

# Zoologické preparáty pro výuku přírodovědy, přírodopisu a biologie

## 1. Tekutinové preparáty

**K napsání volného seriálu článků o biologických preparátech, který bude nepravděpodobně vycházet v letošním a následujícím ročníku Živy, nás vedl fakt, že se tento druh velice názorných učebních pomůcek postupně vytrácí z mnoha našich škol a je stále častěji nahrazován digitálními prezentacemi, které již nemají stejně názorný efekt. Význam tekutinových preparátů ve výuce zoologie na základních a středních školách napomáhá učitelům zachovávat didaktickou zásadu názornosti na biologickém, i když fixovaném materiálu. Učitelova demonstrace a zejména pak samostatná žákovská pozorování organismů a jejich orgánů v kapalinových preparátech umožňují zvyšovat motivaci žáků ke studiu. První díl věnujeme historii technik přípravy kapalinových preparátů a popisu renovace poškozených a zhotovování nových preparátů.**

Časy ucelených školních přírodovědných sbírek známe už jen z filmů pro pamětníky jako Škola základ života nebo Cesta do hlubin študákovy duše. Nejčastějším důvodem postupného chátrání a likvidace sbírek na nejedné základní škole nebo gymnáziu je nedostatek financí, stále přísnější legislativa a nedostatek učitelova času. Mnohé biologické preparáty však lze udržovat za minimální náklady tak, aby sloužily ještě dlouhá léta. Z pohledu řady učitelů i žáků jsou tyto učební pomůcky stále cenné a názorné i v kombinaci s výukou doprovázenou digitálními prezentacemi (Odcházelová 2013 nebo také Živa 2016, 6: CXLII).

### Preparáty konzervované v tekutině

Historie tekutinové konzervace ve světě sahá až do 5. stol. př. n. l., kdy se používal ocet, med, olej a další látky. Živočiškové se spolu s jiným biologickým materiálem začali uchovávat ve fixačních tekutinách na dlouhých výpravách, aby je bylo možné zajistit pro další vědecké zkoumání. Postupně se tekutinová konzervace uplatňovala i v dalších oblastech – ve zdravotnictví např. na ústavech anatomie a patologie pro demonstraci anatomických struktur nebo zajímavých případů onemocnění. Někteří preparátoři používali jako fixativum také rum. První zmínky o uchovávání v alkoholu anglickým vědcem a filozofem Rogerem Baconem jsou známy již od 13. stol. Běžně se začal etanol používat k fixaci od 17. stol., kdy ho zmiňují např. nizozemští vědci – biolog, průkopník mikroskopie Jan Swammerdam, anatom a botanik Frederik Ruysch nebo lékárník, zoolog a sběratel Albertus Seba. Hojně ho před více než 150 lety začali využívat v zoologických odděleních přírodovědeckých muzeí za účelem vystavování malých a středně velkých živočichů v expozicích.

Od druhé poloviny 19. stol. vznikaly firmy zabývající se výrobou přírodovědných preparátů, mezi nimiž držela prvenství firma Václava Friče z Prahy (bratra zoologa a paleontologa Antonína Friče). Od konce 19. stol. se objevovaly tekutinové preparáty v přírodopisných kabinetech základních a středních škol.

Průlomový vynález byl uskutečněn v r. 1858, kdy ruský chemik Alexander Butlerov poprvé syntetizoval formaldehyd (HCHO, metanal). Průmyslová výroba byla poté zahájena od r. 1868. Německý lékař Ferdinand Blum nově používal formaldehyd jako antiseptikum a následně i pro fixaci preparátů. Od 70. a 80. let minulého stol. až do současnosti slouží jako další alternativní fixativa např. paraformaldehyd (PFA, polyoxymetylen), glycerol (pro-



pan-1,2,3-triol), glutaraldehyd (pentan-1,5-dial), glykol (etylglykol, etan-1,2-diol), fenol, izopropanol (izopropylalkohol, propan-2-ol), izobutanol, dále také propylen fenoxetol (propylenglykolfenyléter) a v neposlední řadě etyl- nebo metylnanofluorobutan. Tato variabilita chemikálií souvisí s jejich vlastnostmi, např. kvalitou zachování barev nebo některých struktur preparátů, v moderní době i s možností extrakce vzorků pro genetické analýzy (k tomu se např. příliš nehodí formaldehydové preparáty).

V našich školních sbírkách se nejčastěji používal formaldehyd a etanol.

### Specifické metody vytváření různých druhů tekutinových preparátů

Jednotlivé druhy byly a jsou vyráběny dále představenými metodami. Ve fixačních tekutinách lze uchovávat prakticky veškeré drobné a středně velké živočichy. Tekutinové preparáty jsou vhodné také k zachování koster, barvených kostí, preparátů cévního řečiště, nervové soustavy apod. Pro lepší představu o jejich vzniku a kvůli možnosti případných oprav poškozených starých preparátů stručně přiblížíme příklady zhotovení jednotlivých typů preparátů a na webové stránce Živy pak uvádíme odkazy na publikované metodiky; uvědomujeme si však, že výroba zcela nových tekutinových preparátů do školních sbírek není v současných podmínkách snadná až reálná (viz dále).

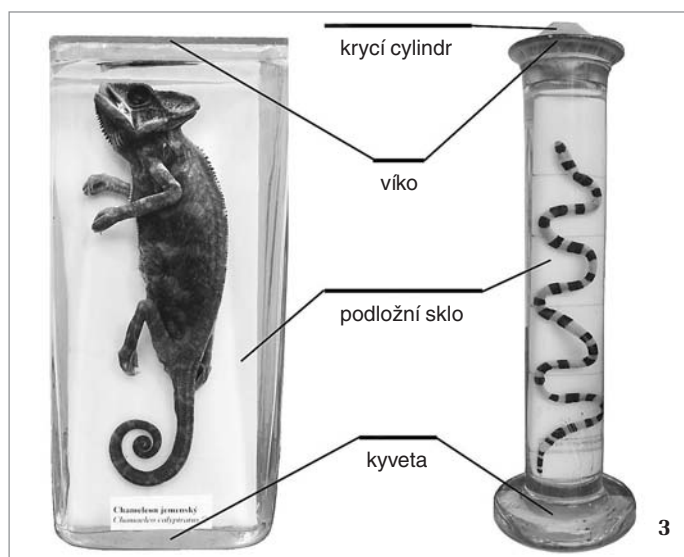
Kosterní tekutinové preparáty se vytvářejí např. macerací ve zředěném amoniaku, etanolu, peroxidem vodíku nebo enzymaticky a ukládají se v zestupnou alkoholovou řadou od 30% do 70–80% etanolu.

Chrupavky a kosti se barví pomocí alciánové modře a alizarinu. Průsvitné preparáty vznikají postupným projasněním v organických rozpouštědlech s vysokým indexem lomu světla.

Preparáty v přirozené barvě se připravují většinou postupným využitím tří roztoků. První roztok preparát fixuje a redukuje hemoglobin na methemoglobin pomocí octanu draselného, dusičnanu draselného, formaldehydu a vody. Po vložení do etanolu se mění methemoglobin na katabemoglobin, čímž obnoví přirozenou barvu. Trvalé uchování je v roztoku z vody, glycerolu a octanu draselného. Obnova původních barev objektu se provádí např. vodným roztokem formaldehydu, vody, hydrogensíranu sodného a kyseliny nikotinové.

Nástříkem cév pomocí propláchnutí s následnou injektáží barevných mas různého složení se zvýrazní cévní řečiště nebo duté prostory. K nástříkům se dříve používaly voskové směsi – vosk s kanadským balzámem, rumělkou a fermeží, šelakové – šelak s berlínskou modří, rumělkou či karmínem, nebo směsí želatinové s přísadkou barviva. V dnešní době existují průmyslově vyráběné latexy nebo pryskyřice, které se obarví a v případě potřeby je můžeme využít ke korozivní preparaci, tedy vytvoření odlitku cévního řečiště bez

**1** Tekutinové preparáty – nástřík cévního systému – sistema nervosum sysla obecného (*Spermophilus citellus*). Sbírkový Gymnázium Brno, Elgartova



okolních tkání. Mořští živočichové se mohou uchovávat v 70% etanolu nebo v cukerném roztoku s přísadkou formaldehydu a tymolu (izopropyl-m-kresol, 2-izopropyl-5-metylfenol; také Magnus 1913). Ukázkou některých z uvedených technik demonstrují obr. 1 a 2.

### Jednotlivé části tekutinového preparátu

Celý preparát se skládá z několika částí (obr. 3). Základ tvoří kyveta různého tvaru s víkem a podložní sklo, na kterém je připraven samotný preparát. Lité skleněné kyvety se dnes již prakticky nevyrobí, ale můžeme je nahradit vhodnými nádobami se zábrusovým nebo šroubovacím víkem, případně zhotovit z řezaného skla slepeného sklenářským silikonem. Hranaté kyvety mají víko rovné (přilepené transparentním silikonovým tmelem) na rozdíl od válcových, kde je víko se zábrusem většinou utěsněno (pouze na jeho horní ploše, ve spáře mezi ním a kyvetou) starým tmelem ze směsi sily, kalafunu, vosku, terpentýnu a sádla s krycím cylindrem z měchuřiny (vepřového močového měchýře) či jiného materiálu anebo celofánu.

### Složení roztoku

Různé druhy fixáže lze identifikovat podle charakteristického zápachu, lihoměrem, leuko-fuchsinovými indikačními papírky nebo digitálním hustoměrem. Pro příklad uvádíme hustotu 70% etanolu, která se pohybuje kolem  $0,859 \text{ g.cm}^{-3}$ , u 4% formaldehydu  $1,009 \text{ g.cm}^{-3}$  a 10% formaldehydu  $1,014 \text{ g.cm}^{-3}$ , což jsou hodnoty, které ukáže digitální hustoměr v případě těchto koncentrací běžně používaných roztoků. Ke stanovení pH slouží indikační papírky – nejčastější bývá pH 3, optimální je neutrální, které se upraví pomocí vhodného pufru. Při výběru fixativa pomůže ukládací pravidlo: čím více vody objekt obsahuje, tím je vhodnější formaldehyd, zatímco čím více vaziva, tím se lépe hodí etanol. Nevýhoda dlouhodobého uložení v etanolu spočívá v postupné degradaci lipidů, v případě formaldehydu se degraduje DNA.

### Opravy častých poškození

Nejběžnější poškození představuje bílé zakalení (vznik paraformaldehydu, a to zejména u starších kapalinových válců, protože v současné době se k formaldehydu

přidává metanol, který zabraňuje polymeraci formaldehydu na paraformaldehyd), částečné nebo úplné vyschnutí, odlepení popisného štítku a uvolnění preparátu od podložního skla (obr. 4). Zakalení formalinového roztoku je patrné na ilustrační fotografii preparátu mozku (obr. 5). Začíná se opatrným otevřením kyvety, vyjmutím preparátu a umytím kyvety. Otevření je provedeno odstraněním měchuřinového cylindru, odškrabáním tmelem a proudem teplého vzduchu z fónu na víko. Pokud ani přesto nejde víko otevřít, můžeme ho zkusit uvolnit opatrným poklepáním vrchem válce do dřevěné hrany vhodného předmětu. Víko a kyveta se nechají odmočit v teplém detergentu a poté se omyjí. Následuje odmočení preparátu, očištění a případná rehydratace ve vodě o teplotě  $35^\circ\text{C}$  s dekontaminačním přípravkem Decon 90, tj. 0,5–2% roztokem hydroxidu draselného, z důvodu odstranění případných mikrobu, plísní apod. V případě formolového roztoku se preparát nechá v jeho 4% koncentraci. Hranaté víko kyvety uzavřeme po odmaštění styčných ploch s nanesením silikonového tmelem, opatrným otřením přebyteků a zatížením víka. Po zaschnutí okraj víka oblepíme parafilmem nebo vhodnou černou páskou. V případě zabroušeného víka doporučujeme nanést na zábrus malé množství Ramsay tuku a následně utěsnit silikonovým tmelem mezeru mezi víkem a kyvetou. Kvalitní utěsnění kyvety zaručí, že nedojde k vysychání konzervačního roztoku.

### Optimální podmínky pro skladování preparátů

Vhodné uložení etanolových a formaldehydových preparátů ve sbírkách je v místnosti nebo ve skříni bez přístupu světla a ultrafialového záření při relativní vlhkosti vzduchu 50–65% a teplotě  $18\text{--}21^\circ\text{C}$ , se zamezením vibrací a zbytečného pohybu.

### Zhotovování nových kapalinových preparátů

Uvedený popis se týká přípravy nového preparátu drobného uhynulého terarijního živočicha nespádajícího pod úmluvu CITES (o mezinárodním obchodu s ohroženými druhy) a také kapalinových válců rozličných orgánů. Právě terarijní zvířata nebo uhynulí živočichové, kteří nejsou

2 Tekutinové preparáty – otevřená tělní dutina zeleného skokana.

Sbírky Gymnázia Brno, Elgartova

3 Části tekutinového preparátu v hranaté a válcové kyvetě. Foto J. Tauš

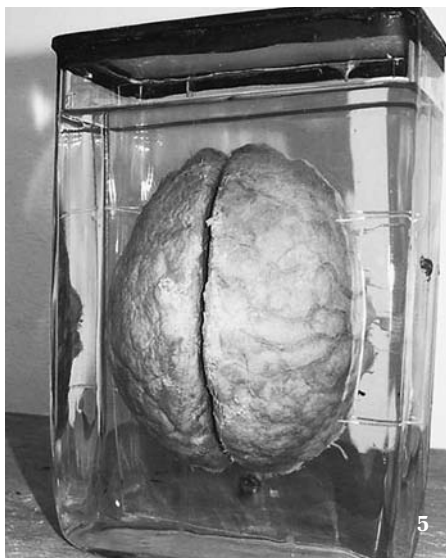
4 Nejčastější poškození – zakalení, vysychání, tvorba paraformaldehydu a odpadlý štítek

5 Zkazení formalinového preparátu lidského mozku

6 Kyvety s preparáty, doplněné přehledovými schématy ve sbírkách Ústavu anatomie, histologie a embryologie Veterinární a farmaceutické univerzity Brno. Snímky z archivu J. Frišhony, pokud není uvedeno jinak

zahrnutí do úmluvy CITES nebo mezi naše zvláště chráněné druhy, jsou pro nové kapalinové válce nejvhodnější. U druhů např. ze školních chovů nebo získaných od chovatelů se mrtvý jedinec fixuje dočasně (24–48 hodin) 4% formalinem (případně s nástřikem tělních dutin 10% formolem nebo 70% etanolem), a pak přes vzestupnou alkoholovou (etanolovou) řadu. Relativně nejjednodušší je příprava různých orgánů – např. prasečího nebo drůbežního srdce či ledviny, které se dají získat v řeznictví. Živočichy jako sépie, olivně, ústřice, slávky, krevety, humry apod. můžeme opatřit zmrazené. Zde lze jen doporučit zpracovávat je co nejčerstvější. Postup je stejný – fixace, odvodnění, zalití a uzavření.

Prvním krokem je výběr kyvety vhodných rozměrů nebo její výroba z řezaného skla podle velikosti živočicha. Následuje příprava, preparace a fixace biologického objektu (viz např. Mourek a Lišková 2010) a tvrzení preparátu 24 hodin v 10% roztoku formaldehydu (jeden díl 40% formaldehydu se třemi díly vody) v potřebné poloze, upevněného na vyhovujícím podložním skle pomocí vhodného šicího materiálu s nástřikem dutin koncentrovaným roztokem. Použití formaldehydu ve školních sbírkách však doporučujeme kvůli jeho toxicitě nahradit 70–80% etanolem ředěným destilovanou vodou. Ačkoli někteří autoři (Mourek a Lišková 2010) nedoporučují použití nejlevnějšího technického lihu, a to z důvodu silné macerace tkání, lze v nejvyšší nouzi použít i tento

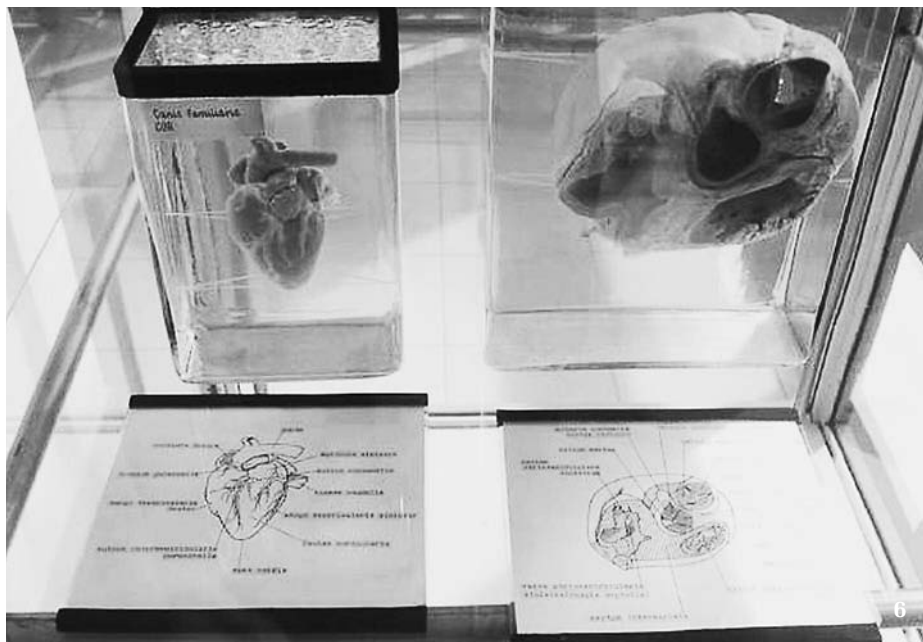


technický etanol, který je však třeba doplňovat. Proti vysychání etanolu uvedení autoři doporučují přidat malé množství glycerolu (1 díl glycerolu přibližně na 10 dílů 80% etanolu). Přidání glycerolu zajistí, že objekty zůstanou vláčné i po úplném odpaření etanolu a nepodléhají svrašštění. Alternativou k etanolu je propanol nebo izopropanol. Fixace znamená proces rychlé denaturace proteinů ve tkáních živočicha. Ideální fixativum musí být bezbarvé, baktericidní, netoxické, laciné, zachovávající přirozenou barvu preparátu. Preparát je také možné tvrdit 0,25–0,5% roztokem kyseliny chromové s následným řádným vypráním ve vodě.

Popisná cedulka se lepí na podložní sklo pomocí rozpuštěné želatiny, kterou je potřena z obou stran, a zafixuje se koncentrovaným formaldehydem. Případně se dá nalepit na vnější stranu kyvety. Na spodní hranu podložního skla lze upevnit kousek plastu proti případným otřesům. Preparát se na podložní sklo buď přivazuje prošitím jeho zadní strany se zauzlením na hraně skla, nebo vyvrtáním dvou otvorů v preparátu vedle sebe, přes které se uchytí také prošitím. Po 48 hodinách fixáže v 4% formaldehydu se vymění tekutina a trvale ho uložíme do 4% formalde-

hydu (jeden díl 40% formaldehydu s 9 díly vody) nebo vzestupnou etanolovou řadou do etanolu ředěného zásadně destilovanou vodou na 70–80%. Uzavření kyvety se provede postupem již zmíněným v odstavci nejčastějších oprav.

Vzhledem k finanční situaci v našich školách lze použít jakoukoli uzavíratelnou válcovou skleněnou nádobu a jako fixační tekutinu denaturovaný alkohol. Pokud má škola více finančních prostředků, pak doporučujeme dát výrobci skleněné kyvety na zakázku, případně nechat sklo nařezat ve sklenářství a s žáky je pak slepovat sklenářským silikonem. Jako nevhodnější se jeví použití 70–80% etanolu (vyšší koncentrace mohou způsobit degradaci preparátu), jak jsme již zmínili výše. K uzavírání je nejlepší víčko se zábrusem a překrytí měchuřinou, anebo mnohem dostupnějším celofánem. V nouzi nejvyšší můžeme zvolit šroubovací uzávěr, který lze opět překryt měchuřinou či celofánem. U zhotovených kyvet pak zavíráme skleněnou destičkou, případně ještě zalitou voskem. Asi nejtěžší je úprava orgánu anebo živočicha na sklo, zde postupujeme prošitím orgánu či živočicha a k pevnému uchycení využijeme boční zářezy, které na kraji skla vyřezáme pilníkem.



## Zdravotní rizika práce s konzervačními roztoky

V případě formaldehydu mohou zdravotní obtíže vznikat hlavně jeho vdechováním – dráždí oči, kůži a dýchací cesty. Akutní expozice malým dávkám vyvolává bolesti hlavy a zánět sliznic, při vyšší koncentraci látka dráždí sliznice a někdy vyvolává dýchací problémy. Chronická expozice formaldehydu může způsobit záněty průdušek, astma nebo záněty kůže (HPA 2008, Mourek a Lišková 2010). Je klasifikován jako karcinogen skupiny 1, tedy prokázaný karcinogen v případě vyšší koncentrace a pravidelné dlouhodobé expozice. Ve zvýšené míře se mohou vyskytovat nádory dutiny nosní a nosohltanu. Nebyla prokázána teratogenita ani reprodukční toxicita. Při krátkodobé občasných pracích (s výjimkou alergií apod.) by neměly vznikat zdravotní problémy.

Skladování 70% etanolu, podle nařízení EU č. 1272/2008 hořlavě kapaliny 2. kategorie, dříve látky vysoce hořlavé, není ve škole zakázáno, musí však splňovat náležitosti normy ČSN 65 0201. Podle §12 písm. a) nařízení vlády č. 32/2016 Sb. mohou mladiství žáci nakládat s uvedenými nebezpečnými chemickými látkami a směsmi pod přímým soustavným dozorem osoby odpovědné nebo s odbornou způsobilostí. Na běžnou manipulaci s již hotovými, ať historickými, nebo nově vyrobenými preparáty při demonstračních během výuky se nevztahují zvláštní pravidla.

Ochranné pomůcky při výrobě preparátů zahrnují oděv, rukavice, brýle/štíť, masku s filtrem skupiny A nebo digestoř s odtahem vzduchu či dobré větrání. Při manipulaci s preparáty během výukových demonstrací nejsou třeba ochranné pomůcky, pouze opatrná manipulace, aby nedošlo k poškození skleněné kyvety nebo válce.

## Využití ve výuce

Je třeba zdůraznit, že tekutinové preparáty zaujímají nezastupitelné místo v názorné výuce (Jančaříková 2017), stejně jako mají v mnoha případech zároveň nemalou historickou hodnotu. Ve sbírkách se často nacházejí historické preparáty chráněných nebo již vyhynulých živočichů. Pro názornější použití tekutinových preparátů při výuce lze připojit k vystavenému preparátu také jednoduché schéma (obr. 6).

Do dnešní doby se nepodařilo najít plnohodnotnou a adekvátní náhradu formaldehydu jako prvotního fixativa. V mnoha případech se dá po konzultaci s odborníkem použít etanol. Ve světě běžně uznávají postup fixace a tvrzení formaldehydem s následným trvalým uložením do 70% etanolu, který má ale nevýhodu z důvodu poměrně nízkého bodu vzplanutí.

S případnými konzultacemi se můžete obrátit na kurátory nebo preparátory muzeí, kde mají vlastní zoologické sbírky. Další možností je kontaktovat některý z anatomických ústavů lékařských fakult nebo makropreparační laboratoř Ústavu soudního lékařství LF Masarykovy univerzity a Fakultní nemocnice u svaté Anny v Brně.

Druhý díl zaměříme na dermoplastické preparáty, známé jako vycpaniny.

Použitá a doporučená literatura je uvedena na webové stránce Živý.