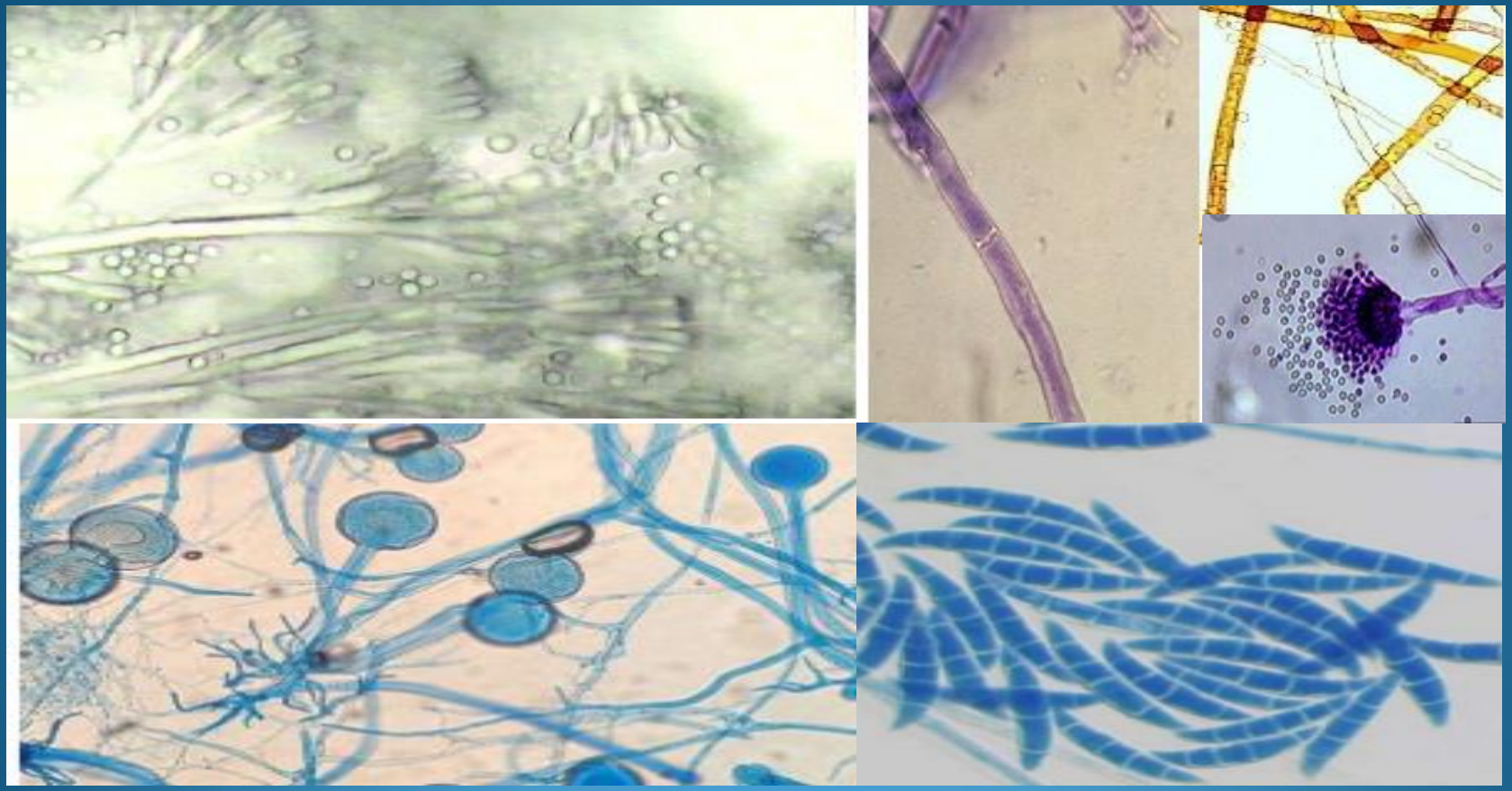
Slide Preparation

تحضير الشرائح الزجاجية



Hiba Fouad Abdulfatah

ان الهدف من تحضير الشرائح الزجاجية هو فحص العينات والنماذج الطبيعية التي تحتوي على الفطريات والتعرف عليها من خلال الصفات المظهرية والشكلية للخيوط الفطرية والأبواغ والحوامل الكونيدية وحوامل الحوافظ البوغية والتراكيب التكاثرية، وقد يتطلب ذلك عمل مقاطع في النماذج المصابة بالفطريات خصوصاً عندما تكون الإصابة داخلية وهناك أكثر من طريقة لتحضير الشرائح الزجاجية للفطريات منها ما يأتي:

شريحة من مزرعة فطرية حديثة Slide from fresh fungal culture

يمكن تحضير شريحة زجاجية من مزارع حديثة لبعض الفطريات المتوافرة لغرض دراسة الخيوط الفطرية والتراكيب الأخرى والاختلافات فيما بينها.

المواد:

1- شرائح زجاجية **Slides** مع الأغطية **Cover slips**

2- أبر عزل **Isolating needles**

3- مصباح بنزين **Bunsen Burner**

4- صبغة أزرق القطن **Cotton blue**

5- لاكتوفينول **Lactophenol**

6- مزارع حديثة بعمر 3 — 5 أيام لبعض الفطريات مثل:

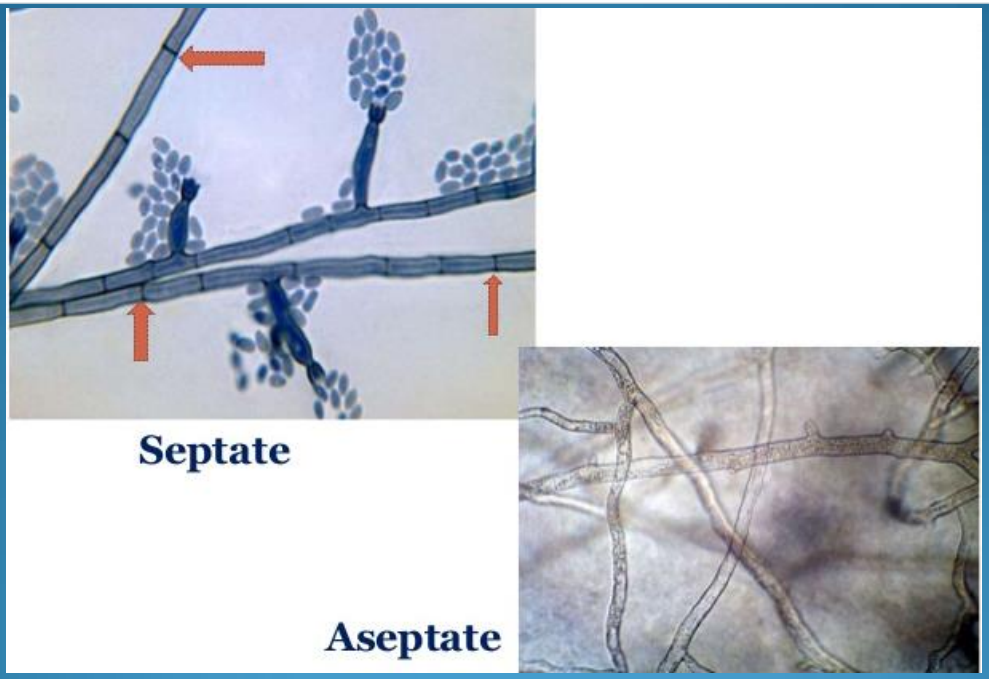
Alternaria sp., *Aspergillus* sp., *Pencillium* sp., *Rhizopus* sp.

طريقة العمل:

1- تعقم أبرة النقل باللهب حتى الإحمرار وتبّرد عند حافة الوسط الزرعي قبل نقل الفطر.

2- ينقل جزء صغير من الفطر بالأبرة المعقمة ويوضع على شريحة زجاجية نظيفة مع قطرة من الماء المقطر أو اللاكتوفينول ثم يوضع غطاء الشريحة.

3- افحص الشريحة تحت المجهر ولاحظ المظهر العام للخيوط الفطرية وصفاته التركيبية، قد تجد التراكيب الخضرية فقط وعدم وجود التراكيب التكاثرية مثل الأبواغ والكونيدات لان المزرعة حديثة النمو، وتأكد من الخيوط الفطرية هل هي من النوع عديمة الحواجز أم من النوع المقسم بحواجز عرضية.؟



اطلع على الفيديو في الرابط الاسفل

https://youtu.be/OMIF1Elr9i4

Lactophenol cotton blue slide mount.

Teaching resources from the Microbiology Laboratory

Marilena Ioannou and Malgorzata Rekas

HALS OER
De Montfort University

Attribute:
De Montfort University
HALSOER Project

CC BY SA

شريحة من مزرعة فطرية جافة Slide from dried culture

لتحضير شريحة زجاجية من نموذج جاف للفطر أو من مستعمرة جافة يستخدم محلول مخفف من هيدروكسيد البوتاسيوم KOH بتركيز 2-10% لغرض ترطيب النموذج وإعطاء التراكيب الفطرية شكلها وحجمها الطبيعي.

طريقة العمل:

1- تؤخذ قطعة صغيرة من البيئة الجافة للفطر باستخدام أبرة معقمة باللهب وتوضع على شريحة مع قطرة من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم المذكور أعلاه.

2- تسخن الشريحة مع النموذج بتمريرها فوق لهب هادئ وبعد أن تبرد يوضع غطاء الشريحة، ثم تفحص تحت المجهر وتدون المعلومات عن طبيعة الخيوط الفطرية والتراكيب الأخرى.

شريحة من نموذج مصاب جاف Slide from dried infected sample

ان اغلب النماذج التي تستخدم لهذا الغرض هي الاجزاء النباتية المصابة التي تبدو عليها علامات الإصابة أو المرض وتتمثل بالخيوط الفطرية أوالأبواغ أو التراكيب الثمرية التي يكونها الفطر في منطقة الإصابة. ومن أكثر الصعوبات التي تواجه عملية تحضير الشريحة من النموذج المصاب هو احتمال التلوث

بكائنات أخرى أو فطريات أخرى غير تلك المراد فحصها ودراستها، لذا لابد من أخذ الاحتياطات اللازمة لتعقيم جميع الأدوات المستعلمة كالمشارط والملاقط وابر النقل. يمكن تحضير الشريحة بطريقة مباشرة ولكن في حالات كثيرة قد يتطلب عزل الفطر أولاً ثم تحضير الشريحة ومن أهم الطرق المتبعة لإنجاز هذا العمل هي ما يلي:

المواد:

1- كحول أثيلي 95 %.

2- مصباح غازي أو كحولي

3- شرائح زجاجية وأغطيتها.

4- نموذج نباتي جاف مصاب بالفطريات

1- التحضير المباشر

يستخدم ناقل معقم غمست نهايته أولاً في 95 % من مادة الكحول ثم عرضت للهب بعدها تبرد في ماء مقطر معقم ثم يمرر فوق المنطقة المصابة من النموذج لإزالة جزء من الخيوط الفطرية أو الأبواغ التي توضع على قطرة ماء وضعت في وسط شريحة زجاجية معدة لهذا الغرض ثم يوضع فوقها غطاء الشريحة وتفحص تحت المجهر.

2- التحضير غير المباشر

تعتمد هذه الطريقة في الحاجة إلى تحضير شريحة بحالة نقية للفطر الممرض المتبوغ في منطقة الإصابة وتتواجد معه فطريات أخرى، أو عندما يكون الفطر الممرض غير متبوغ وغير مرئي على سطح النموذج، وتعتمد في ذلك الطرق التالية:

أ- معلق الأبواغ:

إذا كان الفطر متبوغاً على سطح النموذج على هيأة مسحوق من الأبواغ أو مكوناً تراكيب ثمرية فيمكن عزله بعمل معلق من الأبواغ في الماء المقطر المعقم ثم تنميته في حالة نقية إما بطريقة الخط المتعرج (التخطيط) أو طريقة التخفيف، ثم تحضر الشريحة الزجاجية من المزرعة النقية التي نمت على الوسط الزرعي.

ب- الخيوط الفطرية

إذا كان الفطر غير متبوغ وغير مرئي على سطح النموذج المصاب فتؤخذ أجزاء صغيرة من البقعة المصابة تتراوح من 5-10 ملم بحيث تشمل جزء مصاب وجزء سليم، تعقم سطحياً بغمسها في 5 % من محلول هايبوكلورات الصوديوم لمدة ثلاث دقائق ثم تنقل بواسطة ملقط معقم إلى ماء مقطر معقم لكي يتم غسلها من مادة التعقيم ومن ثم تنقل إلى ورق ترشيح معقم لتجفيفها ثم تنقل إلى طبق بتري حاوي على الوسط الزرعي المناسب وبمعدل 5 قطع / طبق، وتعمل عدة أطباق كمكررات، وبعد حضن الأطباق عند درجة حرارة 25 مْ لمدة 72 ساعة، تفحص الأطباق لملاحظة الخيوط الفطرية الظاهرة من القطع ثم تؤخذ منها أجزاء صغيرة بواسطة أبرة معقمة لتحضير شريحة زجاجية للفطر الممرض حسب الطرق التي ذكرت سابقاً. أما إذا كان النموذج الحامل للفطر مادة غير شفافة مثل الأوراق النباتية فيتم تحضير الشريحة على الشكل التالي:

المواد :

1- هيدروكسيد البوتاسيوم تركيز 10%
2- انابيب اختبار.
3- مصباح غازي.
4- شرائح زجاجية واغطيتها.

طريقة العمل:

1- تؤخذ قطع صغيرة من ورقة النبات الجافة الحاملة للفطر وتوضع في انبوبة اختبار مع قليل من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم تركيز 10%.
2- تسخن محتويات أنبوبة الاختبار حتى الغليان لدقائق قليلة لغرض إزالة الصبغات من الورقة (الخضراء منها أو البنية).
3- تنقل قطعة من ورقة النبات من انبوبة الاختبار باستخدام أبرة معقمة إلى شريحة زجاجية مع قطرة من ماء مقطر ويوضع عليها غطاء الشريحة.
4- تفحص الشريحة تحت المجهر وتدون المعلومات عن طبيعة الفطر وتواجده في أنسجة الورقة النباتية.

ملاحظة:

يمكن استخدام اللاكتوفينول بدلاً من هيدروكسيد البوتاسيوم في تحضير شرائح البيئات الفطرية الجافة في حالة عدم توفر المادة الثانية.

شريحة الشريط اللاصق الشفاف Slide of Scotch tape technique

تستخدم هذه الطريقة لتحضير الشرائح الزجاجية من المزارع ذات الخيوط الفطرية الهوائية aerial hyphae لغرض دراسة طبيعة هذا النوع من الخيوط والحوافظ البوغية وحوامل الحوافظ البوغية الموجودة على سطح المستعمرة، ونادراً ما تستخدم هذه الطريقة مع المزارع الفطرية ذات السطوح الناعمة أو الخميرية الشكل yeast – like colony.

المواد:

1- شريط لاصق شفاف

2- شرائح زجاجية

3- لاكتوفينول – ازرق القطن

4- مزرعة فطرية من نوع الغزل الهوائي مثل *الفطر Fusarium* sp. أو الفطر *Rhizopus* sp.

طريقة العمل:

1- يؤخذ 4 سم من الشريط اللاصق الشفاف (عرض 1-2 سم).

2- تمسك قطعة الشريط اللاصق من طرفيها بالسبابة والابهام ووضع الوجه اللاصق من الشريط على سطح مستعمرة الفطر المدروس ويضغط عليها جيداً.

3- يرفع الشريط اللاصق بلطف ويوضع فوق قطرة من صبغة أزرق القطن باللاكتوفينول وضعت على شريحة زجاجية أعدت لهذا الغرض.

4- تفحص الشريحة تحت المجهر باستخدام العدسة ذات قوَة التكبير الواطئ ثم التكبير العالي، وندرس طبيعة الخيوط الفطرية والتراكيب الأخرى مثل الأبواغ والكونيدات وحواملها والحوافظ البوغية وحواملها.

ملاحظة:

إذا كانت الشريحة غير واضحة وغير وافية فإن السبب يعود إلى عدم ضغط الشريط جيداً فوق المستعمرة.

المصادر: عبد الرضا طه سرحان ،الفطريات العملي