مجلة جامعة بابل / العلوم الصرفة والتطبيقية / العدد (2) / المجلد (17) : 2009

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

مهند جواد كاظم الجبوري **جواد كاظم عبود الجنابي**

كلية العلوم- جامعة بابل

الخلاصة

أجريت دراسة مختبريه لبيان تأثير بعض العوامل البيئية مثل نوع الوسط الغذائي ودرجة الحرارة والرقم الهيدروجيني ومدة الحضن 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 30 م على وسط PDA ولمدة 14 يوم مقارنةً بالدرجات الحرارية 35 و 25 و 20 م بينما أظهرت درجة الحرارة 20 م تأثيراً واضحاً في خفض معدلات أقطار مستعمرات الفطريات مقارنة بدرجتي الحرارة 25 و 35 م. وبالنسبة لتأثير الرقم الهيدروجيني فقد بينت النتائج إن أفضل رقم هيدروجيني للنمو هو 6 على وسط PDA عند درجة حرارة 30 م ولمدة 14 يوم يليه الرقم الهيدروجيني 7 و 5 وفي المقابل انخفضت معدلات أقطار مستعمرات الأنواع الفطرية المعزولة بصورة كبيرة عند الرقم الهيدروجيني 8. أوضحت نتائج تأثير مدد الحضن على وسط PDA برقم هيدروجيني 6 ودرجة حرارة 30 م زيادة معدلات أقطار مستعمرات الأنواع الفطرية بزيادة مدة الحضن، إذ بلغ أقصى معدل لأقطار مستعمرات الأنواع الفطرية المعزولة في اليوم 14 من الحضن.

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 30 ^{0}C on PDA for 14 days, while the temperature 20 ^{0}C showed great reduction in the growth compared with the other temperature. The optimum pH for growth was 6 on PAD at 30 ^{0}C for 14 days followed by pH_7 and pH_5, but the growth was greatly reduced at pH_8 compared with the other pH levels. The effect of incubation period on PDA at pH_6 and 30 ^{0}C showed substantially increased in growth along the incubation time, where, the optimum growth for isolated species was at the end of incubation (14 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, 1996; Weitzman & Summerbell, 1995). 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 ووراثة المضيف وتركيب الزهم Sebum ووفرة ثنائي اوكسيد الكربون CO_2 على سطح الجلد (Hay, 1986). 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 والأمثل للفطريات الجلدية الخيطية باختلاف الأوساط الغذائية (Meletiadis *et al*., 2001)، 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، 1990). ويعد الكربون والنتروجين من أهم مكونات الأوساط الزرعية الضرورية لنمو الأحياء المجهرية ومن ضمنها الفطريات باختلاف أنواعها (Meletiadis *et al*., 2001; Cuenca–Estrclla *et al*., 2001). 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*., 2002). تنمو الفطريات المحبة للكيراتين بصورة جيدة عند وجود السكريات مثل الكلوكوز كمصدر للكربون مع البروتينات بالإضافة إلى أنها تستغل البروتينات مصدراً للكربون والنتروجين معا (Kunert, 2000).

تقسم الأحياء المجهرية إلى ثلاثة مجاميع بالنسبة لمتطلبها الحراري هي الأحياء المحبة للحرارة العالية Thermophilic والتي تنمو بصورة جيده في درجة حرارة أعلى من 40 م، والأحياء المحبة للحرارة المتوسطة Mesophilic وهذه تنمو بشكل أفضل بين درجتي الحرارة 25-40 م وأخيرا الأحياء المحبة للبرودة Psychrophilic فإنها تنمو في درجة حرارة اقل من 25م (السعد، 1990). تنمو الفطريات المحبة لدرجات الحرارة المتوسطة بصوره جيدة بين درجتي 32-30 م (Bull & Bushnell, 1976). تعد الفطريات الجلدية من الأحياء المجهرية متوسطة التحمل الحراري Moderately thermophilic ومعظمها تنمو جيداً بدرجة حرارة 37 م خارج الجسم الحي، وان درجة الحرارة المثلى لنمو الفطريات الجلدية تتراوح بين 25-35 م ولا تتمكن من النمو بدرجة حرارة 40 م وهناك أنواع أخرى من الفطريات الجلدية لا تستطيع النمو بدرجة 37 م (Weitzman and Summerbell, 1995). يتأثر نمو الفطريات والعديد من فعالياتها الحيوية الأخرى بالرقم الهيدروجيني للوسط الزرعي، إذ انه يوثر في الحالة الأيونية لمكونات الوسط الزرعي وجاهزية الأحماض الامينية والمغذيات الأخرى في الوسط وإمكانية استغلالها من قبل الفطريات (Danew & Klossek, 1989). كما وجد إن الرقم الهيدروجيني يؤثر في عملية التعبير الجيني لبعض الجينات المسؤولة عن تغير الشكل في خميرة *Candida spp*. (Ramon *et al*., 1999). أشار Kunert (1988) إلى أن نمو الفطريات الجلدية في وسط غني بالسكريات يؤدي إلى جعل الوسط حامضياً مما يؤدي إلى تثبيط نموها لذلك تضاف بعض محاليل الدواريء للأوساط الزرعية للمحافظة على الرقم الهيدروجيني للوسط ضمن المدى الأمثل للنمو.

تؤثر مدة الحضن في نمو الفطريات الجلدية وإنتاج الكونيدات، فقد ذكر Jessup وجماعته (2000) أن النوع *T. rubrum* ينتج عدداً كبيراً من الكونيدات في وسط Heinz oatmeal cereal agar بعد مدة حضانة 4 أيام إلا انه لا ينتج إلا عدداً قليلاً من الكونيدات في وسط Potato dextrose agar ووسط Mycoseal agar بعد مدة

حضن 7 أيام. تتباين مدة الحضن اللازمة لنمو الفطريات باختلاف أنواعها، إذ تحضن الفطريات الجلدية مدة لا تقل عن 15 يوماً عند عزلها، وتتلاف الأوساط الزرعية التي لا يظهر فيها نمو بعد مدة أربعة أسابيع (Kwon- Chung & Bennett, 1992).

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 الابواغ الكونيدية فقد تم إجراء هذه الدراسة.

المواد وطرق العمل

1- جمع العينات السريرية وعزل الفطريات:

تم جلب العينات من وحدة الإمراض 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 المجهري المباشر للعينات تم زرع العينات على وسط سابروويد دكستروز أكار مع كلورامفينكول 0.05 غم لمنع نمو البكتيريا وكذلك تم إضافة هيدروكسيد الامونيوم تركيز 30 % إلى الوسط الزرعي بدلا من السايكلوهكسامايد لمنع نمو الفطريات الملوثة إذ تم إضافة قطرة واحدة من هيدروكسيد الامونيوم تركيز 30 % إلى حافة الأطباق الزرعية م حركت حركة رحوية أو دائرية وتركت لمدة 20 دقيقة قبل زراعتها، حضنت الأطباق بدرجة حرارة 30 ± 2 م لمدة 7-14 يوماً (Larone *et al*., 1999).

2- تأثير بعض العوامل البيئية في نمو الأنواع الفطرية المعزولة *T .rubrum* و *T. mentagrophytes* و *T. verrucosum*

A) الوسط الغذائي:

1- 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 Potato Dextrose Agar (PDA) و Oatmeal Cereal Agar (OMA) و Rice Tween Agar (RTA). وذلك بأخذ قرص بقطر 10 ملم من حافة المستعمرة الفطرية بعمر 7-10 أيام ووضع في مركز الطبق الذي يحوي الوسط الغذائي، كررت العملية بالنسبة للأنواع الفطرية الثلاث ولجميع الأوساط الزرعية المستخدمة. حضنت الأطباق لمدة 14 يوماً وبدرجة 30 ± 2 م. حسب النمو بقياس قطرين متعامدين من ظهر المستعمرة الفطرية يمران بمركز القرص كل 48 ساعة وسجل معدل أقطار المستعمرات لثلاثة مكررات (Aubaid , 1997).

2- 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 م ولمدة 7 أيام وبواقع ثلاثة مكررات لكل فطر ولكل وسط. وفي نهاية مدة الحضن تم حساب أعداد الابواغ الكونيدية، إذ تم إضافة 5 مل من

محلول الملح الفسيولوجي لكل طبق وقشطت الابواغ باستخدام الناقل الجرثومي ثم سحب بواسطة ماصة معقمة ووضع في أنبوبة معقمة وتم إضافة قطرتين من سائل الصابون liquid soap. حسبت أعداد الابواغ الكونيدية لكل نوع في خمسة حقول بواسطة Haemocytometer بأتباع طريقة Jessup وجماعته (2000). سجل معدل إنتاج الابواغ الكونيدية لثلاثة مكررات بالنسبة للأنواع الفطرية الثلاثة وعلى الأوساط الغذائية الثلاثة.

B) درجة الحرارة:

تم حساب تأثير درجة الحرارة على نمو الأنواع الفطرية المعزولة *T. rubrum* و *T. mentagrophytes* و *T. verrucosum* على مدى يتراوح بين 20-40 م وعلى درجات حرارية هي 20 و 25 و 30 و 35 وذلك بأخذ قرص قطره 10 ملم من حافة مستعمرة فطرية حديثة بعمر7-10 أيام ووضع في مركز الطبق الذي يحتوي على PDA ولمدة 14 يوماً. تم حساب معدل أقطار مستعمرات الأنواع الفطرية الثلاث بنفس الطريقة المتبعة في الفقرة (1) وبواقع ثلاثة مكررات لكل نوع فطري ولكل درجة حرارية. وقد تم استبعاد نتائج تاثير درجة الحرارة 40 م وذلك لعدم ظهور أي نمو للأنواع الفطرية المعزولة عند هذه الدرجة الحرارية.

C) الرقم الهيدروجيني:

تم حساب نمو الأنواع الفطرية المعزولة *T. rubrum* و *T. mentagrophytes* و *T. verrucosum* في أرقام هيدروجينية مختلفة هي 5 و 6 و 7 و 8 و 9 وذلك بأخذ قرص بقطر 10 ملم من حافة المستعمرات الفطرية بعمر 7-10 أيام ووضع في مركز طبق بتري حاو على PDA ولمدة 14 يوماً وبدرجة 30 م وبواقع ثلاثة مكررات لكل نوع من الفطريات الثلاث ولمستويات الحموضة الخمسة. حسب معدل أقطار مستعمرات الأنواع الفطرية بالطريقة السابقة نفسها. وأيضا تم استبعاد الرقم الهيدروجيني 9 وذلك لحدوث تثبيط كامل لنمو الأنواع الفطرية المعزولة عند هذا الرقم الهيدروجيني.

D) مدة الحضن:

تم حساب نمو الأنواع الفطرية المعزولة *T. rubrum* و *T. mentagrophytes* و *T. verrucosum* بعد مدة حضن هي 4-14 يوم وذلك بنقل قرص بقطر 10 ملم من حافة المستعمرات الفطرية بعمر 7-10 أيام إلى مركز الطبق الحاوي على PDA برقم هيدروجيني 6، وحضنت الأطباق للأنواع الفطرية المعزولة بدرجة حرارة 30 م. حسب معدل أقطار مستعمرات الأنواع الفطرية لثلاثة مكررات بالطريقة السابقة نفسها.

التحليل الإحصائي

حللت نتائج التجارب بواسطة اختبار تحليل التباين ANOVA والاستعانة بجداول النسب المثلثية عند مستوى احتمالية (0.01) وتم استخدام اختبار اقل فرق معنوي Least Significant Difference (L.S.D) لبيان معنوية النتائج. (الراوي وخلف الله، 2000).

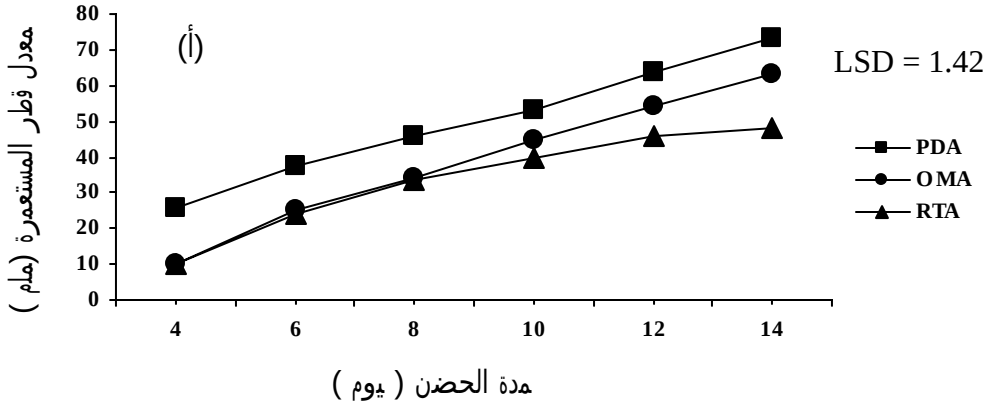
النتائج

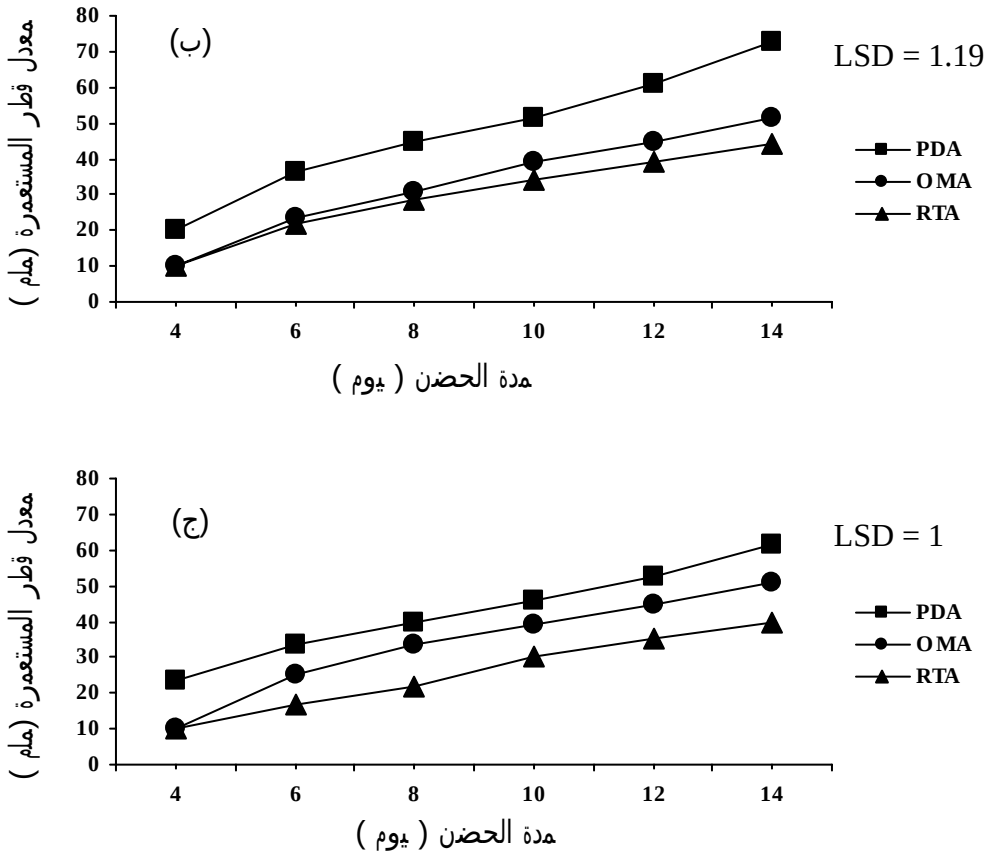
تأثير بعض العوامل البيئية في نمو أنواع جنس *Trichophyton*

1- الوسط الغذائي

A) الوسط الغذائي الملائم لنمو الأنواع الفطرية المعزولة

أظهرت نتائج التجربة (الشكل 1-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 الحضن وللأوساط الغذائية الثلاثة PDA و OMA و RTA عند درجة حرارة 30±2 م إلا أن معدلات أقطار مستعمرات الأنواع الفطرية المعزولة على الوسط الغذائي PDA قد تفوقت معنويا (<0.01) على مثيلاتها بالنسبة للوسطين OMA و RTA طيلة مدة الحضن إذ بلغت 73.3 و 72.5 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 الحضن 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 الحضن إذ تفوقت معنويا (<0.01) معدلات أقطار المستعمرات على وسط OMA مقارنة بمثيلاتها وسط RTA واستمرت إلى نهاية مدة الحضن.





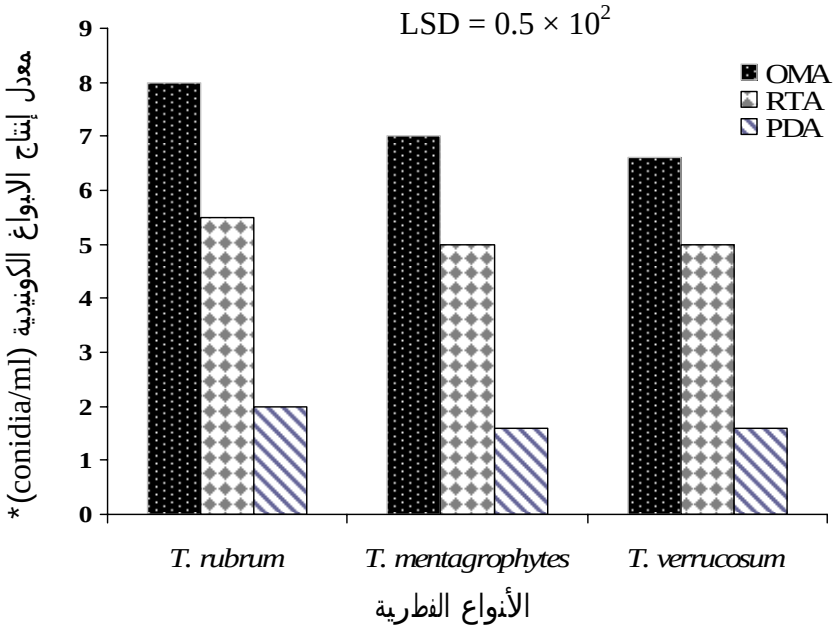
الشكل (1) تأثير نوع الوسط الغذائي في معدلات أقطار مستعمرات الأنواع الفطرية المعزولة على درجة حرارة 30 ± 2 م ولمدة حضن 14 يوماً.

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

B) الوسط الغذائي الملائم لتجرثم الأنواع الفطرية المعزولة

بينت نتائج هذه التجربة (الشكل 2) وجود فروقات معنوية (<0.01) 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 حضن 7 أيام بدرجة حرارة 30 م إذ لوحظ أن معدل إنتاج الابواغ الكونيدية على وسط OMA قد تفوق معنويا (<0.01) 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 2×10^2 و 1.6 $\times 10^2$ و 1.6 $\times 10^2$ (conidia/ml) على وسط PDA بالنسبة للأنواع الفطرية المعزولة *T. rubrum* و *T. mentagrophytes* و *T. verrucosum* على التوالي. كذلك أظهرت النتائج تفوقاً معنوياً (<0.01) في معدل إنتاج الابواغ الكونيدية للفطر *T. rubrum* مقارنة بالفطر *T. mentagrophytes* و

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

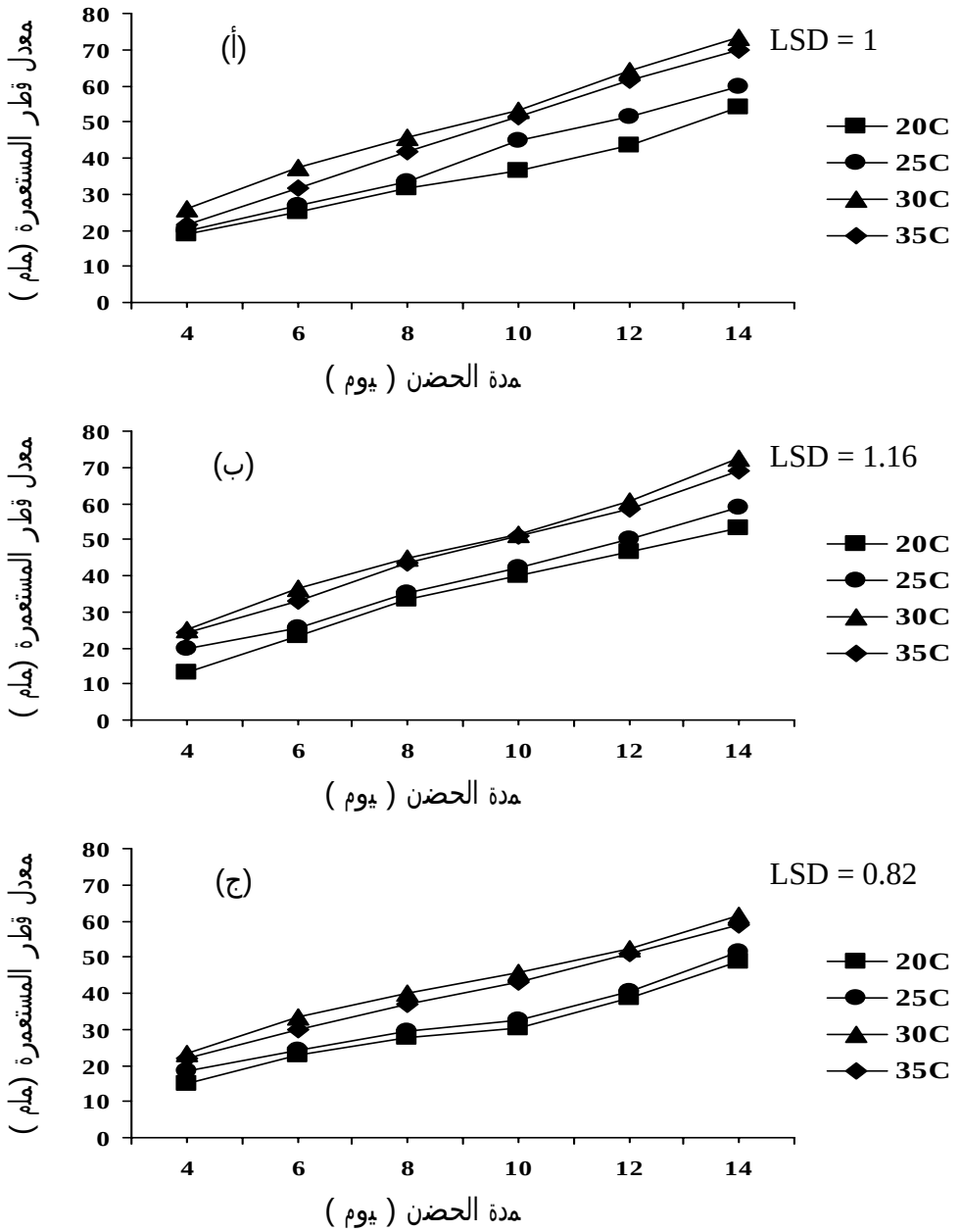


* معدل إنتاج الابواغ الكونيدية مضروب × 10^2

الشكل (2) تأثير نوع الوسط الغذائي في معدل إنتاج الابواغ الكونيدية للأنواع الفطرية المعزولة بعد مدة حضن 7 أيام وبدرجة حرارة 30 م.

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

أوضحت نتائج هذه التجربة (الشكل 3-أ-ب-ج) حصول زيادة معنوية (<0.01) في معـدلات أقطـار المستعمرات للأنواع الفطرية المعزولة *T. rubrum* و *T. mentagrophytes* و *T. verrucosum* النامية على وسط PDA طيلة 14 يوماً من الحضن و لجميع المستويات الحرارية 20 و 25 و 30 و 35 م إلا أن معـدلات أقطار المستعمرات الفطرية عند درجة 30 م قـد تفـوقت معنوياً (<0.01) عن مثيلاتها عنـد درجـة 20 و 25 و 35 م طيلة مدة الحضن إذ بلغت معدلات أقطار المستعمرات في نهاية مدة الحضن 73.3 و 72.5 و 61.6 ملم عند درجة 30 م لكل من *T. rubrum* و *T. mentagrophytes* و *T. verrucosum* على التوالي في حين كانت معدلات أقطار المستعمرات 70 و 69 و 59 ملم عند درجة 35 م ، 60 و 59 و 51.6 عند درجة 25 م ، 54 و 53.3 و 49 ملم عند درجة 20 م في نهاية مدة الحضن وللأنواع الفطريـة المعزولـة *T. rubrum* و *T. mentagrophytes* و *T. verrucosum* علـى التوالي. أظهرت النتائـج انخفاضـاً معنويـاً (<0.01) فـي معدلات أقطار مستعمرات الأنواع الفطرية المعزولة عند درجة 20 م عن مثيلاتها عند درجتي 25 و 35 م طيلة مدة الحضن بينما تفوقت معنويا (<0.01) معدلات أقطار مستعمرات الأنواع الفطرية المعزولة عند درجـة 30 م مقارنة بمثيلاتها عند درجة 25 م وطيلة مدة الحضن.



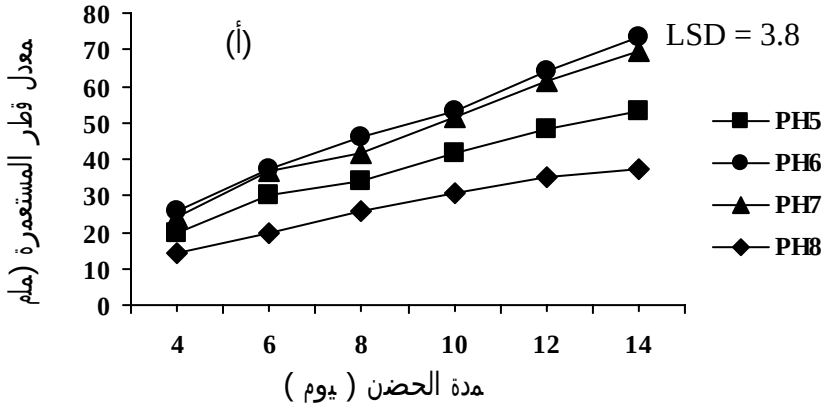
الشكل (3) تأثير درجات الحرارة في معدلات أقطار مستعمرات الأنواع الفطرية المعزولة النامية على وسط PDA ولمدة حضن 14 يوماً.

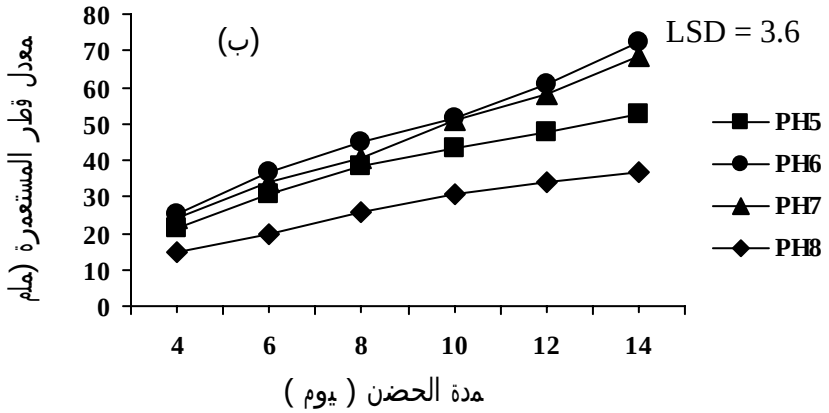
***T. rubrum* (أ) ، *T. mentagrophytes* (ب) ، *T. verrucosum* (ج)**

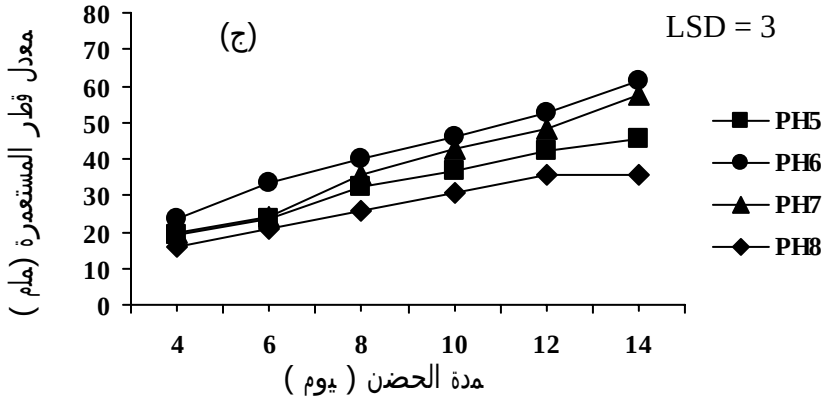
3- تأثير الرقم الهيدروجيني في معدلات أقطار مستعمرات الأنواع الفطرية المعزولة

أظهرت نتائج التجربة (الشكل 4-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 30 م وللأرقام الهيدروجينية 5 و 6 و 7 و 8 طيلة مدة الحضن وأظهرت النتائج تفوقاً معنويـاً (<0.01)

لمعدلات أقطار المستعمرات عند الرقم الهيدروجيني 6 مقارنة مع مثيلاتها في 5 و 7 و 8 طيلة مدة الحـضن إذ بلغت معدلات أقطار مستعمرات الفطريات *T. rubrum* و *T. mentagrophytes* و *T. verrucosum* بعد 14 يوما من الحضن 73.3 و 72.5 و 61.6 ملم عند الرقم الهيدروجيني 6 على التوالي. في حين كانـت معـدلات أقطار المستعمرات لهذه الأنواع المعزولة 53.3 و 52.5 و 45.3 ملم عند الرقم الهيدروجيني 5 و 69.5 و 68.5 و 53.3 ملم عند الرقم الهيدروجيني 7 و 37.3 و 36.6 و 35.8 ملم عند الرقم الهيدروجيني 8 بالنسبة للأنـواع الفطرية *T. rubrum* و *T. mentagrophytes* و *T. verrucosum* على التوالي. كما لوحظ انخفاض معنـوي (0.01>) في معدلات أقطار مستعمرات الفطريات عند الرقم الهيدروجيني 8 عن مثيلاتها عند الرقم الهيدروجيني 5 و 7 طيلة مدة التجربة في حين تفوقت معنوياً (0.01>) معدلات أقطـار مـستعمرات الأنـواع عنـد الـرقم الهيدروجيني 7 مقارنةً بمثيلاتها عند الرقم الهيدروجيني 5 طيلة مدة الحضن.





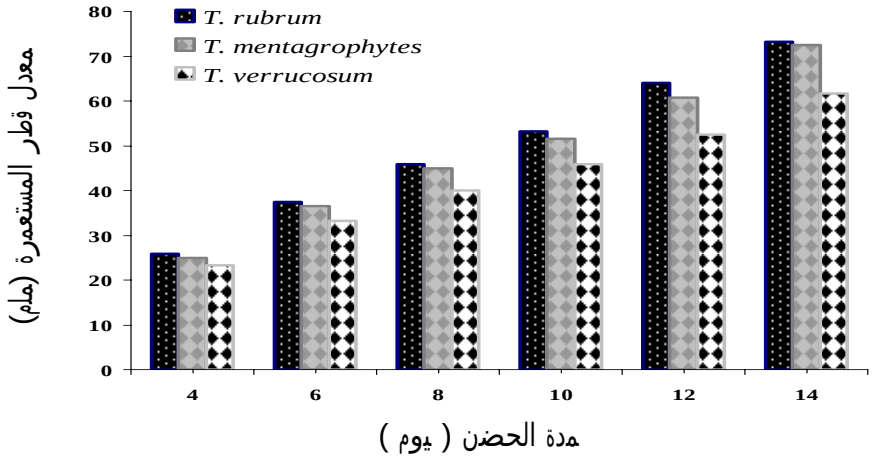


الشكل (4) تأثير الرقم الهيدروجيني في معدلات أقطار مستعمرات الأنواع الفطرية المعزولة النامية على وسط PDA بدرجة حرارة 30 م ولمدة حضن 14 يوماً.

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

4- تأثير مدة الحضن في معدلات أقطار مستعمرات الأنواع الفطرية المعزولة

أظهرت نتائج هذه التجربة (الشكل 5) وجود زيادة معنوية (<0.01) في معدلات أقطار مستعمرات الأنـواع الفطرية *T. rubrum* و *T. mentagrophytes* و *T. verrucosum* النامية على وسط PDA برقم هيدروجيني 6 ودرجة حرارة 30 م طيلة مدة الحضن، إذ بلغت أعلى معدلات لأقطار مستعمرات الأنواع الفطرية في نهايـة مدة الحضن 73.3 و 72.5 و 61.6 ملم بالنسبة لـ *T. rubrum* و *T. mentagrophytes* و *T. verrucosum* على التوالي. بينت نتائج هذه التجربة انخفاضاً معنويـاً (<0.01) فـي معـدلات أقطـار مـستعمرات الفطـر *T. verrucosum* مقارنة بمثيلاتها بالنسبة لـ *T. verrucosum* و *T. mentagrophytes* طيلة مدة الحـضن، في حين لم تظهر فروقات معنوية (<0.01) في معدلات أقطـار المـستعمرات بـين النـوعين *T. rubrum* و *T. mentagrophytes* إلا بعد اليوم الثامن من الحضن، إذ تفوقت معنويا (<0.01) معدلات أقطار مـستعمرات النوع *T. rubrum* مقارنةً بمثيلاتها للنوع *T. mentagrophytes* واستمرت إلى نهاية مدة الحضن.



الشكل (5) تأثير مدة الحضن في معدلات أقطار مستعمرات الأنواع الفطرية المعزولة النامية على وسط PDA برقم هيدروجيني 6 ودرجة حرارة 30 م.

المناقشة

تأثير بعض العوامل البيئية في نمو أنواع جنس *Trichophyton*

1- 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 (2%) في وسط PDA والذي يخلو منه وسطي OMA و RTA (Kurbanoglu & Algur, 2002; Kwon-Chung & Benett, 1992)، 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 10:1 و 4:1 و 3:1 بالنسبة للأوساط PDA و OMA و RTA على التوالي (Wyss *et al*., 2001). يتناسب معدل نمو الأحياء المجهرية طردياً مع تركيز الكربون (الكلوكوز) في الوسط الغذائي ضمن حدود معينة (السعد، 1990). 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, 2000). 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 والكازئين 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*., 2003; Kunert, 2000). 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 أيضا، 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 استنفاذها (السعد، 1990).

B) الوسط الغذائي الملائم للتجرثم

بينت نتائج هذه الدراسة إن الزيادة المعنوية في معدل إنتاج الابواغ الكونيدية على وسط OMA مقارنةً 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 مباشرةً في إنتاج الابواغ الكونيدية (Jackson & Bothast, 1990). وقد جاءت هذه النتائج متوافقة مع ما ذكره Jessup وجماعته (2001) 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 (1987) إن نسبة C:N (5:1) 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 واطئ 10 غرام/لتر من الكلوكوز إلى وسط Water rice أدى إلى زيادة إنتاج الابـواغ الكونيدية للفطر *Dactylaria higginsii* في حين إن ارتفاع تركيز الكلوكوز إلى 100 غرام/لتر سـبب تثبـيط إنتاج الابواغ الكونيدية للفطر نفسه (Wyss *et al.*, 2001)، كذلك أشار الباحث نفسه إلى أن وسط Water rice حفز إنتاج الابواغ الكونيدية للفطر أعلاه ولكن نسبة إنبات الابواغ الكونيدية فيه قد انخفضت بمقدار 50% مقارنة بنسبة الإنبات 100% على وسط PDA. لذلك فان إنتاج ونوعية السبور وقابليته علـى الإنبـات إضـافة إلـى أمراضـيته وضـراوته تتـأثر بتركيـز الكربـون ونـسبته إلـى النتـروجين فـي الوسـط الغـذائي (Jackson & Bothast, 1990).

2- درجة الحرارة

أظهرت نتائج دراسة تأثير درجـة الحـرارة فـي نمـو الأنـواع الفطريـة المعزولـة *T. rubrum* و *T. mentagrophytes* و *T. verrucosum* (الشكل 3-أ-ب-ج) إن لهذه الأنواع القابلية على النمو فـي مـدى حراري يتراوح بين 20-35 م وكان أفضل نمو لهذه الأنواع عند درجة 30 م في حين انخفضت معدلات أقطـار مستعمرات الأنواع الفطرية بصورة كبيرة عند درجة حرارة 20 م مقارنة بالدرجات الحرارية 30 و35 و 25 م، بينما حصل تثبيط كامل للنمو عند درجة حرارة 40 م. إن توقف نمـو الأنواع الفطرية عند درجة حرارة 40 م قد يعود إلى فقدان الغشاء الخلوي لوظيفته الحـيوية أو تحطـيم المكونـات الـسايتوبـلازمية وتحـلل الخلايا (De Maranon *et al.*,1999). ويعزى سبب زيادة النمو في المدى الحراري 20-35 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 الفعاليـات الحيويـة المرتبطـة بنمو الفطر التي تتأثر بتغيـر درجات الحرارة عملية التنفس Respiration processes إذ تـنخفض عملية التـنفس عند خفض درجة الحرارة عن الدرجة المثلى للنمو ومن ثم تتأثر عملية بناء الجزيئـات الكبيـرة Macromolecular وهذا ما يحدث عند خفض درجة الحرارة. في حين أنه عند رفـع درجـة الحـرارة فـإن عملية التنفـس سـوف تتوقف وتؤدي إلى موت الفطر حتى ولو انخفضـت درجة الحـرارة إلى الدرجة المثلى للنمو (Maheshwari *et al.*, 2000). 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، 1990). إن هذه النتائج جاءت متوافقة مـع مـا ذكـره Weitzman and Summerbell (1995) من أن درجة الحرارة المثلى لنمو الفطريات الجلدية تتراوح بين 25-35 م ولا تنمو بدرجة حـرارة 40 م. وجاءت هذه النتائج متقاربة مع ما ذكره Ulifig (2003) من إن الفطريات الجلدية تنمو بمدى حراري يتراوح بين 23-33 م وأفضل نمو لها عند درجة حرارة 29 م. أظهرت نتائج هذه التجربـة وجـود فروقـات معنويـة (<0.01) في معدلات نمو الأنواع الفطرية المعزولة بين درجتي حرارة 30 و35 م، وهذه النتائج غير متوافقة مع ما ذكره Norris وجماعته (1999) من عدم وجود اختلافات في تأثير كل من درجة الحـرارة 30 و 35 م فـي معدل نمو الفطريات الجلدية العائدة إلى الجنس *Trichophyton*، وقد يرجع السبب إلى اختلاف ظروف التجربـة واختلاف النوع كذلك وجد الباحث نفسه إن أفضل نمو لأنواع هذا الجنس يكون بين درجة حرارة 28-30 م وهذه النتائج جاءت مقاربة لنتائج الدراسة الحالية.

3- 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 ناضح نسبياً لهذه الأيونات إلا أن الإنزيمات الموجودة في الغشاء السايتوبلازمي 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، 1990). وقد أظهرت نتائج هذه التجربة (الشكل 4-أ-ب-ج) إن أفضل نمو للأنواع الفطرية المعزولة عند الرقم الهيدروجيني 6 يليه الرقم الهيدروجيني 7 و 5 في حين كان للرقم الهيدروجيني 8 تأثيراً واضحاً في خفض معدلات أقطار مستعمرات الأنواع الفطرية مقارنة بالأرقام الهيدروجينية الأخرى.وقد جاءت هذه النتائج متوافقة مع ما أشار إليه Tanner (1997) من أن الرقم الهيدروجيني 8 يعد غير ملائم لنمو اغلب الفطريات. كذلك جاءت هذه النتائج متوافقة مع ما ذكره Danew & Klossek (1989) الذين أشارا إلى انه في أوساط المحاليل المنظمة يكون أفضل نمو للفطريات الجلدية عند رقم هيدروجيني يتراوح بين 6-7.5 في حين تبدأ هذه الفطريات بالنمو في أوساط المحاليل غير المنظمة عند رقم هيدروجيني يتراوح بين 4-11.

4- مدة الحضن

يزداد معدل النمو للغزل الفطري مع ازدياد مدة الحضن 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* .,2001). إذ أوضحت نتائج هذه التجربة (الشكل 5) إن معدل نمو الأنواع الفطرية المعزولة يتناسب طرديا مع زيادة مدة الحضن، فقد بلغ أقصى معدل للنمو في اليوم 14 من الحضن وهو 73.3 و 72.5 و 61.6 ملم لكل من *T. rubrum* و *T. mentagrophytes* و *T. verrucosum* على التوالي. إن هذه النتائج جاءت متوافقة مع ما ذكره الجنابي (2005) من أن معدل نمو الفطر *M. canis* يزداد تدريجياً مع ازدياد مدة الحضن، إذ وصل نمو هذا الفطر إلى ذروته بعد مدة حضن 14 يوماً على وسط SDA. أشار بعض الباحثين وجود مدد حضن مختلفة لاختبار حساسية الفطريات الجلدية فقد لاحظ Barchiesi وجماعته (2001) و Butty وجماعته (1995) إن الفطر *T. rubrum* ينمو بشكل بطيء بعد مدة حضن 4 أيام لكن 7 أيام كانت كافية لملاحظة نمو الفطريات الجلدية. في حين احتاج Norris وجماعته (1999) إلى 6 أيام لملاحظة نمو الفطريات الجلدية. وأشار Santos & Hamadan (2005) إلى إن زيادة مدة الحضن 10 أيام مقارنة بمدة الحضن 7 أيام معدلات النمو للنوعين *T. rubrum* و *T. mentagrophytes*. تمتلك مدة الحضن تأثير كبير في تجرثم الفطريات الجلدية، إذ لوحظ إن أنواع جنس *Trichophyton* تنتج الابواغ الكونيدية بغزارة بعد مدة حضانة 4 أيام على وسط Heinz oatmeal cereal agar ولم تنتج الابواغ الكونيدية على وسطي Mycosel agar و Potato dextrose agar إلا بعد مدة حضانة 7 أيام (Jessup *et al*.,2000). تختلف مدة الحضن للفطريات الجلدية اعتمادا على نوع الفطر وسلالات النوع الواحد والوسط الغذائي إضافة إلى نوع الاختبار وظروف التجربة (Kunert, 2000).

References

الجنابي، حيدر شخير عبيس. (2005). تأثير بعض العوامل البيئية في نمو الفطر *Microsporum canis* وفعالية إنزيم البروتيز. رسالة ماجستير / كلية العلوم-جامعة بابل.

السعد، مها رؤوف. (1990). فسلجة الأحياء المجهرية. الطبعة الثانية. جامعة بغداد، بغداد.

الراوي، خاشع محمود وخلف الله، عبد العزيز محمد. (2000). تصميم وتحليل التجارب الزراعية، دار الكتب للنشر. جامعة الموصل.

Aubaid, A.H. (1997) Enzymatic activity, purification of keratinase and proteinase and their roles in the pathogenicity and lmmunogenicity 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. (2001). In vitro activity of posaconazole against clinical isolates of dermatophytes. J. Clin. Microbiol., 39: 4208–4209.

Bull, A. T. and Bushnell, M. E. (1976) Environmental control of fungal growth. In the filamentous fungi. (eds. J.E. Smith and D.R. Berry). Edward Arnold. London., 2: 1-26.

Butty, P.; Lebecq, J.C.; Mallie, M. and Bastide, J.M. (1995). Evaluation of the susceptibility of dermatophytes to antifungal drugs: a new technique. J. Med. Vet. Mycol., 33:403–409.

Cuenca-Estrella, M.; Diaz-Guerra, T.M.; Mellado, E. and Rodriguz-Tudela, J.L. (2001). Influence of glucose supplementation and inoculm size on growth kinetics and antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. J. of clin. Microbiol., 39(2): 525-532.

Danew, P. and Klossek, P. (1989) The dependence of the physiological properties of *Trichophyton mentagrophytes* on the pH value of the culture medium . Mycoses; 32(6): 303-308.

De Maranon, I.M.; Chandanson, N.; Joly, N. and Gervais, P. (1999). Slow Heat Rate Increase Yeast Thermotolerance by Maintainining Plasma Membrane Integrity. Biotechnol. Bioeng., 65: 176-181.

Drori, N.; Kramer- Haimovich, H.; Rollins, J.; Dinoor, A.; Okam, Y.; Pines, O. and prusky, D. (2003). External pH and nitrogen source affect secretion of pectatelyase by *Colletrichum gloeosporioides.* App. Environ. Microbiol., 69(6) : 3258-3262.

Hay, R. J. (1986). Chronic dermatophyte infections In : Verbov, J.L.(ed) .New Clinical applications dermatology superficial fungal infections . Butler and Tanner Ltd . London, pp: 21-35.

Jackson, M. A., and Bothast, R. J. (1990). Carbon concentration and carbon-to-nitrogen ratio influence submerged-culture conidiation by the potential bioherbicide *Colletotrichum truncatum* NRRL 13737. Appl. Environ. Microbiol., 56:3435-3438.

Jessup, C. J.; Warner, J. ; Isham, N.; Hasan, I. and Ghannoum, M. A. (2000) Antifungal Susceptibility Testing of Dermatophtes: Establishing a Medium for Inducing Conidial Growth and Evaluation of Susceptibility of Clinical Isolates. J. Clin. Microbiol., 38(1): 341-344.

Kunert, J. (1988). Uutilization of cystine by dermatophytes on glucose- peptone media. Folia Microbiol., 33: 188-197.

Kunert, J. (2000). Physiology of keratinophilic fungi. Revista Iberoamericana de Micologia.,1: 77-85.

Kurbanoglu, E.B. and Algur, Ö. F. (2002). Use of Ram Horn Hydrolyste as a peptone for bacterial growth. Turk. J. Biol.; 26: 115-123.

Kwon-Chung, K. S. and Bennett. E. (1992). Medical Mycology. Williams and Wilkins, 2nd.ed.U. S. A.

Larone, D. H. (1996). Culture and identification of dermatophytes. Clin. Mi-crobiol. Newsl., 18:33-38.

Larone, D. H.; Mitchell, E. and Walsh, T. J. (1999). In Murray, Baron, Pfaller, Tenover and Yolken (ed.), Manual of clinical microbiology, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Maheshwari, R.; Bharadwaj, G. and Bhat, M. (2000). Thermophlic Fungi; their physiology and enzymes. Microbiology and Molecular Biology Review. 63: 461-488.

Meletiadis, 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. Microbi., 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., 40:S9-S13.

Palecek, S.P.; Parikh, A.S. and Kron, S.J. (2002). Sensing, Signalling and integrating physical processes during *Saccharomyces cervisiae* 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 *PRR2*. J. of Bacteriol., 181(24): 7524-7530.

Santos, D.A. and Hamdan, J.S. (2005). Evaluation of broth microdilution antifungal susceptibility testing conditions for *Trichophyton rubrum*. J. Clin. Microbiol., 43: 1917-1920.

Tanner, R.S. (1997). Cultivation of bacteria and fungi. In: Manual of environmental microbiology (ed. Hurs, C.J.; Knudsen, G.R.; Mclnerney, 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. (1995). The dermatophytes. Clin. Microbiol. Rev., 8(2): 240-25.

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., 85:1165-1170.