

Zastosowanie kwasu octowego i alkoholu benzyłowego w preparatyce parazytologicznej — zalety i wady

The application of acetic acid and benzyl alcohol in parasitological preparations — advantages and disadvantages

Leszek Rolbiecki

Katedra Zoologii Bezkręgowców, Uniwersytet Gdański, Al. Marszałka Piłsudskiego 46, 81-378 Gdynia; E-mail: lrolbiecki@ocean.univ.gda.pl

ABSTRACT. This work presents the application of acetic acid as a fixing and dehydrating agent and benzyl alcohol as the clearing medium for helminths of the Monogenea, Digenea, Cestoda, Nematoda and Acanthocephala, and mounting them in Canada balsam or other resins.

Key words: acetic acid, benzyl alcohol, clearing, dehydration, fixing, helminths, mounts.

Wstęp

W preparatyce helmintów stosowane są różne substancje chemiczne w celu ich utrwalenia, konserwowania, barwienia, odwadniania, prześwietlania i zatapiania w postaci preparatu półtrwałego lub trwałego. W przedstawionej pracy opisano procedurę wykonania preparatów trwałych z Monogenea, Digenea, Cestoda, Nematoda i Acanthocephala, zatapianych w balsamie kanadyjskim lub innej żywicy, przy zastosowaniu utrwalczy i substancji odwadniających opartych o kwas octowy oraz przy użyciu alkoholu benzyłowego jako medium do prześwietlania.

Opis procedury

Preparaty zatopione w balsamie kanadyjskim mają długą trwałość, wykonanie ich wymaga jednak szeregu procedur. Pierwszym etapem, zatrzymującym zachodzące w komórkach procesy fizjologiczne, jest utrwalenie obiektu,

dzięki czemu zachowana zostaje ich struktura. W klasycznej preparatyce stosuje się zazwyczaj tzw. proste (jednoskładnikowe) utrwalcze, głównie 60-75% roztwór etanolu (zimny lub gorący) i 4% roztwór formaldehydu (zimny lub gorący). Istnieją też utrwalcze złożone, tzn. oparte na działaniu kilku substancji. Szczególnie korzystnymi złożonymi utrwalczami helmintów są te, w skład których wchodzi lodowaty kwas octowy, który ułatwia szybkie przenikanie utrwalcza w głąb tkanek. Mogą to być, np. AFA (alcohol-formalin-glacial acetic acid) czy płyn Berlanda (od nazwiska Profesora Bjorna Berlanda, Katedra Biologii Uniwersytetu w Bergen, Norwegia, obecnie na emeryturze), stanowiący mieszaninę lodowatego kwasu octowego i formaliny w proporcji 19:1 [1–3]. Szczególnie skuteczny dla utrwalania „świeżych” helmintów jest płyn Berlanda, podczas gdy AFA (zawiera mniej lodowatego kwasu octowego) czasami lepiej nadaje się do materiału mrożonego. Przy stosowaniu płynu Berlanda do materiału mrożonego obserwuje się odpada-

nie kolców u przywr, a nawet haków u drobnych tasiemców. Często utrwalanie poprzedzane jest zabiciem obiektów w gorącej wodzie, w celu ich wyprostowania. Efekt rozluźnienia helmintów (głównie drobnych przywr i tasiemców) można też uzyskać umieszczając je w probówce z wodą do 1/3 wysokości, którą wstrząsa się przez 3–4 minuty (do momentu rozluźnienia się pasożyta). Następnie uzupełnia się próbkę 96% etanolem i znowu wstrząsa kilka razy; przy okazji obiekty ulegają także utrwaleniu [4]. Proces wytrząsania trzeba jednak wykonać bardzo ostrożnie, gdyż istnieje ryzyko przemieszczenia się narządów wewnętrznych. Niektóre utrwalacze (gorący alkohol i gorący 4% formaldehyd, płyn Berlanda) zastosowane do żywego materiału powodują z reguły jednocześnie jego wyprostowanie i rozluźnienie tkanek, w tym wycisowanie ryjka u kolcogłów. Pod wpływem płynu Berlanda wyprostowaniu ulegają nawet mrożone wcześniej nicienie. Czasami jednak, głównie w przypadku dużych tasiemców, warto pozostawić je w płynie fizjologicznym do chwili rozluźnienia tkanek (w lodówce może trwać to nawet kilka dni) i wtedy dopiero zastosować utrwalacz. Przykładowo plerocerkoidy *Schistocephalus solidus* (pospolite pasożyty ciernika), osiągające 7,6 cm długości przy maksymalnej szerokości 1,1 cm i grubości 0,8 mm [5], potraktowane na żywo gorącą formaliną lub mieszaniną lodowatego kwasu octowego i formaliny, mogą ulec skurczeniu nawet o 1/5 długości ciała. Pozostawianie dorosłych helmintów w płynie fizjologicznym czy wodzie wodociągowej powoduje, że zaczynają one znosić jaja, co może być istotne z punktu widzenia prowadzonego eksperymentu. Z kolei pewne nicienie, np. samice z rodzaju *Filometroides* należy niezwłocznie po wypreparowaniu umieścić w utrwalaczu, gdyż przetrzymywane w wodzie pękają. Czas utrwalania przy zastosowaniu płynu Berlanda uzależniony jest od budowy i wielkości poszczególnych pasożytów. Duże nicienie i kolcogłowy należy utrvalać kilka minut, duże płazińce do 2 minut, natomiast małe, w tym *Monogenea* i *Digenea*, a także drobne nicienie do 1 minuty.

Nie należy jednak przekraczać czasu utrwalania, zwłaszcza w wypadku drobnych pasożytów, ponieważ może dojść do ich zniszczenia. Dlatego bezpieczniejszym od lodowatego kwasu octowego jest obniżenie stężenia do 90%–80%, a czasami nawet do 50%. Poza tym można podwoić ilość formaliny, która zwiększa twardość oskórka utrwalanych obiektów. Ponieważ utrwalacz skutecznie przenika tkanki nie ma potrzeby przekłuwania kolcogłów, co często robi się w przypadku innych utrwalaczy. Płynu Berlanda nie powinno się stosować dla helmintów posiadających w parenchymie ciała wapienne (np. larwy *Diphyllobothrium*, metacerkarie) ponieważ reagują one z lodowatym kwasem octowym. Także Niewiadomska [6] podaje, że dla metacerkarii płyn Berlanda nie zawsze okazuje się skuteczny. Obiekty utrwalone w Płynie Berlanda konserwuje się następnie w 70–75% etanolu.

Kolejnym etapem jest barwienie obiektów w celu skonstrastowania ich struktur wewnętrznych. Z reguły barwienia wymagają *Digenea* i *Cestoda*, ale czasami warto też zastosować barwienie dla dużych okazów *Monogenea* (np. *Diplozoidae*) i *Acanthocephala*. Jako barwników używa się przede wszystkim różnych rodzajów karminu. Na przykład, dla dorosłych stadiów helmintów stosowane są głównie alunowe karminy Mayera i Gowensa [7–9], do larw przywr, w tym sporocyst, redi i cercarii — żelazowy karmin octowy Georgieva i wsp. [10, 11], a do metacerkarii — octowy karmin Schneidera (stosowany też jako utrwalacz) [4]. Z kolei karmin Blachina (karmin kwasomlekowy Ruchadze i Blachina) ma zastosowanie do świeżych, nieutrwalonych płazińców [11]. Kwaśny karmin boraksowy wybarwia głównie narządy wewnętrzne, a karmin kwasomlekowy — przewody helmintów [12, 13]. Zabarwiony obiekt wymaga różnicowania (wodą, zakwaszonym etanolem, czasami dodatkowo alkalicznym etanolem, kwasem mlekowym) czyli wypłukania nadmiaru barwnika; w efekcie uzyskujemy ciemnej zabarwione struktury/narządy wewnętrzne przy jaśniejszej parenchymie i strukturach zewnętrznych.

Po barwieniu obiekty wymagają odwodnienia. W tym celu najczęściej stosuje się szereg alkoholowy o wzrastającym stężeniu. Procedura ta jest jednak czasochłonna. Dobrą i znacznie szybszą metodą jest zastosowanie lodowatego kwasu octowego [9], w którym np. obiekt o długości 5 mm ulega odwodnieniu w ciągu 5 minut. Należy dodać, że obiekty (w tym przywry z kolcami, czy tasiemce z hakami) utrwalone w innym medium niż płyn Berlanda, np. etanolu, mogą także być odwadniane przy zastosowaniu lodowatego kwasu octowego — na tym etapie już nie odpadają kolce i haki. Jednak stosując lodowaty kwas octowy należy zachować szczególną ostrożność, gdyż jest on substancją żrącą i wywołuje poważne oparzenia. Warto zauważyć, że stosowanie lodowatego kwasu octowego nie powoduje odkształceń odwadnianych obiektów [9]. Obecnie przetestowano też skuteczność 90%, 80% i 50% kwasu octowego do odwadniania helmintów. Roztwór 90% okazał się równie dobrym jak lodowaty kwas octowy. Z kolei 80% roztwór odwadniał większość obiektów, jednak w wypadku dorosłych (posiadających jaja) tasiemców i kolcogłówów wymagał dwukrotnego zastosowania kwasu. Natomiast 50% kwas octowy okazał się wystarczający i skuteczny dla przywr.

Odwodnione obiekty prześwietla się najczęściej w ksylenie, benzenie, toluenie czy kreozocie. Można też zastosować, mniej toksyczny, alkohol benzylowy ($C_6H_5CH_2OH$). Warto dodać, że pasożyty prześwietlane w alkoholu benzylowym, wcześniej odwadniane w szeregu alkoholowym, nie wymagają stosowania alkoholu absolutnego, a często wystarczy nawet stężenie 96%. Jednak prześwietlonych okazów nie należy przetrzymywać w alkoholu benzylowym, ponieważ z czasem ulegają stwardnieniu i stają się kruche. Dlatego, jeśli nie przewiduje się zatopienia obiektu w balsamie kanadyjskim, należy go przemyć w 96% etanolu i przenieść do roztworu o stężeniu 70–75%.

Podsumowując, na jakość uzyskanego preparatu ma wpływ przynależność taksonomiczna, stadium rozwojowe, wielkość i jakość

obektu (materiał żywy, mrożony). W związku z tym preparatyka wymaga zazwyczaj indywidualnego podejścia, a co za tym idzie opracowywania i stosowania modyfikacji poszczególnych procedur.

Literatura

- [1] Berland B. 1982. Basic techniques involved in helminth preservation. Workshop: Technology as applied to museum parasite collections. ICOPA V, Toronto, Canada: 1-16.
- [2] Berland B. 1984. Basic techniques involved in helminth preservation. *Systematic Parasitology* 6: 242–245.
- [3] Rolbiecki L. 2002. Szybka metoda wykonywania semipermanentnych glicerożelatynowych preparatów z pasożytów. *Wiadomości Parazytologiczne* 48: 87–88.
- [4] Byhovskaâ-Pavlovskaâ I.E. 1985. Parazyty ryb. Rukovodstvo po izučeniu. Izdatel'stvo Nauka, Leningrad.
- [5] Bauer O.N. (Red.) 1987. Opredelitel' parazitov presnovodnyh ryb fauny SSSR. Tom 3. paraziticheskie mnogokletočne. Čast 2. Izdatel'stvo Nauka, Leningrad.
- [6] Niewiadomska K. 2003. Pasożyty ryb Polski. Klucze do oznaczania. Przywry — Digenea. Polskie Towarzystwo Parazytologiczne, Warszawa.
- [7] Pritchard M.H., Kruse G.O., 1982. The collection and preservation of animal parasites. Technical bulletin no. 1. University of Nebraska Press, Lincoln and London.
- [8] Rolbiecki L. 2003. Diversity of the parasite fauna of cyprinid (Cyprinidae) and percid (Percidae) fishes in the Vistula Lagoon, Poland. *Wiadomości Parazytologiczne* 49: 125–165.
- [9] Berland B. 2005. Whole mounts. Occasional publication, no. 1. Institute of Oceanography, Kustem.
- [10] Pokora Z., Szilman P. 1991. Zastosowanie karminów octowych do barwienia larw przywr digenetycznych in situ. *Wiadomości Parazytologiczne* 37: 235–240.
- [11] Lonc E., Złotorzycka J. 1994. Zajęcia praktyczne z parazytologii dla studentów biologii. Uniwersytet Wrocławski, Wrocław.
- [12] Pojmańska T. 1991. Pasożyty Polski. Klucze do oznaczania. Tasiemce — Cestoda. Instytut Parazytologii im. W. Stefańskiego PAN, Warszawa.
- [13] Pojmańska T., Cielecka D. 2001. Tasiemce (Cestoda) związane ze środowiskiem wodnym. Fauna Słownikowa Polski, z. 33. Uniwersytet Łódzki, Łódź.

Wpłynęło 10 lipca 2007

Zaakceptowano 16 lipca 2007