



## Protokol ke cvičení z Biologie vodních živočichů

---

Jméno :  
Obor, ročník :  
Datum :

---

### Úvod

Cílem tohoto cvičení je praktická ukázka fixace a preparace vodních bezobratlých živočichů (jak celkové tělesné stavby, tak některých funkčních a determinačních útvarů) s následným vytvořením trvalých preparátů a fotograficko-kresebnou dokumentací.

Většinu biologických objektů je nutno před mikroskopickým pozorováním usmrtit a často i chemicky upravit (fixovat) a vhodným způsobem obarvit. Fixace preparátů je nezbytný krok před samotnou tvorbou trvalého preparátu. Fixace znamená rychlé vysrážení (denaturaci) bílkovin protoplazmy buněk a tkání fixačními prostředky, které mají zabránit samovolnému rozkladu živé tkáně – autolýze (Knoz, Opravilová 1992). Kousek tkáně (tkáňový bloček), část orgánu nebo celého živočicha vložíme do fixační tekutiny. Při fixaci je nutné zachovávat tato pravidla (Knoz, Opravilová 1992, Habrová 1986):

- Fixujeme materiál co nejčerstvější
- Fixovaný objekt by neměl mít větší rozměry jak krychlička o hraně 1 cm; při fixaci větších orgánů je nutné fixační tekutinu injikovat
- Fixační tekutiny musí být dostatečné množství, nejméně 50x více, než je objem fixovaného objektu
- Fixační tekutina musí mít přístup k objektu ze všech stran

Fixační prostředky mohou být:

- fyzikální*
- chemické*

*Z fyzikálních fixačních prostředků je možné použít náhlé zahřátí objektu nebo jeho pozvolné vysychání.*

*Chemické fixační prostředky připravujeme jako roztoky jedné nebo více chemických sloučenin anorganického i organického původu; roztok se nazývá fixační tekutina nebo směs. Někdy je možno použít k fixaci i páry (4% formol, kyselina osmičelá). Chemické fixační prostředky musí splňovat tyto základní požadavky: rychle pronikat do objektů, zachovat co nejvíce strukturu objektu a zachovat jeho barvitelnost (Habrová 1986). Tato skupina chemických sloučenin je více používaná než fyzikální. Základními složkami bývají etanol, metanol, chloroform, formaldehyd, kyselina pikrová, kyselina octová a další (Vymětalová 2008).*

Dobře fixovaný biologický materiál je dále možno zpracovávat a uchovávat, např. tvorbou trvalých preparátů. Trvalé preparáty můžeme vytvářet jak z celých těl drobných vodních živočichů, tak z orgánů

a tělesných částí. Tyto se pak využívají při bližší determinaci na úroveň rodů a druhů. Drobné objekty, např. planktonní organismy, drobný hmyz, části živočišných orgánů apod. montujeme vcelku do nejrůznějších uzavíracích prostředí – médií. Větší objekty je zpravidla nejdříve potřeba uzavřít do rámečku ze skla nebo silikonu a vytvořit tak bloček, do kterého se objekt po zalití do média vejde. Pokud montujeme preparáty do médií, která se mohou dříve či později odpařit, pak je třeba preparát orámovat lakem nebo tmelem.

Uzavírací média dělíme na dvě skupiny:

- 1) *S vodou mísitelná*
- 2) *S vodou nemísitelná*

Ve cvičení budeme pracovat s dvěma médii a to Glycerol-želatinou (s vodou mísitelná) a Solakrylem (s vodou nemísitelná).

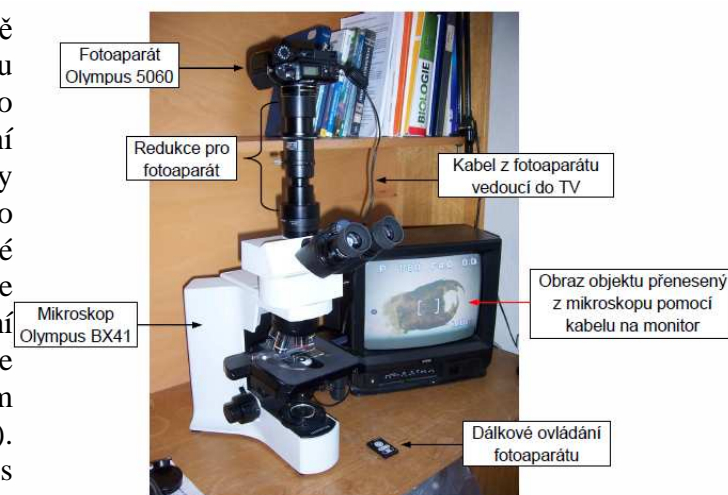
Glycerol-želatina – je univerzální uzavírací médium. Glycerol-želatinu rozehřejeme ve zkumavce ponořené do vodní lázně a pak skleněnou tyčinkou přenášíme na podložní sklíčko s objektem (práci usnadní umístění podložních sklíček na mírně nahřátou plochu – glycerol-želatina tak zůstane déle tekutá a máme čas objekt upravit). Po utužení přiklopíme krycím sklíčkem. Přebytečnou želatinu z podložního i krycího sklíčka odstraníme žiletkou, preparát očistíme 4% formolem a orámujeme *du Noyerovým tmelem*. Jemnější objekty nejprve převádíme do glycerol-vody (1 : 5, 1 : 10) nebo glycerol-alkoholu. Můžeme uzavírat i řezové preparáty.

Solakryl - je to syntetická pryskyřice, která tuhne rychleji než kanadský balzám a má neutrální reakci (kanadský balzám je slabě kyselý).

Při používání tohoto média je nutno, až na výjimky, objekty dokonale odvodnit alkoholovou řadou (70%, 96%, 100%) a xylenem. Objekty ponecháme v jednotlivých tekutinách podle velikosti různě dlouho: objekty o velikosti 1 – 2 mm: 10 – 15 minut; 5 – 10 mm: i několik hodin (Knoz, Opravilová 1992).

Po zhotovení preparátů je často nutné provést obrazovou dokumentaci (ať už kvůli inventarizaci sbírky, nebo pro případnou konzultaci s expertem na danou skupinu při determinaci). Dnes se obrazový záznam provádí takřka výhradně digitální mikrofotografií, ale pro některé specifické účely (např. popis nových druhů) je stále vhodnější odborná kresba.

Dnešní digitální fotoaparáty dosahují běžně rozlišení okolo 10 Mp a disponují většinou velmi slušnou optikou (např. objektivy Carl-Zeiss, Leica, Nikon). Pro účely mikrofotografie jsou vhodnější spíše profesionální kompaktní fotoaparáty než digitální zrcadlovky (jednoduchost obsluhy, příslušenství, velikost, cena). Pro mikrofotografii je pak také velmi užitečné širokouhlé ohnisko objektivu (dnes nabízené většinou 28 mm, ale někdy i 18 mm, ekv. 35 mm), které umožňuje zabránit širšího zorného pole (naopak méně vhodné jsou přístroje z kategorie tzv. ultrazoomů, u kterých bývá problém s montáží teleobjektivu do adaptérů na mikroskopech). Fotoaparát se montuje pomocí redukce na tubus mikroskopu (většinou je nutný trinokulární mikroskop s vhodným příslušenstvím, viz. Obr.1). Obraz je pak zaznamenáván buď na paměťovou kartu přístroje, nebo pomocí speciálního rozhraní přímo do počítače, kde může být dále upraven. Pro lepší výsledky je možné také využít široké nabídky dalšího příslušenství (filtry, clony, makrosvětla, atd.), které zlepšují výslednou obrazovou kvalitu. Asi nejčastější je použití kruhového osvětlení u binokulárních lup, které redukuje stíny a projasňuje objekt (Obr.3).



**Obr.1** : Trinokulární mikroskop Olympus BX 41 s připojeným digitálním fotoaparátem Olympus C-5060 WZ.

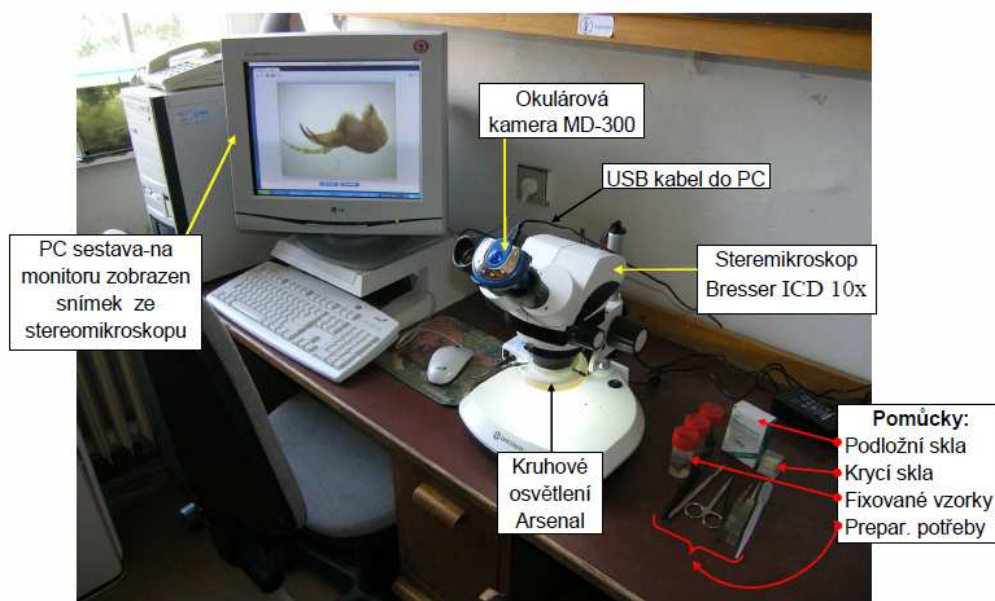
Druhou možností mikrofotografie je použití digitální nebo CCD okulárové kamery, která navíc umožňuje pořizovat i video záznam. Digitální kamery jsou dnes dostupné v 3-5 Mp rozlišení, a poskytují tak již relativně kvalitní záznam (lepších obrazových výsledků dosahují CCD kamery, které jsou ale také nesrovnatelně dražší). Levnější digitální okuláry fungují na principu webkamery a jejich použití je velmi snadné (Obr.2), zasunují se buď jako třetí okulár v trinokulárních, nebo místo jednoho okuláru v binokulárních přístrojích (Obr.3).



**Obr.2** : Digitální okulárová kamera Bresser MicrOcular 3.0 Mp.

Přenos obrazu do počítače je pak prováděn přes USB port a zpracováván v dodávaném softwaru, který (v případě lepších přístrojů) dokáže upravit výsledek například složením různých rovin ostření, odstraněním šumu, nebo i importem do 3D podoby. Nejnákladnějším zařízením pro mikrofotografii jsou speciální mikroskopické kamery, které jsou kalibrovány s mikroskopem, takže ovládání přístroje (ostření, intenzita osvětlení, apod.) je prováděno plně přes počítač. Tyto přístroje s velkým rozlišením také umožňují automaticky generovat série snímků buď panoramatických (pro příliš velké objekty) nebo snímků stejného objektu při různých rovinách ostření (toto je opět nastavováno přes počítač).

Odborná kresba je záležitostí značně individuální a do značné míry závisí na schopnostech, zkušenostech a pozorovacím talentu kreslíře. Jako pomůcky bývají občas používány speciální kreslicí ramena nebo šablony. Výsledná kresba může být následně naskenována a v digitální podobě upravena (změna pozadí, popisky, atd.). Zvláštní metodou na pomezí odborné kresby a fotografie je skeletizace fotografií v softwaru pro úpravu a analýzu obrazu (Photoshop, ImageJ, Gimp, apod.). Jedná se v podstatě o fotografii, která byla softwarově převedena na zjednodušenou kresbu s využitím detekce hran a kontrastů. V některých případech se tak dá dosáhnout zajímavých a kvalitních výsledků.



**Obr.3** : Binokulární stereolupa Bresser s nainstalovanou digitální okulárovou kamerou MicrOcular a kruhovým osvětlením Arsenal.

## Pomůcky a materiál

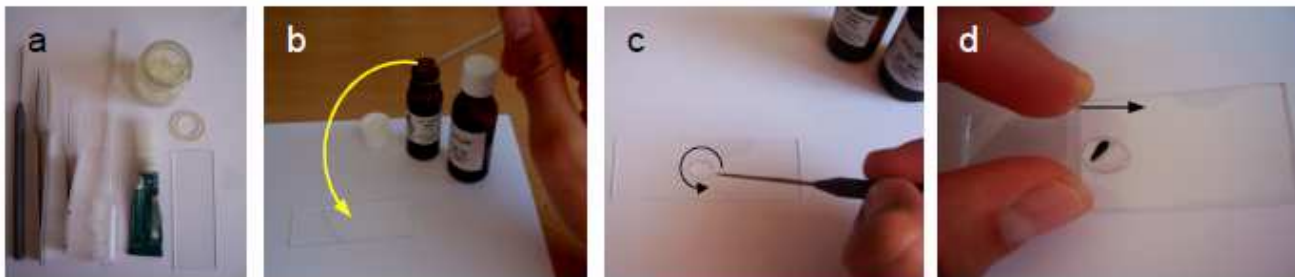
mikroskop a stereomikroskop (binokulární lupa), laboratorní topná deska nebo elektrický gril s regulací teploty a lávovým kamenem, standardní preparační potřeby (jehly, tvrdé i měkké pinzety, skalpel, pipeta, atd.), podložní a krycí skla, skleněná tyčinka, silikonové těsnící kroužky (stejného průměru jako kulatá krycí skla)

solakryl, xylen, glycerol-želatina, destilovaná voda, etanol, duNoyerův tmel nebo lak na nehty, vteřinové lepidlo

## Úkol č. 1: Příprava preparátů determinačně důležitých tělních částí vodních bezobratlých

### Postup

Nejprve opatrně odpreparujeme požadovanou tělní část živočicha s důležitými determinačními znaky (nejlépe masku vážky, případně končetinu některého druhu larvy vodního hmyzu). Dáváme pozor, aby se objekt při preparaci nepoškodil, preparaci provádíme pod stereomikroskopem. Objekt odvodníme vzestupnou alkoholovou řadou (70%, 96%) a xylenem (délka odvodňovací fáze je závislá na velikosti objektu). Na podložní sklo přeneseme skleněnou tyčinkou menší množství solakrylu (**b**), který rozředíme xylenem (**c**). Odvodněný objekt opatrně montujeme do média, upravíme preparační jehlou do požadované polohy a ze strany přiklopíme krycím sklem (**d**). Necháme ve vodorovné poloze preparát zaschnout (cca. 1 týden), poté můžeme preparát očistit (žiletkou nebo skalpelem odříznout přebytečné médium podél krycího sklíčka), případně zarámovat lakem na nehty (není nezbytné). Provedeme fotografickou a kresebnou dokumentaci.



Tvorba preparátu s použitím solakrylu. **a)** potřebné pomůcky; **b)** nanášení solakrylu skleněnou tyčinkou na podložní sklo; **c)** rozmíchání přidaného xylénu; **d)** uzavření vloženého objektu krycím sklem

### Výsledky

Výsledkem práce je vytvoření celkem 4 kvalitních a reprezentativních preparátů. Každý preparát bude podle pokynů vedoucího cvičení zdokumentován formou mikrofotografie a odborné kresby, zařazen do systému sbírky a dokumentace bude v digitální podobě uložena na záznamové médium.

Nákresy preparátů (každý preparát bude označen evidenčním číslem, popisem a použitým zvětšením)

### Závěr

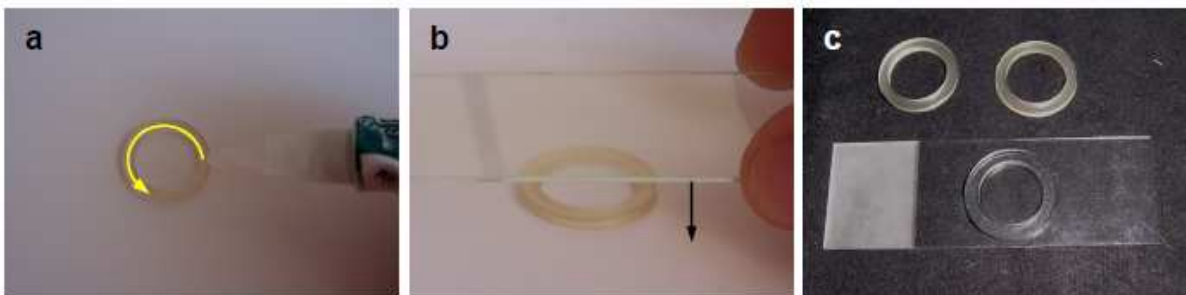
V závěru uveďte seznam a popis vytvořených preparátů a postřehy z práce ☺

## Úkol č. 2: Příprava celkových tělních preparátů vodních bezobratlých

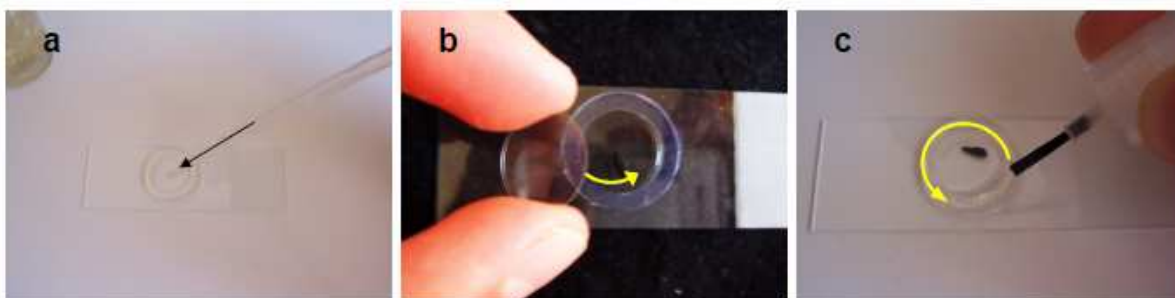
### Postup

Glycerol-želatinu opatrně rozehejeme ve vodní lázni nebo na topné desce na cca. 60°C (nesmí přejít varem!). Připravíme si odmaštěné podložní sklo, na které vteřinovým lepidlem přilepíme silikonový kroužek (**1a-c**). Po zaschnutí umístíme podložní sklo na jemně nahřátou topnou desku (můžeme umístit víc sklíček vedle sebe). Komůrku vytvořenou silikonovým kroužkem naplníme rozehřátou glycerol-želatinou (**2a**). Opatrně vložíme uzavíraný objekt a preparační jehlou ho upravíme do požadované polohy (pokud preparát vyrábíme bez topné desky musíme tuto fázi co nejvíce uspišit, jinak želatina po ochlazení ztuhne!). Doplníme komůrku až po okraj médiem a přiklopíme kulatým krycím sklem (**2b**). Po utužení želatiny (do druhého dne) rámuje krycí sklo i s kroužkem (**2c**). Provedeme fotografickou a kresebnou dokumentaci.

Pozn. Po delší době se v takto vytvořeném preparátu mohou smrštěním želatiny samovolně vytvořit bublinky, pokud máme ale stereomikroskop se standardní žárovkou (ne LED), pak stačí takovýto preparát chvíli ponechat na pozorovací ploše mikroskopu a teplo žárovky médium znovu zkapalní, pak stačí jen preparát nahnout a případné bublinky nahnutím „vypudit“ od objektu. Objekt pak můžeme ve znovu zkapalněném médiu pozorovat zcela čistý.



**1** Tvorba rámečku. **a)** nanášení vteřinového lepidla na silikonový kroužek; **b)** přitisknutí podložního skla ke straně kroužku s lepidlem; **c)** hotový rámeček



**2** Uzavření objektu do připraveného rámečku. **a)** nanesení média (GŽ) plastovou pipetou; **b)** přiklopení krycího skla; **c)** rámování preparátů průhledným lakem

### Výsledky

Výsledkem práce je vytvoření celkem 4 kvalitních a reprezentativních preparátů. Každý preparát bude podle pokynů vedoucího cvičení zdokumentován formou mikrofotografie a odborné kresby, zařazen do systému sbírky a dokumentace bude v digitální podobě uložena na záznamové médium.

Nákresy preparátů (každý preparát bude označen evidenčním číslem, popisem a použitým zvětšením)

### Závěr

V závěru uveďte seznam a popis vytvořených preparátů a postřehy z práce ☺