

M. REYMANÓWNA i L. STUHLIK

PRÓBY STOSOWANIA POLIMERÓW W PRACOWNI PALEOBOTANICZNEJ

Istnieje w chwili obecnej szereg technik paleobotanicznych pozwalających wprowadzić na uzyskanie doskonałych preparatów, mających jednak tę wspólną wadę, że wymagają wielkiego nakładu pracy i czasu. Stosuje się np. zatapianie materiału w parafinie czy celloidynie celem przygotowania do krajania na mikrotomie, a także sporządzania trwałych preparatów za pomocą balsamu kanadyjskiego. Obydwa te sposoby wymagają przeprowadzenia badanego materiału przez alkohole różnoprocentowe celem odwodnienia, na co zużywa się dużo czasu i odczynników, a poza tym w pewnych przypadkach obie te metody zawodzą. Podobnie przedstawia się sprawa z konserwacją okazów paleobotanicznych przy pomocy parafiny lub szelaku, gdyż zabiegi te również wymagają poprzedniego odwodnienia.

Zagranicą osiągnięto dobre wyniki stosując tworzywa sztuczne do wykonywania preparatów i konserwacji materiałów z różnych dziedzin nauk przyrodniczych. Zagadnieniem tym zajmowało się i u nas szereg autorów, zachęconych do przeprowadzenia doświadczeń przez Instytut Syntezy Chemicznej w Gliwicach, który chętnie służył zainteresowanym bezpłatnymi próbkami polimerów oraz radami i literaturą fachową. Po kilku latach prób rezultaty osiągnięte w różnych ośrodkach naukowych były przedstawione w dniu 1. XII. 1956 na konferencji w Gliwicach, zorganizowanej pod hasłem «Tworzywa sztuczne w Medycynie i Biologii» przez Komitet Nauk Chemicznych PAN, Instytut Onkologii, Oddział w Gliwicach oraz Instytut Syntezy Chemicznej w Gliwicach.

W Instytucie Botaniki PAN w Krakowie zagadnieniem tym zajmowano się od 1954 roku, mając głównie na uwadze możliwości utrwalania świeżo wydobytych ze złożeń okazów paleobotanicznych.

Biorąc udział w wyżej wymienionej konferencji, zainteresowaliśmy się przede wszystkim metodami stosowania polimerów w technice histologicznej oraz do konserwacji materiałów muzealnych. Szczególnie interesujące wyniki badań z tego zakresu referowali prof. L. Komczyński i dr H. F. Nowak z Zakładu Anatomii Patologicznej Akademii Medycznej w Białymstoku.

W zakładzie tym, dzięki życzliwości obu wymienionych uczonych, odbyliśmy w lutym 1957 r. kilkudniowe praktykum w obchodzeniu się z polime-

rami z punktu widzenia ich zastosowania do prac paleobotanicznych. Doświadczenia nasze były później kontynuowane na szerszym materiale w Krakowie. Niektóre z uzyskanych wyników są — jak się nam wydaje — interesujące i zasługują na rozpowszechnienie w pracowniach naukowych.

Opisy metod

P(olikol) 42. (Polietylenoglikol)

W Pracowni Anatomii Patologicznej Akademii Medycznej w Białymstoku stosowano ten polimer z dużym powodzeniem do zatapiania fragmentów tkanek przeznaczonych do krajania na mikrotomie. Polietylenoglikol o ciężarze cząsteczkowym 1600 nosi w handlu nazwę «Polikol 42» (W dalszym ciągu artykułu będziemy używać skrótu P 42). Do naszych badań otrzymaliśmy potrzebną ilość tego polimeru z Instytutu Syntezy Chemicznej, Oddziału w Kędzierzynie. W stanie stałym jest on substancją barwy brązowej o konsystencji świeżego mydła, która dobrze się rozpuszcza w wodzie i w rozpuszczalnikach organicznych. W temperaturze około 40° P 42 przechodzi w stan płynny i zmienia barwę na jasnożółtą, opalizującą.

Zastosowanie P 42 do zatapiania szczątków roślinnych przeznaczonych do krajania na mikrotomie

Naczynko z polikolem umieszcza się w termostacie ogrzonym do około 60°C. W tej temperaturze P 42 rozpuszcza się i wtedy zanurza się w nim materiał przeznaczony do krajania, który zostaje stopniowo odwodniony, ponieważ użyty polimer P 42 jest substancją hydrofilną. Po upływie około 10 minut przenosi się badany materiał do drugiego naczynka z tym samym rozpuszczonym odczynnikiem, a po dalszych 15 minutach okazy wyjmuje się i umieszcza w foremce metalowej kształtu prostokątnego również z płynnym P 42. Po upływie godziny polimer ten twardnieje w kostkę gotową do krajania. Na mikrotomie uzyskujemy pojedyncze skrawki nie pozlepiane we wstążkę, jak to ma miejsce przy stosowaniu parafiny. Rzucamy je do zimnej wody, w której P 42 rozpuszcza się szybko, a pływające na jej powierzchni skrawki umieszczamy na szkiełku przemytym alkoholem.

W porównaniu z zatapianiem w parafinie praca przy pomocy P 42 przebiega znacznie szybciej i prościej, gdyż nie potrzeba całego zestawu odczynników, lecz tylko jednego, który może być ponownie użyty.

Próby z zatapianiem w P 42 materiałów twardych i kruchych, takich jak np. kopalne owocki rodzaju *Nyssa* nie powiodły się, natomiast doskonałe wyniki uzyskaliśmy z subfosylnymi szpilkami świerka.

Masa nitrocelulozowa «Nowakolina»

Produktem wyjściowym przy otrzymywaniu masy błonotwórczej zwanej nowakoliną jest nitroceluloza NC_2Z . Jest to biały, lekki proszek o konsystencji puszystej, rozpuszczalny w octanach amylu i etylu. Nowakolinę uzyskuje się przez rozpuszczenie nitrocelulozy w wymienionych octanach z dodatkiem toluenu i plastyfikatorów palatinolu C i oleju rącznikowego. Autorem recepty jest dr H. F. Nowak, który udzielił nam próbki tej substancji dla naszych celów.

Próby zastosowania nowakoliny w preparatyce paleobotanicznej**a) Zatapianie preparatów mikroskopowych**

Suchy skrawek materiału, np. mikrotomowy przekrój szpilki świerka, umieszcza się na szkiełku podstawowym, a następnie przy pomocy pręcika szklanego nakłada się kroplę nowakoliny, którą należy równomiernie rozprowadzić. Po pewnym czasie nowakolina zaczyna wysychać, a po upływie jednej godziny tworzy się sucha błonka okrywająca skrawek.

Ten sposób przyrządzania preparatów mikroskopowych nie wymaga użycia szkiełek nakrywkowych i ochronnych żywic, np. balsamu kanadyjskiego. Można je swobodnie oglądać pod imersją, gdyż olejek imersyjny nie uszkadza nowakoliny.

b) Badanie skórek z liści roślin współczesnych

Liść pokrywa się cienką warstwą nowakoliny, która po upływie jednej godziny tworzy delikatną błonkę na jego powierzchni. Błonkę z zachowaną dokładnie budową komórek ściąga się przy pomocy pensety na sucho lub po uprzednim namoczeniu w wodzie i ogląda pod mikroskopem. W podobny sposób uzyskał odciski komórek skórki A. G. Nathorst (1907), używając do tego celu błonki z kolloidum.

Odciski komórek skórki na błonce nowakolinowej dają się łatwo przechowywać, a okazy, z których zostały one sporządzone, nie ulegają zniszczeniu.

c) Utrwalanie preparatów mikroskopowych zatopionych w glicerynie żelatynowej

Lak asfaltowy, używany powszechnie do zabezpieczania preparatów mikroskopowych, można z powodzeniem zastąpić nowakoliną. Preparaty takie mają wygląd bardziej estetyczny, a poza tym są znacznie trwalsze, gdyż przyczepność nowakoliny do szkła jest większa niżeli laku asfaltowego.

d) Zastosowanie nowakoliny o większej zawartości palatinolu C

Gdy do nowakoliny dodamy około 2 g palatinolu C (na 100 g masy), otrzymamy masę błonotwórczą bardziej plastyczną, nadającą się doskonale do zabezpieczania preparatów zawierających pyłek zatopiony w płynnej glicerynie pod szkiełkiem nakrywkowym. Nowakolinę stosuje się wówczas

podobnie jak polioctan winylu, o którym będzie mowa dalej. Jediną jej wadą jest powstawanie w miejscu zetknięcia się nowakoliny z gliceryną delikatnej mleczej obwódki.

P(octoan) W(inylu)

Polimer octanu winylu, z którym przeprowadziliśmy doświadczenia jest białym proszkiem o konsystencji ziarnistej, rozpuszczalnym w octanie etylu i benzenie. Roztwór PW w postaci lepkiej, przezroczystej cieczy otrzymujemy przez jego rozpuszczenie w wyżej wymienionych rozpuszczalnikach zmieszanych w stosunku 1:1.

Stosowaliśmy go do zabezpieczania preparatów zawierających w glicerynie zarówno pyłek roślin współczesnych, jak i kopalny, przeznaczony do badań metodą analizy pyłkowej. Preparaty w ten sposób utrwalone mają jednakże nieraz wygląd nieestetyczny, gdyż w PW powstają łatwo liczne pęcherzyki. Można je częściowo lub całkowicie usunąć przez dodatkowe rozcieńczenie PW octanem etylu i przyspieszenie wysychania błony przez lekkie podgrzanie (nie nad otwartym płomieniem). Preparaty mikroskopowe przeznaczone do utrwalania PW nie mogą być mokre, a gliceryna nie powinna sięgać poza szkiełko nakrywkowe. Z tego względu należy utrwalać preparaty z pyłkiem kopalnym przed ich opracowaniem, aby uniknąć ewentualnego wypłynięcia gliceryny spod szkiełka nakrywkowego w czasie obliczania spektrum. Preparat utrwalaony PW jest pod szkiełkiem nakrywkowym płynny, co umożliwia oglądanie ziarn pyłku w różnych położeniach. Utrwalone w ten sposób preparaty mogą być przechowywane jako dokumenty paleobotaniczne podobnie jak preparaty porównawcze.

A(alkohol) P(oliwinyłowy)

Jest to ciało stałe, rozpuszczalne w wodzie, używane w postaci roztworu, który według H. Szarskiego (1956), str. 140, przygotowuje się w sposób następujący:

«Suchy AP zalewamy wodą w stosunku AP 1 część, woda 6 części i pozostawiamy przez noc w termostacie o temp. $+60^{\circ}$. Na drugi dzień gotujemy preparat przez godzinę na łaźni wodnej, mieszając przez pewien czas. Po ochłodzeniu, na dnie naczynia pozostaje jeszcze nierozpuszczona reszтка AP. Płyn z wierzchu zlewamy ostrożnie i przeznaczamy do użytku. Jest rzeczą wskazaną zagęszczenie roztworu przez odparowanie pewnej ilości wody.

W wodnym roztworze AP mogą pojawić się po pewnym czasie nitki pleśni. Chcąc temu zapobiec, należy włożyć do roztworu kilka kryształków fenolu lub innego środka dezynfekującego».

a) Konserwacja szyszek kopalnych

Do prób użyto subfossylnych szyszek sosnowych, które przez tydzień trzymano w rozcieńczonym roztworze alkoholu poliwinylowego. W ciągu pierwszych miesięcy po ich wysuszeniu niektóre łuski nasienne odgięły się nieznacznie, potem jednak w przeciągu rocznego okresu czasu nie nastąpiły żadne dalsze zmiany. Dłuższe przechowywanie szyszek w AP, względnie użycie jego silniejszego stężenia pozwoli prawdopodobnie uniknąć tych zmian. Szyszki tak utrwalone są matowe. Powlekanie AP czy też innym polimerem samej tylko powierzchni szyszek nie dało wyników zadowalających.

b) Utrwalanie glicerynowych preparatów mikroskopowych

Roztwór AP nadaje się również do utrwalania mikroskopowych preparatów pyłkowych, zamkniętych w płynnej glicerynie. W tym celu należy otoczyć szkiełko nakrywkowe roztworem AP, podobnie jak to czynimy przy pomocy laku asfaltowego. W odróżnieniu od tegoż laku i innych polimerów AP nie odkleja się od szkła niezbyt dokładnie oczyszczonego z gliceryny. Dla zabezpieczenia błonki z AP od wpływu wilgotnego powietrza można ją jeszcze powlec którymś z metakrylanów lub nowakoliną.

P(olimetakrylan) B(utyłu)

Polimer ten, będący ciałem stałym, jest używany w postaci bezbarwnego i przezroczystego roztworu o konsystencji lakieru. Roztwór taki można otrzymać w dwojaki sposób: 1) przez polimeryzację monomeru (który jest ruchliwą cieczą) w temperaturze 90°, w obecności katalizatora i następnie przez dodanie rozpuszczalnika (ksylenu lub octanu etylu) do jeszcze niezestalonej masy, 2) przez rozpuszczenie stałego polimetakrylanu, pociętego na drobne skrawki, w octanie etylu (H. F. Nowak 1956, H. Szarski 1956). W naszych doświadczeniach stosowaliśmy roztwór otrzymany w sposób pierwszy jak i drugi. H. Szarski (1956) powlekał PB szkielety drobnych ssaków i okazy entomologiczne, co wzmagało ich trwałość i zabezpieczało przed żerem szkodników. H. F. Nowak (1956) wykonywał suche preparaty anatomiczne z całych narządów, powlekając je tym polimerem. Powlekanie okazów przy pomocy PB, mające zabezpieczyć od wysychania i pęknięcia, należy wykonywać dokładnie, bez pozostawiania najmniejszych nawet miejsc, w przeciwnym bowiem razie materiał wysycha i może ulec popękaniu. PB w odróżnieniu od innych polimerów stosowanych w podobnych przypadkach można nakładać na powierzchnie wilgotne bez obawy przed zmętnieniem błonki.

PB można używać zamiast szelaku do konserwacji kopalnych szczątków roślinnych z pominięciem odwadniania w alkoholu. Powlekano nim z powodzeniem kopalne szyszki, szpilki i nasiona. Ostatnio używaliśmy roztworu PB w octanie etylu do konserwacji świeżego materiału trzeciorzę-

dowych liści i nasion oraz do sklejanego pękniętych okazów. Liście są zachowane w łatwo pękającym ile, niejednokrotnie przypominającym ily warwowe. Powlekano powierzchnie liści silnie rozcieńczonym roztworem PB, co zabezpiecza je od pęknięcia i złuszczenia się, a równocześnie zyskuje na tym wyrazistość okazu, zwłaszcza zaś jest bardzo dobrze widoczna siatka nerwów. Powierzchnia zabezpieczonych okazów jest gładka, lecz nie błyszcząca, o ile użyjemy dostatecznie rozcieńzonego roztworu.

W przeciwieństwie do szelaku PB, można nakładać na materiał wilgotny bez uszczerbku dla wyglądu okazu. W razie potrzeby zmywa się najpierw pędzelkiem i wodą ił, którym powierzchnia liści jest zanieczyszczona. Używaliśmy również PB jako mocnego spoiwa do sklejanego pękniętych przy pracy w terenie, a jeszcze wilgotnych okazów. Następnie powlekano gęstszym roztworem boki i spód okazu, aby uchronić je od pęknięcia.

Bardzo dobre wyniki uzyskaliśmy przy konserwacji materiałów geologicznych do celów muzealnych. Przeschnięta nieco kostka ily warwowego, powleczona parokrotnie w odstępach kilkudniowych mocno rozcieńczonym PB, nie posiada po roku żadnych pęknięć oraz w pełni zachowuje naturalne barwy.

Z Instytutu Botaniki PAN w Krakowie

LITERATURA

- Komczyński L., Nowak H. F., 1957, Polietylenoglikol w badaniach histologicznych. *Patologia Polska* 3, 249.
- Nathorst A. G., 1907, Kollodiumaftryck säsom hjälpmedel vid undersökning af fossila växter. *Geol. Fören. Förhandl.*, Bd. 29.
- Nowak H. F., 1954, Nowa masa błonotwórcza dla celów techniki histologicznej. *Pol. Tyg. Lek.*
- 1956a, Niektóre polimery i masa błonotwórcza w laboratorium anatomopatolog. *Patologia Polska*, 2, 95.
- 1956b, Nitroceluloza w technice histologicznej. *Roczniki A.M.B.* 85.
- 1958, Pokrywanie narządów anatomicznych polimetakrylanem butylu, metylu i polioctanem winylu, *Patologia Polska*, 1, 23.
- Pabst F., 1955, Tłum. z niem. Moliński. *Tworzywa sztuczne — poradnik*. Warszawa.
- Schildknecht C. F., 1956, Tłum. z ang. *Polimery winylowe*, Warszawa.
- Szarski H., 1956, Próby użycia metakrylanów i alkoholu poliwinylowego w niektórych technikach anatomicznych. *Folia Morphol.* z. 2, 139—148.