الفصل الرابع

التحميل والصبغ

● التحميل ● الصبغ

الدرس العملي السابع

أولاً : التحميـل Mounting

التحميل عبارة عن نقل العينة كلها أو جزئها المراد فحصه على الشريحة ثم وضعه في أوساط التحميل الآتية، وذلك حسب طبيعة العينة :

الماء المقطر، أو اللاكتوفينول، أو الجلسرين، أو هيدروكسيد البوتاسيوم المخفف، كما يمكن استخدام بعض المنظفات الخفيفة والسوائل الصابونية. والتحميل نوعان: مؤقت ودائم. ويتم التحميل المؤقت في قطرة من الماء أو الجلسرين أو الكحول المخفف ٣٠٪ أو اللاكتوفينول الشفاف. أما التحميل الدائم فيكون باستخدام مواد تحميل مثل غروي الجلسرين، وكندا بلسم.

١ ـ تقانة وأدوات التحميل

يمكن القيام بالتحميل بالنسبة للعديد من الفطريات دون عمل قطاعات فيما إذا أزيلت الأجزاء الجسدية أو التناسلية من المزرعة أو من الطبقة الأساسية الطبيعية ووضعت هذه العينات في قطرة من التحميل على شريحة زجاجية، أما في حالات الأجسام الثمرية الكبيرة (ثمرة فطر الكمأة مثلاً) فيمكن عمل قطاعات باليد لملاحظة التفاصيل التركيبية، وفي حالة الجسم الثمري الصغير أو عندما يكون الفطر ناميًا على

ورقة نبات فإنه يتطلب وضع العينة داخل قطعة من الجزر، ومن ثم تقطيع قطعة الجزر هذه بما فيها بوساطة موسي، وتوضع القطاعات في قطرات من وسط التحميل المناسب.

٢ ـ تحميل العينات

(ا) تحميل العينات الطرية

يمكن وضع التراكيب الصغيرة الطرية من الفطريات بما فيها القطاعات مباشرة في قطرة ماء مقطر أو وسط تحميل مثل اللاكتوفينول يمكن وضعها على شريحة إذا كانت العينة طرية، كذلك يمكن استخدام منظف خفيف أو سائل صابوني بدلاً من الماء لتقليل فقاعات الهواء، ومما ينبغي الاهتمام به وضع الغطاء ببطء وبزاوية مع التحميل في قطرة ماء حتى لا تتكون فقاعات من الهواء، هذا عند استخدام اللاكتوفينول أو الجلسرين كوسط تحميل، وإذا أردنا الحصول على شريحة دائمة التحميل يستحسن تشميع الشريحة وتثبيتها بمادة الك التي تستخدمها السيدات في تجميل أظافرهن، أو أي مادة أخرى مناسبة، ويجب ألاَّ يكثر من مواد التحميل على الشريحة لكي لا تسيل على حواف الغطاء الزجاجي، وإذا زادت مادة التحميل لزم إزالة الزائد منها قبل غلق حواف الغطاء.

(ب) تحميل العينات الجافة

تستخدم في حالة تحميل جزء صغير من فطر جاف قطرة واحدة من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم المخفف (٢ ـ ١٠٪) بدلاً من قطرة الماء على الشريحة، وذلك لتبليل وانتفاخ التراكيب لتكون في حجمها الطبيعي، كذلك ينبغي تحميل القطاعات الجافة بالطريقة نفسها وذلك في محلول هيدروكسيد البوتاسيوم مع تسخين الشريحة بلطف لزيادة معدل الانتفاخ وتنظيف العينة الجافة.

هناك طريقة أخرى لتحميل العينات الجافة في قطرة من محلول اللاكتوفينول وتغطية العينة وتسخينها على عود ثقاب مشتعل أو لهب بنزن هادىء حتى يبلغ وسط التحميل حد السخونة، ومن ثم يلزم تبريد العينة تمامًا قبل وضعها على المجهر للفحص.

أما بالنسبة للعينات المعتمة مثل الأوراق الجافة ، فعلى الطالب أن يغلي أجزاء صغيرة من العينة لمدة ثوان معدودات، وذلك في أنبوبة اختبار تحوي محلولاً من هيدروكسيد بوتاسيوم (١٠٪) لإزالة الصبغات البنية، ومن ثم تحمل العينة في الماء على الشريحة.

٣ ـ طرق التحميل

تحضير الشرائح لدراسة الفطريات: إذا ما أريد تحضير شريحة من الخميرة أو العفن لدراستها تحت المجهر، يلجأ إلى اتباع ثلاث تقنيات مختلفة، لكل منها محاسنها ومساوئها (Koneman et al., 1978) .

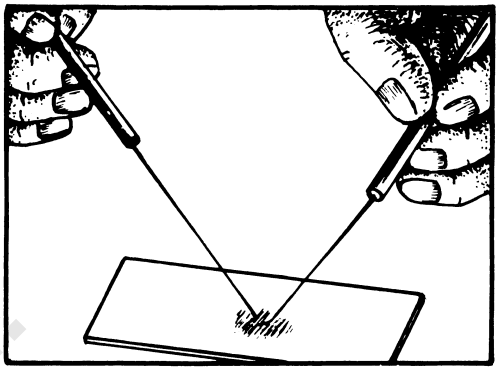
ا) التحميل بالنشر Tease mount technique

تقوم هذه الطريقة على أخذ جزء يسير من مستعمرة نامية على سطح أجار بوساطة إبرة معقمة من قبل، ويوضع هذا الجزء على سطح الشريحة ثم ينشر على هذا السطح بالإبرة ذاتها، تضاف بعد ذلك قطرة من محلول لاكتوفينول Lactophenol وأزرق الأنيلين Aniline blue حيث تعمل هذه الصبغة على قتل العينة وصبغها في الوقت نفسه.

من محاذير هذه الطريقة صعوبة احتفاظ الجراثيم والتراكيب بوضعها الطبيعي، ذلك أن عملية النشر هذه تعمل أحيانًا على تمزيق التراكيب التي يعول عليها في تعريف مثل تلك العينات (شكل ٤ ـ ١).

ب) شريط اسكوتش Scotch tape technique

يستخدم شريط اسكوتش Scotch رقم ٨٠٠ الشفاف بأخذ ٤ سم من الشريط، بحيث يكون الوجه اللاصق مواجهًا سطح المزرعة ويلصق بعناية وحذر شديدين، حيث يوضع الشريط بين إصبعي السبابة والإبهام، وبعد أن تلصق الخيوط الفطرية الهوائية بالشريط يرفع الشريط عن الطبق بلطف ويوضع على شريحة تحتوي على قطرة



فرد العينة على الشريحة بوساطة الإبر.

شكل ٤ ـ ١ . طريقة التحميل بالنشر

من اللاكتوفينول ـ أزرق أنيلين، ثم يتم الفحص باستخدام المجهر، وتعتبر هذه الطريقة أفضل من الطريقة الأولى آنفة الذكر، وذلك لأن الخيوط الفطرية تحتفظ بتنظيمها الطبيعي وشكلها العام في هذه الطريقة، ومما يجدر ذكره أن الطريقة الثانية هذه تتعذر إذا ما أريد تطبيقها على فطريات عفن ذات غزل فطري هوائي قليل. (الشكل ٤ ـ ٢ ، ا ، ب).

جـ) الزرع بالشريحة Slide culture technique

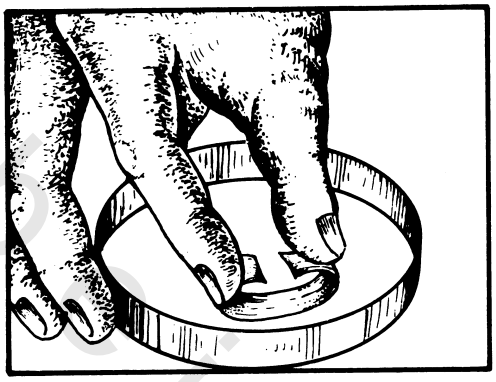
يتم إجراء هذه الطريقة على الفطر حتى يتسنى مشاهدة التراكيب الفطرية، وكيفية وجودها على الحاملات، وكيفية تفرع الخيوط الفطرية، وفضلاً عن ذلك فإنه يمكن قياس أطوال الجراثيم، وبالتالي يسهل التعرف عليها.

١ - يوضع في طبق بتري معقم ساق أو ساقان زجاجيان Glass rods، من المستحسن أن تكون على شكل حرف V، وأن تكون معقمة، ثم يوضع قليل من الماء المعقم بالطبق أو ورق ترشيح مبلل قبل وضع الساق الزجاجية لتوفير الرطوبة اللازمة.

٢ ـ يتم وضع شريحة مجهرية نظيفة ومعقمة فوق الساق الزجاجية.

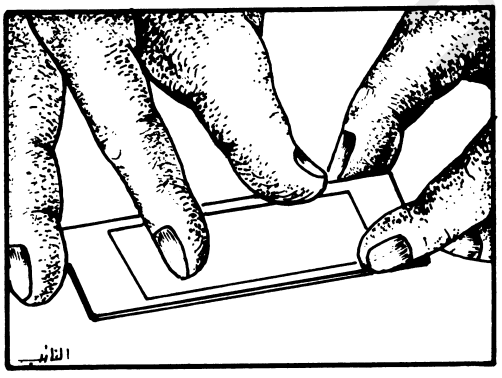
٣ ـ تقطع البيئة الغذائية إلى مكعبات صغيرة بأبعاد ١×١ سم، ويوضع كل مكعب فوق الشريحة الزجاجية.

obeikandl.com



ا

(ا) إلصاق الشريط بالإبهام والسبابة ثم لصق الشريط بقوة على سطح المزرعة.

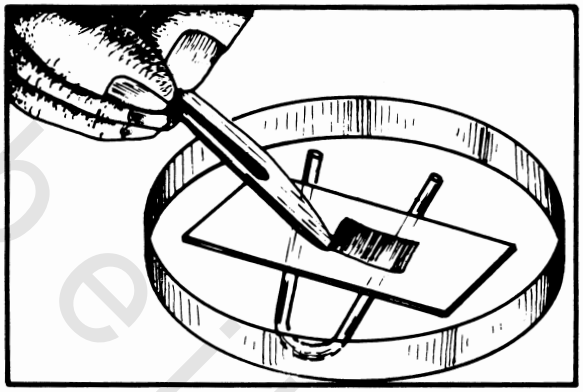


ب

(ب) فرد الشريط الذي يحمل الفطر على سطح الشريحة.

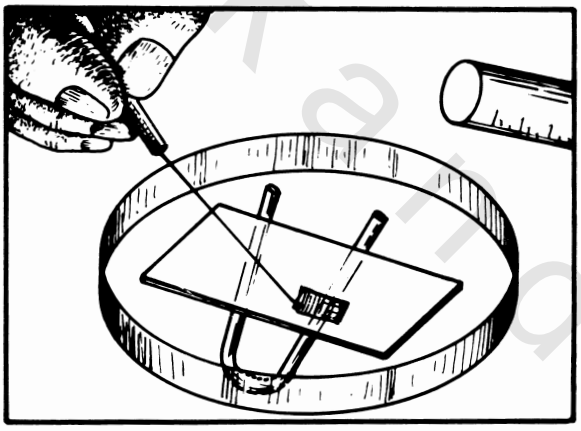
شكل ٤ ـ ٢ . طريقة شريط اسكوتش

٤ ـ يتم وضع كمية صغيرة جدًا من اللقاح على أطراف قطعة الأجار، وتغطى الشريحة بغطاء معقم ثم تحضن لمدة ٤ أيام، وبعد فترة النمو يزال غطاء الشريحة المستخدم ثم يوضع على شريحة تحتوي على قطرة من أحد الأصباغ المناسبة، بعد ذلك تزال قطعة الأجار من فوق الشريحة المستخدمة في الخطوة ٣ وتوضع في محلول فينول ٥٪



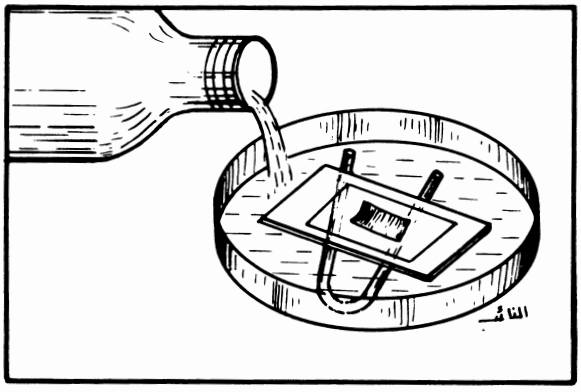
(ا)
الساق الزجاجية وعليها الشريحة وفوقها مكعب البيئة الغذائية.

ا



(ب)
تلقيح مكعب البيئة الغذائية بالفطر المراد زراعته ويغطى المكعب بغطاء معقم.

ب

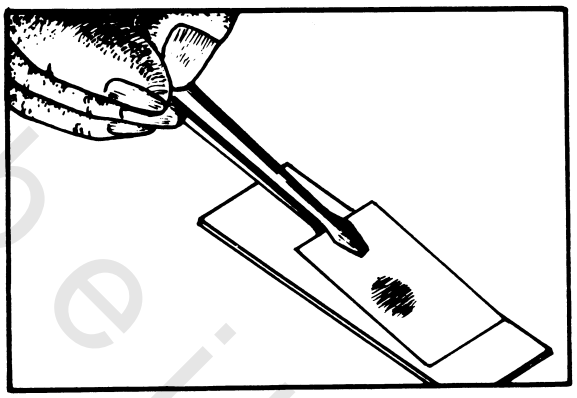


(جـ)
صب قليلاً من الماء القطر المعقم في الطبق ثم تحضن المزرعة

جـ

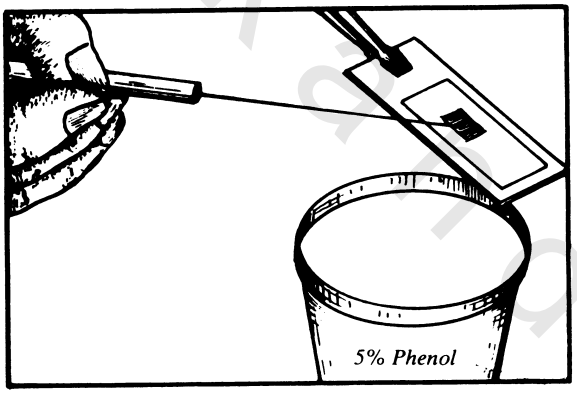
شكل ٤ ـ ٣ . طريقة الزرع بالشريحة

obeikandi.com



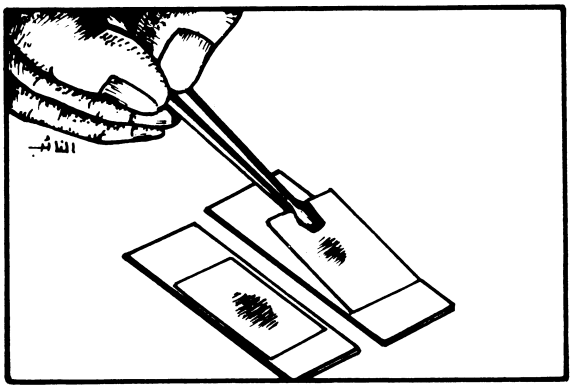
د

(د)
نزع غطاء الشريحة بوساطة الملقط بلطف.



هـ

(هـ)
إزالة قطعة الأجار من الشريحة ووضعها في محلول فينول ٥٪ .



و

(و)
الحصول على شريحتين من هذه الطريقة.

تابع شكل ٤ ـ ٣

للتخلص من قطعة الأجار، ثم تصبغ هذه الشريحة وتغطى بغطاء جديد، فبذا نكون قد حصلنا على شريحتين من شريحة المزرعة، ومن ثم يمكن فحصهما تحت المجهر للتعرف على نوع الفطريات بهذه الطريقة. ومن محاسن هذه الطريقة أنه يمكن الحصول على تركيبات الفطر التفصيلية متكاملة بيد أنها لا تصلح كطريقة سريعة للتعرف على الفطريات. (الشكل ٤ ـ ٣ ، ا ـ و).

ثانيًا : الصبغ Staining

الصبغة هي أي مادة ملونة لها المقدرة على التغلغل والثبات في الأنسجة التي تعامل بها، حتى ولو عوملت فيما بعد بمواد مذيبة للعينات، ويفسر عمل الصبغة تبعًا لأحد رأيين، أولهما يفسر فعل الصبغة كيميائيًا حيث يحدث تفاعل كيميائي بين الجزء الملون من الصبغة وبين مكونات البروتوبلازم. أما الرأي الآخر فهو يفسر عمل الصبغة بذوبانها في المادة التي تصبغها، أي أنه ظاهرة طبيعية، وذلك يحدث عند صبغ بعض المواد الدهنية بصبغة سودان ٣ (Sudan 3)، وقد تحتاج أحيانًا إلى مواد مثبتة للون حتى يبقى مفعول الصبغة. (شعير وقاسم ١٩٨٤).

وتستخدم للفطريات الصبغات التي لها القابلية للذوبان في محلول القتل والتثبيت، كاللاكتوفينول مثلاً، ومن أكثر الصبغات استخدامًا في هذا الصدد صبغة أزرق القطن Cotton blue ، التي تضاف لمحلول اللاكتوفينول بنسبة ١ر٠ ـ ٥ر٠ في الألف، وبذا تتلون النموات الفطرية الشفافة بلون أزرق، وعادة تستخدم الصبغات بأخذ نقطة أو نقطتين من الصبغة ووضعها على العينة المحملة على الشريحة. ولمعرفة تراكيب الصبغات المختلفة يمكن مراجعة ملحق الصبغات.