ٣٥ م طيلة مدة الحضن إذ بلغت معدلات أقطار المستعمرات في نهاية مدة الحضن ٧٣.٣ و ٧٢.٥ و ٦١.٦ ملم عند درجة ٣٠ م لكل من *T. rubrum* و *T. mentagrophytes* و *T. verrucosum* على التوالي في حين كانت معدلات أقطار المستعمرات ٧٠ و ٦٩ و ٥٩ ملم عند درجة ٣٥ م ، ٦٠ و ٥٩ و ٥١.٦ ملم عند درجة ٢٥ م ، ٥٤ و ٥٣.٣ و ٤٩ ملم عند درجة ٢٠ م في نهاية مدة الحضن وللأنواع الفطرية المعزولة *T. rubrum* و *T. mentagrophytes* و *T. verrucosum* على التوالي. أظهرت النتائج انخفاضاً معنوياً (>0.01) في معدلات أقطار مستعمرات الأنواع الفطرية المعزولة عند درجة ٢٠ م عن مثيلاتها عند درجتني ٢٥ و ٣٥ م طيلة مدة الحضن بينما تفوقت معنوياً (>0.01) معدلات أقطار مستعمرات الأنواع الفطرية المعزولة عند درجة ٣٠ م مقارنة بمثيلاتها عند درجة ٢٥ م وطيلة مدة الحضن.



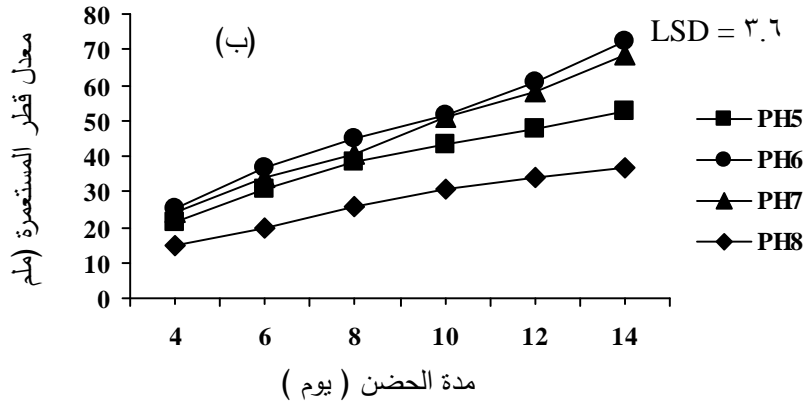
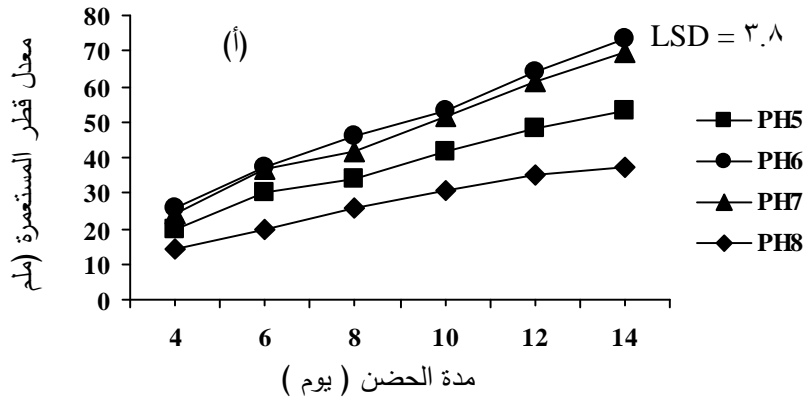
الشكل (٣) تأثير درجات الحرارة في معدلات أقطار مستعمرات الأنواع الفطرية المعزولة النامية على وسط PDA ولمدة حضانة ١٤ يوماً.

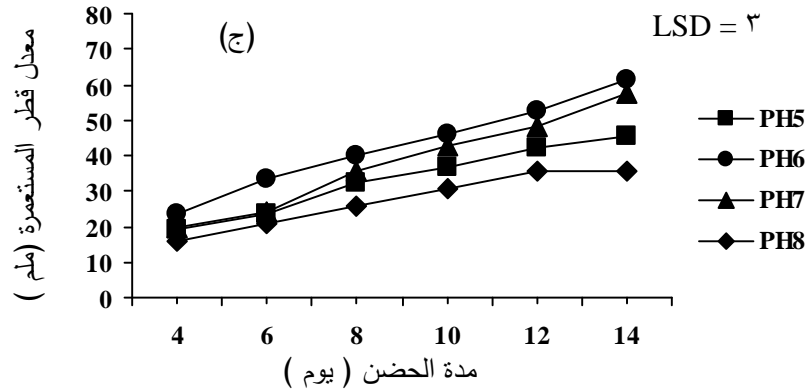
(أ) *T. rubrum* ، (ب) *T. mentagrophytes* ، (ج) *T. verrucosum*

٣- تأثير الرقم الهيدروجيني في معدلات أقطار مستعمرات الأنواع الفطرية المعزولة

أظهرت نتائج التجربة (الشكل ٤-أ-ب-ج) حصول زيادة معنوية (>0.01) في معدلات أقطار المستعمرات للأنواع الفطرية المعزولة *T. rubrum* و *T. mentagrophytes* و *T. verrucosum* النامية على وسط PDA بدرجة ٣٠ م° وللأرقام الهيدروجينية ٥ و ٦ و ٧ و ٨ طيلة مدة الحضانة وأظهرت النتائج تفوقاً معنوياً (>0.01)

لمعدلات أقطار المستعمرات عند الرقم الهيدروجيني ٦ مقارنة مع مثيلاتها في ٥ و ٧ و ٨ طيلة مدة الحضان إذ بلغت معدلات أقطار مستعمرات الفطريات *T. rubrum* و *T. mentagrophytes* و *T. verrucosum* بعد ١٤ يوماً من الحضان ٧٣.٣ و ٧٢.٥ و ٦١.٦ ملم عند الرقم الهيدروجيني ٦ على التوالي. في حين كانت معدلات أقطار المستعمرات لهذه الأنواع المعزولة ٥٣.٣ و ٥٢.٥ و ٤٥.٣ ملم عند الرقم الهيدروجيني ٥ و ٦٩.٥ و ٦٨.٥ و ٥٣.٣ ملم عند الرقم الهيدروجيني ٧ و ٣٧.٣ و ٣٦.٦ و ٣٥.٨ ملم عند الرقم الهيدروجيني ٨ بالنسبة للأنواع الفطرية *T. rubrum* و *T. mentagrophytes* و *T. verrucosum* على التوالي. كما لوحظ انخفاض معنوي (>0.01) في معدلات أقطار مستعمرات الفطريات عند الرقم الهيدروجيني ٨ عن مثيلاتها عند الرقم الهيدروجيني ٥ و ٧ طيلة مدة التجربة في حين تفوقت معنوياً (>0.01) معدلات أقطار مستعمرات الأنواع عند الرقم الهيدروجيني ٧ مقارنةً بمثيلاتها عند الرقم الهيدروجيني ٥ طيلة مدة الحضان.



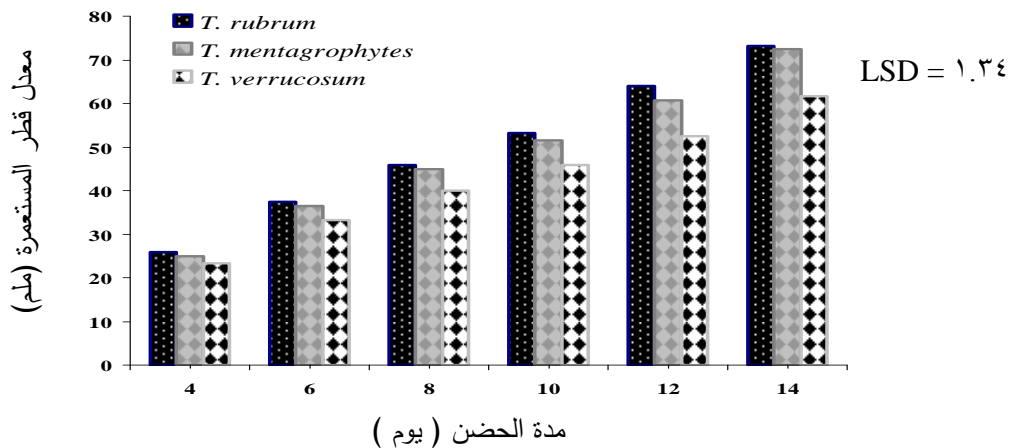


الشكل (٤) تأثير الرقم الهيدروجيني في معدلات أقطار مستعمرات الأنواع الفطرية المعزولة النامية على وسط PDA بدرجة حرارة ٣٠ م° ولمدة حضان ١٤ يوماً.

(أ) *T. rubrum* ، (ب) *T. mentagrophytes* ، (ج) *T. verrucosum*

٤- تأثير مدة الحضان في معدلات أقطار مستعمرات الأنواع الفطرية المعزولة

أظهرت نتائج هذه التجربة (الشكل ٥) وجود زيادة معنوية (>٠.٠١) في معدلات أقطار مستعمرات الأنواع الفطرية *T. rubrum* و *T. mentagrophytes* و *T. verrucosum* النامية على وسط PDA برقم هيدروجيني ٦ ودرجة حرارة ٣٠ م° طويلة مدة الحضان، إذ بلغت أعلى معدلات لأقطار مستعمرات الأنواع الفطرية في نهاية مدة الحضان ٧٣.٣ و ٧٢.٥ و ٦١.٦ ملم بالنسبة لـ *T. rubrum* و *T. mentagrophytes* و *T. verrucosum* على التوالي. بينت نتائج هذه التجربة انخفاضاً معنوياً (>٠.٠١) في معدلات أقطار مستعمرات الفطر *T. verrucosum* مقارنة بمثيلاتها بالنسبة لـ *T. mentagrophytes* و *T. verrucosum* طويلة مدة الحضان، في حين لم تظهر فروقات معنوية (>٠.٠١) في معدلات أقطار المستعمرات بين النوعين *T. rubrum* و *T. mentagrophytes* إلا بعد اليوم الثامن من الحضان، إذ تفوقت معنوياً (>٠.٠١) معدلات أقطار مستعمرات النوع *T. rubrum* مقارنة بمثيلاتها للنوع *T. mentagrophytes* واستمرت إلى نهاية مدة الحضان.



الشكل (٥) تأثير مدة الحضان في معدلات أقطار مستعمرات الأنواع الفطرية المعزولة النامية على وسط PDA

برقم هيدروجيني ٦ ودرجة حرارة ٣٠ م°.

المناقشة

تأثير بعض العوامل البيئية في نمو أنواع جنس *Trichophyton*

١- الوسط الغذائي

(A) الوسط الغذائي الملائم للنمو

إن الزيادة المعنوية في معدلات أقطار مستعمرات الأنواع الفطرية *T. rubrum* و *T. mentagrophytes* و *T. verrucosum* المعزولة على وسط PDA مقارنة بمثيلاتها على وسطي OMA و RTA قد يرجع إلى وجود سكر الكلوكوز (٢%) في وسط PDA والذي يخلو منه وسطي OMA و RTA (Kurbanoglu & Algur, ٢٠٠٢; Kwon-Chung & Benett, ١٩٩٢)، إذ إن الفطريات الجلدية يمكنها استغلال السكريات البسيطة مثل سكر الكلوكوز كمصدر للكربون الذي يعد من العوامل المهمة في نمو الفطريات، كما إن نسبة الكربون إلى النتروجين C:N هي ١٠:١ و ٤:١ و ٣:١ بالنسبة للأوساط PDA و OMA و RTA على التوالي (Wyss et al., ٢٠٠١). يتناسب معدل نمو الأحياء المجهرية طردياً مع تركيز الكربون (الكلوكوز) في الوسط الغذائي ضمن حدود معينة (السعد، ١٩٩٠). إذ إن وجوده في الوسط الغذائي يؤدي إلى زيادة معدل النمو وزيادة الوزن الجاف، وقد يؤدي إلى إنتاج الأحماض التي تسبب انخفاض الرقم الهيدروجيني للوسط الغذائي وجعله ملائماً لنمو الفطريات (Kunert, ٢٠٠٠). يعتقد الباحث إن الكلوكوز هو احد أهم العوامل المحددة للنمو بالنسبة للأوساط الغذائية PDA و OMA و RTA هو الكلوكوز. الفطريات الجلدية لا يمكنها تحليل السكريات المتعددة كالنشأ والسيليلوز الطبيعي ومشتقاته وهي تقوم باستغلال الأحماض الامينية المكونة للبيتون والكارئين كمصدر للنتروجين والكربون على الرغم من وجود الكلوكوز وهذا يؤدي بدوره إلى ارتفاع الرقم الهيدروجيني للوسط الغذائي والذي يصبح غير ملائم لنمو الفطريات (Drori et al., ٢٠٠٣; Kunert,) (٢٠٠٠). أما بالنسبة لوسط RTA فهو يحتوي على العديد من المواد المعقدة كالنشأ التي قد لا يستطيع الفطر استغلالها مما ينعكس سلباً على نمو الأنواع الفطرية فيه مقارنة بوسط OMA الذي يخلو من الكلوكوز أيضاً، فضلاً عن انخفاض تركيز بعض العناصر الغذائية المحددة للنمو، إذ تستمر الزيادة في معدل نمو الأحياء المجهرية مع ازدياد مدة الحضن عند توفر المواد الغذائية الضرورية في الوسط حتى استنفادها (السعد، ١٩٩٠).

(B) الوسط الغذائي الملائم للتجريم

بينت نتائج هذه الدراسة إن الزيادة المعنوية في معدل إنتاج الابواغ الكونيدية على وسط OMA مقارنة بمثيلاتها على وسطي PDA و RTA بالنسبة للأنواع الفطرية الثلاثة المعزولة *T. rubrum* و *T. mentagrophytes* و *T. verrucosum* يعزى إلى وجود اختلافات تركيبية هامة في هذه الأوساط الغذائية الثلاثة كاختلاف البروتين ومحتوى الدهون والتي تؤثر مباشرة في إنتاج الابواغ الكونيدية (Jackson & Bothast, ١٩٩٠). وقد جاءت هذه النتائج متوافقة مع ما ذكره Jessup وجماعته (٢٠٠١) من أن وسط Heinz oatmeal cereal agar هو أفضل وسط لإنتاج الابواغ الكونيدية لأنواع جنس *Trichophyton* يليه وسط Rice agar و PDA. وفي دراسة أخرى ذكر Thomas وجماعته (١٩٨٧) إن نسبة C:N (٥:١) حفزت الفطر *Beauveria bassiana* النامي على وسط TKI broth على إنتاج نسبة عالية من الابواغ الكونيدية بينما زيادة تركيز النتروجين خفض من هذه النسبة. إن إضافة تركيز واطى ١٠ غرام/لتر من الكلوكوز إلى وسط Water rice أدى إلى زيادة إنتاج الابواغ الكونيدية للفطر

Dactylaria higginsii في حين إن ارتفاع تركيز الكلوكوز إلى ١٠٠ غرام/لتر سبب تثبيط إنتاج الأبواغ الكونيدية للفطر نفسه (Wyss *et al.*, ٢٠٠١)، كذلك أشار الباحث نفسه إلى أن وسط Water rice حفز إنتاج الأبواغ الكونيدية للفطر أعلاه ولكن نسبة إنبات الأبواغ الكونيدية فيه قد انخفضت بمقدار ٥٠% مقارنة بنسبة الإنبات ١٠٠% على وسط PDA. لذلك فإن إنتاج ونوعية السبور وقابليته على الإنبات إضافة إلى أمراضه وضروته تتأثر بتركيز الكربون ونسبته إلى النتروجين في الوسط الغذائي (Jackson & Bothast, ١٩٩٠).

٢- درجة الحرارة

أظهرت نتائج دراسة تأثير درجة الحرارة في نمو الأنواع الفطرية المعزولة *T. rubrum* و *T. mentagrophytes* و *T. verrucosum* (الشكل ٣-أ-ب-ج) إن لهذه الأنواع القابلية على النمو في مدى حراري يتراوح بين ٢٠-٣٥ م° وكان أفضل نمو لهذه الأنواع عند درجة ٣٠ م° في حين انخفضت معدلات أقطار مستعمرات الأنواع الفطرية بصورة كبيرة عند درجة حرارة ٢٠ م° مقارنة بالدرجات الحرارية ٣٠ و ٣٥ و ٢٥ م°، بينما حصل تثبيط كامل للنمو عند درجة حرارة ٤٠ م°. إن توقف نمو الأنواع الفطرية عند درجة حرارة ٤٠ م° قد يعود إلى فقدان الغشاء الخلوي لوظيفته الحيوية أو تحطيم المكونات الساييتوبلازمية وتحلل الخلايا (De Maranon *et al.*, ١٩٩٩). ويعزى سبب زيادة النمو في المدى الحراري ٢٠-٣٥ م° إلى أن الفعاليات الحيوية للنمو تصل إلى قمة نشاطها عند الدرجة الحرارية المثلى، ومن ثم يسهل لها استغلال المصادر الغذائية في الوسط لغرض بناء الجزيئات الكبيرة Macromolecular ومن ثم بناء كتلة الفطر، من أهم الفعاليات الحيوية المرتبطة بنمو الفطر التي تتأثر بتغير درجات الحرارة عملية التنفس Respiration processes إذ تنخفض عملية التنفس عند خفض درجة الحرارة عن الدرجة المثلى للنمو ومن ثم تتأثر عملية بناء الجزيئات الكبيرة Macromolecular وهذا ما يحدث عند خفض درجة الحرارة. في حين أنه عند رفع درجة الحرارة فإن عملية التنفس سوف تتوقف وتؤدي إلى موت الفطر حتى ولو انخفضت درجة الحرارة إلى الدرجة المثلى للنمو (Maheshwari *et al.*, ٢٠٠٠). فضلاً عن ذلك فإن فعالية إنزيمات النمو تتأثر بارتفاع درجات الحرارة إذ يحدث مسخ denaturation للتركيب البروتيني للإنزيم وحدوث خلل في الفعالية الإنزيمية مسبباً انخفاض النمو أو موت الفطر (السعد، ١٩٩٠). إن هذه النتائج جاءت متوافقة مع ما ذكره Weitzman and Summerbell (١٩٩٥) من أن درجة الحرارة المثلى لنمو الفطريات الجلدية تتراوح بين ٢٥-٣٥ م° ولا تنمو بدرجة حرارة ٤٠ م°. وجاءت هذه النتائج متقاربة مع ما ذكره Ulifig (٢٠٠٣) من أن الفطريات الجلدية تنمو بمدى حراري يتراوح بين ٢٣-٣٣ م° وأفضل نمو لها عند درجة حرارة ٢٩ م°. أظهرت نتائج هذه التجربة وجود فروقات معنوية (>٠.٠١) في معدلات نمو الأنواع الفطرية المعزولة بين درجتي حرارة ٣٠ و ٣٥ م°، وهذه النتائج غير متوافقة مع ما ذكره Norris وجماعته (١٩٩٩) من عدم وجود اختلافات في تأثير كل من درجة الحرارة ٣٠ و ٣٥ م° في معدل نمو الفطريات الجلدية العائدة إلى الجنس *Trichophyton*، وقد يرجع السبب إلى اختلاف ظروف التجربة واختلاف النوع كذلك وجد الباحث نفسه إن أفضل نمو لأنواع هذا الجنس يكون بين درجة حرارة ٢٨-٣٠ م° وهذه النتائج جاءت مقارنة لنتائج الدراسة الحالية.

٣- الرقم الهيدروجيني

بالرغم من التغيرات الحاصلة في المحيط (الوسط) الذي ينمو فيه الفطر إلا أن سايتوبلازم الخلية يبقى محافظاً على نسبته من أيونات الهيدروجين والهيدروكسيل وذلك لأن الغشاء البلازمي يعد غير ناضج نسبياً لهذه الأيونات إلا أن الإنزيمات الموجودة في الغشاء الساييتوبلازمي نفسه تتأثر بتركيز أيون الهيدروجين مما يؤدي إلى تأثر الفعاليات الأخرى التي من أبرزها ألفة هذه الإنزيمات الموجودة في الغشاء للمواد المذابة في الوسط (السعد، ١٩٩٠). وقد أظهرت نتائج هذه التجربة (الشكل ٤-أ-ب-ج) إن أفضل نمو للأنواع الفطرية المعزولة عند الرقم الهيدروجيني ٦ يليه الرقم الهيدروجيني ٧ و ٥ في حين كان للرقم الهيدروجيني ٨ تأثيراً واضحاً في خفض معدلات أقطار مستعمرات الأنواع الفطرية مقارنة بالأرقام الهيدروجينية الأخرى. وقد جاءت هذه النتائج متوافقة مع ما أشار إليه Tanner (١٩٩٧) من أن الرقم الهيدروجيني ٨ يعد غير ملائم لنمو اغلب الفطريات. كذلك جاءت هذه النتائج متوافقة مع ما ذكره Danew & Klossek (١٩٨٩) الذين أشاروا إلى انه في أوساط المحاليل المنظمة يكون أفضل نمو للفطريات الجلدية عند رقم هيدروجيني يتراوح بين ٦-٧.٥ في حين تبدأ هذه الفطريات بالنمو في أوساط المحاليل غير المنظمة عند رقم هيدروجيني يتراوح بين ٤-١١.

٤- مدة الحضانة

يزداد معدل النمو للغزل الفطري مع ازدياد مدة الحضانة عند توفر المواد الغذائية الضرورية في وسط النمو حتى تستنفد المواد الغذائية الضرورية لنمو الفطر أو يقل تركيز أحد العناصر المحددة للنمو (Cuenca- Estrella *et al.*, ٢٠٠١). إذ أوضحت نتائج هذه التجربة (الشكل ٥) إن معدل نمو الأنواع الفطرية المعزولة يتناسب طردياً مع زيادة مدة الحضانة، فقد بلغ أقصى معدل للنمو في اليوم ١٤ من الحضانة وهو ٧٣.٣ و ٧٢.٥ و ٦١.٦ ملم لكل من *T. rubrum* و *T. mentagrophytes* و *T. verrucosum* على التوالي. إن هذه النتائج جاءت متوافقة مع ما ذكره الجنابي (٢٠٠٥) من أن معدل نمو الفطر *M. canis* يزداد تدريجياً مع ازدياد مدة الحضانة، إذ وصل نمو هذا الفطر إلى ذروته بعد مدة حضانة ١٤ يوماً على وسط SDA. أشار بعض الباحثين وجود مدد حضانة مختلفة لاختبار حساسية الفطريات الجلدية فقد لاحظ Barchiesi وجماعته (٢٠٠١) و Butty وجماعته (١٩٩٥) إن الفطر *T. rubrum* ينمو بشكل بطيء بعد مدة حضانة ٤ أيام لكن ٧ أيام كانت كافية لملاحظة نمو الفطريات الجلدية. في حين احتاج Norris وجماعته (١٩٩٩) إلى ٦ أيام لملاحظة نمو الفطريات الجلدية. وأشار Santos & Hamadan (٢٠٠٥) إلى إن زيادة مدة الحضانة ١٠ أيام مقارنة بمدة الحضانة ٧ أيام معدلات النمو للوعين *T. rubrum* و *T. mentagrophytes*. تمتلك مدة الحضانة تأثير كبير في تجرثم الفطريات الجلدية، إذ لوحظ إن أنواع جنس *Trichophyton* تنتج الأبواغ الكونيدية بغزارة بعد مدة حضانة ٤ أيام على وسط Heinz oatmeal cereal agar ولم تنتج الأبواغ الكونيدية على وسطي Mycosel agar و Potato dextrose agar إلا بعد مدة حضانة ٧ أيام (Jessup *et al.*, ٢٠٠٠). تختلف مدة الحضانة للفطريات الجلدية اعتماداً على نوع الفطر وسلالات النوع الواحد والوسط الغذائي إضافة إلى نوع الاختبار وظروف التجربة (Kunert, ٢٠٠٠).

References

الجنابي، حيدر شخير عبيس. (٢٠٠٥). تأثير بعض العوامل البيئية في نمو الفطر *Microsporium canis* وفعالية إنزيم البروتيناز. رسالة ماجستير / كلية العلوم-جامعة بابل.
السعد، مها رؤوف. (١٩٩٠). فسلجة الأحياء المجهرية. الطبعة الثانية. جامعة بغداد، بغداد.
الراوي، خاشع محمود وخلف الله، عبد العزيز محمد. (٢٠٠٠). تصميم وتحليل التجارب الزراعية، دار الكتب للنشر. جامعة الموصل.

- Aubaid, A.H. (١٩٩٧) Enzymatic activity, purification of keratinase and proteinase and their roles in the pathogenicity and immunogenicity of clinical isolates of dermatophytes and yeasts. Ph. D. thesis, collage of education, Basrah University
- Barchiesi, F.; Arzeni, D.; Camiletti, V.; Simonetti, O.; Cellini, A.; Offi-dani, A. M. and Scalise, G. (٢٠٠١). In vitro activity of posaconazole against clinical isolates of dermatophytes. J. Clin. Microbiol., ٣٩: ٤٢٠٨-٤٢٠٩.
- Bull, A. T. and Bushnell, M. E. (١٩٧٦) Environmental control of fungal growth. In the filamentous fungi. (eds. J.E. Smith and D.R. Berry). Edward Arnold. London., ٢: ١-٢٦.
- Butty, P.; Lebecq, J.C.; Mallie, M. and Bastide, J.M. (١٩٩٥). Evaluation of the susceptibility of dermatophytes to antifungal drugs: a new technique. J. Med. Vet. Mycol., ٣٣: ٤٠٣-٤٠٩.
- Cuenca-Estrella, M.; Diaz-Guerra, T.M.; Mellado, E. and Rodriguz-Tudela, J.L. (٢٠٠١). Influence of glucose supplementation and inoculum size on growth kinetics and antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. J. of clin. Microbiol., ٣٩(٢): ٥٢٥-٥٣٢.
- Danew, P. and Klossek, P. (١٩٨٩) The dependence of the physiological properties of *Trichophyton mentagrophytes* on the pH value of the culture medium . Mycoses; ٣٢(٦): ٣٠٣-٣٠٨.
- De Maranon, I.M.; Chandanson, N.; Joly, N. and Gervais, P. (١٩٩٩). Slow Heat Rate Increase Yeast Thermotolerance by Maintaining Plasma Membrane Integrity. Biotechnol. Bioeng., ٦٥: ١٧٦-١٨١.
- Drori, N.; Kramer- Haimovich, H.; Rollins, J.; Dinoor, A.; Okam, Y.; Pines, O. and prusky, D. (٢٠٠٣). External pH and nitrogen source affect secretion of pectatelyase by *Colletrichum gloeosporioides*. App. Environ. Microbiol., ٦٩(٦) : ٣٢٥٨-٣٢٦٢.
- Hay, R. J. (١٩٨٦). Chronic dermatophyte infections In : Verbov, J.L.(ed) .New Clinical applications dermatology superficial fungal infections . Butler and Tanner Ltd . London, pp: ٢١-٣٥.
- Jackson, M. A., and Bothast, R. J. (١٩٩٠). Carbon concentration and carbon-to-nitrogen ratio influence submerged-culture conidiation by the potential bioherbicide *Colletotrichum truncatum* NRRL ١٣٧٣٧. Appl. Environ. Microbiol., ٥٦: ٣٤٣٥-٣٤٣٨.
- Jessup, C. J.; Warner, J. ; Isham, N.; Hasan, I. and Ghannoum, M. A. (٢٠٠٠) Antifungal Susceptibility Testing of Dermatophytes: Establishing a Medium for Inducing Conidial Growth and Evaluation of Susceptibility of Clinical Isolates. J. Clin. Microbiol., ٣٨(١): ٣٤١-٣٤٤.
- Kunert, J. (١٩٨٨). Utilization of cystine by dermatophytes on glucose- peptone media. Folia Microbiol., ٣٣: ١٨٨-١٩٧.
- Kunert, J. (٢٠٠٠). Physiology of keratinophilic fungi. Revista Iberoamericana de Micologia., ١: ٧٧-٨٥.
- Kurbanoglu, E.B. and Algur, Ö. F. (٢٠٠٢). Use of Ram Horn Hydrolyste as a peptone for bacterial growth. Turk. J. Biol.; ٢٦: ١١٥-١٢٣.

- Kwon-Chung, K. S. and Bennett, E. (1994). Medical Mycology. Williams and Wilkins, 7nd.ed.U. S. A.
- Larone, D. H. (1996). Culture and identification of dermatophytes. Clin. Microbiol. Newsl., 18:23-28.
- Larone, D. H.; Mitchell, E. and Walsh, T. J. (1999). In Murray, Baron, Pfaller, Tenover and Tenover (ed.), Manual of clinical microbiology, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Maheshwari, R.; Bharadwaj, G. and Bhat, M. (2000). Thermophilic Fungi; their physiology and enzymes. Microbiology and Molecular Biology Review. 65: 461-488.
- Meletiadiis, J.; Meis, J.F.G. M.; Mouton, J.W. and Verweij, P.E. (2001) Analysis of Growth characteristics of Filamentous Fungi in Different Nutrient Media. J. Clin. Microbiol., 39(2): 478-484.
- Norris, H. A.; Elewski, B. E. and Ghannoum, M.A. (1999). Optimal growth conditions for determination of the antifungal susceptibility of three species of dermatophytes with the use of a microdilution method. J. Am. Acad. Dermatol., 41:S9-S13.
- Palecek, S.P.; Parikh, A.S. and Kron, S.J. (2002). Sensing, Signalling and integrating physical processes during *Saccharomyces cerevisiae* invasive and filamentous growth. Microbiol., 148: 893-907.
- Ramon, A. M.; Porta, A. and Fonzi, W.A. (1999). Effect of Environmental pH on Morphological Development of *Candida albicans* Is Mediated Via The Pac C-Related Transcription Factor Encoded by *PRR1*. J. of Bacteriol., 181(24): 7024-7030.
- Santos, D.A. and Hamdan, J.S. (2000). Evaluation of broth microdilution antifungal susceptibility testing conditions for *Trichophyton rubrum*. J. Clin. Microbiol., 38: 1917-1920.
- Tanner, R.S. (1997). Cultivation of bacteria and fungi. In: Manual of environmental microbiology (ed. Hurs, C.J.; Knudsen, G.R.; McInerney, M.J.; Stetzenbach, L.D. and Walter, M.V.) American Society for Microbiology, Washington. pp. 52-60.
- Thomas, K.C., Khachatourians, G. G., and Ingledew, W. M. (1987). Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture. Can. J. Microbiol., 33:12-20.
- Ulifig, K. (2003). Studies of Keratinolytic and Keratinophilic Fungi in Sewage Sludge by Means of a Multi-Temperature Hair Baiting Method. J. Environmental studies., 12: 461-466.
- Weitzman, I. and Summerbell, R. C. (1990). The dermatophytes. Clin. Microbiol. Rev., 3(2): 240-250.
- Wyss, G. S.; Charudattan, R. and DeValerio, J. T. (2001). Evaluation of Agar and Grain Media for Mass Production of Conidia of *Dactylaria higginsii*. Plant Dis., 85:1160-1170.