

Zoran Nikolić, Srećko Ćurčić

Praktikum iz entomologije sa radnom sveskom (drugo izdanje)

Izdavač:

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu
Studentski trg 16, 11000 Beograd

Glavni i odgovorni urednik:

Doc. dr Slaviša Stanković

Recenzenti:

Prof. dr Miloje Brajković, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu
Prof. dr Vladimir Pešić, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet Crne Gore u Podgorici

Tehnička obrada:

Mr Zoran Nikolić
Doc. dr Srećko Ćurčić

Grafička obrada, priprema za štampu i autor korica:

Mr Zoran Nikolić

Tiraž:

300 primeraka

Štampa:

Alta Nova, Zemun

CIP - Каталогизacija y publikaciji
Народна библиотека Србије, Београд

595.7(075.8)(076)

НИКОЛИЋ, Зоран, 1968-
Praktikum iz entomologije : sa radnom
sveskom / Zoran Nikolić, Srećko Ćurčić. - 2.
izd. - Beograd : #Univerzitet, #Biološki
fakultet, 2011 (Beograd : Alta nova). - 153
str. : ilustr. ; 30 cm

Tiraž 250. - Bibliografija: str. 151-153.

ISBN 978-86-7078-058-3
1. Ђурчић, Срећко [аутор], 1976-
а) Ентомологија - Вежбе
COBISS.SR-ID 186621196

© Sva prava zadržavaju autori i izdavač. Zabranjeno je preštampavanje i umnožavanje.

VEŽBA 11: PREPAROVANJE I FORMIRANJE ZBIRKI INSEKATA

Metode preparovanja insekata

Značaj pravilnog preparovanja insekata je u tome što nepravilnim preparovanjem upropašćujemo sve napore vezane za sakupljanje insekata i njihovu pripremu za preparovanje. Loše preparovani insekti imaju malu naučnu vrednost jer ih je teško identifikovati. Postoje različite metode i pravila za preparovanje različitih grupa insekata. Sva pravila preparovanja slede jedan princip, a to je da najvažniji taksonomski karakteri posle preparovanja budu dostupni za proučavanje, što će omogućiti identifikaciju objekata (Brajković & Tomanović, 2000).

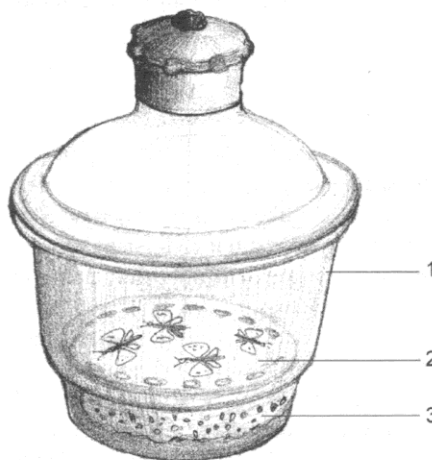
Insekti se mogu podeliti na dve grupe, zavisno od metoda njihovog preparovanja. Prva grupa obuhvata insekte mekanog tela, što uključuje i njihove larve, koji se mogu čuvati u 70-80% etil-alkoholu. Drugu grupu čine insekti čvrstog tela, koji, za razliku od insekata mekanog tela, posle smrti bitno ne menjaju svoj oblik, tako da se mogu preparovati kao suvi objekti.

Opuštanje insekata

Idealna situacija je kada insekte preparujemo odmah posle usmrćivanja na terenu. Sveže ulovljeni insekti su najlakši za preparovanje. Međutim, posle sakupljanja i usmrćivanja obično prođe neko vreme pre nego što pristupimo preparovanju. Za to vreme insekti se suše i postaju kruti, tako da ih je nemoguće preparovati bez prethodnog opuštanja. Sitniji insekti se osuše za jedan dan, a krupniji za nekoliko dana.

Ulovljeni insekti se stavljaju u **posude za opuštanje**. To su staklene ili metalne nerđajuće posude koje čuvaju vlagu (Sl. 95).

Na dno posude treba staviti neki materijal koji dobro apsorbuje vodu (pesak, sunder, pamuk) i maksimalno ga natopiti. Na površinu tako pripremljenog materijala treba staviti nekoliko kapi fenola, sirćeta ili etil-acetata, koji će sprečiti nastanak gljiva. Preko ovog sloja treba staviti vatu debljine 2-3 cm na koju ćemo staviti insekte koje nameravamo da preparujemo ili odgovarajuću rešetku. Na ovaj način odvajamo insekte od direktnog kontakta sa vodom. Zavisno od veličine, insekti se drže



Slika 95. Posuda za opuštanje insekata: 1 - staklena posuda; 2 - rešetka; 3 - sunder natopljen vodom.

u posudama za opuštanje od jednog do nekoliko dana, pri čemu može doći do kondenzovanja vlage unutar posude. Da bismo to sprečili potrebno je staviti pamuk ili papirnu maramicu sa unutrašnje strane poklopca posude pre njenog zatvaranja. Vreme potrebno za opuštanje primeraka zavisi od njihove veličine i temperature. Predugo držanje primeraka u posudama za opuštanje može imati i neželjene efekte, kao što su gubitak ili promena boje. Ovome su

naročito izloženi primerci insekata sa zelenom bojom. Da bi se sprečio efekat gubljenja ili slabljenja boje potrebno je u posudu dodati nekoliko kapi amonijum-hidroksida.

Posle vađenja primeraka iz posude za opuštanje ne treba ih stavljati odmah na čvrstu podlogu da ne bi došlo do njihovog oštećenja pri kontaktu sa podlogom, već na papir, karton ili plutu.

Čišćenje jedinki

Jedinke sakupljene entomološkom mrežom, ulovljene u različitim klopama ili izvađene iz nedovoljno čistih morilki mogu biti više-manje zaprljane. Da bi takve primerke mogli da preparujemo neophodno ih je prethodno očistiti od prljavštine. Insekti čije je telo čvrsto i kompaktno i koji nemaju lomljive antene, krila ili druge nastavke (na primer tvrdokrilci) potapaju se u 30% alkohol i na taj način se mogu odstraniti manje nečistoće. Naknadna upotreba četkice mora biti krajnje pažljiva. Preporučuje se u ovakvim slučajevima skraćivanje dlaka na četkici na 1-2 mm i njihovo sužavanje u uzani snop da bi korišćenje četkice bilo što bezbednije.

Čišćenje jedinki ultrazvukom

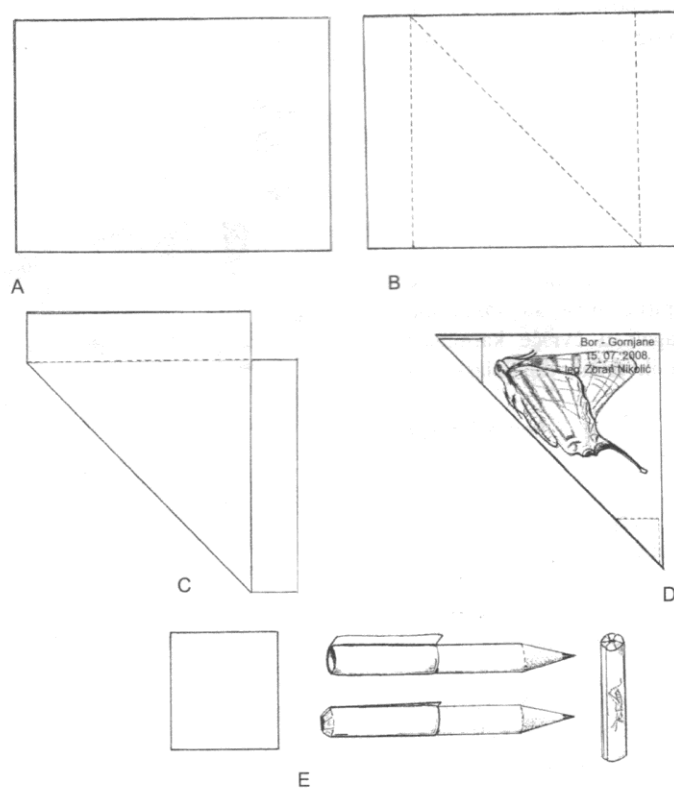
Ultrazvučni čistač je jedan od najefikasnijih, ali i najskupljih sredstava za čišćenje insekata od prljavštine. Pre nego što se podvrgnu ultrazvučnim vibracijama insekti se potapaju u rastvor amonijum-hidroksida, etil-acetata ili obične vode. Ultrazvučni čistač je posebno efikasan za odstranjivanje entomofagnih gljiva.

Sušenje jedinki

Posle čišćenja primeraka potrebno ih je osušiti pre preparovanja. Ako su primerci posle čišćenja u položaju koji omogućuje njihovo preparovanje potrebno ih je dehidratirati u 95% alkoholu, zatim i u apsolutnom alkoholu, pa ih dalje sušiti na upijajućoj hartiji ili na novinama. Ukoliko primerci nisu u položaju koji dozvoljava njihovo direktno preparovanje potrebno ih je opustiti u vodi i dehidratirati kroz seriju alkohola pre nego što ih dovedemo u položaj koji omogućuje njihovo konačno preparovanje.

Sušenje insekata iz alkohola

Jedinke prikupljene Malezovom klopom se obično konzerviraju u alkoholu. Pre preparovanja potrebno je njihovo sušenje. Ako se jedinke direktno iz alkohola suše na vazduhu onda se često dešava da se njihove dlačice prilepe za kutikulu, pri čemu zaklanjaju mnoge morfološke strukture. Sušenje na vazduhu takođe dovodi do deformacije mekih tkiva abdomena. Jednostavan metod kojim se dobijaju dobri rezultati jeste držanje jedinki u 95% etil-alkoholu 24 h, potom u 100% etil-alkoholu 24 h, zatim u hloroformu dva sata, posle čega su primerci osušeni. Ovakav tretman sprečava skupljanje tankih membrana i svi nastavci ostaju uspravljani i izvan tela. Ako se upotrebi set malih kaveza ili perforiranih poliesterskih pločica metod je onda vrlo brz, tako da se u jednom postupku može obraditi veliki broj jedinki. Ovaj metod se pokazao kao najbolji za sušenje sitnih parazitskih Hymenoptera (Braconidae, Ichneumonidae, itd.).



Slika 96. Pravljenje trouglova i cilindričnih papirnih tuba: A-D - postupak savijanja trougla; E - postupak savijanja cilindrične papirne tube.

Privremeno čuvanje ulovljenih jedinki

Ukoliko na terenu provedemo više dana, prilikom čega se sakupi obiman insekatski materijal, neophodno je da ulovljene jedinke sačuvamo do dolaska u laboratoriju, tj. do njihovog trajnog preparovanja. Ulovljene insekte možemo čuvati u staklenim ili plastičnim **flakonima** koji su zatvoreni vatom. Međutim, postavlja se pitanje kako sačuvati veliki broj ulovljenih leptira, vilinih konjica ili drugih krupnijih insekata, a da im pri tome ne polomimo ili oštetimo krila, antene ili noge. Jedan od načina za to je pravljenje **trouglova od hartije** (Sl. 96). Trouglovi se koriste najčešće za privremeno čuvanje leptira, ali se mogu koristiti i za čuvanje vilinih konjica ili mrežokrilaca, tj. insekata nežnijeg tela i lomljivih telesnih nastavaka. Dimenzije papira od kojeg pravimo trougao zavise od veličine primerka koga želimo da spakujemo u njega, a one su najčešće 4 x 6 cm ili 13 x 20 cm. Papir treba da bude tanak i dovoljno čvrst da bi zaštitio primerak u trouglu. U trougao smeštamo samo jednu jedinku, i to tako što se krila prebace iznad tela. Na svakom trouglu treba napisati lokalitet, datum i ime osobe koja je sakupila primerak, i to pre smeštanja primerka u njega da naknadnim upisivanjem ne bi došlo do oštećenja sakupljenog materijala. Osim papira, koristi se i celofan za privremeno čuvanje krupnijih i nežnijih primeraka, koji se prihefta na krajevima.

Međutim, u vlažnijim uslovima u celofanu se mogu razviti gljivice, tako da je za naše klimatske uslove najbolje koristiti papir.

Veći broj sitnijih insekata možemo smestiti u cilindrične **papirne tube**, takođe sa prethodno ispisanim osnovnim podacima o datumu, lokalitetu i legatoru. Možemo ih veoma lako i brzo napraviti uz pomoć cilindrične olovke (Sl. 96). Papirne tube sa insektima možemo odlagati u čvršće kartonske kutije i tamo ih držati do dolaska sa terena.

Insekti čvršćeg i kompaktnijeg tela (npr. tvrdokrilci, pravokrilci, stenice, muve i sl.) mogu se slagati na vatu, a preko svega se zaštitni papir savija u četvorougao. Pojedinačni slojevi četvorouglova sa insektima se pakuju u kartonske ili plastične kutije, gde se mogu držati određeni vremenski period do trajnog preparovanja u laboratoriji. Osnovne podatke o lokalitetu, datumu i

legatoru treba da sadrži svaki **četvorougao** (Sl. 97), a ispisujemo ih pre nego što smestimo insekte u četvorougao. Pri ovome treba voditi računa da u jednom četvorouglu ne budu insekti sakupljeni sa različitih lokaliteta ili tokom različitog perioda da ne bi došlo do greške.

Ukoliko za to postoje uslovi insekte na terenu možemo čuvati duži vremenski period na niskoj temperaturi u zamrzivaču uvijene u papir na vati.

Preparovanje insekata pomoću čioda

Insekti se mogu trajno preparovati pomoću **čioda** na nekoliko načina u zavisnosti od njihove veličine i grupe kojoj pripadaju.

Prvi način je direktno probadanje čiodom. Načini direktnog probadanja insekata su različiti kod insekata iz različitih redova, pri čemu postoje specifična pravila za svaki red što se tiče položaja nogu, krila i antena (Sl. 98). Po pravilu, ako su antene duže od polovine tela one se upravljaju unazad, a ako su kraće, onda prema napred. Noge, krila i antene dovodimo u željeni položaj fiksiranjem pomoću čioda posle opuštanja.

Čiodama direktno možemo probadati insekte čije je telo dovoljno veliko da čioda kojom ih probodemo ne izazove oštećenje koje bi nam onemogućilo ili otežalo kasniju identifikaciju. Za probadanje insekata koriste se specijalne entomološke igle od nerđajućeg čelika. Njihova debljina je različita i razlikujemo brojeve 000 (najtanje čiode koje se koriste za probadanje sitnijih insekata nežnijeg tela), zatim 00, 0 i 1, pa sve do 7, što je i najveća debljina čiode (koriste se za probadanje najkrupnijih insekata, kao što su neki krupni tvrdokrilci ili leptiri). Najčešće su u upotrebi čiode broj 0, 1 i 2. Entomološke igle su duge 4 cm, ali njihova dužina varira par milimetara u zavisnosti od proizvođača. Po pravilu insekte



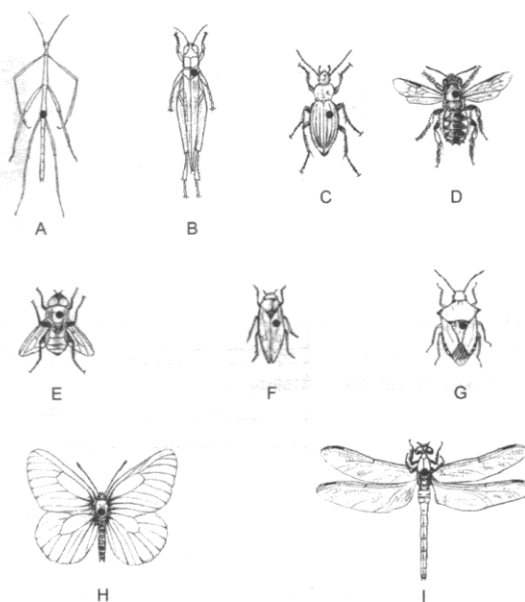
Slika 97. Privremeno čuvanje ulovljenih insekata na vati: A - insekti na vati; B - savijanje četvorougla sa vatom.

probadamo čiodom najveće veličine koja ga neće oštetiti. Prilikom probadanja insekti treba da budu opušteni da ne bi došlo do lomljenja delova tela. Najlakše se probadaju sveže ulovljeni i usmrćeni insekti. Posle probadanja čiodom delovi tela treba da budu aranžirani tako da budu maksimalno pristupačni za identifikaciju. Pri ovome se mogu koristiti fine četkice i pincete.

Insekte probadamo do oko 1 cm od glave čiode, tako da imamo prostora da rukujemo čiodama na koje su probodeni insekti, a takođe i dovoljno prostora ispod probodenog insekta za odgovarajuće etikete.

Sitniji i nežniji insekti ne mogu se probadati čiodama standardne debljine jer bi zbog njihove konstitucije došlo do manjih ili većih oštećenja. Zbog toga neke sitnije primerke, ukoliko je potrebno njihovo preparovanje probadanjem, preparujemo tako što ih probadamo posebnom vrstom izuzetno tanke čiode koja se naziva **minucija**. One

su kraće od standardnih čioda i nemaju glavu. Primerak proboden minucijom pričvršćen je za parče plute ili štira (ksilofagna gljiva *Polyporus* spp.). Standardnom čiodom veličine 2 ili 3 se na jednom kraju probada nosač preparovanog objekta.

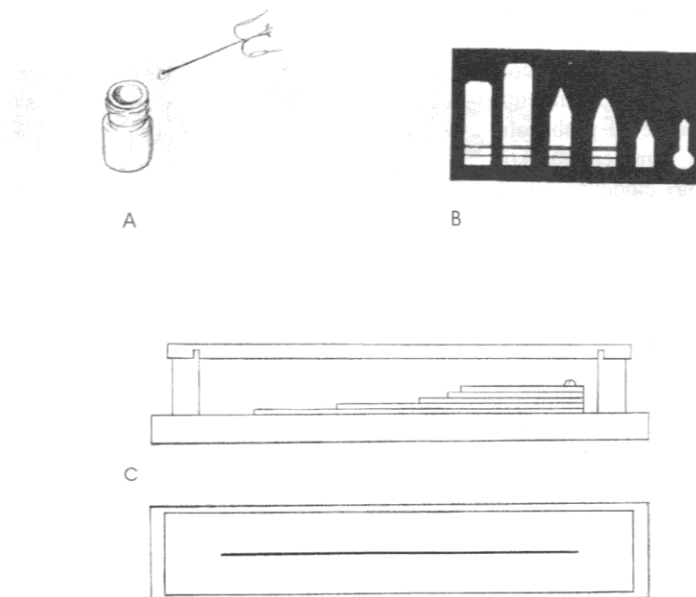


Slika 98. Mesta probadanja raznih grupa insekata čiodama označena tačkama: A - Phasmida; B - Orthoptera; C - Coleoptera; D - Hymenoptera; E - Diptera; F - Hemiptera (Homoptera); G - Hemiptera (Heteroptera); H - Lepidoptera; I - Odonata.

Preparovanje insekata lepljenjem na trouglove od kartona

Ovaj metod preparovanja je veoma rasprostranjen i korišćen za preparovanje sitnih insekata (osim Diptera) koje ne možemo probadati čiodama. Kapljica lepka se pažljivo nanese na vrh trougla, koji je sa suprotne strane proboden debljom čiodom (obično veličine 2). Po pravilu primerak se položi desnom stranom grudi na vrh trougla, tako da je osim desne strane grudi kompletna jedinka dostupna za proučavanje. **Trouglovi** su od čvrstog papira ili kartona. Standardna veličina trougla je sledeća: dužina 8 mm, širina pri osnovi 2.5 mm i širina na vrhu 0.7 mm (Sl. 99). Za objekte veličine do 2 mm koriste se potpuno zašiljeni trouglovi. Da bi trouglovi sa zalepljenim insektima i etikete bili na istim visinama koristimo takozvane **ravnjače** (Sl. 99). Etiketa ispod trougla sa zalepljenim primerkom treba da bude duža i šira od njega, jer ga na taj način može zaštititi od oštećenja prilikom pada, što se često može desiti pri manipulisanju preparovanim primerkom.

Izbor lepka prilikom preparovanja insekata lepljenjem je veoma važan (Sl. 99). **Lepak** treba da bude dovoljno jak da i u minimalnim količinama drži objekat čvrsto uz podlogu, da ne predstavlja podlogu za razvoj gljivica i da se pri upotrebi ne formiraju „končići“ na vazduhu koji bi mogli da ulepe i oštete druge primerke iz zbirke.



Slika 99. Pribor za preparovanje insekata lepljenjem: A - lepak; B - kartončići za koje se lepe insekti; C - bočni (gore) i dorzalni prikaz ravnjača (dole).

Postoje specijalni entomološki lepkovi koji se mogu nabaviti u specijalizovanim prodavnicama entomološke opreme. Odgovarajući lepak se može i pruručno napraviti tako što se parčići celulozne trake potope u amil-acetat i nastala smeša promeša. Lepak treba da ima optimalnu gustinu, što znači da ne sme biti previše gust, kao ni previše redak. Odgovarajuća gustina lepka se postiže dodavanjem amil-acetata ili celuloznih traka. Rastvaranjem u toploj vodi ravnomernim mešanjem lepka za tapete uz dodavanje nekoliko kapi sirćetne kiseline takođe možemo dobiti odgovarajući pruručni lepak. Pruručne lepkove je najbolje čuvati u malim bočicama sa dobro dihtujućim zatvaračem da bi se sprečilo sušenje. Lepak se na trouglove od kartona nanosi nekom debljom čiodom.

Preparovanje insekata lepljenjem na četvorougaone kartone

Ovaj metod se preporučuje za krupnije insekte, kao što su krupni tvrdokrilci ili stenice (Sl. 99). Entomološke zbirke sa ovako preparovanim insektima izgledaju veoma uredno. U slučaju potrebe da se primerak ispita sa ventralne strane kojom je zalepljen za karton, tvrdokrilci se mogu lako odlepiti bez oštećenja. Takođe se i mikrohimenoptere lepe za **četvorougaone kartone**, jer je to najbrži i najjednostavniji način njihovog preparovanja.

Ovo nije slučaj sa većinom drugih insekata, za koje se ne preporučuje ova metoda preparovanja.

Suvo preparovanje insekata mekog tela

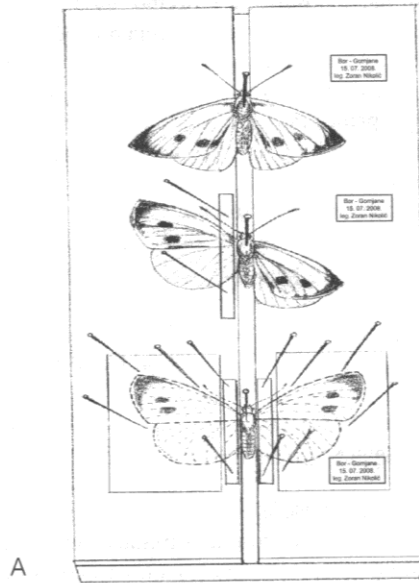
Insekti mekanog tela se obično po prikupljanju konzerviraju u alkoholu. Jedinke koje se čuvaju na ovaj način su pogodne za studiranje, međutim, za prikazivanje u muzejskim

zbirdama bolje su kao suvi preparati. Postoje uglavnom dva uobičajena metoda za pravljenje suvih preparata insekata sa mekim telom. Najčešće se primenjuje metod naduvavanja praznog integumenta vazduhom ili punjenje voskom. Drugi metod se sastoji u dehidraciji jedinki i kalupljenju u providnoj plastici, koja se zatim brusi kako bi se jedinke jasno videle. Metod naduvavanja se najčešće koristi za preparovanje gusenica leptira i moljaca.

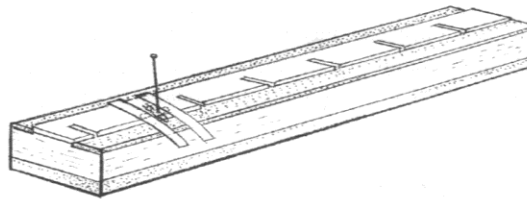
Gusenice i druge larve sličnog oblika zadržavaju svoje boje (osim zelene) bolje nego primerci koji se čuvaju u tečnosti. Za naduvavanje gusenica je potrebna sledeća oprema: staklena cevčica čiji je jedan otvoren kraj sužen ili prirodna slamka, par štipaljki, mala sušionica, špiritusna lampa, zaobljena olovka, špenadle, slamke, meka žica i lepak.

Gusenica se najpre ubija vreloom vodom, a zatim rastegne na podlozi od papira. Finim makazama ili skalpelom se napravi kružni rez oko analnog otvora, čime se crevo oslobađa od tela. Posle toga se izbacuju unutrašnji organi napolje kroz analni otvor pritiskanjem olovkom počev od glave pa do kraja tela. Očišćena gusenica se zatim montira na vrh staklene cevčice za koju je vezano gumeno crevo sa duvaljkom.

Kružni otvor na zadnjem kraju tela gusenice se vrelim voskom lepi oko vrha staklene cevčice, a zatim se štipaljkom steže. Ovako pripremljena gusenica se polako naduva duploakcionim gumenim duvačem. Za vreme naduvavanja ispod komore za naduvavanje se drži upaljena špiritusna lampa. U komori (peći) gusenica se suši. Pri sušenju treba voditi računa da se integument ne pregreje, izgubi boju ili izgori. Naduvane i osušene gusenice je moguće napuniti vrućim voskom ili mešavinom voska i parafina. Ispunjavanje voskom se obavlja špicem. Ovako ispunjene gusenice predstavljaju čvršće i sigurnije preparate u zbirdama. Preparovane gusenice se montiraju na slamčice žita na dva načina. Gusenica može da se sa ventralne strane između nogu prilepi za slamčicu ili joj se u analni otvor uvlači cilindrični zapušać koji se namaže lepkom. Kroz zapušać prethodno treba usaditi parče mekane žice. Žicom se gusenica pričvršćuje za slamku. U slobodne krajeve slamčice se ubadaju čiode kojima se jedinke fiksiraju za podlogu entomološke



A



B

Slika 100. Razapinjači krila: A - za krupnije insekte; B - za sitnije insekte.

kutije. Pošto se ovom metodom zadnji deo gusenice oko analnog otvora manje ili više ošteti preporučljivo je da se za zbirku napravi od svake vrste bar po jedan primerak preparovan preko glavenog regiona. Nedostaci metode naduvavanja su delimično gubljenje boje i svih unutrašnjih organa koji se vade pre naduvavanja. Gubljenje boje naduvanih gusenica može se nadoknaditi bojenjem ako se zna kako su pojedini delovi tela bili obojeni. Kolor fotografije živih gusenica za naknadno bojenje su od velike koristi.

Razapinjanje krila insekata

Krila insekata sadrže veliki broj važnih taksonomskih karaktera neophodnih za identifikaciju, kao što su karakteristična krilna nervatura, boja i oblik. Razapinjanjem krila prilikom preparovanja je potrebno obezbediti njihovu dostupnost za proučavanje. Pošto većina insekata po uginuću sklopi krila ili ona ostanu u položaju koji ne omogućava njihovu dostupnost za proučavanje neophodno ih je postaviti u ravan, horizontalan i simetričan položaj. To najjednostavnije možemo uraditi pomoću **razapinjača krila**. Razapinjač čine dve ravne površine od mekanog drveta prevučene plutom ili stiroporom, sa žljebom između njih (Sl. 100). Veličina razapinjača zavisi od veličine insekata koje preparujemo. Za razapinjanje krila insekata su potrebne glatke papirne trake ili celofan, kao i čiode. Pažljivim manipulisanjem papirnim trakama i čiodama krila i antene se dovode u odgovarajući položaj. Poseban tip razapinjača možemo koristiti za sitnije Lepidoptera, Hymenoptera i Diptera.

Posle razapinjanja krila neophodan je određen vremenski period za sušenje preparovanih primeraka. Sušenje sveže ulovljenih i preparovanih primeraka, zavisno od veličine, traje 3-4 nedelje. Ukoliko su primerci ranije ulovljeni neophodno ih je prethodno opustiti. Njihovo sušenje traje nekoliko dana da bi krila, telo i antene zadržali željeni položaj.

Tečni fiksativi za insekte

Veliki broj zglavkara, među njima ogromna većina Arachnida i stonoga, larve i lutke mnogih insekata, kao i adulti insekata mekanog tela, može se trajno čuvati u različitim tečnim fiksativima.

Svakako najviše korišćeni tečni fiksativ je **etil-alkohol** u koncentraciji 70-80%. Jedan od nedostataka etil-alkohola kao fiksativa je taj što primerci pri dužem stajanju u njemu postaju obezbojeni i ukočeni, pogotovo ako koncentracija odstupa od navedene. Efekat ukočenosti se može eliminisati u velikoj meri dodavanjem 10% sirćetne kiseline.

Takozvani AGA rastvor je dosta korišćen uglavnom za fiksiranje sitnijih insekata čiju spoljašnju morfologiju izučavamo, pošto ovaj rastvor ne može da očuva dugo u dobrom stanju unutrašnje organe. Primerci u AGA rastvoru su mekani i opuštani, sa blago razdvojenim tergitema i sternitima, što dodatno olakšava izučavanje spoljašnje morfologije. AGA rastvor čine: 8 delova 95% etil-alkohola, 5 delova destilovane vode, 1 deo glicerina i 1 deo glacijalne sirćetne kiseline.

Često korišćen fiksativ je i takozvani Pempelov rastvor. Primerci u njemu su mekani, opuštani i lako ih je disekovati. Jedini nedostatak ovog rastvora je taj što primerci pri dužem stajanju u njemu postaju kruti i lomljivi, tako da se njegova primena ne preporučuje za primerke koje koristimo za citološke ili histološke analize. Sastav Pempelovog rastvora je sledeći: glacijalna sirćetna kiselina – 4 dela, formalin (40% formaldehid) – 6 delova, destilovana voda – 30 delova i 95% etil-alkohol – 15 delova.

Pravljenje hitinskih preparata insekata

Za pravljenje trajnih preparata celih adultnih insekata, njihovih delova tela ili larvi potrebno je izvršiti maceraciju kako bi se odstranili mekani delovi tela, mišići, unutrašnji organi i masni delovi. Maceracija se vrši najčešće u 5% ili 10% rastvoru KOH. U zavisnosti od stepena sklerotizovanosti kutikule maceracija se izvodi u zagrejanom ili hladnom rastvoru kalijum-hidroksida. Insekti sa slabo sklerotizovanim telom se maceriraju u hladnom rastvoru kalijumove sode, a sa čvrstim, jako sklerotizovanim telom u njenom vrućem rastvoru. Trajanje maceracije je različito. Ako se radi sa vrućim kalijum-hidroksidom vreme je znatno kraće i ono se iskustveno određuje. Da je maceracija završena vidi se na osnovu struktura insekata koje postaju prozirne. Po izvršenoj maceraciji obavlja se neutralizacija baze nekom slabom kiselinom. Obično se za neutralizaciju koristi 5% rastvor sirćetne kiseline (0.1% rastvor glacijalne sirćetne kiseline). Pri ovome se stvara kalijum-acetat ili natrijum-acetat, koji se ispiranjem destilovanom vodom odstranjuje.

Po završetku ispiranja insekatske strukture se zavisno od stepena sklerotizovanosti boje. Za bojenje je najbolje koristiti 0.51% eozin ili kongo crvenilo. Za bojenje štitastih ili lisnih vašiju može se koristiti magenta crvenilo. Sve ove boje su crvene i hitin se njima dobro oboji. Najbolji rezultati bojenja hitina se dobijaju u 1% vodenom rastvoru pirogalne kiseline. Ova kiselina ga ustvari ne boji, već oksidiše i usled toga mesta koja su svetla potamne.

Po izvršenom bojenju insekatskih struktura vrši se njihova dehidratacija. Ovim postupkom treba da se iz preparovanih struktura potpuno odstrani voda. Dehidratacija se obavlja tako što se preparovani delovi insekata sprovode kroz seriju alkohola rastuće koncentracije: od 65%, 85%, 95%, pa do 100% (apsolutnog) alkohola. Preparovani delovi, zavisno od veličine, drže se po desetak minuta u navedenim koncentracijama alkohola.

Nakon izvršene dehidratacije preparovane insekatske strukture treba prosvetliti i osloboditi alkohola. Za prosvetljavanje je najbolje koristiti ksilol, toluol, a ređe i benzol. Preporučljivo je raditi sa toluolom, jer se ksilol smatra kancerogenom materijom. Preparovane strukture ili cele insekte u toluolu treba držati nekoliko minuta, zavisno od veličine. Preporučljivo je da se objekti prenose u dva suda sa toluolom ili ksilolom. U slučaju da u drugom sudu dođe do zamućenja to je znak da voda nije dobro oduzeta, pa zato objekat treba vratiti u alkohol i postupak ponoviti.

Po izvršenom prosvetljavanju preparovane strukture montiramo na predmetna mikroskopska stakla (pločice) u Kanada balzam. Na pločice se staklenim štapićem nanosi nekoliko kapi Kanada balzama. Zatim se finom pincetom prenosi preparovani objekat. Pri ovome je značajno stanje Kanada balzama. Naime, ako je on mnogo gust montaža objekta je prilično teška jer objekat pliva po površini. Ako je redak, objekat pliva i po polaganju pokrovnog stakla obično se nađe na ivici pokrovnog stakla, pa nije dostupan za analizu. Ako je Kanada balzam suviše gust treba mu dodati malo toluola ili ksilola i lagano zagrejati, pa ga onda nanositi na predmetne pločice. Ako je Kanada balzam redak, po nanošenju na predmetne pločice treba malo sačekati da toluol ili ksilol ispare i da se stvori spolja fina membrana, pa tek tada montirati objekat. Nakon montaže objekta uzima se pokrovno staklo (ljustica) i premaže mu se unutrašnja strana toluolom ili ksilolom. Premazivanje pokrovne ljustice obavlja se tako što se jednom pincetom ona drži sa strane, a drugom umače u ksilol ili toluol i sa zadržanom količinom ovih materija prevlači sa unutrašnje strane pokrovnog stakla. Na ovaj način se obezbeđuje prisno sjedinjavanje pokrovnog stakla sa Kanada balzomom i objektom u njemu na predmetnom staklu bez formiranja mehurova vazduha. Pri montaži pokrovnog stakla bitno je prvo da se jedna ivica stakla položi na predmetno

staklo i Kanada balzam, pa postepeno da se polaže i ostali deo, čime se izbegava formiranje mehurova vazduha i pokretanje objekta u Kanada balzamu.

Ponekad nije potrebna maceracija, već se objekat sprovodi kroz tečnost koja ga prosvetljava, posle čega ga stavljamo u medijum, kao što je laktofenol, Berlezova tečnost ili Ferova tečnost.

Izrada preparata organa insekata

Ova metoda se koristi za proučavanje građe pojedinih organa insekata koji se izoluju putem disekcije. Disekcija insekata se vrši u izotoničnom rastvoru koji je ustvari fiziološki rastvor. Veoma dobre rezultate daje Ringerov rastvor, čiji je sastav sledeći: NaCl – 6.5 g, KCl – 0.25 g, CaCl₂ – 0.3 g, natrijum-bikarbonat – 0.2 g i destilovana voda – 1 l.

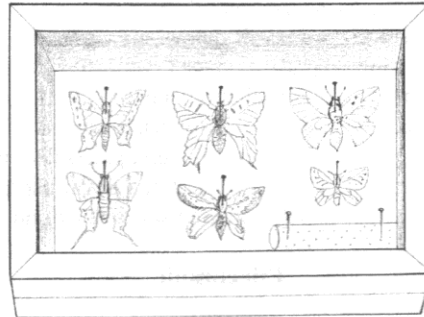
Disekovaná struktura (organ) sa kapljicom ovog rastvora prenosi se na pločicu. Višak ovog rastvora odstranjuje se upijanjem pomoću filter ili upijajuće hartije. Fiksiranje se vrši nekim od poznatih fiksativa (npr. diboskom). Trajanje fiksiranja je obično oko pola sata. Po obavljenom fiksiranju fiksativ se odstranjuje ispiranjem 90-96% etil-alkoholom. Fiksativ se mora potpuno odstraniti spomenutim ispiranjem. Ukoliko ta operacija nije zadovoljavajuća, onda se preparovana struktura ispira 0.5% rastvorom litijum-karbonata.

Posle ispiranja objekat se sprovodi kroz 96% i 100% alkohol. Iz apsolutnog alkohola se preparovane strukture prebacuju u toluol ili ksilol. Iz njih se objekti prenose u Kanada balzam. Ukoliko je potrebno da se preparovane strukture boje, taj postupak se odvija posle fiksiranja i ispiranja u alkoholu. Pre bojenja, ukoliko se ono vrši u vodenom rastvoru boje, objekti se moraju sprovesti kroz seriju alkohola opadajuće koncentracije do destilovane vode. Trajanje bojenja preparovanih struktura je različito, od pola časa do nekoliko časova. Po obavljenom bojenju strukture se ispiraju vodom, a zatim se sprovede kroz seriju alkohola rastuće koncentracije do apsolutnog kako bi se izvršila potpuna dehidratacija. Posle dehidratacije preparovane strukture se utapaju u toluol ili ksilol, a na kraju u Kanada balzam.

Čuvanje insekatske kolekcije

Insekte je posle preparovanja neophodno zaštititi od nepovoljnih spoljašnjih uticaja koji mogu da ih unište ili trajno oštete. Najčešća oštećenja insekatske kolekcije su mehanička (potresi i vibracije), usled prašine koja može prekriti i zaprljati insekte, zbog svetlosti koja može dovesti do obezbojavanja delova tela, zbog drugih insekata koji se hrane mekanim delovima tela preparovanih insekata (bubašvabe, moljci, *Anthrenus museorum*), kao i usled vlage koja može dovesti do pojave gljivica koje mogu prouzrokovati trajna oštećenja insekatske kolekcije.

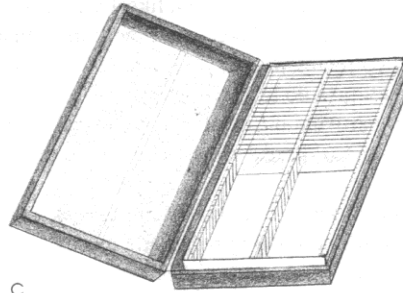
Preparovani insekti se čuvaju u zatvorenim drvenim ili kartonskim kutijama. To mogu biti specijalne **entomološke kutije** pravljene isključivo za tu namenu u kojima se čuvaju naučne zbirke u muzejima i institutima (Sl. 101). Entomološke kutije imaju standardne dimenzije, zavisno od insekatske grupe koja se čuva u njima. Amateri i studenti mogu napraviti improvizovane entomološke kutije od drveta ili čvrstih kartonskih kutija, što je jednostavnije. Takođe, za čuvanje insekata preparovanih čiodama amateri mogu koristiti i plastične kutije sa hermetičkim poklopcem koje se koriste u domaćinstvu. U svakom slučaju, neophodno je da svaka entomološka kutija ima odgovarajuću podlogu u koju će biti moguće zabadati čiode. Najpodesnija podloga je stiropor, koga je potrebno precizno iskrojiti i učvrstiti na dno kutije.



A



B



C

Slika 101. Načini čuvanja insekatske kolekcije: A - u entomološkoj kutiji; B - u tečnom fiksativu; C - u kutiji sa mikroskopskim preparatima.

Preko stiropora treba čiodama fiksirati ili zalepiti beli papir. Na ovako pripremljenu podlogu mogu se redati preparovani insekti. Ako nam je bitno da preparovani insekti u entomološkoj kutiji budu poređani u ravnom nizu možemo grafitnom olovkom blago povući liniju duž koje ćemo pribadati čiode sa insektima. Vrsta *Anthrenus museorum* je najpoznatija štetočina insekatskih kolekcija kod nas. Da bismo sprečili ovog i neke druge insekte da nam potpuno unište kolekciju i time upropaste sav naš trud oko sakupljanja, preparovanja i aranžiranja insekatske zbirke potrebno je da u entomološku kutiju stavimo neko zaštitno sredstvo. U ovu svrhu se najčešće koriste tus-traka ili naftalin. Ova sredstva treba staviti unutar perforiranih kartonskih valjčića u jedan ugao kolekcije, a valjčiće treba fiksirati čiodama da ne bi oštetili preparovane insekte pri pomeranju entomološke kutije.

Primerke u tečnom fiksativu treba čuvati u **staklenim** ili **plastičnim posudama** sa dobro dihtujućim zapušačima koji će sprečiti isparavanje (Sl. 101). Unutrašnjost posude treba potpuno ispuniti fiksativom, posebno ako u njoj čuvamo nežnije primerke da bi se smanjila mogućnost njihovog oštećenja. Prilikom čuvanja sitnijih objekata u tečnom fiksativu treba voditi računa da se što veći broj manjih flakona sa objektima napuni fiksativom i zatim potopi u veću posudu napunjenu fiksativom. Na ovaj način se efikasno sprečava ili svodi na minimum isparavanje fiksativa i oštećenje objekata usled sušenja. U slučaju krupnijih

objekata koji se čuvaju u tečnom fiksativu u većim flakonima ili epruvetama koristi se polica na koju se uspravno ređaju posude sa fiksiranim objektima.

Mikroskopske preparate insekata ili delova njihovog tela (genitalija, krila, ekstremiteta i dr.) treba takođe zaštititi od prašine, vlage i svetlosti. Za to se koriste posebne **kutije za mikroskopske preparate** čiji je kapacitet obično 100 mikroskopskih pločica (Sl. 101). Pre stavljanja preparata u kutije neophodno je da preparat, odnosno fiksativ u kome je objekat, bude suv da ne bi došlo do pomeranja objekta ili curenja fiksativa u kutiji za mikroskopske preparate. Kutije sa mikroskopskim preparatima treba držati uspravno tako da preparati u njima imaju horizontalan položaj sa pokrovnim ljuspicama okrenutim nagore.

Etiketiranje

Osnovno pravilo etiketiranja je da svaki sakupljeni uzorak mora da ima etiketu koja će sadržati osnovne podatke o uzorku. Uzorak bez etikete nema nikakvu naučnu vrednost. U slučaju sakupljanja većeg broja primeraka koje ne nameravamo da pojedinačno preparujemo, već ih držimo kao suve u flakonu ili u fiksativu kao tečne preparate, dovoljna je jedna etiketa koja se obavezno ubacuje u flakon sa primercima i nikada se ne lepi sa spoljašnje strane zbog mogućnosti odlepljivanja i gubitka etikete. U slučaju da etiketu ubacujemo u tečni fiksativ, podatke na etiketi pišemo tušem ili grafitnom olovkom na hameru ili čvršćem papiru. Svaki pojedinačno preparovani primerak obavezno sadrži etiketu.

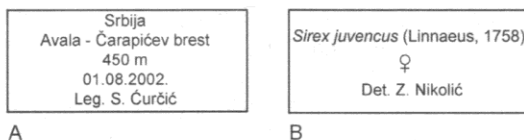
Podaci koje treba da sadrži svaka etiketa prilikom sakupljanja uzorka su sledeći (Sl. 102):

1) **tačan lokalitet** i država gde je uzorak sakupljen. Podatke o lokalitetu treba dati tako da svako može pomoću njih da nađe mesto gde smo sakupili naš uzorak. Vrlo često je osim lokaliteta potrebno navesti i bliže određenje, odnosno sublokalitet. Na primer, ako kao lokalitet navedemo Avalu informacija neće biti potpuna, pošto Avala zahvata veliki prostor. Ali, ako kao lokalitet navedemo Avala - Čarapičev brest, u tom slučaju će svako znati na kom delu Avale smo sakupili naš uzorak. Za materijal prikupljen na planinama treba navesti i nadmorsku visinu;

2) **datum** sakupljanja je drugi osnovni podatak koji treba da sadrži etiketa, osim podataka o lokalitetu;

3) **ime legatora**, odnosno onoga ko je uzorak sakupio (latinski *lego, legere* = sakupljati).

Pored ovih osnovnih podataka koje mora da sadrži svaka **legatorska (kolektorska) etiketa** (Sl. 102), bez obzira da li se radi o insektima ili ma kojoj drugoj grupi životinja, dodatni podaci kao što su nadmorska visina, tip staništa (livada, bukova šuma, potok, bara, itd.), podaci o biljci hraniteljki (u slučaju herbivornih insekata) ili o domaćinima iz kojih su odgajeni (u slučaju parazitskih insekata) su podaci koji će naš uzorak učiniti naučno vrednijim. Dodatni podaci se mogu staviti na kolektorsku etiketu, a ako na njoj nema dovoljno prostora mogu se napisati na posebnoj, dodatnoj etiketi.



Slika 102. Etikete: A - legatorska; B - determinatorska.

Posle obrade sakupljenih primeraka u laboratoriji i njihove determinacije dodajemo im takozvanu **determinatorsku etiketu** (Sl. 102). Ova etiketa sadrži pun naziv determinisane vrste i ime onoga ko je izvršio determinaciju. Eventualno ona može sadržati i podatke o polu.