

Stanisław Pelc

TECHNIKA WYKONYWANIA  
BOTANICZNYCH PREPARATÓW MIKROSKOPOWYCH

Artykuł niniejszy opracowany jest w głównej mierze dla nauczycieli szkół średnich. Zawiera przepisy łatwego i niezbyt kosztownego sporządzania preparatów mikroskopowych. Celowo omijam w nim skomplikowane metody, które wymagają drogiej i często trudno dostępnej aparatury oraz odczynników. Preparaty, które omawiam, można wykonać w każdej pracowni szkolnej, średnio wyposażonej.

Zestaw potrzebnych narzędzi i odczynników

Narzędzia

- 1) Szkiełka nakrywkowe
- 2) Szkiełka podstawowe
- 3) Szkiełka podstawowe z wklęsłym szlifem (wglębieniem)
- 4) Szkiełka zegarkowe
- 5) Igiełki preparacyjne
- 6) Brzytwa płasko-wklęsła lub żyłетки
- 7) Pinceta z cienkim końcem
- 8) Pipetki zwykłe
- 9) Pipetki włosowate
- 10) Palnik spirytusowy lub gazowy
- 11) Naczynka ze szczelnym zamknięciem (szlifem), najlepiej małe naczynka wagowe
- 12) Nożyczki małe
- 13) Skalpele lub ostry nóż
- 14) Bibuła filtracyjna
- 15) Wata szklana (do sączków)
- 16) Rdzeń z łodygi bzu czarnego Sambucus nigra
- 17) Szkło laboratoryjne (zlewki, próbówki, menzurki, słoiki itp.)

Odczynniki

- |   |   |         |
|---|---|---------|
| 1) Alkohol etylowy 96%                      | - | 1000 ml |
| 2) Alkohol etylowy 100%                     | - | 250 ml  |
| 3) Alun potasowy $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ | - | 100 g   |
| 4) Asfalt                                   | - | 200 g   |
| 5) Balsam kanadyjski                        | - | 100 g   |
| 6) Błękit metylenowy                        | - | 10 g    |
| 7) Chloran potasu $KClO$                    | - | 250 g   |
| 8) Chlorek cynku $ZnCl_2$                   | - | 250 g   |
| 9) Fenol                                    | - | 250 g   |
| 10) Floroglucyna                            | - | 50 g    |
| 11) Glicerol                                | - | 200 ml  |
| 12) Hematoksylina                           | - | 50 g    |
| 13) Jodek potasu $KJ$                       | - | 100 g   |
| 14) Jod $J$                                 | - | 10 g    |
| 15) Kalafonia                               | - | 100 g   |
| 16) Karmin                                  | - | 10 g    |

17) Ksylen	-	200 ml
18) Kwas azotowy stęż. $\text{HNO}_3$	-	200 ml
19) Kwas salicylowy	-	50 g
20) Kwas solny stęż. $\text{HCl}$	-	250 g
21) Lakier bezbarwny nitro		
22) Olej lniany	-	100 ml
23) Podchloryn wapnia $\text{Ca}(\text{ClO})_2$	-	250 g
24) Sudan III	-	10 g
25) Tymol	-	50 g
26) Wapno chlorowane $\text{Ca}(\text{ClO})\text{Cl}$	-	250 g
27) Wazelina biała	-	
28) Węglan potasu		
29) Węglan wapnia	-	250 g
30) Woda destylowana		
31) Woda utleniona 3%	-	100 ml
32) Wodorotlenek potasu $\text{KOH}$	-	150 g
33) Wodzian chloranu $\text{CCl}.\text{CH}(\text{OH})_2$	-	100 g
34) Wosk pszczeli	-	100 g
35) Zieleń jodowa	-	50 g
36) Żelatyna biała	-	250 g

Ilości poszczególnych odczynników podałem w przybliżeniu. Zapas taki wystarczy na kilka lat pracy.

### Przygotowanie materiału roślinnego do sporządzenia preparatów

Najczęściej w praktyce sporządzamy preparaty z materiałów konserwowanych. Sposoby konserwowania materiałów roślinnych wychodzą poza ramy tego artykułu, a więc nie będę ich omawiał. Zasadą jest, aby materiał konserwowany był jak najmniej zmieniony, i w związku z tym trzeba dobrać odpowiedni płyn konserwujący.

Badając materiał żywy, trzeba pamiętać o tym, aby przez cały czas badania zachował on właściwości organizmu żywego. Badając fragmenty tkanek lub całe drobne obiekty, należy umieszczać je w płynie izotonicznym dla danego obiektu.

tu lub w naturalnym środowisku. Np. plankton trzeba badać w wodzie z tego zbiornika, w którym został złowiony. Badanie materiału żywego przeprowadzamy w preparacie wodnym, tzn. w zwykłej kropli lub w kropli wiszącej. Sposoby wykonywania tych preparatów podaję w dalszej części niniejszego artykułu. Wykonanie preparatów stałych z żywego materiału jest oczywiście rzeczą niemożliwą.

Materiał konserwowany należy odpowiednio przygotować do sporządzenia preparatu. W wypadku drobnych organizmów sprawa jest ułatwiona. Drobne organizmy zamykamy w całości. Jeżeli preparat zamykamy w substancji, która nie łączy się z wodą, np. w balsamie kanadyjskim, trzeba dany obiekt odwodnić, natomiast gdy preparat zamykamy w substancji łączącej się z wodą, nie jest wskazane odwadnianie preparatu.

Przy sporządzaniu preparatów z większych obiektów musimy materiał odpowiednio rozdrobnić lub zrobić z niego skrawek.

Rozdrobnić materiał możemy w dwojaki sposób. Na szkiełku podstawowym dwoma igielkami preparacyjnymi rozprowadzamy w kropli płynu dany obiekt tak, aby poszczególne elementy oddzieliły się od siebie, względnie sporządzamy rozmaz. Rozmaz robimy między dwoma szkiełkami podstawowymi lub nakrywkowymi. Badany materiał dajemy na szkiełko podstawowe do kropli wody i brzegiem drugiego szkiełka podstawowego, trzymanego ukośnie, lekko naciskając, rozmazujemy go po szkiełku. W ten sposób sporządzamy preparaty z drobnych obiektów, które nie ulegną zniszczeniu przy rozmazie, np. z bakterii.

## Sporządzanie skrawków z większych obiektów

W artykule tym nie będę omawiał techniki sporządzania skrawków mikrotomowych, gdyż szkoły z reguły nie posiadają mikrotomów, potrzebnych do takiej manipulacji. Poza tym robienie skrawków mikrotomowych jest żmudne i wymaga dużej wprawy.

Do badań anatomicznych wystarczają zupełnie dobrze skrawki robione ręcznie brzytwą lub żyłką.

Do krajania materiału roślinnego używamy brzytwy płasko wklęsłej, tzn. jedna jej strona jest płaska, a druga wklęsła, względnie ostrej i sztywnej żyłki. Brzytwę należy często ostrzyć na pasku, zasadniczo przed każdorazowym użyciem, a od czasu do czasu dać do oszlifowania na kamieniu szlifierskim. Krojąc materiał zwracamy brzytwę stroną płaską do obiektu.

Posługując się żyłką wybieramy żyłki ostre i sztywne, najlepiej o grubości 0,10 mm.

Przy krojeniu tak żyłką, jak i brzytwą należy zawsze najpierw materiał obrobić z grubsza ostrym nożem lub starą żyłką. Obrobienie takie polega na wyrównaniu miejsca, z którego będziemy robić skrawek. Zapobiega to w dużym stopniu tępieniu ostrej żyłki lub brzytwy.

Jeżeli materiał, z którego robimy przekrój, jest dość duży i sztywny, np. kilkuletnia gałązka drzewa, sztywna łodyga rośliny jednorocznej itp., wówczas krajanie nie przedstawia większej trudności. Natomiast, jeżeli mamy zrobić przekrój przez drobny i wiotki organ rośliny, np. przekrój przez liść, cienki korzeń itp., wówczas materiał dla lepszego operowania nim wkładamy w łupki z rdzenia łodygi

bzu czarnego *Sambucus nigra*. Rdzeń powinien posiadać przekrój ok. 10 - 15 mm. Mały kawałek rdzenia, długości ok. 30 - 40 mm, przecinamy wzdłuż na dwie połowy, wkładamy materiał, który mamy kroić, w postawie łupki, tak aby nieco materiału wystawało od góry (ok. 1-2 mm), po bokach materiału krojony nie może wystawać. Następnie starą żyłką ucinamy ok. 1-2 mm rdzenia wraz z materiałem. Dobrze jest też ścinać brzegi rdzenia w ten sposób, aby przy robieniu skrawków ciąć ostrą żyłką jak najmniej rdzenia. W ten sposób przygotowany materiał ujmujemy lewą ręką, trzymając tę część rośliny, z której będziemy robić przekrój. Prawą ręką krajemy materiał wraz z rdzeniem. Robiąc skrawek ręcznie, nie należy przykładać żyłki, względnie brzytwy do brzegu krojonego obiektu, lecz nieco dalej - w kierunku ku środkowi. W ten sposób łatwiej jest zrobić cienki skrawek. Używając do krojenia żyłki, należy ją trzymać lekko, tak aby nie gięła się w palcach.

Ukrojony skrawek należy natychmiast przenieść na szkiełko podstawowe do kropli wody, lub na szkiełko zegarkowe do barwnika. Trzymanie skrawka na powietrzu powoduje jego wysychanie, co w znacznym stopniu utrudnia dalszą obserwację (banieczki powietrza).

Krojąc drobne obiekty w rdzeniu, dobrze jest włożyć między łupki kilka warstw, np. liścia lub kilka korzonków. W ten sposób równocześnie robimy kilka skrawków.

### Maceracja tkanek i rozjaśnianie skrawków

Maceracja tkanki roślinnej ma na celu rozłożenie jej na poszczególne komórki. Jak wiadomo, komórki roślinne połą-

czone są blaszką środkową, tę właśnie blaszkę środkową rozpuszczamy przy maceracji. W pewnych wypadkach blaszka środkowa jest łatwo rozpuszczalna już w gorącej wodzie i wystarcza badany materiał zagotować. W razie gdy blaszka środkowa jest bardziej odporna, musimy do maceracji używać środków chemicznych.

1) Woda utleniona  $H_2O_2$  3%

---

Pogrążona w niej tkanka roślinna ulega maceracji w czasie od 1 do 15 dni. Długość maceracji zależy od odporności danej tkanki. Przy maceracji zawartość komórek nie ulega zniszczeniu.

2) Mieszanina SCHULZA

chloran potasu	10 g
kwas azotowy stęż.	10 cm <sup>3</sup>

Służy do maceracji drewna. W czasie reakcji wydziela się wolny chlor, który maceruje tkankę.

Do próbki z mieszaniną wkładamy kawałki drewna i podgrzewamy ostrożnie aż do chwili wydzielania się baniek gazu. Po pewnym czasie (ok. 5 min) zlewamy płyn, a pozostałość płuczemy kilkakrotnie wodą silnie wstrząsając. Kawałki drewna, które nie uległy całkowitej maceracji, dajemy na szkiełko podstawowe i rozdrabniamy igiełkami.

Rozjaśnianie skrawków mikroskopowych ma na celu uczynienie ich bardziej przejrzystymi,

1) Gliceryna

Preparaty zamknięte w glicerynie po pewnym czasie, ok.

2 - 3 dni są znacznie rozjaśnione. Gliceryna należy jednak do środków najslabiej rozjaśniających.

## 2) Woda JAVELLA

Podaję dwa przepisy na sporządzenie tego odczynnika.

- I. 20 g wapna chlorowanego mieszać z 100 cm<sup>3</sup> wody i dodawać 15% roztworu węglanu wapnia do chwili, kiedy przestanie tworzyć się osad. Przesączyć po pewnym czasie przez watę szklaną, przechowywać w ciemnej i szczelnej butelce.
- II. 20 g podchlorynu wapnia  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  rozpuszczamy w 100 ml wody, kolbę zamykamy i silnie wstrząsamy nią co kilka minut przez godzinę, po czym dolewamy roztwór 15 g węglanu potasu w 100 ml wody. Tworzy się galaretowaty osad węglanu wapnia, który po 3 godz. odsączamy przez bibułę. Przesącz zbieramy i przechowujemy w dobrze zamkniętej, ciemnej butelce.

Woda JAVELLA działa wybielająco dzięki wydzielaniu się wolnego chloru, który przy dłuższym działaniu niszczy tkankę roślinną. Działanie tego płynu polega na rozpuszczeniu plazmatycznych składników komórki. Czas działania na skrawki trwa od 15 do 30 minut.

Wody JAVELLA można używać również do maceracji delikatnych tkanek roślinnych, np. liści lub całych małych obiektów, np. okrzemek. Wówczas czas działania wynosi od 12 - 24 godzin.



### 3) Ług potasowy

Roztwór od 5 do 50% w wodzie destylowanej.

Skrawki zanurzamy w roztworze, bardzo ostrożnie podgrzewamy (przy podgrzewaniu łatwo pryska), następnie skrawki przenosimy do wody. Stężenie ługu jest zależne od zawartości balanej tkanki; im tkanka bardziej zdrewniała, tym silniejszego trzeba użyć stężenia. Ług potasowy używać można również do maceracji tkanki korkowej.

### 4) Wodzian chloranu

- a) słaby - dla delikatnych tkanek roślinnych;  
8 części wagowych rozpuścić w 5 częściach wagowych wody destylowanej,
- b) mocny - dla odpornych tkanek roślinnych;  
5 części wagowych rozpuścić w 2 częściach wagowych wody destylowanej.

Wodzian chloranu wnika w tkankę bardzo szybko. Skrawki zawierające dużo chlorofilu należy trzymać uprzednio w alkoholu etylowym aż do wyługowania barwnika. Czas działania nie ustalony - wypróbować należy dla każdego materiału.

### 5) Fenol

w różnych stężeniach.

Wnika szybko do tkanek i dobrze rozjaśnia. Skrawki przed zanurzeniem w fenolu muszą być odwodnione. Należy więc wysuszyć je lub odwodnić w alkoholu. Czas działania i stężenie wypróbować dla każdego materiału oddzielnie.

W każdym wypadku po rozjaśnieniu skrawków należy je dobrze przemyć w wodzie.

## Barwienie preparatów

W niniejszym rozdziale omówię tylko proste i łatwe sposoby barwienia preparatów. Sposoby trudne i skomplikowane, wymagające specjalnych, nieraz bardzo drogich odczynników, pomijam ze względu na to, że w warunkach szkolnych nie mają zastosowania.

Barwienie preparatów ma na celu uwidocznienie pewnych struktur, które w preparacie niebarwionym nie są widoczne lub są słabo widoczne. Przy barwieniu występuje również zróżnicowanie poszczególnych elementów komórkowych, względnie tkankowych.

### Barwienie przyżyciowe

Barwienie przyżyciowe ma na celu zabarwienie pewnych elementów żywej komórki lub tkanki, przy równoczesnym słabym uszkodzeniu struktur wewnątrzkomórkowych. Każdy barwnik, nawet w bardzo dużym rozcieńczeniu, zmienia w pewnym stopniu strukturę żywej plazmy. W związku z tym do wyników badań trzeba odnosić się z pewną dozą krytycyzmu.

Barwienie przyżyciowe metodami chemicznymi wymaga bardzo wielkiej wprawy i nie można podać dokładnych recept co do stężenia i czasu działania barwnika. Chcąc barwić tymi metodami należy wykonać szereg prób,

Często do badań przyżyciowych stosuje się roztwór błękitu metylenowego w rozcieńczeniu od 1:5000 do 1:100 000 lub czerwień obojętną w rozcieńczeniu od 1:500 do 1:5000.

W preparatach barwionych przyżyciowo możemy oglądać stadia podziałowe komórki in vivo. Dobrym obiektem do tego celu są włoski na pręcikach trzykrotki Tradescantia sp.

Odcinamy pylnik, a nitkę pręcikową umieszczamy na szkiełku podstawowym w barwniku. Czas barwienia trudno określić, najlepiej całe barwienie przeprowadzać pod mikroskopem, kontrolując jego przebieg. Niektóre komórki w tym samym preparacie barwią się znacznie szybciej, a inne wolniej. Z chwilą odzyskania stadiów podziałowych w komórce należy preparat przenieść do wody lub jeszcze lepiej do 1-2% roztworu cukru, gdzie przeprowadzamy dalszą obserwację.

Badania takie możemy przeprowadzać również na innym materiale. Dobrze jest wybierać taki materiał, który nie wymaga robienia skrawków, np. delikatne płatki z korony kwiatów.

### Barwienie obiektów martwych

#### Barwienie węglowodanów

#### Płyn LUGOLA

2 g jodku potasu rozpuszczamy w 100 ml wody destylowanej, dodajemy 1 g jodu.

Płynem LUGOLA wykrywamy obecność skrobi w badanym materiale. Skrobia barwi się na kolor fioletowoczarny. Jeżeli chcemy uzyskać mniej intensywne zabarwienie, rozcieńczamy płyn LUGOLA wodą destylowaną lub zwykłą w stosunku od 1:10 do 1:20.

Reakcja ta nadaje się do wykrywania skrobi w preparatach mikroskopowych i w materiale makroskopowym. Zabarwienie skrobi wywołane płynem LUGOLA po podgrzaniu znika, po oziębieniu powraca z powrotem,

Skrobię możemy wykrywać również tzw. wodą jodową, którą sporządzamy przez dodanie paru kropli jodyny do wody.

### Chlorek cynku z jodem

Podaję dwa sposoby sporządzenia tego odczynnika.

I. 20 g chlorku cynku i 6,5 jodku potasu rozpuszczamy w 10,5 ml wody destylowanej, dodajemy 1,3 g jodu. Odczynnik jest gotowy do użycia po rozpuszczeniu się jodu.

II. 5 g jodku potasu i 1 g jodu rozpuszczamy w 7 ml wody destylowanej, 30 g chlorku cynku rozpuszczamy w 7 ml wody destylowanej. Oba roztwory zlewamy i sączymy przez watę szklaną.

Odczynnik ten barwi błony celulozowe na kolor fioletowy, zdrewniałe na jasnożółty, a skorkowaciałe na brunatny. Zabarwienie nie jest trwałe i po pewnym czasie znika. Należy używać świeżo przyrządzonego odczynnika, gdyż z czasem łatwo się rozkłada i nie daje pożądaných rezultatów.

### Hematoksylina alunowa wg EHRICHA

2 g hematoksyliny rozpuszczamy w 100 ml alkoholu etylowego 96%, dodajemy 100 ml gliceryny i 100 ml wody destylowanej oraz 2 g alunu potasowego  $KAl(SO_4)_2 \cdot 12 H_2O$ .

Odczynnik zlewamy do kolby, zatykamy watą. Po ok. 2 tygodniach, gdy roztwór nabierze barwy czerwono-fioletowej, zlewamy go do flaszki i korkujemy.

Do barwienia odczynnik rozcieńczamy 2-3-krotnie wodą destylowaną. Czas barwienia w zasadzie trwa 1-3 minut, lecz dobrze jest każdorazowo wypróbować, jak długo należy barwić dany materiał, gdyż różne obiekty różnie reagują.

Hematoksylina alunowa zabarwia błony celulozowe na kolor fioletowy, zdrewniałe pozostają bezbarwne lub przybierają kolor czerwonobrunatny. Może zdarzyć się, że cały preparat zabarwi się na fioletowo. Oznacza to, że albo był za długo barwiony, albo barwnik posiada za duże stężenie. Barwienie należy przeprowadzać na szkiełku zegarkowym, po barwieniu przepłukać preparat w wodzie wodociągowej. Przed barwieniem skrawki rozjaśnić, najlepiej w wodzie JAVELLA.

### Barwienie drzewnika - ligniny

#### Floroglucyna z kwasem solnym

- a) 1-5% roztwór floroglucyny w alkoholu lub wodzie
- b) stężony kwas solny HCl

Na szkiełko zegarkowe dajemy pipetką parę kropli floroglucyny, a następnie parę kropli stężonego kwasu solnego. W płynie zanurzamy gotowe skrawki i po stwierdzeniu zabarwienia (widoczne gołym okiem, jeżeli szkiełko postawimy na białym tle), robimy preparat wodny lub glicerynowy. Floroglucyna z kwasem solnym barwi drzewnik na kolor intensywnie czerwony, błony celulozowe nie ulegają zabarwieniu. Zabarwienie nie jest trwałe.

### Barwienie podwójne karminem alunowym i zielenią jodową

#### A. Karmin alunowy

5 g alunu potasowego  $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$  rozpuszczamy w 100 ml wody destylowanej, dodajemy 0,5 g karminu i gotujemy na słabym ogniu przez 10 minut. Po ostudzeniu sączymy przez bibułę filtracyjną, dodajemy kryształek tymolu lub 0,1 g kwasu salicylowe-

go. Jeżeli po pewnym czasie utworzy się osad, należy przed użyciem ponownie odczynnik przesączyć przez bibułę filtracyjną.

### B. Zieleń jodowa

0,5 g zieleni jodowej rozpuszczamy w 100 ml wody destylowanej i sącymy przez bibułę filtracyjną.

Oba odczynniki trzymamy w oddzielnych flaszkiach.

Skrawki, rozjaśnione w wodzie JAVELLA, barwimy przez 10-20 minut w karminie alunowym na szkiełku zegarkowym lub wprost na szkiełku podstawowym, płuczemy wodą i dajemy na jedną minutę do zieleni jodowej. Na końcu płuczemy kilkakrotnie w wodzie destylowanej.

Błony komórkowe z celulozy zabarwiają się na kolor czerwony, zdrewniałe na kolor zielony. Należy uważać, ażeby nie przebarwić zielenią jodową, gdyż wówczas i błony celulozowe zabarwiają się na zielono. W wypadku gdy próba wykaże przebarwienie zielenią, należy skrócić czas barwienia lub działać bardziej rozcieńczonym barwnikiem. Zabarczenie preparatów jest trwałe.

### Preparaty świeże

Preparaty świeże nadają się właściwie do natychmiastowego użycia po sporządzeniu.

Kropla zwykła. Na szkiełko podstawowe dajemy pipetką włosowatą kropelkę wody lub innego płynu. Szkiełko podstawowe powinno być czysto wyczyszczone, lecz nie należy go myć w alkoholu lub innym odczynniku, który rozpuszcza tłu-

szcze, Szkiełka zawsze czyścimy suchą, spraną szmatką bawełnianą. Następnie zanurzamy w kropli skrawek i przykrywamy szkiełkiem nakrywkowym. Przykrywając szkiełkiem nakrywkowym, należy uważać, aby wraz ze skrawkiem nie zamknąć w preparacie powietrza, które utrudnia obserwacje. W tym celu brzeg szkiełka nakrywkowego należy przysunąć do brzegu kropli i powoli, podtrzymując drugi brzeg szkiełka igielką preparacyjną, kłaść szkiełko na kropelkę wody. Przestrzeń pod szkiełkiem powinna być całkowicie wypełniona płynem, nadmiar wody zbieramy za pomocą skrawka bibuły filtracyjnej. Jeżeli natomiast wody jest za mało pod szkiełkiem nakrywkowym, to znaczy nie wypełnia całkowicie przestrzeni pod szkiełkiem, dodajemy ją pipetą włosowatą. Wodę należy dodawać pod brzeg szkiełka nakrywkowego w to miejsce, w którym ona dochodzi do brzegu.

Preparaty mikroskopowe wykonane w ten sposób nadają się do szybkiej obserwacji. Czas badania nie może przekraczać ok. jednej godziny, gdyż woda z preparatu wysycha. W preparatach tego typu oglądać można w zasadzie wszystkie obiekty: żywe i martwe, w całości i przekroje różnych organów roślinnych.

Chcąc mieć preparat bardziej trwały, można zamknąć skrawek w czystej glicerynie, a nie w wodzie. W tym wypadku preparat możemy przechowywać przez kilka dni i nie wysycha.

### Kropla wisząca

Preparaty tego typu nadają się specjalnie do oglądania małych, ruchliwych obiektów lub do przeprowadzania krótkotrwałych hodowli, np. kiełkowania ziarn pyłku i zarodników.

Preparaty w kropli wiszącej sporządzamy w następujący sposób: Na szkiełko nakrywkowe dajemy kroplę wody z badanym materiałem. Następnie nakrywamy szkiełkiem podstawowym z wgłębieniem. Brzeg wgłębienia na szkiełku podstawowym pokrywamy wazeliną. Zapobiega to wysychaniu preparatu. Należy uważać, ażeby kropla znajdująca się na szkiełku nakrywkowym nie zetknęła się z brzegiem wgłębienia szkiełka podstawowego. Szkiełko podstawowe przyciskamy lekko do szkiełka nakrywkowego, tak aby wazelina zlepiła oba szkiełka. Preparat obracamy szybko o  $180^{\circ}$ , wówczas szkiełko nakrywkowe znajduje się na górze. Preparaty zrobione tym sposobem możemy trzymać kilka dni, gdyż woda nie wysycha i nie zmienia się stężenie w kropli.

Kielkowanie ziarn pyłku należy przeprowadzać w roztworze cukru trzcinowego (sacharozy) o stężeniu od 0,2 do 0,5 mola.

W braku szkiełka podstawowego z wgłębieniem możemy go zastąpić tzw. mostkiem szklanym. W tym celu jedno zwykłe szkiełko podstawowe przecinamy na trzy części, dwie jednakowe, a jedną mniejszą, nieco mniejszą niż szkiełko nakrywkowe, którymi dysponujemy. Dwie większe części przyklepamy na brzegu do całego szkiełka podstawowego balsamem kanadyjskim lub innym lepiszczem, środek szkiełka zostawiamy wolny. Dalej postępujemy, jak w wypadku szkiełka z wgłębieniem, z tym że musimy również uszczelnić wazeliną szparę powstałą między szkiełkiem nakrywkowym a podstawowym dolnym.



## Preparaty trwałe

Preparaty stałe robimy, chcąc mieć z roku na rok materiał dydaktyczny. Dobrze zrobiony preparat stały może służyć przez kilkanaście lat do celów dydaktycznych. Omówię znowu kilka sposobów robienia stałych preparatów, sposobów nie wymagających specjalnych urządzeń, ani aparatury.

### Preparaty zamykane w glicerynie

Najprostszym w wykonaniu preparatem stałym jest zamknięcie skrawka w glicerynie. Aby gliceryna nie wysychała, należy brzeg szkiełka nakrywkowego obramować jednym z kłów, których przepisy podaję poniżej. Preparaty zamykane w glicerynie mają tę zaletę, że małe obiekty w czasie obserwacji możemy obracać, lekko stukając igielką preparacyjną w szkiełko nakrywkowe.

### Żelatyna z gliceryną

- 7 g żelatyny białej
- 42 ml wody destylowanej
- 50 g gliceryny
- 0,5 g fenolu krystalicznego

Żelatynę moczymy w wodzie przez 2 godziny, dodajemy glicerynę i fenol. Mieszaninę ogrzewamy w łaźni wodnej przez 15 min. w temp. do  $60^{\circ}\text{C}$  (nie wyżej). Sączymy na gorąco przez watę szklaną lub rzadką bibułę do flaszki z szerokim otworem.

Zamykanie skrawków odbywa się następująco: Mały kawałek zastygłej żelatyny topimy w próbówce, najlepiej na

łaźni wodnej, w temp.  $60^{\circ}\text{C}$ . Pipetką dajemy na szkiełko podstawowe kropelkę roztopionej żelatyny, następnie wkładamy przygotowany skrawek, nakrywamy szybko szkiełkiem nakrywkowym, uważając, żeby nie zamknąć powietrza i lekko przyciskamy. Żelatyna powinna wypełnić całą przestrzeń pod szkiełkiem nakrywkowym. Następnie kładziemy preparat w pozycji poziomej aż do całkowitego zastygnięcia żelatyny. Nadmiar żelatyny, wychodzącej spod szkiełka, zeszkrobujemy żyletką.

Można również skrawek zamknąć w inny sposób. Malutki kawałek zastygłej żelatyny kładziemy bezpośrednio na środek szkiełka podstawowego, podgrzewamy delikatnie nad palnikiem spirytusowym, uważając, aby żelatyna nie zagotowała się, a tylko stopiła. Dalej postępujemy jak w metodzie pierwszej.

Preparaty zamknięte w żelatynie mogą być przechowywane wiele lat i nadają się dobrze do celów dydaktycznych. Sporządzanie preparatów tą metodą jest bardzo łatwe i nie wymaga odwadniania obiektów. Odwadnianie jest, jak wiadomo, dość kłopotliwe w pracowni szkolnej.

Aby preparat zamknięty w żelatynie z gliceryną był znacznie trwalszy, należy obramować brzeg szkiełka nakrywkowego substancją, która zapobiega wysychaniu i kurczeniu się żelatyny. W najprostszym wypadku można takie obramowanie wykonać z parafiny, jest ono jednak nietrwałe. Stosuje się również lakier bezbarwny "nitro". Środek ten kupuje się gotowy w płynie. Można obramowanie wykonać z kitów. Podaję dwa sposoby sporządzania tych substancji:

I. 115 g asfaltu

120 g oleju lnianego

280 g oleju terpentynowego

Zmieszać i lekko podgrzewać na łaźni wodnej, stale mieszając aż do chwili równomiernego połączenia się poszczególnych składników.

II. 2 g wosku pszczelego

7 g kalafonii

Zmieszać na ciepło w parownicy, preparaty zamykać substancją półpłynną (lekko podgrzaną).

### Balsam kanadyjski

Bardzo dobrym środkiem do zamykania preparatów mikroskopowych jest balsam kanadyjski. Chcąc zamknąć preparat w balsamie kanadyjskim, należy przeprowadzić następującą manipulację:

Skrawki odwadniamy w szeregu alkoholi. Odwadnianie musi być stopniowe, ażeby nie zmienić całkowicie struktury badanej tkanki. Należy wobec tego stosować szereg roztworów alkoholowych w wodzie destylowanej o wzrastającej mocy. Szereg taki składa się z alkoholi o mocy 15, 30, 50, 70, 85, 96, 100%.

Jeżeli odwadniany obiekt był utrwalany w utrwalaczu alkoholowym, wówczas zaczynamy go odwadniać od stężenia odpowiadającego stężeniu utrwalacza. Natomiast jeżeli preparat był barwiony barwnikami w roztworze wodnym, trzeba przeprowadzić go przez cały szereg alkoholi. Czas przebywania skrawka w alkoholu jest uzależniony od jego grubości. Skrawki z delikatnych tkanek trzymamy krócej (ok. 5-10 min) w każdym stężeniu, skrawki z tkanek o strukturze bardziej masywnej, np. z drewna, należy trzymać ok. 20 - 30 min. Kąpiel preparatów w alkoholu 400% powtarzamy dwukrotnie

(w dwóch naczynkach) celem całkowitego odwodnienia. Z alkoholu 100% przenosimy skrawek do mieszanki alkoholu 100% i ksylenu w stosunku 1 : 1, a następnie do ksylenu czystego. Można również przeprowadzić skrawki z alkoholu 100% do ksylenu z tym, że wówczas kąpiel w ksylenie powtarzamy dwukrotnie. Z ksylenu przenosimy skrawki do kropli balsamu kanadyjskiego na szkiełku podstawowym, przykrywamy szkiełkiem nakrywkowym, lekko naciskamy i preparat odstawiamy do zaschnięcia, które trwa dość długo, bo ok. 2 tygodnie.

Całą manipulację można przeprowadzić na szkiełkach zegarkowych z wyjątkiem alkoholu 100%, który należy trzymać w naczynku szczelnie zamkniętym, aby nie nabierał wody z powietrza. Do tego celu nadają się dobrze małe naczynka wagowe (ze szlifem).

Balsam kanadyjski rozpuszcza się w ksylenie, roztwór należy trzymać w ciemnej butelce, ale nie pod szlifem, dobrze jest wpuścić do flaszeczki z balsamem kanadyjskim małą kawałeczek marmuru, który zapobiega zakwaszeniu.

Balsamu nie wolno nigdy podgrzewać.

### Balsamy syntetyczne

Na rynku jest dużo różnego rodzaju syntetycznych środków do zamykania preparatów mikroskopowych. Mogą one być z powodzeniem używane w mikrotechnice botanicznej. Manipulacja przy zamykaniu preparatów z reguły jest podana przez firmy produkujące te odczynniki, a więc nie będę jej omawiał. Należy jednak zawsze wiedzieć, w jakim odczynniku dany środek syntetyczny jest rozpuszczalny, i przez ten właśnie środek należy przeprowadzić skrawki przed zamknięciem ich w danym balsamie syntetycznym,

LITERATURA

CZOŚNOWSKI J., ĆWICZENIA Z ANATOMII ROŚLIN. PWN, Warszawa 1951.

FILUTOWICZ A., KUŹDOWICZ A., MIKROTECHNIKA ROŚLINNA. Warszawa 1951.

GREB K., W SPRAWIE TRWAŁYCH PREPARATÓW MIKROSKOPOWYCH. Biologia w szkole r. XIII Nr 2 (68). 1960.

STRASSBURGER E., KORNICKE M., BOTANISCHES PRAKTIKUM, wyd. G. Fischer, Jena 1913.

STRASSBURGER E., KRÓTKI PRZEWODNIK DO ZAJĘĆ PRAKTYCZNYCH Z BOTANIKI MIKROSKOPOWEJ, wyd. M. Arcta, Warszawa 1924.