المختبر الثاني

تحضير الشرائح
الطحالب الدايتومية:

تتطلب الدراسة النوعية للهائمات النباتية من الدايتومات توضيح هياكلها اولا وذلك بسبب عدم التمكن من تشخيصها اعتمادا" على شكلها وهي حية بسبب تشابهها ولذلك يلجأ الى اكسدة المادة العضوية للخلايا و الابقاء على الهيكل السيلكوني الذي يكون ذو صفات تشخيصية جيدة لغرض التصنيف وتتم الاكسدة باستخدام احد المواد المؤكسدة القوية مثل بيروكسيد الهايدروجين و حامض النتريك و حامض الهايدروكلوريك مع حامض النتريك و حامض الكروميك و يعتبر حامض الكروميك من اقوى الحوامض و اكثرها استخداماً لهذا الغرض و يتم توضيح هياكل الدايتومات باستخدام هذا الحامض بالطريقة التالية :

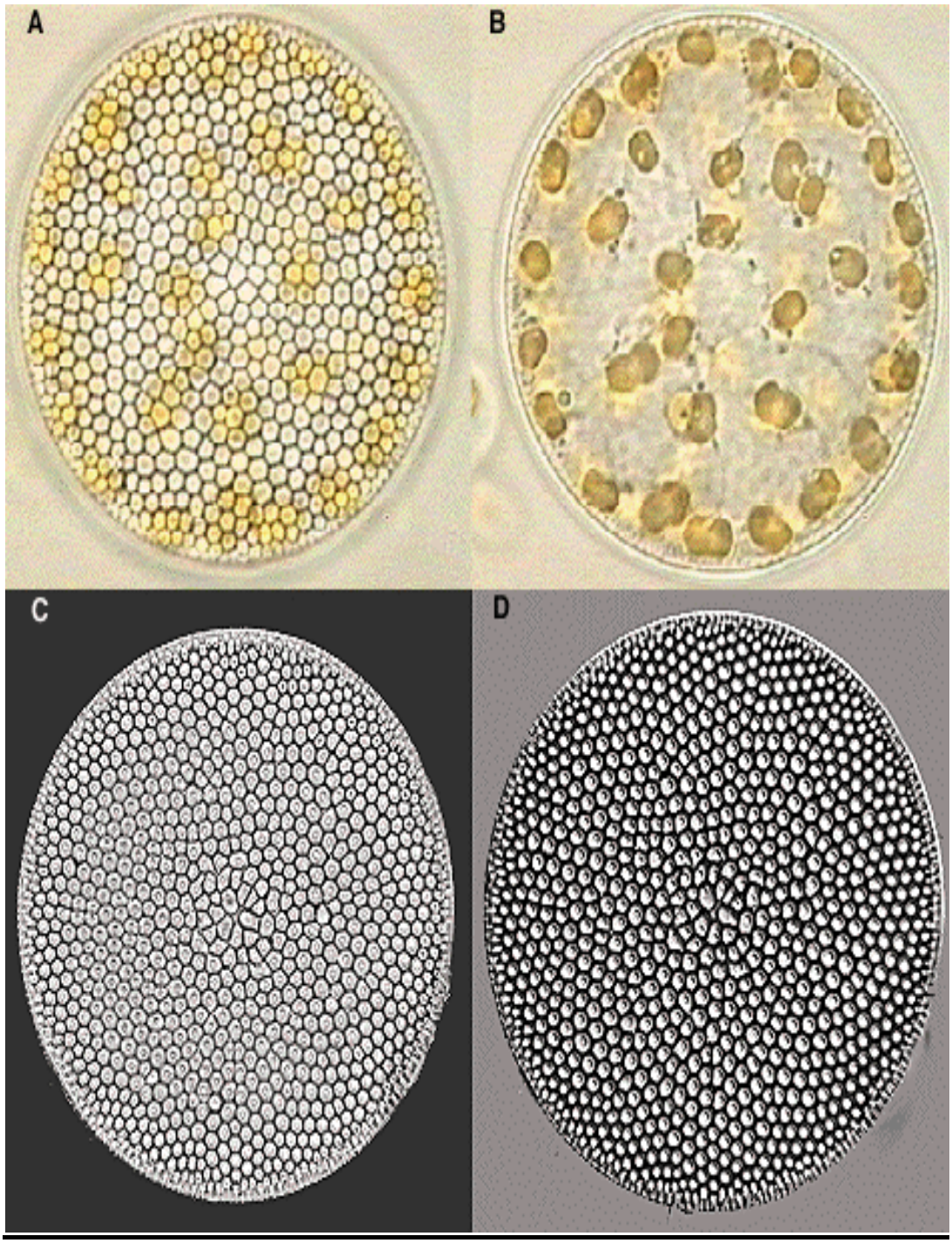
ترج العينة المركزة بشكل جيد ثم يوضع حجم معين منها في وعاء زجاجي مصنوع من البايركس , و يضاف اليها حامض الكبريتيك المركز بمقدار 1-2 حجم الى حجم واحد من العينة ثم يوضع الوعاء الزجاجي في حمام المائي بدرجة الغليان لمدة عشر دقائق مع التحريك المستمر لكي لا تتجمع الرواسب في قعر الوعاء . و عند تأكسد المواد العضوية تماما تضاف كمية قليلة جدا من دايكرومات البوتاسيوم حتى يصبح لون المحلول احمر الى بني . يترك المحلول بعدها لكي يبرد و يستخدم الطرد المركزي للتخلص من الراشح و يغسل الراسب بعدها عدة مرات بالماء المقطر مع استخدام الطرد المركزي بعد كل مرة و لفترة عشر دقائق بسرعة 2500-3000 دورة بالدقيقة للتخلص من الحامض . تضاف بعد ذلك عدة قطرات من الفورمالين لكي يمنع نمو الفطريات و البكتيريا , او يمكن إن يحفظ الراسب في المرة الاخيرة باستخدام الكحول الاثيلي بدلاً من الماء .

وهناك طريقة اخرى اكثر سهولة وصفت من قبل Al-Handal (1984) وتتلخص باستخدام مادة بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 تركيز 30% حيث يمزج حجم واحد من العينة مع 1.5— 2 حجم من مادة بيروكسيد الهيدروجين وتسخن الى ان يبقى نفس حجم العينة الاصلي بعد ذلك نستخدم الطرد المركزي لغسل العينة بالماء المقطر لاربع مرات على الاقل للتخلص من بقايا البيروكسيد او نستخدم الغسل للعينة بواسطة الترشيح عبر ورقة الترشيح وتغسل لاربع مرات على الاقل بالماء المقطر .

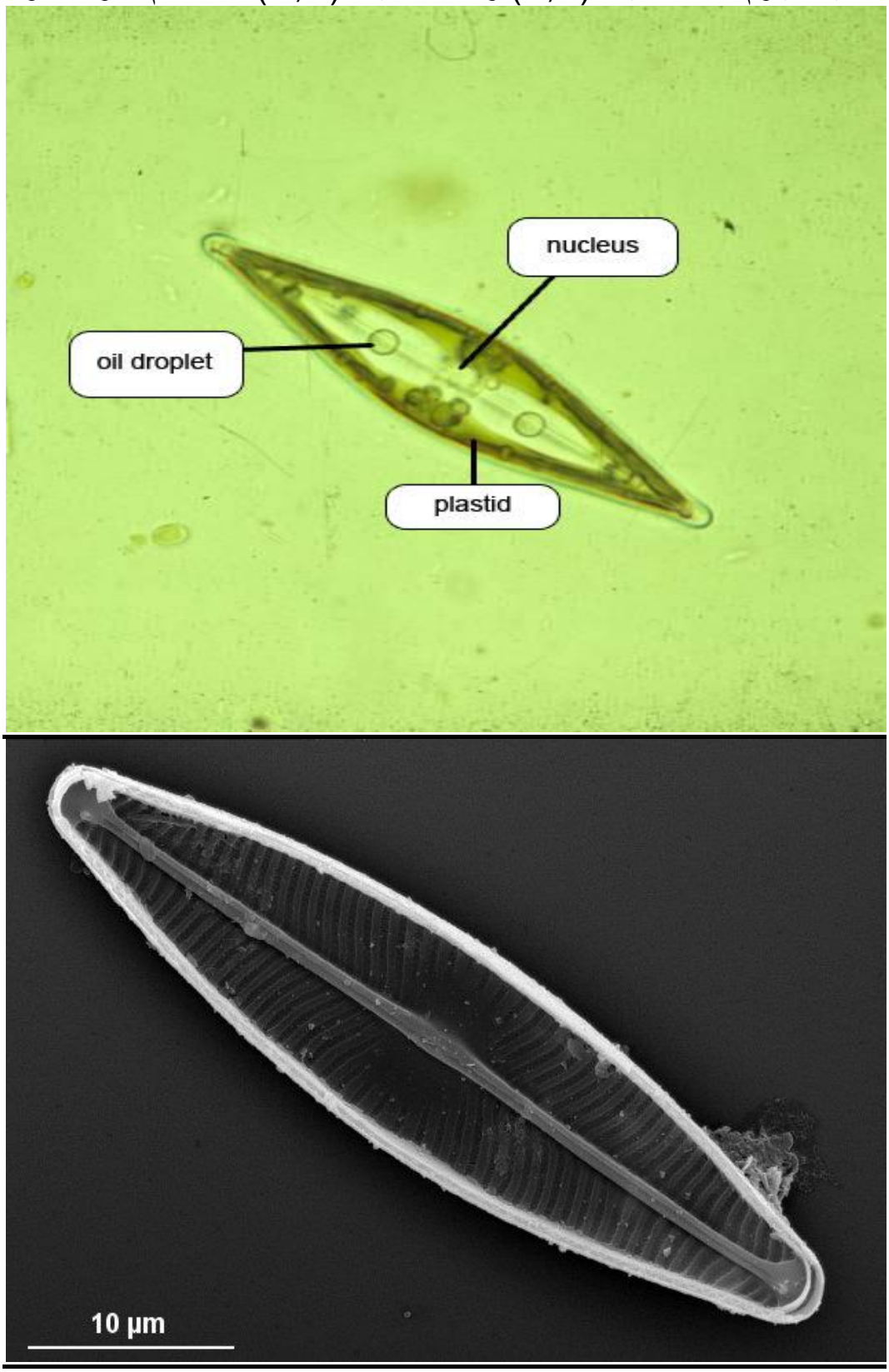
والطريقة الثالثة تتلخص بمزج العينة مع البروكسيد بنفس الحجوم اعلاه وتركها بدرجة حرارة المختبر لاربعة ايام على الاقل او وضعها في الفرن على

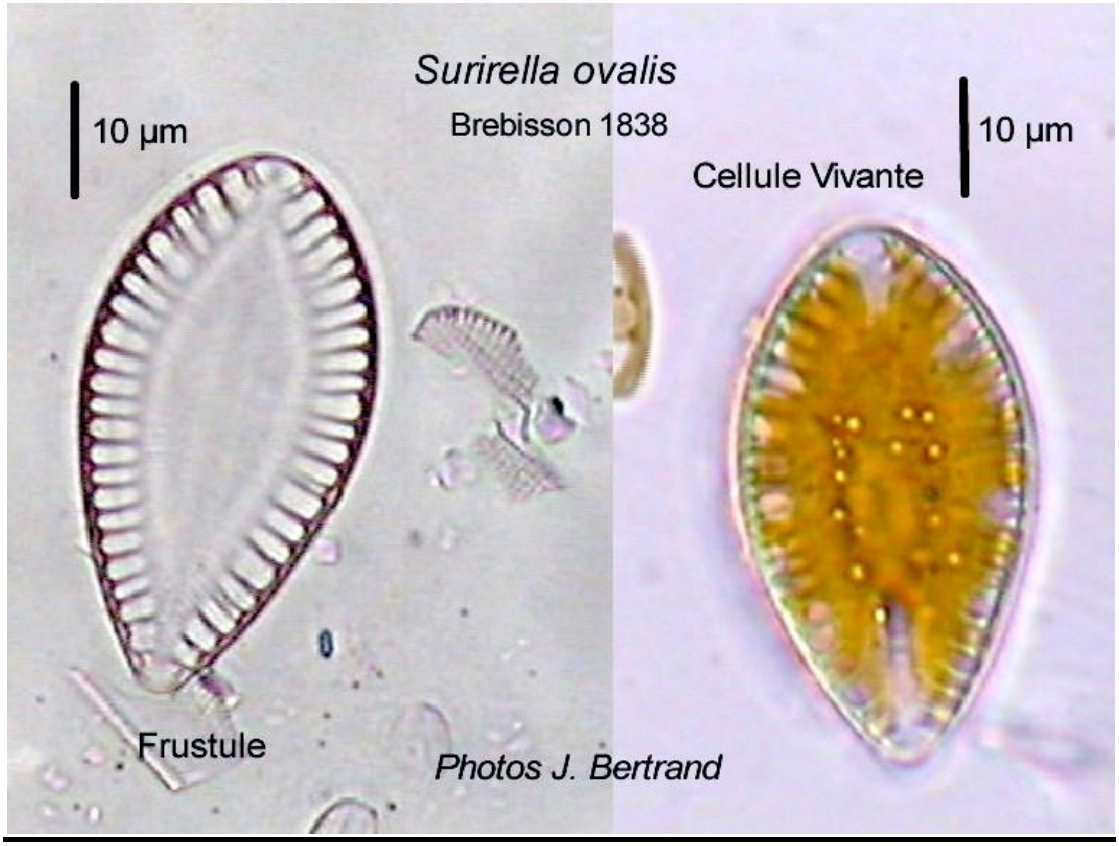
حـرارة 60 درجـة مئويـة لمـدة يـومين علـى الاقـل ثـم نتبـع نفـس عمليـة الغسـل الموضحة سابقا".

ملاحظة مهمة: المواد الموكسدة المستخدمة في الطرق اعلاه مواد خطرة ويجب الحذر جدا" عند استخدامها.



شكل (6): خلية دايتوم قبل التنظيف (A,B) وبعد التنظيف (C,D) باستخدام المواد المؤكسده





تحضير الشرائح:

شرائح الدايتومات المؤقتة :

توضع قطرة من العينة الموضحة (المنظفة) على شريحة نظيفة و تفحص بالطريقة المباشرة بعد وضع غطاء الشريحة .و هذه الطريقة مفيدة جداً للتعرف على الاوضاع المختلفة للخلية الواحدة نظرا لسهولة تحريك غطاء الشريحة .

شرائح الدايتومات الدائمية:

توضع قطرة من العينة الموضحة (المنظفة) على شريحة نظيفة و تترك الشريحة على صفيحة تسخين خاصة بالشرائح حتى الجفاف و بدرجة حرارة 75-80 درجة مئوية ثم توضع قطرة من احد مواد التحميل ذات معامل الانكسار العالي مثل مادة النفراكس او الهايراكس (معامل الانكسار = 1.7) على غطاء الشريحة و يقلب الغطاء على بقعة العينة الجافة ثم تترك الشرائح على صفيحة

التسخين الى اليوم التالي لغرض التوزيع المتجانس لمادة التحميل على الشريحة , تبرد الشرائح بعد ذلك و تطلى حافات غطاء الشريحة باستخدام صبغ الاظافر لتثبيت الغطاء بصورة دائمية ثم يثبت لاصق لتعليم الشريحة بالمعلومات الخاصة بالعينة التي تتضمن الموقع و تاريخ الجمع او اية معلومات اخرى .

وهناك طريقة احدث تتلخص بوضع قطرات مناسبة من العينة الوضحة على غطاء الشريحة cover slid وتترك لتجف في حرارة المختبر او في غرفة التجفيف ثم نضع قطرة مناسبة من مادة التحميل على شريحة نظيفة slide ونقلب عليها غطاء الشريحة الجاف ثم نسخنها باستخدام صفيحة ساخنة Hot plate حتى نتخلص من فقاعات الهواء وكذلك لتسريع تجفيف وتجمد مادة التحميل بعدها نقوم بتبريد الشريحة من خلال ابعادها عن الصفيحة الساخنة.

شرائح الطحالب غير الدايتومية

الشرائح المؤقتة:

يمكن تحضير شرائح مؤقتة للهائمات النباتية غير الدايتومية بطريقة الفحص المباشر و ذلك باخذ قطرة من العينة المركزة و وضعها على شريحة نظيفة ثم تغطيتها بغطاء الشريحة و فحصها تحت القوة المناسبة , اذا كانت الهائمات في العينة بطيئة الحركة او غير متحركة او محفوظة . اما اذا كانت الهائمات سريعة الحركة او غير محفوظة فهناك عدة وسائل لعمل الشرائح المؤقتة و منها :

1- طريقة ورق تنظيف العدسات : توضع قطعة صغيرة من ورق تنظيف العدسات فوق الشريحة الزجاجية ثم توضع قطرة من العينة المركزة فوقها و عند تغطية الشريحة بالغطاء نلاحظ تكون ردهات صغيرة بين الورق تحتجز الهائمات فيها فتبطئ حركتها .

2- طريقة الاكار :تعتمد هذه الطريقة على مزج الوسط الحاوي على العينة بحجم مساوي له من الاكار بتركيز 0.5 % فيزداد قوام الوسط و تبطئ الحركة فيه .

3- طريقة التخدير : ذلك باستخدام المواد المخدرة مثل Chloral hydrate او المياه الكربونية لفترة دقيقة واحدة تقريباً.

4- استخدام مادة الكليسيرين : وهي مادة زيتية تعمل على ابطاء وايقاف الحركة وتحافظ على شكل الخلايا ويكفي اضافة قطرة واحدة منها لغرض الفحص.

الشرائح الدائمية:

يمكن تحضير شرائح **شبه دائمية** للهائمات النباتية غير الدايتومية تمكننا من الفحص لفترات طويلة نظرا لان الشرائح المؤقتة ذات الوسط المائي تكون عرضة للجفاف مما يسبب تلف النموذج و الشرائح شبه الدائمية يمكن تحضيرها باضافة الكليسرين 4% بصورة تدريجية وصولا الى تركيز 100% يتم بعدها طلاء جوانب الغطاء باحد المواد المانعة للتبخر كالفازلين او صبغ الاظافر .اما **الشرائح الدائمية** فتتطلب امرار العينة في سلسلة من التحضيرات المجهرية و تشمل الغسل Washing و سحب الماء Dehydration و التصبيغ Staining و التشريب Infilteration و التحميل Mounting . الغسل و يتضمن تخليص العينة من الشوائب باستخدام الماء المقطر لعدة مرات مع استخدام الطرد المركزي, اما سحب الماء فيتطلب امرار العينة في تراكيز مختلفة من الكحولات (30-100%) يتخلل ذلك استخدام الصبغات المختلفة . و تستخدم عادة اصباغ الاخضر السريع و الاحمر المتعادل للكشف عن السايتوبلازم و النواة , بينما يستخدم محلول لوكل للكشف عن النشأ كما يستخدم الحبر الهندي لتوضيح وجود الغلاف او الغشاء المخاطي حول الخلايا.

تحضر صبغة الاخضر السريع من اذابة 1 غم من الصبغة في 100 سم ^{3} من الكحول الاثيلي (95-100 %) . و يحضر الاحمر المتعادل من اذابة 0.1 غم من الصبغة مع 0.2 سم ^{3} من حامض الخليك في 100 سم ^{3} من الماء المقطر . اما التشريب فيتطلب امرار العينة بتراكيز مختلفة من الزايلول او الكلوروفورم .

توضع العينة بعد ذلك على الشريحة ثم تغطى بالغطاء بعد إن توضع عليه بضعة قطرات من مادة التحميل اللاصقة مثل **كندا بلسم** Canada balsam . ثم تطلى حافات الغطاء باحد المواد المانعة للتبخر و تعلم الشريحة بالمعلومات الطلوبة على احد جوانبها.