

## ارشادات عامة

### تعليمات مختبرية

يجب على الطلبة ارتداء صدرية المختبر و الاطلاع على تعليمات الدرس العملي قبل الحضور الى المختبر و اجراء التجارب او الدراسة العملية حيث ان موضوع الفطريات العملي يتضمن اجراء بعض التجارب المختبرية و التي تتطلب النظافة التامة للادوات المستخدمة و الدقة في العمل لاجل الحصول على نتائج صحيحة. كما يتطلب الدرس العملي الاحتراس و الدقة اثناء اجراء التجارب و الاعمال المختبرية و استخدام ادوات مختبرية معقمة حيث ان استخدام الادوات الملوثة يؤدي الى الحصول على نتائج خاطئة هذا بالاضافة الى عدم التبذير في المواد اثناء اجراء التجارب العملية .

### السلامة المختبرية

- اخذ الحيطة والحذر من قبل الطالب اثناء العمل المختبري يعد من الامور المهمة والذي يتحقق عبر التقيد بتعليمات السلامة المختبرية والتي تتضمن الاتي:
- 1- عدم الاكل و الشرب في المختبر
  - 2- تعويد الطلبة على استخدام تقنيات التعقيم بالنسبة للمواد و الادوات المختبرية الواجب استخدامها اثناء اجراء التجارب العملية فضلا عن المحافظة على نظافة مكان العمل قبل و بعد اجراء التجارب حيث ان كل طالب مسؤول عن نظافة المكان الذي يشغله خلال فترة وجوده في المختبر.
  - 3- ارتداء الصدرية قبل الدخول للمختبر.
  - 4- ضرورة تعقيم الاسطح و الايدي بالمواد المعقمة المتوفرة مثل الكلور،الديتول، الكحول70% وغيرها من المطهرات قبل و بعد اجراء التجارب.
  - 5- الرجوع الى الاستاذ المشرف في حالة حصول حالة طارئة ما لمعالجتها.

### اللوازم والأدوات المختبرية

- يحتاج الطالب خلال الدروس العملية في موضوع علم الفطريات إلى بعض الأدوات والأجهزة المختبرية التي لايمكن الاستغناء عنها مثل أدوات التشريح والمجهر إضافة إلى بعض اللوازم الأخرى ولذا يجب على الطالب الحرص على سلامة ونظافة هذه اللوازم والأدوات قبل وبعد الاستعمال. ومن اللوازم والأدوات مايلي:-
- 1- صدرية بيضاء خاصة للدرس العملي وإجراء التجارب في المختبر.
  - 2- دفتر مختبري مع أدوات الكتابة اللازمة لأجل تسجيل النتائج والملاحظات الخاصة بالعمل المختبري ومشاهدات الطالب.
  - 3- أدوات التنظيف والتعقيم مثل قطعة إسفنجة،صابونة،مادة معقمة وقطعة قماش.
  - 4- ورق تنظيف عدسات المجهر lens paper .
  - 5- أدوات التشريح وهذه تشمل:-
    - ا-مبضع scalpel
    - ب-ملقط forceps
    - ج-مقص scissor
    - د-ابر تشريح needle وناقل جرثومي loop
    - هـ- قطارة dropper
  - 6- بعض الأدوات الزجاجية مثل الإطباق petridishes،الماصات pipettes،الدوارق flasks،أقداح زجاجية bakers بأحجام مختلفة،اسطوانات زجاجية مدرجة graduated cylinders،علب شرائح زجاجية slides مع غطاء شريحة cover slips للفحص المجهرى .

## بعض الأجهزة المستخدمة في العمل المختبري

### \*المجهر Microscope

المجهر عبارة عن جهاز يستخدم في فحص الاجسام الدقيقة التي لا ترى بالعين المجردة لذا فهو عدة اساسية لكل مختبر بايولوجي فضلا عن اهمية استخدامه في الدراسات والابحاث العلمية المختلفة , وقد تطور هذا الجهاز عبر السنين و ظهرت انواع كثيرة منه ولكن من اهم المجاهر المستعملة في مختبراتنا هو المجهر المركب (compound microscope) (شكل 1) والذي نجد انه من الضروري والمفيد ان نتعرف على اجزائه المختلفة ووظيفة كل جزء قبل استخدامه .

### أجزاء المجهر المركب:

يتركب المجهر من الأجزاء التالية:-

#### 1- العدسة العينية Ocular piece

تقع أعلى المجهر فوق أنبوب معدني, لهذه العدسة قوة تكبير خاصة مؤشر عليها وعادة ماتكون 10x, يقترن بعض هذه العدسات بمؤشر pointer يستفاد منه في التأشير على أجزاء معينة من الجسم المراد فحصه.

#### 2- الجسم الأنبوبي Body tube وهو التركيب الذي يحمل العدسة العينية.

3- القرص الدوار Revolving nose-piece يقع هذا القرص عند النهاية السفلى للجسم الأنبوبي وهو تركيب يستعمل لتغيير قوة التكبير من قوة إلى أخرى.

#### 4- العدسة الشيئية Objectives piece

هي عدد من العدسات التي تحمل على القرص الدوار, تختلف فيما بينها من حيث الطول وقوة التكبير, فاقصرها بالطول اقلها تكبيرا. تجهز معظم المجاهر بالعدسات الشيئية التالية:-

أ- العدسة الشيئية ذات القوة الصغرى Low power objective ويرمز لها (L.P.) وقوة تكبيرها 10 مرات (10x) .

ب- العدسة الشيئية ذات القوة الكبرى High dry power objective ويرمز لها (H.P.) وقوة تكبيرها 40 مرة (40x) .

ج- العدسة الشيئية الزيتية Oil immersion objectives وقوة تكبيرها 100 مرة (100x) ولا تستعمل هذه العدسة إلا مع زيت خاص.

5- الذراع Arm الذراع عبارة عن الجزء الذي يحمل بواسطته المجهر ويتصل من الأسفل بقاعدة المجهر.

6- المسرح Stage عبارة عن الجزء العريض الذي توضع وتثبت عليه الشريحة الزجاجية المراد فحصها ويوجد في منتصفه ثقب لمرور الضوء خلاله أثناء فحص الشرائح الزجاجية.

7-الماسكانClips هما عبارة عن مقبضين معدنيين يستعملان لتثبيت الشرائح الزجاجية على المنصة بالإضافة إلى جهاز يعمل على تحريك الشرائح المراد فحصها إلى الأمام والخلف واليمين واليسار .

#### 8- عجلة الضبط البعيدCoarse adjustment knob

تستخدم لتحريك الجسم المراد فحصه إلى أعلى أو أسفل مسافة كبيرة بحركة سريعة حتى تمام وضوح الرؤيا عند فحصه باستخدام العدسة الشيئية ذات القوة الصغرى. وهي عبارة عن عجلتين واحدة على كل جانب من المجهر تقعان بالقرب من منطقة اتصال الذراع بقاعدة المجهر.

#### 9- عجلة الضبط الدقيقFine adjustment knob

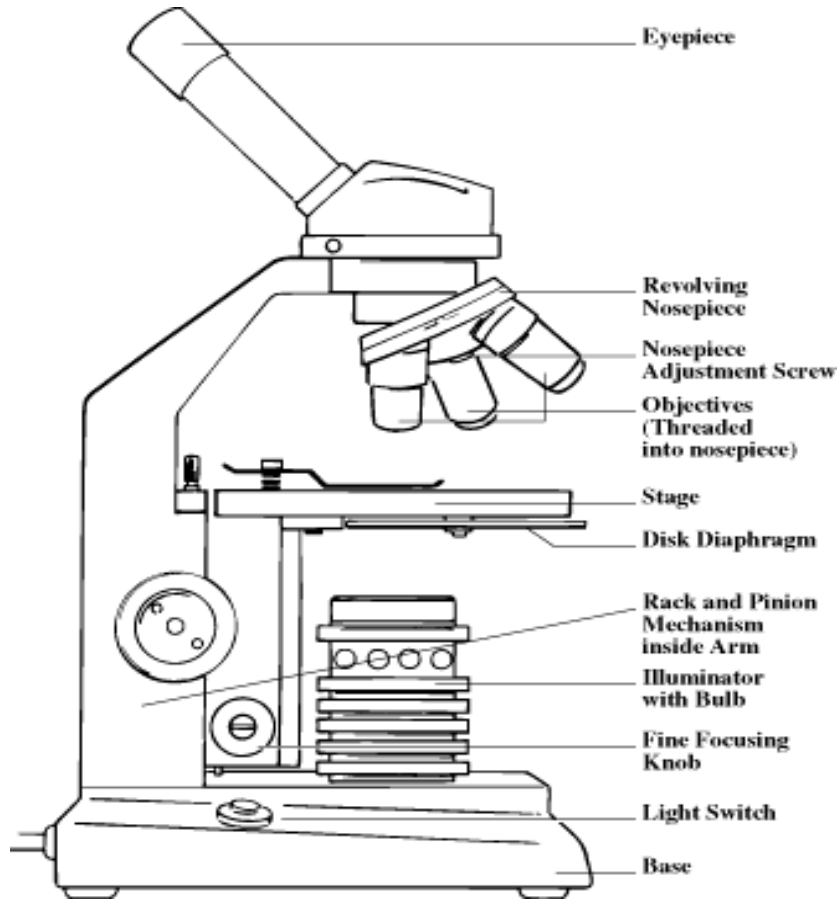
تستخدم في حالة استعمال العدسة الشيئية ذات القوة الكبرى لرفع أو خفض الجسم المراد فحصه مسافة صغيرة جدا بحركة بطيئة حتى تمام وضوح الرؤيا. وتقع أسفل عجلة الضبط البعيد وهي اصغر منها.

#### 10-المكثفCondenser

هو عبارة عن مجاميع من العدسات التي تقع تحت المسرح مباشرة والتي تستخدم في اضاءة الجسم المراد فحصه باستخدام الضوء العادي من خلال تركيز الضوء عليه.

#### 11-الحاجزDiaphragm يقع تحت المكثف ويسيطر على كمية الضوء المارة خلال المكثف.

#### 12-القاعدةBase تركيب قرصي او مستطيل الشكل يستند عليه المجهر ويوجد فيه مصباح كهربائي للإضاءة.



شكل (1) الاجزاء المختلفة للمجهر المركب.

### \*الحاضنة Incubator

جهاز يستخدم لتنمية الفطريات عند درجة الحرارة المثلى لنموها و التي تكون على الاغلب ضمن المدى الحراري (25-30) م° (شكل 2).



شكل (2) جهاز الحاضنة .

### \*الثلاجة Refrigerator

تستخدم لاجل حفظ بعض المواد المخبرية و المزارع الفطرية حيث ان استمرار نمو الفطر يؤدي الى استهلاك المادة الغذائية مما يؤدي الى موته, لذا تستخدم الثلاجة للمحافظة على الفطر عن طريق عملها على تثبيط نموه (inhibition of growth) عادة درجة حرارة الثلاجة بحدود 4 م .

### \* غرفة العزل Isolation chamber

عبارة عن مكان معقم (شكل 3) يستخدم لاجراء بعض تجارب العمل المخبري فيه مثل الزرع الفطري و صب الاوساط الغذائية ... الخ . وتستخدم في الوقت الحاضر كابينه مزودة بمرشحات تتم عملية التعقيم فيها بوساطة الهواء الساخن تسمى Air laminar flow لعزل وزرع الاحياء المجهرية على الاوساط الغذائية في الاطباق الزجاجية او الانابيب المخبرية .



شكل(3) غرفة العزل .

### \* اجهزة التعقيم Sterilization instruments

مثل الفرن الكهربائي Oven وجهاز المؤصدة Autoclave والتي سنتطرق اليها بشيء من التفصيل في موضوع التعقيم .

### \*الميزان المخبري Balance

## التمرين العملي

- 1- تدريب الطالب على كيفية حمل واستخدام المجهر وذلك من خلال فحص شرائح زجاجية جاهزة.
- 2- تعريف الطالب على استعمال العدسات الشيئية المختلفة لغرض فحص شرائح زجاجية جاهزة ومقارنة ما يشاهده باستعمال العدسة الشيئية ذات القوة الصغرى مع ما يشاهده باستعمال العدسات الشيئية ذات القوة الكبرى.

# التعقيم Sterilization

التعقيم عملية القضاء التام أو ازالة الاحياء المجهرية من المادة المراد تعقيمها في حين إن مصطلح التطهير Disinfection هو اختزال أو ازالة المكروبات المرضية في أو على المواد غير الحية بحيث لا تعد تشكل خطرا وبخلاف التعقيم فان التطهير يعني ضمنا بقاء بعض المايكروبات الحية. تختلف طرق و اجهزة التعقيم حسب طبيعة المادة المراد تعقيمها ونوع الكائن المجهري المطلوب القضاء عليه حيث إن الكائنات المجهرية لا تمتلك نفس سرعة التأثير بالعوامل المعقمة فهناك تباين مابين الأنواع المايكروبية وذلك حسب طور النمو والشكل الخصري المتواجد للكائن المجهري . و فيما يلي بعض طرق و اجهزة التعقيم الشائع استخدامها :

## (1) بوساطة العوامل الكيماوية Chemical agents

التي تستخدم عادة كمطهرات disinfectants لاجل اختزال أو ازالة المايكروبات المرضية وغير المرضية في أو على المواد بحيث لاتعد تشكل خطرا وهناك عدد كبير جدا من العوامل الكيماوية المستخدمة لهذا الغرض قيد الاستعمال ولكننا سنتطرق إلى المجاميع الرئيسية منها والشائع استعمالها بالحالات الاعتيادية. وهذه تشمل :

### • الكحولات Alcohols

التي عملها تعتمد على تخثيرها للبروتينات الأساسية في الخلية المايكروبية وفعاليتها تزداد عند وجود الماء فقد وجد ان الكحول يكون في أقصى قدرته على قتل الأحياء المجهرية في المادة المراد تطهيرها عند التركيز 70% . وعلى الرغم من إن الكحوليين الايثيلي Ethyl alcohol والايذوبروبيلي Isopropyl alcohol ذوا فاعلية سريعة في قتل البكتريا والفطريات بشكلهما الخصري ولكن فعلهما قليل ضد الابواع الجرثومية وبعض أنواع الفايروسات.

### • الكلور ومركباته Chlorine

يستعمل الكلور على نحو واسع في التطهير والذي يعتقد بان فعله يتم بأكسدة البروتينات الأساسية في الخلية المايكروبية. يستخدم الكلور بشكل غاز طليق أو عند وجود مركبات عضوية تحرره كايون الهايبوكلورات الذي يستعمل بتركيز تتراوح مابين (5-12) % والذي يوجد على شكل مادة كيماوية شائعة الوجود في المنازل كمادة قاصرة أو منظفة على صورة هايبوكلورات الكالسيوم  $Ca(OCl)_2$  وهايبوكلورات الصوديوم NaOCl .

### • اليود ومركباته Iodine

اليود يشابه الكلور الى حد كبير في كونه فعال جدا ضد معظم الأنواع المايكروبية من خلال تأثيره على الحامض الاميني التايروسين Tyrosine الموجود في الأنزيمات والبروتينات التركيبية في الخلية المايكروبية. يستعمل اليود ومركباته على نحو واسع كمطهرات للأنسجة الحية.

### • الفورمالدهايد Formaldehyde

الذي يعد مطهرا فعالا جدا عند التركيز 8% لقتله معظم انواع الخلية المايكروبية في دقائق معدودة والذي يعود الى عمله عبر اتحاده مع المجاميع الامينية في بروتينات الخلايا المايكروبية.

• وهناك بالإضافة إلى ما ذكر سابقا الفينولات phenolics والهكساكلورفين hexachlorophene ومركبات الامونيوم الرباعية Quaternary ammonium compounds والمركبات المعدنية metallic compounds .

## 2) بوساطة العوامل الفيزيائية Physical agents وهذه تشمل:

### • الحرارة Heat

يكون استخدامها محددا للمواد التي تتحمل درجات الحرارة العالية والمطلوبة للقتل المايكروبي , مع ذلك فهي تعد من طرق السيطرة السريعة والمؤثرة والرخيصة على نمو الأحياء المجهرية حيث إنها لا تدخل مواد سامة في المادة التي تعامل بها. وهذه تكونه على شكلين :-

### أ-الحرارة الجافة Dry heat وتشمل :

#### 1-التعقيم باللهب المباشر

حيث يستخدم لهب المصباح الكحولي او مصباح بنزن في تعقيم الادوات اليدوية المعدنية مثل الملاقط ،ابر التلقيح و افواه الانابيب و الدوارق الزجاجية ...الخ .

#### 2-التعقيم بالهواء الساخن

وهي من الطرق المناسبة لتعقيم الادوات و الاواني الزجاجية التي يجب ان تكون جافة عند استخدامها مثل الاطباق و الماصات و الدوارق الزجاجية و غيرها بوساطة الافران الجافة الكهربائية او الغازية وعادة تكون عند درجة حرارة 180م° لمدة 3 ساعات.

### ب-الحرارة الرطبة Moist heat وتشمل :

#### 1-الماء المغلي boiling water

احدى الطرق المستخدمة لتعقيم بعض أنواع المحاليل والمواد عند درجة حرارة 100م° لمدة 10 دقائق والذي لا يكون كافيا لقتل كل الخلايا الخضرية بدرجة عالية فضلا عن قتل كل انواع الابواغ , لذا فقد عدت ك تقنية تعقيم غير موثوقة لكونها غير كافية لتعقيم المواد الملوثة بصورة تامة .

#### 2-استخدام الحرارة الرطبة مع الضغط العالي

التمثلة بجهاز المؤصدة Autoclave (شكل4) والذي يعد من أكثر الوسائل بساطة وأعظمها فعالية في تعقيم معظم المواد ومن حيث المبدأ فان جهاز المؤصدة يماثل قدر الضغط المستعمل في الطهي في اساس عمله للحصول على درجات حرارة اعلى من 100م° حيث تصل درجة حرارة الجهاز 121م° مع ضغط مقداره 15 بار حيث تحصل زيادة في درجة حرارة غليان الماء عند زيادة الضغط عليه وهذا كافي لقتل اكثر الخلايا المايكروبية مقاومة للحرارة في بضع دقائق . يستخدم هذا الجهاز لتعقيم الاوساط الغذائية و المواد السائلة التي لا تتأثر بارتفاع درجات الحرارة مثل الماء و يستخدم ايضا لتعقيم التربة و لاتلاف المزارع الفطرية ...الخ. إن السبب الرئيسي للفاعلية العالية في عمل هذا الجهاز عند مقارنته بغرف الهواء الحار يرتبط بحقيقة إن تخثر البروتينات بالحرارة و بضمنها الأنزيمات الأساسية يحدث بسهولة أكثر تحت الظروف الرطبة عما عليه في حالة الظروف الجافة بفعل الحرارة الكامنة للبخر المتكاثف داخل الجهاز مؤديا إلى القتل السريع للخلايا المايكروبية عبر تخثر بروتيناتها .

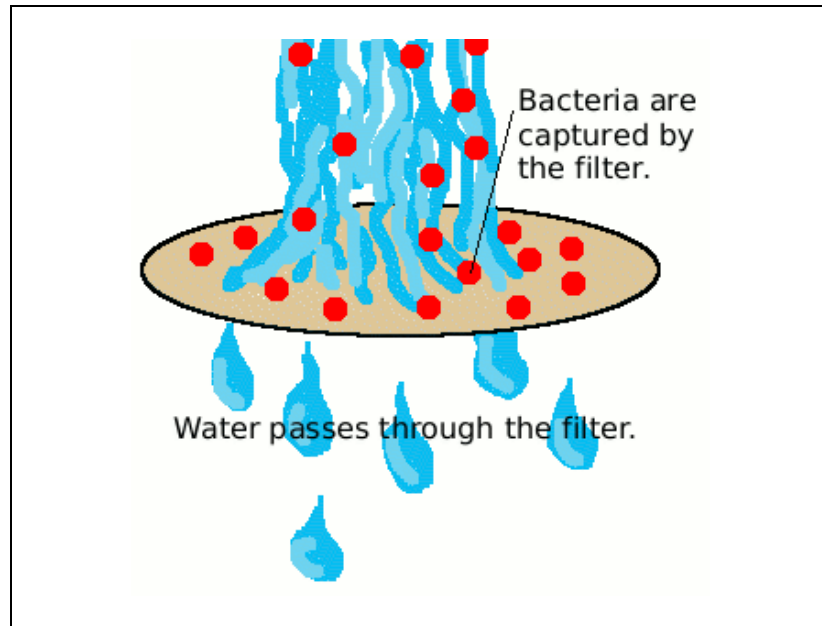




شكل (4) جهاز المؤصدة .

#### • الترشيح Filtration

احدى الطرق المفيدة لتعقيم المواد والسوائل التي تتأثر بدرجات الحرارة العالية مثل الانزيمات , المضادات الحياتية و المحاليل السكرية ... الخ وتستخدم لهذا الغرض المرشحات Filters المصنوعة من مركبات معدنية مثل السليكا او الخزف الصيني أو الازبستوس والتي يعتقد إن عملها هو منخل مجهري يستبقي المكروبات في حين يدع السائل المحيط يتدفق من خلال الثقوب الصغيرة في هذه المناخل المجهرية Milipore filters . في السنوات الأخيرة استعملت بصورة واسعة في المختبرات والصناعة مرشحات غشائية Membrane filters وهي اوراق ترشيح خاصة مؤلفة من مركبات مثل خلات السليلوز تكون رقيقة جدا وتحوي على ثقوب ذات اقطار مختلفة منها الصغيرة 0.22 مايكرون وهناك الثقوب ذات الاقطار الاكبر 0.45 مايكرون حيث انها تمنع مرور الاحياء المجهرية الملوثة لمادة ما اعتمادا على حجم الفتحات الموجودة فيها و عليه تختلف اقطار الفتحات في المرشحات التي تمنع مرور الخلايا البكتيرية فقط عن قطر الفتحات في المرشحات المستخدمة لمنع مرور الخلايا الفطرية والتي تكون اكبر حجما (شكل 5).



شكل (5) يوضح عملية الترشيح

## بوساطة الاشعاع Radiation

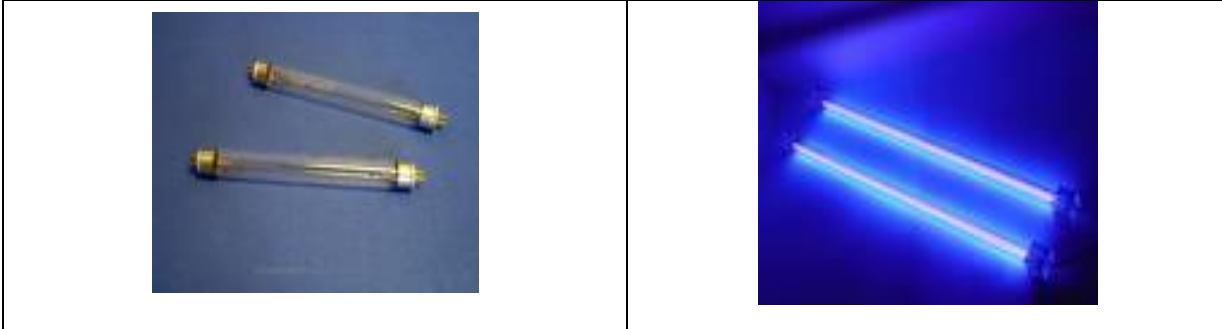
يعتقد بان الإشعاعات الكهرومغناطيسية هي أمواج ذات طاقة لكنها عديمة الكتلة ومن أمثلتها الأشعة السينية X-ray وأشعة كاما Gamma rays والأشعة فوق البنفسجية UV ray والأشعة المرئية Visible ray. تتناسب الطاقة التي تملكها تلك الإشعاعات تناسباً طردياً مع تردد الإشعاع وهكذا تكون الإشعاعات ذات الطول الموجي القصير مثل أشعة كاما لها قوة قتل أكبر من تلك ذات الطول الموجي الطويل مثل الضوء المرئي. وقد اثبتت العديد من الدراسات والبحوث إن أشعة كاما والأشعة فوق البنفسجية ذوات نفع كوسائل للسيطرة على النمو البكتيري.

### أشعة كاما

أشعة كاما احد انواع الإشعاعات المؤينة التي تسبب الضرر البايولوجي بتكوينها ايونات مفرطة الفعالية ضد المايكروبات فقد ثبت إن لأشعة كاما قيمة تطبيقية في السيطرة طبيياً على عدد من الكائنات المجهرية الممرضة ولذا فقد استخدمت لتعقيم عدد من المواد البيولوجية التي تتأثر بالحرارة دون تغيير في المادة المراد تعقيمها مثل محاليل المضادات الحياتية والعديد من المواد البلاستيكية القابلة للاستهلاك.

### الأشعة فوق البنفسجية

تعد الأشعة فوق البنفسجية (Ultra violet Ray (UV من الأشعة القاتلة للحياة المجهرية لاحتوائها على أطوال موجية تمتص بصورة مثلى من قبل الأحماض النووية المايكروبية مما يؤدي إلى حصول ضرر في تراكيبيها الطبيعية ووظائفها عن طريق توليد تغيرات في القواعد النايتروجينية (البورينات والبيريميدينات). في الوقت الحاضر توجد مصابيح خاصة وباحجام مختلفة لها القابلية على توليد الأشعة فوق البنفسجية UV (شكل 6) تستخدم لغرض التعقيم في المستشفيات وغرف العمليات الجراحية و المختبرات الخاصة بالابحاث و غرف التعبئة في مصانع الادوية وكذلك غرف العزل للحياة المجهرية.



شكل (6) يوضح مصابيح UV .

## التمرين العملي

1- يعطى الطالب عدد من المواد والأجهزة المختبرية المختلفة مثل : ( صدريّة مختبر , أطباق بتري زجاجية , أدوات تشريح معدنية , أنابيب زجاجية مختلفة الأحجام , أوساط زرعية , محاليل سكرية ) ويطلب منه تحديد الطريقة المثلى لتعقيم كلا منها مع ذكر السبب؟

2- ماهي درجة الحرارة ومقدار الضغط والوقت اللازم للتعقيم بجهاز المؤسدة. ولماذا؟

## زراعة الفطريات Cultivation of Fungi

وجود الفطريات في الطبيعة نامية في التربة والماء والهواء شائع جدا ولغرض دراستها مختبريا تنمى على اوساط غذائية تحضر مختبريا لتوفر لهذه الاحياء متطلباتها للنمو من الطاقة والوحدات الاساسية لبناء اجزاء وتراكيب الخلية الفطرية وهذا الكلام بالطبع يقتصر على الفطريات المترمة فقط سواء كان الترمم اجباريا ام اختياريا في حين ان الفطريات المتطفلة اجباريا يتعذر تنميتها مختبريا ، و اهم متطلبات النمو الاساسية للخلية الفطرية والتي يجب توفرها في الاوساط الغذائية المستخدمة مختبريا هي :-

**1. المصدر الكربوني Carbon source** كالكلوكوز الذي يعد اكثر المصادر الكربونية استهلاكاً من قبل معظم انواع الفطريات هذا بالاضافة الى الفركتوز من بين السكريات الاحادية والسكروروز والمالتوز من بين السكريات الثنائية والنشا من بين السكريات المتعددة ..... الخ من المركبات الكربوهيدراتية.

**2. المصدر النتروجيني Nitrogen sources** حيث ان معظم انواع الفطريات تستهلك النتروجين الذي قد يكون بصورة عضوية كالاحماض الامينية او البيبتون او البروتين المهضوم او بصورة غير عضوية كأملاح النترات و أملاح الامونيوم كمصدر نتروجيني .

**3. العناصر المعدنية Minerals** تشمل عددا كبيرا من العناصر المعدنية اللازم اضافتها بهيئة املاح الى الاوساط الغذائية لنمو الفطريات لما لها من اهمية في عمل بعض انواع الانزيمات والتركييب البنائي الخلوي و تنشيط النمو والتجريم للخلية الفطرية ، وهذه يمكن تقسيمها الى مجموعتين : تضم المجموعة الاولى العناصر التي تضاف بكميات كبيرة نسبيا مثل البوتاسيوم ،المغنيسيوم ،الفسفور ،الكالسيوم والصوديوم بينما تضم المجموعة الثانية المعادن التي يلزم وجودها بكميات صغيرة ولكن لها قيمة غذائية اساسية لنمو الفطر مثل الكبريت ،المغنيز ،النحاس ، الحديد والزنك و غيرها .

**4. الفيتامينات وعوامل النمو Vitamines & Growth factors** والتي تحتاج اليها الفطريات ايضا في نموها ، الا ان معظم الفطريات تكون فيتاميناتها بنفسها والقليل منها بحاجة اضافة بعض الفيتامينات كالثيامين والبيوتين وفيتامين B6 الى الوسط الغذائي الخاص بتنميتها وكذلك قد تضاف بعض عوامل النمو ومنها الاحماض الامينية والبيبتون ومستخلص الخميرة لتنشيط عمليات النمو والتجريم للخلية الفطرية.

**5. عوامل اخرى مثل : الماء ، الاس الهيدروجيني PH ، درجة الحرارة المناسبة للنمو الفطري والتهوية .**

### الماء

تتباين الفطريات من حيث حاجتها الى الماء ، فبعضها يحتاج الماء بوفرة مثل الفطريات المائية وهناك من الفطريات ما يكتفي برطوبة عالية ، عموما يحتاج الوسط الزراعي(الغذائي)الى الماء بنسبة (70-90) % وتأتي اهمية الماء في توفيره الرطوبة اللائمة لنمو الاحياء المجهرية فضلا عن توفيره لبعض المعادن التي تحتاجها الاحياء المجهرية بكميات ضئيلة جدا مثل النحاس والخاصين وغيرها . لذا يراعى عند تحضير الاوساط الغذائية الجاهزة اضافة المواد المجففة المكونة لهذه الاوساط بالنسب الموصى بها لان زيادتها تعمل على تقليل كمية الرطوبة في الوسط الغذائي .

## الاس الهيدروجيني PH

توفير الاس الهيدروجيني في الاوساط التي تستخدم في المختبر بما يناسب الكائن الحي المجهرى المراد تنميته يعد من الامور المهمة حيث ان لكل كائن حي اس هيدروجيني مناسب لنموه وذلك اما باضافة بضع قطرات من الحامض او القاعدة ومن ثم يقاس باستخدام مقياس الاس الهيدروجيني او باستخدام ورق خاص PH paper ، اغلب الفطريات تنمى على اوساط غذائية ذات اس هيدروجيني ( 5-6 ) .

## درجة الحرارة

تتباين الفطريات من حيث المدى الحراري الذي تستطيع العيش فيه ولكنه يقع عادة بالنسبة لمعظم الفطريات ما بين ( 5-50 ) م° ، اما درجة الحرارة المثلى فتتراوح عادة ما بين ( 20-30 ) م° .

## التهوية

الفطريات بصورة عامة هي كائنات هوائية بمعنى انها تنمو وتزدهر في وجود الاوكسجين و وجود وتراكم مقادير عالية نسبيا من ثاني اوكسيد الكربون يثبط نموها ولذا فقد استغلت هذه الظاهرة مع خفض درجات الحرارة في حفظ وتخزين الاغذية ومنعها من الفساد بفعل الفطريات .

## انواع الاوساط الغذائية Types of culture media

الوسط الغذائي هو كل مادة تستطيع الكائنات المجهرية ان تنمو عليها او فيها لكون هذه الاوساط توفر الاحتياجات الغذائية لهذه الكائنات لتنمو وتتكاثر .  
تتعدد الاوساط الغذائية وتتنوع حسب الغرض من استخدامها ولذا فاننا سوف نركز اهتمامنا على اكثر الاوساط الغذائية شيوعا واستخداما في تنمية الفطريات ولجل تسهيل فهمنا لموضوع انواع الاوساط الغذائية فسوف ندرسها كالآتي :

أ- حسب طبيعة مكونات الوسط الغذائي : حيث نجد ان هناك 3 انواع من الاوساط الغذائية من حيث طبيعة مكوناتها .

### اوساط غذائية طبيعية Natural media

هي الاوساط الغذائية المكونة من مواد طبيعية تستخدم كوسط غذائي لتنمية الفطريات عليها بعد تعقيمها ( كيف؟ ) وهذه الاوساط تستطيع ان تزود معظم الفطريات بالعناصر الضرورية اللازمة للنمو والتكاثر ولكنها تتميز بانها غير معروفة التركيب الكيميائي نوعا وكما ، من امثلتها : اجزاء النبات ، الخضراوات ، الثمار ، اجسام بعض الحشرات الميتة ..... الخ .

### اوساط غذائية شبه صناعية Semi synthetic media

تحضر من استعمال مواد طبيعية ذات تركيب كيميائي غير معروف مضافا اليها بعض المواد الكيميائية المعروفة كما ونوعا والتي يحتاج اليها الكائن الفطري لنموه ، ومن امثلتها الوسط الغذائي المعروف ب ( PDA ) Potato Dextrose Agar .

### اوساط غذائية صناعية Synthetic media

وتعرف ايضا الاوساط الغذائية الجاهزة لتوفرها على شكل مسحوق مجفف معبا في قناني خاصة (شكل 7) ، وهذه الاوساط الغذائية ذات تركيب كيميائي معروف تماما ، تحضيرها للعمل المختبري سهل جدا حيث يضاف وزن معين من هذه المساحيق الى حجم معين من الماء المقطر ثم تعقم بجهاز الموصدة ويتم بعد ذلك صبها في الاطباق او الانابيب الزجاجية ومن ثم تستخدم للزرع المختبري . ومن اكثرها شيوعا الوسط الغذائي جابكس Czapeks medium .



شكل (7) الاوساط الغذائية أ- وسط غذائي طبيعي ب-وسط غذائي صناعي

ب-حسب شكل وقوام الوسط الغذائي : وهنا ايضا نجد 3 انواع من الاوساط الغذائية كما في شكل (8) وهي :-  
**1-الوسط السائل Liquid or Broth culture media** وهي عبارة عن الاوساط الزرعية السائلة , التي تكون خالية من المادة المصلبة (الاکار) .

**2-الوسط شبه الصلب Semi solid culture media** وهي عبارة عن الوسط الغذائي الحاوي على نسبة قليلة جدا من مادة الاكار بحيث تكون غير كافية لاجل جعله بشكل صلب وعادة تركيز الاكار في مثل هذه الاوساط يتراوح من (0.5-1) % .

**3-الوسط الصلب Solid culture media** وهي الاوساط الغذائية الصلبة لاحتوائها على المادة المصلبة الاكار بنسبة عالية تتراوح من (1.5 - 2) % .



وسط شبه صلب

وسط صلب

وسط سائل

شكل (8) اوساط غذائية مختلفة القوام .

## الأكار Agar

هو عبارة عن مادة كاربوهيدراتية معقدة تستخرج من بعض انواع الاعشاب البحرية وليست لها اي قيمة غذائية ، تكون محلولاً غروبياً عند درجات الحرارة المرتفعة وتتماسك كالجيلاتين عند درجة حرارة 40 م° ، وتكمن اهميتها في الحصول على وسط غذائي صلب .

### التمرين العملي

#### تحضير اوساط غذائية مختلفة لتنمية الفطريات عليها

##### • تحضير وسط طبيعي

- 1- نأخذ درنة بطاطا او اي نوع من الخضراوات او الفواكه وبعد الغسل والتقشير تقطع بالسكين الى قطع صغيرة.
- 2- نضع هذه القطع في انبوبة اختبار ثم تسد فوهة الانبوبة بواسطة القطن وتوضع في جهاز المؤسدة لتعقيمها والزرع عليها وبالإمكان استخدام الاطباق الزجاجية بدلا من الانابيب لوضعها فيه .

##### • تحضير وسط PDA شبه الصناعي

###### 1- مكونات الوسط:

بطاطا 200 غم	اكار (15-17) غم
دكستروز 20 غم ويمكن الاستعاضة عنه بالسكروز 10 غم	ماء مقطر 1000 مل

- 2- تغسل البطاطا وتقشر ويوزن 200 غم منها وتخلط مع نصف كمية الماء 500 مل ثم توضع على النار الى ان تنضج تقريبا (أي حتى خروج النشا من البطاطا ، علي ذلك ؟) ثم تصفى بقطعة شاش ويؤخذ الراشح .
- 3- نزن 20 غم من سكر الدكستروز او 10 غم من السكروز (السكر الذي نستعمله في حياتنا اليومية ، لماذا 10 غم ؟) ويخلط مع الأكار ومن ثم يخلط مع الماء المتبقي .
- 4- يمزج المحلولين في فلاسك سعة 1 لتر ويكمل حجم الماء الى 1000 مل للتعويض عن كمية الماء المفقودة في عملية التبخر .
- 5- ثم نضع الوسط المحضر في جهاز المؤسدة لتعقيمه وبعد اخراجه من الجهاز يترك حتى يبرد بدرجة حرارة مناسبة (45-50) م° ويصب في اطباق او انابيب زجاجية للزرع عليها .

##### • تحضير وسط صناعي

تحضر احد الاوساط الزرعية الجاهزة من خلال وزن كمية مناسبة من المسحوق الزرعى حسب التعليمات المثبتة على العلبة الخاصة به وتذاب في حجم معين من الماء المقطر والذي يحدد ايضا حسب الحجم المراد تحضيره من الوسط الغذائي ، وبعد الاذابة يتم تعقيمه في جهاز المؤسدة ثم يصب في الاطباق ويستخدم .

#### صب الوسط الغذائي

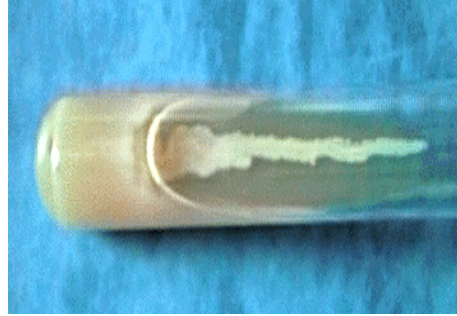
لاجل استخدام هذه الاوساط الغذائية للعمل المختبري يجب وضعها او صبها في اطباق زجاجية او دوارق زجاجية (flasks) او انابيب اختبار تكون فوهتها مغلقة بالقطن المعقم و بالإمكان صب الوسط الغذائي في انابيب زجاجية ذات غطاء screw tube كما موضح في الشكل (9).



شكل(9) صب الوسط الغذائي في اطباق زجاجية.

### انابيب الاكار المائل Slants

وهي انابيب اختبار تحتوي على وسط غذائي صلب بشكل مائل ، فائدتها المحافظة على المستعمرات الفطرية النامية لاطول فترة ممكنة (لماذا؟) وطريقة عملها هو صب او وضع الوسط الغذائي الى ربع حجم انبوبة الاختبار وتسد فوهتها بالقطن وتعقم بجهاز المؤسدة وبعد اخراجها توضع هذه الانابيب بوضع مائل لحين تصلب الوسط ثم تستعمل .



شكل(10) الاكار المائل slant.

### المواد المانعة للتلوث البكتيري

لتحضير الاوساط الزرعية الخاصة بالنمو الفطري لابد من اضافة بعض المواد التي تعمل على منع النمو البكتيري الذي ممكن ان يلوث نمو المزارع الفطرية النامية مثل :-

1. اضافة بعض المضادات الحياتية مثل الكلورمفنكول والبنسلين.
2. اضافة قطرات من الحامض لاجل جعل الاس الهيدروجيني للوسط المحضر حامضيا حيث ان الفطريات والخمائر بصورة عامة تفضل الوسط الحامضي (5.5-6) في حين ان البكتيريا تنمو جيدا في الوسط المتعادل (7).
3. استخدام صبغة ال Rose Bengal والتي هي عبارة عن مسحوق احمر اللون يضاف الى الوسط الغذائي بتركيز 1/30000. وفائدتها خفض الاس الهيدروجيني لكي يصبح الوسط حامضي فيمنع نمو البكتيريا وكذلك يعمل تثبيط للنمو السريع للفطريات (لماذا؟) .



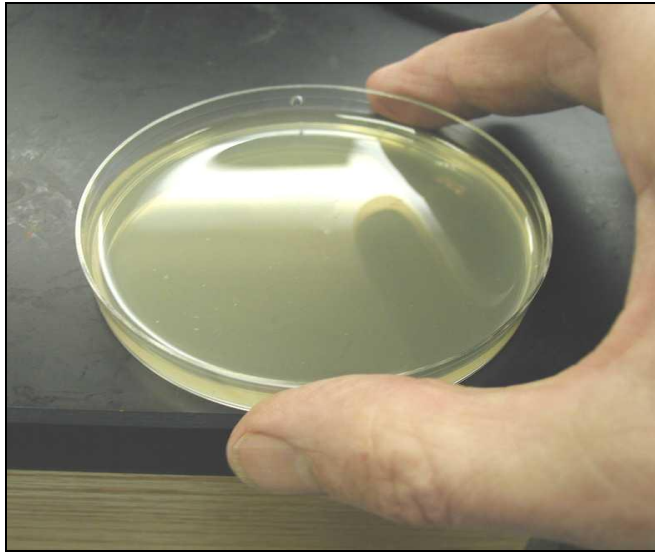
## عزل الفطريات من مصادر مختلفة (الهواء، التربة، بعض الاجزاء النباتية، ماء الساقية)

تنتشر الفطريات بكثرة في الطبيعة فهي توجد في كل مكان و على سطوح الاجسام الحية و الميتة و يسهل انتشارها و حملها بواسطة الهواء لصغر حجمها . تتواجد الفطريات في جميع البيئات الصلبة و السائلة و الغازية .

### التمرين العملي

#### • عزل الفطريات من الهواء

- 1- يستخدم طبق بتري حاوي على وسط غذائي معقم و بعد فتح غطائه يعرض لجو الغرفة لمدة من الزمن (15 دقيقة) ثم يعلق الغطاء و يوضع بالحاضنة بدرجة 25م° لمدة (3-7) ايام ثم يفحص .
- 2- طبق السيطرة control يكون حاوي على وسط غذائي معقم فقط ولا يعرض لجو الغرفة و يوضع بالحاضنة كذلك و بعد (3-7) ايام يفحص ويستعمل للمقارنة . (س: ماذا تتوقع ان تكون النتائج ؟) .



شكل(11) يوضح طريقة عزل الفطريات من الهواء.

#### • عزل الفطريات من بعض الاجزاء النباتية :

##### البذور seeds

- 1- يحضر طبق حاوي على وسط غذائي معقم (PDA) . و بواسطة ملقط معقم تنقل البذور المراد عزل الفطريات منها اليه و توزع بشكل مناسب ثم يوضع الطبق في الحاضنة و بعد(3-7) ايام يفحص . وللتأكد من دقة النتائج نعمل عدة مكررات .
- 2- طبق السيطرة يكون حاوي على وسط غذائي معقم فقط بدون بذور , يوضع الطبق في الحاضنة و بعد(3-7) ايام يفحص .

## الثمار و الجذور

تؤخذ قطع من الثمار و الجذور من المناطق المصابة وغير المصابة (لماذا؟) وتغسل جيدا بالماء وتقطع بالمشروط المعقم الى قطع صغيرة بطول (1-2) سم وتوزع بالتساوي في طبق بتري بحيث لا يزيد عددها عن 4 قطع ثم تحضن عند درجة حرارة 27م° لمدة اسبوع وتفحص لملاحظة النتائج .

### • عزل الفطريات من التربة

التربة هي سطح الارض الذي نعيش عليه و فيه الاحياء المختلفة و بضمنها الاحياء المجهرية .و التربة هي اغنى البيئات بالاحياء المجهرية و ان اختلفت انواعها و اعدادها من مكان لآخر والذي يعود الى عدة اسباب منها: حسب ما تتعرض له من ظروف جوية , محتواها من المواد العضوية و اللاعضوية , استغلالها من قبل الانسان لاغراض الزراعة و الصناعة ..... الخ . ففي التربة تتواجد البكتريا و الفطريات و الابدائيات و الطحالب و الرواشح(الفايروسات) والتي تتداخل سلبا و ايجابا فيما بينها او مع الاحياء الاخرى بعلاقات معقدة . و لاجل عزل الانواع الفطرية المتواجدة في العينة المأخوذة من التربة نقوم بالاتي:

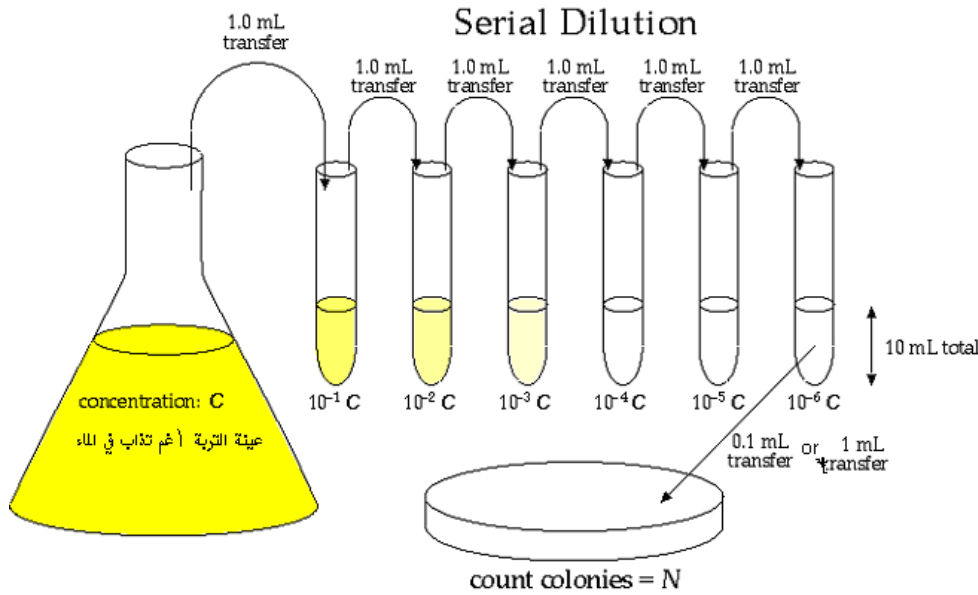
1-ناخذ عينة من التربة بصورة عشوائية بمقدار 1غم لتكون ممثلة للحقل المراد دراسته ككل .  
2-تستخدم الطريقة المباشرة Direct method او طريقة التخفيف Dilution method لعزل الفطريات من التربة و كالاتي :

### ا- الطريقة المباشرة Direct method

تؤخذ عينة من التربة مقدارها 1 غم توضع في انبوبة اختبار حاوية على ماء مقطر 10 مل ثم يؤخذ 1 مل من هذه الانبوبة و تنقل لطبق فارغ و يصب فوقها الوسط الغذائي و تنقل للحاضنة لمدة ( 3-7 ) ايام ثم تفحص و يتم العمل ب 3 مكررات على الاقل .

### ب-طريقة التخفيف Dilution method

1- تعمل عدة تخفيف (10<sup>-1</sup> , 10<sup>-2</sup> , ..., 10<sup>-6</sup>) كما في (شكل 12) وذلك بمزج 1غم من التربة مع 10مل ماء مقطر معقم في انبوبة اختبار معقمة ثم يؤخذ منه 1مل ويضاف الى 9مل من الماء المقطر والمعقم في انبوبة اختبار ثانية ليصبح التخفيف 10<sup>-1</sup> ثم نجري سلسلة من التخفيف في انبوبة ثالثة ورابعة الى ان نصل الى تخفيف 10<sup>-6</sup> .



شكل(12) يوضح طريقة التخفيف العشرية لعزل الفطريات من التربة.

2- يؤخذ من كل تخفيف 1 مل و ينقل الى اطباق فارغة ومعقمة غير حاوية على وسط غذائي ثم يصب بعد ذلك الوسط الغذائي في الطبق و لاجل التجانس ما بين العينة المراد زرعها (1 مل ) و الوسط الغذائي الذي تم صبه في الطبق تحرك الاطباق بحركة دائرية ( يتم العمل بثلاث مكررات على الاقل ) ثم توضع الاطباق في الحاضنة و تفحص بعد ذلك وبالإمكان استخدام اطباق زجاجية حاوية على الوسط الغذائي وينشر على سطحها 0.1 مل من العينة المراد زرعها.

\*-طبق المقارنة في الطريقتين هو عبارة عن 1 مل ماء مقطر معقم يصب فوقه الوسط الغذائي المعقم و من ثم يوضع في الحاضنة لمدة (3-7) ايام و يفحص بعد ذلك .

### • عزل الفطريات من ماء الساقية

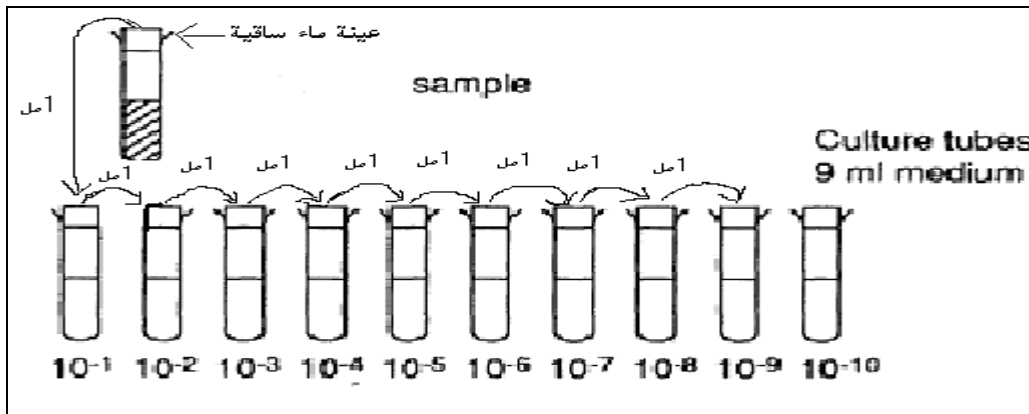
كما هي الحال في التربة فان مجاميع الاحياء المجهرية من رواسح و بكتريا و فطريات و طحالب تتواجد طبيعيا في البيئة المائية . للاحياء المجهرية في الماء اهمية خاصة لعلاقتها انشطتها المختلفة بصحة الانسان و الحيوان و لاتخاذها موقعا متميزا في سلسلة الغذاء حيث توفر المغذيات للاحياء المجهرية الاكثر تعقيدا . فالماء مصدر غذاء ووباء . تستخدم طرائق شتى للتحري عن الاحياء المجهرية في الماء و كما يلي :

#### ا- الطريقة المباشرة

تؤخذ عينة من ماء الساقية مقدارها 1 مل و توضع في طبق فارغ معقم غير حاوي على وسط غذائي ثم يوضع في الطبق طعوم صائدة و ينقل للحاضنة و بعد(3-7) ايام يفحص . (ملاحظة : من الافضل ان نستخدم عدة مكررات عند اجراء أي تجربة , لماذا؟).

#### ب- طريقة التخفيف

ان الغرض من القيام بهذه العملية هو للتقليل من الاحياء المجهرية و للحد من التداخل فيما بينها . لذا يفضل استخدامها عندما تكون عينة الماء ذات درجة عالية من التلوث بالنمو المكروبي .وكالاتي:  
1- تؤخذ عينة مقدارها 1 مل من ماء الساقية و يتم عمل عدة تخفيف عشرية لها ( $10^{-1}$  ,  $10^{-2}$  , --- الخ ) كما في الشكل التخطيطي الموضح ادناه (شكل13) .



شكل(13) طريقة التخفيف لعزل الفطريات من عينة ماء الساقية.

2- يؤخذ من كل تخفيف 1مل و ينقل الى طبق فارغ معقم ثم يوضع في الاطباق طعوم صائدة(مثلا الذباب المنزلي) و تنقل الاطباق الى الحاضنة و بعد(3-7) ايام تفحص . يتم العمل بثلاث مكررات على الاقل .

\*طبق المقارنة في الطريقتين اعلاه عبارة عن 1 مل من الماء المقطر المعقم الحاوي على طعوم صائدة ثم يوضع في الحاضنة و بعد(3-7) ايام يفحص .

## الطعوم الصائدة

عبارة عن ( بذور السمسم او القنب ,حشرات او اجزاء من الحشرات الميتة مثل ارجل أو اجنحة الذباب ) تعقم بجهاز المؤسدة وتوضع في الاطباق لتصبح مركز لتجمع الفطريات عليها (شكل14) أي انها تمثل اوساط غذائية طبيعية Natural media و هذه تستخدم مع الفطريات المائية بصورة عامة لكون هذه الفطريات عادة تفضل هذا النوع من الاوساط الغذائية .



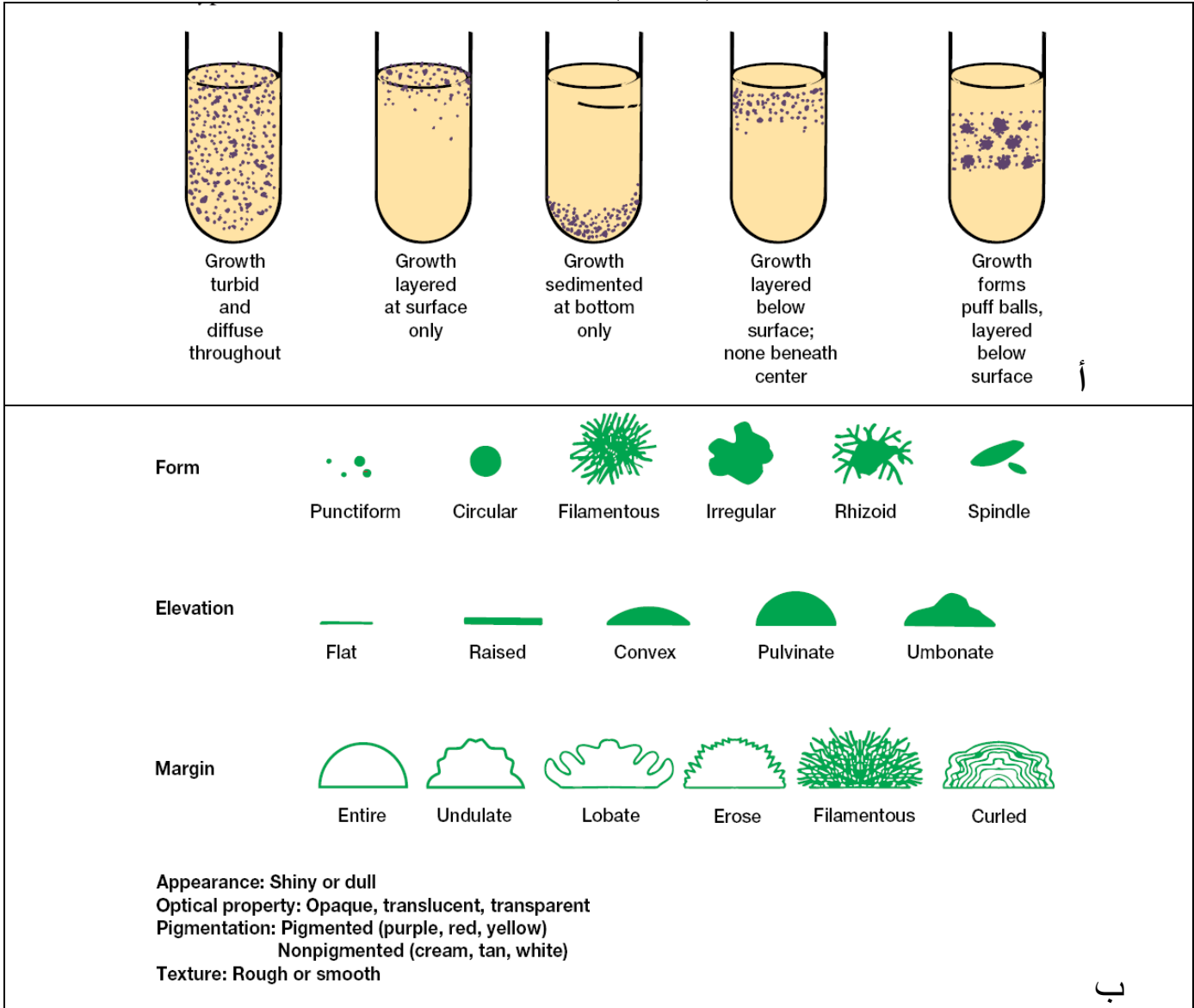
شكل(14) طبق زجاجي حاوي على طعوم صائدة لعزل بعض الفطريات المائية من عينة ماء ساقية .

## تشخيص الفطريات

تدرس الفطريات مختبريا بعد عزلها على الاوساط الغذائية بشكل مستعمرات نقية Pure culture حيث نحصل عليها عند اجراء عملية التلقيح Inoculation وذلك بنقل كمية من الابواغ الفطرية او الغزل الفطري بواسطة ابرة خاصة معقمة needle الى احد الاوساط الغذائية المجهزة لهذا الغرض ومن ثم توضع في الحاضنة عند درجة حرارة ملائمة لمدة (3-7) ايام وبعد ذلك تفحص لمشاهدة النمو الفطري والذي يكون عادة على شكل خيوط فطرية متفرعة شفافة او ملونة تعرف بالهيفات Hyphae وهذه الخيوط الفطرية قد تكون مقسمة بحواجز او غير مقسمة ، ومجموع الخيوط الفطرية النامية يطلق عليه الغزل الفطري المايسيليوم Mycelium .

ولاجل دراسة وتشخيص المستعمرات الفطرية النامية نقوم بما يلي:

1- رؤية الشكل الخارجي للمستعمرات الفطرية النامية وملاحظة حجم المستعمرة الفطرية النامية وشكلها ولونها على سطح الوسط الزراعي وطبيعة وقوام هذه المستعمرة (خيوطية، قطنية، ---الخ) فضلا عن ان طبيعة نموها في الوسط الصلب والسائل ايضا له دلالة تشخيصية مهمة (شكل 15).



شكل (15) يوضح طبيعة نمو المستعمرات الفطرية في الوسط السائل (أ) و الوسط الصلب (ب) .

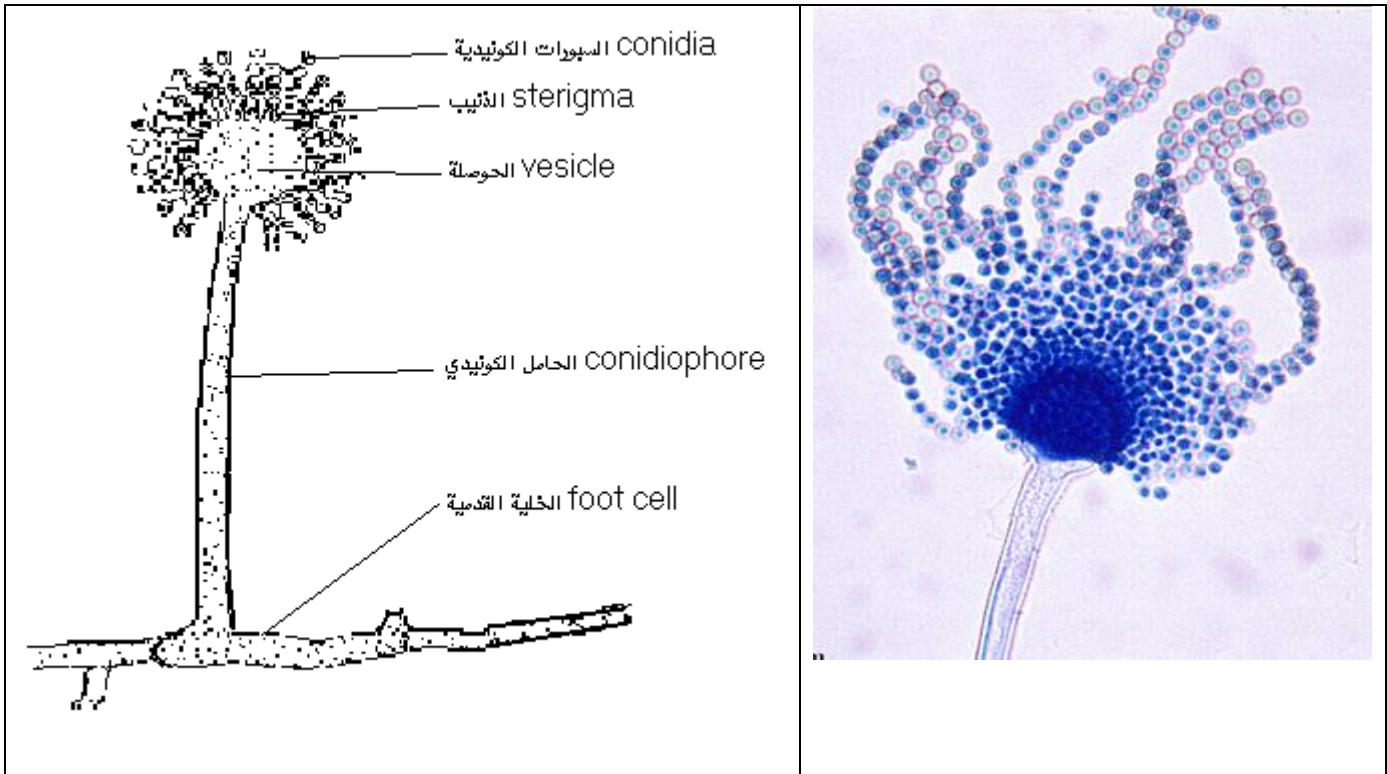
2- تحضر شرائح مجهرية من هذه المستعمرات النامية لاجل فحصها مجهريا باستخدام المجهر الضوئي وتسجيل الملاحظات حولها من حيث اصطبغها وطبيعة الخيط الفطري مقسم ام لا , شكل الابواغ ولونها وحجمها وعددها ، طريقة ترتيب الابواغ على الخيط الفطري للفطر المراد دراسته .

### بعض الاجناس الفطرية الشائع عزلها من المزارع الفطرية

#### فطر *Aspergillus*

فطر الاسبرجلس يعد من الفطريات غزيرة التكاثر والانتشار وبالذات في البيئة الهوائية والتربة ولهذا الفطر العديد من الفوائد في النواحي الصناعية والطبية والزراعية وكذلك له العديد من الأضرار التي سنوردها لاحقا. ويطلق عليه بالعامية ابو كفشة . مستعمرات الفطر ذات الوان مختلفة حسب انواعه فمنها الابيض والاسود والاصفر والاخضر وغيرها .

الغزل الفطري يتكون من خيوط فطرية مقسمة ومتفرعة الى فروع هوائية مستقيمة تعرف بالحوامل الكونيدية Conidiophores وتكون نهاية كل حامل على شكل راس مستدير يعرف باسم الحوصلة Vesicle والتي تحمل مجموعة من الحوامل الصغيرة التي تعرف بالذنبات sterigma ويحمل كل ذنب سلسلة من الابواغ التي تكون بشكل سلاسل مرتبطة بالحوصلة على شكل شعاعي والتي تعطي الفطر شكله المميز (شكل 16).



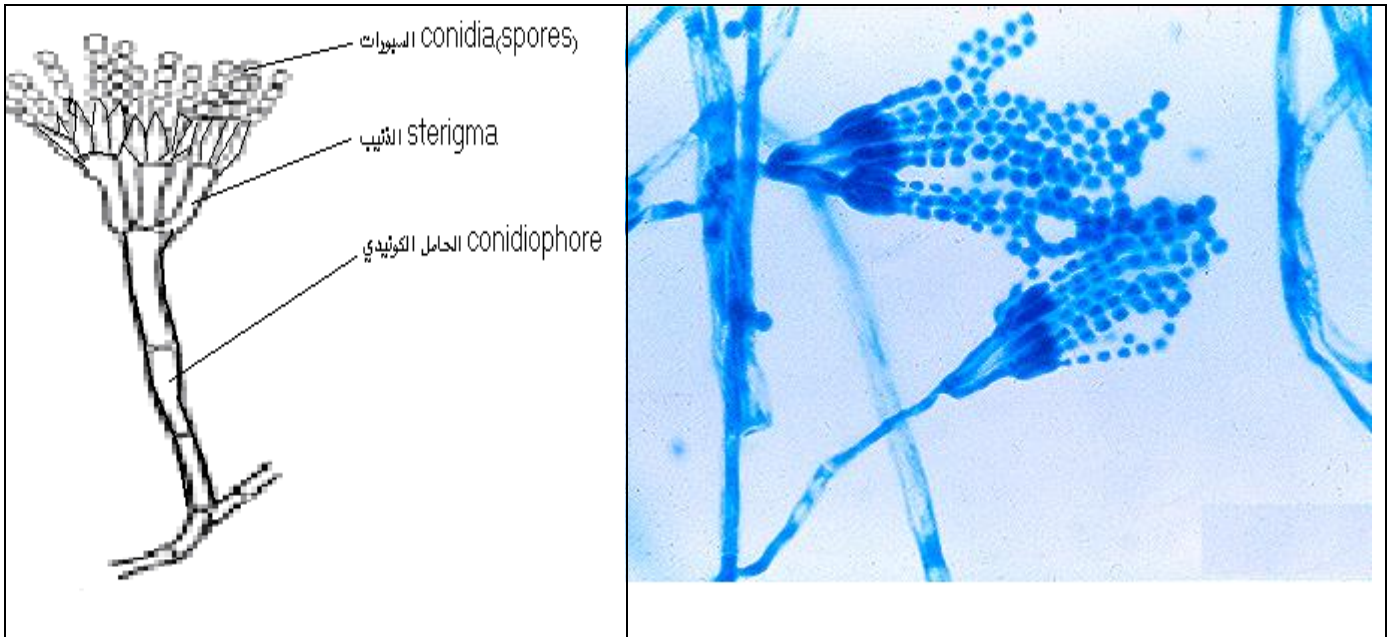
شكل (16) فطر *Aspergillus* .

#### فطر *Penicillium*

فطر البنسليوم يعد ايضا من الفطريات غزيرة التكاثر والانتشار وبالذات في البيئة الهوائية والتربة وللفطر ايضا العديد من الفوائد في النواحي الصناعية والطبية والزراعية و الغزل الفطري له يتكون من خيوط فطرية مقسمة ومتفرعة الى فروع هوائية مستقيمة تعرف بالحوامل الكونيدية وتكون نهاية كل حامل مميزة حيث انها تنتهي بمجموعة من الذنبات تحمل سلاسل من الابواغ بحيث تشابه هذه الفروع كف اليد او المكنسة ولجل ذلك يطلق عليه



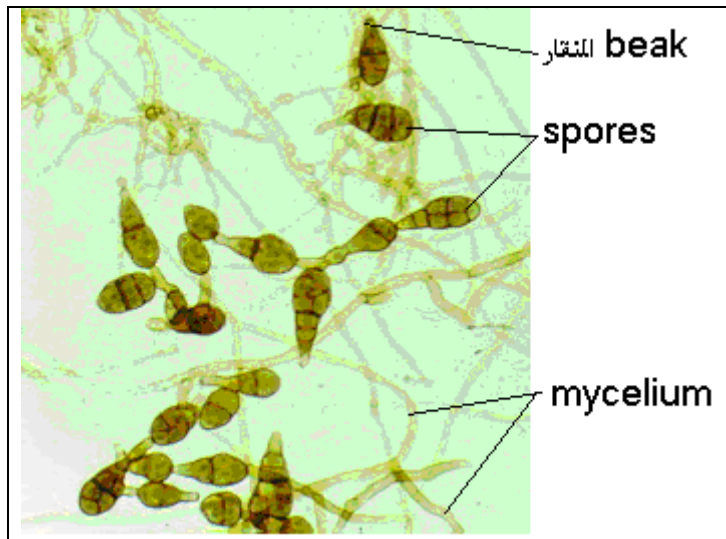
بالعامية مكنسة الساحرة . مستعمرات الفطر ذات الوان مختلفة تبعا للنوع فمنها الاصفر والاخضر والازرق وغيرها (شكل 17).



شكل (17) فطر *Penicillium* .

#### فطر *Alternaria*

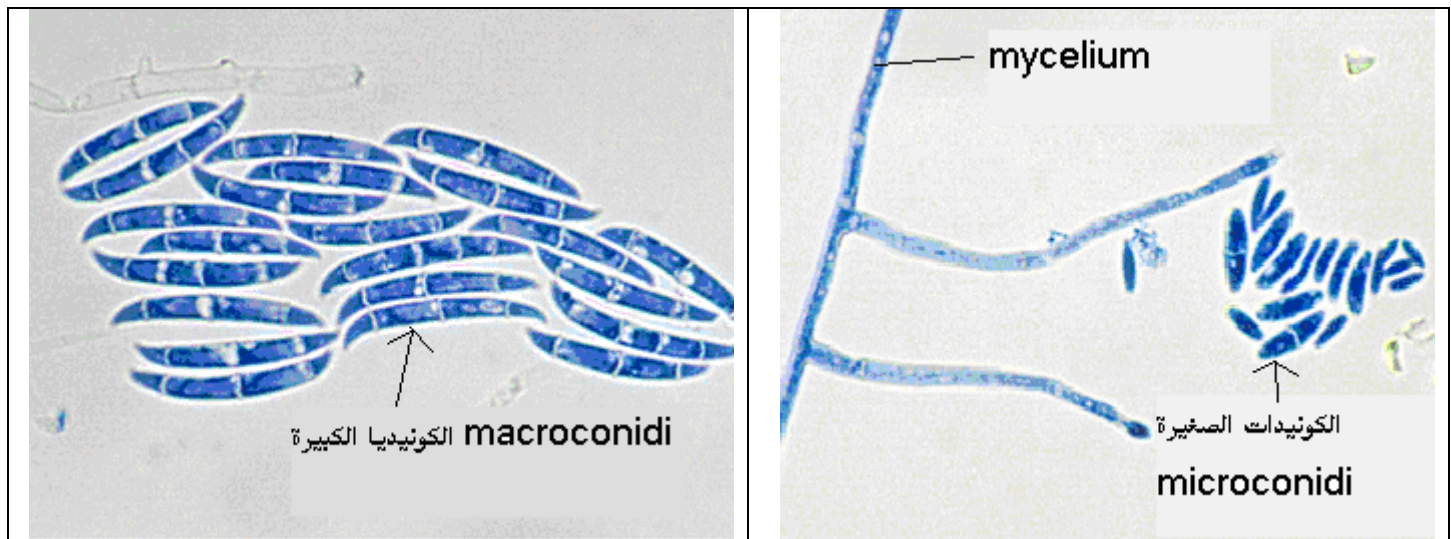
المستعمرات ذات لون بني مسود او اسود والغزل الفطري له يتكون من خيوط فطرية مقسمة و ينتج الفطر انواع من الابواغ تكون مقسمة تقاسيم طولية وعرضية شكلها بيضوي وقد تحوي على تركيب يشبه المنقار (شكل 18).



شكل (18) فطر *Alternaria* .

#### فطر *Fusarium*

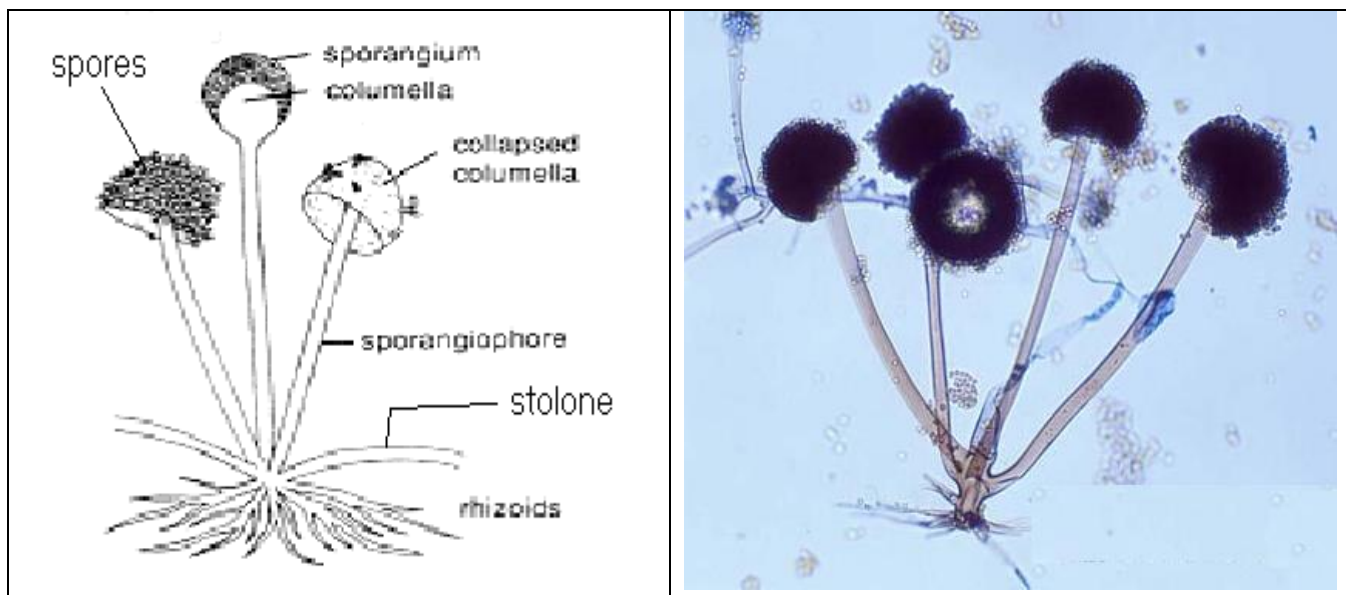
المستعمرات بيضاء اللون قطنية و بعض انواعه ذات لون مصفر ، الغزل الفطري له يتكون من خيوط فطرية مقسمة و ينتج الفطر انواع من الجراثيم الكونيدية ذات شكل هلالى و هي: الكونيديا الكبيرة Macro conidia و الكونيديا الصغيرة Micro conidia .



شكل (19) فطر *Fusarium*.

### فطر *Rhizopus*

يطلق عليه فطر عفن الخبز ( فطر مترمم يعيش على الخبز الرطب) الغزل الفطري له غير مقسم ويكون متفرع باتجاهات مختلفة : نحو الاسفل يشكل اشباه الجذور و يخرج من مكان مقابل لاشباه الجذور نحو الأعلى حاملات العلب البوغية و عددها يتراوح من ثلاثة الى خمسة حوامل ينتهي كل منها بحواظ بوغية تحتوي كل علبة منها العديد من الابواغ , ويربط ما بين حامل علبة بوغية واخرى خيوط فطرية عرضية تعرف بالمدادات stolones (شكل 20) .

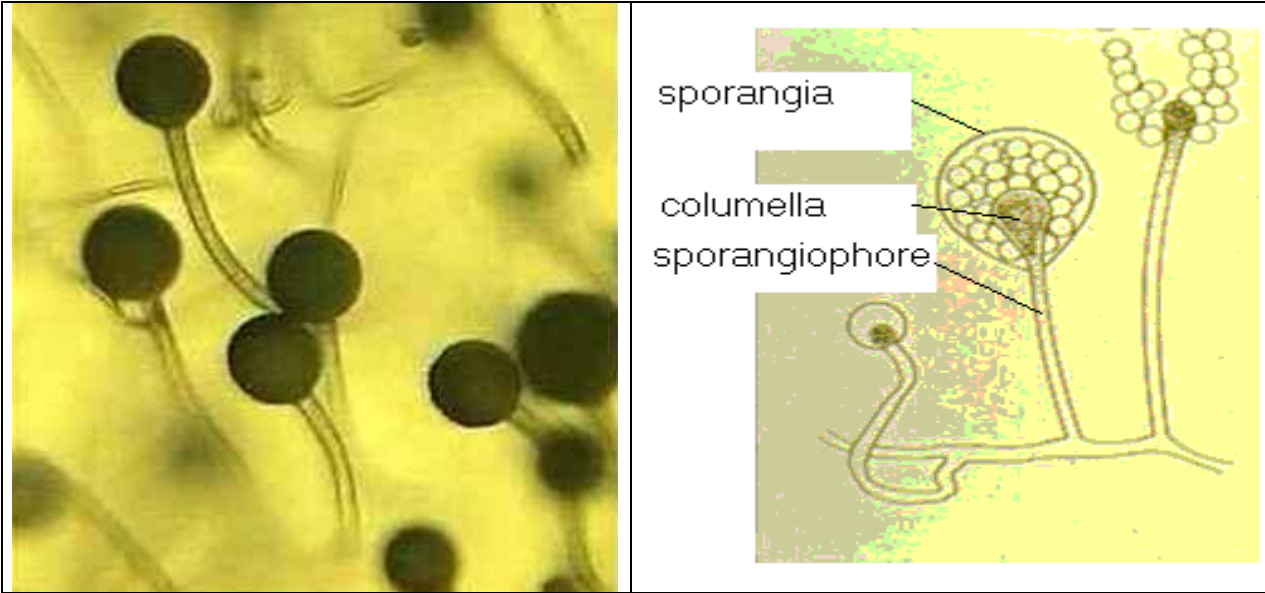


شكل (20) فطر *Rhizopus*.

### فطر *Mucor*

فطر مترمم ذو غزل فطري غير مقسم يشبه كثيرا عفن الخبز ولكنه يفتقر لاشباه الجذور ، والحوامل الجرثومية له متفرعة او غير متفرعة (شكل 21).





شكل (21) فطر *Mucor* .

## التمرين العملي

- يطلب من الطلبة دراسة وفحص المستعمرات الفطرية التي تم عزلها في التجارب السابقة من حيث حجم المستعمرة الفطرية النامية وشكلها ولونها على سطح الوسط الزراعي وطبيعة وقوام هذه المستعمرة (خيطية، قطنية، --- الخ) وطبيعة نموها في الوسط الصلب والسائل وتسجيل النتائج .
- يطلب من الطلبة تحضير شرائح مجهرية من هذه المستعمرات النامية ودراستها باستخدام المجهر الضوئي وتسجيل الملاحظات حولها من حيث اصطبغها وطبيعة الخيط الفطري مقسم ام لا، شكل الابواغ ولونها وحجمها وعددها ، طريقة ترتيب الابواغ على الخيط الفطري للفطر المراد دراسته وتسجيل النتائج ، كما يلي :

- 1- يرفع بواسطة الابرة جزء من النمو الفطري ويوضع في وسط شريحة زجاجية حاوية على قطرة ماء (سلايد مؤقت ) او تحتوي على قطرة لاکتوفينول (سلايد دائمي) .
- 2- يوضع غطاء الشريحة Cover slips بصورة عامودية الى ان يغطي القطرة حتى لا تتكون فقاعات هوائية في الشريحة الزجاجية المحضرة ثم تفحص الشريحة المحضرة تحت المجهر وتسجل النتائج .
- 3- يحضر اللاكتوفينول وذلك باخذ 20 غم من الفينول و يذوب في 20 مل من الماء المقطر بعد تدفئته ومن ثم يضاف اليه 20 مل من حامض اللاكتيك و 40 مل من الكليسيرون مع بضع قطرات من بعض الصبغات مثل Cotton blue او Methylene blue او Acid fuchsin ، يحفظ المحلول في قناني معتمة لمنع تأكسده بفعل الضوء .