

## METODY PREPAROWANIA I KONSERWOWANIA NIEKTÓRYCH ROZTOCZY (ROZSZERZONE)

ALEKSANDER RAJSKI

Instytut Zoologiczny PAN, Poznań, Pracownia Fauny Glebowej

**WSTĘP.** Ogromne zainteresowanie roztoczami, jakie można obserwować od kilku dziesiątków lat na całym świecie, znalazło w ostatnim czasie swój oddźwięk również i w Polsce. Ponieważ roztocze występują często w ogromnych ilościach, a klasyczna metodyka entomologiczna (mam na myśli preparowanie na sucho) nie znajduje w stosunku do nich żadnego zastosowania, sądzę, że celowym jest zaznajomienie się ze swoistą „kuchnią naukową” akarologii. Sprawy te, choć z pozoru drugorzędne, mają istotne znaczenie ze względu na oszczędność czasu, jak również na dokładność obserwacji.

Celem niniejszego artykułu nie jest wyczerpanie tematu. Chodzi jedynie o zreferowanie bardziej interesujących wskazówek, jakie można znaleźć w literaturze metodycznej, obserwacji poczynionych w różnych pracowniach akarologicznych oraz w pewnym stopniu doświadczeń własnych. Niemniej autor pragnąłby sprowokować dyskusję, która zapoznałaby nas z doświadczeniami poszczególnych pracowni w tym zakresie.

**Przechowywanie materiałów.** Można rozróżnić dwa sposoby przechowywania roztoczy: w preparatach trwałych i w probówkach z płynem konserwującym. Zakładanie zbioru preparatów jest metodą bardziej przestarzałą, wychodzącą właściwie z użycia i wykazującą, przynajmniej na obecnym etapie badań akarologicznych, więcej wad niż zalet. Okaz zamknięty w preparacie jest dostępny dla obserwacji wyłącznie w nadanej mu raz pozycji. Płyn, użyty do montowania preparatu, może zmieniać swoje właściwości optyczne, niezależnie od tego może krystalizować lub wysychać, co często zupełnie uniemożliwia obserwację. Wreszcie preparaty, jak i same okazy, ulegają łatwo uszkodzeniom mechanicznym. Substancja, użyta jako środowisko optyczne i substancja izolująca preparat od wpływu powietrza, ulegają z biegiem czasu wzajemnej dyfuzji. Przygotowanie i utrzymanie takiej kolekcji pochłania więcej czasu niż założenie i utrzymanie racjonalnego zbioru mokrego, łącznie z każdorazowym montowaniem i rozmontowy-

waniem preparatów mokrych. Mimo starań kolekcja preparatów, w dużej mierze niezależnie od użytego medium, ulega, po około 50 latach, tak dalece posuniętemu procesowi starzenia się, że wymaga kompletnego przemontowania.

Przykładem może być kolekcja Berlesego we Florencji. W 1960 roku była ona właśnie w takim stanie, że aktualny jej opiekun, dr Pegazzano, czynił starania, mające na celu renowację prawie zupełnie nienadającego się do obserwacji zbioru (wiadomość listowna z pracowni Forsslunda, 1961).

Pozostają więc zbiory mokre, jako najwłaściwszy sposób przechowywania materiału, co oczywiście nie przesądza zupełnie w sensie negatywnym potrzeby posiadania pewnej ilości preparatów trwałych.

Najczęściej używanym środkiem do konserwowania roztoczy jest 75—85% alkohol etylowy. Najwłaściwszym środkiem skażania spirytusu jest alkohol metylowy. Celem zapobieżenia zupełnemu wyschnięciu alkoholu w ciągu długiego okresu magazynowania zbiorów, można dodawać do spirytusu do 5% glicerolu. W przypadku zupełnego wysuszenia roztoczy, należy je umieścić na okres 2—3 dni w ciepłym kwasie mlekowym o stężeniu 50—80%, a następnie przenieść do alkoholu (Evans i in. 1961).

Istnieją jednak głosy świadczące o tym, że alkohol uszkadza chitynę po około 40—50 latach, przynajmniej u niektórych roztoczy (Sellnick, 1956 — wiadomość listowna: szczególnie *Parasitiformes*). Ponadto alkohol nie nadaje się do konserwowania szpecieli — *Eriophyidae* (Evans i in. 1961), *Paleoacaroida* i niektórych mechowców — *Oribatei*: *Metabelba Grandjean* (Sengbusch, 1963). W związku z tym Sellnick używa, jako mieszaninę konserwującą glicerol z wodą destylowaną w stosunku 1:1, z dodatkiem kilku ml lodowatego kwasu octowego, który ma zapobiegać rozwojowi grzybów. Płyn ten ma być uniwersalnym medium dla wszystkich roztoczy.

Balogh i Grandjean czynią próby przechowywania zbioru podstawowego w kwasie mlekowym. Utrwalacz ten ma dodatkową zaletę, ponieważ nie tylko konserwuje, lecz również prześwieśla i można przygotowywać w nim bardzo dobre mokre preparaty mikroskopowe. W przypadku kwasu mlekowego odpada również konieczność szczelnego zamknięcia naczyń ze zbiorami, ponieważ praktycznie nie występuje tu parowanie. Należy jednak bardzo starannie chronić zbiór przed zanieczyszczeniem pyłem. Niestety, kwas mlekowy nie nadaje się według Balogha (1959) do przechowywania następujących roztoczy: *Macrochelidae* (szczególnie samce), *Pachylaelaptidae*, *Laelaptidae* (samice), *Prostigmata*, ponieważ uszkadza ich delikatną chitynę i wywołuje kurczenie się okazów. Brak danych odnośnie: *Hydracarinae*, *Eriophyidae*, pasożytniczych *Mesostigmata* i pasożytniczych *Tyroglyphoidea* (z wyjątkiem *Analgesoi-*

dea). Natomiast z powodzeniem można konserwować w kwasie mlekowym: *Oribatei* (z wyjątkiem *Atopochthoniidae* — Sengbusch, 1963), *Uropodina*, swobodne *Tyroglyphoidea* — szczególnie hypopusy, znaczną część *Trombidiidae*, *Labidostommidae*, *Erythraeidae*, *Calyptosomidae*, *Smariidae*, *Analgesoidea*, a z *Mesostigmata*: *Zerconidae*, *Parasitidae* i część swobodnych *Lealaptidae*. Ogólnie stwierdzić należy, że kwas mlekowy jest znakomitym środkiem konserwującym roztocze silnie sklerotyzowane oraz wszystkie formy stosunkowo duże, nawet jeżeli mają cienką i delikatną chitrynę. Co prawda doświadczenia zdobyte w zakresie konserwowania roztoczy w kwasie mlekowym dotyczą stosunkowo krótkiego odcinka czasu, tj. dopiero około 30 lat, niemniej zdaniem Balogha (1959), dotychczasowe wyniki są bardzo zachęcające.

W niektórych pracowniach używa się do konserwacji mieszaniny Oudemansa. Jednak już w 1931 r. Thor zauważył, że przechowywane w niej okazy ulegały zbyt silnemu odbarwieniu. Ponadto jeżeli do odbarwiania i prześwietlania używa się kwasu mlekowego, stosowanie mieszaniny Oudemansa wydaje się zbędne (Ewans i in. 1961).

Zupełnie nieodpowiednim środkiem konserwującym jest formalina, ponieważ, zdaniem prof. Jaczewskiego, uniemożliwia ona wypłukanie części miękkich w trakcie maceracji.

W związku z powyższymi uwagami wydaje się, że nie ma uniwersalnego środka konserwującego dla roztoczy, lecz że trzeba je dobierać w zależności od grupy, przy czym najbardziej polecenia godnym jest kwas mlekowy i alkohol etylowy.

**Preparowanie.** Przygotowanie okazów do mikroskopowania obejmuje kilka odrębnych procesów: odtłuszczanie, macerację, odbarwianie, barwienie i, w przypadku sporządzania preparatów częściowych, także preparowanie.

**Odtłuszczanie.** Nie jest to zabieg powszechnie stosowany w akarologii, szczególnie w przypadku roztoczy silnie sklerotyzowanych. Ponadto istnieją zasadnicze różnice zdań odnośnie momentu, w którym proces ten jest skuteczny. W aphidologii powszechnie uważa się, że odtłuszczanie należy przeprowadzać (przy pomocy mieszaniny czterochlorku węgla i alkoholu etylowego 96% w stosunku 1 : 1) najdalej 24 godz. po zakonserwowaniu okazów. Później zabieg jest bezcelowy (Quednau, 1954). Balogh (1958) pisze, że materiał przechowywany w alkoholu przez czas dłuższy ulega odtłuszczeniu bez jakichkolwiek zabiegów dodatkowych, natomiast świeży zaleca traktować kwasem etylooctowym. Autor nigdy nie stosował odtłuszczania materiałów akarologicznych.

**Maceracja.** Celem maceracji jest rozluźnienie lub rozpuszczenie błon, łączących twarde części szkieletu, rozpuszczenie wnętrzości, ewentualnie oczyszczenie zewnętrznej powierzchni pancerza chitynowego. Zwykle w trakcie maceracji zachodzi w pewnym stopniu odbarwienie,

które w przypadku okazów mniej intensywnie zabarwionych zupełnie wystarcza. Macerację należy uznać także za czynność przygotowującą i ułatwiającą preparowanie, gdyż rozpuszczenie błon ułatwia mechaniczne oddzielenie twardych części chitynowych. Niezależnie od płynu macerującego stosuje się macerowanie na gorąco i na zimno.

Czas trwania maceracji na ciepło nie przekracza na ogół kilku minut, a zależy od gatunku i od maksymalnej temperatury. Proces ten wymaga jednak nieprzerwanego śledzenia i w większości przypadków prowadzi do uszkodzeń chityny. Z tego względu autor nie stosuje maceracji na ciepło. W każdym razie należy jej zupełnie zaniechać, mając do dyspozycji niewielką ilość okazów danego gatunku. Macerowanie na zimno może trwać od kilku godzin do kilku tygodni. Przy zastosowaniu odpowiedniego płynu, daje jednak absolutną pewność, że macerowane okazy nie zostaną uszkodzone.

Najprostszym sposobem macerowania jest pozostawienie okazów na kilka tygodni w lekko alkalicznej (zahamowanie rozwoju grzybni) wodzie. Proces maceracji przebiega wówczas pod wpływem bakterii. Tego rodzaju maceracja jest rzadko stosowana w akarologii.

Dość powszechnie stosuje się macerację w roztworze KOH (do 10%), chociaż przy jego użyciu należy się liczyć z możliwością uszkodzenia chityny, niezależnie od temperatury.

Najlepszym środkiem macerującym, polecanym i używanym przez Balogha, Forsslunda, Grandjeana i Sellnicka jest wysokoprocentowy, chemicznie czysty kwas mlekowy, stosowany na zimno. Zabieg maceracji w kwasie mlekowym przeprowadza się następująco (Sellnick, 1956 — wiadomość listowna): Do możliwie małej probówki (4—5 cm wysokiej i do 5 mm szerokiej) nalewamy  $\frac{1}{3}$  kwasu mlekowego i  $\frac{1}{3}$  alkoholu, wraz z okazami, które utrzymują się początkowo na granicy obu płynów. Niektóre gatunki pękają pod wpływem zwiększonego ciśnienia osmotycznego, wytwarzanego przez wnikający do nich kwas mlekowy. Aby temu zapobiec, należy nakłuć je w takim miejscu, ażeby uszkodzenie nie utrudniało oznaczenia. Probówkę zatykamy watą i umieszczamy wraz z etykietką w stojaku w pozycji pionowej. Gdy okazy osiadną na dnie probówki (po około 3 dniach), można sporządzić preparaty lub przystąpić do odbarwiania czy też preparowania. Można je jednak pozostawić w probówce z kwasem mlekowym na kilka miesięcy lub nawet lat, bez obawy uszkodzenia chityny. Ostatnio (Sengbuch, 1963) zaleca się macerację na zimno dla preparatów totalnych, a na ciepło dla ułatwienia rozpreparowania okazu.

**Barwienie.** Poza szczególnymi przypadkami nie ma w akarologii potrzeby stosowania specjalnych barwników. Słabo sklerotyzowane struktury można różnicować barwnikiem goździkowym („lignin pink”) lub kwaśną fuksyną, dodając je do substancji prześwietlającej (Evans i in. 1961). Dla uwidocznienia aktinochityny stosuje się nasycony roztwór jodu w kwasie mlekowym na ciepło, zaś dla wyróżni-

cowania nieaktywnej chityny „Unna's polychrome blue” w wodzie destylowanej, przez około 2 godz., po maceracji w kwasie mlekowym. Nadmiar barwnika należy usunąć przez płukanie w zimnym kwasie mlekowym (Evans i in. 1961).

**Preparaty nietrwałe.** Po zmacerowaniu i zachodzącym równocześnie odbarwieniu, w większości przypadków możemy przystąpić bezpośrednio do przygotowania preparatu mokrego w kwasie mlekowym, zarówno z całego okazu, jak i z jego części. Godną polecenia jest metoda wypracowana przez Grandjeana (1949), a stosowana obecnie przez szereg pracowni akarologicznych na świecie (Evans i in., 1961; Sengbusch, 1963). Preparat montujemy na tzw. szkiełku z „łezką”. Łezkę wypełniamy częściowo kwasem mlekowym i przykrywamy tylko do połowy szkiełkiem nakrywkowym. Następnie w części nieprzykrytej umieszczamy jeden lub kilka badanych okazów, które wsuwamy pod szkiełko nakrywkowe, zakrzywioną pod kątem prostym igłą preparacyjną, nie dalej jak 1,5 mm od brzegu szkiełka nakrywkowego. Kwas mlekowy, jako środowisko stosunkowo gęste, umożliwia ustawienie okazu w dowolnej pozycji (igłą i przy pomocy ruchów szkiełka nakrywkowego). Ostatecznie należy odpowiednio ustawiony okaz przesunąć na obwód łezki, tak daleko jak to jest możliwe. Tzn. okaz powinien opierać się zarówno o szkiełko podstawowe, jak i nakrywkowe. Takie ustawienie okazu gwarantuje stałość jego pozycji, jak również możliwość oglądania danego okazu pod dużymi powiększeniami, przy pewnej wprawie nawet pod immersją. Ewans i in. (1961), polecając metodę Grandjeana, uważają jednak, że stosowanie immersji olejowej wymaga preparatu całkowicie przykrytego. W tym ostatnim przypadku należy jednak bardzo zwracać uwagę na to, aby olejek immersyjny nie mieszał się z kwasem mlekowym.

Należy dążyć do możliwie powszechnego stosowania tej prostej metody, ponieważ ma ona szereg zalet. Przede wszystkim kwas mlekowy jest idealnym środowiskiem optycznym. Poza tym, przy zastosowaniu tej metody, można jeden i ten sam okaz obejrzeć w dowolnej pozycji, w całości, a następnie rozpreparować go i obejrzeć poszczególne części i wszystko to w stosunkowo bardzo krótkim czasie. Kwas mlekowy nie nadaje się jednak do sporządzania preparatów z *Eriophyidae*. W tym celu należy zastosować płyn Keifera (Evans i in., 1961).

Niektóre gatunki roztoczy są z natury jasne i przezroczyste i wiele różnych szczegółów morfologicznych, niejednokrotnie wystarczających do identyfikacji, można obserwować bez prześwietlania w kwasie mlekowym. W tych przypadkach montujemy preparat w identyczny sposób, używając jednak zamiast kwasu mlekowego glicerolu, jeżeli mamy do czynienia z materiałem alkoholowym. Dobrze jest przygotować preparat na 1 lub 2 godziny przed mikroskopowaniem, ażeby glicerol mógł wnikać do wnętrza okazu.

Niektóre szczególnie małe formy (np. niektóre *Hypochthonoidea*: 0,11—0,20 mm) wygodniej jest oznaczać w preparacie nieprzykrytym. Metodę przeznaczoną specjalnie dla tego rodzaju form opracował Forsslund. Ponieważ mają one zwykle bardzo delikatną chitynę, stosujemy nieco inny sposób prześwietlania. Jednorazowo możemy badać do 20 okazów. W tym celu na szkiełku podstawowym umieszczamy kroplę chloralformolu, a obok niej badane okazy w kropli alkoholu. Gdy alkohol wyparuje, wilgotne jeszcze roztocze przesuwamy jednym ruchem pęsety do kropli chloralformolu, w której pozostają nie dłużej jak 5 minut. Na drugim szkiełku podstawowym ciągniemy, wzdłuż całej jego długości, 2 równoległe pasma glicerynowe, a za nimi dajemy jeszcze dwie oddzielne krople. Po pięciominutowym prześwietlaniu badanych obiektów w chloralformolu, przenosimy je, celem opłukania, do kropeł glicerynowych na drugie szkiełko, a po kilku minutach ustawiamy okazy w podłużnych pasmach glicerynowych, w możliwie dużych odstępach.

Powyższa metoda pozwala jedynie oznaczyć gatunki danej osobie już znane, ponieważ preparatu nie przykrytego nie można oglądać pod większym powiększeniem. Celem identyfikacji poszczególnych osobników, należy zaznaczyć na schemacie poszczególne okazy liczbami i kolejno w miarę oznaczania wpisywać ich nazwy, a następnie poszczególne gatunki przenieść do oddzielnych naczyń. Metoda ta nadaje się prawdopodobnie również dla wielu innych drobnych i słabo sklerotyzowanych roztoczy.

**O d b a r w i a n i e.** Niektóre gatunki, o wyjątkowo tęgim pancerzu i ciemnej pigmentacji, wymagają jeszcze dodatkowego odbarwienia. Zabieg ten należy przeprowadzić zwykle bardzo ostrożnie, gdyż wyjątkowo łatwo prowadzi on do uszkodzeń chityny. Zwykle odbarwia się jeden lub kilka okazów, które mają być w najbliższym czasie narysowane, oznaczone etc. Forsslund stosuje w tym celu mieszaninę stężonej wody utlenionej ( $H_2O_2$  conc.) i lodowatego kwasu octowego ( $CH_3COOH$ ) w stosunku 1 : 1, na zimno. Balogh (1958, 401) poleca działanie wolnym chlorem w roztworze wodnym, który można otrzymać, działając stężonym kwasem solnym ( $HCl$ ) na braunsztyn ( $MnO_2$ ). Dla oczyszczenia, otrzymanego w ten sposób roztworu wodnego chloru z resztek kwasu solnego, należy przepuścić roztwór przez kolumnę z siarczanem miedzi ( $CuSO_4$ ). Kunst (za Baloghiem 1959, 247) odbarwia, dodając do parowniczkii z roztoczami w kwasie mlekowym 30%  $H_2O_2$ , w ilości od kilku kropeł, aż do otrzymania mniej więcej stosunku 1 : 1 z kwasem mlekowym. Następnie całość delikatnie podgrzewa, obserwując okazy, które w widoczny sposób jaśnieją. Bardziej dogodne do badań są okazy tylko częściowo odbarwione, niż zupełnie przezroczyste. Autor nie stosuje specjalnego, niezależnego od maceracji, odbarwienia. W przypadkach koniecznych można przedłużyć czas maceracji, a następnie oddzielnie oglądać stronę grzbietową i brzusznią, co zwiększa przezroczystość o ponad 50%. Gatunki mechowców, które wymagałyby dodatkowego odbarwienia i tak trzeba rozpreparować.

**P r e p a r o w a n i e.** W trakcie preparowania chodzi przede wszystkim o oddzielenie odnóży od korpusu, rozdzielenie strony brzusznej od grzbie-

towej i oczyszczenie ich zarówno z wnętrzości, jak i z zanieczyszczeń zewnętrznych, wreszcie o wyodrębnienie narządów gębowych. Oczywiście w szczególnych przypadkach, celem zabiegów mogą być inne części ciała. Rostocze można preparować przy pomocy igielki lub lancetu (sporządzonego z igły od maszyny do szycia) czy też dwu igiełek.

Balogh (1958, 408) daje następujące wskazówki, podkreślając równocześnie, że wypreparowanie najmniejszych nawet partii roztocza nie wymaga specjalnych uzdolnień. Preparowany okaz powinien znajdować się w płaszczyźnie stołu, jeżeli więc nie można odłączyć dolnej części binokularu, należy wstawić ją do otwartej szuflady, opierając stolik binokularu o powierzchnię stołu. Całe przedramię powinno spoczywać na stole. Preparowany okaz należy umieścić w kwasie mlekowym. Zwierzę, leżąc na grzbiecie, powinno być zwrócone tylnym końcem ciała do preparującego. Igiełki nie powinny wystawać więcej niż 1 cm z obsadki. Należy trzymać je między kciukiem i palcem wskazującym, w ten sposób, żeby koniec obsadki nie wystawał poza końce palców. Pozostała część obsadki powinna znajdować się pod palcami, Względnie pod dłonią. Taka pozycja igielki pozwala wykonywać nią ruchy we wszystkich kierunkach. Samo preparowanie wykonujemy, przyciskając lewą ręką okaz (igielka tępą) do szkiełka, a prawą (igielka lancetowata) nacinając błony między twardymi częściami szkieletu, ruchem z góry w dół i prowadząc ją następnie poziomo w dowolnym kierunku. Znacznie łatwiej preparuje się okazy uprzednio lekko podgrzane w kwasie mlekowym (Sengbusch, 1963).

**P r e p a r a t y t r w a ł e.** Jak już wyżej podkreśliłem, są one złem koniecznym, niemniej jesteśmy zmuszeni sporządzać je w niektórych przypadkach. Balogh (1958, 406—413) opisuje krótko metodę Sellnicka i swoje doświadczenia. Wszyscy badacze zgadzają się z tym, że najlepszym środkiem do sporządzania preparatów trwałych są płyny oparte na gumie arabskiej (mieszanka Berlesego i in.).

Balsam kanadyjski ma znacznie gorsze od nich własności optyczne. Chciałbym również podkreślić, że modny w ostatnim czasie alkohol poliwinilowy jest również znacznie gorszy od płynu Berlesego, ponieważ zbyt silnie przeświecła zamknięte w nim okazy, a wysychając, powoduje ich zupełne spłaszczenie, tak że nawet wprawnym okiem trudno odróżnić stronę brzuszną od grzbietowej. Wreszcie, gdy szkiełko nakrywkowe jest podparte, co ma zapobiec zgnieceniu okazu, podciśnienie, wytwarzane przez alkohol poliwinilowy, powoduje często jego pęknięcie. Nie referuję tutaj ani nie polecam płynów podanych przez Woolley'a (1953) oraz Ossiannilssona (1958), ponieważ nie są one u nas dostępne, a ich skład nie jest zany. Ponadto metoda zalecana przez Ossiannilssona (l. c.) nie jest ani prosta, ani też nie daje pewności uzyskania dobrego preparatu.

Istota metody Sellnicka sprowadza się do następujących zaleceń: Wnętrze okazu powinno być dostępne dla płynu Faure'a. W tym celu najlepiej częściowo odpreparować narządy gębowe. Szkiełko nakrywkowe powinno

być podparte (błoną filmową lub kawałkami cienkich szkiełek nakrywkowych), tak aby nie dotykało okazu. Gotowy preparat ma wysychać w ciągu kilku tygodni w temperaturze pokojowej, przy czym ubytki płynu Faure'a należy możliwie często i starannie uzupełniać. Po obeschnięciu brzegów preparatu płyn Faure'a trzeba izolować od kontaktu z powietrzem. Sellnick używa w tym celu specjalnej substancji o właściwościach żywicy, którą nakłada na ciepło i dodatkowo powleka jeszcze balsamem kanadyjskim. W naszych warunkach do izolacji płynu Faure'a od wpływów atmosferycznych można użyć pod balsam nitrolaku w dowolnej barwie. Nitrolak stosuje także Forsslund.

Balogh zwraca uwagę na niektóre inne momenty. Radzi mianowicie kłaść okaz na szkiełko podstawowe do małej ilości płynu Faure'a i poczekać aż płyn nieco zastygnie. Resztę płynu należy umieścić na szkiełku nakrywkowym w postaci kropli zwisającej. Przy pewnej wprawie można w ten sposób uniknąć zmiany pozycji okazu w trakcie nakrywania preparatu. Przy wykonywaniu preparatów częściowych, dobrze jest zmontować na jednym szkiełku podstawowym dwa preparaty, przykryte szkiełkami  $9 \times 9$  mm, podkładając pod szkiełko podstawowe szablon z wyrysowanym na nim schematem preparatu. Pod jednym szkiełkiem zaleca Balogh umieścić (na zasadach podanych wyżej) wypreparowane części danego okazu, pod drugim tułów tego samego egzemplarza i dodatkowo inny kompletny okaz danego gatunku. Taki preparat ma oczywiste zalety, których tu wyliczać nie trzeba. Również Balogh stosuje podpieranie szkiełka nakrywkowego, podobnie jak Sellnick, kawałkami błony fotograficznej lub okrawkami szkiełek nakrywkowych.

Od tego typu preparatów łatwo już przejść do tzw. preparatów seryjnych. Mają one mieć układ regularny, tzn. okazy mają być ułożone wzdłuż równoległych linii, które na podstawie odpowiedniego szablonu ciągniemy igielką z płynem Faure'a na szkiełku podstawowym. Po podeschnięciu linii całość nakrywamy szkiełkiem  $18 \times 18$  mm z wiszącą kroplą, pod którym można pomieścić 25—50 okazów, zależnie od ich wielkości. Regularność układu okazów jest rzeczą istotną dla identyfikacji poszczególnych osobników. Autor sporządzał tego rodzaju preparaty i uważa, że poza specjalnymi przypadkami nie należy ich stosować, ponieważ prawie nigdy nie udaje się zidentyfikować wszystkich okazów. Dla celów wyłącznie determinacyjnych wystarczają zupełnie preparaty mokre, a przechowywanie jest wygodniejsze w próbkach, co wyżej zostało już uzasadnione.

Nieco inną, i zdaje się, najlepszą z dotychczasowych metod poznałem w pracowni Forsslunda. Opisuje ją częściowo Balogh (1958, 412) jako metodę v. Törnego. Forsslund montuje cały preparat na szkiełku nakrywkowym (okrągłym), które swoimi brzegami jest przyklejone do kartonika nad wyciętym w nim, nieco mniejszym od tego szkiełka, również okrągłym otworem. Kolejność sporządzania takiego preparatu jest następująca: Na szkiełku umieszcza się 4 grudeczki plasteliny lub kitu, sprasowanego



uprzednio do żądanej grubości między dwoma szkiełkami podstawowymi. Między grudeczkami kładziemy taką kroplę płynu Faure'a, która wypełni cały preparat. W kropli umieszczamy okaz, który z kwasu mlekowego do płynu Faure'a, należy przeprowadzić (celem wypłukania) przez choral-fenol. W przypadku zaniechania tego zabiegu, kwas mlekowy krystalizuje wewnątrz okazu i preparat staje się bezużyteczny. Całość nakrywamy mniejszym, również okrągłym, szkiełkiem nakrywkowym. Preparat należy nakrywać pod binokulem, a następnie nie przerywając obserwacji, przycisnąć szkiełko nakrywkowe mocną igłą lub nawet pęsetą, wykonując na szkiełku, dookoła okazu, nieprzerwany ruch kolisty, aż do momentu, w którym słupki plastelinowe spłaszczą się na tyle, że okaz zetknie się ze szkiełkami zarówno z góry jak i z dołu. Ten ostatni etap jest właściwie najważniejszy, ponieważ w trakcie przyciskania górnego szkiełka możemy, albo wykorzystując przepływ płynu Faure'a, albo dzięki bezpośredniemu zetknięciu okazu ze szkiełkami, nadać mu dowolną pozycję, którą później trwale zachowuje. W miarę wysychania preparatu należy go dopełnić, a następnie obwieść lakierem etc. Na koniec, celem ułatwienia właściwego ustawienia preparatu pod mikroskopem, można na kartoniku zaznaczyć oś długą okazu. U nas nie ma w handlu okrągłych szkiełek Zeissa, ale preparaty tego rodzaju udają się również na szkiełkach kwadratowych. Metoda Forsslunda ma następujące zalety: Pozwala oglądać okaz z obu stron i to pod stosunkowo dużym powiększeniem, gdyż przylega on bezpośrednio do obu szkiełek. W sposób zupełnie pewny pozwala ustawić okaz w dowolnej pozycji. Preparaty na kartoniku są znacznie bardziej odporne na wszelkie uszkodzenia mechaniczne niż preparaty na szkiełku podstawowym, a poza tym znacznie lżejsze. Dowolną pozycję można jednak nadać tylko jednemu okazowi pod każdym szkiełkiem.

Badanie okazów w świetle odbitym. Jak wykazały doświadczenia Grandjeana (1949), nie wszystkie szczegóły morfologiczne dają się zaobserwować nawet w najlepiej sporządzonych preparatach. Natomiast niektóre z nich można rozpoznać nawet pod stosunkowo małym powiększeniem (40—100  $\times$ ) w świetle odbitym, w środowisku powietrznym. Metodę tę streszczają krótko Balogh (1958, 402) oraz Evans i in. (1961, 78), dając zarazem schematyczne rysunki potrzebnego zestawu. Badany okaz powinien być w ciągu całego okresu obserwacji przesiąknięty alkoholem, a jednocześnie ma się znajdować w środowisku powietrznym. W tym celu na stoliku binokularu umieszczamy kostkę porowatego węgla drzewnego („Holzkohle”, „porous carbon”), której górna i dolna powierzchnia muszą być idealnie równoległe, a górna także i wypolerowana. Na kostce ustawiamy maleńkie naczynko z alkoholem, połączone z określonym punktem powierzchni kostki cienką kapilarą. W tym punkcie powinien znajdować się badany okaz. Za źródło światła służy silna matowa

żarówka, izolowana od obiektu filtrem wodnym (wąskie naczynie, wypełnione wodą (filtr nie jest konieczny jeśli dysponujemy nowoczesną lampą mikroskopową na niskie napięcie). Między filtrem a okazem można umieścić skupiający układ optyczny (Grandjean używa w tym celu kondensora mikroskopowego z wymontowaną soczewką czołową). Dzięki kapilarze węgiel, w miejscu, w którym znajduje się okaz, jest stale przesiąknięty alkoholem, a powietrze przesycone jego parami. Zapobiega to wysychaniu okazu wewnątrz oraz odbijaniu światła od powierzchni węgla, a także zapewnia możliwość nadania badanemu obiektowi dowolnej pozycji (lepkość), pogłębiając równocześnie czerń tła (kontrastowość). Dla przeprowadzenia obserwacji odsuwamy nieco okaz od końca kapilary, ażeby powierzchnia jego obeschła. Po pierwszych objawach wysychania wewnętrznego należy przerwać obserwację i zbliżyć okaz do wylotu rurki.

Poza metodą Grandjeana, której autor nie wypróbował, a która rzeczywiście pozwala pogłębić obserwacje morfologiczne, powszechnie stosuje się badanie wstępne w świetle odbitym w środowisku płynnym.

## WNIOSKI

1. Najlepszymi środkami do konserwacji roztoczy są alkohol lub kwas mlekowy, w zależności od grupy.
2. Należy unikać sporządzania preparatów trwałych.
3. Najbardziej godnymi polecenia są preparaty nietrwałe w kwasie mlekowym.
4. Nie zaleca się przeprowadzać maceracji ani odbarwiania na ciepło, w przypadku przygotowywania preparatów totalnych.
5. Spośród preparatów trwałych najlepsze są preparaty w płynie Berlesego (Hoyera) według Forsslunda.
6. Przy sporządzaniu opisów morfologicznych dobrze jest zbadać daną formę w świetle odbitym według Grandjeana.
7. Ogólnie rzecz biorąc, przy oznaczaniu wszelkie zabiegi, jak macerowanie, odbarwianie, preparowanie należy stosować dopiero wówczas, gdy nie można oznaczyć świeżego materiału. Przy opisywaniu natomiast, należy dążyć wszelkimi sposobami do ujawnienia możliwie znacznej ilości szczegółów morfologicznych.

## NIEKTÓRE PŁYNY UŻYWANE W AKAROLOGII

Mieszanka Oudemansa (płyn konserwujący)	
70% alkohol etylowy	87 ml
kwas octowy	8 ml
glicerol	5 ml

## Płyny macerujące

## Chloralfenol (mieszanka żrąca)

fenol	112,50 g
wodzian chloralu	125,00 g
woda destylowana	12,55 g

## Płyn Nesbitta

wodzian chloralu	40,00 g
woda destylowana	25,00 ml
kwasy solny	2,50 ml

Płyn Nesbitta i laktofenol stosuje się do okazów silnie sklerotyzowanych i silnie zabarwionych. Działanie ich jest silniejsze niż kwasu mlekowego.

Płyny do preparatów trwałych, mające za podstawę gumę arabską  
(według Sengebuscha, 1963, 182)

	De Faure	Berlese (Hoyer)	Evans	Strandt- mann
Woda destylowana, ml	50	50	50	8
Wodzian chloralu, g	50	200	50	70
Glicerol, ml	20	20	20	5
Guma arabska, g	30	30	30	8
Lodowaty kwas octowy, ml	—	—	—	3
Wodzian chloralu kokainy, g	0,5	—	—	—

Autor używa do *Oribatei* i *Gamasides* modyfikacji Hoyera. Sporządzanie: gumę arabską w grudkach wrzucić do wody destylowanej i po rozpuszczeniu przesączyć przez gazę młynarską nr 25. Do przesączu dodawać składniki chemicznie czyste: glicerol i wodzian chloralu. Jeżeli po rozpuszczeniu chloralu płyn nie jest klarowny, należy go poddać sedymentacji w ciągu kilku do kilkunastu tygodni, w wąskim wysokim cylindrze, w niskiej temperaturze lub sączyć przez watę szklaną.

## LITERATURA

1. Balogh J. 1958. Lebensgemeinschaften der Landtiere, Budapest, Ak. Kiado, 540 pp.
2. Balogh J. 1959. Acta Zool. Hung., Budapest, 5: 241—253.
3. Börner C. 1942 Veröf. Deutsch. Kol.-Üb. Mus., Bremen, 3: 267—272.
4. Evans G. O., E. Browning 1955. Ann. Mag. Nat. Hist., London, (12th ser.), 8: 631—635.
5. Evans G. O., J. G. Sheals, D. Macfarlane 1961. The Terrestrial Acari of the British Isles. An Introduction to their Morphology, Biology and Classification. I. Introduction and Biology. London, 219 pp.
6. Grandjean F. 1949. Bull. Mus. Hist. Nat., Paris, (2), 21: 363—370.
7. Ossiannilsson F. 1958. Ent. Tidskr., Stockholm, 79: 1—5.

8. Quednau W. 1954. Mitt. Biol. Zentr. Land-Forstw., Berlin—Dahleh, Hf. 78: 1—71.
9. Raјski A. 1962. Pol. Pismo ent. B, Wrocław, 3—4 (27—28): 281—188.
10. Raјski A. 1962. Streszczenie. Biuletyn IOR, Poznań, 18: 145—147.
11. Sengebusch H. G. 1963. Methods Recommended for the Preparation and Culture of Oribatei: Advances in Acarology, 1. Ithaca, N. Y., XII+480 pp., 64 ff.
12. Thor S. 1931. Einführung in das Studium der Acarina (Milben). W dziele zbiorowym pod redakcją F. Dahla „Die Tierwelt Deutschlands”, Jena, 22: 1—78.
13. Wolley T. H. 1953. J. econ. Ent., Menasha, Wisc., 46: 366.

А Рајски

## МЕТОДЫ ПРЕПАРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ НЕКОТОРЫХ КЛЕЩЕЙ

Резюме

Акарология, которая всё более выделяется из общей энтомологии, выработала также свои собственные методы препарирования и хранения, отличающиеся от энтомологических методов.

Многолетние опыты ряда акарологов показали, что наилучшим способом хранения клещей является сохранение в жидкостях. В зависимости от вида клещей следует употреблять этиловый спирт, молочную кислоту или другое консервирующее средство. До сих пор нет универсальной консервирующей жидкости, и по всей вероятности она никогда не будет найдена.

Наилучшим просветляющим средством является холодная молочная кислота. Автор подробно описывает ход этого процесса, согласно указаниям д-ра Зельника.

Окраска применяется в акарологии очень редко (Evans et all. 1961). Легко просветлённый в молочной кислоте материал пригоден уже для микроскопических исследований. Наиболее правильным является распространённый во всём мире метод приготовления временных препаратов в молочной кислоте, разработанный Гранжаном.

Некоторые виды — особенно если дело касается только их определения — можно рассматривать в микроскопе без просветления, заключённые во временные глицериновые препараты.

Далее автор даёт описание метода серийного определения мелких *Hypochthonoidea* в препаратах без покровного стекла, с которым он познакомился в лаборатории проф. Форшлунда.

Подробное исследование или описание многих тёмно-окрашенных или сильно уплотнённых видов требует их обесцвечивания. Частичное обесцвечивание происходит уже во время просветления. Кроме того, можно применять более сильно действующие окислительные вещества (по Фор-

шлунду, Балогу — 1958, Кунсту), которые однако часто повреждают хитин.

Просветлённый и обесцвеченный материал можно уже легко препарировать, соблюдая указания Балоба (1958: 408).

Независимо от основной коллекции клещей, хранимых в этиловом спирте или молочной кислоте, целесообразно создать небольшой сбор постоянных препаратов. Наилучшей средой для их изготовления являются растворы гуммиарабика. Автор даёт подробное описание различных способов изготовления постоянных препаратов: Зельника, Балоба и фон Тёрне по Балобу — 1958, а также неопубликованный метод Форшлунда, который он считает наилучшим.

В конце рассматривается, описываемый часто в литературе (Балог 1958, Evans et al. 1961), метод Гранжена (1949) исследования объектов в свете отражённом в воздушном пространстве. Автор делает следующие выводы:

1. Наилучшими средствами для консервации клещей является, в зависимости от группы животных, этиловый спирт или молочная кислота.
2. Следует избегать изготовления постоянных препаратов.
3. Рекомендуются использование временных препаратов в молочной кислоте.
4. При изготовлении постоянных препаратов не следует просветлять ни обесцвечивать при повышенных температурах.
5. Среди постоянных препаратов наилучшими являются препараты, изготовленные в смеси Берлезе (Гойер) по Форшлунду.
6. При проведении морфологических описаний рекомендуется исследовать данную форму в отражённом свете, согласно Гранжену.
7. Обобщая, нужно сказать, что при определении клещей их следует просветлять, обесцвечивать и препарировать лишь тогда, когда не удаётся определить в свежем виде. В то же время при описании следует всеми способами стремиться вскрыть возможно большее количество морфологических подробностей.

К работе даётся приложение: «Некоторые жидкости, употребляемые в акарологии».

A. R a j s k i

## METHODS OF PREPARATION AND CONSERVATION OF CERTAIN MITES

### S u m m a r y

In acarology which is becoming a more and more distinct sphere of entomology, also special methods of preparation and conservation have been elaborated.

Long standing experience of a number of acarologists has proved that the best way of conservation of mites consists in wet collection. In dependence on the group conserved, ethanol, lactic acid or some other conserving agent should be used. So far no such universal agent for mites may be recommended and, maybe, will never be found.

The best clearing substance for most mites is the cold lactic acid. The author discusses this process based on directions given by dr Sellnick.

The application of staining in acarology is very limited (Evans et al. 1961).

Material slightly cleared in lactic acid is already suitable for microscopic investigation. The most suitable is the routine method of preparing temporary mounts in lactic acid, developed by Grandjean.

Some species, particularly if the aim in view is only their determination, can be examined without clearing in temporary mounts in glycerin.

The author further describes the method of serial determination of minute *Hypochthonoidea* in non-covered mounts applied in the laboratory of professor Forsslund.

Accurate examination of the numerous dark-coloured or strongly sclerotized species, e. g. for description requires depigmentation. This is already partially achieved during clearing. Moreover stronger oxidizing agents may be used (after Forsslund, Balogh, 1958 and Kunst) which, however, often damage the chitin.

The cleared and depigmentated material is quite easy to prepare according to the directions of Balogh (1958 : 408).

Irrespective of the basic collection in ethanol or lactic acid, it seems useful to have a small collection of permanent mounts. As best medium for their preparation serve solutions based on gum arabic. Various techniques of preparation of permanent mounts are discussed: those of Sellnick, Balogh and v. Törne after Balogh, 1958 and Forsslund according to his unpublished directions. The author considers the latter as the best.

Finally the author describes the method of Grandjean (1949), frequently referred to in the literature (Balogh, 1958; Evans et al., 1961) for examining the specimen in reflected light in air medium.

The following conclusions are formulated:

1. The most suitable conservation agents for mites are ethanol and lactic acid in dependence on the group.
2. Preparation of permanent mounts should be reduced to minimum.
3. The most recommendable are temporary mounts in lactic acid.
4. It is not indicated to perform clearing and depigmentation in the hot, in the case of total preparations.
5. The best permanent mounts are obtained in Berlese's (Hoyer's) solution after Forsslund.

6. For morphological descriptions, it is indicated to examine the given specimen in reflected light according to Grandjean.

7. In general all kinds of treatment such as clearing, depigmentation and preparation should only be applied if it is not possible to determine the fresh material. For descriptions, on the contrary, efforts should be made to reveal as many morphological details as possible by all available means.

The paper includes a supplement headed „Some fluids used in acarology”.