الفصل الرابع عشر

طرق دراسة وجمع واعداد الأوالي

- تمهيد
- جمع واعداد الأوالي المائية
- السلوك البيني وتنوع مواطن الأوالي المائية
- جمع واعداد الأوالي البحرية
- جمع واعداد أوالي منطقة المد والجزر
- جمع واعداد أوالي منطقة تحت نطاق المد والجزر
- طريقة استخدام الشباك
- طريقة استخدام الكرادة والتردلة
- طريقة استخدام الكباش أو المكروفة
- جمع واعداد الأوالي القاعية المنصفة
- طريقة الترشيح
- طريقة الفقاعات الهوائية أو طريقة هيجنز
- طريقة ثلج ماء البحر أو طريقة أوليج
- طريقة Boisseaw أو طريقة الترويق
- جمع واعداد أوالي المياه العذبة
- جمع واعداد أوالي البيئة الأرضية
- جمع واعداد الأوالي المتعايشة والمتطفلة
- أوالي التعايش والتطفل الخارجي
- أوالي التعايش والتطفل الداخلي
- جمع واعداد الأوالي الفطرية الحيوانية
- خطوات دراسة الأوالي بعد الجمع
- بعض طرق فحص الأوالي
- بعض طرق تثبيت الأوالي
- صبغ وتلوين الأوالي

الفصل الرابع عشر

طرق دراسة وجمع واعداد الأولى

تمهيد:

تخضع دراسة الأوالي والتعرف عليها إلى العديد من الاعتبارات والتي يقع في مقدمتها فهم حياتية هذه الأحياء وطريقة انتشارها وتواجدها في البيئة وطريقة التعامل معها وتهيئة الوسيلة والأداة أو الجهاز البيئي المناسب لجمعها مع المحافظة على مكونات الجسم من دون تأثيرات قد تفقده بعض الخواص المطلوب التعرف عليها وخاصة في الجوانب التصنيفية، ونتيجة لهذه الاعتبارات نجد أن هذا الموضوع قد خضع إلى الدراسة والمراجعة من قبل الباحثين وتغيرت كثير من وسائل البحث والجمع والتشخيص، لذلك حاولنا التعرض في هذا الفصل لأهم الطرق التي تخصصت في كل مجموعة من الأوالي وتطبيق ذلك على نماذج شائعة منها وخاصة ما هو متوفر في بيئة الطالب والباحث لغرض التطبيق المباشر في بيئة الأولي أو داخل المعامل والمختبرات العلمية، وعليه قسمت هذه الدراسات كما في التوصيف التالي:

جمع واعداد الأوالي المائية:

كما هو معروف أن البيئة المائية تشمل بيئة الماء العذب freshwater والماء المالح Marine water وكل من هذين الوسطين هو الآخر يتضمن عدة نظم بيئية فرعية تتوزع فيها الأوالي كهائمات أو قاعيات أو الأوالي متحركة في الجسم المائي أو إنها تكون جالسة أو ملتصقة على الأجسام غير الحية الموجودة فيه، وهذا الكلام ينطبق على الأوالي المائية الحرة المعيشة لكننا سنجد ضمن النظام البيئي المائي أوالي تعايشية وأخرى متطفلة خارجية أو ذات تطفل إجباري داخل عدد العديد من الأحياء المائية المختلفة، ومن الجانب الآخر نجد أن هنالك اختلاف في الطبيعة الجيولوجية والهيدروبيولوجية للماء المالح والماء العذب تتعلق بعمق الماء والمساحة المائية والملوحة والضغط المائي واللزوجة وغيرها من العوامل التي تفرض دراسة كل من هذه البيئات بصورة مستقلة وباستخدام طرق مختلفة.

السلوك البيني وتنوع مواطن الأوالي المائية:

عند متابعة توزيع وبيئة هذه الأوالي في الأوساط المائية نجد هنالك بعض التخصص في هذا التوزيع ناتج عن طبيعة معيشة هذه الأحياء وسلوكها البيني وتكيفها للمتغيرات البيئية التي تحصل في هذه الأوساط المختلفة وكما يظهر في الحالات التالية.

- **الأوالي المتخفية تحت أوراق النباتات والمخلفات العضوية:**

تختفي بعض الأوالي من اهدبيات والنحميات والعديد من السوطيات حرة المعيشة في الماء تحت الأجزاء النباتية الموجودة في المياه أو تحت الطحالب الخيطية أو الطحالب الكبيرة الأخرى وخاصة البنية في منطقة السواحل البحرية أو الأعشاب البحرية بعد انحسار الماء، لذلك ترفع أجزاء كاملة من هذه التجمعات إلى أحواض أو قناني كبيرة أو جرادل وتحرك بلطف لتمتزج فيها أو بتحفيزها على ذلك بإضافة كمية من الماء العذب أو محلول الفورمالين المخفف أو الكحول أو قليل من بلورات كبريتات المغنسيوم $MgSO_4$ حيث تعمل هذه المواد على تنفير الأوالي الحيوانية بشكل خاص protozoa وتتحرر في الماء، بعدها ترفع النباتات والطحالب تدريجيا مع التحريك المستمر لغرض نزع الأوالي منها، ثم يتم بعد ذلك فصلها عن اللافقاريات والحيوانات المائية الأخرى باستخدام وسائل ترشيح مختلفة حسب حجم الأولي المقصود بالدراسة والبحث. وتستخدم لجمع هذه الأوالي المعدات والأدوات المبينة في الشكل التالي (14- 1).

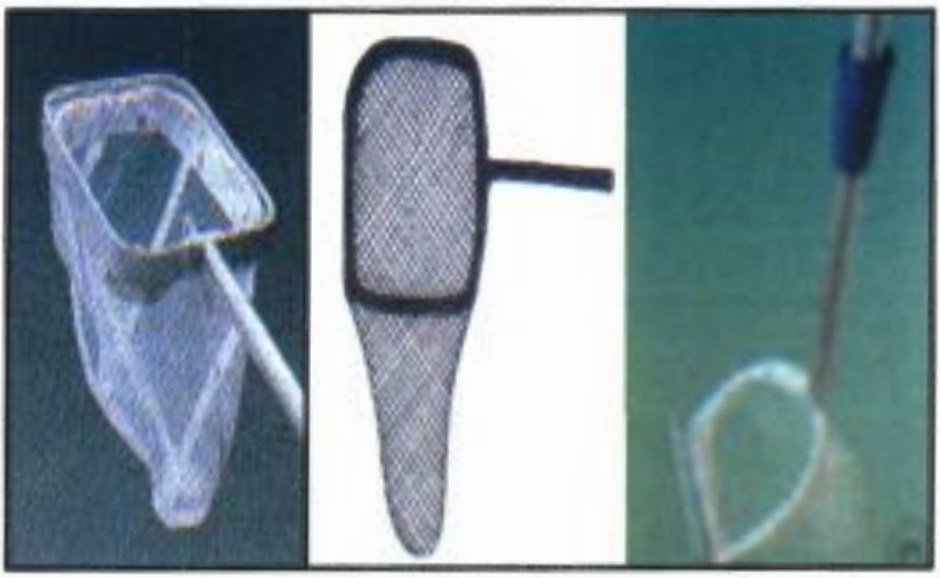
شكل (14-1) نماذج من أدوات جمع الأوالي المختبئة تحت المتبقيات النباتية.

- **الأوالي المختفية داخل شقوق الصخور وأخاديدها:**

تميل بعض الأوالي من اللحميات وبعض اهدبيات الجالسة والخرمات بعد انسحاب الماء إلى الاختباء بين شقوق الصخور والأخاديد المتكونة بينها لذلك تحفز هذه الأوالي بمحلول مخفف من الفورمالين يسكب حول الشقوق والأخاديد حيث يعمل على تنفيرها وخروجها من مواقعها. أما الجالسة منها فيجب كسر الصخور ما أمكن منها لإخراج الأجزاء الموجودة في الأخاديد.

- **الأوالي الموجودة في أرصفة الموانئ والمرافئ:**

حيث تنشأ في هذه المواقع الأسطح المنحدرة والمرصوفة بالأحجار أو بالخرسانة أو الحديد وغير ذلك من الأجسام العائمة في الماء، ولغرض جمع الأوالي فيها من السوطيات الحيوانية والنباتية أو الأوالي الجالسة حيث يستخدم عند إذ إما الأدوات الكاشطة أو الشبكة الكاشطة Scrape-net ذات ماسك طويل وقوي كما في الشكل (14-2) التالي:



شكل (14-2) نماذج من الشباك الكاشطة.

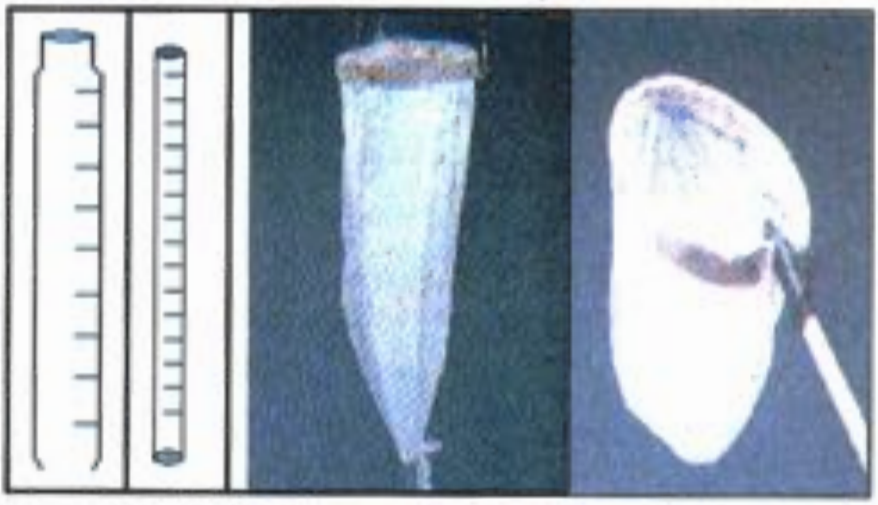
- **الأوالي التي تختفي في المواد العضوية واللاعضوية:**

تستخدم لذلك طريقة الطفو كما جاء في لنكوين وشيلز Lincoln & Sheals والتي وضعها (بريكيت Birkett 1957) وهي تحضير سائل من رباعي كلوريد الكربون CCl_4 توضع فيه الأجسام

الخاوية على الكائنات وتقلب عدة مرات ثم تترك لتستقر، وبعد فترة تتحلل هذه الأجسام وتنزل إلى القاع أما الأوليات الأقل كثافة تطفو على سطح المحلول. ولكن وجد من خلال تطبيق هذه الطريقة وجد أن الكتل الغنية بالمواد العضوية تتحلل في رابع كلوريد الكربون مما يكون رغوة تطفو على السطح مع الكائنات وتعتبر هذه مشكلة في فصل وعزل الكائنات، لذلك اقترح الباحث Anderson 1959 طريقة أخرى وهي إضافة محلول من حبيبات السكر بمعدل 1 كغم / 4.5 لتر من الماء حيث يعمل السكر الممتزج مع الماء على زيادة كثافة المواد العضوية المتحللة والرواسب العالقة الأخرى لأن كثافته في الماء تبلغ كثافته 12٪ مما يؤدي إلى زيادة سرعة نزول الفتات العضوي إلى القاع مما يساعد على تحرر الأوالي في المنطقة العليا وسهولة التعرف عليها.

- **الأوالي المتواجدة في البرك والأحواض في منطقة المد والجزر:**

تتكون في منطقة المد والجزر برك بيولوجية وأحواض وهي نتيجة لتأثير الاختلاف الجيولوجي في تكوين المناطق وتأثير تيارات الماء على الطبيعة الساحلية من رمال ومواد طينية وصخور، مما يؤدي إلى نشوء هذه المواقع ومع مرور الزمن تترسب فيها المغذيات والمواد العضوية والرواسب البحرية مما يجعلها مصائد طبيعية غنية بالكائنات المختلفة ومن ضمنها الأوليات، ولغرض جمع ما فيها من دراستها يفضل استخدام الشباك اليدوية Hand-net ذات الفتحات الصغيرة والضيقة أو أنابيب الامتصاص Pipettes ذات النهايات الواسعة وخصوصا للأوالي السريعة الحركة وكما مبين في الشكل (14-3) التالي:



شكل (14-3) نماذج من الشباك اليدوية والأنابيب المستخدمة في جمع الأوالي من البرك والأحواض.

- **الأوالي الملازمة لحبيبات الرمل والقرين والكتل الصخرية الصغيرة:**

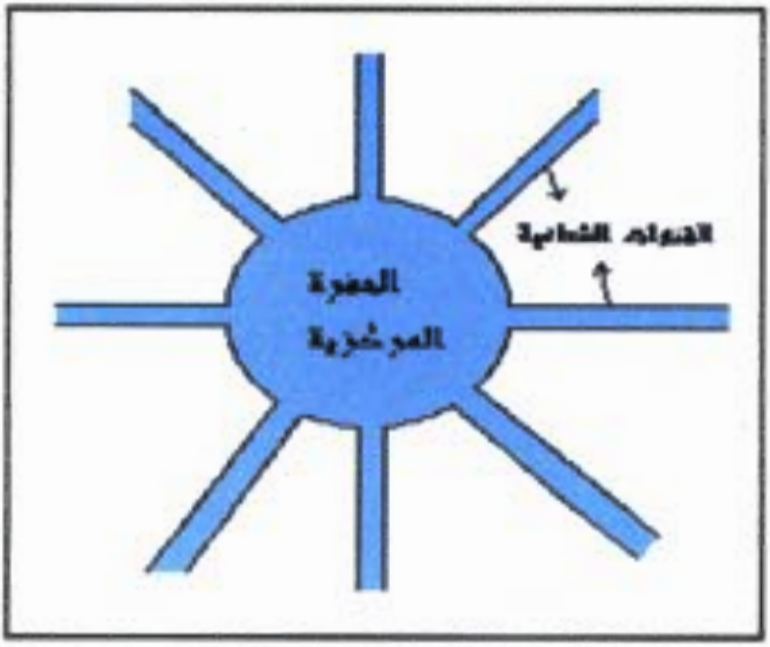
وهي مجاميع الأوالي التي تكوّن أحيانا إنفاق داخل الرمال أو تلتصق بحبيباته كما في خيطية الأقدام والأميبات وبعض الهدبيات والشعاعيات وغيرها، وهذه الأوالي تجمع بطريقة الحفر أو جرف التربة ثم غربلة الناتج باستخدام غرابيل مختلفة ذات فتحات صغيرة جدا، أما في حالة الرغبة بالتقدير الكمي للعينات فتستخدم غرابيل الاهتزاز وكما في الشكل (14- 4)، ويجب عمل ذلك مختبرياً وتسجيل النتائج مثل المساحة المأخوذ منها العينة وحجم العينة ووزنها الرطب ومجموع عدد العينات.

شكل (14-4) غربيل التربة الهزاز وغرابيل يدوية مختلفة الأحجام.

- **الأوالي التي تختفي بين مكونات التربة الطينية والرمل الناعم.**

وتستخدم لذلك طريقة خاصة ومبسطة يمكن تنفيذها بأبسط الأدوات تسمى بطريقة (الحفر شعاعية الأذرع)، وهي الطريقة التي ابتدعها الباحثان هيلينش وجيري Hulings & Gray ويطبق هذا الأسلوب في حالة انحسار المد عن السواحل التي تتصف بالتربة التي ذكرناها، حيث يتم عمل حفرة صغيرة في الرسابة الساحلية نفسها مع عمل عدد من القنوات الشعاعية الصغيرة حولها وعلى مسافة 2-3 متر لغرض تسهيل عملية انسياب الماء المتبقي داخل جزيئات التربة إليها من مختلف جوانب المنطقة المحيطة بالحفرة المركزية وكما مبين في الشكل (14-5) وبعد تجمعه فيها تدريجيا فأنه سيحمل إلى مركز الحفرة أحياء مختلفة تنساب مع حركة الماء ومن ضمنها الأوالي.

وهنا يتم دراسة مجاميع مختلفة من الأوالي بطرق مختلفة كذلك فمثلا لجمع العائمة منها والمتحركة نستخدم غربال دقيق الفتحات أو شبكة جمع العوالم البحرية دقيقة الثقوب أقل من 10-50 ميكرون، أو نستخدم الجرادل الصغيرة أو الأنابيب المخبرية ثم تنقل العينات للمعمل لغرض الفحص والتعرف عليها، أما الأوالي غير المتحركة فنأخذ النماذج من المواد المترسبة في قاع الحفرة المركزية ونطبق عليها طرق الفصل المختلفة التي تم توضيحها سابقا تماشيا مع طبيعة الرسابة الموجودة في المنطقة.



شكل (14-5) طريقة الجفر الشعاعية الأذرع لجمع الأوالي.

أولا. طرق جمع واعداد أوالي البيئة البحرية Marine Protista :

تقسم البيئة البحرية لأغراض الدراسة ومتابعة توزيع الأحياء بشكل عام والأوالي بشكل خاص إلى عدة مستويات ونظم داخلية لأن الأوالي البحرية تنمو وتقطن عدة مناطق بيئية ذات خصائص مختلفة من حيث الغذاء وحركة الماء وعمود الضوء بالإضافة إلى طبيعة عوامل الكيميائية والفيزيائية والجيولوجيا والتوزيع الحراري وموقع البحر من خط الاستواء وغيرها من العوامل، وهذا ما ينطبق على أجناس وأنواع مملكة الأوالي كذلك.

لذلك نجد أن هنالك مواطن توزيع بيئي مختلفة في البيئة البحرية للأوالي كهائمات أو سابحات أو ملتصقة على الأجسام أو على الأحياء الكبيرة أو متعايشة معها أو متطفلة عليها أو أنها تعيش على شكل مجاميع قاعية، لذلك يفضل أن تدرس بصورة منفصلة عن بعضها لزيادة الدقة وتفسير التداخل بين العوامل وتحديد الدور البيئي لهذه الأحياء نتيجة لسعة وتنوع هذه البيئة مقارنة مع البيئات المائية الأخرى، وعليه سوف يتم تناول الأوالي في المناطق البيئية التالية:

(أ) أوالي منطقة المد والجزر:

تمثل منطقة المد والجزر الساحل البحري الذي تغمره المياه وقت المد وتنسحب عنه وقت الجزر، وتفضل الدراسة فيه بأوقات المد الربيعي التام Spring tides أي المد الأعلى والذي يحصل كل أسبوعين في أول الشهر عندما يكون القمر هلالاً وفي منتصف الشهر عندما يكون بدراً حيث يرتفع مستوى مياه البحر إلى أعلى حد وبعد ذلك ينخفض إلى اقل مدى ممكن. ولذلك تنكشف هذه المناطق بما فيها من أوليات وخصوصا الكبيرة وكذلك الأوليات المجهرية وتبقى مع المواد المطروحة من البحر في تربة السواحل. إن الطرق المستعملة في جمع كائنات مناطق المد والجزر عادة تكون طرق بسيطة ولا تحتاج إلى تقنيات معقدة وهي بالدرجة الأساس تعتمد على التكوين الجيومرفولوجي للشاطئ البحري نفسه وعلى السلوك البيئي للأوالي نفسها، حيث نجد أنها تختلف في طبيعة تعاملها مع مكونات هذه المنطقة أثناء وجود الماء أو بعد حصول عملية الجزر وانسحاب الماء إلى داخل البحر، وعموما يمكن ملاحظة السلوكيات التالية لهذه الكائنات.

- أنواع عديدة من الكائنات الأولية تسارع بالاختفاء بعد انحسار الماء بين جزيئات التربة الساحلية.
- هنالك بعض الأوالي تختفي بعد نقص عمود الماء ابتعادا عن مصدر الضوء المباشرة لذلك يفضل جمعها باليد قبل هذه الفترة وخاصة الخرمات والفطريات اللحمية المتطفلة على الحشائش البحرية وغيرها.
- الأوالي التي تلتصق على الصخور المكشوفة يمكن التقاطها عن طريق الملاقط والفرشاة وأما الجالسة منها فباستخدام أدوات القشط مع الجزء المستندة عليه أو كسر أجزاء من الصخور والتي يمكن نقلها إلى المختبر للتعرف على محتوياتها من الأوالي. أما الجالسة منها فيجب كسر الصخور ما أمكن منها لإخراج الأوالي الموجودة بين الأخاديد.

وتستخدم لتحقيق هذه الأغراض العديد من الأدوات البسيطة المبينة في الشكل (14 - 6) مثل الملاقط المختلفة الأحجام، أدوات القشط، الفؤوس الصغيرة، أنواع من الفرش المختلفة المتانة وعدسات مكبرة للتعرف على بعض الأوالي في موقع تواجدها وخاصة الكبيرة الحجم من المخرمات وغيرها من ذات الأغلفة والقشور التي تلفظها المياه خاصة في حالة حركة الموج القوية.

الشكل (14–6) بعض نماذج من الأدوات المستعملة في جمع الأوالي في منطقة المد والجزر.

(ب) أوالي منطقة تحت نطاق المد والجزر Subtidal region:

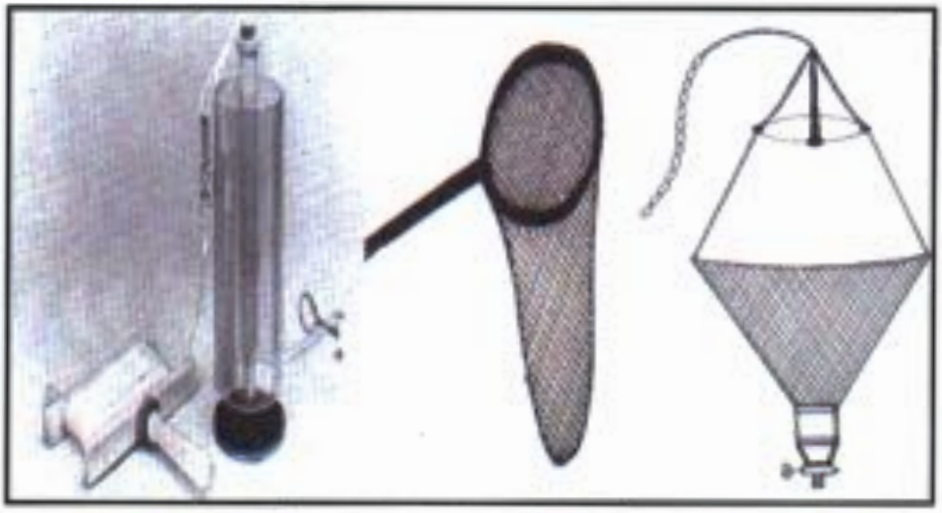
وهي المنطقة الواقعة تحت منطقة الساحل وتمثل المياه الضحلة ذات العمق المحدود والتي يكون فيها عمود الضوء جيد ويمتاز بوجود الطحالب والنباتات المائية وتمتاز بكثرة أحيائها كما في مناطق الجرف القاري ومناطق تشكل الشعاب المرجانية والجيوب البحرية والخلجان وغيرها، ويمكن دراسة كائنات هذه المنطقة باستخدام الطرق التالية:

1- عن طريق الغوص وخاصة المناطق التي يقل فيها العمق عن 40 مترا باستخدام جهاز التنفس تحت الماء (SCUPA) Self contained Underwater breath apparatus.

2- استخدام القوارب والسفن البحثية الصغيرة المزودة بأجهزة ولوازم جمع الأحياء المائية من السطح وتستخدم لذلك عدة وسائل وطرق منها:

الأوالي من الهوائم Planktonic Protista:

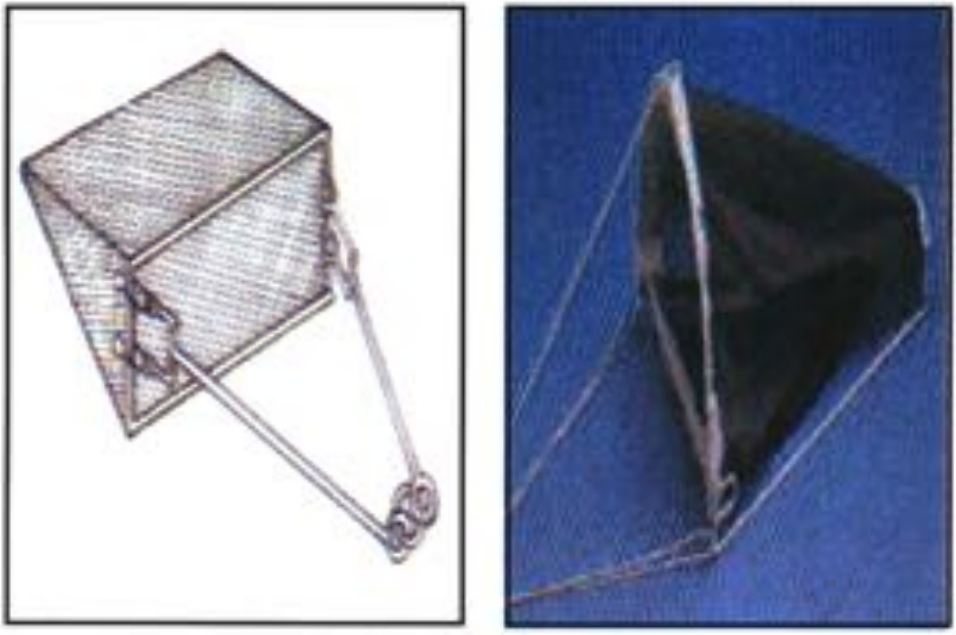
وتستخدم في هذه الطريقة شباك جمع الهوائم النباتية والحيوانية Phyto-Zooplanktonic nets المفتوحة أو ذات الأطواق المغلقة، والتي يتم استخدامها بعكس حركة تيار الماء وفيها يتم جمع الأوالي السابحة من السوطيات النباتية والحيوانية والهدبيات حرة المعيشة والشمسيات والشعاعيات من الهوائم والسابحات المختلفة، وفي حالة الرغبة بجمع العينات بأعماق مختلفة فيمكن استخدام جهاز Van Dor الذي يمكن التحكم بفتحة وغلقه على العمق المطلوب وكما مبين في الشكل (14-7).



شكل (14-7) نماذج من شباك الهوائم وجهاز فان دور.

الأوالي فوق القاعية Epiphytic Protista :

باستخدام الكراءة أو النردلة أو الشباك الكاشطة، وهي طريقة تستخدم لدراسة الأوالي القوقية قاعيه الموجودة في مناطق الجرف القاري والمياه قليلة العمق من المخرمات والشعاعيات والخيبشبكيات وبعض الهدبيات واللحميات الجالسة أفضلها الكراءة المستطيلة كما مستخدم في دراسة اللافقاريات الكبيرة ولكن تستبدل الفتحات بحيث تكون بالميكرونات أو الملليمترات حسب الأوالي المستهدفة بالدراسة. أما في البحار العميقة فتستخدم شباك السحب عبر قاع البحر وهي مشابهة لحالة النزول trawl الخشبية أو نزولة الأعمدة beam trawl أما للأغراض العملية فيستخدم نزولة اغاسز Agossiz trawl. والشكل (14-8) يبين بعض هذه الأدوات.



شكل (14-8) نماذج من شباك جمع الأوالي فوق القاعية.

(ج) جمع واعداد أوالي المنطقة البحرية المفتوحة:

تتميز المنطقة البحرية المفتوحة باحتوائها بالدرجة الأساس على العوالق البحرية Marine Plankton من الأوالي المختلفة وخاصة من السوطيات النباتية والدايتومات والشعاعيات، ولغرض دراستها توجد عدة طرق ووسائل ولكنها جميعا تستخدم الشباك الخاصة بجمع العوالق البحرية Plankton net وبعض التقنيات الأخرى للدراسة على أعماق مختلفة ضمن المنطقة المفتوحة ومن هذه الطرق ما يلي:

1- شباك بسيطة مثل شبكة المقطورة Tow-net.

2- الشباك التي تحتوي على طوق معدني وغطاء يمكن التحكم به ،وتتحد عدة شباك مثل شبكة هنسن Henson net.

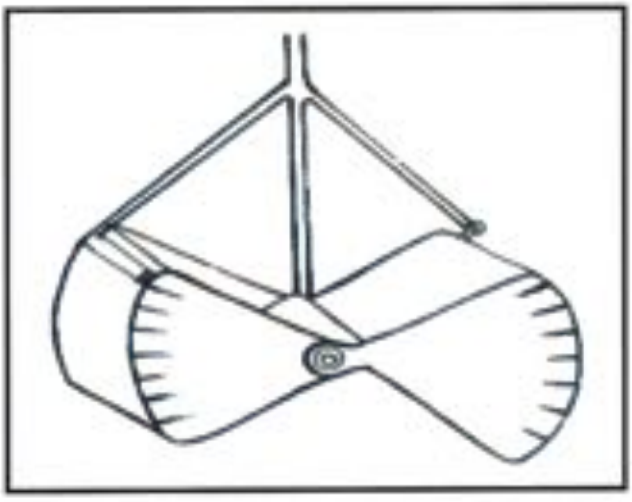
3- شباك تحتوي على جهاز قياس كمية الماء الداخلة للشبكة Flometer مثل شبكة Lark Pumpas.

4- شباك تحتوي على الأثقال وجهاز قياس العمق مثل شباك هاردي Hardy وشبكة إسحاق وكيد Isaak & Kidd والتي تدرس مياه الوسط.

ويجب الانتباه هنا إلى بعض هذه الشباك تستخدم لدراسة وجمع مختلف الأحياء من اللافقاريات والأحياء البحرية الأخرى، ولكن عند الرغبة في دراسة وجمع الأوالي يجب أن تكون الشباك والأجهزة المستخدمة ذات فتحات مناسبة لحجم مجموعة الأوالي المستهدفة بالدراسة لأن أحجام هذه الأوالي صغيرة جدا.

(د) جمع وإعداد أوالي المنطقة القاعية: Benthic Protista

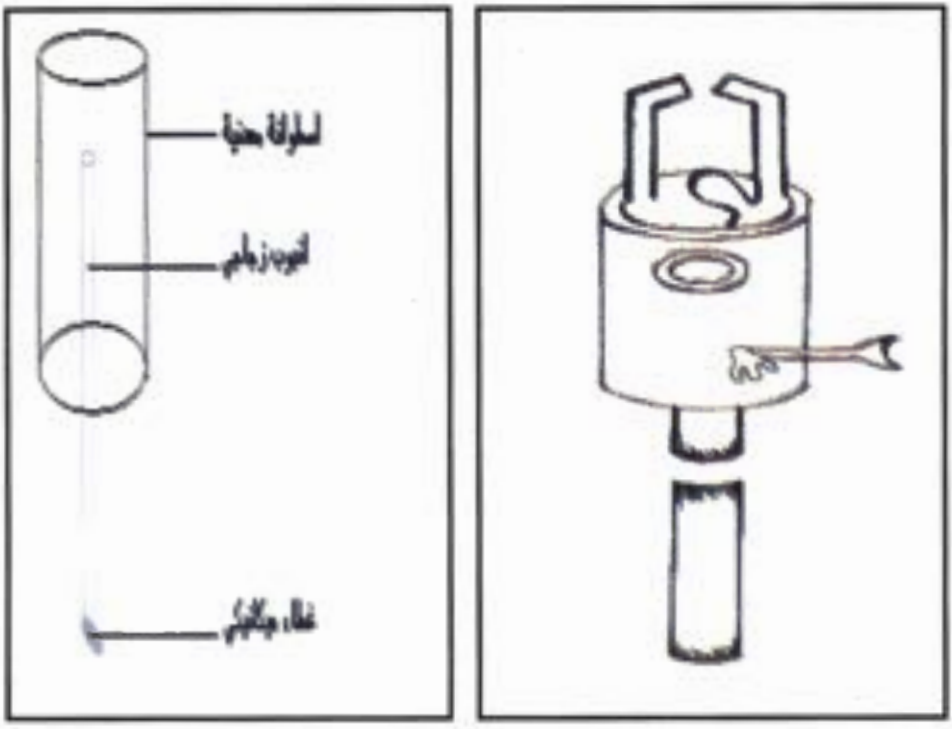
تتبع طريقة استخدام الكباش أو الكروفة Grabs وهي طريقة تستخدم لغرض الدراسة الكمية لتوزيع الأوالي واللافقاريات المختلفة في الأعماق القاعية المختلفة لان هذه الأجهزة تستطيع النزول إلى أعماق أكثر من الكرامات والشباك التي مر ذكرها وهذه الكباشات أو الكرامات أشكال وأحجام مختلفة ولكن طريقة استخدامها واحدة ومن هذه الطرق كباش أو كرامة بترسين Petersen grab كما في الشكل التالي (14 - 9).



شكل (14-9) نموذج من كباش أو كرامة بترسن Petersen grab.

وعند الرغبة للكشف عن هذه الأحياء ودراستها في عمق أكبر داخل القاع مثلا بين 50 - 200 سم وعدم إحداث أي اضطراب في الموقع القاعي، نستخدم المباب البسيط أو المباب ذات اللب مثل مباب جونس كار Jones care أو مباب جونتر، وهذه المباسب يتكون كل منها من أنبوب

زجاجي محاط باسطوانة معدنية يمر عبرها الماء بحرية أثناء نزوله في الجسم المائي وعند اختراقه لجزيئات الوحل حال اصطدامه بالقاع، وعند شده إلى الأعلى تغلق الفتحة ميكانيكيا بواسطة مصراع بسيط تمنع فقدان العينة من داخلة والشكل (14 - 10). بعد ذلك تفرغ المحتويات وتغسل بماء المصدر نفسه وتهيأ للدراسة المطلوبة.



الشكل (14 - 10) نماذج من القباب ذات اللب.

- **طريقة الكرادة والشباك الكاشطة:**

تستخدم هذه الأدوات لدراسة الأوالي الفوق قاعيه الموجودة في مناطق الجرف القاري والمياه قليلة العمق، ومن بين الأوالي التي يمكن جمعها بهذه الطريقة هي مجاميع من المخرمات والشعاعيات والخيشبكيات وبعض الهدبيات التي تقطن المنطقة القاعية وبعض اللحميات والسوطيات الجالسة، وأفضلها طريقة الكرادة المستطيلة كما هو مستخدم في دراسة اللافقاريات الكبيرة ولكن تستبدل

الفتحات بحيث تكون بالميكرونات أو المليمترات حسب الأوالي المستهدفة بالدراسة .

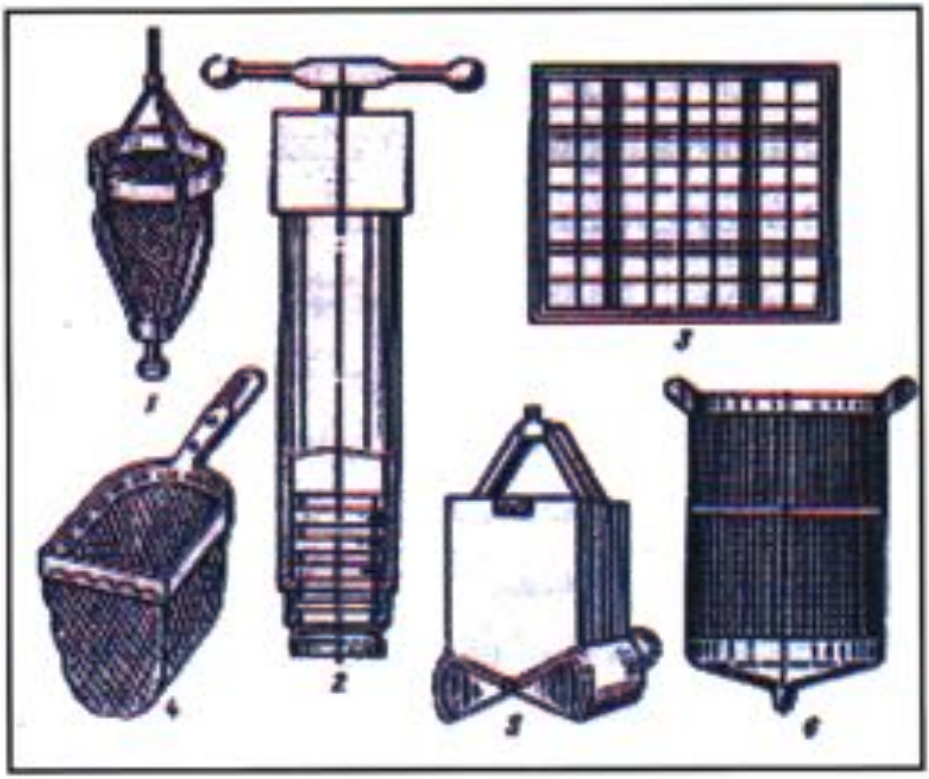
أما في حالة البحار العميقة فتستخدم شباك السحب عبر قاع البحر والمشابهة لحالة النزول trawl الخشبية أو نزولة الأعمدة beam trawl أما للأغراض العملية فيستخدم نزولة اغاسز Agossiz trawl (أمزي 2002).

ثانياً دراسة طرق وجمع أوالي بيئة المياه العذبة:

تستخدم لجمع أوالي المياه العذبة نفس الطرق المتبعة والتي تم توضيحها في دراسة البيئة البحرية إلا إن الأجهزة المستخدمة والمعدات تكون اصغر حجما واخف وزنا بما يتناسب مع حجم البيئة العذبة كالأنهار والجداول والقنوات والسواقي الجارية أو البحيرات وخزانات الماء أو الأهوار أو العيون والواحات التي تمثل المياه الساكنة، حيث تستخدم لدراسة الأوالي في مثل هذه البيئات أدوات وأجهزة مختلفة حسب العمق المائي والأوالي المستهدف بالدراسة ومن هذه المعدات الشباك اليدوية لجمع العوالق والمكارف والملاليب والشباك الكاشطة والجرادل والمشابك والحقائب البيئية الحقلية وغيرها وكما في الشكل (14-11).

أما في حالة المياه الجارية كالأنهار والجداول فيستخدم لدراسة القاع جهاز خاص يسمى (جهاز معيان قاع النهر Stream bottom Sampler) وهو عبارة عن صندوق معدني مفتوح الجوانب ويتصل بأحد جوانبه شبكة مخروطية، ويوضع هذا الجهاز على القاع مباشرة ويتم تحريك القاع بواسطة الأيادي أو الأرجل أو باستخدام آلة الرفاس صغيرة الحجم، وبذلك ترتفع مع التيار هذه الرسابة ومحتوياتها باتجاه الجهاز بفعل التيار، وتجمع في الشبكة وتجرى عليها العمليات السابقة الذكر.

وتستخدم الأدوات والأجهزة المبينة في الشكل أدناه لجمع العوالق من الأوالي من السوطيات النباتية والحيوانية وأفراد تحت طائفة الشمسيات والاميبيات الحرة والهدبيات المختلفة وغيرها من أوالي بيئة المياه العذبة.



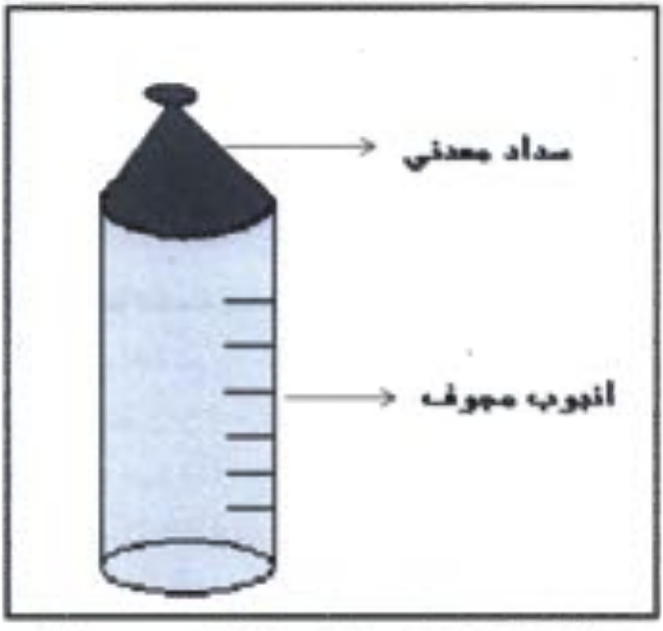
1- شبكة البلانكتون 2- الكيس الساحب للعينة 3- الشريحة الحسابية 4- مقشط 5- المكرفة
6- جهاز لأخذ عينات القاع النهري.

شكل (14-11) نماذج من أجهزة جمع وتقدير الأوالي في الوسط المائي والبيئة القاعية. (الناصح، 1993).

ثالثاً: طرق جمع الأوليات القاعية المنصفة Meiobenthic Protista:

تمثل فئة من الكائنات الحية تقع من حيث الحجم بين Macro-Fauna و Micro-Fauna، وهي عموما حيوانات صغيرة تتمكن من التحرك خلال الفراغ الخاصل بين حبيبات المواد المترسبة في القاع دون أن تحدث تحركاً اضطرابياً في جسيمات الرسابة، وتشكل المخرمات واللحميات ذات الأغلفة النسبة الكبيرة منها (Moodley et al, 1997، ألفوني 2002). كذلك يمكن تعريفها بشكل آخر بأنها تلك الكائنات القاعية الداخلية التي يمكن إن تمر خلال رشح غربال ثربة دقيق قطر ثقوبه واحد ملم وتشترك في تكوين مجتمع لافقاريات القاع المختلفة (ألفوني 2002). وهناك عدة طرق

لدراستها كما يقترح الباحثون Hulings & Gray وذلك حسب الحالة التي يكون فيها الوضع البيئي للمنطقة البحرية المستهدفة بالدراسة وطبيعة مكونات الرسابة القاعية والشكل المتوقع لارتباط هذه الأحياء معها، ومن أشهر الطرق المستخدمة لدراسة هذه الأوالي هي طريقة استخدام اللباب البسيط Simple Corer، ويستخدم هذا الجهاز لدراسة الأوليات الشديدة الالتحاد بالرسابة وحبيبات الرمل وكذلك دراسة هذه الكائنات من ناحية كمية وذلك بأخذ عينة من الرسابة بإنزال اللباب المطاطي أو الزجاجي أو المعدني بقطر لا يقل عن 30- 40 ملم وطول 400 ملم، يدفع الأنبوب إلى داخل القاع باستخدام اليد أو المطرقة المطاطية تدريجيا على النهاية الحرة له المغطاة بغطاء مطاطي كذلك، وبعد ذلك يرفع اللباب مع محتوياته من الرسابة أو مكونات القاع ويفتح الغطاء وتقوم بالطرق الهادئ لكي تندفع محتوياته ونضعها في غربيل دقيق الفتحات أو شبكة هائمات صغيرة وتغسل العينات بماء من نفس الموقع البيئي، أو نضع الرسابة في صحون بتري أو جرادل صغيرة ونضيف كمية من ماء ذات الموقع للمحافظة على حيوية الأوالي لحين الدراسة. وطريقة اللباب مفيدة لدراسة التوزيع العمودي والأفقي ومعرفة كمية هذه الأحياء. والشكل (14-12) يبين شكل ومكونات اللباب.



شكل (14-12) اللباب البسيط لجمع الأوالي.

ويمكن تحليل العينات المتحصل عليها باستخدام طريقة اللباب أنفة الذكر بطرق مختلفة حسب طبيعة الجزيئات القاعية وطريقة ارتباط الأوالي معها ونوعية الأوالي المستهدفة بالدراسة، ومن أهم هذه الطرق مايلي:

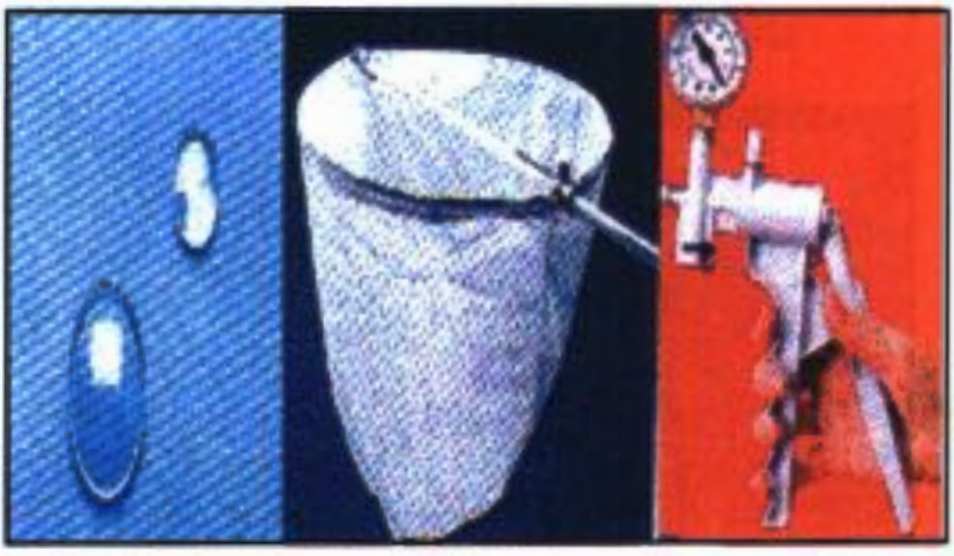
(1) طريقة الترشيح Filtration:

نأخذ عينة الرسابة المحتوية على العينات وتصفى لعدة مرات بماء البحر في سطل أو جردل ونخلطها جيدا في الماء ونصفيها باستخدام شباك جمع العوالق بقطر (50-62) ميكرون وتعاد العملية عدة مرات خلال نفس الشبكة أو شبكات اقل منها حجما، بعد ذلك تغسل جوانب الشبكة ومحتوياتها بماء البحر المصفى لكي تتجمع كل محتوياتها من الأوالي في قاع الشبكة المخروطي، بعد ذلك يقلب بلطف محتوى الشبكة في صحن أو وعاء آخر مناسب للدراسة وتدرس العينات وتصنف حسب الهدف المطلوب من الدراسة. وفي حالة الرغبة في حفظ العينات لفترة أطول توضع العينات في محلول من فورمالين 10٪ أو الكحول 70٪، كذلك يمكن إضافة قطرات من مواد مثبتة لزيادة فعالية الطريقة كإضافة كلوريد المغنسيوم مع تحريك العينة بهدوء لمدة 10-20 دقيقة لكي تؤدي المادة المضافة مفعولها ونحصل على كائنات حية بهيئة جيدة غير منكمشة الخلية.

شكل (14-13) نماذج من الأدوات المستخدمة بطريقة الترشيح.

(2) طريقة الفقاعات الهوائية أو طريقة هيجنز Higgins:

تكون هذه الطريقة مناسبة لدراسة الأوالي المرتبطة مع الرسوبيات الناعمة ذات الحبيبات الدقيقة كالوحل والغرين والطين وذلك بأن تأخذ الرسابة من القاع بواسطة الكارف أو اللباب أو باستخدام أية وسيلة مناسبة حسب العمق المائي، توضع العينة مباشرة مع كمية من ماء البحر (ماء مصفى) على أن يعامل هذا الماء سلفا مع مادة مخدرة كالفورمالين أو الكحول بتركيز 70٪ أو فينوكستول البروبلين وذلك حسب طبيعة العينة المطلوبة للدراسة. تقوم بعد ذلك بتحريك وتقليب النماذج عدة مرات مع الماء ليمتزج جيدا ولمدة (10-20) دقيقة وذلك عن طريق إمرار تيار هوائي بواسطة منفاخ يدوي إلى تتكون فقاعات على السطح الخارجي للماء، هذه الفقاعات هي التي تحتوي على الأوالي والأحياء الصغيرة الأخرى مع كمية من الغشاء العضوي، وباستخدام ورق ترشيح نقوم بسحب محتويات هذه الفقاعات، يكرر العمل لعدة مرات ويتم غسل أوراق الترشيح بشكل جيد في إناء نظيف داخل شبكة ذات فتحات صغيرة (52-60) ميكرون وبعدها تفرغ محتويات الشبكة في طبق بتري وتدرس.



شكل (14-14) بعض الأدوات المستخدمة في طريقة الفقاعات الهوائية.

(3) طريقة ثلج ماء البحر أو طريقة اوليج Uhlig:

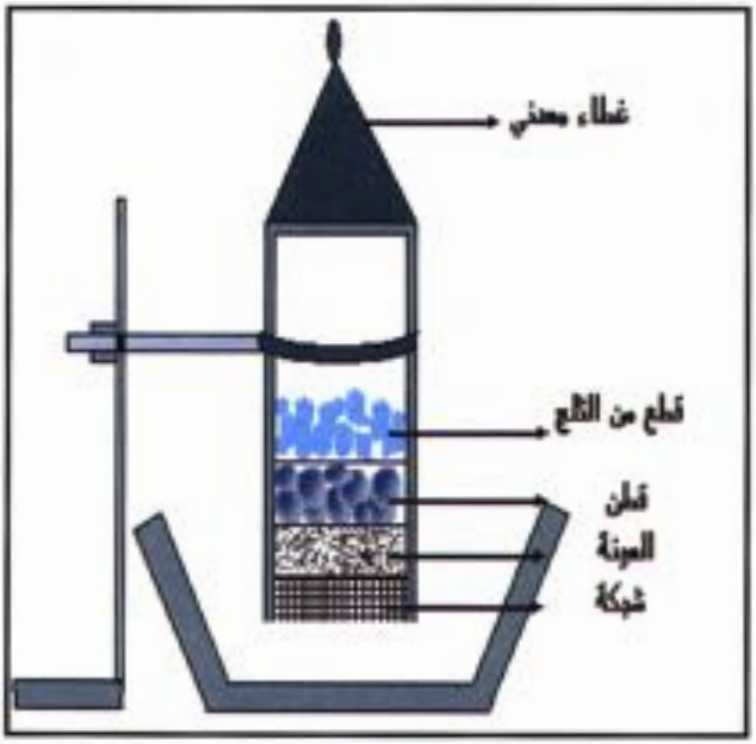
وهي طريقة تستخدم لفصل الحيوانات القاعية الملتصقة من الرسابات السامية كالرمل وخاصة المخرمات والهيدروبيكيات وكما يلي:

1- توضع الرسابة في قاع أنبوب مثبته عليه شبكة من النايلون دقيقة قطرها 50-140 ميكرون.

2- وتوضع فوق العينة الموضوعة على الشبكة طبقة بسيطة من القطن .

3- ثم نملأ بقية الأنبوب بالثلج يتسلسل إلى الرسابة عبر القطن ويعمل على طرح الكائنات إلى إناء جمع العينات .

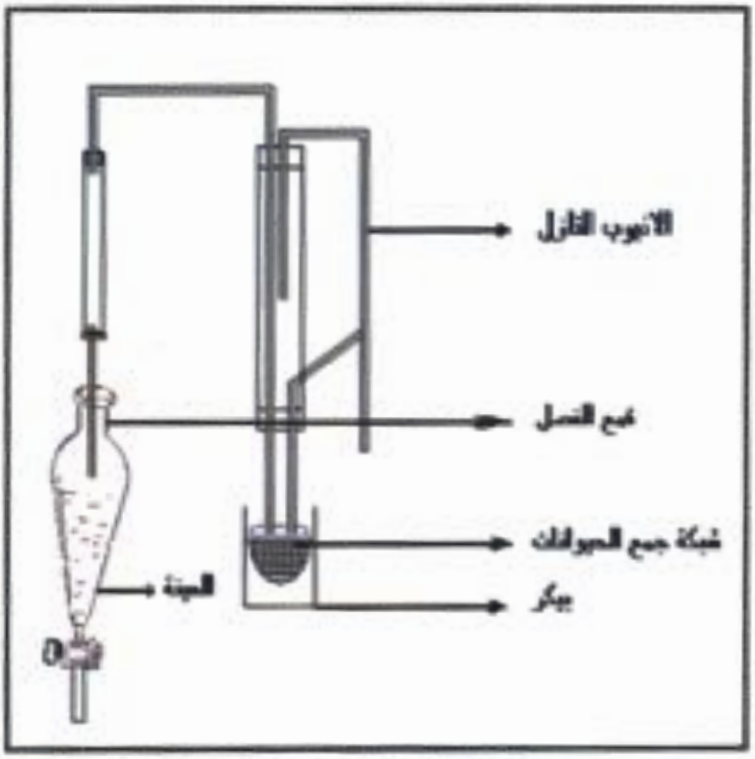
وفي حالة عدم توفر الثلج يمكن أن يستخدم ماء بارد جدا مع استخدام ورق ترشيح أو ألياف القطن حتى ينزل الماء ببطء ويسيطر على برودة الماء بشكل متواصل. والشكل (14-15) يبين مكونات الطريقة المقترحة.



شكل (14-15) طريقة ثلج ماء البحر أو طريقة أوليج.

(4) طريقة Boisseaw أو طريقة الترويق

وتستخدم لدراسة وفصل الأوليات الملتصقة حيث توضع المادة الحاوية على الأوالي في جهاز فصل مكون من قمع فصل (الرسابة) واسطوانة زجاجية تحتوي على أنبوب نازل وآخر صاعد وتنتهي هذه الأنابيب في إناء جمع يوضع بداخلة إناء آخر مشبك وكما مبين في الشكل (14-16) وتضع في قمع الفصل مادة مخدرة لغرض طرد الأوالي الموجودة في العينة أي كمادة منفرة، تترك العينة المدروسة إلى إن تؤدي المادة المخدرة مفعولها ثم تُدخل تيار من ماء بحر صافي إلى القمع عن طريق الصنبور بشكل متوازن من تدفق الماء الصاعد والنازل بين الأنبوبين، تتحرك الأوالي مع تيار الماء الصاعد إلى الطرف النازل من الجهاز وبذلك يتم جمعها من فترة لأخرى في إناء الجمع المزود بشبكة ذات أقطار لا تتجاوز 62 ميكرون. ولضمان عدم رجوع والتصاق الحيوانات في الطرف النازل والصاعد مرة أخرى تضيف مادة مخدرة مع ماء البحر الصافي.



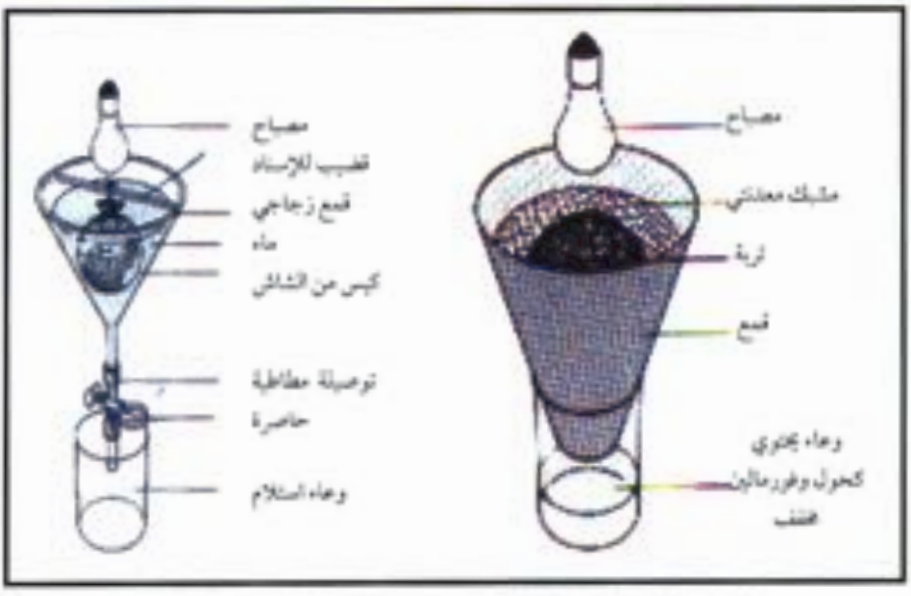
شكل (14-16) طريقة Boisseaw أو طريقة الترويق

طرق جمع واعداد أوالي البيئة الأرضية Land ecology.

يتباين توزيع ومعيشة الأوالي في البيئة الأرضية كما هو الحال في البيئات المتخصصة التي تم التعرض إليها، وذلك لأن البيئة الأرضية تنتشر فيها أنواع مختلفة من السوطيات النباتية والدايتومات والسوطيات الحيوانية والهدبيات واللحميات والقطريات الحيوانية وغيرها ولكل مجموعة منها أسلوب معيشة وسلوك بيئي مختلف، لذلك هنالك عدة طرق مقترحة لدراسة هذه الكائنات منها ما يلي:

أولاً طريقة استخدام أقماع التجفيف Desiccation Funnels

وتستخدم هذه الطريقة لفصل الأوالي المتحركة من اللحميات والهدبيات والسوطيات التي تقطن جزيئات التربة ويستخدم في هذه الطريقة أنواع تجفيف منها قمع برليزي Berlese funnel والذي يستخدم الماء الساخن وقمع تولجرن Tullgren funnel والذي يستخدم الضوء (مصباح كهربائي) وكما مبين في الشكل (14-17) وكلا الطريقتين تستند على مبدأ الطرد والعزل الحراري والضوئي حيث أن المعروف عن الأحياء التي تقطن جزيئات التربة ومنها الأوالي تكون كاره للضوء المباشر وكذلك الجفاف والحرارة العالية، لذلك تأخذ عينات من التربة المتوقع وجود هذه الأوالي بين مكوناتها وتوضع في إناء مشبك أو قماش ذات فتحات صغيرة جدا وتوضع العينات في الأقماع المذكورة وتعرض مباشرة تحت مصباح ضوئي أو توضع على فوهة إناء يعطي بخار ساخن، وفي كلا الحالتين عندما تسخن مكونات التربة تبدأ الأوالي بالحركة والهجرة إلى أسفل إناء الجمع أو إلى أسفل قطعة القماش من الجهة المعاكسة لمصدر الإضاءة في حالة تعريضها لضوء مصباح كهربائي، أو خلال الأعلى في حالة تعريضها إلى حرارة الماء الساخن كما في حالة قمع برليزي، وفي كلا الأمرين يمكن دفع هذه الأوالي للخروج من جزئيات التربة وفحصها والتعرف عليها بعد جمعها في الماء العادي أو الكحول المخفف أو الفورمالين ومن ثم فحصها والتعرف على الأنواع والأجناس الموجودة ضمن مكونات التربة.



شكل (14-17) طريقة استخدام أقماع التجفيف في عزل أوالي التربة.

ثانيا. طريقة الطفو Flotation method

وهي طريقة تستخدم لدراسة الكائنات اللافقارية وكذلك الأوالي التي تعيش بين جزيئات التربة الطينية أو ما يسمى بالتربة الثقيلة والوحل حيث تكون جزيئاتها دقيقة ومتماسكة بدرجة تكون عملية التوصيل الضوئي والحراري التي ذكرناها في الطريقة الأولى بطيئة أو غير مجدية أحيانا، لذلك فكر الباحثون بطرق أخرى يمكن من خلالها تفتيت هذه الجزيئات وعزل الأوالي منها ومن هذه الطرق طريقة الطفو وتفتيت مكونات التربة وفق الخطوات التالية:

1- نقوم باختيار مواقع مختلفة من التربة الجيدة المادة العضوية، على أن تأخذ عينات التربة على عمق مناسب منها حسب الرغبة في الدراسة ونضعها في إناء يحتوي على محلول كبريتات المغنسيوم ($MgSO_4$) ذات الكثافة النوعية 1:1، ونترك العينة لفترة وجيزة لكي تتشرب بالمحلول وتصبح اقل تماسك.

2- نعمل على إمرار تيار من الهواء من أسفل الإناء الحاوي على المحلول بواسطة مضخة هواء أو بالنفخ العادي في حالة عدم توفرها، حيث يعمل تيار الهواء على زيادة تفكك جزيئات التربة وحصول سيل من الفقاعات الهوائية التي تحمل معها إلى أعلى الإناء جزيئات التربة والأوالي المرتبطة بها، وبفعل اختلاف الكثافة تسقط جزيئات التربة وتبقى الأحياء معلقة في الطبقة العليا من المحلول.

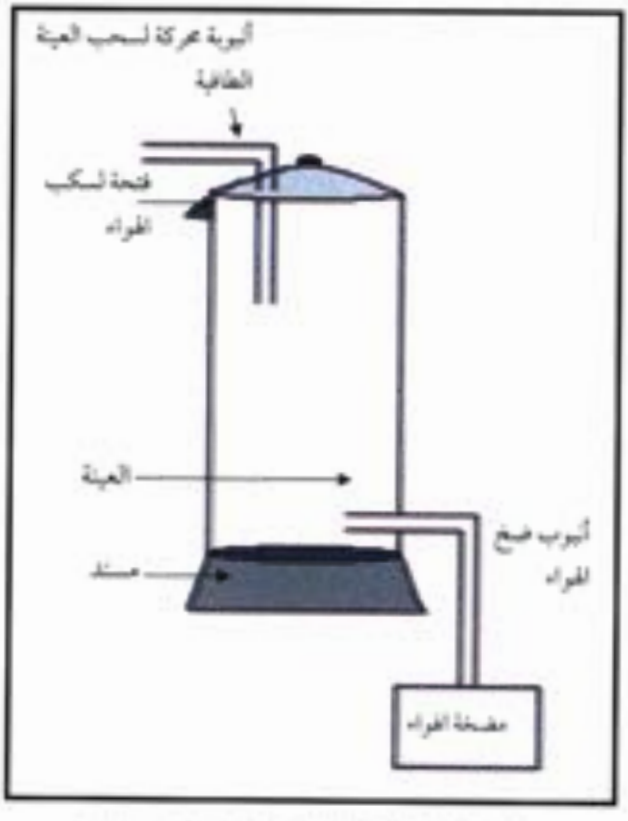
3- يترك الوسط ليستقر تدريجيا وتكتمل عملية نزول المواد العالقة والرواسب إلى قاع إناء التجربة وبذلك تتكون طبقة من الرواسب في الأسفل وطبقة رائقة في الأعلى.

4- تقوم بسكب ماء الطبقة العليا بهدوء داخل شبكة يدوية صغيرة من شباك جمع العوالق كما مرّ وصفها في الطرق السابقة. أو يزود الجهاز بأنبوب متحرك من الأعلى يتم إدخاله لسحب الماء من أعلى الجهاز.

5- تجمع عينات الأوالي المنفصلة في قنينة أو أنبوبة مخبريه توضع تحت نهاية شبكة العوالق لغرض حفظ العينة والتعرف على طبيعة الأوالي.

6- تكرر غسل العينة بهدوء عدة مرات لغرض فصل الكائنات عن الحبيبات القاعية والمواد العضوية.

7- يتم فحص الأوالي مباشرة تحت المجهر أو تضاف للمحلول مواد حافظة كالفورمالين أو الكحول لغرض حفظها لحين الدراسة.



شكل (14-18) طريقة الحفنو لعزل أوالي التربة.

طرق جمع واعداد الأوالي المتطفلة.

(أ) أوليات التطفل الخارجي:

توجد عدة طرق لجمع الأوالي الطفيلية الخارجية من جسم العائل وتعتمد على عدة عوامل قسم منها تتعلق بالطفيلي نفسه فمثلا بعض الطفيليات تغادر الجسم حال شعورها ببرودة الجسم فيفضل جمع الأولي مباشرة بعد موته، وكثير من العوامل يحددها العائل وطبيعة معيشته فمثلا الثدييات تختلف عن الطيور وبدورها تختلف عن الأسماك أو البرمائيات ، وفي جميع الحالات يجب أن يُدون على العينة بعض البيانات المهمة التي تخص العائل مثل اسمه وأوصافه وما يخص العينة مثل مكان جمع العينة والموقع والتاريخ والزمن.

يصف ليبوفسكي(1951) طريقة لجمع الطفيليات الخارجية على الطيور والثدييات بواسطة غسل أجسامها في محلول مطهر، أما بالنسبة للحيوانات كبيرة الحجم فيغسل الجلد فقط بعد ذبحها ويترك في هذا المحلول لمدة نصف ساعة وبعدها يسكب محلول الغسيل في أسطوانة ويترك 15 دقيقة حتى يركد وتترسب المواد العالقة به ثم يسكب المحلول الرائق بحذر للحصول على الرواسب السفلية والتي تصب على الشريحة للفحص تحت المجهر.

أما لينكولن وشيلز (1979) فقد ذكروا أن كوك (1954) يقترح بأنه يمكن جمع الطفيليات الخارجية للثدييات عن طريق هضم الجلد العائل بعد ذبحه ، بواسطة إنزيم التريبسين والذي يقوم على إحلال البروتين وتكون الطريقة بتقطيع الجلد إلى قطع مربعة ذات أبعاد من 30-50 ملم ثم توضع في دورق يحتوي على محلول التريبسين 3٪ وجعل الـ(pH = 8.3) بواسطة محلول فوسفات ثنائي الصوديوم ويوضع المحلول في حاضنة بدرجة حرارة 37 ولمدة 48 ساعة. بعد عملية الهضم هذه يضاف محلول بوتاس كاوي 20٪ إلى محتويات الدورق ويغلى المزيج حتى يذوب جميع الشعر والجلد ثم يغربل المزيج للحصول على الطفيليات في الغربال فتنقل إلى طبق زجاجي وتغسل بالكحول.

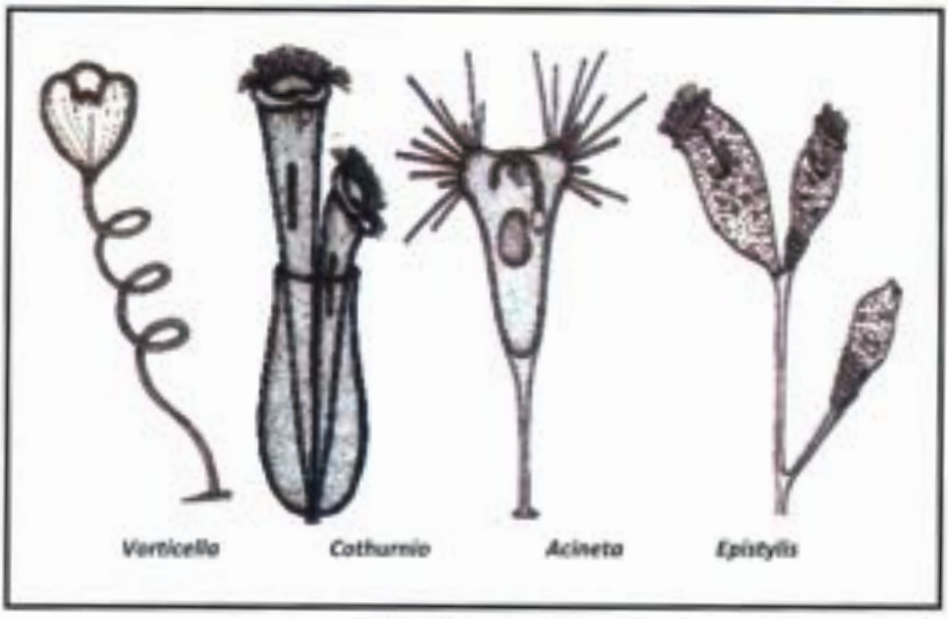
أما بالنسبة للحيوانات المائية مثل البرمائيات والأسماك واللافقاريات البحرية الرئيسية فتجمع الأوالي الخارجية من على جلودها بالشرط حيث تكشط الذيب والأكياس مع الجلد والمواد المخاطية وتوضع في طبق بتري به ماء نظيف، كذلك تعتبر الخياشيم والفتحات الأنفية وتجاويف الفم مواقع مهمة أخرى كثيرا ما تصاب بالطفيليات لذلك تجمع من هذه الأماكن بكشط المواد المخاطية أما

بالنسبة للخياشيم فتزال من رأس السمكة وتوضع في طبق بيتي ماء نقي ثم تفحص. وينبغي إزالة المواد المخاطية قبل تثبيت الأوالي وذلك بوضع الطفيليات في دورق زجاجي ذات سداد محكم به ماء بحر أو ماء عذب حسب الحالة ثم يرج بشدة ويسكب الماء بحذر وتعاد عملية الغسل هذه عدة مرات وتصبح جاهزة للفحص تحت المجهر.

ومن الأوالي السوطية المتطفلة خارجيا أجناس *Leishmania* مثل *L.donovani, L. brazilensis,* والتي تسبب الأمراض الجلدية للإنسان وبعض من الثدييات والتي ينقلها الذباب عن طريق اللسع حيث يحمل الذباب الطور السوطي وهو الطور المعدي بهذه المتطفلات، والعائل الوسطي لكثير من أجناس هذا الأولي السوطي هي القوارض والكلاب وبعض الثدييات، وتكون عوائل مخزنة له والجنس *L. tropic,* غير محددة في الجلد وإنما ينتقل إلى كل مكان من الأحشاء الداخلية.

ومن الأوالي الهدبية التي تصيب الأسماك مثل الأجناس التالية : *Glossatella, Epistylis, Amphileptus, Scyphidia, Trichophrya* وتلتصق هذه الأوالي بجلد الأسماك وتطفل عليها مسببة ارتشاحات دموية على الجلد وقرح صغيرة وبعدها يفقد الجلد بريقه ثم تبدأ القشور بالتساقط، وتتكاثر هذه الأوالي عن طريق الانقسام الثنائي البسيط وفي بعض الحالات يحدث التكاثر جنسي وغالبا ما تصيب الأعمار الصغيرة من الأسماك وخاصة عائلة البوري والبلطي. ويمكن تشخيص المرض عن طريق عمل مسحات من الجلد وبعد صبغها بمحلول الجمساء أما الهدبيات التي تصيب الجمبري فهي أفراد جنس *Epistylis* وهو يصيب الأطوار ما قبل البلوغ والبالغة ويوجد على الجلد والخياشيم وعنق العين والذيل ووجوده بصورة كثيرة يؤدي كذلك إلى سوء التنفس، ومن الأوالي الخارجية الأخرى التي تصيب الجمبري وتتواجد على الجلد والخياشيم وعلى أعضاء الحركة وخاصة المناطق السفلى هي هدبيات من أجناس *Zoothamnium, Vorticella, Acinta, Tokophrya, Corthmia, Lagenophrys, Vaginicola*. والشكل (14 - 19) يبين بعض هذه الأجناس.

وتوجد كذلك أنواع من جنس الهدبي *Trichodina* تصيب بعض الأسماك البحرية حيث يعمل على التهام خلايا الجلد والخياشيم أو تكسيرها وخاصة عند تغير العوامل البيئية مثل الأس الهيدروجيني أو تغير درجة حرارة الجسم المفاجئة أو النقص الحاد في الأوكسجين وغيرها من العوامل.



شكل (14–19) بعض الأوالي الهدبية المتطفلة خارجيا على الجمبري.

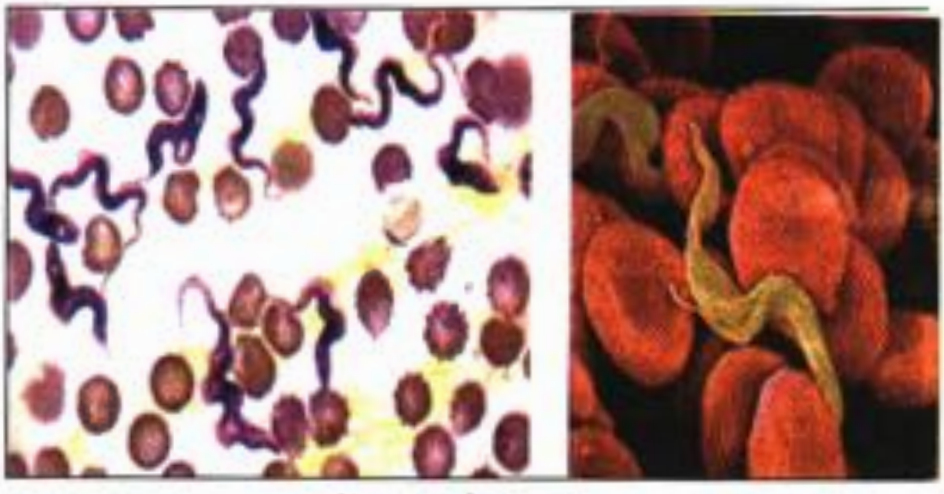
أما الأوالي السوطية الحيوانية التي تصيب الأسماك وتسبب العديد من الأمراض جنس *Ichthiobodo necatrix* الذي يصيب اسماك المياه العذبة والمالحة وخاصة العائلة البوري والبلطي والمبروك حيث يدخل بين خلايا الجلد ويظهر منها بشكل زوائد مجهريه تنتشر على الجلد وهو أيضا يصيب الخياشيم وخاصة في الأعمار الصغيرة مما يسبب خسائر كبيرة، واهم الأعراض هو وجود كمية كبيرة من المواد المخاطية على الجلد في منطقة الظهر والرأس وأيضا وجود قروح سطحية أو عميقة لذلك يسمى المرض عدوى الجلد المخاطي وعند الكشف عن الطفيل يعمل مسحة من الجلد وقتيا أو بعد صبغها بمحلول الجمسا بتركيز 1:10 توضع على شريحة وتفحص تحت المجهر.

ومن مجموعة الفطريات الحيوانية ذات التطفل الخارجي فهي أجناس *Vampyrella* و*Pseudospora* التي تتطفل على الطحالب الخيطية والأعشاب والحشائش المائية، والأجناس من مجموعة *Saprolegnial* تتطفل على الطحالب المعروفة باسم Ectocarpus كما تتطفل بعضها على الأسماك كما في الأجناس *Saproegniosis* و *Ichthiophinus* حيث تصيب الأسماك بأمراض مختلفة تدعى بأمراض الأسماك الفطرية Mycotic fish diseases (Perkins, 1974)، براية وآخرون 1996).

(2) أوليات التطفل الداخلي:

تطفل الأوالي على الأعضاء الداخلية للكائنات الحية وتتباين المواقع التي تشغلها هذه الأوالي، فمثلا قسم منها في القناة الهضمية أو جدرانها أو التجاويف والفراغات والأغشية المبطنة لها وقسم منها تتطفل على الكبد والمرارة والقنوات المرارية أو تكون طفيليات دموية وغيرها من أنماط التطفل الإجباري. وطريقة الحصول على الأوالي ذات التطفل الداخلي يتطلب تشريح العائل والفحص الكامل للعضو المصاب، وهذه العملية تستغرق وقتا طويلا لذلك يقتصر الفحص على التجاويف الداخلية. فمثلا الأوالي التي تصيب التجاويف المعوية عند البحث عنها يجب فتح الجسم وشق بطن الحيوان ثم فتح المعي بالمقص ثم إزالة المحتويات بما فيها من الطفيليات وغسل بطانة الأمعاء بمحلول ملحي للحفاظ على بقية الأوالي اللاصقة بجدار الأمعاء، وبعض الأوالي لا تستطيع الحصول عليها إلا بكشط البطانة في محلول ملحي.

وتوجد أجناس كثيرة من الأوالي ذات تطفل داخلي من شعبة اللحميات السوطية مثلا توجد أجناس من اللحميات مثل جنس *Entamoeba histolytica* حيث يعتبر الطور المتكيس هو الطور المعدي والطور النشط يعيش في الأمعاء الغليظة للإنسان، وأيضا الأوالي السوطية الطفيلية التي تعود للأجناس *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* فهي المسببة لمرض النوم في القديات والإنسان. والشكل (14-20) يبين مسحات مختلفة لعينات دم مصابه بهذه الأوالي.

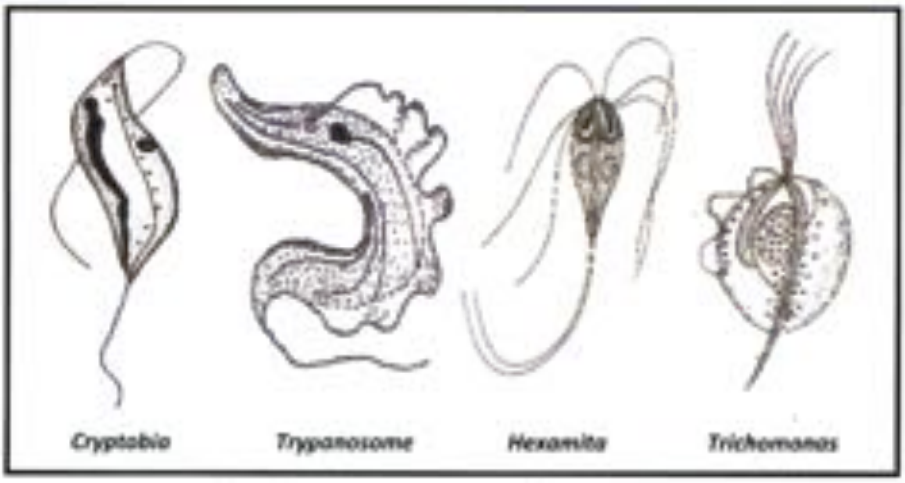


شكل (14-20) عينات دم مصابه بأجناس مختلفة من *Trypanosoma*.

أما جنس *Costia* يتطفل على الأسماك، وجنس *Trypanoplasma* الذي يسبب مرض النوم في الأسماك وينتقل عن طريق العلقيات، وتعتمد في إصابتها للأسماك على مصاصات الدماء الخلقية والتي تساعدها على الوصول إلى الأسماك وذلك عندما يفقد الأولي السوطي (التريبانوسوما والكريثوبيا) أسواطه ويعيش في أمعاء المصاصات ويقسم انقسام ثنائي بسيط ثم تنمو الأسواط مرة أخرى وتنتقل إلى منطقة الفم في المصاصات والتي تنقلها إلى الأسماك عند لدغها فتنتشر بعد ذلك في الدم، وتصيب هذه السوطيات الأسماك التي تعيش في المياه العذبة والمالحة وخاصة العائلة القطية وقد ينتشر في القناة الهضمية لأسماك المياه المالحة وعلى الجلد والخياشيم في اسماك المياه العذبة. وبعض الأوالي السوطية التي تسبب كثير من الأمراض في الأحياء المائية المهمة فمنها ما يصيب القشريات الكبيرة مثل الجمبري حيث يتطفل عليه الأجناس *Leptomonas, Unclassified, Amaeba* ويمكن مشاهدة الطفيل داخل الخلايا المصابة مجهريا، ومنها ما تصيب الأسماك مثل جنس *Cryptobia brachialis ،Cryptobia cyprinid ،Trypanosoma leuciscl* حيث تصيبها بأمراض مختلفة. وتأثير هذه الأوالي المباشر ليس بالضروري أن يكون مرضيا، ولكن وجودها قد يؤثر على عمل أعضائها، فمثلا تؤثر على التنفس أو التغير الاسموزي أو مسببات أخرى تؤدي إلى أمراض وخاصة عند وجودها بكثافة عالية.

والكشف عن وجود هذه الأوالي السوطية يتم عن طريق أخذ مسحة من الدم أو من الكبد لأسماك ميتة حديثا ووضعها على شريحة وتثبيت العينة بواسطة كحول مطلق ثم 10 نقاط تقريبا من محلول جيما المخفف، أما للحصول على الطفيل فيمكن جمع كمية من الدم في أنابيب صغيره وتركه يتجلط ويؤخذ المصل للحصول على الطفيل (الموني 2002).

ومن السوطيات التي تصيب الأسماك أيضا جنس Hxamita, Trichomonas خاصة اسماك البلطي والبوري عن طريق الطعام الملوث بحويصلات الطفيل ويعيش في الخلايا المبطنة للأمعاء ويسبب فقد الشهية ونقص في النمو والتهاب الأمعاء مع وجود البقع النزفية التي من الممكن اخذ شريحة منها لمشاهدة الطفيل.



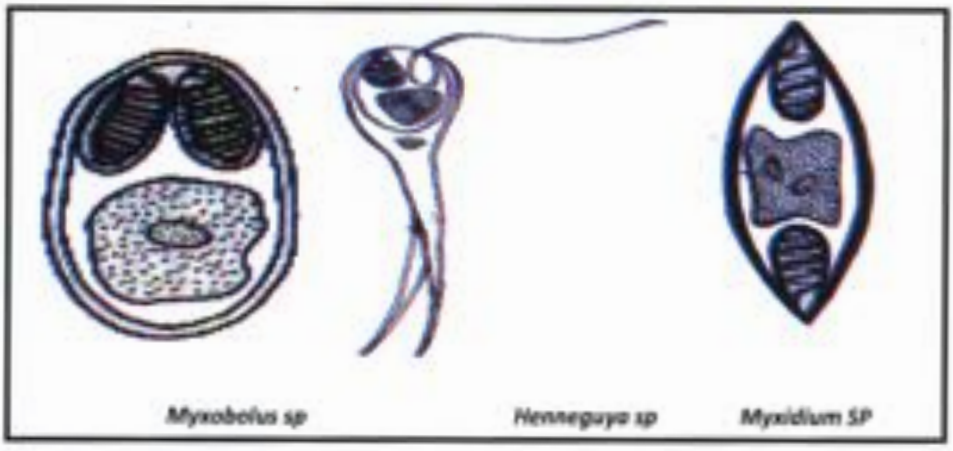
شكل (14-21) بعض الأوالي السوطية المتطفلة داخلياً في الأسماك.

أما الأوالي البوغية فهي أيضا من الأوالي التي تتطفل على الأسماك ومن أهم الأجناس *Hemegoya, Myxobolus, Myxidium, Glugea Plistophora* والتي تتطفل على الغضاريف والأنسجة أو الأعضاء الداخلية فأما أن تكون داخل حويصلات أو حرة تنتشر بين الخلايا تصيب أنواع كثيرة من الأسماك في العالم ولكن أهمها أسماك البورية والبلطي والقطه والمبروك في منطقتنا العربية، وتخترق هذه الأوالي جدار الأمعاء إلى الأوعية الدموية والليمفاوية التي تنقلها إلى بقية مناطق مختلفة من الجسم ويلجأ كل طفيل إلى ما يفضل من عضو أو نسيج وإذا كان داخل الحويصلة تنفجر هذه الحويصلة ويخرج الطفيل يتغذى على جدار العضو أو على خلايا النسيج ، وعند اختراق الحويصلات والأحشاء تنهتك هذه الحويصلات مسببة جروح صغيره على الجلد وتأكل في الزعانف.

إن وجود هذه الحويصلات في الأحشاء الداخلية مثل الكبد والطحال والأنسجة المختلفة وأيضا وجودها في الجلد وتحت القشور والأهداب الخيشومية والزعانف يسهل مشاهدتها وفحصها، حيث تؤخذ هذه الحويصلات بعد التشريح لأسماك حديثة الموت وتوضع بين شريحتين زجاجيتين وضغطها بشكل جيد لإخراج محتوياتها ومن ثم فحص محتويات هذه الحويصلات.

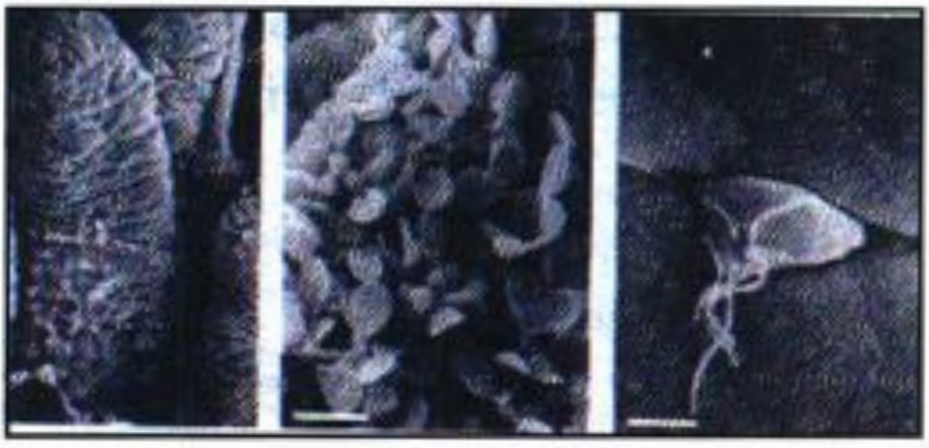
كذلك يمكن إضافة هيدروكسيد الصوديوم NaOH 1٪ لأنه يساعد على ظهور الأسواط بشكل أفضل، كما يمكن اخذ مسحات من الأحشاء الداخلية وصبغها بمحلول جيما 1:10 العمل

شرائح مجهريه. والشكل (14-22) يبين نماذج للطور البوغي من هذه الأوالي الطفيلية على أن أنواع مختلفة من الأسماك.



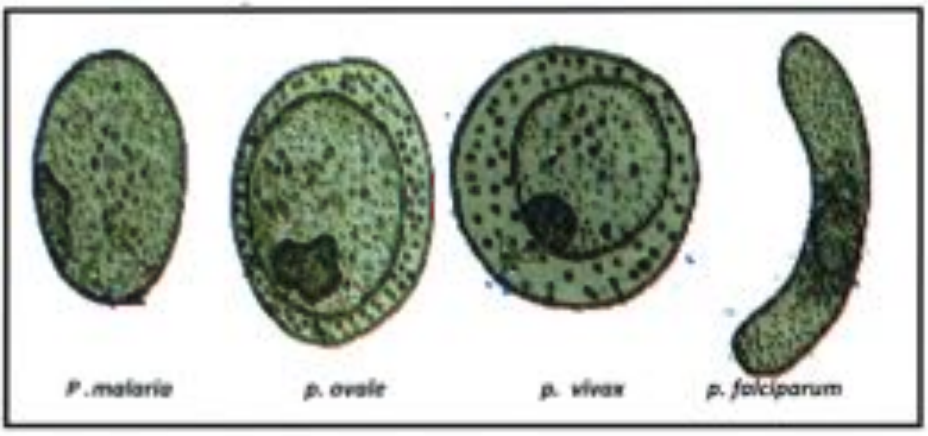
شكل (14-22) نماذج من الأوالي البوغية المتطفلة على الأسماك.

ومن الأوالي البوغية التي تصيب الأمعاء الدقيقة *Cryptosporidium* و*Giardia lamblia* حيث تدخل هذه الأوالي إلى جدار الأمعاء وقد استطاع العلماء بواسطة المجاهر المتطورة التقاط صور تبين الأولي من جنس *Giardia* وجنس *Cryptosporidium* بين طيات الأمعاء كما في الشكل (14- 23) التالي.



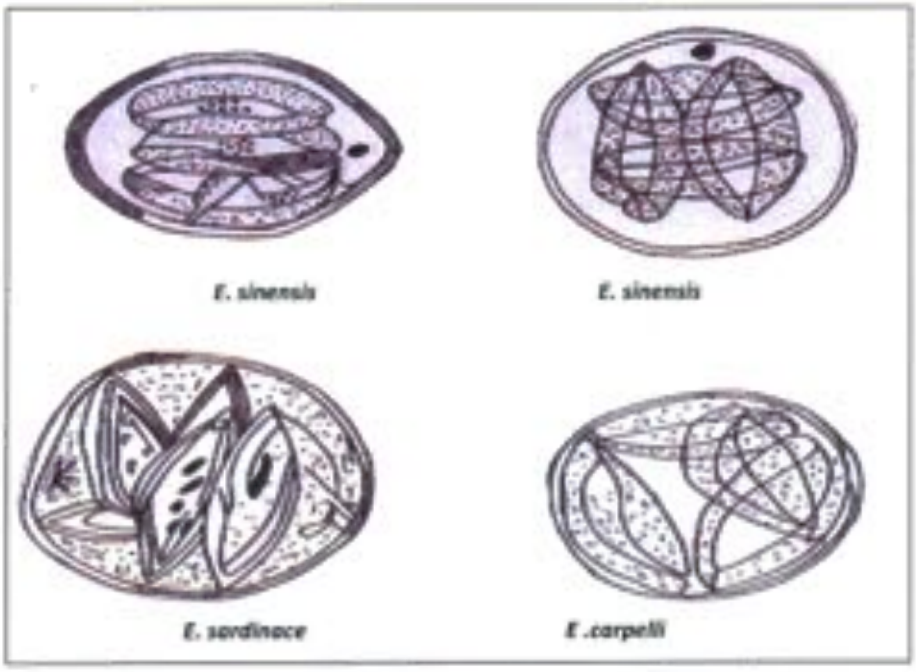
شكل (14-23) نماذج من الإصابة بالأوالي من جنس *Giardia lamblia* وجنس *Cryptosporidium*.

أما الأوالي المتطفلة على الكبد مثل الأوليات البوغية جنس *Plasmodium* وتوجد منها عدة أنواع جميعها تصيب خلايا الدم الحمراء في الأوعية المؤدية إلى الكبد مثل *P.vivax, P.oval, P.falciparum, P.malariae*، أما الأولي الطفيلي *Myxosoma* من مجموعة البوغيات المخاطية فيصيب الأسماك بمرض خاص يسمى مرض الدوران السريع، وتعتبر بيئته المفضلة القاع الطيني للوسط المائي. والشكل (14-24) يبين نماذج من هذه الأوالي المتطفلة.



شكل (14-24) أنواع من جنس البلازمديوم المتطفلة على الكبد في الثديات.

ومن الأوالي التي تعود لمجموعة ذوات المركب القمي الأجناس *Agmasoma ,Amazon, Plistophora*, فهذه الأجناس تصيب الجمبري في أعمار مختلفة، حيث وجد إن العضلات تكون بيضاء أو شاحبة اللون وغالبا ما تسبب العقم. ويمكن مشاهدة الأبواغ داخل الخلايا لهذه الأسماك عن طريق الفحص الميكروسكوبي للخياشيم والأعضاء الداخلية والتي تظهر كبيرة الحجم وتشبه الحويصلات. أما أفراد جنس الأيميريا *Eimeria* فتصيب الأسماك وتأتي العدوى عن طريق تناولها أكياس هذه الأوالي مع الطعام، حيث تخترق جدار الأمعاء بعد أن يذوب جدار الكيس مسببة قرحة أو ندب داخل الأمعاء، وتوجد عدة أنواع من الأيميريا التي تصيب الأسماك كما موضح في الشكل (14-25) ولغرض الكشف عنها نعمل مسحات من الأمعاء أو الحويصلات الهوائية لغرض مشاهدة الأبواغ spores أو عمل شرائح لجهريه هذه الأجزاء المصابة.



شكل (14-25) أشكال مختلفة من انواع جنس الايميريا التي تصيب الأسماك.

وأيضا من أوالي شعبة ذوات التركيب القمي يمكن اعتبار مجموعة المحتشدات الجريناريات مثال على التطفل الداخلي فهذه المجموعة حيث يمكن جمع ودراسة عينات من جنس *Monocystis hambrici* تتطفل على التجويف البطني والأمعاء للافقاريات حيث يعيش هذا الحيوان متطفل في الحويصلات المنوية لدودة الأرض وقد يلاحظ وجوده أحيانا في التجويف حول الاحشائي في النهاية الخلفية متعلقا بالخافر لذلك عندما يراد الحصول على هذا الأولي لغرض الدراسة يتم تشريح دودة الأرض للحصول على الحويصلات المنوية وكما في الطريقة التالية :

- تخدير دودة الأرض بقليل من الكلوروفورم أو الايثر.
- تثبيتها بواسطة الدبابيس على صحن شمعي وان يكون السطح الحر هو الجهة الظهرية للدودة
- يقطع جدار الدودة من بدايتها لغاية الحلقة 15 باستخدام سكين حادة وإبرة لتمزيق الجدار الداخلي بين القطع.

- نلاحظ وجود ثلاثة أزواج من الخويصلات المنوية ذات لون كريمي على الجهة اليسرى وبعد رفع القناة الهاضمة نجد لحقها بقية الخويصلات.
- يفع جزء من الخويصلات المنوية على الشريحة الزجاجية وبعد ضغطها على الشريحة نضع قطرة من محلول كلوريد الصوديوم 0.7٪ ثم نضع فوقها غطاء الشريحة.
- سوف نشاهد الطور الحر متحرك والطور الكيسي الحاوي على ناشطين والكيس المبوري وبداخله الأبواغ.

ويوجد أولي آخر من رتبة المتجمعات هو جنس *Gregarine garnhami* والذي يصيب أمعاء الجراد الصحراوي.

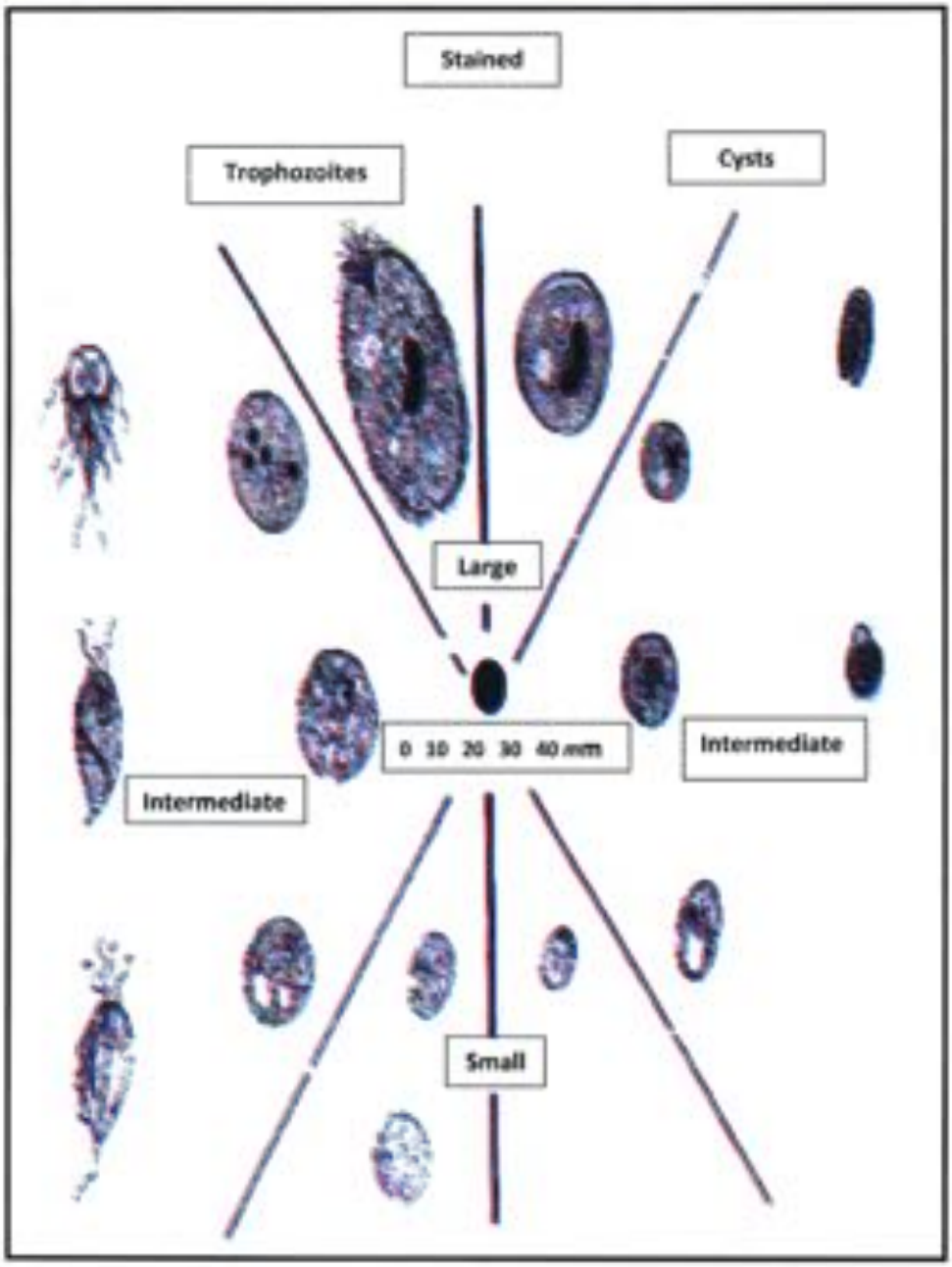
أما بالنسبة للأوليات الهدبية التي تصيب الأسماك جنس *Ichthyophthirius multifiliis* ويدخل عن طريق الفم ويصيب الأجزاء الداخلية مما يؤدي إلى ضيق في التنفس والتغير الأسموزي، ويصيب هذا الجنس كذلك الأسماك التي تعيش في المياه العذبة مثل الكارب وأسماك الزينة.

أما الأسماك البحرية والقشريات مثل الجمبري فيصيبها الجنس *Cryptocaryon irritans* الذي يسبب لها نفس المرض، أما جنس *Trichodina* فهو يصيب الأسماك في مواقع مختلفة من الجسم داخلية وخارجية فهو يصيب الجلد والخياشيم حيث تظهر بقع سيانوية اللون في الرأس والزعانف وقد ثبت وجود هذا الطفيلي أيضا في الخالب والأنابيب الكلوية لبعض الأسماك في مصر، وهناك أجناس أخرى تصيب الطحال والكل.

وتوجد أصناف من *Trichodina* تصيب الأسماك البحرية وهو يعمل على التهام خلايا الجلد والخياشيم أو تكسيرها وخاصة عند تغير العوامل البيئية مثل الأس الهيدروجيني أو تغير درجة حرارة الجسم المفاجئة أو النقص الحاد في الأوكسجين وغيرها من العوامل ، أما الأولي الهدبي من جنس *Paramoeba* وجنس *Paramoebya* فيصيب الجمبري ويعيش في الأحشاء والتجاويف الداخلية مسبب تأكل خلاياه والشكل (14-26) يوضح بعض هذه الأوالي.

شكل (14–26) بعض الأوالي الهدبية الحلقيلية الداخلية التي تصيب الأسماك.

ومن الملاحظ أن الكثير من الأوالي التي ذكرت تشترك في إصابة الإنسان بالعديد من الأمراض وهي تصل إليه أما عن طريق الماء الملوث أو الغذاء أو عن طريق التعامل مع الحيوانات العائلة لهذه الأوالي، ومنها أجناس من السوطيات الحيوانية مثل الجيارديا والترايكوموناس والتريبانوسوما، ومن اللحميات الأميبا أميبا الزحار وأميبا هستولوتكا، وداء القوسات وطفيل الملاريا من أفراد شعبة ذوات المركب القمي والبلانتيوديوم من الهدبيات وغيرها والشكل (14-27) يبين مخطط نموذجي وضعة الباحثون (Jeffrey et al, 1991) يبين توزيع وأحجام وأشكال بعض من هذه الأوالي وعلاقتها مع الإنسان.



شكل (14-27) مخطط يبين اشكال نماذج مختلفة من الأوالي في التطفل على الإنسان (Jeffrey et al, 1991).

بعض طرق جمع الدايتومات:

كما تم توضيحه في فصل توزيع وبيئة الأوالي نجد أن الدايتومات تنتشر في مختلف البيئات سواء التربة أو في المياه وفي المياه بشكل خاص تكون إما بشكل هوائم أو ملتصقة على القاع المائي أو طليقة ضمن الجسم المائي بأعماق مختلفة اعتماداً على العمر والوزن وطبيعة الجسم المائي وغيرها من العوامل البيئية. لذلك سوف تكون هنالك طرق متباينة لجمع هذه الأحياء منها:

1- استخدام قناني البولي اثلين والجرادل والقناني الزجاجية النظيفة وخاصة في البرك والأحواض والعيون والآبار الصغيرة وقليلة العمق.

2- استخدام شباك جمع الهوائم المائية plankton nets ذات الفتحات الدقيقة حيث تنتهي هذه الشباك بقناني جمع العينات، وتستخدم هذه الطريقة في الأوساط المائية المفتوحة كما في البيئة البحرية والأنهار والبحيرات الكبيرة.

3- أما في حالة الدايتومات الملتصقة على الأرصفة الساحلية والصخور والأجسام الكبيرة في الوسط المائي فيتم ذلك عن طريق استخدام أدوات القشط المعدنية والخشبية أو باستخدام الشباك الكاشطة التي تم وصفها سابقاً، وبعد ذلك تمزج تدريجيا مع ماء من نفس المصدر لغرض تنظيفها تدريجيا من الرواسب العالقة.

4- في حالة الدايتومات الموجودة في التربة تتبع طريقة التي ذكرها الباحث (Alexander, 1979) في جمع الدايتومات حيث تأخذ عينات من سطح التربة بواسطة فرشات برفق ويتم تمريرها على سطح وسط من الاجار محضرة لغرض تنمية الدايتومات عليها، تحفظ لعدة أيام في الثلاجة أو الحاضنة تحت درجة حرارة ثابتة لحين مشاهدة النمو الواضح على سطح الوسط، تأخذ مسحات بواسطة آلة كاشطة ويذوب في كمية من الماء نقي ويفضل أن يكون من الأوساط الصناعية التي تم الإشارة إليها في مجال تنمية الأوالي السوطية.

خطوات فحص وتشخيص الأوالي بعد جمعها:

- **طرق فحص الأوالي الطفيلية المرضية:**

لأجل تشخيص الإصابة بالأولي الطفيلي يتم فحص البراز أو البول (الإدرار) أو القشع أو السائل النخاعي أو بعض الإفرازات أو الأنسجة تبعا لنوع وموقع ونشاط هذه الطفيليات، يتم الفحص عن طريق المجهر للتحري عن وجودها بشكلها المتحرك (الناشط) أو غير المتحرك (الطور الكيسي).

ويجمع الإدرار مثلا في حالة الإصابة بالأولي من جنس *Trichomonas vaginalis* (الشعرة المهبلية) حيث تكون متواجدة فيه لذلك يركز الإدرار ويرمى الجزء السائل ويؤخذ الراسب ويوضع جزء منه على شريحة المجهر ثم يفحص أو تؤخذ مسحة وتوضع في أنبوبة اختبار حاوية على كلوريد الصوديوم وتوضع على شريحة زجاجية ثم يتم فحصها بالمجهر بقوة تكبير 10 × 10 و 10 × 40.

وفي حالة البراز يجمع في علب بلاستك ذات فوهة واسعة لها غطاء محكم ويسجل على العلبة اسم المريض ونوع الفحص والجنس والعمر وأخيرا تاريخ اخذ العينة حيث يفضل يفحص البراز خلال ساعة واحدة وإذا تأخر عن ذلك يوضع في الثلاجة لحين إجراء الفحص،ولإجراء الفحص نحتاج إلى شرائح زجاجية وعيدان خشبية، أقلام شمع ، محلول كلوريد الصوديوم ومحلول لوكل أيودين، ومن ثم يتم تحضير الشرائح وفقا للتالي:

- تؤخذ شريحة ويوضع عليها قطره واحدة من محلول كلوريد الصوديوم في وسط النصف الأيسر وقطره واحدة من محلول لوكل أيودين في وسط النصف الأيمن.
- يؤخذ مقدار قليل من البراز بالعود الخشبي ويفضل إن يؤخذ من السطح وداخل البراز ومن المخاط إذا كان موجود ويمزج جيدا مع قطره محلول كالوريد الصوديوم.
- يؤخذ مقدار آخر وبنفس الطريقة ويضاف إلى قطره محلول لوكل ايودين.
- يغطى كل نموذج من الشريحة بغطاء الشريحة ثم يسجل رقم النموذج على طرف الشريحة بقلم الشمع.
- تفحص الشريحة بالمجهر بقوة تكبير 10 × 10 و 10 × 40 وعند وجود الطور الكيسي عديم اللون يراعا تخفيض قوة الإضاءة لزيادة التباين.
- من أجل الفحص الدقيق نبدأ من الزاوية العليا اليسرى وانتهاء بالزاوية السفلية اليمنى.

- **طرق فحص الأوالي لأغراض الدراسة :**

تتضمن دراسة الأوالي بعد جمعها عدة خطوات ومن أهم هذه الخطوات طريقة السيطرة على الأولي ووضعه تحت المجهر دون حراك حتى يتسنى للباحث التركيز في التعرف على أجزاء الأولي ومن ثم دراستها من حيث الشكل العام والملحقات الخارجية والتركيب الداخلي وغيرها من أهداف الدراسة، إما الخطوات الأخرى من حيث الفحص والتثبيت والتلوين فتختلف باختلاف الأولي وطريقة المعيشة ولكن الباحثين (Dales et al, 1981 ، افوتي 2002، Kimball, 2005) وغيرهم جمعوا هذه الطرق والمواد المستخدمة وركزوا على الطرق الممكنة والبسيطة التي يستطيع البحث إجراءها بدون تعقيدات ومن هذه الطرق:

- **طرق فحص الأوالي سريعة الحركة.**

توجد عدة طرق لفحص الأولي تحت المجهر وتعتمد هذه الطرق على طبيعة الحيوان وطريقة المعيشة فمثلا للأوالي السريعة الحركة والنشطة مثل اهدبيات والسوطيات ولغرض إبطائها حتى نتمكن من فحصها بالمجهر تستخدم لذلك الطريقة الشائعة والناجحة التي ذكرها الباحث (Samworth, 2005) والتي تتلخص بالخطوات التالية:

1- نضع قطرة صغيرة من مزرعة الحيوان الأولي المراد فحصه على الشريحة الزجاجية ونتأكد من عدم وجود أي حبات من الرمل أو مواد غريبة حتى لا يعيق انطباق الغطاء للشريحة وبالتالي استخدام العدسة الشيئية .

2- نضع على الغطاء قطرة من حجم مماثل من محلول الأجار agar المذاب في ماء عذب (للمحافظة على محلول الأجار 1٪ في حالة سائلة عند 40 م° في حوض مائي ساخن أو فرن حراري لها نفس درجة الحرارة) ثم نقلب الغطاء في الحال فوق الشريحة حتى يسقط مركز قطرة محلول الأجار مباشرة فوق قطرة محلول المزرعة ونترك الغطاء مستقر فوق الشريحة.

3- عند التقاء القطرتان تهبط درجة الحرارة بسرعة إلى ما تحت 30 م° ويكتسب المزيج صلابة ويتحول سائل الأجار إلى هلام يحتوي على أعداد كبيرة من الفراغات الثانية الصغيرة ومعظمها اصغر من مجال قوة التكبير للمجهر، ويحتجز في داخل هذه الفراغات أعداد من الحيوانات

الأولية. وهكذا قد تشغل الأنواع كبيرة الحجم حيز لا يسمح لها بالحركة مطلقاً، بينما يمكن للأنواع الأصغر حجماً أن تسبح فيها حولها في دوائر صغيرة.

ملاحظة: يمكن زيادة التحكم في حركة الحيوانات الأولية عن طريق زيادة حجم قطرة الآجار بالنسبة إلى قطرة محلول المزرعة أو عن طريق استعمال محلول آجار 1.5٪.

4- يستمر بقاء الحيوانات حية تحت هذه الظروف مدة لا تقل عن نصف ساعة وكثير ما تبقى حية لساعات عدة. إن الغطاء يطبق على الشريحة بدرجة تسمح باستخدام العدسة الشيئية المغمورة في قطرة الزيت (لزيادة التكبير) ولكن يجب الحرص دائماً على عدم الضغط على غطاء الشريحة أو تحريكه لان ذلك يؤدي إلى تلف شبكة هلام الآجار التي تحتوي على الأوالي.

أما بالنسبة للأوالي البحرية فيمكن فحصها مجهرياً باستعمال نفس الطريقة السابقة ولكن بحضر الآجار من ماء البحر، أما بالنسبة الأوالي المتطفلة يمكن فحصها مجهرياً باستعمال نفس الطريقة ولكن بحضر محلول الآجار من محلول كلوريد الصوديوم المائي 0.7٪.

بعض طرق تثبيت الأوالي:

تتوقف دراسة الأوالي على طبيعة العينات المحفوظة، لذلك يهتم الباحثون بالطرق المتبعة في جمع وإعداد وتجهيز العينات للفحص والدراسة وتتوقف سهولة ودقة الدراسة للعينات على هذه الطرق، لذلك فأن مواد وطرق التخدير والتثبيت والحفظ تشكل خطوات أساسية للحصول على العينات بصورة جيدة وعلى الأوالي بصورة واضحة المعالم الخارجية والتراكيب الداخلية، ومن أهم هذه المواد الكحول والفورمالين واللذان يستخدمان في الكثير من العينات كمثبت وحافظ. وتوجد أيضا كثير من المواد التي تم التطرق إليها أو سوف يتم التطرق إليها حسب نوع الأولي أو طريقة الجمع.

تختلف طرق التثبيت بالنسبة للأوالي إذا كانت حرة المعيشة أو إذا كانت متطفلة، وتوجد عدة طرق يراعا في كل منها طبيعة المعيشة للكائن الأولي وأيضا طريقة جمعه ويراعا أيضا الدقة إثناء العمل وذلك للحصول على أولي كامل الأجزاء، فمثلاً بالنسبة إلى تثبيت الأوليات الحرة المعيشة يتبع الخطوات التالية:

1. يسحب الحيوان مع قطرة من الماء باستعمال أنبوب زجاجي ماص رفيع ويترك في البيد ليستقر لمدة دقيقة وذلك كون بعض الحيوانات مثل الأميبا تنكمش أو تسحب أقدامها (كره فعل هذه العملية)، ثم نمزج قطرة الماء سريعا مع قليل من مثبت شودين وتترك لمدة 15 دقيقة.
2. نعمل على تركيز الحيوانات بلطف حتى يمكن سحب معظمها بالأنبوب الماص مع كمية قليلة جدا من المادة المثبتة ونسكبها في قليل من الكحول بنسبة 70٪ ثم ننقلها إلى كحول بتركيز 90٪ ثم إلى كحول مطلق ويراعا في هذه العملية تركيز الحيوانات بلطف.
3. نحضر شرائح زجاجية ونضع على كل منها مسحة من المادة المثبتة إسمنت الألبومين Albumen cement.
4. بعد إجراء طرد مركزي خفيف للكحول ومافيه من الأوالي نسحب وباستعمال الماصة محلول العينات ثم ندعه يسقط قطره قطره بحيث تسقط على كل شريحة قطرة واحدة من ارتفاع نحو 2.5 سم فوق مستوى الشريحة.
5. ينتج عن سقوط القطرات والتجلط السريع للالبومين التصاق الحيوانات بشدة ويتم تثبيتها ثم نضع الشرائح مباشرة في كحول مطلق.

أما في حالة الأوالي الجالسة مثل جنس الفورتسيلا فنضع عدد من الشرائح فوق رف معدني أو خشبي مفتوح ونغمره بما عليه من شرائح في بركة الماء أو مزرعة مخبريه تتواجد فيها وفرة من هذه الحيوانات، وبعد عدة أيام تلتصق أعداد كبيرة من هذه الأوالي بأسطح الشرائح، بعد ذلك ترفع ثم تغمر مباشرة في مادة مثبته مثل سائل شودين وتترك لمدة 15 دقيقة ثم تنقل إلى الكحول بتركيز 70٪ ومن ثم تكمل العملية كما جاء خطوات فحص وتثبيت الأوالي حرة المعيشة.

أما في حالة الأوالي الطفيلية فتكون عملية التثبيت على الشكل التالي:

1- لتثبيت الحيوان الأولي المتعايش أو المتطفل داخل القناة الهضمية مثل الأوبلينا *Opalina* ونيكتوثيروس *Nyctotherus* يؤخذ كمية صغيرة من براز ضفدعة أو محتويات مستقيم ضفدعة وتفرد على شريحة زجاجية على شكل طبقة رقيقة جدا، ثم نتأكد من وجود الأولي

المتطفل وبعدها نترك الشريحة معرضة للهواء الجوي لمدة دقيقة أو أكثر، نضع الشريحة في مثبت شودين ثم ننقلها بعد حوالي 15 دقيقة إلى كحول 70٪ ثم نكمل العملية.

2- أما لتثبيت عينة من المونوسيتس *Monocystis* وهو أولي يتطفل داخل الحويصلات المنوية لدودة الأرض، ونحصل عليه من تشريح دودة ارض بالغة ونزع إحدى حويصلاتها المنوية، ثم نأخذ شريحة زجاج ونجعلها رطبة بهواء الزفير ثم نسحب فوقها محتويات الحويصلة المنوية لنحصل على مسحة رقيقة جدا، نضع الشريحة في الحال في مادة مثبته مثل سائل شودين وتترك لمدة 15 ثم تنقل إلى الكحول بتركيز 70٪ ثم تكمل العملية كما جاء في تحضير الأوالي حرة المعيشة.

بعض طرق صبغ وتلوين الأوالي:

تلون الأوالي بصبغات لمحاليل تحضر مسبقا، وتعتمد هذه المحاليل على عدة عوامل أهمها تركيب الجسم في الأولي، إن كان عارياً أو مغطى بقشرة وأيضا على الجزء المطلوب تلوينه من كونه نواة أو سايتوبلازم أو جزء من المكونات الداخلية أو اللواحق الخلوية، وكذلك يجب أن يراعى كذلك نوع المحلول الذي يحتوي على الأولي وكما مبين في الحالات التالية:

1- الأوالي العارية يمكن استخدام محاليل الهيماتوكسيلين ومنها (محلول ديافيلد ومحلول ارليش ومحلول ماير) وهذا لتلوين النواة وليس السايتوبلازم والطريقة المتبعة هي تمرير الشرائح على الكحول بتراكيز تنازلية 90٪ ، 70٪ ، 50٪ ، 30٪ على الترتيب وتترك لمدة دقيقتين في كل درجة ثم توضع في احد محاليل الهيماتوكسيلين وتترك لمدة بين 5- 20 دقيقة ويغسل الفائض بالماء وحتى يتحول لون الصبغة إلى الأزرق، بعدها توضع في ماء قلوي (قطرة من الامونيا المركزة في 250 مل من الماء المقطر). إما بالنسبة إلى السايتوبلازم فيصبغ باللون الأحمر باستخدام صبغة الايوسين ويغسل فائض الصبغ بالماء ويظل إلى كحول بتراكيز تصاعدية 30٪ ، 50٪ ، 70٪ ، 90٪ ثم كحول مطلق ولمدة دقيقتين في كل درجة من الكحول، ثم ينقل إلى الزايلول ثم قطرة من بلسم كندا بعدها نضع غطاء الشريحة ويفحص أو يحفظ النموذج.

2- أما بالنسبة للحيوانات الأولية المغطاة بقشرة أو صدفة، فتذاب القشرة أولاً في حامض ضعيف فإذا كانت في كحول تنقل بواسطة الماصة إلى محلول حامض الهيدروكلوريك 1٪ إلى 70٪ حسب صلابة القشرة، وإذا كانت في الفورمالين فتنقل إلى محلول الهيدروكلوريك 1٪ وعندما تذوب القشرة تغسل العينات لإزالة الحامض إما في كحول أو في ماء حسب محلول الحفظ، العينات المحفوظة في الكحول يمكن صبغها بسهولة بإضافة صبغ كارمين البوراكس لمدة نصف ساعة ثم يغسل الفائض بالكحول الحامضي وتنقل إلى كحول 90٪ ثم إلى الزايلول لمدة دقيقتين إلى ثلاثة ، إما إذا كانت الحيوانات في الماء فتصبغ كما في حالة الأوالي العارية ثم تنقل إلى الكحول 30٪ ، 50٪ ، 70٪ ، 90٪ ثم كحول مطلق ثم زايلول ولمدة دقيقتين إلى ثلاث في كل محلول ثم قطرة من بلسم كندا ونضع على كل شريحة غطاء الشريحة .