

الفصل الرابع

التحضيرات الكاملة

The Whole Mounts

توفر التحضيرات الكاملة فرصة لدراسة الحيوان - كله أو جزء منه - للتعرف على أجزائه التشريحية والمورفولوجية. وتتميز التحضيرات الكاملة إلى عدة أنواع منها ما يلي:

١ - التحضيرات الجافة Dry Mounts:

وهي نستعمل للتراكيب التي تكون جافة في الأصل أو يمكن تجفيفها دون إتلافها ومن أمثلتها أصداف المنقبات (الفورامينيفرا) وأشواك الإسفنج والألواح الهيكلية لخيار البحر وأجنحة بعض الحشرات والريش والشعر وقطاعات العظم والأسنان.

وفي حالة ما إذا كانت العينات رقيقة فإنها تفحص في الضوء المار (تمرين ١). أما إذا كانت معتمة فإنها تفحص في الضوء المنعكس (إضاءة من أعلى) (تمرين ٢) وفي معظم الحالات يفضل غمس العينة في وسط تحميل أثناء الفحص لتقليل إعتامها.

تمرين ١: تحضير جاف لعينة شفافة Transparent specimens:

١ - جهز حيزاً له عمق مناسب على سطح شريحة زجاجية (راجع صفحة) باستخدام شرائط من ورق الكرتون بحيث تكون مساحة الحيز مناسبة للغطاء الزجاجي الذي سيستعمل.

٢ - انقل العينة الجافة (مثل الأجنحة الفشائية للحشرات أو الشعر أو الريش أو قطاعات رقيقة في العظم أو الأسنان)، وذلك بواسطة ملقط أو إبرة تشريح إلى الحيز المحدد على الشريحة. وإذا كانت العينة في وسط مائي إنتقلها عن طريق قطارة ولكن بعد أن تتأكد تماماً من جفاف العينة حيث أن العينة الرطبة تسبب تكون غلالة من بخار الماء على السطح السفلي للغطاء الزجاجي مما يعيق فحص العينة.

٣ - ثبت العينة فوق الشريحة باستخدام مادة صمغية ولتكن الكندا بلسم مع ملاحظة أن تكون الكمية المستعملة أقل ما يمكن.

٤ - يغطى الحيز بالغطاء الزجاجي ويثبت في جدران الحيز بواسطة مادة لاصقة سريعة الجفاف مثل طلاء الأظافر.

تمرين ٢: تحضير جاف لعينة معتمة Opaque specimens:

تفحص العينات في هذه الحالة في الضوء المنعكس وستحسن وضع العينات على أرضية ملونة تجهز بواسطة ورق معتم أو طلاء فوق سطح الشريحة. ومن أمثلة العينات التي تفحص بهذه الطريقة

أصداف المثقبات (الفورامينيفرا) وكذلك القطاعات السميكة للعظم. وفي هذه الحالة تتبع الخطوات التالية:

١ - جهاز حيزا ذا عمق مناسب على سطح شريحة زجاجية نظيفة ثم غطّ قاع الحيز بطلاء سريع الجفاف بحيث يكون لونه أسودا إذا كانت العينات بيضاء، أو يكون لونه أبيضاً إذا كانت العينات ملونة ثم انقل العينات بملقط قبل جفاف الطلاء إلى الحيز حتى تثبت العينات داخل الحيز عندما يجف الطلاء. ويمكنك أيضا أن تثبت العينات داخل الحيز بعد جفاف الطلاء بواسطة مادة صمغية مثل الكندا بلسم كما يمكنك استخدام قطعة مناسبة المساحة من الورق المعتم مقسمة إلى وحدات مربعة بواسطة القلم لتكون أرضية تلتصق على الشريحة ثم تحاط هذه القطعة من الورق بشرائط رفيعة من الكرتون لتكوين حيز توضع فيه العينات بعد تصنيفها بحيث يلصق كل طراز من العينات داخل أحد المربعات بواسطة الكندا بلسم.

٢ - بعد تمام جفاف الطلاء والمواد اللاصقة غط التحضير بواسطة الغطاء الزجاجي وثبته في جدران الحيز بواسطة مادة لاصقة.

٤ - تحضيرات التحميل الكامل الرطبة Wet whole mounts :

وهي تستعمل للكائنات الحية صغيرة الحجم أو الأجزاء الصغيرة من الحيوانات حتى يمكن تحميلها على الشريحة الزجاجية وفحصها في الضوء المار.

وفي هذه الحالة غالبا ما تحتاج عينات اللافقاريات أو يرقات الفقاريات الى التخدير أو القتل قبل أن تثبت في المثبت المناسب. ويمكن أن تكون هذه التحضيرات مصبوغة أو غير مصبوغة. وفي العينات المصبوغة تجرى عملية إزالة الماء من العينة بواسطة سلسلة صاعدة من الكحول ثم يتم ترويق العينة بواسطة مروق كيبائى مناسب مثل الزيلول Xylool ثم تحمل على الشريحة في وسط التحميل، وهو عادة مادة الكندا بلسم. أما العينات غير المصبوغة فهي تحمل في الجلسرين أو الجلسرين جيللى.

تثبيت الحيوانات اللافقارية بغرض التحميل الكامل:

الأوليات: يمكن تثبيت الحيوانات الأولية في محلول بوان لمدة تتراوح بين ١٠-٤٠ دقيقة ثم تغسل العينات في ٧٠٪ كحول كما يمكن تثبيت العينات في محلول شاوندين Schaudin أو تشامبى Champy أو هولاند Howland أو رابع أكسيد الأوزميوم Osmium tetroxide.

الجوفمغويات: يفضل تثبيت العينات في محلول بوان ساخن.

التريلاريا والنزيماتودا: تثبت في سبلميت التحليك Acetic-sublimate وفورمول ملهى. وعند تثبيت الدودة الكبدية، فلضمان جودة اتبساط جسم الدودة توضع بين شريحتين زجاجيتين يضمنان معا بواسطة رباط مطاط وتوضع العينة والشريحتان في محلول مثبت مع ملاحظة ابعاد الشريحتين عن بعضها على فترات لضمان وصول المثبت الى العينة. وعندما تبسط العينة تماما تحرر العينة من بين الشريحتين وتوضع في المثبت حتى انتهاء فترة التثبيت.

السستودا: في أى مثبت يحتوي على كلوريد زئبقيك Mercuric chloride .
 الديدان الخيطية: في ٧٠٪ كحول دافئ أو (فورمالين - خليك - كحول).
 المفصليات: تثبت عادة في الكحول أو محلول يوان أو فورمول كحولى أو أى مثبت يحتوي على كلوريد زئبقيك.

وفي حالة الحشرات ينصح أيضا بالمثبت Sinha. ويراعى وضع العينة بعد قتلها على لوح زجاجى ثم يتم فرد زوائد الجسم إلى وضعها الطبيعي بعناية قبل التثبيت ومراجعة ذلك بعد تمام التثبيت.

أولاً: تحضيرات التخميل الكامل غير المصبوغة:
 هناك ثلاثة أنواع من هذه التحضيرات هي:

(أ) تحضيرات تطمر في الهواء:

قد تكون العينة شفافة وترى في الضوء المار مثل الأجنحة الغشائية للحشرات - أو قد تكون معتمة مثل أصداف المثقيات وقطاعات العظم (تمرين ٦) وهي تدرس في الضوء المنعكس ويستحسن وضع العينات على أرضية قائمة. وقت تمت الإشارة إلى هذا النوع من التحضيرات.

(ب) تحضيرات تطمر في وسط تخميل يذوب في الماء:

وهي تستخدم في تحضيرات الديدان الأسطوانية الصغيرة أو بيض الديدان حيث يتم طمرها في الجلسرين (تمرين ٣) أو الجلسرين جيللى (تمرين ٤).

(ج) تحضيرات تطمر في وسط صمغى:

وهي أفضل من النوع السابق فيها لو كان من المرغوب فيه الإحتفاظ بتحضيرات دائمة. ومن المستحسن أن تجرى عملية تبييض Bleaching للعينات التي تحتوي على صبغات كثيفة حتى تصبح أكثر شفافية. وإذا كان المطلوب الحصول على تحضير مسطح للهيكل فيجب إذابة الأجزاء الطرية من جسم الحيوان بأية مادة كيميائية مناسبة (تمرين ٥). ويمكن أن تطمر بعض العينات الجافة (شوكيات - ريش - شعر - الواح هيكلية) بدون أية معاملة سابقة في الوسط الصمغى مباشرة. ولتسهيل ذلك يوضع على العينة قطرة من الزيلول أو التوليول قبل وضع الصمغ وذلك لتجنب تكوين الفقاعات الهوائية حول العينة. كما يمكن طمر العينات داخل حيز خاص ذى عمق مناسب يتم تكوينه على الشريحة باستخدام قطع كرتونية أو معدنية تلتصق على الشريحة باستخدام كندا بلسم. وتشتمل هذه المجموعة من التحضيرات على طمر قطاعات العظم المنحوتة في الوسط الصمغى (تمرين ٧).

تمرين رقم ٣: تحميل كامل غير مصبوغ للديدان الأسطوانية الصغيرة أو بيض الديدان في الجلسرين:

- ١ - بت العينة في ٧٠٪ كحول دافئ لمدة ٢٤ ساعة أو (فورمالين - خليك - كحول)
- ٢ - انقل العينة إلى خليط من الجلسرين ٨٠٪ كحول بنسبة ١ : ٢ بالحجم مع ترك الإناء معرضاً للهواء ليساعد على تبخير الكحول مما يزيد تركيز الجلسرين الذي يتخلل العينة تدريجياً مع ملاحظة عدم تعريض الخليط للتلوث بالغبار. أترك الخليط وبه العينة حتى يقل حجم الخليط إلى النصف تقريباً.
- ٣ - جهز حيزاً ذا عمق مناسب على شريحة نظيفة ثم ضع قطرة من الجلسرين في مركز الحيز وضع العينة فيها باستخدام طرف إبرة أو قطارة أو ماصة صغيرة ثم املاً الحيز تماماً بالجلسرين.
- ٤ - كون فيلماً من بخار الماء على أحد سطحي الغطاء الزجاجي عن طريق تعريضه لبخار الزفير ثم ضعه في وضع أفقي (السطح الرطب إلى أسفل) فوق الحيز على الشريحة ليغطيه تماماً (فيلم بخار الماء يمنع تكوين قطاعات هوائية في الجلسرين) الحم حواف الغطاء مع حواف الحيز باستخدام مادة لاصقة سريعة الجفاف مثل طلاء الأظافر ويستحسن استخدام آلة القرص الدوار Turn table في لصق حواف الغطاء الزجاجي.

تمرين ٤: تحميل كامل غير مصبوغ في الجلسرين جيللي:

- يفضل الطمر في الجلسرين جيللي على الطمر في الجلسرين فقط عند عمل التحضيرات الدائمة ويكون الجلسرين جيللي صلباً في درجة حرارة الغرفة، وعند الاستعمال يتم تحويله إلى الحالة السائلة بتعريضه للحمام مائي (يجب عدم استعمال اللهب المباشر). (انظر الجلسرين جيللي).
- ١ - ثبت العينة في ٧٠٪ كحول لمدة ٢٤ ساعة أو أي مثبت مناسب.
 - ٢ - ضع العينة في خليط من الجلسرين، ٨٠٪ كحول بنسبة ١ : ٢ واترك الإناء معرضاً للهواء ليساعد ذلك على تبخير الكحول مما يؤدي إلى التركيز التدريجي لتخلل الجلسرين داخل العينة. إحترس من تلوث الخليط بالأتربة واترك الخليط وبه العينة حتى يقل حجمه إلى النصف تقريباً.
 - ٣ - ضع شريحة زجاجية نظيفة على لوح تسخين (٤٠-٥٥ م) ثم ضع عليها قطرتين أو ثلاث من الجلسرين جيللي السائل بواسطة قطارة سبق وضعها في ماء ساخن ثم انقل العينة إلى الجلسرين جيللي الموضوع على الشريحة واضبط وضعها بواسطة ابرة تشريح. إذا كانت العينة سميقة ضع حولها قطعاً صغيرة من الزجاج (من غطاء زجاجي للشرائح) حتى تدعم الغطاء الزجاجي عند وضعه فوق العينة.

- ٤ - كون فيلماً من بخار الماء على أحد سطحي الغطاء الزجاجي عن طريق تعريضه لبخار هواء الزفير ثم ضعه في وضع أفقي (السطح الرطب إلى أسفل) فوق العينة المغموسة في الجلسرين جيللي. وإذا كانت كمية الجلسرين جيللي في أحد الجوانب أسفل الغطاء غير كافية أضف مزيداً من الجلسرين جيللي أسفل الغطاء عند ذلك الجانب. أما إذا كانت هناك فقاعة هواء داخل الجلسرين

جبللى فارع الغطاء وأزل الفقاعة باستخدام ابرة ساخنة ثم ضع الغطاء مرة أخرى.

٥ - أزل الزيادة من الجلسرين جبللى على الشريحة بواسطة قطعة قماش مبللة بالماء مع الحفاظ على وضع الشريحة الأفقى وعدم زحزحة الغطاء الزجاجى وإلا تمزقت العينة. كذلك حافظ جيدا على نظافة هذا العطاء لرححى. إحم حواف الغطاء مع الشريحة باستخدام مادة لاصقة سريعة الجفاف مثل سائل طلاء. لاحظوا ويستحسن استخدام آلة القرص الدوار Turntable فى لصق حواف الغطاء الزجاجى.

تمرين ٥: تحميل كامل غير مصبوغ لحيوان من مفصليات الأرجل فى وسط صمغى:

- ١ - ثبت العينة فى ٧٠% كحول ائبلى أو محلول يوان أو زنكر لمدة ٢٤ ساعة.
- ٢ - اجر الخطوات اللازمة بعد التثبيت إذا كانت العينة مثبتة فى محلول يوان أو زنكر.
- ٣ - إن كان من المرغوب فيه الحصول على تحميل مسطح للهيكل فعليك أن تذيب الأجزاء الطرية من العينة بوضعها فى محلول مائى ١٠% أيدوكسيد صوديوم لمدة ١-٣ أيام أو القيام بغليها فى هذا المحلول لمدة نصف ساعة ثم اغسل العينة جيدا بالماء.
- ٤ - إذا كانت العينة محتوية على صبغيات كثيفة فيستحسن إجراء عملية تبييض لها بإحدى الوسائل الآتية:

(أ) ضع العينة فى محلول ٣٠% ماء أوكسجين. وبعد تمام تبييضها اغسلها بالماء ثم انقلها إلى ٧٠% كحول.

(ب) ضع العينة فى ٧٠% كحول ائبلى ثم انقلها إلى محلول مكون من ٥ سم^٣ ٥% هيبوكلووريت الصوديوم + ٩٥ سم^٣ ٧٠% كحول إئبلى. وبعد تمام تبييض العينة اغسلها فى ثلاث تغييرات من ٧٠% كحول، كل تغييرة لمدة ٣٠ دقيقة.

٥ - انزع الماء من العينة بوضعها فى ٩٥% كحول ائبلى لمدة ساعة ثم فى تغييرتين من الكحول المطلق لمدة ساعة لكل تغييرة.

٦ - روق العينة فى تغييرتين من مذيب يذيب كلا من الكحول والصمغ المستخدم، كل تغييره لمدة $\frac{1}{3}$ ساعة على الأقل. ومن أشهر الكيماويات المستخدمة فى هذا الصدد الزيولول والترينول والكاربول، ويفضل الأخيران لأنها لا يسببان جفاف العينة المتزايد كما أنهما يمتصان الماء من العينة إن وجد. ويجب عند تمام هذه الخطوة أن تكون العينة شفافة تماما، وإذا وجدت بها مناطق معتمة بيضاء فهذا يعنى أن عملية نزع الماء من العينة لم تستكمل بعد فى الخطوة السابقة ولذلك يجب إعادة ارجاع العينة إلى الكحول المطلق تغييرتين، ساعة لكل تغييرة وذلك لضمان نزع الماء من العينة قبل عملية الترويق.

٧ - ضع قطرة من صمغ التحميل على الشريحة ثم اغمس العينة فيها وبعد ذلك أضف قطرة أخرى من صمغ التحميل ثم غطى العينة بالغطاء الزجاجى الرقيق. إنقل الشريحة إلى فرن درجة حرارته ٣٧ م لمدة ٢٤ ساعة مع ملاحظة الحفاظ على الشريحة فى وضع أفقى مستو. ويراع أنه فى

حالة ما إذا كانت العينة سميكة فيستحسن أن يستعمل صمغ تحميل غليظ القوام وأن يسخن الصمغ والشريحة قبيل عملية التحميل. ويمكن أيضا في هذه الحالة تحميل العينة على الشريحة داخل حيز خاص يتم تحديده على الشريحة باستخدام قطع من الكرتون أو المعدن تلتصق على الشريحة باستخدام بلسم كندا بحيث يتلامم عمق هذا الحيز مع سمك العينة ويجب بعد تجفيف العينة في الفرن أن يكون التحضير جافا تماما.

تمرين ٦: تحضير للقصبية الهوائية في الحشرات *Insect tracheoles*:

- ١ - حضر محلولاً مشبعا من السودان الأسود Sudan Black في خليط من كميات متساوية من زيت الزيتون Olive Oil والكيروسين. Kerosine.
- ٢ - ضع بعض قطرات من المحلول المحضر على جسم حشرة مخدرة أو مقتولة حديثا.
- ٣ - اغسل الحشرة لثواني قليلة في الزيلول.
- ٤ - افحص الحشرة وهي موضوعة في الهواء أو موضوعة في وسط مائي. لاحظ القصبية الهوائية سوداء حيث أن السائل الأسود جرى فيها طاردا الهواء.

تمرين ٧: تحضير مقاطعات في العظم *Bone preparations*:

- ١ - أزل اللحم المحيط بقطعة العظم المراد أخذ مقاطعات منها ثم جففها تماما.
 - ٢ - اقطع بمنشار في قطعة العظم فاصلا مقاطعات رقيقة بقدر الإمكان بحيث تكون أسطح القطع متوازنة.
 - ٣ - ضع هذه المقطعات في الماء لفترة أسابيع لإزالة التراكيب الطرية منها ثم اغسلها بالماء الجاري لإزالة كل ما يعلق بالعظم من تراكيب غير صلبة.
 - ٤ - إذا كانت قطعة العظم من النوع الإسفنجي فيجب أن تجففها تماما ثم تنقلها إلى الزيلول وتضعها في كندا بلسم متوسط القوام ثم جفف الكندا بلسم (وفيه العينة) في الفرن.
 - ٥ - عالج مقاطعات العظم بمسح حجري مسطح ومبيل بغرض العمل على أن تكون هذه المقطعات رقيقة جدا وشفافة. ويمكن بداية هذه المعالجة بمسح خشن على أن تكون المعالجة في النهاية بمسح ناعم أو قطعة زجاجية.
 - ٦ - اغسل المقطعات لإزالة التراب الناتج عن عملية المسح ثم جففها جيدا.
 - ٧ - أزل الكندا بلسم من العظم الإسفنجي عن طريق إذابته في الزيلول.
 - ٨ - إذا أردت طمر المقطعات في الهواء.. فجهز حيزا فوق شريحة زجاجية نظيفة بحيث يكون نصف مساحة قاع الحيز ملونا بطلاء ويترك النصف الآخر شفافا كما هو. ثبت قطاع العظم بالكندا بلسم عند الخط بين النصفين وبذلك يمكنك أن ترى جزءا من القطاع في الضوء المرار وجزءا آخر في الضوء المنعكس.
- وإذا أردت طمر القطاع في الكندا بلسم فضع قطرة من الكندا بلسم سميكة القوام على سطح

شريحة زجاجية وأخرى فوق سطح زجاجي. اترك الشريحة والغطاء لفترة أيام حتى تزداد غلظة قوام الكندا بلسم. ضع قطاع العظم فوق الكندا بلسم على الشريحة ثم غط القطاع بالغطاء الزجاجي ثم ضع الشريحة فوق لوح تسخين واضغط على الغطاء الزجاجي برفقة حتى يندمج الكندا بلسم الخاص بالشريحة مع ذلك الخاص بالغطاء الزجاجي.

ثانياً: تحضيرات التحميل الكامل المصبوغة:

عادة ما تصبغ التحضيرات الخاصة بالتحميل الكامل بالكارمين (بوراكس كارمين أو ألم كارمين) أو الهياتوكسيلين (هاريس ألم) أو لايت جرين أو فاست جرين.

تمرين ٨: صباغة تحضير كامل بالبوراكس كارمين (جرناشر)

:Borax carmine preparations

- ١ - ثبت العينة في المثبت المناسب وأزل الزيادة من المثبت.
- ٢ - إذا كانت العينة بها مواد صبغية كثيفة أجر لها عملية تبيض.
- ٣ - ضع العينة في ٥٠% كحول لمدة ٢٠ دقيقة.
- ٤ - اصبغ العينة بواسطة جرنا شريوراكس كارمين (مفصليات الأرجل ٩٠ دقيقة. الديدان من ٧-١ أيام).
- ٥ - اغسل العينة في ٧٠% كحول لإزالة الصبغ العالق بالعينة.
- ٦ - أجر تميّزاً للصبغ بوضع العينة في ٧٠% كحول محمض مع ملاحظة أن الأجزاء اللاخوية (الافرازية) من العينة تكون خالية من الصبغ. عملية التمييز قد تحتاج إلى ٢٤ ساعة في حالة الديدان.
- ٧ - اغسل العينة في ٧٠% كحول لإزالة الحمض حتى توقف عملية التمييز.
- ٨ - اصبغ الأجزاء اللاخوية من العينة بصبغ فاست جرين في ٩٥% كحول لمدة $\frac{1}{3}$ دقيقة (قطرتين من محلول مشبع فاست جرين إلى ١٠ سم^٣ ٩٥% كحول).
- ٩ - انزع الماء من العينة بسلسلة صاعدة من الكحول ثم روق العينة في زيت القرنفل Clove Oil ثم حمل العينة في الكندا بلسم.

تمرين ٩: صباغة تحضير كامل لعينات صغيرة الحجم (أوليات - يرقات اللافقاريات - ميدوسات الجوفعمويات) بواسطة ألم كارمين أو هاريس الم هياتوكسيلين:

إذا توفر لديك عدد غير قليل من العينات فيمكنك وضعها في طبق زجاجي صغير ثم ضع المحاليل في ذلك الإناء على أن يتم تغيير هذه المحاليل بسحبها عن طريق قطارة. أما إذا كان عدد العينات قليلاً فيمكنك وضعها على شريحة من ذلك النوع الذي يحتوي على حيز منخفض عند مركزها وتغير المحاليل بواسطة ماصة دقيقة الطرف مع ملاحظة عملية سحب المحاليل عن طريق ميكروسكوب تشريح.

ويراعى في مثل هذه التحضيرات أن تزداد مرات تغير كل محلول عن المعدل العادى حيث انه من الصعوبة سحب كل كمية السائل تماماً في كل تغيره. كما يراعى رج الاناء الزجاجى (أو الشريحة) الحماوية على العينات عند وضع كل محلول تجنباً لتراكم العينات معا في القاع مما يعيق تحلل المحاليل للعينات بصورة جيدة.

١ - ثبت العينات بالثيبت المناسب وأجر المعاملة المناسبة بعد التثبيت.

٢ - انقل العينة من الماء إلى صبغة الالم كارمين أو صبغة هاريس الم هيماتوكسيلين. وفي حالة الصباغة بالأم كارمين افحص العينات على فترات كل ١٠ دقائق بالميكروسكوب حتى تصل إلى التوقيت المناسب لاستكمال صبغ العينة.

وفي حالة الصباغة بالالم هيماتوكسيلين افحص العينات بعد ٢٤ ساعة. وفي جميع الأحوال تفحص العينات بعد نقلها من الصبغ إلى الماء المقطر ويلاحظ أن لون العينة بعد الصباغة سيكون أحمرًا في حالة استخدام الكارمين وبنفسجيا في حالة الهيماتوكسيلين.

٣ - اغسل العينات عدة مرات بالماء المقطر لإزالة الصبغ العالق بالعينات وإذا كنت صبغت العينات بالهيماتوكسيلين ضع العينات لمدة ١٥ دقيقة في ماء الصنوبر أو محلول ضعيف من ايدروكسيد الصوديوم حتى تأخذ العينات اللون الأزرق الزاهى للصبغة.

٤ - إنزع الماء من العينات باستخدام سلسلة صاعدة من الكحولات (٥٠٪، ٧٠٪، ٨٠٪، ٩٦٪ وذلك لمدة ٥ دقائق لكل تغييرة على الأقل أو حتى تهبط العينات في قاع الإناء بعد كل تغييرة).

٥ - إذا أريد عمل خلفية للصبغة فيمكنك وضع العينات في محلول مخفف من صبغة فاست جرين الذائبة في ٩٥٪ كحول (أضف قطرة من محلول مشبع من الصبغ إلى ١٠ سم^٣ من ٩٥٪ كحول) اترك العينات في الصبغ حتى تهبط العينات في قاع الإناء ثم اسحب الصبغ بالقطارة وأضف ٩٥٪ كحول وافحص العينات بالميكروسكوب. ومن الواجب أن يكون لون السيترولان في هذه الحالة أخضر فاتحاً وقد يحتاج الأمر إلى زيادة مدة الصباغة أو زيادة تركيزها. ويمكنك استخدام صبغات أخرى كخلفية مثل أيوسين Y أو أورانج G.

٦ - اغسل العينات في ثلاث تغييرات من ٩٥٪ كحول مع ملاحظة التغير فور هبوط العينات إلى قاع الإناء واحذر من وضع العينات لفترات طويلة في الكحول حتى لا تفقد العينة لون الصبغ.

٧ - ضع العينات في ثلاث تغييرات من الكحول المطلق (٥ دقائق لكل تغييرة) حتى يتم نزع الماء من العينات.

٨ - روق العينة في ثلاث تغييرات من الزيول أو التوليول (٥ دقائق لكل تغييرة).

٩ - انقل العينات إلى زجاجة ساعة مملوءة بكندا بلسم رقيقة القوام (٢٠٪). اترك التحضير في الفرن عند ٤٠° مئوية حتى تزيد قوام الكندا بلسم تدريجياً إلى أن يصل إلى درجة أن يتحول إلى مادة صلبة إذا برد.

١٠ - انقل العينات بالملقط أو بعروة من السلك إلى غطاء زجاجى نظيف موضوع على لوح تسخين وضع حول العينات قطعاً صغيرة من غطاء زجاجى والياف صوف الزجاجى لتقلل من تقلل

الغطاء على العينات ولتساعد على اتخاذه وضعا افقيا فوق الشريحة.

١١ - ضع قطرة من الكندا بلسم عند مركز شريحة زجاجية نظيفة. اقلب الشريحة واجعل الكندا بلسم الذى على الشريحة يلامس الغطاء الزجاجى المرتبة عليه العينات ثم تنتشر على الجوانب حتى حواف الغطاء الزجاجى. ارفع الشريحة واقبلها إلى وضعها العادى بحيث يمسك بها الغطاء الزجاجى ثم ضعها على لوح تسخين فى حرارة ٣٥ م° حتى تجف وتطرد فقاعات الهواء ان وجدت تماما ويلاحظ أنك إذا حملت العينات الصغيرة - المشار إليها فى هذا التمرين بالطريقة العادية فى الكندا بلسم فإن العينات سوف تهرب من أسفل الغطاء الزجاجى.

تمرين ١٠: صباغة العينات فى الكلورازول بلاك إى Chlorazol Black E :

- ١ - ثبت العينات بالمثبت المناسب وأجر المعاملة المناسبة بعد التثبيت.
- ٢ - انقل العينات فى سلسلة متصاعدة التركيز من الكحول حتى تركيز ٧٠٪.
- ٣ - اصبغ العينات فى محلول مشبع من صبغ الكلورازول بلاك إى Chlorazol black E فى ٧٠٪ كحول (حوالى عشرون دقيقة).
- ٤ - اغسل فى ٩٠٪ كحول لمدة تعتمد على سمك العينة.
- ٥ - روى وحمل كالمعتاد.

ملحوظة: هذا الصبغ يصبغ الكيتين وأيضا يمتاز كصبغ عام.

تمرين ١١: صباغة مؤقتة لأنوية الحيوانات الأولية:

- ١ - خذ عينة من مزرعة لحيوانات أولية بخاصة أو انشوطة سلكية معقمة.
- ٢ - لكل قطرة من المزرعة أضف قطرة من ١٪ مثيل جرين فى ١٪ حمض خليك. هذا المحلول يعتبر مثبتا وصبغا فى نفس الوقت.

تمرين ١٢: تحضير مؤقت لصبغة الأهداب والأسواط فى الحيوانات الأولية:

(طريقة نولاند Noland's method)

- ١ - حضر المثبت والصبغ الآتى:
- رطب ٢٠ جم من صبغ جنتيان فيوليت Gentian Violet بكمية قليلة من الماء ثم أضف ٨٠ سم^٣ من محلول مشبع من الفينول فى الماء المقطر، ٢٠ سم^٣ فورمالين، ٤ سم^٣ جلسرين. راع ألا يحتوى محلول الفينول على فينول فى صورة معلق.
- ٢ - احضر قطرة من مزرعة للحيوانات الأولية بخاصة أو انشوطة من السلك معقمة.
- ٣ - لكل قطرة من المزرعة أضف قطرة من المحلول المحتوى على المثبت والصبغ.

تمرين ١٣: تحضير مصبوغ للديدان المفلطحة (التريماتودا):

- ١ - ثبت العينة. وفى حالة العينات الصغيرة، ضع الديدان فى أنبوبة اختبار مملوءة بمحلول ملهى عادى - رج الأنبوبة جيدا لفرد الديدان - تخلص من نصف المحلول بسرعة ثم أضف المثبت. والمثبت فى هذه الحالة هو فورمول ملهى أو ٧٠٪ كمحلول مضاف إليه ٣٪ حمض خليك.

أما في حالة العينات الكبيرة فتراعى الطريقة السابق وصفها عند الحديث عن تثبيت الحيوانات اللاقارية (التريماتودا).

٢ - اغسل العينات في الماء.

٣ - اصبغ العينات لمدة ١٢ ساعة على الأقل في محلول صبغ كركباتريك كارم ألم Kirkpatrick's Carmalum وهو يحضر كما يلي:

خذ ٢٥ جم من الكارمين وأضف عليها ٢٥ سم^٣ من حمض خليك ثلجي، ١٠٠ سم^٣ ماء مقطر. اصحن لمدة ٢٠ دقيقة ثم اغلى على نار هادئة لمدة ساعة. ذوب ٢٥ جم من شب البوتاسيوم Potassium alum في ٥٠٠ سم^٣ من الماء المقطر ثم اضف اليها محلول الكارمين. اغل على نار هادئة لمدة ساعة. برد ثم رشح وضمف ١ جم من حمض الساليسيك أو بلورات الثيمول. هذا الصبغ صالح للاستعمال لمدة عام على الأقل.

٤ - ميز الصبغ في كحول محمض (قد تأخذ هذه الخطوة عدة ساعات).

٥ - انزع الماء في سلسلة متصاعدة التركيز من الكحول حتى ٩٠% كحول (كل تغييرة نصف ساعة على الأقل).

٦ - أكمل نزع الماء في كحول مطلق لمدة ١٢ ساعة.

٧ - روق في Beechwood creosote

٨ - حمل في بلمس كندا. جفف على لوح تسخين.

تحضير الهياكل الحيوانية:

تستخدم مجموعة من الأصباغ لصبغة العظم في وضعه الطبيعي في أجسام الحيوانات الصغيرة أو أجزاء من أجسام الحيوانات الأكبر. ومن أشهر هذه الأصباغ أليزارين ريدس Alizarin red S وتعتمد الطريقة المستخدمة على نزع جلد العينات الكبيرة أو العينات كثيفة الشعر ثم تعامل العينة بمحلول مخفف نسبيا من إيدروكسيد الصوديوم لجعل العضلات شفافة (ولا يزيل العضلات) وتعمل على أن يصبغ الصبغ المادة العظمية فقط وعادة ما توضع العينات الكبيرة بعد صباغتها في الجلسرين داخل برطمانات زجاجية. أما العينات الصغيرة فيمكن تحميلها على شرائح زجاجية في الجلسرين أو الجلسرين جيللى أو الصمغ.

تمرين ١٤: تحضير كامل مصبوغ للعظم:

١ - ثبت العينة في ٩٥% كحول.

٢ - انقل العينة إلى ٢% إيدروكسيد بوتاسيوم حتى يظهر العظم من خلال العضلات وعادة ما تحتاج هذه العملية أكثر من ٢٤ ساعة.

٣ - إنقل العينة إلى صبغ اليزارين ردس (١ : ١٠,٠٠٠) مذابة في ١% إيدروكسيد الصوديوم. اترك العينة في المحلول حتى يأخذ العظم اللون الأحمر وإذا أصبح محلول الصبغ عديم اللون قبل أن يأخذ العظم اللون المناسب فعليك أن تغير الصبغ، وعادة ما تحتاج العينة ٢٤ ساعة في الصبغ حتى تتلون باللون المطلوب.

٤ - انقل العينة إلى ٨٠٪ كحول. وإذا كانت العضلات بالعينة قد أخذت لون الصبغ أيضا فعليك أن تترك العينة في الكحول حتى يزول لون الصبغ من العضلات.
 ٥ - احفظ العينات الكبيرة في برطانات مملوءة بالجلسرين. أما العينات الرقيقة فيمكنك تحميلها في الجلسرين أو الجلسرين جيللي (تمرين ٤، ٥). أما إذا كنت تريد تحميلها في الصمغ فعليك أن تستكمل خطوات نزع الماء من العينة بوضعها في تغييرتين من كل من ٩٥٪، ١٠٠٪ كحول ثم تروق العينة بوضعها في تغييرتين من الزيلول على ألا يقل زمن كل تغييرة في هذه المحاليل عن ٤٥ دقيقة.

تمرين ١٥: تحضير كامل مصبوغ للغضروف:

- ١ - ثبت العينة في ١٠٪ فورمالين متعادل.
- ٢ - اغسل العينة بالماء.
- ٣ - انزع الماء من العينة بوضعها في سلسلة صاعدة من الكحولات بتركيز ٣٠٪ ثم ٥٠٪ ثم ٧٠٪ ويعتمد وقت كل تغييرة على حجم العينة وهو بصفة عامة لا يقل عن ٢٠ دقيقة.
- ٤ - اصبغ العينة في محلول ٠,٢٥٪ تولويدين بلو مذابا في ١٪ حمض هيدروكلوريك في ٧٠٪ كحول وقد تحتاج عملية الصباغة إلى أكثر من ٢٤ ساعة.
- ٥ - اغسل العينة في ٧٠٪ كحول لإزالة الصبغ العالق بالعينة.
- ٦ - أزل الصبغ الزائد الموجود بالعضلات في العينة بوضعها في ٠,٢٥٪ حمض هيدروكلوريك في ٧٠٪ كحول.
- ٧ - أزل الحمض من العينة بغسلها في ٧٠٪ كحول.
- ٨ - انزع الماء من العينة بوضعها في سلسلة صاعدة من الكحول (٨٠٪، ٩٠٪، ٩٥٪، تغييرتين من ١٠٠٪ كحول) على أن تترك العينة في كل محلول مدة ٣٠ دقيقة على الأقل.
- ٩ - روق العينة في تغييرتين من الزيلول أو التولول، بوضعها في كل تغييرة مدة ٣٠ دقيقة على الأقل.
- ١٠ - حمل العينة في صمغ الكندا بلسم.