

MARIA PAUTSCH

## METODY MACERACJI UTWORÓW MEZO- I KENOFITYCZNYCH DO BADAŃ PYŁKOWYCH

Dobór odpowiedniej metody maceracji materiału jest czynnością wstępną w badaniach palinologicznych, ale niezmiernie ważną, ponieważ od metody przede wszystkim zależy ilość wydobytych ziarn pyłku, co w głównej mierze stanowi o powodzeniu lub niepowodzeniu analizy pyłkowej.

Jakość materiału jest bardzo rozmaita od węgla brunatnych, torfów poprzez łupki, wapienie, margle, ily, piaskowce aż do zupełnie sypkich piasków. Nic więc dziwnego, że różnorodność metod stosowanych w palinologii, mimo młodego wieku tej gałęzi nauki, jest bardzo wielka.

Pierwsze badania palinologiczne osadów pokarbońskich przeprowadzono na torfach i węglach brunatnych.

Najdawniej stosowaną metodą maceracji torfów jest metoda ługu potasowego wprowadzona do palinologii jeszcze przez L. von Posta (1933). Metoda ta polega na gotowaniu torfu w 10 proc. roztworze ługu potasowego. Materiał po ostudzeniu przepuszcza się przez sito o oczkach 0,2 mm i płucze w wodzie destylowanej dopóty, dopóki nie przestanie zabarwiać wody na brunatno. Po każdym przemyciu wodą wirujemy i zlewamy płyn. Uzyskany materiał miesza się z gliceryną i bada pod mikroskopem. Jest to metoda bardzo prosta i niekosztowna. Oprócz tego ług potasowy stosunkowo mało atakuje ziarna pyłku i spory, nie niszczy również i wszystkich innych szczątków organicznych, jak liście, łodygi mchów itp.

Drugą metodą maceracji torfów jest acetoliza podawana przez G. Erdtmana (1952). Przy tej metodzie zalewa się sproszkowany materiał w próbówce wirówkowej mieszaniną kwasu octowego, chloranu sodu i kwasu solnego w następującym stosunku: 4 cm<sup>3</sup> lodowatego kwasu octowego z paroma kropkami chloranu sodu dopełnia się stężonym kwasem solnym do 5 cm<sup>3</sup>. Po wymieszaniu materiału z powyższą cieczą odstawia się naczynie na minutę. Następnie materiał się wiruje, dekantuje płyn, przemywa materiał kolejno wodą destylowaną i kwasem octowym. Potem zalewa się materiał świeżo przyrządzoną mieszaniną bezwodnika kwasu octowego i stężonego kwasu siarkowego (9 części objętościowych bezwodnika kwasu octowego i 1 część objętościowa kwasu siarkowego). Kwas siarkowy należy wlewać ostrożnie do bezwodnika kwasu octowego, ponieważ następuje znaczne podniesienie temperatury. Probówkę wkłada się do łaźni wodnej i podgrzewa do wrzenia. Po wirowaniu dekantuje się płyn i przepłukuje osad wodą destylowaną,

wiruje powtórnie i zlewa wodą. Płukanie wodą powtarza się dopóki materiał wydziela woń kwasu octowego. Potem przepłukuje się go jeszcze raz mieszaniną gliceryny i wody destylowanej w równych częściach. Po wirowaniu mieszaninę się zlewa, a probówkę stawia się na bibule do góry dnem, by ściekły resztki płynu.

Acetoliza jest o tyle lepsza od metody ługu potasowego, że przy jej zastosowaniu rozkładają się prawie wszystkie inne szczątki organiczne oprócz spor i ziarn pyłku, co stwarza dobrą widzialność i umożliwia większą koncentrację pyłku na preparacie. Istnieją jednak zastrzeżenia przeciw tej metodzie, ponieważ przypuszcza się, że acetoliza uszkadza niekiedy ziarna pyłku. Oprócz tego jest to metoda w praktyce dość skomplikowana.

F. Thiergart (1940) opracował w odniesieniu do węgla brunatnych metodę kwasu azotowego i ługu potasowego. Jest to metoda stosunkowo prosta, za pomocą której rozkładamy również większość szczątków organicznych. Oprócz ziarn pyłku i spor pozostają nabłonek i drewno.

Suchy rozdrobniony węgiel brunatny zalewa się 60 proc. kwasem azotowym, który po upływie jednej doby rozcieńcza się do połowy. Materiał się odstawia. Po 24 godzinach rozcieńcza się kwas raz jeszcze do połowy wodą destylowaną i po zamieszaniu odstawia naczynie znów na dobę. Po tym czasie kwas się zlewa, a materiał przepłukuje wodą. Następnie zalewa się go 7 proc. ługiem potasowym i zagotowuje. Po ostudzeniu płucze się materiał wodą destylowaną aż do uzyskania w cieczy zawiesiny bez brunatnego zabarwienia.

Oprócz torfów i węgla, które pod względem ilości zawartego w materiale pyłku i łatwości jego wydobywania są wręcz idealnym materiałem palinologicznym, istnieją jeszcze inne, mniej wdzięczne, ale często ciekawe stratygraficznie; są to skały osadowe mórz i wód słodkich oraz osady lądowe. Ziarna pyłku występują w nich w znacznie mniejszej ilości, są uwięzione w lepiszczu skały, a często nawet ich wewnątrz zalega krzemionka. Aby je wydobyć, musimy rozpuścić lepiszcze jak również krzemionkę, która przedostała się do wnętrza ziarn pyłku.

Najprościej przedstawia się sprawa przy lepiszczu wapiennym. Do jego rozpuszczenia wystarcza zalać rozdrobniony materiał 10 proc. ługiem potasowym, zagotować, a następnie wypłukać wodą i zadać 10 proc. kwasem solnym (Bertsch 1942). Po rozłożeniu węglanów materiał przepłukuje się wodą destylowaną.

Znacznie trudniejsza jest sytuacja, gdy lepiszcze zawiera krzemionkę. Lepiszcze krzemionkowe można rozpuścić tylko za pomocą kwasu fluorowodorowego. Kwas ten ma różne nieprzyjemne właściwości. Rozpuszcza przede wszystkim naczynia szklane oraz koroduje szybko większość naczyń metalowych. Bertsch zaleca wobec tego posługiwanie się naczyniami platynowymi, ołowianymi lub szklanymi oblewanymi parafiną. Te ostatnie są naj-

dostępniejsze ale i najgorsze w użyciu. Trudno jest przede wszystkim uzyskać warstwę parafiny czy wosku, która by była odpowiednio gruba, nie zawierała pęcherzy powietrznych i przylegała wszędzie ściśle do ścian naczynia. Jeśli te warunki nie zostaną spełnione, kwas w ciągu bardzo krótkiego czasu rozpuści ścianę naczynia. Poza tym w naczyniach szklanych oblanych parafiną nie można ogrzewać kwasu fluorowodorowego i wobec tego nadaje się on do stosowania jedynie na zimno. Przy twardych skałach maceracja kwasem fluorowodorowym na zimno trwa kilka miesięcy. Przy tak długim okresie maceracji nietrudno również o uszkodzenie naczynia szklanego. W takim wypadku trzeba przelożyć materiał do nowego naczynia i powtórnie zalać kwasem lub też próbkę marnuje się i trzeba kilkumiesięczną macerację zacząć od nowa.

Naczynia platynowe byłyby najlepsze, ale uzyskanie odpowiedniej ilości odpowiednio dużych naczyń ( $1/2$  litra dla prób o małej zawartości pyłku) jest rzeczą wręcz niemożliwą. Z tymi trudnościami borykają się zresztą palinologowie na całym świecie. W 1953 r. amerykańscy uczeni na drugiej krajowej konferencji pyłkowej w Boston uzgodnili stosowanie metody kwasu fluorowodorowego w sposób następujący:

Za konieczne utensylia uznano digestorium, miedziane zlewki pojemności  $1/2$  l, palnik Buńsena, trójnóg i siatkę azbestową, szczypcę, gumowe rękawice, maskę ochronną, zlewki szklane (800 ml), wirówkę i próbki, kwas fluorowodorowy o stężeniu 52 proc.

Materiał ma być rozdrobniony na cząstki o średnicy  $1/8''$ . Następnie należy go zalać 52 proc. kwasem fluorowodorowym w takiej ilości, by pokrył materiał. Po zalaniu kwasem należy zamieszać materiał w miedzianej zlewce za pomocą szczyptic. Czynności tej należy dokonywać tylko pod digestorium. Konieczne są przy tej pracy rękawice i maska. Materiał pozostawia się na 8 do 12 godzin w kwasie fluorowodorowym. Po upływie tego czasu zagotowuje się materiał. Po ostudzeniu dopełnia się zlewkę wodą destylowaną i pozostawia, dopóki cząstki nie osiadą na dnie. Osad płukać i dekantować kilkakrotnie.

Przy próbach poczynionych w pracowni palinologicznej Głównego Laboratorium Przemysłu Naftowego naczynia miedziane okazały się zupełnie zdadne do użytku. Należy je tylko suszyć dokładnie po użyciu, by nie pokrywały się śniedzią. Obecnie używa się w naszej pracowni wyłącznie zlewek miedzianych. Są one zaopatrzone dopasowaną pokrywą i uszczelką gumową własnego pomysłu, by pary fluorowodoru nie wydostawały się na zewnątrz w czasie gotowania materiału. Ma to na celu ochronę zdrowia pracownika oraz ochronę digestorium i ścian wyciągu kominowego. Przy stosowaniu kwasu fluorowodorowego używamy masek oraz gumowych rękawic i fartuchów.

Macerację kwasem fluorowodorowym stosujemy również nieco odmiennie. Materiał zawierający węglany zadajemy najpierw kwasem solnym, który

następnie się wypłukuje. I dopiero wtedy zalewa się materiał kwasem fluorowodorowym. Ma to duże znaczenie oszczędnościowe, ponieważ kwas fluorowodorowy jest drogi. Materiał z kwasem fluorowodorowym zagotowujemy i odstawiamy na 24 godzin. Potem rozcieńczamy kwas wodą destylowaną dopełniając zlewkę do brzegu. Materiał się miesza. Po sedymentacji materiału płyn się dekantuje, a następnie przemywa osad aż do wykazania przez papierek lakmusowy reakcji neutralnej. Materiał o reakcji obojętnej przekładamy do zlewek szklanych, zalewamy kwasem solnym i zagotowujemy. Ma to na celu rozpuszczenie powstałych fluorokrzemianów, które następnie usuwamy wraz z nadmiarem kwasu przez płukanie wodą. Jest to konieczne, ponieważ fluorokrzemiany zmniejszają widoczność pod mikroskopem.

Skały osadowe nie obfitują w pyłek tak jak torfy czy węgle brunatne. Im mniej zawierają pyłku na jednostkę objętości, tym większą ilość materiału trzeba macerować, by uzyskać dostateczną ilość pyłku do badań.

Po zastosowaniu metody kwasu fluorowodorowego materiał organiczny uwalnia się wprawdzie z krzemionki, ale jeśli jest go stosunkowo niewiele, ukrywa się wśród pozostałych ziarn minerałów. Dla wyosobnienia i zarazem koncentracji materiału organicznego w takim wypadku stosuje się ciecz ciężką. I tak np. E. Hoffman (1948), po uprzedniej maceracji materiału metodą Thiergarta wydobyla za pomocą cieczy Thouleta ziarna pyłku *Rhizophora* (rośliny należącej do zespołu mangrove) ze skał osadowych fliszu austriackiego. Według autorki ciecz Thouleta należy tak sporządzić, by miała ciężar właściwy zbliżony do 2,22—2,23. Ziarna pyłku o mniejszym ciężarze właściwym wypływają na wierzch po zalaniu materiału cieczą ciężką. Górną partię cieczy zawierającą pyłki zlewa się lub ściąga pipetą i rozcieńcza wodą w probówce wirówkowej, tak by uzyskać ciężar właściwy cieczy zbliżony do 1,0. Wtedy pyłki opadają na dno.

Proces ten można przyspieszyć przez wirowanie. Probówkę z materiałem zalany cieczą ciężką wstrząsa się ponownie celem wydobycia dalszych ziarn pyłku. Górną warstwę znów się ściąga i rozcieńcza. Czynność tę trzeba powtórzyć około czterech razy.

Ciecz ciężka posiada tę zaletę, że umożliwia w sposób łatwy i szybki wydobycie oraz koncentrację ziarn pyłku, często bardzo nielicznych i rozproszonych w materiale. Ciecz Thouleta (jodek rtęciowo-potasowy) jest jednak silnie trująca.

Również bromoform jest szkodliwy dla zdrowia i nieprzyjemny w użyciu. Oprócz tego używa się jako rozpuszczalnika benzenu, alkoholu absolutnego lub acetonu, co pociąga za sobą konieczność dokładnego suszenia lub odwodnienia próbki przed użyciem bromoformu (W. L. Norem 1953) i jest kłopotliwe.

Najlepszą ze znanych mi cieczy ciężkich wydaje się ciecz, którą stosuje obecnie Griczuk (1952). Ciecz ta jest właściwie bezwonna i prawie nieszko-

dliwa, a w dodatku posiada tę zaletę, że jest rozpuszczalna w wodzie. 9 części wagowych jodku potasu i 10 części wagowych jodku kadmu rozpuszcza się w takiej ilości wody zakwaszonej jodowodorem, by powstał roztwór nasycony. Roztwór nasycony ma ciężar właściwy 2,70. Ponieważ materiał, z którego trzeba wydobyć pyłek, jest zawarty w roztworze wodnym, stwierdziłam, że najwygodniej jest stosować roztwór nasycony powyższej cieczy ciężkiej, zalewając dekantowany osad mniej więcej równą ilością cieczy. Po wymieszaniu cieczy z osadem płyn ma na ogół odpowiedni ciężar właściwy i materiał organiczny tworzy ciemno zabarwiony krążek wokół menisku. Jeżeli czasem w jakiejś próbce przy tej metodzie podpłyną oprócz materiału organicznego także części mineralne, to należy ciecz rozcieńczyć przez dodanie paru kropel wody destylowanej. Jeżeli zaś ciężar właściwy cieczy jest za mały i materiał organiczny nie wypływa na wierzch, trzeba dodawać nasyconego roztworu cieczy ciężkiej, dopóki nie utworzy się na powierzchni cieczy ciemna warstwa zawierająca materiał organiczny. Warstwę tę następnie ściąga się pipetą i wpuszcza do próbówki z dostateczną ilością wody, tak by ciężar właściwy otrzymanego płynu był zbliżony do 1,0 i materiał organiczny osiadł na dnie.

Nie zawsze jednak materiał tak wydobyty nadaje się do badań. Ponieważ w pracowni palinologicznej GLPN wykonujemy przeważnie analizę pyłkową skał osadowych zawierających krzemionkę, stosujemy metodę kwasu fluorowodorowego, w następstwie czego wydobywa się za pomocą cieczy ciężkiej cały materiał organiczny, nie tylko same ziarna pyłku czy spory jak po maceracji kwasem azotowym (Hoffman). Widać wtedy pod mikroskopem większe i mniejsze kawałki węgla oraz pojedyncze pyłki. W takim wypadku stosujemy dodatkowo metodę Thiergarta dla węgla brunatnych. Wówczas dopiero otrzymujemy czysty materiał pyłkowy do analizy.

Z powyższego wynika, ile skomplikowanych czynności trzeba wykonać i ile odczynników trzeba stosować, by spowodować uwolnienie pyłku z materiału skalnego. Jeżeli stosuje się macerację bieżąco na większą skalę, powstaje poważne zagrożenie szkodliwości stosowanych odczynników dla zdrowia pracownika.

Działanie związków fluoru omawia szczegółowo G. Bredemann (1951). Opisuje uszkodzenia budynków oraz zahamowanie wzrostu roślin pod wpływem oparów kwasu fluorowodorowego. U bydła odżywianego paszą pokrytą kurzem z zawartością fluoru stwierdzono poważne dolegliwości. Fluor działa również silnie na zdrowie człowieka. Autor zapoznaje nas z szeregiem faktów bardzo dla palinologów ważnych. Okazuje się bowiem, że kwas fluorowodorowy atakuje bardzo silnie górne drogi oddechowe, znacznie silniej nawet niż kwas solny.

Działanie oparów kwasu fluorowodorowego powoduje podrażnienie dróg oddechowych, kichanie, łzawienie, chrypkę, kaszel, krwawienie błon śluzowych, trudnogojące się wrzody dróg oddechowych, utratę węchu, podrażnienie

tchawicy i oskrzeli. Znane są z literatury wypadki śmiertelnych zatruc ro-  
botników zatrudnionych w fabrykach produkujących aluminium lub fluorki  
sodu. W jednym z opisanych wypadków wystąpiły trudności w oddychaniu,  
wymioty, a po kilku godzinach — cjanitis i śmierć. Przy sekcji stwierdzono  
rozedmę i przekrwienie płuc. W innym wypadku doszło do uszkodzenia  
ścian oskrzelików i do gangreny płuc. Zdarzały się również wypadki udu-  
szenia na skutek skurczu ścian gardzieli i oskrzeli.

Zetknięcie się skóry ze stężonym kwasem fluorowodorowym prowadzi  
do natychmiastowego oparzenia. Jony F<sup>-</sup> wchodzą przy tym na miejsce jon-  
ów Ca, co wywołuje coraz to głębszy ubytek tkanki. Bockemüller (1940)  
opisuje wypadek całkowitej nekrozy palca po 2-minutowym działaniu kwasu  
fluorowodorowego (80 proc.). Po 5 tygodniach pozostał z palca tylko  
szczętek kości. Skóra i mięśnie uległy rozpadowi.

Zatrucie fluorem przez przewód pokarmowy (Prissok 1945) idzie w czte-  
rech kierunkach:

1) następuje wytrącanie jonów wapnia, które prowadzi do odwapnienia  
kości i porażenia systemu nerwowego,

2) powstają zaburzenia w przemianie materii. Nie dochodzi mianowicie  
do utworzenia kwasu heksosomono- i difosforowego, co uniemożliwia wy-  
tworzenie kwasu mlekowego.

3) Fluor niweluje działanie cholinoesterazy. Następuje przesylenie tkanek  
acetylocholiną i podrażnienie systemu współczulnego.

4) Fluor działa na tarczycę.

Od roku 1918 do 1935 K. Roholm (1939) zanotował w Niemczech  
54 śmiertelne wypadki zatrucia związkami fluoru po przypadkowym spożyciu  
trutek na szczury, myszy czy karaluchy.

R. Gutzeit (1948) opisuje masowe zatrucie chlebem z mąki, która miała  
domieszkę trucizny na karaluchy zawierającą związki fluoru. Zależnie od  
ilości spożytego chleba występowały zawroty głowy, nudności, torsje, wymioty,  
palpitacje serca, uczucie zimna rąk i nóg, dreszcze, drgawki i ataki epileptyczne.  
Ataki powtarzały się do dziesiętnastu razy. Chorych uratowano dzięki na-  
tychmiastowej pomocy lekarskiej, pompowaniu żołądka itp.

Inaczej przedstawiają się skutki chronicznego zatrutowania się małymi daw-  
kami fluoru, jak to bywa np. w niektórych częściach Stanów Zjednoczonych,  
Afryki Północnej i Azji Mniejszej, gdzie woda studzienna zawiera domieszkę  
fluoru albo w fabrykach produkujących HF, NaF lub kriolit.

Przy stałym picciu wody zawierającej fluor, szczególnie w okresie wapnie-  
nia zębów tj. około 12 roku życia, występują zmiany w szkliwie zębów. Szkliwo  
mętnieje i robi się kredowo białe, potem ukazują się żółte plamy, które prze-  
chodzą w brązowe lub czarne. Przy silnym zatruciu zęby zaczynają się kruszyć.  
Fluor działa jednak zarazem niszcząco na drobnoustroje powodujące para-

dentozę, tak że stosowanie fluoru w małych ilościach, zewnętrznie, np. przez pędzlowanie dziąseł i szyjek korzeniowych, jest dla zębów korzystne.

Na paznokciach obserwuje się podobne zmiany jak na zębach. Najpierw występują białe plamy, a następnie paznokcie odpadają warstwami.

Peperkorn i Kähling (1944) studiowali zmiany chorobowe na robotnikach pracujących przy HF, NaF i kriolicie. Zanotowali zmiany reumatyczne, sztywność członków i ból w czasie szybszych ruchów oraz trudności w oddychaniu przy wysiłkach fizycznych. W kościach miednicy kręgosłupa, żeber, kończyn oraz dolnej części czaszki odkłada się fluor powodując grubienie kości, wyraźnie widoczne na zdjęciu rentgenologicznym, oraz przyrost wagi kości do trzykrotnego ciężaru pierwotnego włącznie. Według L. Spira (1942) może również wystąpić plamistość zębów, zaburzenia systemu trawienego i nerwowego, skłonność do schorzeń skóry i łamliwość paznokci.

Jeśli chodzi o działanie fluoru na tarczycę, to L. Goldenberg (1927) i E. Woakes (1881) uważają, że F działa antagonistycznie do J i na tej podstawie próbowali leczyć schorzenia tarczycy. Liczni inni uczeni udoskonalali metodę leczenia fluorem. Wyniki są jednak częściowo sprzeczne.

Widzimy więc, że stosowany w palinologii kwas fluorowodorowy jest bardzo silną trucizną. Nawet opary tego kwasu, które są w dodatku prawie bezwonne i wskutek tego nie ostrzegają przed groźącym niebezpieczeństwem, mogą powodować poważne schorzenia dróg oddechowych. Należy zatem bezwzględnie używać masek, gumowych rękawic i fartuchów oraz manipulować z kwasem fluorowodorowym tylko pod digestorium z dobrym wyciągiem. Najbardziej celowe byłoby oczywiście digestorium miedziane, ponieważ przy zwykłym kwas fluorowodorowy uszkadza szybko szklane ściany. Działa również na zaprawę murarską i może uszkodzić wyciąg. Kafle, którymi wyłożone jest digestorium, też są silnie atakowane i niszczone.

Metoda kwasu fluorowodorowego, mimo swego ujemnego działania na zdrowie człowieka, jest w pracowni palinologicznej G. L. P. N. stale stosowana, ponieważ tylko ona daje wyniki przy skałach twardych. Początkowo stosowaliśmy kwas fluorowodorowy na zimno. Tym sposobem maceracja próbki trwała od 5—8 miesięcy. Po żmudnych próbach i doświadczeniach wypróbowaliśmy stosowanie metody kwasu fluorowodorowego na gorąco w naczyniach miedzianych i przy użyciu najdalej idących środków ostrożności. Czas maceracji próbki skrócono tym sposobem do około 5 dni. Ma to ogromne, znaczenie dla tempa prac badawczych, które jest szczególnie ważne przy ekspertyzach dla przemysłu naftowego.