الاجهزة والمواد المستعملة
Lab 1

Dr. Hiba Fouad Abdulfatah

أنواع المجاهر Types of Microscopes

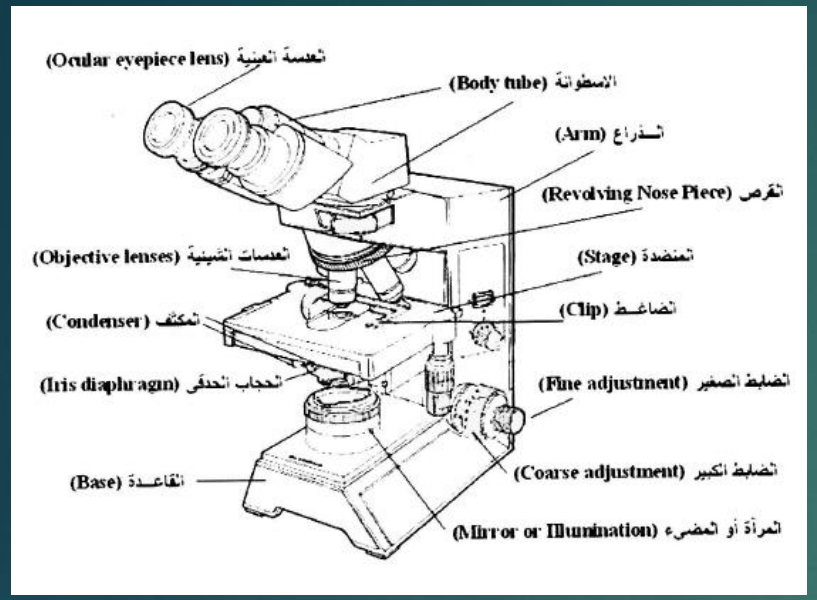
هناك العديد من المجاهر التي تستخدم في حقل الفطريات والأحياء المجهرية، فمنها البسيط ومنها المعقد الذي يستخدم في المجالات البحثية والمزودة بأجهزة تصوير وكاميرات دقيقة وحساسة لأخذ الصور الفوتوغرافية للنماذج التي يتم فحصها. فلا بد للطالب ان يتعرف على انواع المجاهر التي يحتاجها في مختبر الفطريات وهي:

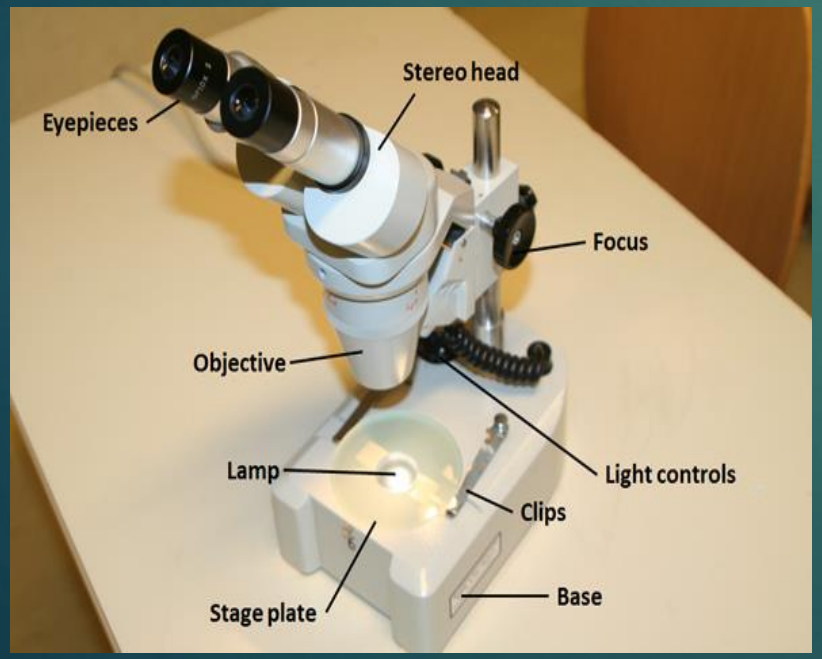
1- مجهر مركب Compound microscope

وهو النوع الأكثر استخداماً في فحوصات الفطريات أثناء العمل داخل المختبر ويعمل بمنظومتين من العدسات (الشيئية والعينية) تعطي العدسة الأولى صورة كبيرة للنموذج، ثم تقوم العدسة الثانية بتكبير الصورة الناتجة عن العدسة الأولى.(شكل 1)

2- مجهر للتشريح Dissecting microscope

وهو مجهر ضوئي يستعمل لتكبير المواد الخاضعة للتشريح، وغالباً ما يتم فحص النماذج المصابة بالفطريات أو الحاملة لها بشكل مباشر دون الحاجة إلى عمل شرائح زجاجية من النموذج. (شكل 2)





العدسات تحمل أرقاماً تبين عدد مرات التكبير. ويمكن حساب عدد مرات التكبير للنموذج المفحوص بضرب الرقم على العدسة العينية بالرقم على العدسة الشيئية التي يتم من خلالها فحص النموذج ، كما في أدناه.

قوة تكبير النموذج = قوة تكبير العدسة العينية × قوة تكبير العدسة الشيئية

معايرة المجهرة Calibration of the microscope

ان قياس أحجام وأبعاد التراكيب الفطرية الدقيقة من الأمور المهمة في مجال دراسة الفطريات وهذا يتطلب إجراء تعيير أو تنظيم للمجهر قبل استخدامه لهذا الغرض من خلال استخدام المواد وكما يأتي:

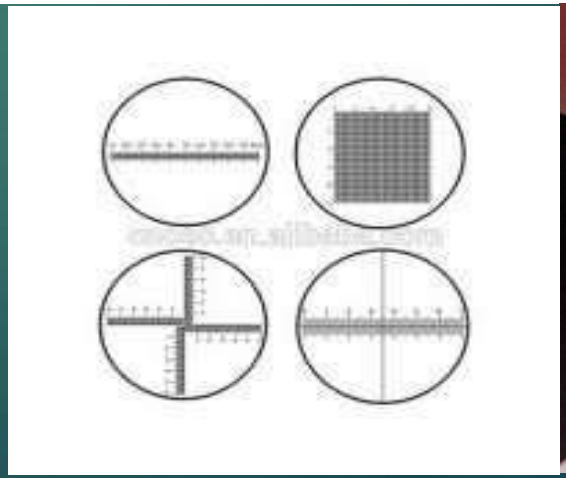
المواد Materials

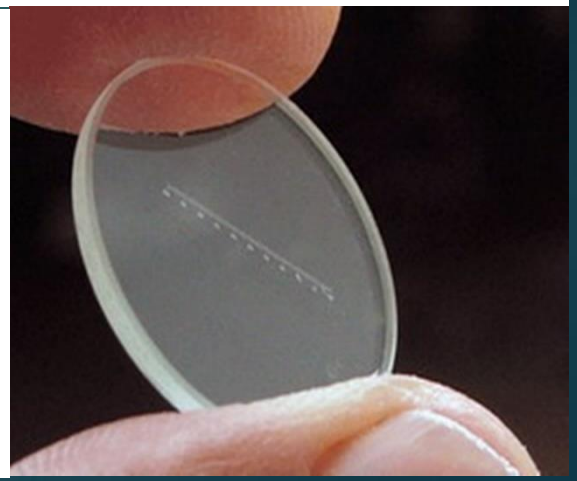
1- المسطرة المجهرية العينية Ocular micrometer

وهي عبارة عن عدسة تشبه العدسة العينية إلا أنها تحتوي على مقياس مدرج دقيق مكون من 50 أو 100 جزء ولا توجد قيمة لكل جزء من هذه الأجزاء لأنها ستخضع للتعيير باستخدام المسطرة المجهرية الشينية.

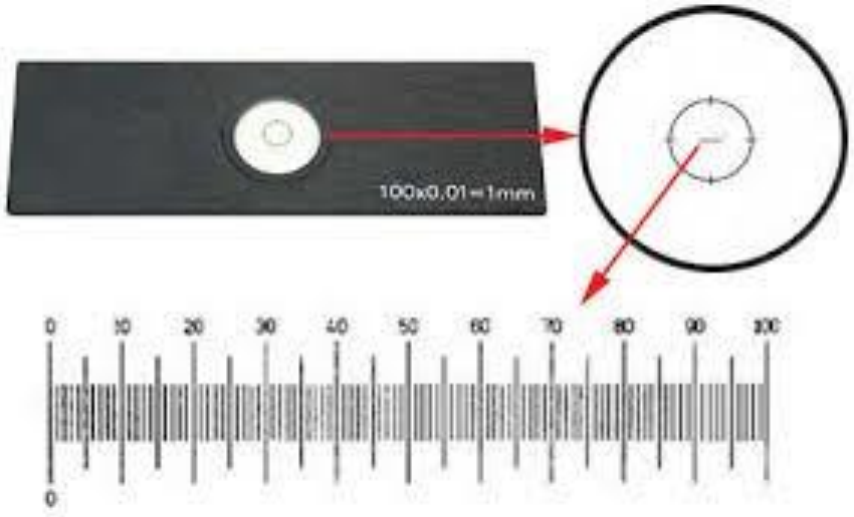
1-3) Turn the bracket at the end of eyepiece and remove

4-5) Insert an ocular micrometer to the bracket with printed side facing down, then put it back to the eyepiece.





2- المسطرة المجهرية الشيئية Stage (Objective) micrometer



وهي عبارة عن شريحة زجاجية تشبه الشريحة الاعتيادية إلا أنها تحتوي في وسطها على مقياس مدرج دقيق مقسم إلى أجزاء وكل جزء يعادل 0.1 ملم ومقسم إلى عشرة اجزاء صغيرة، أي ان كل جزء يعادل 0.01 ملم (10^{-2} ملم).

طريقة العمل Procedure

1- تستبدل العدسة العينية للمجهر بالمسطرة المجهرية العينية.

2- توضع المسطرة المجهرية الشيئية على مسرح المجهر.

3- اختيار قوة التكبير المناسبة (العدسة الشيئية ×4 أو ×10 أو ×40).

4- توضح الصورة بمساعدة منظمات المجهر ويتم مطابقة المقياسين بتحريكهما وجعلهما متوازيين ومتطابقين.

5- يتم تحريك المسطرة الشيئية لحين تطابق بداية المقياس فيها مع بداية المقياس في المسطرة العينية، ثم يتم مطابقة الخط الأخير من مقياس المسطرة العينية مقابل الخط المقابل له في مقياس المسطرة الشيئية أوالخط الأقرب له، فمثلا قد يتطابق الرقم الأخير (الـ 50) من المسطرة العينية مع الرقم 0.16 ملم من المسطرة الشيئية وكما موضح في الشكل (2-1) أدناه، وعليه يتم احتساب قيمة كل جزء من المسطرة العينية حسب المعادلة التالية:

$$\text{الجزء الواحد من المسطرة العينية} = \frac{\text{(0.16 ملم من الشيئية}}{\text{50 جزء من العينية}} = \frac{\text{160 مايكرون}}{\text{50 جزء}} = \text{3.2 مايكرون}$$

6- ترفع المسطرة الشيئية وتوضع محلها الشريحة الزجاجية الحاملة للنموذج المطلوب قياس طوله فإذا وجد أن طول النموذج يغطي خمسة أجزاء من المسطرة العينية فيتم ضرب هذا الرقم بقيمة الجزء الواحد وهو 3.2 مايكرون لتصبح قيمة طول النموذج هي حاصل ضرب الرقمين (5 × 3.2 = 16 مايكرون).

مثال:

لنفترض إنك استخدمت العدسة العينية المقسمة إلى 100 جزء والعدسة الشيئية ذات التكبير العالي وعند مطابقتهما كما ورد في أعلاه وجدت أن الخط الأخير من المسطرة العينية (الرقم 100) قد تطابق مع الخط الأول من المسطرة الشيئية وهو الرقم 0.1 ملم (100 مايكرون)، المكون من عشرة أجزاء دقيقة،

إذاً فإن الـ 100 جزء من المسطرة العينية = 100 مايكرون من المسطرة الشيئية

أي أن الجزء الواحد من العينية = 1 مايكرون

فإذا رفعت المسطرة الشيئية ووضعت مكانها الشريحة الزجاجية المجهزة لقياس ما عليها من نموذج فطري ووجدت أن النموذج قد غطى عشرة أجزاء من المسطرة العينية فإن ذلك يعني أن طوله أو قطره يساوي 10 مايكرون وهو حاصل ضرب قيمة الجزء الواحد بطول النموذج (1×10=10 مايكرون).

الأجهزة المختبرية

الأجهزة المختبرية Equipments

وهي الاجهزة التي تستخدم في تهيأة وتحضير الأوساط والبيئات الغذائية لتنمية الفطريات، وحضن وحفظ مزارع ونماذج الفطريات مكملة لما ورد ذكره من أدوات ومعدات، وتشمل الأجهزة ما يأتي:

1- المجهر **Microscope**

وهو من الأجهزة المهمة جداً التي يتوجب توافرها في مختبر الفطريات ويستخدم لفحص ودراسة التراكيب الفطرية الدقيقة والتعرف عليها لأنه يستطيع تكبيرها بحدود معينة تمكن الباحث من رؤية شكلها وتفاصيلها بوضوح.

2- جهاز التعقيم (الموصدة) **Autoclave**

وهو جهاز يعمل بالبخار الناتج من تسخين الماء في حيز مغلق ينتج عنه توليد ضغط ويستخدم لتعقيم البيئات والأوساط الزرعية والمحاليل والمواد الكيميائية التي لا يتأثر تركيبها بدرجات الحرارة العالية التي تصل داخل الجهاز أثناء التعقيم إلى 121مْ وضغط 15 باوند/انج^2 وتعرض المواد تحت هذه الدرجة لمدة 15-20 دقيقة لقتل أغلب الخلايا الخضرية وأبواغ الأحياء المجهرية.

الأجهزة المختبرية

3- حاضنة Incubator

جهاز يمكن التحكم من خلاله بدرجة الحرارة المطلوبة لتنمية الفطريات وحضنها لفترة محددة عند درجة حرارة ثابتة وغالباً ما تكون عند 25 مْ للفطريات المترممة أو 37 مْ للفطريات المسببة في مرض الانسان، أو عند درجات حرارة مختلفة حسب حاجة الفطريات الخاضعة للدراسة.

4- فرن Oven

يستخدم لتعقيم الزجاجيات بالهواء الساخن ويفضل النوع ذا المروحة الداخلية، ويتم التعقيم غالباً عند درجة حرارة 160مْ لمدة ساعتين ويمكن عند الضرورة يجوز رفع درجة الحرارة إلى 180 مْ لاختصار الوقت إلى ساعة واحدة فقط. كما يستخدم لتجفيف النماذج أو الغزل الفطري عند درجة حرارة 40 مْ حتى الجفاف.

الأجهزة المختبرية

5- كابينة تلقيح **Inoculation chamber**

كابينة صغيرة مزودة بمفرغة هواء وفلتر هواء لتفريغ الهواء داخل الكابينة قبل استخدامها بالإضافة إلى مصباح للأشعة فوق البنفسجية ومصباح ضوئي (نيون) فهي توفر حيزا خاليا من الأحياء المجهرية ومقعما يسمح للعمل فيه بحرية اثناء تلقيح أو عزل الفطريات وتسمى أيضاً بصندوق العزل Isolation box.

6- أجهزة أخرى **Other equipments**

وتشمل جهاز قياس pH، جهاز طرد مركزي centrifuge ، خلاط mixer ، ميزان balance ، هزاز shaker ، حمام مائي water bath ، جهاز تقطير Distilatre ، ثلاجة ومجمدة Refregertor & freezer.

أنواع مختلفة من جهاز قياس الحموضة pH meter

أنواع مختلفة من المنبذات centrifuge

Vortex mixture

Laberatory mixer

Shaker

Material المواد

تشمل بعض الأوساط الزرعية المصنعة والجاهزة التي سيرد ذكرها في موضوع الأوساط الزرعية بالإضافة إلى المواد التي تدخل في تحضير بيئات عزل وتنمية الفطريات، الصبغات، المعقمات، مواد تحميل الفطريات لأغراض الفحص المجهري وغيرها من المواد.

1- اكار – اكار Ager – Agar

مادة كاربوهيدراتية معقدة مستخرجة من بعض الأعشاب البحرية sea weeds ليس لها قيمة غذائية وتضاف إلى الأوساط الزرعية بنسبة 1.5 – 2.0 % تذوب عند تسخين الوسط فوق 45 مْ وتتصلب عندما يبرد الوسط وتنخفض حرارتها دون 40 مْ.

2- قطن Cotton

يستخدم في عمل سدادات أنابيب الاختبار والدوارق المعدة لتحضير البيئات الزرعية، كما يستخدم لأغراض التعقيم وأمور عديدة في المختبر.

3- أوراق ترشيح Filter papers

تستخدم في ترشيح البيئات السائلة والمحاليل المستخدمة أثناء العمل في المختبر.

4- الكحول Alcohol

يستخدم لأغراض تعقيم الأدوات ومناضد العمل في المختبر، وأمور أخرى عديدة.

5- اللاكتوفينول Lactophenol

يستخدم في قتل وتثبيت وتحميل الفطريات للمحافظة على شكلها الطبيعي أثناء الفحص المجهري.

6-الصبغات Stains

تعد الصبغات واحدة من المواد المهمة جدا في مختبر الفطريات لدورها الأساسي في تمييز الأجزاء المختلفة في جسم الفطر سواء كان في الخيط الفطري او في الخلية الفطرية او السبورات او الاجسام التكاثرية فضلا عن الأجسام الثمرية

اهم الصبغات المستخدمة :

صبغة الانلين (أزرق القطن) **Anilin blue (cotton blue)**

وهي أكثر الصبغات التي تستخدم في فحص الفطريات عموماً وتتميز في صبغها للجدران السليلوزية والبروتوبلازم – تذاب الصبغة في الماء وتحضر بتركيز 0.1 %، إلا أن كفاءتها قد تكون أفضل في بعض الحالات عندما تحضر بتركيز 1 % في الكحول الأتيلي (90 %) وبالإمكان استخدام الصبغة مع محلول اللاكتوفيول لغرض التثبيت والصبغ في نفس الوقت بشرط أن تكون بنفس التركيز (0.1 %) وتحضر كما يأتي:

Lactophenol	75 ml
Distilled water	25 ml
Anilin blue (cotton blue)	0.1 g

الصبغة البنفسجية البلورية Crystal Violet

يطلق على هذه الصبغة أيضاً اسم صبغة جنتين gentian violet ، وهي من الصبغات الكثيرة الاستخدام في صبغ محتويات الخلية، تذوب الصبغة في الماء بتركيز 1.6 % وفي الكحول بتركيز 1.3 % وتحضر بشكل محلول مائي بإذابة الصبغة في الماء المقطر بتركيز 1.0 %.

المثبتات Fixatives

المثبتات هي محاليل لمواد كيميائية تستعمل لقتل الخلايا الحية قتلاً سريعاً لغرض تثبيت مكونات ومحتويات الخلية الفطرية أو اي جزء من جسم الفطر في حالته الاعتيادية والطبيعية أثناء فحصها مجهرياً، ويجب اختيار محلول التثبيت المناسب حسب طبيعة النموذج المطلوب تثبيته وأن يتم التثبيت مباشرة بعد أخذ النموذج من وسط النمو لكي لا يحدث أي تغيير على مكونات النموذج خارج حالته الاعتيادية من حيث الشكل والحجم والتركيب، وتتصف محاليل التثبيت بعدة صفات من أهمها:

1- تكون سريعة الانتشار في الانسجة الحية لضمان القتل والتثبيت.

2- عدم تأثيرها على بروتوبلاست الخلية.

3- عدم تأثيرها على قابلية الخلية في أخذ الصبغات التي قد يتطلب استعمالها لفحص النموذج ومن بين المثبتات المستخدمة في مختبر الفطريات هي:

محلول خليط الفورمالين – حامض الخليك – الكحول

Formalin – Acetic acid – Alcohol mixture (FAA)

هذا المحلول من أكثر المحاليل استخداماً في تثبيت وحفظ النماذج الحية ويسمى أيضاً بمحلول الحفظ القياسي standard preservative ويحضر من:

Formaldehyde 40% (Formalin)	5 ml
Acetic acid (glacial)	5 ml
Alcohol (ethyl 50%)	90 ml

أوساط التحميل Mounting media

ان عملية فحص ودراسة الفطريات في المختبر تتطلب تحضير شرائح زجاجية مؤقتة أو دائمية، وللحصول على شرائح دائمية أو شبه دائمية يجب استعمال محاليل أو أوساط خاصة يطلق عليها أوساط التحميل، وللاحتفاظ بالشرائح الدائمية بشكل أفضل يتم لصق غطاء الشريحة بعد التأكد من فحص النموذج باستخدام مواد لاصقة sealing materials مثل الغلايسيل Glycel وهي مادة لاصقة ذات أساس سليلوزي للشرائح الدائمة وشبه الدائمة ويمكن استخدام طلاء الأظافر Nail polish لهذا الغرض أو مواد لاصقة أخرى. هناك نقطة مهمة جداً يجب الانتباه إليها قبل عملية لصق غطاء الشريحة هي ضرورة التأكد من عدم وجود كمية زائدة من وسط التحميل على حافة غطاء الشريحة لأنها تؤثر على المادة الاصقة وعليه يجب سحبها باستخدام ورق النشاف أو ورق الترشيح قبل وضع مادة اللصق على حافة غطاء الشريحة. ومن أهم أوساط التحميل المستخدمة في مختبر الفطريات ما يلي:

وسط تحميل آمان (اللاكتوفينول)

Amman's mounting medium (lactophenol)

هذا الوسط مناسب جداً لتحضير الشرائح الزجاجية الدائمية وشبه الدائمية في معظم الفطريات، ويتكون من المواد التالية:

Phenol	20g
Lactic acid	20g
Glycerine	40g
Distilled water	20g (weight)

المحاليل الدارئة (المنظمة) Buffer solutions

تدعى المحاليل التي تضبط درجة الأس الهيدروجيني للأوساط الزرعية وخاصة السائلة منها وتقاوم تغيرات الأس الهيدروجيني (pH) التي تحصل في الوسط نتيجة نمو الفطريات بالمحاليل الدارئة أو المنظمة. وهي تتكون من مزيج من حامض ضعيف مع ملحه او قاعدة ضعيفة مع ملحها، وللملح المتشكل من حامض ضعيف وقاعدة ضعيفة فعل منظم لدرجة الأس الهيدروجيني،

ضبط وقياس درجة الأس الهيدروجيني (pH)

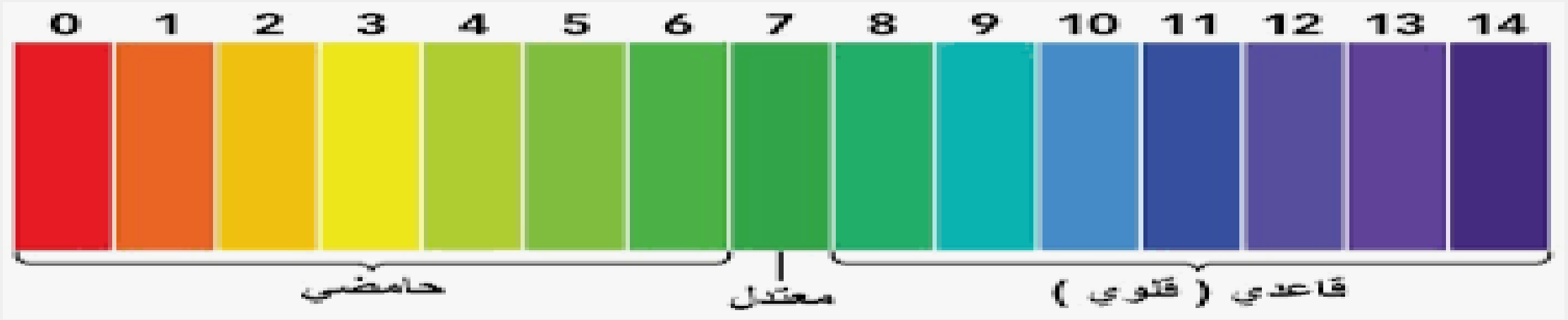
Adjustment and measurement of pH

يعتبر ضبط وقياس درجة الأس الهيدروجيني للوسط الزرعي من أهم الأمور الواجب مراعاتها عند تحضير الأوساط الزرعية فلكل نوع من الفطريات احتياجات خاصة للنمو فغالبيتها يفضل الأوساط الحامضية بينما تتطلب أنواع أخرى أوساط قلوية في حين أن البعض الآخر يفضل النمو في الأوساط المتعادلة.

تكون درجة الأس الهيدروجيني لمعظم أنواع الأوساط الزرعية عند تحضيرها منخفضة قليلا أو قريبة من المتعادلة ولهذا يجب قياسها قبل استخدام الأوساط للنمو ثم ضبطها وتعديلها باستخدام حامض مخفف او قاعدة مخففة، ويفضل إعادة فحصها بعد التعقيم الذي قد يسبب تغيير طفيف في درجة الأس الهيدروجيني. ومن أهم الطرق المعتمدة لقياس درجة الأس الهيدروجيني هي:

1- الأدلة الملونة pH indicators

الأدلة هي مواد تستخدم كمحاليل كاشفة أو أوراق دالة على درجة الأس الهيدروجيني للوسط الزرعي أو المحلول، والأدلة الملونة هي مواد يؤدي تغيير تركيبها أو تأينها عند قيمة الأس الهيدروجيني المختلفة التي تحدث عندها تغييرات لونية يتم مقارنتها مع ألوان محاليل قياسية ذات درجة أس هيدروجيني مختلفة، أما استخدام الأوراق الدالة فيتم أما بتغطيس الأوراق بسرعة في المحلول قيد الاختبار أو وضع نقطة من المحلول على الورقة بوساطة ماصة شعرية ومقارنة اللون الحاصل على الورقة مع خارطة الألوان المرافقة لهذه الأوراق وقيمه درجة الأس الهيدروجيني لكل لون.



2- قياس الجهد الكهربائي Electrical potentiometer

تعتمد هذه الطريقة في تحديد درجة الأس الهيدروجيني على اساس الفرق في الجهد الكهربائي بين محلول الاختبار والمحلول القياسي، الجهاز المستخدم لهذا الغرض هو pH-meter. يعتبر القطب الكهربائي الزجاجي Electrode الذي يحتوي على محلول كلوريد البوتاسيوم هو الأكثر استخداماً في مختبرات الفطريات والدراسات الحيوية عموماً، علماً أن الالكترود الهيدروجيني الغازي هو الأفضل لقياس درجة الأس الهيدروجيني. يقاس الفرق في الجهد الكهربائي بالفولت ويحول إلى الرقم الهيدروجيني الذي يتوضح على مقياس الجهاز.

طريقة إستخدام جهاز
PH METER

المصادر:

- علم الفطريات العملي ،عبد الرضا طه سرحان