

1. Příprava trvalého preparátu s glycerol-želatinou

Glycerol-želatina je uzavírací medium vhodné pro školní práci, protože práce s ní je snadná a levná. Glycerol-želatina je vodou mísitelné médium. Její příprava je nenáročná a zhotovení preparátu rychlejší a snadnější než v případě kanadského balzámu. Preparát je ale třeba rámovat.

Do glycerol-želatiny uzavíráme drobný hmyz nebo části hmyzího těla, roztoče, drobné korýše. Máme-li objekty fixované ve formaldehydu (4%) je třeba je převést do roztoku glycerolu a vody (1:5 nebo 1:10), máme-li je fixované v 70% alkoholu, převedeme je do roztoku glycerolu a absolutního alkoholu (1:5 nebo 1:10). Preparáty rámuje du Noyerovým tmelem.

Materiál

- perloočky nebo buchanky fixované v 70% alkoholu
- podložní sklo a krycí sklíčko
- absolutní alkohol, destilovaná voda
- glycerol-želatina (příprava – viz níže)
- du Noyerův tmel (příprava – viz níže)
- kahan, síťka na kahan, vodní lázeň (kádinka s vodou)
- zkumavka (10 ml), skleněná tyčinka, pinzeta, žiletka

Postup zhotovení preparátu

Objekt (perloočku nebo buchanku) fixovaný v 70% alkoholu přeneseme do roztoku alkoholu a vody (v poměru 1:5), který máme kápnutý na podložním sklíčku. Alkohol pak necháme odpařit (buď při pokojové teplotě nebo v termostatu při 40°C). Zakápneme kapkou glycerol-želatiny. Přikryjeme krycím sklíčkem. Pokud se glycerol-želatina nerozlila pod celým krycím sklem, nahřejeme mírně celý preparát vysoko nad kahanem (nebo např. nad topením). Preparát necháme 3-4 dny tuhnout. Přebytečnou glycerol-želatinu oškrábeme žiletkou. Preparát pak zarámujeme du Noyerovým tmelem. Preparáty skladujeme ve vodorovné poloze, vydrží několik let.

Příprava glycerol-želatiny

7 g čisté želatiny, 40 ml destilované vody, 40 ml čistého glycerolu, 0,5 g krystalického fenolu. Fenol je pro desinfekci. Co nejčistší želatinu necháme asi 2 hodiny buřet v 40 ml destilované vody a pak ji rozpustíme za tepla ve vodní lázni. Jakmile je dokonale rozpuštěna, přidáme glycerol, dále fenol (rozežírání plasty), dobře promícháme a ještě horkou zfiltrujeme přes skleněnou vatu. Nalijeme do malých zkumavek (10 ml) a v případě potřeby glycerol-želatinu rozpustíme ve vodní lázni. Můžeme ji nechat ztuhnout v Petriho misce, rozkrájet na krychličky o hraně 5 mm a uchovat v širokohrdlé láhvi se zabroušenou zátkou a odebírat v případě potřeby.

Příprava du Noyerova tmelu

20 g bezvodého lanolinu (vosk z ovčí vlny) nebo včelího vosku, 80 g kalafuny – nejlépe drcené. Lanolin zahříváme v prázdné plechové konzervě (dobře vymyté, 500 ml) 20-30 minut na síťce nad kahanem (nebo na vařiči), aby se vypudily zbytky vody (přestane prskat). Za stálého zahřívání a mísení potom přidáváme kalafunu. Po vymíchání do hladka přeplníme do pracovních plechových nádobek (např. krabičky od krémů). Pozor, tmel tuhne velmi rychle.

2. Příprava trvalého preparátu s kanadským balzámem

Kanadský balzám je médium s vodou nemísitelné (na rozdíl od glycerolu nebo glycerol-želatiny). Rozpouští se v xylenu, benzenu, chloroformu a terpentýnu. Má vysoký index lomu ($n=1,535$), takže objekty dobře projasňuje. Hustý kanadský balzám se rozpouští nejčastěji čistým xylenem nebo benzenem. Přechovává se ve skleněných lahvičkách a přenáší skleněnou tyčinkou.

Suché objekty (jehlice hub, ptačí peří, křídla hmyzu, vlasy) můžeme dávat přímo do kapky kanadského balzámu. Objekty, které obsahují vodu (čerstvý hmyz a jeho orgány, drobní korýši, červy) je nutno odvodnit. K odvodnění se používá vzestupná alkoholová řada, kdy se objekty nechávají v alkoholu 70%, 96% a pak v absolutním alkoholu. V alkoholu se ponechávají různou dobu podle velikosti – drobné objekty (1-2 mm) 10-15 minut, větší (5-10mm) pak i několik hodin. K projasnění objektů je možno použít několik látek. Nejjednodušší je ale použití hřebíčkové silice, ve které se objekty podle velikosti několik minut ponechají.

Materiál

- drobní bezobratlí vodní živočichové (perloočky, buchanky, drobní červi), hmyz nebo parazité
- podložní sklo a krycí sklíčko, skleněná tyčinka, malé Petriho misky
- kanadský balzám (lze koupit u firem prodávajících laboratorní potřeby)
- hřebíčková silice (lze koupit v malých lahvičkách v květinářství nebo drogerii)
- alkohol 70%, 96%, absolutní alkohol, destilovaná voda
- pinzeta, preparační jehla

Postup přípravy

Objekt přeneseme z fixační směsi do 70% alkoholu. Ponecháme 10 minut, pak přeneseme do 96% alkoholu, ponecháme opět 10 minut a přeneseme (opět na 10 minut) do absolutního alkoholu. Pak objekt přeneseme na 10 minut do hřebíčkové silice. K tomuto účelu použijeme buď malé Petriho misky nebo k tomu dobře poslouží jakékoli malé nádoby, nejlépe skleněné. K přenosu používáme buď pinzetu (nejlépe entomologickou) nebo preparační jehlu.

Na podložní sklo kápeme skleněnou tyčinkou kapku kanadského balzámu, přeneseme do ní objekt a přiklopíme krycím sklíčkem. Přebytek kanadského balzámu můžeme setřít vatou namotanou na špejli a namočenou v xylenu nebo benzenu. Preparát sušíme ve vodorovné poloze buď při pokojové teplotě (tuhnutí trvá déle) nebo v termostatu při 30°C. Při okrajích tuhne kanadský balzám rychle, uvnitř preparátu však zůstává dlouho tekutý. Preparát není třeba rámovat. Je třeba ho skladovat ve vodorovné poloze. Vydrží desítky let.

3. Příprava suchého trvalého preparátu rámováním

Trvalý preparát upravený rámováním je buď preparát suchý – to znamená, že je objekt bez média – nebo preparát, kde je objekt v médiu – a to buď v glycerolu nebo v glycerol-želatině. Jiná běžně používaná dobře tuhnutí média nevyžadují rámování (např. kanadský balzám). Rámeček kolem krycího sklíčka se vytváří z du Noyerova tmelu. Dobře zhotovený preparát vydrží desítky let.

K rámování se používá tzv. rámovačka. Je to tříhranná lopatka (hrana musí být o kousek delší než je hrana krycího sklíčka) s vyříznutým středem, která je zhotovena z mosazného plechu a má dřevěnou násadku. Rámovat se může i vhodně upraveným drátem. Pokud se zhotovuje suchý trvalý preparát, je možno k rámování použít také např. lak na nehty, i když trvanlivost tohoto preparátu nebude dlouhá.

Materiál

- pro suchý preparát např. křídlo motýla, křídlo včely, peří, pyl
- du Noyerův tmel
- rámovačka
- papír pro otírání rámovačky, nejlépe filtrační
- podložní sklo a krycí sklíčko
- lihový nebo plynový kahan
- preparační jehla, žiletka, zápalky

Postup zhotovení suchého preparátu

Na podložní sklo umístíme objekt. Přikryjeme krycím sklíčkem. Rámovačku nahřejeme nad kahanem a ihned ponoříme do du Noyerova tmelu (dále jen tmel). Z rámovačky necháme stéci kapku do rohu krycího sklíčka tak, aby se přichytilo k podložnímu sklu, totéž uděláme v protilehlém rohu. Krycí sklíčko si mezitím přidržujeme preparační jehlou v druhé ruce.

Po zaschnutí těchto kapek (cca 2 minuty) můžeme pokračovat. Nahřejeme v plameni rámovačku, ponoříme do tmelu a přiložíme na podložní sklo těsně na hraně krycího skla, rovnoběžně s ním. Necháme tmel stéci a rámovačkou ho část do strany roztáhneme. Takto zarámujeme všechny strany krycího sklíčka. Šířka rámečku z tmelu by měla být asi 2 mm. Rámovačkou za tepla rámeček upravujeme. Preparát označíme a necháme několik dní zaschnout. Po zaschnutí rámeček upravíme žiletkou. Dobře připravený preparát vydrží mnoho let. Skladovat je ho možno ve svislé poloze.

Příprava du Noyerova tmelu

20 g bezvodého lanolinu (vosk z ovčí vlny) nebo včelího vosku, 80 g kalafuny – nejlépe drcené. Lanolin zahříváme v prázdné plechové konzervě (dobře vymyté, 500 ml) 20-30 minut na síťce nad kahanem (nebo na vařiči), aby se vypudily zbytky vody (přestane prskat). Za stálého zahřívání a mísení potom přidáváme kalafunu. Po vymíchání do hladka přeplníme do pracovních plechových nádobek (např. krabičky od krémů). Pozor, tmel tuhne velmi rychle.

Literatura (pro všechny tři přípravy):

Knoz J. a Opravilová V. (1992): Základy mikroskopické techniky. Skriptum MU v Brně, Brno, 195 s.,

Wolf J. (1954): Mikroskopická technika. SPN, Praha, 651 s.

Jírovec a kol. (1958): Zoologická technika. SPN, Praha, 314 s.