

PŘÍPRAVA PLEURAXU PRO TVORBU TRVALÝCH ROZSIVKOVÝCH PREPARÁTŮ

PREPARATION OF PLEURAX FOR MAKING PERMANENT DIATOM SLIDES

Karel Vojjř, Univerzita Karlova, Pedagogická fakulta, Katedra biologie
a environmentálních studií vojir.karel@gmail.com

Abstrakt

Frustules, typické schránky rozsivek, se vyznačují značnou variabilitu forem a struktur. Kvůli malým rozměrům nemohou být jejich charakteristické detaily pozorovány pod světelným mikroskopem bez média s vysokým lomením světla. V tomto příspěvku je popsána příprava pleuraxu. Tuto látku je možné díky vysokému indexu lomu světla využít jako uzavírací médium při tvorbě rozsivkových mikroskopických preparátů.

Abstract

Frustules – typical shells of diatoms – appear in considerable variability of forms and structures. Because of small dimensions, their characteristic details cannot be observed under an optical microscope without a high-refractive medium. In this paper, preparation of pleurax is described. Due to its high refractive index, this substance can be used as a mounting medium for diatom microscope slides preparation.

Klíčová slova

Rozsivky, pleurax, uzavírací médium s vysokým indexem lomu světla, trvalé mikroskopické preparáty

Key words

Diatoms, pleurax, high-refractive mounting medium, permanent microscope slides

ÚVOD

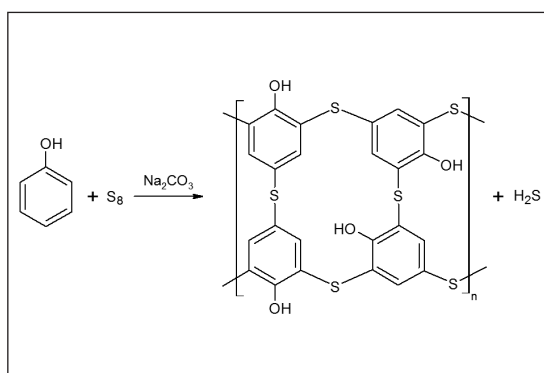
Rozsivky (*Diatomeae*, *Bacillariophyceae*) jsou jednobuněčné organismy řazené do skupiny Chromista. Tato velmi početná skupina je tvořena 285 rody s 10 až 12 tisíci druhy (Round, Crawford, & Mann, 1990). Jejich charakteristickým znakem jsou křemičité schránky (frustuly) se specifickou stavbou. Schránky jsou tvořeny dvěma částmi – větší epithekou a menší hypothekou. Svrchní a spodní plochy se označují valvy (epivalva a hypoalva), boční plochy se označují pleury (epipleura a hypoalva) (Braune, Leman, & Taubert, 2002).

Struktury na frustulách rozsivek jsou velmi jemné, což způsobuje značné problémy při jejich pozorování s využitím světelné mikroskopie. Vzhledem k malým rozměrům je k přípravě preparátů nezbytné využívat látek s vysokým indexem lomu světla, které zajistí dostatečný kontrast s hmotou schránek (B. Kříša & K. Prášil Eds., 1989). Takováto media jsou ovšem špatně dostupná a poměrně drahá. Možným řešením je příprava vlastního média, jakým je například pleurax. Tento článek si klade za cíl představit přípravu pleuraxu – polymeru s indexem lomu světla 1,73. Popisovaný postup vychází z návodu prezentovaného Rosenfeldtem (nedatováno). Níže uvedený postup je revidován a upraven na základě praktických zkušeností s přípravou polymeru a s ohledem na zvýšení bezpečnosti provedení syntézy. S přihlédnutím ke specifčnosti přípravy média v biologickém výzkumu, je snahou článku představit ji co nejpodrobněji, aby byla přístupná i zájemcům o studium rozsivek bez větších zkušeností se syntézami organické chemie.

Pleurax je látka připravovaná reakcí fenolu a síry za přítomnosti bezvodého uhličitanu sodného. Možné je i použití siřičitanu sodného (Kříša & Prášil Eds., 1989). Reakční mechanismus je zřejmě obdobný reakcím, které popsal Patel et al. (2008). Jedná se o elektrofilní aromatickou substituci iniciovanou depro-

tonací fenolu za vzniku rezonančně stabilizovaného fenolátového iontu. Ten reaguje se sírou na pozicích *ortho* či *para* za vzniku fenolpolysulfidického iontu. Následnou reakcí s další molekulou fenolu dochází k vytvoření polysulfidické vazby. Při této kondenzační reakci vzniká sulfan. V důsledku nestability vazby S–S se molekula rozpadá a kondenzační mechanismus se opakuje až do vytvoření monosulfidické vazby. Dalšími reakcemi se vytváří síťovitě propojený polymer.

V průběhu reakce se sulfan – vysoce toxický plyn s dráždivým a dusivým účinkem – uvolňuje ve velkém množství. Zároveň se odpařuje část fenolu. Celou přípravu je proto nezbytné provádět v dobře fungující digestoři.

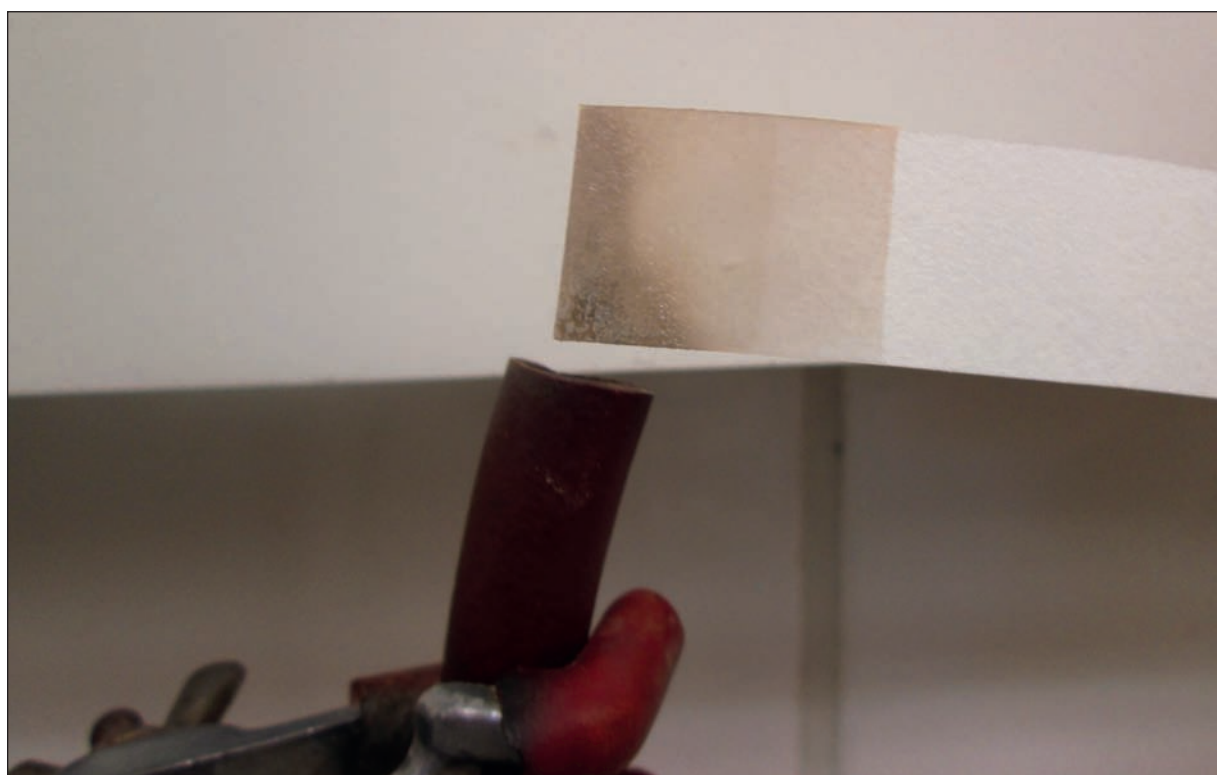


Obr. 1 Reakční schéma přípravy pleuraxu, zdroj: autor

PŘÍPRAVA PLEURAXU

Do varné baňky s kulatým dnem (500ml) se vloží 40 gramů práškové síry a 110 gramů fenolu. Tato za normálních podmínek bezbarvá krystalická látka je často dodávána v lahvích s úzkým hrdlem. Pro snadnější manipulaci je možné ho roztavit na teplé vodní lázni ($t_f = 40,5\text{ }^\circ\text{C}$). Fenol je toxický a silně žíravý. Při manipulaci je nezbytné dbát maximální opatrnosti a užívat ochranné pomůcky (rukavice, oděv, brýle či štít). V důsledku působení světla a vzduchu dochází při delším skladování fenolu k jeho oxidaci projevující se červeným až fialovým zbarvením. Mírné znečištění fenolu vzniklými příměsemi nebrání průběhu reakce.

Baňka se vnoří do olejové lázně v nemagnetické nádobě (např. hliníkové) a umístí se na míchačku. Teplota olejové lázně se měří teploměrem a za míchání se zahřívá na teplotu $150\text{ }^\circ\text{C}$. V průběhu zahřívání dojde k roztavení výchozích látek a vytvoření homogenní směsi. Přidá se na špičku špachtle bezvodého uhličitanu sodného a teplota se zvýší na $170\text{ }^\circ\text{C}$ tak, aby nebyla dosažena teplota varu fenolu, tj. $181,7\text{ }^\circ\text{C}$. Začátek reakce je možné rozpoznat uvolňováním sulfanu. Jelikož reakce běží poměrně pomalu, není vyvíjení sulfanu přímo zjevné. Ten je ale možné prokázat pomocí olovnatých důkazových papírků. Případně je možné použít proužek filtračního papíru namočený do koncentrovaného vodného roztoku octanu olovnatého. Vlhký papírek přiložený k hrdlu baňky působením sulfanu zčerná sulfidem olovnatým.



Obr. 2 Důkaz sulfanu, zdroj: autor

Vzhledem k toxicitě sulfanu je možné doporučit umístění nástavce s trubičkou na zábrus varné baňky. Na trubičku se nasadí hadička, kterou se odvede vznikající plyn k sacímu místu digestoře.

Reakci, jejíž průběh je poměrně zdlouhavý (i více než 10 hodin) je třeba průběžně sledovat a kontrolovat uvolňování sulfanu. Ukončení reakce lze ověřit rozpuštěním malého množství reakční směsi v přibližně 3 ml propan-2-olu. Vzorek se odebere čistou a suchou skleněnou tyčinkou. Pokud je vzniklý roztok žlutavě zakalený (přítomnost nereagované síry), je nezbytné ponechat směs dále reagovat. Přípravu je možné přerušit vypnutím zahřívání a pokračovat následující den. Reakce opět probíhá po zahřátí směsi za stálého míchání na teplotu 170 °C. Produktem je hnědá až tmavě hnědá pryskyřice.

Jiným možným provedením je zahřívání reakční směsi pod zpětným chladičem na topném hnízde. Reakční směs se udržuje při mírném varu, který zajistí promíchávání. Při tomto uspořádání ovšem vzhledem k poměrně dlouhému průběhu reakce dochází k nezanedbatelné spotřebě vody.

Po zreagování veškeré síry se odpaří nadbytek fenolu. Otevřená varná baňka s reakční směsí se umístí na topné hnízdo a směs se zahřeje k mírnému varu. Je důležité vyvarovat se nadýchání par fenolu. Směs se kontroluje nanesením malého množství na sklíčko. Pokud pryskyřice po zchlazení zcela ztvrdne, ukončí se zahřívání a za stálého míchání se přilije přibližně 60 ml propan-2-olu. Směs je třeba míchat až do úplného rozpuštění pleuraxu. Ten se rozpouští poměrně neochotně, proces může trvat i několik hodin. Rozpuštění je možno napomoci mírným zahříváním. V případě potřeby se přilije další propan-2-ol, aby vzniklá pryskyřice získala tekutost řídkého medu. Pokud dojde k přílišnému naředění média, přebytečné rozpouštědlo



Obr. 3 Schéma aparatury pro přípravu pleuraxu, zdroj: autor

se odpaří mírným zahříváním na keramické odpařovací misce. Naředěný pleurax má hnědou barvu. Tmavší zbarvení nijak nebrání pozorování preparátů. Připravené medium se přelije do zásobní lahve (nikoli zábrusové). Prskyřice intenzivně zapáchá po sulfanu. Zápach se ovšem časem vytrácí. Celá příprava trvá přibližně 5 dní.

Pleuraxem se do trvalých preparátů zalévají vypeparované schránky rozsivek. Ty je zapotřebí zbavit organické hmoty, například žíháním. Při volném schnutí, během kterého se z pleuraxu odpařuje

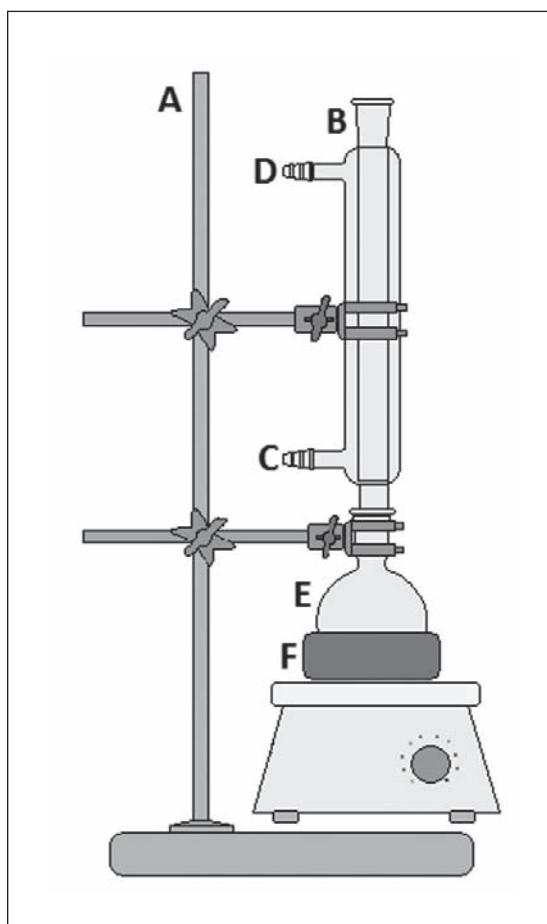
rozpouštědlo, trvá tvrdnutí připravených preparátů v řádu dnů. Tento proces je možné urychlit zahříváním sklíčka.

Obrázek 4: Schéma alternativní aparatury pro přípravu pleuraxu

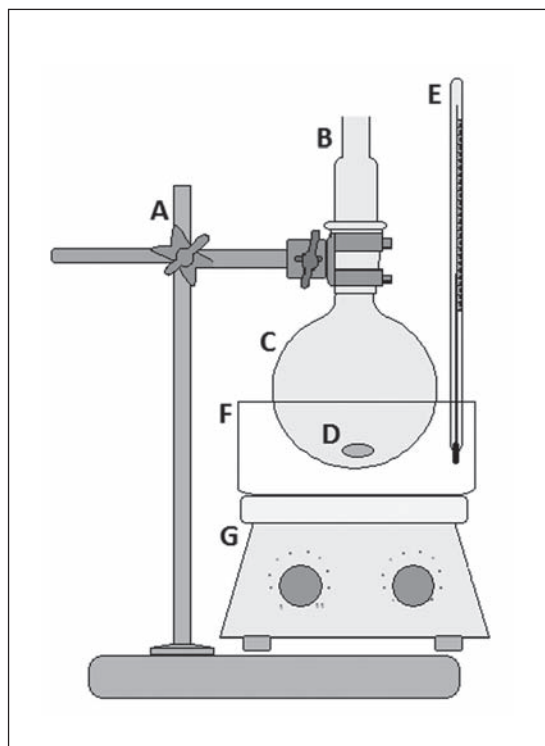
A – stojan, B – Liebigův chladič, C – přívod vody, D – odvod vody, E – varná baňka s kulatým dnem, F – topné hnízdo

Obrázek 5: Aparatura pro přípravu pleuraxu

A – stojan, B – nástavec s trubičkou s nasazenou odvodnou hadičkou, C – varná baňka s kulatým dnem, D – magnetické míchadlo, E – teploměr, F – olejová lázeň, G – magnetická míchačka s ohřevem



Obr. 4 Zdroj: autor



Obr. 5 Zdroj: autor

ZÁVĚR

Ačkoli jsou rozsivky velmi početnou a v přírodě hojnou skupinou, přípravě trvalých mikroskopických preparátů a jejich pozorování se povětšinou věnují pouze specializovaná pracoviště. Výše uvedený podrobný návod pro přípravu využitelného média byl sestaven na základě praktických laboratorních zkušeností a zachycuje plně funkční postup přípravy. Může tak sloužit jako prostředek, který zpřístupní studium rozsivek nespécializovaným biologickým pracovištím i učitelům biologie a jejich žákům.

Ti tak budou moci hlouběji porozumět stavbě schránky rozsivek a skrze přípravu trvalých preparátů se jim přiblíží další prvky laboratorní práce. Složení rozsivkových společenstev je zároveň jednou z významných charakteristik zkoumaných biotopů (B. Křísa & K. Prášil Eds., 1989).

S ohledem k nárokům na laboratorní vybavení je, v případě zájmu o užití pleuraxu ve výuce, možné jeho poskytnutí na Katedře biologie a environmentálních studií PedF UK; zájemci kontaktujte autora článku.

Zdroje

- BRAUNE, W., LEMAN, A., & TAUBERT, H. (2002). *Pflanzenanatomisches Praktikum II*. Berlin: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- KŘÍSA, B., & PRAŠIL, K. (Eds.). (1989). *Sběr preparace a konzervace rostlinného materiálu*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství.
- PATEL, M. H., PATEL, V. B., & SHRIVASTAV, P. S. (2008). *Genesis of thiacalixarenes: a one-pot highly efficient synthesis of TC4A*. *Tetrahedron Letters*, 49(19), 3087-3091.
- ROSENFELDT, G. (nedatováno). High-refractive mounting media (PLEURAX / NAPHRAX / ZRAX). Citováno 29. 12. 2016, z http://www.mikrohamburg.de/Tips/TE_Mountingmedia.html
- ROUND, F. E., CRAWFORD, R., & MANN, D. (1990). *Diatoms: Biology and Morphology of the Genera*. Cambridge: Cambridge University Press.