الملاحق

obeikandl.com

obeikandl.com

إرشادات معملية عامة
General Laboratory Aid

- عند تخفيف الأحماض أضف الحامض إلى الماء وليس العكس. ويجب أن نضيف الحامض ببطء.
- عند قياس كميات صغيرة من السوائل استخدم أدوات قياس صغيرة ضماناً للدقة.
- محلول الفورمالين يحتوى في واقع الأمر على حوالي ٤٠٪ من غاز الفورمالدهيد ولكنه يعامل في إعداد التحضيرات المجهرية كأنه ١٠٠٪ بمعنى عند تحضير ١٠٪ فورمالين، يقاس ١٠مل من الفورمالين ويضاف إليه ٩٠مل ماء مقطر.
- عند تحضير تركيزات مخففة (٨٠٪ – ٧٠٪ – ٥٠٪) من الكحول فإنها تحضر من ٩٥٪ كحول، ويحظر تحضيرها من الكحول المطلق حيث إنه مرتفع الثمن كثيراً عن ٩٥٪ كحول ولا يستعمل إلا على حالته.
- عند تحضير ٧٠٪ كحول مثلاً من ٩٥٪ فإنه لسرعة العمل، يقاس ٧٠مل من ٩٥٪ كحول بواسطة مخبار مدرج، ثم تزداد هذه الكمية إلى ٩٠مل بواسطة الماء المقطر. وبنفس الطريقة يكمن تحضير أي تركيز مطلوب.

- عند قياس كمية من كحول مطلق أو حمض خليك ثلجي بواسطة مخبار مدرج فإنه يجب أن يكون مجففاً تماماً.

- عند تحضير ١٥٪ من سائل معين فإننا نقيس ١٥مل من هذا السائل ونضيف إليه ٨٥ مل من الماء المقطر فتصبح الكمية النهائية ١٠٠ مل. وبالمثل عند تحضير ٢٠٪ كلوريد الصوديوم مثلاً فإننا نزن ٢٠ جرام منه ونذيبها في كمية محددة من الماء المقطر (٥٠ مل مثلاً). وبعد تمام الذوبان نكمل الناتج إلى ١٠٠مل باستخدام الماء المقطر بحيث يكون لدينا بعد ذوبان الملح كمية من المحلول لا تزيد عن ١٠٠مل.

تحضير محلول جزيئي Molecular Solution:

الوزن الجزيئي الجرامى لمادة ما هو مقدار كمية من هذه المادة وزنها بالجرامات يساوى عدد وزنها الجزيئي الجرامي لهذه المادة في لتر من المحلول لحجم نهائي. فمثلاً لتحضير محلول جزيئي من هيدروكسيد الصوديوم Na OH (وزنها الجزيئى ٤٠) نزن ٤٠ جم منها ونذيبها في ماء مقطر بحيث يكون المحلول في النهاية يساوى لترا واحدا.

تحضير محلول عياري Normal Solution:

يحتوي المحلول العياري لمادة ما على المكافئ الجرامي من هذه المادة في محلول حجمه لتر واحد. ويعرف المكافئ الجرامي بأنه الكمية من المادة القادرة على التفاعل مع أو الإحلال محل جزيء واحد (١،٠٠٨ جم) من الهيدروجين.

وإذا أردنا بطريقة عملية معرفة الوزن من مادة ما الواجب وجوده في لتر محلول عياري فإننا نقسم الوزن الجزيئي للمادة على تكافئها.

التعامل مع رابع أكسيد الأزميوم Osmium tetroxide(O4):

هذه المادة غالية الثمن؛ ولذا تستعمل منها كميات صغيرة قدر الإمكان. وهي توجد في المعمل على هيئة بلورات بوزن كمية = ١حم في أمبولات زجاجية.

ويجب الحذر التام عند تحضير محلول رابع أكسيد الأوزيوم (حمض الأوزميك) حيث إن بخاره سام ويسبب أضراراً بقرنية العين الحلق؛ ولذا نغسل الأمبول المحتوي على بلورات الحمض بالماء المقطر ونزيل الورقة الملصقة على الامبول والمسجل عليها البيانات الخاصة به.

ضع الأمبول في زجاجة داكنة اللون محكمة الغلق بها كمية من الماء المقطر المراد اذابة رابع أكسيد الأوزميوم فيها لتحضير محلول تركيزه ٢٪ وأغلق الزجاجة جيداً ورجها بشدة (وبداخلها الماء والأمبول) حتى يكسر الأمبول ويذوب رابع أوكسيد الأوزميوم في الماء. هذا المحلول يحفظ لعدة شهور – إذا أريد – في الزجاجة الداكنة اللون محكمة الغلق عند درجة حرارة ٤ درجات مئوية. وإلا حدث اختزال للمحلول. وعند استخدام كمية من المحلول فيستحسن أن يكون ذلك من خلال دولاب الأبخرة fume cupboard في المعمل. ويراعى عدم إرجاع الكمية التي استعملت من المحلول إلى الزجاجة الأصلية مرة أخرى. كما يمكن تخفيف الكمية المأخوذة من المحلول عند الاستعمال إذا تطلب الأمر ذلك. ويلاحظ أنه مع الوقت يتكون راسب أسود على جدار الزجاجة نتيجة اختزال المحلول، ويمكن منع ذلك بإضافة قطرة من محلول مشبع من كلوريد الزئبقيك لكل ١٠ مل من المحلول.

ويلاحظ أن بلورات رابع أوكسيد الأوزميك OsO4 عندما تذاب في الماء فإنها تكون مادة رمزها الكيماوي H2OsO5 يشار إليها خطأ بكلمة حمض

بل هي متعادلة. ويلاحظ أن اكتساب الدهون للون الأسود بواسطة حمض الأوزميك يرجع إلى اختزالة إلى الأوكسيد الأقل درجة.

استعمال نيترات الفضة فى الصباغة Silver nitrate

عند استعمال نيترات الفضة في الصباغة كما في حالات جهاز جولجي والليفات العصبية – يراعى استخدام أدوات نظيفة تماماً ومغسولة بحمض الكبريتيك والكروميك ثم بالماء الجاري ثم الماء المقطر ثم تجفف جيداً وتحفظ بعيدة عن الأتربة.

كما يراعى في هذه الحالة تجنب أغطية الزجاجات المصنوعة من المطاط، كما يجب استخدام مواد كيماوية على درجة عالية من النقاوة في الطرق التي تستخدم فيها الفضة.

Obeikandl.com

المثبتات

Fixatives

❖ **خليط حمض الخليك والكحول Alcohol- Acetic Acid Mixture**

حمض الخليك الثلجي	١ جزء
الكحول	٣ جزء

❖ **مثبت بوين Bouin**

محلول مائي مشبع من حمض البكريك	٧٥ مل
فورمالدهيد ٤٠٪	٢٥ مل
حمض الخليك الثلجي	٥ مل

❖ **مثبت بوين الكحولي Bouin (alcoholic)**

حمض البكريك	١ جرام
فورمالدهيد ٤٠٪	٦٠ مل
حمض الخليك الثلجي	١٥ مل

❖ **مثبت زنكر Zenker's Fixative**

كلوريد الزئبق	٥ جم
ثاني كرومات البوتاسيوم	٢,٥ جم
كبريتات الصوديوم	١ جم
ماء مقطر	١٠٠ جم
حمض الخليك الثلجي	١ مل

obeikandi.com

❖ **مثبت فلمنج Flemming's Fixative**

٢٪ رابع أوكسيد الأوزمويوم	٠,٨ مل
٥ ثالث أوكسيد الكروم	٠,٤ مل
٢٠٪ حمض الخليك	٠,٥ مل
ماء مقطر	٠,٨ مل

❖ **مثبت هيلي Helly's Fixative**

كلوريد الزئبق	٥ جم
ثاني كرومات البوتاسيوم	٢,٥ جم
كبريتات الصوديوم	١ جم
ماء مقطر	١٠٠ مل
فورماين٤٠٪	

❖ **مثبت التمان Altmann's Fixative**

٢٪ رابع أوكسيد الأوزميوم المائي	١ جزء
٥٪ ثاني كرومات البوتاسيوم المائية	١ جزء

❖ **مثبت كارنوى Carnoy's Fixative**

كحول إثيلي مطلق	٦٠ مل
كلورفورم	٣٠ مل
حمض خليك ثلجي	٥ مل

❖ **مثبت هيدنهين (سوسا) Heidenhain's (Susa) Fixative**

كلوريد الزئبق	٤٥ جم
كلوريد الصوديوم	٥ جم
ماء مقطر	٨٠٠ مل

obeikandi.com

حمض ثالث كلورالخليك	٢٠ مل
فورمالدهيد ٤٠٪	٢٠٠ مل
حمض الخليك الثلجي	٤٠ مل

❖ **مثبت شامبي** **Champy's Fixative**

حمض الكروم المائي ١٪	٧ مل
ثاني كرومات البوتاسيوم المائية ٣٪	٧ مل
رابع اكسيد الاوزميوم المائي ٢٪	٢ مل

❖ **مثبت شاودن** **Schaudin's Fixative**

كلوريد الزئبق المشبع (المائي)	١٠٠ مل
كحول أثيلي مطلق	٥٠ مل
حمض الخليك الثلجي	٥ مل

❖ **مثبت هولاندى** **Hollande's Fixative**

خلات النحاس	٢٥ جم
حمض البكريك	٤ جم
فورمالدهيد ٤٠٪	١٠ جم
حمض الخليك الثلجي	١,٥ جم
ماء مقطر	١٠٠ مل

❖ **مثبت سيرا** **Serra's Fixative**

كحول أثيلي مطلق	٦ أجزاء
فورمالدهيد ٤٠٪	٣ أجزاء
حمض الخليك الثلجي	١ جزء

❖ **مثبت تيجو** Tjio's Fixative

كحول اثيلي	٦ أجزاء
حمض الخليك الثلجي	٢ جزء
فورمالدهيد	١ جزء

❖ **مثبت ديفدسن** Davidson's Fixative

ماء مقطر	٣٥ مل
كحول اثيلي	٣٠ مل
فورمالدهيد ٤٠٪	٢٠ مل
حمض الخليك الثلجي	١٠ مل

❖ **خليط جلوتارالدهيد والاوزميوم (طريقة ترمب وبولجر)** Trump Bulger &

جلوتارالدهيد ٥٠٪	١ جزء
رابع اكسيد الاوزميوم ٥٪	٢ جزء
١٠ جزيئي من منظم الكوليدين 0.1 M Collidine	

❖ **مثبت منظم اوزميوم - سكروز** Buffered OsO4 Sucrose

(التركيز النهائي للأوزميوم ١٪)

رابع أوكسيد الأوزميوم ٢٪	٨ مل
منظم خلات الفيرونال (٢و٧ pH)	٢ مل
ماء مقطر	٤ مل
سكروز	٠,٧٢ جم
١ و٠ عياري حمض الأيدروكلوريك	٢ مل

❖ **خليط الكروم والاوزميوم** Chrome- OsO4

(التركيز النهائي للأوزميوم ١٪)

obeikandi.com

٤ ٪ كرومات البوتاسيوم (٢و٧ pH)	١٠ مل
٤و٣ ٪ كلوريد الصوديوم	١٠ مل
٢٪ رابع أوكسيد الاوزميوم	٢٠ مل

❖ **مثبت ١٠٪ فورمول ملحي Formol Saline**

فورمالين ٤٠٪	١٠٠ مل
كلوريد الصوديوم	٨,٥ جم
ماء	٩٠٠ مل

obeikandi.com

طرق التنظيف

إن ظاهرة التلوث Contamination لتعتبر من أكبر المشاكل التي تواجه الباحث سواء كان ذلك التلوث بكتيرياً أو كيميائياً، لهذا يجب أن يبذل جهد كاف في اختيار نوعية المواد والمعدات التي يحتاج لها في هذا المجال. لهذا يجب أن تكون جميع الأدوات المستعملة في مجال التحضيرات المجهرية على درجة عالية من النظافة ويوجد أربع طرق رئيسية لتنظيف مثل هذه الأدوات:

i. التنظيف بالمذيبات Cleaning with detergents

ii. التنظيف بالقلويات Cleaning with alkalis

iii. التنظيف بالأحماض Cleaning with acids

iv. التنظيف بالموجات فوق الصوتية Cleaning with ultrasonic waves

❖ التنظيف بالمذيبات:

تستعمل المذيبات الآن على نطاق واسع في مجال التنظيف وبالذات لتنظيف الأوعية البلاستيكية، ولكن يجب معرفة إن مثل هذه المذيبات صعب إزالتها وتحتاج إلى عمليات غسل جيدة بالماء الجاري ولعدة ساعات (٣ ساعات كحد أدنى وليلة كاملة كحد أعلى) وبعدها تغسل بالماء المقطر.

ومن أهم المذيبات شائعة الاستعمال في الوقت الحاضر المحاليل الآتية:

أ) محلول الهيماسول Haemosol

ب) محلول السترجين Stergen

ت) محلول الديكون ٧٥ Decon 75

ث) محلول الميكروسولف Microsolve

أما طريقة التنظيف فتتم حسب الاتى:

١. تترك المعدات في الماء العادي لفترة كافية من الزمن (فترة تخمير) بعدها تزال جميع الأوراق وما شابة ذلك من علامات أو آثار غير مرغوب في وجودها. والجدير بالذكر أن آثار الكتابة ببعض الأنواع من أقلام الشمع قد يصعب إزالتها بالماء؛ ولهذا تحتاج إلى معالجة خاصة مثل غطسها في ماء ساخن به مادة مذيبة وبعدها تمسح جيداً بقطعة من القماش

٢. تنقل المعدات إلى حوض التنظيف الفعلي الذي يحتوى على المحلول المذيب مثل (Decon 75) وتكون نسبة تخفيف المحلول (١ : ٢٠٠) بالماء مناسبة جداً، لكن يجب عدم استعمال اليدين مباشرة بل يستحسن لبس قفازات المطاط الرقيقة للحفاظ على سلامة اليدين.

يفضل أن تترك المعدات ليلة كاملة ولو أن تركها لمدة ساعتين قد يؤدي الغرض المطلوب إذا كانت تلك المعدات أصلاً نظيفة، لكن يجب الغسل الجيد بالفرشاة.

٣. بعد عملية الغسل بالمذيب، يجب إزالة آثار المذيب تماماً، وذلك بغسل المعدات تحت الماء الجاري لعدة ساعات، ويفضل أن يكون هذا الماء مرشحاً.

٤. يجب غسل المعدات جيداً بالماء المقطر ثم تترك هذه المعدات لتجف في مكان نظيف خال من ذرات الغبار، أو تجفف عند درجة حرارة معتدلة داخل الفرن (oven).

❖ **التنظيف بالقلويات:**

عملية التنظيف بالقلويات تشبه إلى حد كبير تلك الخطوات المذكورة في التنظيف بالمذيبات، ولكن من أشهر القلويات المناسبة للتنظيف ما يلي:

أ) ميتا سليكات الصوديوم Sodium metacilicate

ب) كربونات الصوديوم Sodium carbonate

ج) فوسفات الصوديوم الثلاثية Sodium triphosphate

❖ **التنظيف بالأحماض:**

استعمال الحموض مثل حمض الكبريتيك وحمض الكروم وحمض النيتريك فى عمليات التنظيف أمر شائع ولو أن هناك بعض الأخطار المتوقع حدوثها في أثناء استعمال مثل هذة الحموض القوية، زيادة على انة من الصعب إزالة آثارها من المعدات. يعتبر حمض الكروم Chromic acid من أشهر الحموض المستعملة فى الوقت الحاضر فى عمليات التنظيف فى مجال التحضيرات المجهرية، ويحضر حسب الآتي:

a. يوزن ٤٠ جرام من ثنائي كرومات البوتاسيوم.

b. تذاب الكرومات في كمية قليلة جداً من الماء المقطر.

c. يضاف حمض الكبريتيك المركز وبحذر شديد حتى يكتمل الحجم إلى لتر واحد، وعندها سوف يكون لون المحلول بنياً مصفراً.

يجب عدم استعمال المحلول في التنظيف عندما يتحول لون المحلول إلى اللون الأخضر. لكن يجب غسل آثار هذا الحمض من المعدات جيداً قبل الاستعمال.

❖ **التنظيف بالموجات فوق الصوتية:**

حديثاً طورت أجهزة دقيقة لتنظيف بعض المعدات الصلبة الدقيقة والحساسة والتي يصعب تنظيفها بالمحليل العادية، أو التي تؤثر عليها بعض المحاليل القوية بحيث توضع هذة المعدات داخل جهاز له القدرة على تكوين ذبذبات صوتية ذات تردد عال كفيل بتكسير الشوائب العالقة بهذه المعدات.

obeikandi.com

بيئات اللصق
Mounting media

❖ مادة بلسم كندا

تتركب مادة بلسم كندا من المواد الآتية:

التربينات	Terpenes
حمض كربوكسيلي	Carboxylic acid
صمغ دمار	Gum damer
صمغ السنروس	Gum sandarac

❖ مادة الايوبارال

تتركب هذه المادة من المكونات الآتية:

زيت الاوكاليبوس	Oil of eucalyptus
صمغ السندروس	Gum sandrarc
سالول	Salol
بارالدهيد	Paraldehyde
منثول	Menthol
كافور	Camphor

❖ جيلاتين الجلسرين القيصري Kaiser glycerine jelly

ماء مقطر	٥٢ مل
جيلاتين	٨ جم
جلسرين	٥٠ مل

obeikandi.com

فينول	٠,١ جم

يترك الجيلاتين في الماء لمدة ساعتين، يضاف بعدها الجلسرين والفينول ثم ترفع درجة حرارة المحلول حتى ٦٥–٧٠ درجة مئوية، ويحرك المحلول لمدة ١٥ دقيقة حتى يتجانس تماماً.

يمكن حفظ مثل هذه البيئة في زجاجة جيدة الإحكام وعند درجة حرارة الثلاجة. لو زادت درجة حرارة المحلول عن ٧٥ درجة مئوية فإن الجيلاتين يتحول إلى ما يعرف ما بعد بالميتاجيلاتين Metagelatin وهذا النوع الأخير لا يتصلب ويبلغ معامل انكسار هذه البيئة ٤٢و١ عند درجة حرارة الغرفة.

❖ **بيئة اباثي Apauthy's medium**

صمغ عربي	٥٠ حم
سكروز	٥٠ جم
ماء مقطر	٥٠ مل
ثيمول	٠,٥٠ جم

يذاب الصمغ العربي في ماء دافئ ثم يضاف السكروز وعند يتمم الذوبان يرشح المحلول ويترك ليبرد ثم تضاف المادة الحافظة مثل الثيمول. يبلغ معمل انكسار هذه البيئة ١,٥٢.

❖ **بيئة فرانت Ferrant's medium**

صمغ عربي	٤٠ جم
جلسرين	٤٠ مل
ماء مقطر	٤٠ مل
فينول	٠,١ جم

obeikandl.com

يـذاب الصـمغ العربـي ـ﴿ المـاء أولاً ثـم يضـاف اليـه الجلسـرين والمـادة الحافظة مثل الفينول ويبلغ معامل انكسار هذه البيئة ١,٤٢.

❖ **بيئة قراى ووس Gray and Wess medium (PVA)**

تعمل عجينة من الكحول والأسيتون ثم تمزج نصف كمية الماء المقطر مع الجلسرين مع التحريك المستمر، ثم تضاف كمية الماء المتبقية قطرة مع الاستمرار فى التحريك. لون المحلول سوف يكون عكراً لكن يستحسن تدفئته لمدة عشر دقائق في حمام مائي حتى يصبح لونه رائقاً.

Obeikandi.com

الصبغات
Stains

obeikandi.com

❖ **هارس هيماتوكسيلين Harris Hematoxyline**

يذاب ١ جم هيماتوكسيلين في ١٠ مل كحول إثيلي.

يذاب ٢٠ جم: بوتاسيوم ألم potash alum Al2(SO4)K2So4.24H2O

أو أمونيا ألم NA4Al (SO4)2.12H2O ammonia alum

في ٢٠٠ مل ماء وسخن حتى تغلى أضف محلول الهيماتوكسلين للمحلول السابق واغل لمدة نصف دقيقة.

أضف ٠,٥ جم أكسيد زئبقيك ثم برد بسرعة.

أضف قطرات قليلة من حمض الثلجي glacial acetic acid لتحسين صفات الصبغ.

لا تستمر صلاحية هذا الصبغ إلا لشهر واحد أو اثنين على الأكثر.

❖ **ماير هيماتوكسلين Mayer's Hematoxylin**

أضف ١جم هيماتوكسلين إلى لتر واحد من الماء المقطر وسخن على لهب هادئ، ثم أضف ٢جم إيودات الصوديوم Sodium Iodate، ٥٠ جم بوتاسيوم ألم Potash alum.

سخن حتى تمام الذوبان وأضف ١جم حمض ستريك Citric acid و٥٠ جم كلورال هيدريت Chloral hydrate.

يتم نضج هذا المحلول خلال ٦ - ٨ أسابيع ولكن يمكن استعماله بعد أسبوعين من تحضيره.

❖ **مالوري حمض فوسفوتنجستيك – هيماتوكسيلين Mallory's phosphotungstic acid- Hematoxylin stain**

هيماتوكسلين	١ جم
حمض فوسفوتنجستيك	٢ جم
ماء مقطر	١٠٠٠ مل

أذب الهيماتوكسلين وحمض الفوسفوتنجستك في كمية من الماء كل على حدة. سخن محلول الهيماتوكسلين حتى يتوقف التغير في اللون.

برد المحلول حتى تقل درجة إلى درجة حرارة الغرفة ثم أضف إليه محلول حمض الفوسفوتنجستكز أضف بعد ذلك ٠,١٧٧ جم من برمنجنات البوتاسيوم. يستعمل هذا المحلول بعد شهرين من تاريخ تحضيره.

❖ **ويجرت أيرن هيماتوكسلين Weigert's iron hematoxylin**

محلول (أ):

كلوريد الحديد	٤ مل
ماء مقطر	٩٥ مل
حمض هيدروكلوريك كثافة ١,٨٨–١,٢٩	١ مل

محلول (ب):

هيماتوكسلين	١ جم
كحول اثيلي٩٥٪	١٠٠ مل

عند كل استعمال أضف كميات متساوية من المحلولين (أ)، (ب) ويمكن أن تستمر صلاحية المحلولين المضافين معاً لمدة أسبوع.

❖ **الأيوسين Eosin stain**

إيوسين	١ جم
كحول إثيلي ٧٠٪	١٠٠٠ مل
حمض خليك ثلجي	٥ مل

عند الاستعمال، خذ كمية من هذا المحلول وأضف إليها كمية مماثلة من ٧٠٪ كحول إثيلي وقطرتين من حمض الخليك، والصبغ حامضى ويراعى نزع الماء من القطاعات بعد الصباغة بسرعة فى ٩٥٪ كحول ثم الكحول المطلق.

❖ **صبغ فان جيسون (المعدل) Van Gieson (modified)**

فوكسين حامض Acid fuchsin	٠,٠١ جم
حمض بكريك Picric acid	٠,٠١ جم
ماء مقطر	١٠٠ مل

❖ **صبغ مالورى الثلاثي Mallory Triple stain**

يتكون من ثلاثة محاليل:

مالوري ١:

فوكسين حامض	١ جم
ماء مقطر	١٠٠ مل

محلول حمض الفوسفومولبدك:

حمض فوسفومولبديك Phosphomolybdic acid	١ جم
ماء مقطر	١٠٠ مل

obeikandi.com

مالورى ٢:

أنيلين بلو Aniline blue	٠,٥ جم
أورانج ج Orange G	٢,٥ جم
ماء مقطر	١٠٠ مل
حمض أوكساليك Oxalic acid	٢ جم

وعند استخدام هذا الصبغ فإن الأنيلين بلو يصبغ النسيج الضام والغضروف. ويصبغ الأورنج ج كرات الدم والغمد النخاعي للألياف العصبية والعضلات ويقوم الفوكسين بصبغ باقي التراكيب بالنسيج بما في ذلك أنوية الخلايا.

❖ **تحضير المحلول الاساسى لصبغ جمسا Stock solution of Giemsa stain**

صبغ جمسا	٠,٥٠ جم
جلسرين	٣٣ مل

سخن لمدة ساعتين في فرن درجة ٦٠ درجة مئوية. ثم أضف ٣٣ مل كحول مثيلي (متعادل خالي من الأسيتون).

ويجب حفظ صبغ جمسا في زجاجة داكنة اللون، حيث إن ضوء الشمس يتسبب في إتلافها.

وعند الاستعمال يخفف الصبغ بالماء المقطر بنسبة ١ : ١٠ أو بإضافة محلول منظم فوسفاتي ذي أس هيدروجيني يتراوح من ٦,٤ – ٧,٢.

ويلاحظ أن صبغ جمسا ذا صبغ مركب حيث إنه يحتوي على إيوسين Eosin Y، ازورت Azures وميثيلين بلوكلورايد Methyline blue chloride.

❖ **تحضير المحلول الأساسي لصبغ لشمان** **Leishman's stain**

صبغ لشمان	٠,١٥ جم
كحول مثيلي نقي	١٠٠ مل

ويستحسن إضافة المحلول إلى الصبغ على دفعات مع الصحن حتى يتم إذابة الصبغ، ويستحسن كذلك عدم استعمال الصبغ قبل حوالي أسبوعين من التحضير.

❖ **صبغ بست كارمين** **Best's carmine**

كارمين	٢ جم
كربونات البوتاسيوم	١ جم
كلوريد بوتاسيوم	٥ جم
ماء مقطر	٦٠ مل

- اغل هذه المواد على نار هادئة في قارورة كبيرة (لتجنب آثار الفوران) لمدة خمس دقائق ثم برد.
- أضف ٢٠ مل من أمونيا مركزة.
- رشح وخزن الرشيح في وعاء داكن اللون عند درجة ٤ درجة مئوية.
- المحلول صالح لمدة شهر أو شهرين.

❖ **صبغات الرصاص** **Lead**

- صبغة خلات الرصاص: Lead acetate
  - يحضر محلول مشبع من خلات الرصاص في ماء مقطر مغلي.
  - يخلط المحلول في زجاجات محكمة القفل ويضاف إليه بعض من بلورات سترات الرصاص.

- بعد أخذ كميات قليلة من الصبغة تملأ الزجاجة مرة أخرى حتى فوهتها بالماء المقطر المغلي.
- تجري عملية الصبغ بجعل القطاعات المحملة على الشبكات النحاسية تطفو في قطرات من المحلول لمدة ٥ – ٣٠ دقيقة.
- تغسل القطاعات جيداً في الماء المقطر.

❖ **صبغة سترات الرصاص Lead citrate**

نترات الرصاص	١,٣٣ جم
سترات الصوديوم	١,٦٧ جم
ماء مقطر	٣٠ مل

رج المكونات السابقة في زجاجة سعة ٥٠ مل لمدة ٢٠ دقيقة، ثم أضف ٨ مل من ١ عياري هيدروكسيد الصوديوم، ثم خفف بالماء المقطر إلى حجم ٥٠ مل، اخلط بالقلب ويكون المحلول جاهزاً للاستعمال عندما يصبح رائقاً.

❖ **صبغة الفضة Silver stain**

٣٪ هكساميثيلين رباعى الامين Hexamethylene amine	١٨ مل
١٠٪ نترات الفضة	٢ مل
٢٪ بورات الصوديوم	٢ مل

❖ **خلات اليورانيل Uranyl acetate**

(طريقة الصبغ قبل الطمر)

خلات اليورانيل	١ جم
١٠٪ اسيتون أو كحول اثيلى	٥٠ جم

تخلط لمدة ٨ دقائق.

(طريقة الصبغ للقطاعات)

خلات اليورانيل	٢و٠ جم
ماء مقطر	٤ مل

❖ **الصبغات السالبة**

المحاليل:

١) ١ — ٥ ٪ من حمض الفوسفوتنجستيك.

٢) ٢٪ من خلات اليورانيل.

٣) ١٪ فورمات اليورانيل.

٤) ١ — ٣٪ تنجسات الليثيوم.

٥) ٢٪ تنجستوبورات الصوديوم

obeikandi.com

المحاليل المنظمة
Buffer solutions

يلزم تحضير المحاليل المنظمة في كثير من الطرق المستخدمة لتجهيز العينات للفحص الميكروسكوبي وتستخدم بالضرورة فيما يتعلق بكيمياء الأنسجة histochemisrty وخاصة في حالات الكشف عن الإنزيمات enzymes. والجداول التالية (١ – ٣) توضح المحاليل المنظمة المستخدمة في هذا المجال وكيفية تحضيرها.

obeikandl.com

جدول رقم ١

Buffer	molarity	Preparation	pH Range										
			3.6	3.8	4.0	4.2	4.4	4.6	4.8	5.0	5.2	5.4	5.6
1. Acetate Buffer													
A. Sodium acetate	0.2 M	1.64 g in 100 ml	3.7	6.0	9.0	13.2	19.5	24.5	30.0	35.2	39.5	41.2	45.2
B. Acetic acid	0.2 M	1.2 ml in 100 ml	46.3	44.0	41.0	36.8	30.5	25.5	20.0	14.8	10.5	8.8	4.8
Distilled water			50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
2. Veronal Acetate													
A.Sodium acetate Sodium barbitone		1.17 g and	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	-
B.Hydrochloric acid	0.1 N	0.84 ml in 100 ml	14.0	13.0	12.5	12.0	11.0	10.0	9.5	9.0	8.5	8.0	-
B.Distilled water			4	5	5.5	6	7	8	8.5	9.0	9.5	10.0	-
3. Citrate-Citric acid													
A. Sodium citrate	0.1 M	3.57 g crystals in 100 ml	13.0	15	17	18.5	22	24.5	27.0	29.5	32.0	34.0	36.3
B. Citric acid	0.1 M	2.10 g in 100 ml	37.0	35.0	33.0	31.5	28	25.5	23.0	20.5	18	16.0	13.7
Distilled water			50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
4. Phosphate-Citrate													
A. Sodium phosphate, Dibasic	0.2 M	2.83 g in 100 ml	32.2	35.5	38.5	41.4	44.1	46.7	49.3	51.5	53.6	55.7	58.0
B. Citric acid	0.1 M	2.10 g in 100 ml	67.8	64.5	61.5	58.6	55.9	53.3	50.7	48.5	46.4	42.3	42.0
Distilled water			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

جدول رقم ٢

Buffer	molarity	Preparation	pH Range										
			5.2	5.4	5.6	5.8	6.0	6.2	6.4	6.6	6.8	7.0	7.2
1. Phosphate													
A. Sodium phosphate, NaH_2PO_2	0.2 M	2.75 g in 100 ml	-	-	-	46.0	43.8	40.7	36.7	31.2	25.5	19.5	14.0
B. Sodium phosphate, Na_2HPO_2	0.2 M	2.83 g in 100 ml	-	-	-	4.0	6.2	9.3	13.3	18.8	24.5	30.5	36.0
Distilled water			-	-	-	50	50	50	50	50	50	50	50
2. Phosphate Citrate													
A. Sodium phosphate, dibasic	0.2 M	2.83 g in 100 ml	53.6	55.7	58.0	60.4	63.1	66.1	69.2	72.7	77.2	82.3	86.9
B. Citric acid	0.1 M	2.101 g in 100 ml	46.4	42.3	42.0	39.6	36.9	33.9	30.8	27.3	22.8	17.7	13.1
Distilled water			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3. Tris-Maleate													
A. (1) Tris‡		2.42 g } in 100 ml											
(2) Maleic acid	0.2 M	2.32 g }	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
B. Sodium hydroxide	0.2 M	0.8 g in 100 ml	3.5	5.4	7.7	10.2	13.0	15.7	19.5	21.2	22.5	24.0	25.5
Distilled water			71.5	69.6	67.3	64.8	62.0	59.3	55.5	53.8	52.5	51.0	49.5
4. Veronal Aceleate													
A. (1) Sodium acetate, $3H_2O$		1.17 g } in 100 ml											
(2) Sodium barbitone		2.94 g }	-	5.0	-	-	-	5.0	-	-	5.0	5.0	5.0
B. Hydrochloric acid	0.1 N	0.84 ml in 100 ml	-	8.0	-	-	-	7.0	-	-	6.5	6.0	5.5
Distilled water			-	10	-	-	-	11	-	-	11.5	12	12.5

جدول رقم ٣

Buffer	molarity	Preparation	pH Range										
			5.2	5.4	5.6	5.8	6.0	6.2	6.4	6.6	6.8	7.0	7.2
1. Phosphate													
A. Sodium phosphate, NaH_2PO_2	0.2 M	2.75 g in 100 ml	–	–	–	46.0	43.8	40.7	36.7	31.2	25.5	19.5	14.0
B. Sodium phosphate, Na_2HPO_2	0.2 M	2.83 g in 100 ml	–	–	–	4.0	6.2	9.3	13.3	18.8	24.5	30.5	36.0
Distilled water			–	–	–	50	50	50	50	50	50	50	50
2. Phosphate Citrate													
A. Sodium phosphate, dibasic	0.2 M	2.83 g in 100 ml	53.6	55.7	58.0	60.4	63.1	66.1	69.2	72.7	77.2	82.3	86.9
B. Citric acid	0.1 M	2.101 g in 100 ml	46.4	42.3	42.0	39.6	36.9	33.9	30.8	27.3	22.8	17.7	13.1
Distilled water			–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
3. Tris-Maleate													
A. (1) Tris‡ (2) Maleic acid	0.2 M	2.42 g, 2.32 g } in 100 ml	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
B. Sodium hydroxide	0.2 M	0.8 g in 100 ml	3.5	5.4	7.7	10.2	13.0	15.7	19.5	21.2	22.5	24.0	25.5
Distilled water			71.5	69.6	67.3	64.8	62.0	59.3	55.5	53.8	52.5	51.0	49.5
4. Veronal Aceleate													
A. (1) Sodium acetate, $3H_2O$ (2) Sodium barbitone		1.17 g, 2.94 g } in 100 ml	–	5.0	–	–	–	5.0	–	–	5.0	5.0	5.0
B. Hydrochloric acid	0.1 N	0.84 ml in 100 ml	–	8.0	–	–	–	7.0	–	–	6.5	6.0	5.5
Distilled water			–	10	–	–	–	11	–	–	11.5	12	12.5

النفايات البيولوجية الضارة
BIOHAZARDOUS WASTES

إن العمل في التحضيرات المجهرية يصاحبه دائماً مخلفات بيولوجية وكيميائية متنوعة. وتتمثل المخلفات الكيميائية في بقايا المواد الكيميائية المستخدمة في العمليات المختلفة لتجهيز العينات وخاصة المواد السامة مثل الألدهيدات ورابع أكسيد الأوزميوم، وكذلك المواد ذات الطبيعة الإشعاعية مثل صبغة خلات اليورانيل، وقد تناولنا مخاطر هذه المواد وكيفية التعامل معها.

أما النفايات البيولوجية biological wastes فهي تتمثل في بقايا العينات البيولوجية التي يتم التعامل معها في مجال التحضيرات والدراسات المجهرية، وأغلبها يكون من الكائنات الدقيقة والأنسجة الحيوانية والنباتية والسوائل الحيوية (مثل الدم) وهي في الواقع ملوثات ومخلفات معدية infectious wastes تحمل العديد من العوامل المرضة pathogenic agents مثل الميكروبات المختلفة كالبكتيريا والفطريات والفيروسات والطفيليات وكذلك المواد السامة toxins التي تنتجها هذه الميكروبات والتي بدورها تسبب أمراضاً للإنسان والحيوان والنبات. وفيما يلي نتناول هذا النوع من المخلفات من حيث تقسيمها وطرق التخلص منها.

تعريف وتقسيم المخلفات البيولوجية
IDENTIFICATION OF BIOHAZARDOUS WASTES

يمكن تقسيم المخلفات البيولوجية المعدية إلى خمس أقسام رئيسية كما يلي:

١. المزارع الميكروبية والعوامل البيولوجية ذات العلاقة Microbial cultures and associated biologicals:

هذا القسم يشمل:

- المزارع الناتجة من المعامل الطبية والباثولوجية pathological medical and laboratories.
- المزارع والعوامل المعدية المخزنة stocks of infectious agents من المعامل البحثية والصناعية research and industerial laboratories.
- مخلفات المنتجات الحيوية wastes from the production of biologicals
- مخلفات اللقاحات الحية أو المضعفة discarded live and attenuated vaccines.
- أطباق الزراعة (أطباق بتري) وأدوات تجميع وتناول العينات وأدوات إجراء الاختبارات التشخيصية assemblies and devices used to conduct diagnostic testes.

Obeikandl.com

٢. المخلفات الباثولوجية Pathological wastes:

المخلفات الباثولوجية للإنسان تشمل الأنسجة tissues والأعضاء organs والسوائل الحيوية body fluids التي يمكن إزالتها من الجسم عن طريق الجراحة surgery أو بطرق طبية أو معملية أخرى.

٣. مخلفات الدم ومنتجاته والسوائل الحيوية للإنسان Human blood, blood products and body fluid wastes:

هذا القسم يشمل:

- دم الإنسان human blood ومنتجاته.
- مكونات الدم مثل السيروم serum والبلازما plasma والصفائح platelets وغيرها، حيث يتم تناول هذه المكونات لمتابعة المرضى معملياً.
- أكياس الدم الوريدي intravenous bags التي تستخدم في عمليات نقل الدم blood transfusion.
- عينات الدم والسوائل الحيوية وحاوياتها specimens and their containers والأدوات البلاستيكية التي تستخدم في تناولها.

٤. مخلفات الحيوانات Animal wastes:

هذه المخلفات الحيوانية تشمل الذبائح الملوثة contaminated animal carcasses وأعضاء الجسم والدم ومنتجاته والإفرازات secretions والمنتجات الحيوانية الملوثة ومخلفات أماكن تربية الحيوانات. كل هذا يعرض الإنسان العادي والباحثين والدارسين ومستخدمي حيوانات التجارب للعوامل الوبائية التي تنتقل من الحيوان للإنسان zoonotic infectious agents.

obeikandl.com

٥. الأدوات الحادة المستخدمة Used sharps:

هـذه الأدوات تشـمل الإبـر needles والسـرنجات syringes وأنابيـب باسـتير pasteur pipettes والأنابيب الزجاجية والشرائح الزجاجية وأغطيتها slides and cover slips وشـفرات المشـارط scalpel blades. حيـث تسـتخدم هـذه الآلات الحـادة بالضـرورة في المستشـفيات ومعامـل الجامعـات ومعامـل التحاليـل الطبيـة وفي الشـركات الصناعية ذات الصلة.

Obeikandi.com

طرق التخلص من المخلفات البيولوجية الضارة
DECONTAMINATION OF BIOHAZARDOUS WASTES

بداية يجب أن يوكل هذا الأمر إلى واحد من مشرفي المعامل ذوي الخبرة في هذا المجال على أن يكون هذا الشخص ملماً بأنواع المخلفات ومدى خطورتها على البيئة والصحة العامة.

يجب أولاً عزل (فصل) المخلفات الخطرة والمعدية infectious and biohazardous wastes عن المخلفات العامة الأخرى وتستخدم ثلاثة أنواع من الحاويات لذلك، على أن تخصص هذه الحاويات safety containers كما يلي:

أ) حاوية للآلات الحادة used sharps.

ب) حاوية للسوائل (الأكثر من ٢٠ مل) fluids.

ج) حاوية للمخلفات المعدية الأخرى other infectious wastes.

مع مراعاة وضع علامة الخطر البيولوجي المعروفة عالمياً universal biohazard symbol على كل حاوية.

كذلك يجب أن تتميز الحاويات بالمتانة وعدم قابليتها للكسر ومقاومتها للتشقق، وأن تكون محكمة الغلق مميزة اللون (حمراء أو صفراء)، مع تجنب تراكم المخلفات فيها. علماً بأن معظم المخلفات الملوث الناتجة من المعامل يجب إعدامها باستخدام عملية التعقيم في جهاز الأوتوكلاف autoclaving قبل وضعها في صناديق (حاويات) النفايات.

(شكل ٥٥)

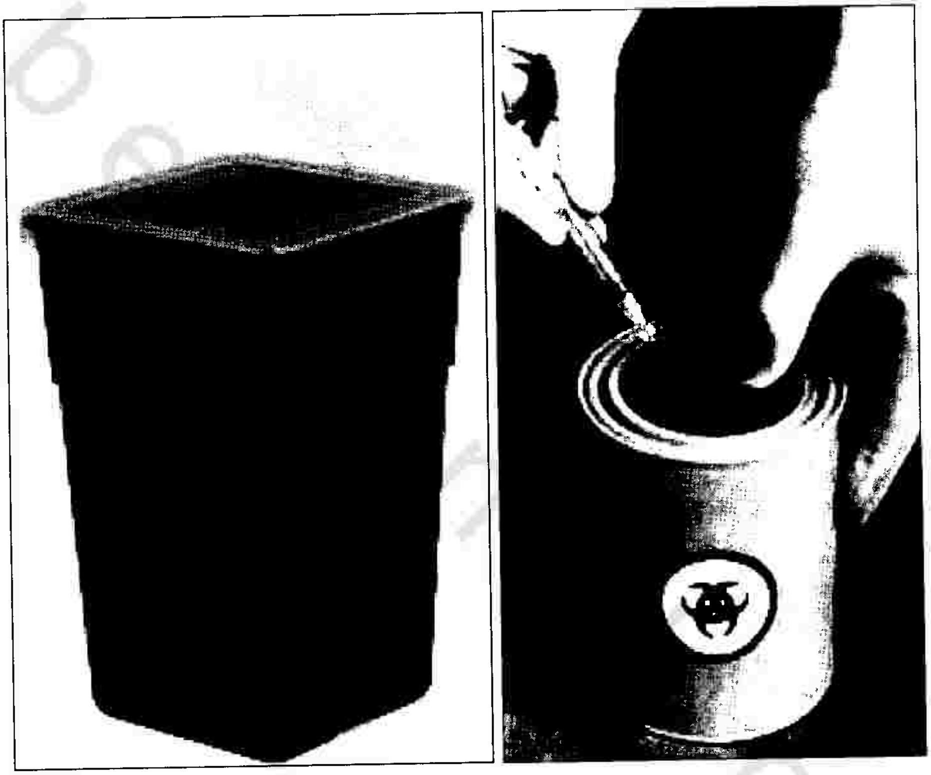
علامة الخطر البيولوجي

Biohazard symbol

بالنسبة للآلات الحادة توضع في حاوياتها sharpsafe containers وهي ذات صفات خاصة تزيد عن المواصفات العامة المذكورة سابقاً بأنها قابلة للتعقيم autoclavable والحرق incinerable دون تصاعد أي أبخرة سامة، ذات صمام لإدخال الآلات الحادة منه، ومقاومة لطبيعة هذه الآلات، وبمجرد امتلائها يقفل الصمام نهائياً ثم تعقم في الأوتوكلاف. أما بالنسبة للسوائل (الأكثر من ٢٠ مل) يمكن إزالة تلوثها decontamination بالتعقيم في الأوتوكلاف أو بإضافة مواد كيميائية مطهرة مناسبة disinfectant، ثم تلقى مع تيار ماء (كمية كبيرة) في خط الصرف الصحي.

يراعى إلقاء الحاوية في حاوية المخلفات الأخرى إذا كانت من النوع غير قابل للاستخدام أكثر من مرة disposable أو تعقيمها في الأوتوكلاف واستعمالها مرة أخرى.

وبالنسبة للمخلفات المعدية الأخرى (مثل المزارع الميكروبية القديمة في أطباق بتري) فيمكن وضعها مباشرة في أكياس بلاستيكية مصنوعة من مادة polypropylene مقاومة للحرارة وتتحمل ظروف التعقيم في الأوتوكلاف autoclavable bags ، ثم تعقم الأكياس في الأوتوكلاف قبل وضعها في الحاوية.



(شكل ٥٦)

أشكال مختلفة لحاويات الآلات الحادة sharpsafe containers

ومن الوسائل الأخرى المستخدمة للتخلص (إعدام) من المخلفات البيولوجية:

المدافن landfill:

تنتشر طريقة دفن النفايات في بعض بلاد العالم الثالث ولهذه الطريقة مخاطرها على البيئة وصحة الإنسان فهي تلوث التربة والمياه الجوفية والزراعية وبالطبع ولهذا يجب اختيار المكان المناسب والبعيد عن العمران.

الحرق Incineration:

وقد تكون هذه الطريقة مناسبة للتخلص من النفايات حيث تستخدم محارق خاصة محكمة الإغلاق. من سلبيات هذه المحارق تصاعد الأدخنة الملوثة للهواء وصعوبة صيانتها وعدم وضع الرقابة اللازمة عليها.

obeikandi.com

obeikandl.com

المراجع

obeikandl.com

obeikandl.com

المراجع العربية

- **الخليفة، محمد صالح والصالح، عبد العزيز عبد الرحمن (١٩٩٥).** المجاهر وتقنياتها. عمادة شئون المكتبات. الرياض. جامعة الملك سعود.
- **البنهاوي، محمود أحمد والجنزوري، منير علي (١٩٨٩).** التقنية المجهرية إعداد التحضيرات الميكروسكوبية. القاهرة. دار المعارف.
- **عبد المجيد، التهامي محمد (١٩٩٤).** دليل الطالب العملي لعلم الأنسجة.عمادة شئون المكتبات. الرياض. جامعة الملك سعود.
- **الموجي، كامل محمود وحامد، جمال الدين وأبا الخيل، عبد الرحمن المهنا (٢٠٠٣).** الكتاب العملي في علم الأحياء الدقيقة. الرياض. مكتبة الرشد.
- **أبو زنادة، عبد العزيز حامد والجوهري، محمود محمد (١٩٨٠).** المجهر والبنيات الدقيقة. الرياض. جامعة الرياض.
- **المختار، كواكب عبد القادر والعلاف، سهيلة محمود والعطار، عدنان عيد الأمير (١٩٨٢).** التحضيرات المجهرية. بغداد. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي.

المراجع الأجنبية

- **Hunter, Elaine E. (1984).** Practical electron microscopyNew York, London. Praeger publishers.
- **Racker, Darlene K. (1986).** Transmission electron microscopy method of application. Chicago. Charlis C Thomas publishers.
- **Abd El-rahman, Ashraf Abd El-rahman (1988).** Studies on the innervation of Guina pig adrenal medulla and para-aortic body.Thesis submitted to the university of Nottingham.
- **Bancroft, John D. and Gamble, Marilyn (2002).** Theory and practice of histological techniques. London. Churchill Livingstone.
- **Lewis, P. R and Knight, D. P. (1977).** Practical methods in electron microscopy. Amesterdam – New York – Oxford. North–Holland publishers.
- **Pease, d. c. (1964).** Histological techniques for electron microscopy. London – New York. Academic Press.
- **Tribe, M., Erant, M. R. and Snook, R. (1995).** Light microscope.Cambridge. Cambridge university Press.
- **Barrenett, R. J., Perney, D. P. and Hagstom, P. E. (1964).** Additional new alhyde fixatives for histochemistry and electron microscopy. London.