Dr.Franz Schömmer

Kryptogamen-Praktikum

Anleitung

zur mikroskopischen Untersuchung

und

Präparation der blütenlosen Pflanzen

für Studierende und Liebhaber

Teil I

Allgemeiner Teil

Kapitel I - VII

KOSMOS.GESELLSCHAFT DER NATURFREUNDE
FRANCKH´SCHE VERLAGSHANDLUNG STUTTGART

STUTTGART 1949

(HAMBURG 2000)

INHALTSÜBERSICHT

Erster Teil

Allgemeine Untersuchungsmethoden

Zur Einführung § 1

Kapitel I Instrumentarium und Material

A. Das Instrumentarium § 2 - 3
- Größere Instrumente § 2
- Kleinere Utensilien § 3

B. Die Beschaffung des Untersuchungsmaterials § 4 - 18
- I Das Sammeln § 4
- II Kulturen, Allgemeines § 5
  - Rohkultur, Reinkultur § 5
  - Kulturgefäße § 6
  - Flüssige Nährmedien § 7
  - Feste Nährböden § 8
- III Sterilisation der Nährböden § 9
  - Sterilisation durch Erhitzen § 9
  - Kaltsterilisierungsmethoden § 10
  - Kaltsterilisation mit einfachen Mitteln § 11
- IV Verschiedene Formen der Kulturen § 12 - 16
  - Isolierung eines Mikroorganismus § 13
  - Anlegung einer Reinkultur § 14
  - Große feuchte Kammer § 15
  - Mikrokulturen § 16
- V Die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration für die Kultur der Organismen § 17
  - Praktische Bestimmung des pH-Wertes § 18

Kapitel II Eigenschaften des Untersuchungsmaterials Fixierung und Konservierungsmethoden

A. Der chemische Aufbau der Kryptogamen § 19
- Organisierte Zellbestandteile § 19
- Leblose Einschlüsse in den Zellen § 20
- Zellmembranen § 21

B. Das Fixieren des Materiales § 22 - 64
- Allgemeine, über das Fixieren § 22
- Das Abtöten und das Fixieren § 23
- Einfache Fixiermittel § 24 - 31
- Fixiergemische für morphologische und anatomische Zwecke § 32 - 49
- Fixiermittel für quellbare pflanzliche Objekte § 50
- Fixiermittel für Herbarmaterial § 51
- Fixiermittel für cytologische Untfersuchungen § 52 - 57
- Veränderungen der Objekte durch das Fixieren § 58
- Aufbewahrung des fixierten Materiales § 59 - 61
- Die Verarbeitung von kleinen und kleinsten Objekten § 62 - 64

Kapitel III Präparate mit Erhaltung der natürlichen Farben Die weitere Verarbeitung des fixierten Materiales Einbetten und Schneiden

A. Morphologische Präparate unter Erhaltung der natürlichen Farben	§ 65 - 68
B. Die Verarbeitung des fixierten Materiales	§ 69 - 72
Bleichen	§ 70
Die Entfemung störenden Zellinha1tes	§ 71 - 72
C. Einbetten und Schneiden	§ 73 - 75
Allgemeines	§ 73
Uneingebettet schneiden	§ 74
Das Schneiden von eingebettetem Materia1	§ 75 - 85
Paraffineinbettung	§ 75 - 77
Zelloidineinbettung	§ 78 - 82
Gelatine als Einbettungsmittel	§ 83 - 84
Gummiarabicum als Einbettungsmittel	§ 85
D. Zupf- und Quetschpräparate	§ 86

Kapitel IV Farstoffe und Färben

Zweck des Färbens	§ 87
Allgemeines über organische Farbstoffe	§ 88 - 90
Das Färben in der Technik und in der Mikroskopie	§ 91 - 94
Nachträgliches Beizen der Färbung zur Erhöhung der Echtheit	§ 95
Die gebräuchlichsten organischen Farben	§ 96
Vorschriften für basische Farbstoffe	§ 97 - 107
Vorschriften für saure Farbstoffe	§ 108 - 121
Vorschriften für Beizenfarbstoffe	§ 122 - 157
Natürliche Beizenfarbstoffe	§ 123 - 145
BECHER-Farbstoffe und andere künstliche Beizenfarbstoffe	§ 146 - 157

Kapitel V Die Praxis der mikroskopischen Färbetechnik

Färbungen in einer Farbe	§ 158
Übersicht über die wichtigsten Färbemöglichkeiten von Kernen, Plasma und Membranen	§ 159
Vorschriften für sukzedane Mehrfachfärbungen	§ 160
Wässerige Farblösungen	§ 160 - 170
Alkoholische Farblösungen	§ 171 - 176
Eisenbeizenfärbungen nach *Pfeiffer von Weilheim*	§ 177 - 178
Vorschriften für simultane Mehrfachfärbungen	§ 179 - 187
Die Verarbeitung von schwierig zu färbenden Objekten	§ 188

Kapitel VI Imprägnationen mit Metallen und Metallsalzen Nuklealreaktion

Goldimprägnation	§ 190 - 191
Silberimprägnation	§ 192 - 194
Osmiumimprägnation	§ 195
Imprägnation mit Metallsalzen	§ 196 - 202
Nuklealreaktion	§ 203

Kapitel VII Einschließen und Fertigmachen der Präparate

A. Das Einschließen der Präparate	§ 204 - 237
1. Flüssige Einschlußmedien	§ 205 - 207
Glycerin	§ 205
Kaliumacetat	§ 206
Paraffinum liquidum	§ 207
2. Erstarrende Einschlußmedien	§ 208 - 237
Gelatine	§ 209 - 219
Gummi arabicum	§ 220 - 229
Harze und Öle	§ 230 - 237
B. Das Fertigmachen der Präparate	§ 238 - 246
Reinigen der Präparate	§ 238
Lackrahmen	§ 239 - 244
Beschriftung	§ 245 - 246
C. Einige technische Bemerkungen	§ 247 - 248
Überführen der Objekte in Medien abweichender Dichte	§ 247
Die Verwendung des Dioxans	§ 248 - 250
Die Haltbarkeit der Präparate	§ 251

Zweiter Teil

Spezielle Untersuchungsmethoden

Kapitel VIII Bakterien

A. Allgemeines über Bakterien	§ 252 - 260
Morphologie, Cytologie	§ 252 - 253
Fortpflanzung, Kultur	§ 254 - 256
Fixiermethoden	§ 257 - 259
Färbemethoden	§ 260
B. Ausgewählte Beispiele zur Bearbeitung der Bakterien	§ 261 - 284
Eigentliche Bakterien	§ 261 - 274
Strahlenpilze	§ 275 - 276
Schleimbakterien	§ 277
Scheidenbakterien	§ 278
Schwefelbakterien	§ 279 - 280
Eisenbakterien	§ 281 - 283
Purpurbakterien	§ 284

Kapitel IX Algen

Allgemeines über Algen	§ 285 - 287
Sammeln, einfache Kulturen	§ 285
Fixiermethoden	§ 286
Färbemethoden	§ 287
I. Unterabteilung: Blaualgen	§ 288 - 295
A. Allgemeines	§ 288 - 290
Nomenklatur	§ 288
Fixiermittel	§ 289
Färbemethoden	§ 290

B. Ausgewählte Beispiele zur Bearbeitung der Blaualgen	§ 291 - 295
Rohkulturen	§ 291
Anfertigung morphologischer Präparate	§ 292
Totalfärbungen, Erhalten der natürlichen Farbe, vegetativer Aufbau, Thallusformen, Gallerthüllen, Plasmodesmen, Dauerzellen, Heterocysten	
Cytologische Präparate	§ 293
Chromatoplasma, Zentroplasma, Zelleinschlüsse	
Präparate zur Fortpflanzung der Blaualgen	§ 294
Zellteilung, Hormogonien, Sporen	
Bemerkungen zur Präparationstechnik der Blaualgen	§ 295
II. Unterabteilung: Kieselalgen	§ 296 - 308
A. Allgemeines	§ 296 - 297
Materialbeschaffung, Kultur	§ 296 - 297
Fixiermittel	§ 298
Färbemethoden	§ 299
B. Ausgewählte Beispiele zur Bearbeitung der Kieselalgen	§ 300 - 308
Lebendfärbungen an Kieselalgen	§ 301
Morphologische Übersichtsbilder	§ 302
Zellkern, Chromatophor, Porenkanäle, Gallerthüllen	
Cytologische Untersuchungen	§ 303
Kern und Kernteilungsfiguren	
Präparate zur Fortpflanzung der Kieselalgen	§ 304
Teilungen, Kopulation, Auxosporen, Mikrosporen, Dauerzellen	
Darstellung der Schalen	§ 305 - 308
a) Reinigung des Materials	§ 306, I
b) Entfernung der organischen Bestandteile	§ 306, II
c) Abschließende Reinigung der Schalen	§ 306, III
d) Einschluß der Schalen in Dauerpräparaten	§ 307
Einschlußmittel, Streu-, Typen- oder Reihenpräparate	
Querschnitte durch Kieselalgen	§ 308
III. Unterabteilung: Flagellaten	§ 309 - 314
A. Allgemeines	§ 309 - 311
Materialbeschaffung	§ 309
Fixierung	§ 310
Färbungen	§ 311
B. Ausgewählte Beispiele zur Bearbeitung der Flagellaten	§ 312 - 314
Gruppe der Euglenales	§ 312
morphologische Übersichtsbilder, cytologische Präparate	
Gruppe der Chrysomonaden und Chloromonaden	§ 313
Gruppe der Dinoflagellaten oder Peridineen	§ 314
Fixierung, Färbung, Fortpflanzung und Kultur	

IV. Unterabteilung: Armleuchteralgen § 315 - 321

A. Allgemeines § 315 - 318
Materialbeschaffung § 315
Fixierung § 316
Einbetten und Schneiden § 317
Färbungen § 318
B. Ausgewählte Beispiele zur Bearbeitung der Armleuchteralgen § 319 -321
Lebendbeobachtungen § 319
Die vegetativen Organe § 320
morphologische und cytologische Präparate, Sproßachsen, Knoten, Internodien, Wurzeln, Wurzelknötchen, Stachelkugeln
Die Fortpflanzung der Armleuchter-Algen § 321
Antheridien, Spermatozoiden, Oogonien, Zygoten

V. Unterabteilung: Konjugaten § 322 - 332

A. Allgemeines § 322 - 325
Materialbeschaffung § 322
Fixiermittel bei Konjugaten § 323
Färbemethoden für Desmidiazeen § 324
Färbemethoden für Zygnematazeen § 325
B. Ausgewählte Beispiele zur Bearbeitung der Konjuiaten § 326 - 332
I. Desmidiazeen (Zieralgen) § 326 - 330
Präparate in natürlichen Farben § 327
Morphologische gefärbte Präparate § 328
Cytologische Präparate § 329
Präparate zur Fortpflanzung § 330
Zellteilung, Konjugation, Zygotenbildung
II. Zygnematazeen (Jochalgen) § 331 - 332
Morphologische Präparate § 331
Cytologische Präparate § 332
Präparate zur Fortpflanzung. § 332 Ziff. 4-9

VI. Unterabteilung: Grünalgen § 333 - 341

A. Allgemeines § 333 - 335
Materialbeschaffung § 333
Fixierungsvorschriften § 334
Färbungen an Grünanlagen § 335
B. Ausgewählte Beispiele zur Bearbeitung der Grünanlagen § 336 - 341
Volvox und seine Verwandten § 336
Protococcales § 337
Tetraspora, Chlorococcum, parasitische Grünalgen,Pediastrum, Protosyphon
Conferven (Chaetophorales) § 338
Ulothrix, Ulva, Enteromorpha, Oedogonium, Trentepohlia
Siphonocladiales § 339
Cladophora, Dasycladus, Acetabularia, Sphaeroplea
Siphonales und Heterocontae § 340 - 341
Bropsis, Halimeda, Vaucheria
Schlußbemerkung zur Präparation der Grünalgen § 342

VII. Unterabtelung: Braunalgen § 343 - 348

A. Allgemeines § 343 - 346
Materialbeschaffung § 343
Fixierung der Braunalgen § 344
Einbetten und Schneiden § 345
Färben der Braunalgen § 346
B. Ausgewählte Beispiele zur Bearbeitung der Braunalgen § 347 - 348
I. Morphologische Präparate § 347
Totalpräparate kleiner Formen, histologische Präparate größerer Formen wie Fucus, Dictyota, Laminaria, Chorda
II. Präparate zur Fortpflanzung § 348
Fortpflanzungsorgane außen am Thallus wie Ectocarpus, Cutleria, Laminaria. Fortpflanzungsorgane in Vertiefungen des Thallus wie Fucus, Ascophyllum, Himanthalia.

VIII. Unterabteilung: Rotalgen § 349 - 358

A. Allgemeines § 349 - 354
Materialbeschaffung § 349
Fixierung der Rotalgen
Süßwasserformen § 350
Meeresflorideen § 351
Färben der Rotalgen
Süßwasserformen § 352
Meeresflorideen § 353
Einbetten und Schneiden § 354
B. Ausgewählte Beispiele zur Bearbeitung der Rotalgen § 355 - 358
I. Süßwasserflorideen § 355
Batrachospermum, Thorea
II. Meeresflorideen § 356
Morphologische Präparate § 356
fadenförmiger Thallus; gallertiger, blattartiger und krustenförmiger Thallus Bangia, Nemalion, Delesseria Corallina, Hildenbrandia
Präparate zur Fortpflanzung § 357
Ungeschlechtliche Fortpflanzung § 357
Sporen, Plumaria
Geschlechtliche Fortpflanzung § 358
Antheridien, Karpogonien, Cystokarpien, Carposporen, Chondrus, Gigartina

Kapitel X Pilze

I. Allgemeines über Pilze	§ 359 - 366
Untersuchung lebender Pilze	§ 360
Fixiermethoden bei höheren Pilzen	§ 361
Fixiermethoden bei niederen Pilzen	§ 362
Einbetten und Schneiden	§ 363
Färbemethoden bei höheren Pilzen	§ 364 - 365
Färbemethoden bei niederen Pilzen	§ 366
Färbemethoden bei Pilzhyphen im Gewebe höherer Pflanzen	§ 367
II. Ausgewählte Übungsbeispiele zur Bearbeitung der höheren Pilze	§ 368 - 376
A. Der vegetative Aufbau der höheren Pilze	§ 368
Stiel, Stroma, Milchgänge Psalliota, Amanita, Lactuaria	
B. Sporenbildung bei Basidomyceten	§ 369
Schnallenmycel, Basidienentwicklung Amanita, Boletus, Bovista	
C. Sporenentwicklung bei Ascomyceten	§ 370
Ascusenentwicklung Pyronema confluens, Morchella, Tuber rufus, Xylaria	
D. Die Sporen der höheren Pilze	§ 371
Untersuchung der Sporen, Sporenkeimung	
E. Chemische Untersuchungen an höheren Pilzen	§ 372 - 376
Diagnostische Reaktionen	§ 372 - 374
Pilzgifte	§ 375
Pilzfarbstoffe	§ 376
III. Ausgewählte Übungsbeispiele zur Bearbeitung der niederen Pilze	§ 377 - 420
Vorbemerkungen	§ 377
I. Unterabteilung: Schleimpilze	§ 378 - 387
A. Allgemeines	§ 378 - 382
Sammeln	§ 378
Fixieren der Schleimpilze	§ 379
Einbetten und Schneiden	§ 380
Färbungsmethoden	§ 381
Einschließen	§ 382
B. Ausgewählte Beispiele zur Bearbeitung der Schleimpilze	§ 383 - 387
Das Sporangium und seine Formen	§ 383
Sporen, Sporenkeimung	
Das Amöbenstadium, Plasmodium	§ 384 - 386
Parasitische Plasmodien	§ 387
II. Unterabteilung: Algenpilze	§ 388 - 391
A. Allgemeines	§ 388 - 389
Sammeln	§ 388
Fixierung und Färbung	§ 389
B. Ausgewählte Beispiele zur Bearbeitung der Algenpilze	§ 390 - 391
Oomyceten	§ 390
Synchytrium, Olpidium, Saprolegnia, Peronospora, Phytophtora	
Zygomyceten	§ 391
Mucor, Pilolobus, Rhizopus	

III. Unterabteilung: Niedere Basidiomyceten § 392 - 397

A. Allgemeines § 392-394
Materialbeschaffung § 392
Fixierung § 393
Färbungen § 394
B. Ausgewählte Übungsbeispiele zur Bearbeitung der niederen Basidomyceten § 395 - 397

Brandpilze § 395
Sporen, Sporenkeimung, histologische Präparate befallener Pflanzen
Rostpilze § 396
Sporen, Sporenkeimung, histologische Untersuchungen
Exobasidien § 397

IV. Unterabteilung : Niedere Ascomyceten § 398 - 408

A. Allgemeines § 398 - 399
Materialbeschaffung § 398
Fixieren und Färben § 399

B. Ausgewählte Übungsbeispiele zur Bearbeitung der niederen Ascomyceten § 400 - 408

Hemiascineae (Protomyces) § 400
Saccharomyceten § 401 - 404
Hefearten, Hefekulturen, Färbungen
Exoascaceae § 405
Taphrina
Plectascineae § 406
Fäulnis- und Schimmelpilze, Aspergillus, Penicillium
Pyrenomyceten § 407
Meltaupilze, Xylaria, Nectria, Claviceps purpurea
Discomyceten § 408
Lachnea, Peziza, Rhytisma, Sclerotinia

V. Unterabteilung: Fungi imperfecti § 409 - 420

A. Allgemeines § 409 - 410
Materialbeschaffung § 409
Fixieren und Färben § 410
B. Ausgewählte Beispiele zur Bearbeitung der Fungi imperfecti § 411 - 420
Sphäropsidales § 411
Phyllosticta, Phoma, Dothiorina
Melanoconiaceae § 412 - 413
Gloeosporium
Hyphomycetae § 414 - 418
Oospora, Torula, Fusarium, Tubercularia
Mycelia sterilia § 419 - 420
Sclerotium, Rhizoctonia, Rhizomorpha, Mykorrhiza, Pilzgallen
Untersuchungstechnik der Fungi imperfecti § 413 u. 420

Kapitel XI Flechten

A. Allgemeines § 421 - 429
Materialbeschaffung § 421
Fixiermittel § 422
Einbetten und Schneiden § 423
Anfertigen von Dünnschliffen § 424
Färben der Flechtenschnitte § 425 - 428
Mikrochemische Untersuchungen § 429
B. Ausgewählte Beispiele zur Bearbeitung der Flechten § 430 - 443

I. Laub-, Strauch- und Rindenflechten § 431 – 439

1. Vegetativer Aufbau der Flechten § 431
Homöomerer Thallus - Collema
Heteromerer Thallus - Xanthoria, Usnea, Graphis, Ephebe Cephalodien
Krustenförmiger Thallus
2. Vegetative Vermehrung der Flechten § 432
Soredien - Lepraria, Lepra, Insidien
3. Die Flechtenfrucht § 433
Apothezien § 434
Perithezien § 435
Podetien § 434
Stylosporen § 437
Spermogonien § 438
Trichogyn und Ascogon § 439
Färbungen § 436 – 439

II. Steinflechten § 441 – 445

Kalkflechten § 441
Kieselflechten § 442
Präparation der Kalkflechten § 443
Schneiden nach dem Entkalken § 443 Ziff. 2
Dünnschliffe § 443 Ziff. 3
Flächenschliffe, Querschliffe, Einschließen der Schliffe, Färben von Schliffen mit und ohne Auflösen des Kalksteines
Präparation der Kieselflechten § 444 - 445
Anfertigen von Schnitten § 444
Anfertigen von Querschliffen § 445

Kapitel XII Moose

A. Allgemeines § 446 - 461
Materialbeschaffung § 446
Fixiermethoden § 447
Einbetten und Schneiden § 448 - 451
Färbemethoden bei Laub- und Torfmoosen § 452 - 456
Färbemethoden bei Lebermoosen § 457 – 461

B. Ausgewählte Beispiele zur Bearbeitung der Moose	§ 462 – 478
I. Laubmoose	§ 462 - 470
Materialbeschaffung	§ 462
A. Vegetativer Aufbau des Gametophyten	§ 463 - 468
Protonema	§ 463
Brutkörper	§ 464
Moosstämmchen	§ 465
Sproßachse	§ 466
Blätter	§ 467 - 468
B. Sexualorgane des Gametophyten	§ 469
Antheridien, Archegonien	
C. Der Sporophyt	§ 470
Embryoentwicklung	
Der ausgewachsene Sporophyt	
Die Sporogonentwicklung	
Alte Sporogone und Sporen	
II. Torfmoose	§ 471 - 474
Materialbeschaffung	§ 471
A. Vegetativer Aufbau des Gametophyten	§ 472
Protonema (Kultur)	§ 472 Ziff. 1
Torfmoosstämmchen	§ 472 Ziff.2
Blätter	§ 472 Ziff.3
B. Die Sexualorgane des Gametophyten	§ 473
Antheridien	§ 473 Ziff.1
Archegonien	§ 473 Ziff.2
C. Der Sporophyt	§ 474
Embryo, Sporophyt, Sporen	
III. Lebermoose	§ 475 - 478
Materialbeschaffung	§ 475
A. Vegetativer Aufbau des Gametophyten	§ 476
Protonema, Gemmen, Brutkörper Thallusformen,	
Moosstämmchen, Blätter	
B. Die Sexualorgane der Lebermoose	§ 477
Antheridien, Antheridienstände, Archegonien	
C. Der Sporophyt	§ 478
Embryo, im Thallus eingesenkte Sporogone	
gestielte Sporogone, Fruchtsack, Sporen und Elateren	

Kapitel XIII Farnpflanzen

A. Allgemeines § 479
B. Ausgewählte Beispiele zur Bearbeitung der Farne § 480 - 527

I. Eigentliche Farne § 480 - 510

A. Allgemeines § 479
Fixiermittel für Farne § 480
Einbetten und Schneiden § 481
Färbemethoden bei Farnen § 482

B. Übungsbeispiele
1. Der Aufbau des Sporophyten § 483 - 493
Wurzel § 484
Rhizom § 485
Stengel und Stamm § 486
Blätter § 487 - 489
Spreuschuppen § 490
Brutknospen, Blattknospen § 491
Sporangien § 492
Sporen § 493
2. Der Aufbau des Gametophyten § 494 - 500
Vorkeim, Kultur § 495 - 497
Antheridien § 498
Spermatozoiden § 500
Archegonien § 499
Befruchtung § 500

II. Wasserfarne § 501 - 506

A. Allgemeines
Materialbeschaffung § 501
Fixierung § 502
Einbetten und Schneiden § 503
Färbemethoden § 504
B. Übungsbeispiele
1. Der Aufbau des Sporophyten § 505
Stengel, Rhizom, Blätter
2. Sporokarpien § 506
Mikro- und Makrosporangien
3. die Gametophyten § 505 - 506

III. Schachtelhalme § 507 - 520

A. Allgemeines
- Materialbeschaffung § 507
- Fixierung § 508
- Schneiden, Einbetten § 509
- Färben § 510

B. Übungsbeispiele
1. Der Aufbau der Sporophyten § 511 - 517
   - Wurzeln, Rhizom, Rhizomknollen § 511
   - Stengel § 512
   - Knoten § 513
   - Blätter § 514
   - Darstellung der Verkieselung § 515
   - Das Sporangium § 516
   - Sporen § 517
2. Der Gametophyt § 518 - 520
   - Keimung der Sporen, Prothalliumentwicklung § 518
   - Antheridien § 519
   - Archegonien § 520

IV. Bärlappgewächse § 521 - 527

A. Allgemeines
- Materialbeschaffung § 521
- Fixierung § 522
- Schneiden, Einbetten § 523
- Färben § 524

B. Übungsbeispiele
1. Lycopodium
   - Sporophyt, Sporangium § 525 Ziff. 1
   - Gametophyt § 525 Ziff. 2
2. Selaginella
   - Materialbeschaffung § 526
   - Sporophyt § 526 Ziff. 1
   - Gametophyt § 526 Ziff. 2
3. Isoetes
   - Materialbeschaffung § 527 Ziff. 1
   - Sporophyt § 527 Ziff. 1
   - Blätter § 527 Ziff. 2
   - Wurzeln § 527 Ziff. 3
   - Sporophyll, Sporangium § 527 Ziff. 4
   - Gametophyt § 527 Ziff. 5

Kapitel XIV: Verschiedene Tabellen

§ 528

Kalendarium für das Sammeln oder Anlegen von Kulturen einiger wichtiger oder leicht erreichbarer Untersuchungsobjekte

Tabelle I	Objekte, die da ganze Jahr erhältlich sind
Tabelle II	Objekte nach Jahreszeit geordnet
Tabelle III	Blütezeiten und Sporogonreife einiger Laubmoose

§ 529

Indikatoren zur Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration

§ 530

Verzeichnis der Brechungsexponenten einiger Einschluß- und Beobachtungsmittel

§ 531

Verzeichnis der im Text erwähnten Chemikalien, Reagenzien und sonstiger Hilfsmittel sowie ihrer Eigenschaften

§ 532

Zusammenstellung der Eigenschaften einiger häufiger in der Literatur genannten organischen und anorganischen Farbstoffe

§ 533

Literaturnachweis

§ 534

Sachwortverzeichnis

Vorwort

Dieses Buch hat sich gewissermaßen von selbst geschrieben. In dreißigjähriger Beschäftigung mit der einheimischen Kryptogamenflora hat sich eine Sammlung von Notizzetteln, Präparationsaufzeichnungen und Sonderdrucken ergeben, die schließlich nur noch einer ordnenden Hand bedurften, um die Grundlage für ein Lehrbuch abzugeben. Der Weg zum druckreifen Manuskript war dann nicht mehr lang.

Das Buch soll in erster Linie dem Studenten und dann zum Selbststudium dienen, es ist also für den Anfänger bestimmt; es muß trotzdem elementare botanische Kenntnisse und die grundlegenden Fertigkeiten der mikroskopischen Technik voraussetzen, bietet jedoch eine erschöpfende Darstellung der speziellen Methoden zur Beschäftigung mit den Kryptogamen. Ich habe versucht, allen Anforderungen eines Lehrbuches gerecht zu werden. Im **ersten Teil** wurde die allgemeine Technik der Kultur der Untersuchung und der Präparation so ausführlich dargestellt, daß dessen Lektüre einen Überblick über die zur Zeit gebotenen technischen Möglichkeiten bietet. Die hier geschilderten Verfahren sind den Eigenheiten der Kryptogamen angepaßt und können nicht ohne weiteres für das Studium der Phanerogamen oder zoologischer Objekte angewandt werden.

Im **zweiten Teil** wurden nun die einzelnen Gruppen der Kryptogamen besprochen. Hier habe ich bei den Übungsbeispielen nur die verläßlichsten und auch für den Anfänger sichersten Arbeitsmethoden angeführt. Der Geübtere kann unter Zurateziehen des allgemeinen Teiles und der Tabellen, insbesondere des Farbstoffverzeichnisses, unschwer weitere Methoden zusammenstellen, falls die Notwendigkeit dazu gegeben sein sollte oder er Lust zum Experimentieren hat.

Etwas ausführlicher, als es im allgemeinen üblich ist, bin ich auf die Materialbeschaffung und auf die Fragen eingegangen, die sich um die Farbstoffe und das Färben allgemein einzustellen pflegen.

Daher hoffe ich, daß auch der Fachbotaniker das Buch nicht ohne Nutzen aus der Hand legen wird, obwohl sich der Verfasser Einschränkungen hat auferlegen müssen und vielleicht mancher eine liebgewonnene Methode vermissen wird. So sind die Arbeitsmethoden mit dem gesundheitsschädlichen Dioxan nicht so ausführlich wie andere Methoden gebracht.

Solche Einschränkungen sind notwendig, um den Anfänger nicht zu verwirren. Es ist jedoch von mir nirgends versäumt worden, durch Literaturhinweise denen den Weg zu ebnen, die als Spezialisten für ein Sondergebiet in die Tiefe gehen wollen.

Um den Gebrauch des Buches zu erleichtern, ist es in Paragraphen eingeteilt worden, was den Vorteil bietet, im Text leicht Hinweise auf andere Stellen des Buches zu geben. Außerdem ist es so kurz wie möglich abgefaßt worden, um den Umfang tunlichst zu beschränken. Im letzten Teil sind dem Buche ausführliche Tabellen beigegeben, die über Farbstoffe und Chemikalien Auskunft geben, die besten Zeiten für Sammeln und Kultivieren ausweisen, kurz, um durch rasches Nachschlagen dem Leser am Mikroskopiertisch bei auftretenden Fragen den Gebrauch des Buches zu erleichtern.

Ursprünglich bestand die Absicht, dem Buch eine Reihe von Abbildungen, und zwar Mikrophotographien nach Präparaten, beizugeben. Wegen der Ungunst der Verhältnisse mußte leider davon Abstand genommen werden. In einer Zeit, in der Papier und Schreibmaschinenbänder schon Kostbarkeiten geworden sind, war es dem Verfasser unmöglich, photographische Platten und Papiere zu erhalten.

Zum Schlusse ist es mir Bedürfnis, dem Verlag dafür meinen Dank auszusprechen, daß er es ermöglichte, allen Schwierigkeiten zum Trotz, das Buch jetzt erscheinen zu lassen.

Erlangen, im Herbst 1949 *Dr.Franz Schömmer*

Schömmers „Kryptogamenpraktikum“ ist heute in Vergessenheit geraten, denn es wurde nie wieder aufgelegt. Um dieses grundsolide Werk, geschrieben von einem kenntnisreichen Praktiker, der offenbar die angegebenen Methoden auch selbst ausprobiert hatte, interessierten Mikroskopikern erneut zugänglich zu machen, wurde der gesamte Text eingescant, neu formatiert und auf CD gebrannt. Die CD enthält somit praktisch ein Reprint des Buches, allerdings mit kleinen Änderungen, welche dem heutigen Leser den Umgang mit dem Text erleichtern sollen.

Unverändert blieb die von *Schömmer* gewählte sehr übersichtliche Gliederung und der Text selbst, allerdings wurden gelegentliche Ausdrucksmängel geglättet, ferner wurden oft mehrere kleine Absätze zu einem größeren zusammengefaßt, um die Lesbarkeit, insbesondere am Bildschirm, zu verbessern.

Die heute nicht mehr gebräuchlichen Bezeichnungen der Chemikalien wurden konsequent durch die heute üblichen ersetzt, allerdings wurden eingebürgerte Trivialnamen, wie „Sublimat“ oder „Chromsäure“ beibehalten; in Zweifelsfällen sind die von Schömmer verwendeten Bezeichnungen

geblieben. Im Anhang sind den Chemikalien die damals üblichen Bezeichnungen in Klammern hinzugefügt, um dem Leser das Verständnis der zeitgenössischen Literatur zu erleichtern. (§ 531).

Wenn aus heutiger Sicht Ergänzungen oder Kommentare nötig erschienen, sind diese in eckigen Klammern den Paragraphen angefügt.

Die von *Schömmer* zusammengetragenen Arbeitsvorschriften haben auch heute noch ihren Wert, allerdings mit einigen kleinen Einschränkungen:

1. Manche Chemikalien sind nur noch schwer erhältlich, wie z.B. „Holzessig“.
2. Einige kofektionierte Farbstoffgemische unbekannter Rezeptur sind nicht mehr im Handel, z.B. Produkte der *Firma Dr.Grübler.*
3. Gelegentlich mag es vorkommen, daß eine Färbung mißlingt, da sich die modernen Farbstoffe bei identischem Namen von den damaligen unterscheiden oder aber, weil bestimmte stark färbende Verunreinigungen heute fehlen; letzteres gilt z.B. für das zu reine „Orange-G“, das für die in der Zoo-Histologie vielfach angewandte Azanfärbung nur noch bedingt zu gebrauchen ist.

Trotz dieser Einschränkungen kann das vorliegende Werk allen Mikroskopikern auch heutzutage, mehr als 50 Jahre nach dem Erscheinen, nur sehr empfohlen werden.

Abschließend noch einige Bemerkungen zum Umgang mit den im Text genannten Chemikalien. Die heute zu beobachtende Hysterie im Umgang mit giftigen Chemikalien ist gänzlich unangebracht - selbst mit starken Giften kann man auch als Liebhaber unbedenklich umgehen, sofern man die üblichen elementaren Vorsichtsmaßregeln einhält. Eine Sonderstellung nehmen flüchtige Gifte ohne charakteristischen Warngeruch ein, wie Phosgen, Dimethylsulfat oder Blausäure, aber mit diesen Stoffen hat man es in der Mikrotechnik ohnehin nicht zu tun. Vor zwei Chemikalien sei allerdings gewarnt:

Benzol, akut nicht sonderlich giftig, führt bei längerem Kontakt zu Leukämie und anderen Arten von Krebs, und das auch schon in Konzentrationen, die mit dem Geruchssinn nicht wahrgenommen werden können. Man sollte daher diesen Stoff völlig meiden. Als *Lösungsmittel* läßt sich Benzol stets durch das unbedenkliche Toluol ersetzen, als *Intermedium* allerdings nicht, da Toluol einen deutlich höheren Siedepunkt besitzt - hier greife man auf andere Intermedien zurück.

Quecksilbersalze sind nicht nur giftig und korrosiv, sie können zudem zu sehr schweren chronischen Vergiftungen führen, da Quecksilber, wie andere Schwermetalle auch, über die Nieren nur sehr langsam ausgeschieden wird. Will man sich über einen längeren Zeitraum mit Objekten beschäftigen, für deren Fixierung sublimathaltige Lösungen empfohlen werden, sollte man stets in einem Vorversuch klären, ob nicht andere Fixierlösungen dasselbe leisten. Nach meinen Erfahrungen ist dies in aller Regel der Fall.

Auf die Gefahren von **Flußsäure, Osmiumtetroxid** und **Chlordioxid** wird im speziellen Teil hingewiesen.

Die im Text aufgeführten Chemikalien und Farbstoffe bezieht man am besten über die *Firma Chroma*, die auf derartige Produkte spezialisiert ist (ein Katalog ist der CD beigegeben), ggf. über die *Firma Merck*. Die üblichen Glasgeräte erhält man über Lehrmittelhandlungen.

Hamburg, im Frühjahr 2000 *Dr.G.Rosenfeldt*

ERSTER TEIL

Allgemeine Untersuchungsmethoden

Zur Einführung

§ 1. Das Arbeiten mit Kryptogamen gilt allgemein als schwierig. Ob mit Recht, mag dahingestellt sein. Sicher ist jedoch, daß sich Mißerfolge und Schwierigkeiten einzustellen pflegen, sowie man sich an das Untersuchen und Präparieren der Kryptogamen heranwagt, insbesondere, wenn man dies als Autodidakt unternimmt. Die Schwierigkeiten liegen vor allem darin, daß dem Untersucher keine leicht zugängliche Literatur zur Verfügung steht. Die botanischen Praktika haben alle einen ausgezeichneten allgemeinen Teil über die botanische Mikrotechnik. Im speziellen Teil jedoch wird vielfach nur die Präparationstechnik der Phanerogamen ausführlich behandelt. Bei den Kryptogamen werden dann die technischen Hinweise spärlicher. Der Leser, der dann diese Pflanzengruppe nach den Hinweisen des allgemeinen Teiles zu behandeln versucht, scheitert an unvorhergesehenen großen Schwierigkeiten.

Die Kryptogamen müssen eben vielfach ***anders*** behandelt werden als die Phanerogamen. Wer sich einmal mit den hier notwendig abgeänderten Arbeitsmethoden vertraut gemacht hat, wird finden, daß sich die Kryptogamen ebenso leicht technisch bearbeiten lassen wie die Phanerogamen.

Die Literatur über die Untersuchungstechnik der Kryptogamen ist umfangreich. Alle Angaben sind jedoch zerstreut in zahlreichen Dissertationen und vielen Aufsätzen in den verschiedensten Zeitschriften. Dieses Schrifttum ist aber schwer zugänglich. In vielen botanischen Praktika wird das Hauptgewicht natürlich darauf gelegt, Botanik zu lehren und dazu - soweit dies nötig erscheint - den Leser auch technisch in den Stand zu setzen, eigene Untersuchungen anzustellen.

Dieses Buch will einen anderen Weg gehen. Es will die Untersuchungstechnik lehren. Es lehrt daher keine Botanik, sondern setzt beim Leser im allgemeinen ein gerütteltes Maß botanischen Wissens voraus, sowie die elementaren Kenntnisse und Fertigkeiten der mikroskopischen Technik (1). Der Leser findet daher in diesem Buche eine knappe, kurze, aber doch ausreichende Darstellung der Untersuchungstechnik und der Präparationsmethoden einheimischer Kryptogamen. Die folgenden Kapitel des Buches machen bekannt mit allen Besonderheiten, die eben die Kryptogamen aufweisen. Eigentlich botanische Hinweise werden nur spärlich gegeben, und zwar meistens nur dann, wenn es nötig erscheint, die Angaben der meistgebrauchten Lehrbücher für die speziellen Zwecke dieses Buches etwas zu ergänzen.

Im **allgemeinen Teil** wird versucht, die Technik so ausführlich zu schildern, daß nicht nur derjenige mit Aussicht auf Erfolg arbeiten kann, der über eine laboratoriumsmäßige Ausstattung verfügt, sondern daß auch der Liebhaber mit bescheidener Ausrüstung seine Ziele erfolgreich ansteuern kann. Ausführlicher als gewöhnlich wird über Farbstoffe und Färben gesprochen. Zusammen mit einer Farbstofftabelle am Schlusse des Buches werden diese Ausführungen manche Frage beantworten können, die beim Arbeiten auftauchen kann.

Im **speziellen Teil** sind alle Gruppen mitteleuropäischer Kryptogamen behandelt worden. Der Leser kann sich daher auch über die seltenen Formen Rat holen. Zur besseren Übersicht der Methoden sind Übungsbeispiele angeführt, die aber nur wenige zuverlässige Arbeitsmethoden schildern. An diese mag sich der Anfänger zunächst halten. Der Geübtere wird ja an Hand der ausführlichen Darstellungen des allgemeinen Teiles bald den so reizvollen Schritt ins Neuland tun können. Die Übungsbeispiele wurden ferner so ausgeführt, daß sie bei ihrer auch nur teilweisen Durcharbeitung mit fast allen Typen einheimischer Kryptogamen bekannt machen. Die meisten Leser werden sich nicht alles Material beschaffen können. Jede Lokalflora bietet aber so viel, daß immer Material genug vorhanden sein wird, das dem im Buche speziell genannten gleichwertig ist.

Für die Benutzung des Buches, besonders beim Studium der Technik, mögen noch kurz einige Hinweise gestattet sein:

Technisch am leichtesten sind die morphologischen Präparate herzustellen. Zweckmäßig beginnt daher der Anfänger mit diesen. Schnitte anatomischer Art würden dann die zweite Stufe des Autodidakten bilden. Größere Schwierigkeiten treten hier meistens nicht auf. Anders ist es

jedoch mit den cytologischen Studien. Diese gehören zu den schwierigen Arbeitsgebieten. Es ist zweckmäßig, sich an solche erst dann heranzuwagen, wenn die gewöhnlichen morphologischen und anatomischen Präparate einschließlich der Einbettungs- und Schneidetechnik keine Schwierigkeiten mehr bieten.

Beim Färben beschränkt man sich zunächst auf eine Methode oder wenigstens auf einige wenige. Besonders empfehlenswerte Vorschriften sind in diesem Buche immer genügend deutlich als solche gekennzeichnet worden. Darunter wird sich immer etwas nach dem eigenen Geschmack finden lassen. Ferner werden zur Erlernung der Technik die Arbeiten vom Leser zweckmäßig nicht nach der Reihenfolge der Pflanzen im botanischen System, sondern nach gestaffelten technischen Schwierigkeiten und Anforderungen gewählt.

Bei natürlich gefärbten morphologischen Totalpräparaten beginnt man zweckmäßig mit Moosen, geht dann zu den Armleuchter-Algen und Algen über und schließt hieran Prothallien von Farnen und Schachtelhalmen sowie Moosvorkeime.

Hinsichtlich der Schneidetechnik sind die leichteren Untersuchungsobjekte unstreitig die Sporophyten der eigentlichen Farne, ferner die Bärlappe und die höheren Pilze. Schwieriger zu schneiden sind die Wasserfarne, die Schachtelhalme, Selaginella sowie die Flechten. Einer besonderen Einarbeitung bedürfen die Moose.

Zellteilungsstudien versuche man zuerst an Objekten, die solche schon am Totalpräparat gestatten wie manche Algen, auch niedere Pilze. Erst später wage man sich an Schnitte.

Die nur orientierende Beschäftigung mit den Bakterien im Rahmen dieses Buches bietet, abgesehen von Geißelfärbungen, keine Schwierigkeiten.

(1) Elementare Kenntnisse vermittelt unter anderem auch: Georg Stehli, *Mikroskopie für Jedermann*, Stuttgart, Franckh'sche Verlagshandlung, 1948.

Kapitel I Instrumentarium und Material

A. Das Instrumentarium

a. Größere Instrumente

§ 2. Zur Untersuchung und Bearbeitung der Kryptogamen sind an größeren Instrumenten notwendig: Mikroskop, Präparierlupe, Mikrotom, Einbettofen und Handzentrifuge.

Die Kenntnis des Baues und des Gebrauches dieser Instrumente muß hier vorausgesetzt werden. Beschreibungen davon sind in allen Werbeschriften der Firmen sowie in den größeren allgemeinen Handbüchern über mikroskopische Technik zu finden.

Mikroskope werden jetzt bereits billig angeboten. Für recht viele Untersuchungen an Kryptogamen sind schon schwache bis mittlere Vergrößerungen ausreichend, doch braucht man für manche Zwecke (Diatomeen, Sporen und Bakterien) noch eine Ölimmersion. Unerläßlich ist ein Okularmikrometer für Messungen unter dem Mikroskop. Wo es sich finanziell ermöglichen läßt, ist unbedingt für Benützung einer Einrichtung zur stereoskopischen Betrachtung zu sorgen. Erst bei räumlicher Betrachtung enthüllen viele Objekte ihr letztes Geheimnis. Besitzt man schon ein Mikroskop für monokulare Betrachtung, kann vielfach ein Aufsatz für binokulare Beobachtung nachträglich angepaßt werden.

Wünschenswert sind ein Kreuztisch, ferner Einrichtungen für Dunkelfeld, Polarisationsvorrichtung, Zeichenapparat und mikrophotographische Ausrüstung. Bei Erstanschaffung eines Mikroskopes sollte unbedingt ein solches Instrument gewählt werden, an das die oben genannten Ergänzungen angebracht werden können.

Schließlich ist eine gute Mikroskopierlampe selbstverständlich.

Eine Präparierlupe ist unerläßlich. Am besten sind binokulare Präparierstative, die in verschiedenster Ausführung zum Beispiel von LEITZ in Wetzlar oder ZEISS in Jena hergestellt werden. Es gibt einfache und entsprechend billige Modelle, die besonders für das Präparieren und das Färben bzw. das Differenzieren sehr brauchbar sind. In Verbindung mit einem Stativ können sie vielfach als binokulare Mikroskope zum Studium der fertigen Präparate bei mäßigen Vergrößerungen benützt werden.

Ein Mikrotom ist der Wunschtraum aller mikroskopierenden Botaniker, denn Handschnitte befriedigen auf die Dauer niemanden. Sehr zu empfehlen sind die billigen Mikrotome der Firma JUNG in Heidelberg. Man beschaffe sich unbedingt ein Modell, das die Anfertigung von Zelloidin- und von Paraffinschnitten gestattet. Dann können auch Schnitte mit uneingebettetem Material hergestellt werden. Gefriermikrotome sind für unsere Zwecke ungeeignet.

Der Einbettofen ist für die Paraffineinbettung notwendig. Die deutsche Industrie stellt sehr verläßliche und preiswerte Öfen für elektrische und für Gasheizung her. Wer sparen muß, kann sich als Bastler aus zwei verschieden großen Blechdosen ein recht brauchbares Kombinat zusammenbauen. *K.Löffler* hat im Mikrokosmos, 21.Jahrg. 1927/28, S.6, einen derartigen Paraffinofen für einfache Ansprüche beschrieben, den ich nur empfehlen kann.

Eine Handzentrifuge ist nötig zur Bearbeitung einiger Algengruppen wie der Diatomeen, der Flagellaten, ferner von Hefepilzen, Sporen, anderen Kleinpilzen und ähnlichen Objekten.

b. Kleinere Utensilien und Instrumente

§ 3. Man benötigt zur mikroskopischen Arbeit Rasiermesser, verschiedene Skalpelle, gerade und gebogene Scheren verschiedener Größe. Ferner: Zupfnadeln, zum Teil mit Lanzettspitze; Pinzetten verschiedener Größe, außerdem sogenannte Schnittheber und Spatel, zugeschnittenes Filtrierpapier, etwa von Objektträgergröße.

Objektträger werden in verschiedener Größe gebraucht. Für die meisten Arbeiten genügt das übliche Format 26 x 76 mm. Für Totalpräparate von Moosen in natürlicher Farbe sind größere Objektträger bis 40 x 76 mm unerläßlich. Es gibt hier eine Reihe von Zwischengrößen. Objektträger aus Quarz und Deckgläser aus Quarz oder aus Glimmer sind nötig für das Veraschen der Schnitte zwecks Darstellung der Verkieselung.

Deckgläser gebraucht man ebenfalls in verschiedener Größe, angefangen von 18 x 18 mm, über 21 x 26 mm bis 40 x 50 mm.

In einen Glasstab eingeschmolzenen Platindraht, ferner ein Platinblech 2 x 2 cm.

Igelstacheln, Kaktusstacheln oder ähnliche als Präpariernadeln verwendbare Objekte werden an Glasstäbe angekittet, z.B. mit Wasserglas oder Kanadabalsam. Solche Instrumente werden benötigt zum Transport der Objekte aus und in Reagenzien, die Metalle angreifen, wie Jodlösungen, Goldlösungen, Quecksilberlösungen usw.

Schweinsborsten, am besten von den Augenwimpern, sind nötig zum Legen von Reihenpräparaten von Diatomeen.

Haarschlingen nach *Speemann*, aus längeren Schweinsborsten, Roßhaaren, Menschenhaaren usw. von verschiedener Ösengröße sind zum Transport kleinster loser Objekte wie Schnitte, Algen und ähnlichen zarten Objekten sehr bequem. Nach *Graupner* (2) stellt man sich diese wie folgt her: "Man zieht eine Glaspipette aus, fügt eine Haarschlinge ein und schmilzt das Haar fest, indem man ein kleines Stück Paraffin in den Pipettenhals steckt, so daß es möglichst nach der Spitze zu liegen kommt, und erwärmt."

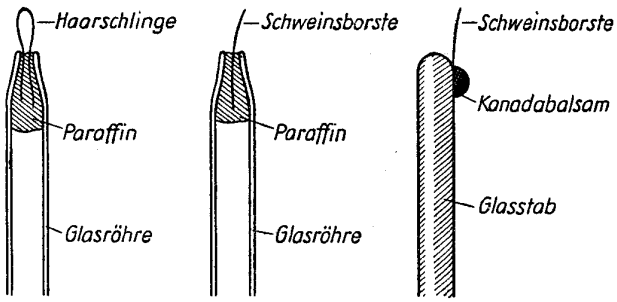
Um die Liste der benötigten Utensilien zu vervollständigen, seien noch als notwendig angeführt: Glasschalen und Uhrgläser verschiedener Größe. Kleine Schalen aus Porzellan. Eine halbweiße und halbschwarze Porzellanplatte als Arbeitsunterlage, ferner sogenannte Präparategläser zum Fixieren und Aufbewahren der Untersuchungsobjekte, größere Glastuben zum Färben der auf Objektträger aufgeklebten Schnitte. *Fairchildsche* Siebeimerchen verschiedener Größe zum Auswaschen der fixierten Objekte. Glaspipetten, einige Glasstäbe, einige Reagensgläser, einige Meßgefäße verschiedener Größe, eine Spritzflasche für destilliertes Wasser, eventuell einige Spitzgläser, Bechergläser und Erlenmeyerkolben. Man läßt sich am besten Kataloge verschiedener Firmen kommen und wählt dann das persönlich Zusagende aus.

Das Reinigen von Glaswaren geschieht am besten mit dem Putzmittel IMI der HENKEL-PERSIL-Werke, das sich in jedem Haushalt vorfindet. Fettfrei werden Objektträger, wenn sie außerdem noch einige Zeit mit einem Gemisch von Brennspiritus und Äther zu gleichen Teilen behandelt und dann mit einem trockenen Tuch abgerieben werden. Alle Tücher zum Abtrocknen von Glassachen dürfen nicht fasern, sonst bringt man diese Fasern als Verunreinigungen in *jedes* Präparat. Gilt es ganz besonders reine Objektträger und Deckgläser zu verwenden, reinigt man sie nach *E.Merck* (3) auf folgende Weise:

„100 g Kaliumdichromat werden in 1 Liter Wasser in der Wärme gelöst und nach Erkalten unter Umrühren 100 ccm Schwefelsäure hinzugegossen. Die Glassachen können 1 - 3 Tage in dieser Lösung liegen und werden in verdünnte Natronlauge gebracht und mit viel Wasser mehrere Stunden gewaschen. Trocknen, eventuell in Trockenschrank. Aufbewahren in Äther- Alkohol."

Abb.1

Haarschlingen und Schweinsborsten in Glasröhrchen oder am Glasstab (§ 3)



(2) H.Graupner, *Mikroskopische Technik* (Taschenbuch der biologischen Untersuchungsmethoden I), Leipzig, Akademische Verlagsgesellschaft 1934, 5.140

(3) E.Merck, *Medizinisch-chemische Untersuchungsmethoden*, Darmstadt, Selbstverlag von E.Merck, 1939

B. Die Beschaffung des Untersuchungsmaterials

I. Das Sammeln

§ 4. Die Beschaffung des Materials geschieht in erster Linie durch eigenes Sammeln. Es ist dies eine zwar geistig und körperlich überaus anstrengende Tätigkeit, die aber Gelegenheit gibt, unsere schöne Heimat so recht kennen und lieben zu lernen.

Im Gegensatz zu den Phanerogamen, die ja Feld und Wald aufbauen und uns auf Schritt und Tritt begleiten, müssen die Kryptogamen meist erst gesucht werden. Es kann nicht Aufgabe dieses Buches sein, all die Örtlichkeiten aufzuzählen, an denen Kryptogamen zu erwarten sind. Darüber geben die floristischen Werke erschöpfenden Aufschluß.

Für das Einsammeln parasitischer Pilze ist der Besitz der Hilfsbücher von *Lindau* (4) eine große Unterstützung. Diese Bücher geben nach Art eines Wörterverzeichnisses an, welche parasitischen Pilze auf den verschiedenen Wirtspflanzen, auf Holz, Erde, Mist und sonstigen tierischen Substraten bei uns in der Heimat vorkommen. Man sieht erst aus diesem Buche so recht deutlich, wie reichhaltig unsere Flora ist. So werden z.B. auf der Buche (*Fagus silvatica*) über 250 verschiedene parasitische Pilze vorgefunden, welche Blätter, Äste und Stamm als Epiphyten bevölkern!

Eines wollen wir jedoch beim Sammeln immer bedenken. Wir wollen nicht zur Vernichtung der einheimischen Flora beitragen! Seltene Arten lasse man lieber stehen, als daß man sie am Standort ausrottet. Die häufigeren Arten geben bestimmt so viel Untersuchungsmaterial ab, daß ein Menschenleben nicht ausreicht, alles zu bearbeiten. Vieles, das man selbst nicht vorfindet, weil es eben in der Lokalflora fehlt, kann man aus botanischen Gärten erhalten, von Aquariengeschäften beziehen oder bei bekannten Botanikern eintauschen.

Sammeln kann man nach zweierlei Gesichtspunkten. Erstens kann man zunächst alle Gruppen der Kryptogamen in typischen Vertretern durcharbeiten. Anregungen dazu findet der Leser in den folgenden Übungsbeispielen in großer Zahl. Ich rate jedem Mikroskopiker, diesen Weg einzuschlagen und das unausbleibliche Spezialisieren auf eine besondere Gruppe Algen oder Moose usw. erst dann zu beginnen, wenn eine genügend umfangreiche Übersicht über alle Formen der Kryptogamen erarbeitet ist.

Der Spezialist sammelt natürlich nach anderen Gesichtspunkten. Innerhalb seines engen Gebietes sucht er alles zu erreichen, was nur irgendwie möglich ist. Aber auch der Spezialist soll die Brücke zu den Nachbargebieten sich immer gangbar erhalten.

Für die erste Art zu sammeln kann das Sammelgerät einfach sein. Ein gutes Messer, eine gute Taschenlupe, Schachtel und einige Tubengläser genügen hier vollkommen. Wer sich spezialisiert, wird unter Umständen eine umfangreichere Ausrüstung benötigen. So sind zum Sammeln von Algen Planktonnetze, Algenrechen, Schilfmesser, Pfahlschaber usw. erwünscht. Es sind dies alles Werkzeuge, die an und für sich wenig Geld kosten, das Sammeln aber sehr erleichtern. Wer Bastelgeschick hat, kann sie sich auch selbst herstellen.

Für die mikroskopische Untersuchung ist im allgemeinen nur einwandfreies lebendes Material brauchbar. Es darf nicht welken oder sonst beim Heimtransport irgendwie Schaden leiden. Vor dem Fixieren zu Hause ist das Material gründlichst von Erde, Schmutz usw. zu reinigen und, wenn nötig, in Brunnenwasser so lange liegen zu lassen, bis alle Anzeichen von Welken verschwunden sind. Flechten allein machen hier eine Ausnahme. Die Flechten trocknen oft in ihrem Leben vollkommen aus. Sie können auch in diesem Zustand gesammelt werden. Vor dem Fixieren sind sie dann 1 bis 2 Tage in Wasser aufzuweichen.

Herbarmaterial ist kein Ersatz für gut gesammeltes Untersuchungsmaterial. Es ist jedoch ein Notbehelf, der sich für morphologische Untersuchungen verwenden läßt.

(4) Gustav Lindau, *Hilfsbuch für das Sammeln parasitischer Pilze I und II*, Berlin, Gebrüder Bornträger, 1901/1903

II. Kulturen

§ 5. Für die Materialbeschaffung spielen Kulturen eine ebenso wichtige Rolle wie die Sammeltätigkeit. Viele Kryptogamen erhält man in der Regel überhaupt am besten durch eine Kultur und wiederum können bestimmte Stadien der Fortpflanzung auch nur durch zielbewußte Züchtung erhalten werden. Es ist daher nötig, das Grundlegende und Unentbehrliche über Kulturverfahren hier einzufügen. Es gibt verschiedene Formen von Kulturen: Teilkulturen, auch Rohkulturen genannt, und Reinkulturen.

Die **Rohkulturen** bezwecken, ein Objekt kürzer oder länger zu halten, teils um es überhaupt einige Zeit zur Verfügung zu haben, teils um Arten oder Entwicklungsstadien zu erreichen, die man in freier Natur nicht auffinden konnte. Diese Rohkulturen sind den natürlichen Verhältnissen insofern noch ähnlich, als sie noch Pflanzengesellschaften aufweisen und daher nicht als steril bezeichnet werden können.

Reinkulturen sind Kulturen nur einer Spezies. Vielfach müssen diese Kulturen auf sterilen Nährböden unter sterilen Verhältnissen durchgeführt werden.

Das Kultivieren von Mikroorganismen ist bereits eine Wissenschaft für sich geworden, und dazu nicht einmal eine leicht erlernbare, wenn es sich um Reinkulturen handelt. Ja, in unangenehm vielen Fällen sind Reinkulturen immer noch nicht erreichbar.

§ 6. Als **Kulturgefäße** kommen nur Glasgefäße in Betracht. Ihre Form ist weniger wichtig, z.B.: Reagensgläser, Erlenmeyerkolben, Bechergläser, Petrischalen, Glasdeckelschalen, Einmachgläser der Hausfrau usw. Unbedingt notwendig ist, daß die Gefäße vollkommen frei von Chemikalien sind. Am sichersten geht man, wenn man die Kulturgefäße von vornherein zu nichts anderem als Kulturen verwendet.

Für **Mikrokulturen** benötigt man hohlgeschliffene Objektträger oder die bekannte *Schultzesche Kammer*.

Zu den **Nährstoffen** rechnen das Wasser, als die Grundlage alles organischen Lebens, und verschiedene mineralische Stoffe, wie verschiedene anorganische Verbindungen von Schwefel, Phosphor, Magnesium, Eisen, Kalzium, Kalium. Als Stickstoffquellen kommen ergänzend organische Verbindungen in Betracht, falls die anorganischen Quellen nicht ausreichen sollten. Als Kohlenstofflieferant ist in erster Linie die Kohlensäure der Luft zu nennen. Reicht diese nicht aus, so können verschiedene Verbindungen, meistens Zuckerarten, verwendet werden.

Nährmedien oder **Nährböden** sind diejenigen Substrate, auf denen die Versuchspflanzen kultiviert werden sollen. Man unterscheidet flüssige Nährmedien und feste Nährböden.

§ 7. Flüssige Nährmedien. Die einfachsten Nährmedien sind die flüssigen Nährmedien. Man benützt entweder z.B. bei Algen das bei der Exkursion vorgefundene Wasser des Standortes oder je nach Zweck Abkochungen und Auszüge von Erde, Mist, Brot, Früchten und ähnlichen Ausgangsstoffen.

Frühzeitig hat man schon begonnen, künstliche Nährsubstrate, sogenannte **Nährlösungen**, zu verwenden. Als die gebräuchlichsten seien genannt:

1. **Die Nährlösung nach *Knop***. Sie wird vielfach für Algen verwendet und hat folgende Zusammensetzung:

Redestilliertes Wasser	1000,0	ccm
Ca(NO3)2	1,0	g
MgSO4.7H20	0,25	g
KH2PO4	0,25	g

ferner eine Spur Eisenchlorid. Die Vorschrift "Spur" kann gar nicht wörtlich genug genommen werden. Lieber gebe man zu wenig Eisen als zu viel hinzu.

Diese Lösung ist 0,15 %ig und gilt als Normallösung. Zweckmäßig verwendet man zur Herstellung der *Knopschen* Nährlösung abgewogene Kapselpackungen, wie sie von *Hollborn* und *Grübler* angeboten werden. Bei ihrer Verwendung lassen sich leicht auch andere Konzentrationen, etwa 0,2 bis 0,5 %ig, ansetzen. Verwendet man solche käufliche Kapselpackungen nicht, ist es zweckmäßig, zuerst das Kali und das Magnesiumsalz aufzulösen und erst dann das Kalziumsalz hinzuzufügen. Auf diese Weise wird der unlösliche Niederschlag am geringsten.

2. **Die Nährlösung nach *Benecke***. Um die Nährlösung nach *Benecke* zu erhalten, vermische man folgende Bestandteile:

KNO3	10	g
Ca3(PO4)2	5	g
MgSO4	5	g
FeSO4	0,5	g

Die Nährlösung nach *Benecke* wird angewendet in Lösungen von 0,175 bis 0,7 % des Gesamtsalzgehaltes der Gesamtlösung. Also 1,75 g der fertigen Mischung in 1000 ccm redestilliertem Wasser aufgelöst ergeben eine 0,175 %ige Lösung. Löst man 7 g der Mischung auf, erhält man eine 0,7 %ige Lösung.

Die Lösungen nach *Knop* und nach *Benecke* sind lange Zeit sehr viel benützt worden. Neuerdings bevorzugt man die Nährlösung nach *Mayer*.

3. **Die Nährlösung nach Mayer**. Die sogenannte **Normallösung nach Mayer** hat folgende Zusammensetzung:

Redestilliertes Wasser	1000,0	ccm
KH2PO4	1,0	g
CaCl2	0,1	g
MgSO4.7H20	0,3	g
NaCl	0,l	g
FeCl3	0,01	g

Ist eine Zehntel-Normallösung vorgeschrieben, so wird die Normallösung mit neun Raumteilen destillierten Wassers verdünnt.

Die Nährlösung nach *Mayer*, wie natürlich alle Nährlösungen, können nur sterilisiert aufbewahrt werden, da sie sonst sofort von Algen besiedelt werden. Die Algen stellen sich in unglaublich kurzer Zeit ein. Man hält sich daher besser 10 %ige Stammlösungen der einzelnen

Salze, bzw. 1 %ige Lösungen. Diese einzelnen Lösungen bleiben steril, da die Teillösungen jede für sich giftig sind. Erst ihre Kombination in entsprechender Verdünnung schaltet die biologische Giftwirkung aus.

Man hält sich zum Beispiel:

I. eine 10 %ige Lösung von KH_2PO_4
II. eine 1 %ige Lösung von $CaCl_2$
III. eine 1 %ige Lösung von $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
IV. eine 1 %ige Lösung von NaCl
V. eine 1 %ige Lösung von $FeCl_3$

Um 1000 ccm Normallösung nach *Mayer* herzustellen, gießt man zu 939 ccm redestillierten Wassers in folgender Reihenfolge 10 ccm I, 10 ccm II, 30 ccm III, 10 ccm IV und endlich 1 ccm V.

Die Nährsalzlösungen nach *Knop*, *Bennecke* und *Mayer* werden benützt, um Algen, Moosprotonemata, Prothallien von Farnen und Schachtelhalmen zu kultivieren. Für Pi1ze und Bakterien sind sie nicht geeignet. Schimmelpilze und Hefen wachsen auf jedem Nährboden, der organische Substanzen enthält. Näheres darüber findet sich bei den betreffenden Übungsbeispielen.

4. Von **Bakterien-Nährböden** in flüssiger Form sind vor allem zu nennen:

1. **Milch**, am besten entrahmt
2. **Nährbouillon**

a) Die einfachste Herstellung von Bouillon, vor allem in kleineren Mengen, ist die Auflösung von 15 bis 20 g *Nährbouillon von E.Merck, Darmstadt* in 1000 ccm Leitungswasser, die in einem Glaskolben mit Watte verschlossen eine Stunde im Dampftopf erhitzt wird. Es gibt neben dem Fabrikat von *E.Merck* noch andere Fabrikate, die in der Regel mit gleichem Erfolg Verwendung finden können.

b) Die Selbstherstellung aus frischem, fettfreiem Fleisch von Kalb, Rind oder Pferd ist natürlich möglich. Zu 1 Liter Wasser gibt man 500 g feingehacktes Fleisch, läßt über Nacht ausziehen, kocht dann eine Stunde und filtriert ab.

Nach dem Kochen wird auf 1 Liter Gesamtvolumen aufgefüllt, 10 g Pepton und 5 g Kochsalz zugegeben. Der pH soll 7,6 sein, notfalls muß etwas Sodalösung zugegeben werden, bis an einer Probe eine 0,3 %ige Lösung von p-Nitrophenol Dunkelgelbfärbung erzeugt. Abfüllen in Reagensgläser und sterilisieren

§ 8. Feste Nährböden. Die festen Nährböden haben, wo sie anwendbar sind, den flüssigen Substraten bedeutende Vorteile voraus. Die kultivierten Mikroorganismen haben einen festen Standort und sind leichter zur Untersuchung zu entnehmen.

Zu den gebräuchlichsten festen Nährböden rechnen: Gelatine, Agar-Agar, beide mit den verschiedensten Zusätzen. Ferner: Brot, Kartoffeln, Rüben, verschiedene Früchte, Erde, Sand, Gipsblöcke, Torf, Lehm, Holzmehl, Mist u.a.m.

1. Gelatine (Blattgelatine, Gelatinepulver) wird in heißem Wasser aufgelöst und nach Filtration in Petrischalen oder Reagensgläser ausgegossen sowie eventuell nach Zugabe der Zusätze sterilisiert. Am bequemsten ist die Herstellung von Gelatinenährböden aus Gelatinefolien. Im Sommer benützt man eine 15 %ige, im Winter eine 10 %ige Gelatine.

Gelatine enthält immer etwas Schwefeldioxid. Man muß daher die Gelatine genau wie die Bouillon neutralisieren.

Gelatine kann mit den Nährlösungen nach *Knop, Bennecke* und *Mayer* für die Zucht grüner Kryptogamen hergestellt werden.

Gelatine für Bakterien wird hergestellt, indem man der Nährbouillon 10% Blattgelatine zusetzt. Nach dem Aufquellen wird die Gelatine durch Erwärmen aufgelöst, alkalisiert, filtriert, abgefüllt und sterilisiert.

2. Agar-Agar. Agarnährböden werden hergestellt, indem man 15 bis 20 g zerkleinerten Federkielagar (*Merck*) in 1 Liter Nährlösung mehrere Stunden quellen läßt und dann durch Erhitzen im Dampftopf (100° C) während einer Stunde löst. Anschließend abfüllen und sterilisieren.

Zur Kultur grüner Kryptogamen wird der Agar in einer Nährlösung aufgelöst. Zur Kultur von Bakterien löst man den Agar in Bouillon auf. Es ist einfacher, sogenannten Standard-Agar für bakteriologische Zwecke, von *Merck* nach Gebrauchsanweisung (45 g auf 1 Liter Wasser) heiß aufzulösen und dann in Platten auszugießen.

Für die Kultur von Pilzen werden anstatt der Nährbouillon Extrakte oder Kochinfuse von Kot, Heu, Erdabkochungen usw. verwendet. Das nähere ist im speziellen Teil angeführt.

3. Kartoffeln, auch Rüben und Früchte, werden vor Gebrauch gereinigt, anschließend mit Sublimatwasser außen abgebürstet und damit an ihrer Oberfläche desinfiziert. Von den Kartoffeln eignen sich am besten stärkearme gelbe Sorten, die sogenannten Salatkartoffeln. Kartoffeln, Rüben und Früchte werden im Anschluß an das Reinigen und Desinfizieren gekocht und sterilisiert.

Erde, Sand, Lehm, Holzmehl, Gipsblöcke werden in passender Weise in die Kulturgefäße verbracht und dann sterilisiert.

4. Torf. Gewöhnlicher Torf in Ziegeln oder Platten ist von sich aus steril und sehr gut zu Kulturen grüner landbewohnender Kryptogamen (Farnprothallien) zu verwenden. Torf bleibt sehr lange in den Kulturen steril. Wird Torf jedoch durch Hitze sterilisiert, dann wird er genau so von Schimmelpilzen usw. angefallen wie Agar oder Gelatine.

Alle festen Nährböden können mit den verschiedensten Flüssigkeiten durchtränkt werden. Bei Erde und Sand geht dies ohne weiteres. Lehm muß mit den Zusätzen durchgeknetet werden.

Gekochte Kartoffeln, Rüben und Früchte reagieren bekanntlich stark sauer. Wenn nötig, können sie mit dünnen Sodalösungen oder sehr verdünnten Natronlaugelösungen alkalisch gemacht oder mit Glycerin durchtränkt werden.

III. Sterilisation der Nährböden

A. Das Sterilisieren durch Erhitzen

§ 9. Falls Reinkulturen erwartet werden, müssen alle Nährmedien entkeimt, also sterilisiert werden. Dazu gibt es zwei Wege, die Entkeimung durch Hitze und die Entkeimung auf kaltem Wege.

Hitze tötet alle Lebenskeime ab, wenn sie nur genügend hoch angewendet wird und genügend lange einwirken kann. Der Höhe der Temperatur und der Dauer der Einwirkung sind in der Praxis jedoch Grenzen gezogen, da die Nährmedien durch Erhitzen zum Teil sehr erheblich, und zwar in der Regel ungünstig verändert werden. Einfache Mineralsalzlösungen können natürlich fast beliebig lange gekocht werden. Alle organischen Nährmedien werden nur so weit erhitzt, bis alle Keime abgetötet sind. Bei empfindlichen Medien kann nicht bis zur Tötung der Bakteriensporen erhitzt werden. Man erhitzt dann mehrmals hintereinander in Zwischenräumen von einigen Tagen (fraktionierte Sterilisierung).

Für das Sterilisieren selbst stehen im Laboratorium Autoklaven und Wärmeschränke zur Verfügung. Die **Autoklaven**, Apparate zur Sterilisierung unter gespanntem Wasserdampf, gestatten bekanntlich die Erreichung von Temperaturen, die erheblich über 100° C liegen. Die Mikroben werden in ihnen mit Sicherheit abgetötet. Sie sind praktisch zum Sterilisieren von Instrumenten und Glasschalen usw.

Nährmedien werden in den Autoklaven jedoch recht häufig so weitgehend verändert, daß die wenigsten Kulturen darauf angehen. Gelatine kann überhaupt nicht autoklaviert werden, da sie nach dem Erkalten nicht mehr fest wird und sich weitgehend zersetzt.

Für unsere Zwecke kann der Autoklav vollkommen ersetzt werden durch einen Kartoffelkochtopf oder einen Einweckapparat des Haushalts.

Gewöhnliches Kochen flüssiger Medien in Glaskolben führt auch zum Ziel. Eventuell ist das Kochen nach 24 Stunden und nach 48 Stunden zu wiederholen, um auch ausgekeimte Sporen abzutöten. Hat man nur ausnahmsweise und wenig durch Hitze zu sterilisieren, so überläßt man dies zweckmäßig einer Apotheke, die es um geringe Gebühren besorgt.

B. Die Kaltsterilisierungsmethoden

§ 10. Die offensichtlichen Nachteile der Hitze-Sterilisation haben schon lange zu Bemühungen geführt, die Hitze bei der Sterilisierung entbehrlich zu machen. Für Trinkwasser - durch Filtrierung mittels genügend enger Filter - und wenn es sich darum handelt, organische Stoffe praktisch steril zu erhalten, ist dieses Problem als gelöst zu betrachten. Mit *Nipagin* und *Nipasol* der Firma *Julius Penner* (5) und ähnlichen Präparaten anderer Firmen können Säfte und Extrakte von Pflanzen lange steril gehalten werden. Leider gibt es keine Methode, diese Stoffe wieder zu gegebener Zeit zu entfernen, so daß Nährböden und Nährlösungen damit nicht behandelt werden können. Es stellte daher einen für die Wissenschaft unschätzbaren Fortschritt dar, als Methoden bekannt wurden, chemische Desinfektion als Sterilisierungsmethoden in der Kälte, das heißt bei Zimmertemperatur anzuwenden.

Im Jahre 1937 hat *Schweizer* (6) die von ihm ausgearbeitete Kaltsterilisierungsmethode bekannt gemacht. Diese Methode erscheint berufen, für die Kulturverfahren neue Wege zu weisen. Auf den sehr interessanten Ausführungen *Schweizers* fußt die hier folgende Darstellung der Methode.

Die Kaltsterilisierung vermeidet die Hitze vollständig. Höhere Temperaturen als die des Brutschrankes kommen nicht zur Anwendung. Die Entkeimung der Nährmedien erfolgt mit chemischen Stoffen - Desinfektionsmitteln -, die so beschaffen sind, daß sie wieder *restlos* aus den Nährmedien entfernt werden können.

(5) Julius Penner A.G, Abteilung Chemie, Berlin-Schöneberg, Belziger Straße.

(6) Georg Schweizer, *Einführung in die Kaltsterilisierungsmethode*, Jena, Gustav Fischer, 1937

Die Kaltsterilisierungsmethode beruht darauf, daß viele Desinfektionsmittel bei Sauerstoffabwesenheit und atmosphärischem Unterdruck Organismen sehr rasch abtöten. Dauer der Einwirkung nur eine bis drei Stunden! Gleichzeitig werden die Nährmedien sehr wenig verändert, insbesondere bleibt die Enzymtätigkeit erhalten. Als geeignete Desinfektionsmittel führt Schweizer eine große Anzahl in einer Tabelle auf. Natürlich handelt es sich nur um leicht flüchtige Stoffe. Ich erwähne hier davon Aceton, Ammoniak, Formaldehyd, Chloroform, verschiedene Alkohole, Toluol und Xylol.

Zur Durchführung der Kaltsterilisierung nach den Methoden von Schweizer ist notwendig:

1. eine Wasserstrahl-Luftpumpe
2. der Kaltsterilisator - eine Spezialapparatur - nach Schweizer

Diese Apparatur wird hergestellt von der *Firma Wagner und Munz, München, Karlstraße 43*. Eine solche besteht aus einem Glaskasten, der die Nährmedien aufnimmt und luftleer gepumpt werden kann. Die Kulturgefäße kommen mit aufgesetzten Glasdeckeln oder Wattepfropfen in den Glaskasten. Nachdem das Vakuum erreicht ist, wird das Desinfektionsmittel durch eine besondere Öffnung zugegeben. Man gibt pro Liter Inhalt des Glaskastens 1 bis 2 ccm. Das Desinfektionsmittel wirkt in Dampfform ein und gelangt überall hin, auch in die mit Glasdeckel verschlossenen Kulturgefäße. Nach einer Sterilisierungszeit von 2 bis 3 Stunden wird durch die Luftpumpe das Desinfektionsmittel wieder restlos entfernt, was sehr rasch geht. Das Vakuum wird endlich durch die Zuleitung von Luft mittels einer angeschlossenen Apparatur aufgehoben, welche durch ihre Konstruktion gestattet, alle Keime aus der zugeleiteten Luft zu entfernen. Würde diese Vorsichtsmaßnahme nicht beachtet werden, so würde bei Aufhebung des Vakuums gewöhnliche, das heißt mit Keimen behaftete Luft sofort auch unter die Verschlüsse eintreten

und die Nährmedien mit Luftkeimen beimpfen. Ist das Vakuum durch entkeimte Luft einmal aufgehoben, besteht diese Gefahr nicht mehr.

Die Luft darf nicht nur keine Keime enthalten, wenn sie wieder zugeleitet wird, sondern muß auch frei sein von schädlichen chemischen Stoffen wie Rauch, Gas usw. Laboratoriumsluft dürfte nicht immer diesen Anforderungen gerecht werden.

Diese Kaltsterilisationsmethode nach *Schweizer* erscheint berufen, die Hitzesterilisation zu einem großen Teil zu verdrängen. Nach *Schweizer* gelingt mit ihr die Kultur vieler Organismen, die auf heiß sterilisierten Medien bisher unzüchtbar waren. Heiß sterilisierte Medien waren eben chemisch zu sehr verändert worden. Die kalte Sterilisierung verändert bei richtiger Auswahl des Desinfektionsmittels die Medien sehr wenig oder fast gar nicht. *Schweizer* gibt als günstig an:

Aceton, eventuell mit Äther oder Chloroform gemischt, für die Sterilisierung von Breien und Säften aus frischen Pflanzen, Fleischwasser, Fleisch und Eiweiß, ferner Gelatine und Agar-Nährböden, sowie anorganische Nährlösungen.

Ammoniak, wässerig konzentriert für Mist, Holz, Torf, Kartoffel, Rüben. Die Enzyme der Pflanzen bleiben erhalten.

Formol, 40 %ig, für Mist, Holz, Torf, Baumrinde, Glaswaren, Gummischläuche und Instrumente.

Wegen näherer Angaben seien Interessenten auf das Buch von *Schweizer* hingewiesen, dessen Lektüre sehr zu empfehlen ist.

C. Kaltsterilisation mit einfachen Mitteln

§ 11. Der Einführung der Kaltsterilisation ist gewiß hinderlich, daß eine ziemlich komplizierte Apparatur notwendig ist. Zwar kann ein erfindungsreicher Experimentator, falls er sich auf ein Laboratorium stützen kann, mit Hilfe von anderen Glasgefäßen sich eine Apparatur zusammenbauen, doch ist dieser Weg dem mikroskopierenden Naturfreund mit den bescheidenen privaten Mitteln kaum möglich. Schweizer selbst hat nun in seinem Buche angegeben, wie in Spezialfällen ohne die große Apparatur Nährmedien sterilisiert werden können. *Bei meiner Nachprüfung hat sich diese einfache Methode als überaus brauchbar erwiesen, so daß sie weiteste Anwendung und Verbreitung verdient.*

Bei dieser Methode verzichtet man gänzlich auf das Vakuum. Dadurch fällt die ganze Apparatur weg. Andererseits ist jedoch eine Verlängerung der Einwirkung der Desinfektionsmittel nötig, was jedoch automatisch durch das Verfahren erreicht wird. Das Prinzip der Arbeitsweise ist folgendes: Man vermischt das Nährmedium mit einer kleinen Menge des Desinfektionsmittels, verschließt das Kulturgefäß mit Stopfen oder Glasdeckel und wartet die freiwillige Verdunstung ab. Diese freiwillige Verdunstung kann beschleunigt werden durch Einstellung in einen Brutschrank, in Sonne oder Zugluft vor dem Fenster usw. Es ist nur zu beachten, daß Dämpfe von Chloroform oder Aceton *auf gar keinen Fall* in einen Raum treten dürfen, in dem Flammen brennen oder der ständig bewohnt wird, da sonst Gesundheitsschädigungen unvermeidlich sind. Zur praktischen Durchführung der vereinfachten Kaltsterilisierung macht Schweizer folgende Angaben:

1. **Gelatinenährböden**. Man benützt am einfachsten Rundfolien, Keile, Zylinder oder Gelatinepulver der *Gelatinefabrik Klotz in Göppingen* (Württemberg). Der Vorrat daran wird am besten in gut verschlossenen Büchsen über Chlorkalzium aufbewahrt. Die Rundfolien passen in Petrischalen, die Keile und Zylinder in Reagensgläser. Man kann auch trockene Blattgelatine (Speisegelatine) zurechtschneiden und in Petrischalen benützen. Wegen des SO2-Gehaltes der käuflichen Gelatine verwendet man Aceton-Ammoniak-Gemische oder Alkohol-Ammoniak-Gemische, wobei der Ammoniakanteil sehr gering sein und sich auf wenige Tropfen beschränken kann.

Die Gelatine wird nun im Glase völlig mit dem Desinfektionsmittel durchtränkt. Reagensgläser schließt man zunächst für 12 Stunden mit einem Korkstopfen, hernach kann ein in be-

kannter Weise durch Abbrennen in der Flamme steril gemachter Wattepfropf aufgesetzt werden. Das Desinfektionsmittel läßt man nun in der geschilderten Weise freiwillig verdunsten. Nach dem Verdunsten, das einige Tage benötigt, kann steriles, gekochtes Wasser oder die sonst anzuwendende Nährlösung vorsichtig aufgegossen werden. Die Gelatine saugt sich dann mit dem Wasser voll und der Nährboden ist fertig. Wieviel Flüssigkeit eingegossen werden muß, ist Erfahrungssache und schnell erprobt.

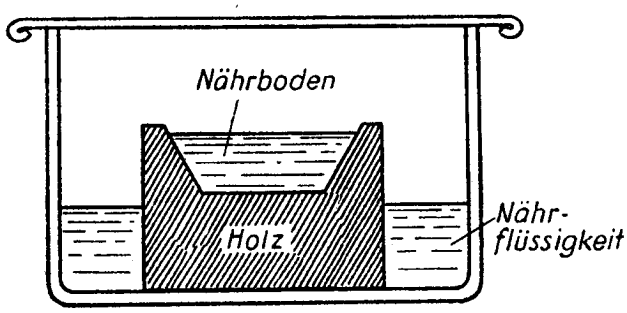
2. **Agarnährböden**. Agarnährböden lassen sich nicht in derselben Weise wie Gelatinenährböden anfertigen, weil einmal getrockneter Agar mit zugegossener Flüssigkeit *nicht* wieder aufquillt.

3. **Mistnährböden**. Der Mist wird in einer Reibschale eventuell unter Zusatz von Wasser oder anderen Flüssigkeiten zu einem dicken Brei verrührt. Ist dies geschehen, rührt man Ammoniak darunter und gibt vom ganzen Nährboden eine etwa 3 mm dicke Schicht in eine Petrischale. Der Deckel wird nun aufgelegt. Das Ammoniak läßt man bei geschlossenem Deckel freiwillig verdunsten. Dem Mist kann übrigens eine Gelatinefolie aufgelegt werden, was die Probeentnahme von den gewachsenen Objekten unter Umständen erleichtert.

4. **Lehm, Torf, Erde, Sand**. Alle diese Medien werden wie Mist behandelt. Die hier unter Ziffer 4 genannten Medien können nach *Schweizer* mit Vorteil auf Holzklötzchen aufgetragen werden. Man verwendet runde, mit Vertiefungen ausgestattete Holzklötzchen zur Aufnahme der Nährmedien. Das Ganze stellt man in eine höhere Glasschale. Die Sterilisation von Glas und Holz einschließlich des aufgetragenen Nährbodens kann in einem Arbeitsgang erfolgen. Nach der Sterilisation kann man noch die anderweitig steril gemachte Nährflüssigkeit mittels eines ebenfalls sterilen Trichters in das Glas gießen. Natürlich lassen sich Holzscheiben ohne Vertiefung mit aufgelegter Gelatinefolie verwenden.

Abb.2

Holzklötzchen mit festem Nährboden
(Kaltsterilisation mit einfachen Mitteln, § 11, Ziffer 4)



IV. Die verschiedenen Formen der Kulturen

§ 12. Vor der Benützung von Nährmedien überzeugt man sich, daß sie tatsächlich steril sind. Die einzige verläßliche Methode dafür ist die probeweise Bebrütung für 1 bis 2 Tage. Bleibt jegliches Wachstum aus, sind die Medien steril. Nicht sterile Nährmedien werden sofort ausgeschieden.

Die eigentliche Technik des Anlegens von Kulturen bedarf der Erläuterung durch einige Hinweise. Grundsätzlich ist die Methode die gleiche, um welche Organismen es sich auch handeln mag. Die Keime müssen auf den Nährmedien so dünn ausgesät werden, daß sie genügend Platz zur individuellen Entwicklung haben. Dabei muß vermieden werden, daß Fremdkeime die Kulturen verunreinigen. Die Arbeit mit nicht pathogenen sporenbildenden Bakterien und Hefepilzen vermittelt am besten die Handgriffe und gibt die nötige Sicherheit durch ständige Erfahrung; auch durch Mißerfolge, die auf Fehler zurückgehen, lernt man die Kulturtechnik so gut, daß man später an schwierigere Versuche herantreten kann.

§ 13. Isolierung eines Mikroorganismusses. Die Mikroorganismen sind in der Natur in der Regel mit anderen Organismen vergesellschaftet. Dies gilt eigentlich auch immer von den er-

sten Kulturen, den sogenannten Rohkulturen. Eine Rohkultur erhält man zum Beispiel, wenn keimhaltige natürliche Vorkommen wie Jauche sehr verdünnt auf festen Nährböden wie Kartoffeln ausgestrichen wurden. In den so gewachsenen Kulturen sind die verschiedensten Organismen bunt mit anderen vergesellschaftet. Um diese bunte Gesellschaft von einander zu trennen, geht man vor, wie in den folgenden Zeilen kurz geschildert ist.

Wir wollen annehmen, daß uns Gelatineplatten zur Verfügung stehen. Zur Übertragung benützen wir in bekannter Weise einen Platindraht, der an seiner Spitze in eine Öse umgebogen ist. Vor jeder Benutzung glühen wir den Platindraht aus und lassen ihn erkalten. Nun streichen wir mit dem Platindraht über eine Rohkultur oder tauchen ihn in das Ausgangsmaterial und machen dann über eine Gelatineplatte einen Strich. Dabei nehmen wir nicht etwa den Deckel ganz ab, weil sonst Luftkeime Zeit finden, sich ebenfalls nieder- zulassen und sich somit auszusäen. Wir lüften den Deckel nur soweit, daß wir mit dem Platindraht unser Vorhaben ausführen können. Den Strich selbst legen wir im Zickzack an, so daß die ganze Platte benötigt wird. Diese Platte bezeichnen wir mit I. Der neu ausgeglühte Platindraht wird nun erneut infiziert, indem wir ihn einmal quer über die Platte I streifen. Genau wie Platte I beimpfen wir jetzt eine Platte II. Nachdem der Platindraht erneut ausgeglüht worden ist, beimpfen wir in derselben Weise eine Platte III und eine Platte IV.

Nach der Bebrütung beobachten wir das Auftreten der ausgesäten Keime. Sie werden in kleineren oder größeren Kolonien zu sehen sein, die auf Platte I am dichtesten, auf Platte IV am weitesten voneinander getrennt gewachsen sein werden. Die Kultur selbst, die Bebrütung, erfolgt je nach Art der Keime bei Zimmertemperatur oder im Brutschrank, im Licht oder im Dunkeln.

Eine Garantie, daß überhaupt etwas wächst, oder daß alle in dem Ausgangsmaterial vorkommenden Organismen auch wirklich in der Kultur gekommen sind, hat man niemals. Das hängt davon ab, ob die Gelatineplatte überhaupt ein zusagendes Medium darstellt oder nicht. Für unsere Versuche kann natürlich jedes andere feste Medium genommen werden.

Die Isolierung in flüssigen Medien empfiehlt sich nicht. Da die Mikroorganismen keinen festen Standort einnehmen, ist die Durchführung einer Isolation viel schwieriger, ja für mein Empfinden eigentlich recht oft reine Glückssache. Einen sicheren Erfolg verspricht nur die *Adhäsionskultur nach Lindner* (siehe diese).

§ 14. Die Anlegung der eigentlichen Reinkultur. Ist durch die mikroskopische Untersuchung der verschiedenen auf der Platte IV aufgegangenen Kolonien festgestellt worden, daß solche der gewünschten Art vorhanden sind, ist die Reinkultur leicht durch Überimpfen von dieser Kolonie durchzuführen. Man beimpft von dieser Kolonie aus eine ganze Platte. Über weitere Methoden der Isolierung und Reinkultur von Organismen sei auf die Literatur verwiesen.

§ 15. Die große feuchte Kammer. Die feuchte Kammer ist eine Vorrichtung, die in der Praxis viel gebraucht werden kann. Ihre einfachste Form ist ein Teller, über den eine Glasglocke (Käseglocke) gestülpt wird. Auf den Teller stellt man ein Glas mit Wasser oder man belegt den Teller mit Sägespänen, Torfmull oder gibt nur etwas angefeuchtetes Fließpapier auf den Boden. Um das Abtropfen von Kondenswasser zu vermeiden, gibt man auf die Innenseite des Deckels eine Scheibe schwach angefeuchtetes Fließpapier.

In die feuchte Kammer können alle Objekte verbracht werden, die nicht austrocknen sollen, z.B. Kulturmedien wie Kartoffelstücke oder kleinere Kulturgefäße mit Watteverschluß. In die große feuchte Kammer verbringt man schließlich auch Kulturen auf Objektträgern mit dünn ausgestrichenem Agar oder Gelatine und ähnliche Dinge. Die spezielle Einrichtung der feuchten Kammer kann sehr variabel gestaltet werden und ist somit den jeweiligen Bedürfnissen leicht anzupassen.

§ 16. Mikrokulturen. Manchmal ist es von Vorteil, die Kulturen als sogenannte Mikrokulturen anzulegen. Das sind sehr kleine Kulturen, die auf einem Deckglas oder Objektträger angelegt werden. Die bekanntesten Formen der Mikrokulturen sind der *hängende Tropfen*, die *Ranviersche feuchte Kammer* und die *Adhäsionskultur nach Lindner*. Alle drei Formen sollen kurz besprochen werden.

1. Der **hängende Tropfen** ist die älteste Form der Mikrokultur. Man benötigt dazu einen sogenannten hohlgeschliffenen Objektträger oder einen Objektträger mit aufgekittetem (Kanadabalsam!) Glasring und ein quadratisches Deckglas, das die Höhlung vollständig und reichlich abdeckt. Absolute Reinheit der Gläser ist Bedingung. Rund um die Höhlung oder auf den Rand des Glasringes bringt man nun einen genügend hohen Rand von Vaseline an.

Das Deckglas wird auf den Tisch gelegt und mit einem Tropfen des Nährmediums beschickt. Hierauf wird nun der Tropfen mit den zu kultivierenden Mikroorganismen geimpft, wenn er sie nicht schon von vornherein enthält. Der Objektträger wird dann vorsichtig umgekehrt, das heißt, mit dem Vaselinering nach unten auf das Deckglas gedrückt und dann umgekehrt. Wenn der Tropfen nicht zu groß ist, gelingt das Manöver leicht. In dem nun hängenden Tropfen können die Objekte wachsen, so lange sie Luft und Nahrung ausreichend zur Verfügung haben. Am Rande des Tropfens können die Objekte leicht im Mikroskop beobachtet werden. Dieser einfache hängende Tropfen hat seine Nachteile. Daher hat man verschiedentlich versucht, ihn durch etwas Besseres zu ersetzen.

Straßburger gibt folgende Methode für einfache Arbeiten an. Man benützt dazu einen gewöhnlichen Objektträger und einen mäßig dicken kleinen Papprahmen von entsprechender Größe mit einem Loch in der Mitte. Vor Gebrauch muß der Papprahmen in Wasser aufgeweicht worden sein. Bei dieser Arbeitsweise fällt die Vaseline fort; das ist dann sehr wertvoll, wenn die etwa gelungene Kultur ohne Übertragung fixiert und gefärbt werden soll. Der Objektträger muß in eine große feuchte Kammer, damit die Kultur nicht austrocknen kann.

2. Die ***Ranviersche* feuchte Kammer** vermeidet den Nachteil des hängenden Tropfens, daß die Objekte nur am Rande des Tropfens günstig für die mikroskopische Betrachtung liegen. Die Ranviersche Kammer wird von einem Objektträger gebildet, der mit einer ringförmigen Rinne versehen ist und bei dem die Kreisfläche innerhalb der Rinne soweit abgeschliffen wurde, daß sie 0,5 bis 1 mm tiefer liegt als die sonstige Oberfläche des Objektträgers. In die Rinne kann etwas Wasser gebracht werden. Um den eingeschliffenen Ring herum wird wiederum Vaseline aufgetragen.

Bei Beschickung wird der Objektträger auf den Tisch gelegt. Der zu untersuchende Tropfen kommt auf die innere Kreisfläche. Bei Auflage des Deckglases wird der Tropfen auf der Kreisfläche zerteilt und besitzt überall eine gleichmäßige Dicke.

Die Ranviersche Kammer ist vorzüglich zum Beobachten von Wachstumsvorgängen, aber wenig geeignet, um von den gezüchteten Objekten weiterhin Kulturen oder Präparate anzulegen bzw. anzufertigen.

3. Die **Adhäsionskltur nach *Lindner*** ist die derzeit beste Methode, etwas größere Mikroorganismen wie Hefe, Brand- und Rostpilzsporen, Schimmelpilze und Objekte ähnlicher Größe in Reinkultur zu züchten. Sie bedient sich der Vorrichtungen des hängenden Tropfens. Ihre Besonderheiten bestehen in folgendem:

Benützt wird ein Deckglas, das noch eine *Spur von Fett* aufweist. Dazu wird ein gereinigtes, in Alkohol liegendes Deckglas nicht mit einer Pinzette, sondern mit dem Finger gehalten und mit einem reinen Leinentuch trocken gerieben. Dabei löst der Alkohol von dem Finger genügend Fett auf und dieses Fett verteilt sich nun auf dem Deckglas. Man kann das Deckglas noch zwei- bis dreimal schnell durch eine nicht zu heiße Flamme ziehen, um es vollständig zu sterilisieren.

Auf einem solchen Deckglas haften nun kleinste Flüssigkeitstropfen, ohne zusammenzufließen. Diese Tropfen werden mit einer sterilen Schreibfeder aufgebracht. Eine solche Feder wird zweckmäßig mit einer Metallhülse an einem Glasstab befestigt. Man kann nun die Feder in Alkohol tauchen und durch Abbrennen des Alkohols leicht sterilisieren. Ausglühen der Feder ist besser zu vermeiden, da sonst allzu leicht Rußpartikelchen mitübertragen werden.

Mit dieser Feder kann man auf dem Deckglas nun entweder Punkte anbringen oder parallele Striche ziehen. Überträgt man nur entsprechend verdünnte Aufschwemmungen der Organismen, kann es erreicht werden, daß pro Tropfen oder Strich nur ein einziger Organismus vorhanden ist.

Wird die Schreibfeder öfters hintereinander gebraucht, so ist sie jedesmal in Wasser abzuspülen, in Alkohol zu tauchen und dann abzubrennen.

Die *Lindnerschen* Adhäsionskulturen, besonders die Tröpfchenmethode, geben die Möglichkeit, Kulturen anzulegen, die von einem einzigen Mikroorganismus ausgehen. Dabei ist Bedingung, daß der Organismus nicht kleiner als eine Hefezelle ist. Man geht dabei folgendermaßen vor:

Die Rohkultur A wird zunächst stark verdünnt zur Aufschwemmung oder Verdünnung B. Dann werden von dieser Verdünnung B Präparate angefertigt, die nur einen Tropfen umfassen. Unter dem Mikroskop zählt man die Zahl der Mikroorganismen aus. Ergibt sich zum Beispiel, daß hier 30 Organismen im Präparat vorhanden sind, so verdünnt man diese erste Verdünnung B nochmals dreißigmal, schüttelt gut durch und legt nun eine Reihe von Tröpfchenkulturen an. Man kann damit rechnen, Tröpfchen zu erhalten, die nur einen Keim enthalten.

Sicherer jedoch ist die Isolation auf Plattenkulturen.

V. Die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration für die Kultur der Organismen

§ 17. Allgemeine Bemerkungen. Wachstum der Organismen und Ablauf des Lebensprozesses ist bei allen Organismen an eine bestimmte Reaktion der Körperbestandteile, der einverleibten Nahrungsstoffe, des umgebenden Wassers usw. gebunden. Alle Organismen bestehen zu einem großen Teil aus Kolloiden, die durch Quellung viel Wasser aufnehmen und es durch Entquellen wieder abgeben können. Auf das Quellungsvermögen der Körperkolloide haben nun die im Wasser gelösten Stoffe einen wesentlichen Einfluß. Im Wasser gelöste Metallsalze zerfallen ja bekanntlich in ihre Ionen, das sind elektrisch geladene Atome oder Atomgruppen. In Säuren sind freie Wasserstoffionen, in Laugen freie Hydroxidionen vorhanden. Positiv geladene Ionen heißen Kationen, negativ geladene Anionen. Wasserstoff und alle Metalle bilden Kationen, die Hydroxidionen sind Anionen.

Auch das reinste destillierte Wasser entspricht nicht vollkommen der chemischen Formel H2O. Teilweise finden sich freie H^+-Ionen und freie OH^--Ionen. Und zwar finden sich in 1 Liter reinen Wassers bei 22° C 0,0000001 g H^+-Ionen und ebensoviel OH^--Ionen. Es sind also in 10 Millionen Liter Wasser 1 g Wasserstoff, in einem einzigen Liter Wasser also 10^{-7} g H^+-Ionen enthalten. Die Zahl 10^{-7} wird Wasserstoffzahl, die Zahl 7 wird als pH oder als Wasserstoffexponent bezeichnet. Die Wasserstoffionenkonzentration bedingt die chemische Reaktion der Lösung. Reines Wasser hat den Wasserstoffexponenten 7. Da das Wasser gleich viel saure wie basische Ionen aufweist, ist die Reaktion des Wassers neutral.

Kleinere Wasserstoffexponenten als 7 bedeuten saure Reaktion, Exponenten, die größer als 7 sind, alkalische Reaktion. Die beiden Grenzwerte sind 1 und 14. pH 1 gibt eine 1-normale Säurelösung, pH 14 eine 1-normale Laugenlösung an. Neutralsalzlösungen haben den gleichen pH-Wert wie reines Wasser, nämlich pH 7. Der pH des toten Protoplasmas wird mit $6,7 \pm 0,1$ angegeben. Bei Kulturen ist es also von größter Wichtigkeit, einen den Organismen zusagenden pH-Wert in den Nährmedien zu halten. Daher der wiederholt in diesem Buche gegebene Ratschlag, das Wasser vom Standort der Kultur zu benützen.

Die Nährlösungen (*Knop, Mayer*) sind nun so zusammengesetzt, daß die giftigen Wirkungen der K^+-Ionen durch die antagonistischen Wirkungen der Ca^{2+} und Mg^{2+}-Ionen aufgehoben werden. Die Wasserstoffionenkonzentration hängt aber nicht nur vom prozentualen Verhältnis der Nährsalze zueinander ab, sondern auch von der absoluten Menge des Salzgemisches im Liter Wasser. Will man also eine im Freien gefundene Alge unter denselben Verhältnissen zu Hause halten, so müssen Standortswasser und Kulturmedium zu Hause den gleichen Wasserstoffexponenten aufweisen. Gelöste reine Kolloide wie Gelatine oder Agar-Agar verändern den pH-Wert einer Nährlösung nicht.

Wir müssen also Methoden kennenlernen zum bequemen Bestimmen des Wasserstoffexponenten.

Ganz exakt wird der pH-Wert durch elektrometrische Messungen gefunden. Für unsere Zwecke genügt die annähernde Messung durch **Indikatoren**. Indikatoren sind Farbstoffe, die bei verschiedenen Reaktionen ihre Farbe genügend ändern. Der älteste und allgemein bekannte Indikatorfarbstoff ist Lakmus. Lakmus zeigt durch Rotfärbung den sauren Charakter, durch

Blaufärbung den basischen Charakter einer Lösung an. Über die Stärke der Reaktion oder den Grad des sauren oder basischen Zustandes können keine Schlüsse gezogen werden.

Es gibt nun eine Reihe von Farbstoffen mit charakteristischem Farbumschlag rot-gelb, gelb-blau, farblos-gelb usw., deren Bereich sehr eng gezogen und genau bekannt ist. Eine tabellarische Zusammenstellung einiger solcher Indikatorfarbstoffe findet der Leser am Schlusse dieses Buches. Die Anwendung dieser Indikatorfarbstoffe ist einfach. Zur Bestimmung des pH-Wertes gibt man zu 10 ccm der zu prüfenden Flüssigkeit einige Tropfen einer meist 0,1 %igen Stammlösung der Farbstoffe. Genaue Gebrauchsanweisung über die Herstellung der Stammlösung erhält man beim Bezug der Farbstoffe oder man entnimmt sie den Katalogen, wo sie in der Regel angegeben ist.

§ 18. Praktische Bestimmung des pH-Wertes. Für die Bestimmungen auf Exkursionen im freien Gelände benötigen wir eine einfache Methode. Diese Methode ergibt sich dadurch, daß nicht die Lösungen der Indikatoren benützt werden, sondern Filtrierpapierstreifen, die mit ihnen getränkt worden sind. Die Firma *Dr.Gerh.Klotz, Chemisches Laboratorium, Leipzig N 22, Friedrich-Karl-Straße 25*, bringt unter dem Namen *Liphan L 615* solche Indikatorpapiere in den Handel. Der einzelne Papierstreifen weist fünf verschiedene Indikatoren auf. Der Bereich eines solchen Papierstreifens reicht von pH 0 bis pH 13, ist also geeignet zum schnellen Abschätzen des pH-Gebietes. Von den fünf Indikatorabteilungen sind im trockenen Zustand die ersten drei farbig und zwei farblos. Zwischen pH 2 und pH 12 erfolgt nun ein schrittweiser Farbumschlag nach Violett. Eine beigegebene Farbtafel läßt den pH-Wert abschätzen. Für die meisten Zwecke ist diese Bestimmung nicht genau genug. Die genannte Firma gibt aber auch Indikatorpapiere für eine Anzahl kleinerer Bereiche des pH-Gebietes heraus, die genau so gehandhabt werden und innerhalb ihres Bereiches eine sehr große Genauigkeit aufweisen. Für unsere Untersuchungen sind die Bereiche um den pH-Wert 7, also von 5,5 bis 8,5, in Betracht zu ziehen.

Wer im Besitz der Liphan-Indikatorpapiere ist, kann mit zwei Filtrierpapierstreifen im Gelände an Ort und Stelle innerhalb weniger Minuten den pH-Wert jedes interessierenden Gewässers feststellen. Für das Anlegen von Kulturen ist dies wertvoll, denn die Organismen wachsen natürlich am besten, wenn der pH-Wert ihrer alten Heimat mit dem pH-Wert des Kulturmediums übereinstimmt. Das Kulturmedium muß dann in seiner Reaktion darauf abgestimmt werden, was schon häufig durch einfache Verdünnungen erreichbar sein dürfte. In diesem Buche ist jeweils angegeben, ob destilliertes Wasser, redestilliertes Wasser oder Brunnenwasser (Leitungswasser) zu verwenden ist. Wenn nur von Wasser die Rede ist, kann Leitungswasser gebraucht werden.

Dieses ist nun in den einzelnen Städten von verschiedener Qualität und daher auch unterschiedlicher Brauchbarkeit für mikroskopische Zwecke. Die Stadt München z.B. verfügt über ausgezeichnetes Quellwasser, das viel Kalk und Magnesiumsalze enthält und für unsere Zwecke sehr gut brauchbar ist. Manche Gegenden wie Thüringen und Frankenwald weisen eisenhaltige Wässer auf, die beim Stehen an der Luft oder beim Kochen einen rotgelben Niederschlag geben. Sehr viele Großstädte sind mit ihrer Trinkwasserversorgung auf Flußwasser, bestenfalls Sickerwasser aus der Nähe großer Flüsse angewiesen. Aus hygienischen Gründen wird dieses Wasser in der Regel zuerst durch Kies filtriert und dann mit chlorabspaltenden Mitteln desinfiziert. Ein solches Wasser läßt sich in der Regel noch zum Bläuen von Hämatoxylinfärbungen verwenden, beim Ansetzen von Kulturen kann es jedoch Mißerfolge ergeben, deren Ursache nicht sofort im ungeeigneten Wasser gesucht werden. Eine pH-Bestimmung gibt in jedem Falle Klarheit. Schwach saure Reaktion zeigt einen unzulässig hohen Chlorgehalt an. Die fremden Bestandteile aus dem eisenhaltigen und dem gechlorten Wasser können durch Kochen entfernt werden. Gekochtes gechlortes Wasser wird zum Bläuen von Hämatoxylinfärbungen am besten etwas alkalisch gemacht, z.B. durch Zusatz von Natriumhydrogencarbonat oder Soda.

[Die hier von *Schömmer* betonte Bedeutung des pH-Wertes ist auch aus heutiger Sicht korrekt, und auch die Verwendung von Teststreifen mit mehreren Indikatoren ist gerade für die Bestimmung des pH-Wertes natürlicher Wässer sehr zu empfehlen. Man bezieht diese Indikatorpapiere am besten über die *Firma Merck*, die auch ein umfangreiches Sortiment von weiteren Teststreifen anbietet (*Merckotest*), mit denen man rasch weitere Parameter des Wassers halbquantitativ bestimmen kann, so den Chlorid- und Sulfatgehalt, den Härtegrad und vieles mehr.

Genauer, aber auch teurer, sind Test-Sets (*Merckoquant*), die zahlreiche weitere Stoffe quantitativ zu bestimmen gestatten, z.B. den Gehalt an Phosphat, Silikat, Nitrat und Ammoniumionen. Eine andere Bezugsquelle sind Lehrmittelhandlungen oder Aquarienhandlungen. In jedem Falle sollte man sich in einem Spezialkatalog der o.g. Firma informieren. Einschränkend ist allerdings hinzuzufügen, daß der Gehalt an Na^+-Ionen und K^+-Ionen nur mit Labormethoden ermittelt werden kann, ferner der Gehalt an Spurenelementen. Das Gelingen einer Kultur ist also auch heute noch z.T. Glückssache, der altbewährte, aber in seiner Wirkung nicht reproduzierbare „Erddekokt“ ist noch nicht obsolet!]

Kapitel II Eigenschaften des Untersuchungsmateriales

Fixierung und Konservierungsmethoden

A. Der chemische Aufbau der Kryptogamen

I. Die organisierten Zellbestandteile

§ 19. Jede erfolgreiche praktische Arbeit setzt die Kenntnisse der Eigenschaften der Werkstoffe voraus. Das ist natürlich in der Mikroskopie ebenfalls richtig. Wer ohne Kenntnisse der chemischen Verhältnisse ein Objekt mit irgendeiner Farbe färben will, überläßt das Ergebnis dem Zufall. Es ist deshalb notwendig, in aller Kürze den chemischen Aufbau der Kryptogamen zu behandeln, weil dann die Operationen des Fixierens, des Färbens und Einschließens in verständnisvollem Eingehen auf die Eigenart des Untersuchungsobjektes vorgenommen werden können.

Die Kryptogamen bestehen morphologisch wie alle Pflanzen aus Zellen. Sowohl die einzelne Zelle, wie auch der Zellverband sind in der Regel von Stützsubstanzen, den Membranen, umgeben. Nur ganz wenige Zustandsformen sind ohne erkennbare Membranen, so die nackten Amöbenformen und Plasmodien der Schleimpilze.

Der Inhalt einer Zelle, der **Protoplast**, besteht aus kolloidalem Protoplasma. Dieses Protoplasma ist ein Gemisch zahlreicher chemischer Verbindungen und besteht vorwiegend aus Eiweiß. In kleineren Mengen kommen Kohlehydrate, Fette und Mineralstoffe vor. Im Leben reagiert das Protoplasma gewöhnlich alkalisch, das heißt basisch oder auch neutral, niemals aber sauer.

Im **Zellkern** herrschen phosphorhaltige Eiweiße vor, die Nukleoproteide, besonders im Chromatin. Das Chromatin bildet ein wabig-netzartiges Gerüstwerk innerhalb des Kernraumes. Der Nukleolus enthält bei Algen und Pilzen ebenfalls teilweise Chromatin. In vielen Kernen ist die chromatische Substanz in kleineren Körnchen zusammengeballt, die auf einem besonderen netzartigen, wenig färbbaren Liningerüst auf- oder eingelagert ist.

Das **Zellplasma** ist die zähflüssige Grundmasse, häufig von Schaumstruktur, in der Zellkern und die anderen organisierten Bestandteile der Zelle schweben oder schwimmen. Das Plasma ist durchsichtig bis körnig. Man unterscheidet das durchsichtige **Hyaloplasma** von den Körnern des **Polioplasmas**. Die körnigen Bestandteile des Zellplasmas werden auch **Mikrosomen** genannt. Im Plasma kommen körnchenlose Stellen, die Vakuolen, vor.

Die **Chromatophoren** oder Farbstoffträger lassen drei verschiedene Arten unterscheiden.

Die **Chloroplasten** oder **Chlorophyllkörner** haben, besonders bei Algen, mannigfaltige Formen, kugelig, ellipsoid, bandförmig, plattenförmig, sternartig usw. Sie enthalten das Chlorophyll oder Blattgrün, das aus vier Komponenten zusammengesetzt ist. Die wechselnde Zusammensetzung aus den einzelnen Komponenten ermöglicht die ungemeine Mannigfaltigkeit in den Abschattierungen des Blattgrüns, mit dem die Natur unser Auge erfreut. Die Chlorophyllkörner zeigen im Leben keine Struktur, sie sind homogen grün gefärbt. In ihnen bildet sich die Stärke, die ein reines Kohlehydrat darstellt. Die Stärkekörner bestehen aus 80 - 85 % Amylose und Amylopektin.

Besonders gestalteten Chloroplasten sind manchmal ein- oder angegliedert die **Pyrenoide**, die jedoch manchmal mit Stärkekörnern umhüllt sind und einen Eiweißkristall enthalten. Chloroplasten finden sich bei allen grünen Pflanzen. Sie fehlen den Pilzen und Bakterien. In den Chloroplasten der Braunalgen und Rotalgen kommen wasserlösliche Farbstoffe vor, welche die braunen und roten Farben dieser Algen verursachen.

In manchen Algen kommt noch Hämatochrom vor, das zu den Karotinen gerechnet wird, jedenfalls sehr nahe damit verwandt ist. Das Hämatochrom findet sich im roten Augenfleck und auch sonst bei Flagellaten, bei der Luftalge *Trentepohlia*.

Leukoplasten sind farblose Chromatophoren nicht belichteter Pflanzenteile; vielfach bilden und enthalten sie Stärke.

Chromoplasten sind Chromatophoren, die hauptsächlich gelbe und rote Farbstoffe enthalten. Sie kommen in erster Linie bei Phanerogamen vor.

Mitochondrien oder Chondriosomen sind wahrscheinlich verschiedenartige Dinge wie Plasmastränge, junge Chromoplasten usw. Sie kommen bei Pilzen vor und in embryonalen Zellen mancher Moose.

II. Leblose Einschlüsse in den Zellen

§ 20. Einschlüsse im Plasma. Von nicht organisierten, das heißt leblosen Zellbestandteilen finden wir bekanntlich folgende vor:

1. Der wässerige Zellsaft. Der Zellsaft reagiert sauer und enthält in Wasser gelöste organische Säuren, Zucker und andere lösliche Kohlehydrate. Bei Pilzen enthält der Zellsaft Glykogen, ebenso bei Schleimpilzen und Blaualgen. Weiter enthält der Zellsaft Eiweiß, endlich eine Reihe von Stoffen, die gemeinhin als Gerbstoffe bezeichnet werden. In besonderen Vakuolen des Zellsaftes werden Fette und Öle gespeichert.
2. Feste Einschlüsse im Zellsaft kommen ebenfalls vor. So sehen wir Kristalle von Kalksalzen auch innerhalb der Algen. Kieselkörper kommen gerade bei Kryptogamen in großem Ausmaße vor (Diatomeen, Schachtelhalme) . Aleuronkörper sind feste, zum Teil kristallisierte Eiweißkörper, meistens Globuline.
3. Einschlüsse in den Chromatophoren. In den Chromatophoren kommen Farbstoffe und Eiweißkristalle vor. Den Hauptbestandteil der Fremdkörper macht aber die Stärke aus. Die Stärke kommt in Form der sogenannten Stärkekörner vor. Das sind kristallähnliche Gebilde, man nennt sie Sphärokristalle oder Sphärite. In wässerigen und alkoholischen Lösungen von Chloralhydrat, ebenso in Wasser von 70 - 80° C verquillt die Stärke und geht in Lösung. Durch Diastase wird Stärke in Zucker verwandelt und geht dann ebenfalls in Lösung. Stärke kommt vor bei Schachtelhalmen, Armleuchteralgen, hier besonders in den Winter überdauernden Teilen. Stärke kommt ferner vor in sehr vielen grünen Algen, Farnen und Moosen. Stärke fehlt den Pilzen, den Braunalgen, den Kieselalgen und den Blaualgen. Mit Jodjodkalilösung färbt sich Stärke bekanntlich blau. Diese Färbung ist nicht haltbar.

III. Die Zellmembranen

§ 21. Die Zellwand oder Zellmembran dient der Pflanze als Stützgewebe. Ihr Hauptbaustoff für alle diese Stützgewebe ist die **Zellulose**. Die Zellulosemembran ist unbelebt, tot, aber der Form nach organisiert. Die Zellulose besitzt micellare Struktur und besteht, wie Röntgendiagramme erkennen lassen, aus vielen kleinen stäbchenförmigen Kristallen (7). Deren Längsachse verläuft in gleicher Richtung wie die Faserachse. Reine Zellulose ist selten, zum Beispiel hat sie die Baumwolle, meistens sind andere Stoffe inkrustiert. Zellulose hat den Brechungsexponenten n = 1,5.

Streng chemisch betrachtet ist die Zellulose ein kompliziertes Kohlehydrat. In der Praxis der botanischen Mikrotechnik kann man den Begriff etwas weiter umreißen, und unter Zellulose auch noch Zellmembranen verstehen, die mit Pentosanen (Hemizellulosen) inkrustiert sind. Der Grund dafür ist der, daß es reine Zellulosemembranen praktisch gar nicht gibt.

Die Zellulose ist in den meisten Flüssigkeiten unlöslich. Sie löst sich nur in frischer Kupferoxidammoniaklösung. Die Zellulose enthält freie Hydroxylgruppen, die reaktionsfähig sind, so daß sie durch starke Säure verändert werden kann.

Die Zellulose kommt bei den meisten Pflanzen vor, sie fehlt jedoch manchen Pilzen.

Zellulose färbt sich mit Chlorzinkjodlösung stark blau. Sowie sich Membranstoffe anders gegen dieses Reagens verhalten, sind sie mit weiteren Stoffen inkrustiert oder angelagert. Die wichtigsten dieser Stoffe sind:

Pektinstoffe. Sie färben sich im Gegensatz zu Zellulose mit Methylenblau und Safranin sehr gut.

Holz. Holzstoff oder Lignin färbt sich mit Chlorzinkjod gelb. Holz kommt bei Kryptogamen fast gar nicht vor. Nur bei Schachtelhalmen (*Casparische* Streifen) und bei Baumfarnen finden wir es.

Die gesonderte färberische Darstellung von Holz kann jedoch von Interesse werden bei parasitischen und saprophytischen Formen, die auf Phanerogamen vorkommen. Holz färbt sich mit basischen Farbstoffen gut. Holz löst sich auf in einer Lösung von $KClO_3$ in Salpetersäure.

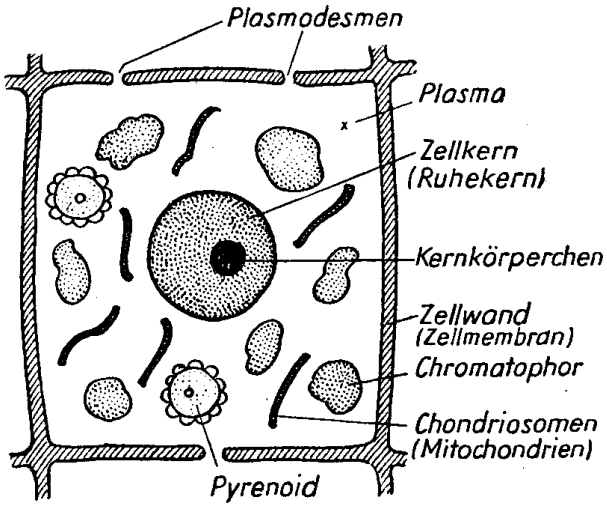
Kork und **Kutin** sind besonders undurchlässig für Wasser, und die beiden Stoffe finden sich gerade deswegen als Schutzschichten gegen die Außenwelt vor.

Chitin. Bei Pilzen ist Chitin vielfach der Baustoff für Membranen. Chitin ist ein stickstoffhaltiges Polysaccharid. Beim Abbau bildet es neben anderen Stoffen Essigsäure. Chitin löst sich in *Javellscher* Lauge. Werden chitinöse Körper mit verdünnter (20 %iger) *Javellscher* Lauge kurz behandelt, so lassen sie sich besser färben. Chitin färbt sich nach der Methode der Tuberkelbazillenfärbungen.

Lichenin und **Isolichenin** sind die Namen für Flechtenbaustoffe, über die nicht allzuviel bekannt geworden ist. Lichenin löst sich in heißem Wasser auf, Isolichenin färbt sich mit Jod blau und mit Rutheniumrot rot.

Abb.3

Schema einer idealen Zelle mit Ruhekern
(§ 19 – 21)



(7) Zitiert nach Paul Karrer, *Organische Chemie*, Leipzig, Verlag Georg Thieme, 1942, S. 384

B. Das Fixieren des Materiales

I. Allgemeines über das Fixieren

§ 22. Alle lebend beobachteten Objekte sind vergänglich und so ist der Wunsch berechtigt, interessante Objekte und die daran beobachteten Erscheinungen in einer dauerhaften Form - dem bekannten Dauerpräparat - darzustellen und aufzubewahren. Die auf die Herstellung von Dauerpräparaten gerichteten Bestrebungen sind nun der Inhalt der mikroskopischen Präparationstechnik. Es soll gleich zu Beginn der Darstellung des technischen Teiles dieses Buches nachdrücklichst darauf hingewiesen sein, daß die Herstellung eines mikroskopischen Präparates niemals Selbstzweck sein soll und kann. Die mikroskopische Untersuchung hat als wissenschaftliche Betätigung den Zweck, Erkenntnisse zu gewinnen. Das mikroskopische Dauerpräparat soll geeignet sein, gleich einer Natururkunde mit dokumentarischer Treue festzuhalten, was die Untersuchung an Erkenntnissen gewonnen hat. Nur wenn die Präparate wirklich alles das zeigen, was sie zeigen sollen und haltbar sind, dann erfüllen sie ihren Zweck.

Nach dem Sammeln muß das Material in einen haltbaren Zustand übergeführt werden. Diesen Arbeitsgang nennt man **Fixieren**.

Dem Fixieren voraus geht eine Prüfung, ob das Sammelgut geeignet ist für eine weitere Verarbeitung. Es ist ja selbstverständlich, daß die zu fixierenden Objekte nicht verwelkt, halb getrocknet usw. sein dürfen. Das sieht man auf den ersten Blick. Manchmal ist aber eine mikroskopische Überprüfung praktisch, die zeigen kann, ob die gesuchten Stadien usw. wirklich im Material vorhanden sind. So sind in den unreifen Pilzsporen der Basidomyceten nicht zu allen

Zeiten Kerne enthalten. Um dies festzustellen, verwendet man Schnellverfahren, die entweder eine Lebendfärbung gestatten oder Färbung und Fixierung in einem Arbeitsgang vereinen.

Zu empfehlen ist vor allem ***Schneiders*** **Karminessigsäure** und dann ferner **Jodwasser-Eosin nach *Palla***. Die bei Phanerogamen bewährte Methylgrünessigsäure nach *Straßburger* versagt bei Kryptogamen in der Regel. Auch verdünnte Jodlösungen oder verdünnte Hämatoxylinlösungen können gleichen Zwecken dienen.

Schneiders Karmin-Essigsäure wird am besten heiß angewendet. Man verbringt die Objekte in die Lösung und zerdrückt sie notfalls oder zerzupft sie.

Die Färbung lebender Bestandteile ohne Beeinträchtigung des Lebens ist selten. Eine Färbung scheint fast immer den Tod anzuzeigen. Wirkliche Lebendfärbungen scheinen nur Neutralrot und Methylenblau zu gestatten. Methylenblau färbt in Verdünnungen von 0,001 % bei Diatomeen den Kern und die Voluntinkugeln. Methylenblau färbt 0,00001 %ig lebende Blaualgen.

In ähnlichen Konzentrationen färben außer Methylenblau auch Methylviolett und Hämatoxylin (reine Substanz) Kleinpilze und Pilzmycelien.

[Heute werden Vitalfärbungen problemlos mit Fluoreszenzfarbstoffen durchgeführt. Über die Verfahren und die Umrüstung eines Mikroskopes zu einem einfachen Blaulicht-Fluoreszenzmikroskop informiere man sich in der einschlägigen Literatur. Anm. Rosenfeldt]

II. Das Abtöten und das Fixieren

§ 23. Ergibt die Vorprüfung die Verarbeitungsfähigkeit der Aufsammlungen, so schreitet man zum Fixieren. Gewöhnlich tötet das Fixiermittel das Objekt gleichzeitig mit dem Fixieren. Für besondere Zwecke, z.B. zum Erhalten von Kernteilungsfiguren, ist es erforderlich, das Abtöten so schnell herbeizuführen, daß die gewünschten Stadien erhalten bleiben, auch wenn das Fixiermittel nicht sofort das ganze Objekt durch und durch fixieren kann. Hier sind dann besondere Fixiermittel am Platze.

Die zu fixierenden Objekte müssen so beschaffen sein, daß die Fixierungsflüssigkeiten überallhin eindringen können. Vor allem nehme man die Stücke nicht zu groß. Ein Zentimeter in der Länge und Breite ist wohl das Maximum der Ausmaße der Objekte.

Das Fixieren selbst - die Dauer des Aufenthaltes in der Fixierungsflüssigkeit - soll nicht länger ausgedehnt werden, als zur Erreichung des Zweckes notwendig ist. Größere Objekte bedürfen einer längeren Fixierungszeit als kleine Objekte. Im allgemeinen reicht eine Frist von 24 Stunden immer zum Fixieren aus. Bei den einzelnen Fixiermitteln ist die Zeit des Fixierens genau angegeben.

Die Menge der Fixierungsflüssigkeit soll das 50-fache bis 100-fache der zu fixierenden Objekte betragen.

Fixiermittel sind im Laufe der Jahre in größerer Zahl bekannt geworden. Für jeden Spezialzweck steht jetzt ein Spezialrezept zur Verfügung. Für die Auswahl eines Fixiermittels ist in erster Linie der Zweck der Untersuchung maßgebend. Man wird bei beabsichtigten einfachen Übersichtsbildern, bei denen womöglich der Zellinhalt noch entfernt werden soll, kein Fixiermittel anwenden, das besonders für die Erhaltung des Zellinhaltes ausgearbeitet worden war.

Es folgen nun die Angaben für einige einfache und einige zusammengesetzte Fixiermittel.

A. Einfache Fixiermittel

§ 24. Alkohol

1. Reiner Alkohol, Ethylalkohol, ist in der Botanik lange Zeit das meist gebrauchte Fixiermittel gewesen. Schon der Ausdruck Alkoholmaterial bezeugt dies. Benutzt wird absoluter Alkohol, oder wenigstens Alkohol von 96 %. Alkohol fällt alle Kolloide aus und härtet die Objekte, die dabei leicht schneidbar bleiben. Auch die Färbbarkeit ist gut. Jedoch schrumpfen viele Objekte stark im Alkohol.

2. Denaturierter Alkohol ist je nach dem Vergällungsmittel zu beurteilen. Ist der Alkohol nur mit Petrolbenzin oder mit Karbolsäure vergällt, so kann er für unsere Zwecke genau wie chemisch reiner Alkohol verwendet werden.
3. Brennspiritus ist jedoch völlig ungeeignet als Fixiermittel. Seine Zusammensetzung wird in der Literatur meist wie folgt angegeben:

Ethylalkohol	88 %
Wasser	9,8 %
Methylalkohol	1,23 %
Azeton.	0,5 %
Pyridinbasen	0,5 %

Neuerdings sind zur Vergällung von Brennspiritus auch noch andere nicht näher bekannt gewordene Mittel verwendet worden.

Brennspiritus macht sehr spröde. Die Sprödigkeit kann durch 24 Stunden langes Wässern aufgehoben werden. Ferner mazeriert Brennspiritus, konzentriert und verdünnt, die Objekte sehr.

§ 25. Andere Alkohole wie **Methylalkohol** oder **Isopropanol** sind in reiner Form nicht als Fixiermittel zu verwenden. Methylalkohol mazeriert ebenfalls gerne die Objekte und Isopropanol (Hartosol) dringt viel zu 1angsam in die Objekte ein. Von der Verwendung von reinem Alkohol als Fixiermittel sieht man am besten ab, man verwende ein geeignetes unter den Alkoholgemischen, die zum Teil ohne Beeinträchtigung der Ergebnisse mit Brennspiritus hergestellt werden können (§ 38).

[Mit der im Originaltext verwendeten Bezeichnung „Propanol“ ist offenbar stets Isopropanol gemeint. Um Mißverständnisse zu vermeiden, wird hier und auch später „Propanol“ oder „Hartosol“ durch „Isopropanol“ ersetzt.]

§ 26. Formalin. Das käufliche Formol des Handels enthält 35-40 % des gasförmigen Formaldehyds. Man muß sich beim Einkauf den genauen Gehalt geben lassen. Zur Verwendung kommt nicht das käufliche unverdünnte Formol, sondern eine Mischung, bestehend aus Wasser 90 ccm und Formol 10 ccm. Es kann unbedenklich Brunnenwasser zum Verdünnen genommen werden. Die oben angeführte Verdünnung des Formols enthält dann 3,5 - 4 % Formaldehyd, je nach Gehalt der käuflichen Ware.

Formalin enthält meistens etwas Ameisensäure, was aber für mikroskopische Zwecke ohne Bedenken ist. Formalin kann sehr einfach neutralisiert werden. Man gibt in die Vorratsflasche etwas Kalziumcarbonat (Marmorstückchen) und schüttelt ab und zu um.

Formalin addiert sich beim Fixieren an die Eiweißkörper der Objekte. Es ist eines der gebräuchlichsten und besten Fixiermittel. Die Objekte schrumpfen darin nicht. Manche quellen etwas. Formalin ist zur Zeit in der Pathologie **das** Fixiermittel.

In Formalin bildet sich manchmal ein Niederschlag von weißem Paraformaldehyd. Bei der Billigkeit des Reagens empfiehlt es sich nicht, solches Formalin weiterzubenützen, da sein Gehalt an wirksamer Substanz unkontrollierbar geworden ist.

In formolfixierten zoologischen und pathologischen Objekten entstehen manchmal dunkelbraune Niederschläge. Sie werden entfernt durch Behandeln der ungefärbten Schnitte mit folgender Lösung: 70 %iger Ethylalkohol 100 ccm und Salmiakgeist 5 ccm.

Ähnliche Niederschläge entstehen auch bei botanischen Objekten. Abhilfe wie bei den zoologischen Objekten.

Formalin kann als Fixiermittel empfohlen werden, wenn keine zu großen Anforderungen gestellt werden. Die Färbbarkeit ist im allgemeinen gut, jedoch nicht so umfassend wie nach Alkohol.

Formalin gerbt die Haut und seine Dämpfe reizen in unangenehmer Weise die Schleimhäute.

[Die hier gegebene positive Bewertung des Formalins **gilt nicht für zoologisches Material**, das in Formalin im Laufe der Jahre weitgehend seine Färbbarkeit verliert! Andererseits ist Formalin für Plankton

immer noch das relativ beste Fixier- und Aufbewahrungsmittel. Objekte mit Kalkskeletten (Foraminiferen) werden wegen des Säuregehaltes entkalkt.]

§ 27. Chromsäure (Chromtrioxid). Wässrige Chromsäurelösungen (0,5 - 1 %ig) werden bei einigen Algengruppen als Fixiermittel benützt.

Chromsäure ist giftig! Haben sich entlang der Fingernägel Chromatniederschläge festgesetzt, so entfernt man sie durch Baden der Finger in Natriumthiosulfat.

Chromsäure bezieht man am besten als konzentrierte Lösung und verdünnt nach Bedarf. Die Kristalle sind hygroskopisch, sehr zerfließlich und ätzend.

In der Regel wird Chromsäure in Verbindung mit Essigsäure in Gemischen verwendet. (Siehe § 39 und § 40) Bei allen chromsäurehaltigen Fixiermitteln ist zu beachten, daß nach ihrer Anwendung Stärke oft nicht aus den Schnitten entfernt werden kann.

Chromsäure ist ein starkes Oxydationsmittel. Eine 1 %ige wässerige Lösung ist jedoch mit Alkohol mischbar.

§ 28. Pikrinsäure. Pikrinsäure ist trocken explosibel. Man kann sie vorsichtig abwiegen, darf sie aber nicht reiben oder drücken. Sie wird als 1 %ige Lösung verwendet. Die Lösung kann entweder mit destilliertem Wasser oder mit 70 %igem Alkohol angesetzt werden.

Pikrinsäure fixiert nur, härtet aber nicht. Beim Auswaschen mit Wasser mazerieren daher die Objekte; sie müssen deshalb mit Alkohol oder Formalin nachgehärtet werden.

Die Pikrinsäure kann nachträglich mit einer Lösung von Lithiumcarbonat entfernt werden.

Die Färbbarkeit nach Pikrinsäurefixierung ist im allgemeinen nicht gut. Ferner betten sich die Objekte schlecht in Zelloidin ein. Man verwendet Pikrinsäure am besten nur da, wo es im Buche als spezielles brauchbares Fixiermittel angeführt ist.

[In der Zoo-Histologie sind dagegen Pikrinsäuregemische, wie die *Bouinsche* Lösung, sehr beliebt. Man bewahrt feste Pikrinsäure gefahrlos und handhabungssicher mit ca. 20% Wasser angeteigt auf.]

§ 29. Osmiumsäure (Osmiumtetroxid). Die teure Osmiumsäure findet, wenn man den Literaturangaben Glauben schenken darf, ausgedehnte Anwendung. Sie ist eigentlich nur ein Tötungsmittel; ihre Dämpfe und ihre Lösungen töten pflanzliche Zellen so schnell ab, daß alle Zellteilungsfiguren erhalten bleiben. Zu härten vermag die Osmiumsäure jedoch die Objekte nicht.

Osmiumsäure, genauer gesagt Osmiumtetroxid , ist leicht löslich in Wasser. Man benützt eine 1 %ige wässerige Lösung. Die Lösung muß vor Licht und Staub geschützt werden, sonst zersetzt sie sich sehr schnell. Am besten soll sie sich halten, wenn der Lösung entweder 0,1 % Chromsäure oder 5 %ige Sublimatlösung tropfenweise zugefügt werden. Bei der Sublimatlösung soll das beste Verhältnis 10 Tropfen auf 100 ccm Osmiumsäurelösung sein.

Osmiumsäuredämpfe reizen die Schleimhäute sehr stark. Der Leser dieses Buches wird selten von der Osmiumsäure in Substanz Gebrauch machen. Dagegen ist die Fixierung kleiner Objekte in Osmiumsäuredämpfen eine häufige Arbeitsweise.

Die Osmiumsäure hat weiterhin die Eigenschaft, daß sie viele Anteile der Objekte schwärzt, was nur umständlich zu entfernen ist, und daß sie langsam in die Objekte eindringt.

[Ohne hier der heute weit verbreiteten Hysterie vor Chemikalien das Wort reden zu wollen, sei vor dem Umgang mit Osmiumtetroxid in geschlossenen Räumen dringend gewarnt, da die Dämpfe zu Hornhauttrübungen und sogar zum Erblinden führen können. Mit dieser flüchtigen Substanz darf man nur unter einem gut ziehenden Abzug arbeiten, und auch die Vorratsflaschen mit gelöstem Osmiumtetroxid müssen in einem Absaugschrank aufbewahrt werden!]

§ 30. Sublimat (Quecksilber-II-chlorid) kann in wässrigen oder alkoholischen Lösungen als Fixiermittel Verwendung finden. Sublimatlösungen sollen immer frisch bereitet sein, da sich beim Stehen störende Niederschläge in den Lösungen bilden. Zum Fixieren kann man gesättigte wässrige oder alkoholische Lösungen verwenden.

Sublimatlösungen werden sehr häufig heiß angewendet.

Sublimat fixiert außerordentlich rasch. Die Färbefähigkeit ist in der Regel sehr gut.

In Sublimatmaterial treten immer Niederschläge auf, die entweder reine Sublimatniederschläge sind und aus Kalomel (Quecksilber-I-chlorid) und aus metallischem Quecksilber bestehen, oder sie entstehen durch falsche Verwendung metallischer Instrumente. In Sublimatlösungen dürfen nur Glasstäbe, Igelstacheln, Holzstäbchen, aber keine Eisennadeln tauchen.

Beide Arten von Niederschlägen können leicht entfernt werden. Nach dem Fixieren werden die Objekte mit Jod nachbehandelt. Man benützt 70 %igen Alkohol, der mit Jodtinktur oder *Lugolscher* Lösung so stark versetzt wurde, daß er eine weingelbe Farbe angenommen hat. Darin bleiben die Objekte, bis der Alkohol sich nicht mehr entfärbt; dies kann einige Tage dauern. Entfärbt sich der Alkohol, so muß etwas Jod nachgegeben werden. Diese Prozedur darf man aber auch nicht übertreiben. Eine solche Behandlung mit Jodalkohol hat den Zweck, das zum Fixieren nicht verwendete Sublimat aus dem Objekt zu entfernen. Durch zu starke Jodalkohollösungen oder Übermäßig langes Behandeln kann auch das Quecksilber entfernt werden, das zur Fixierung verbraucht worden ist; dies ist zu vermeiden.

In den Objekten ist nach dieser Behandlung jetzt Jod vorhanden. Die jodierten Objekte werden zunächst in reinem Alkohol ausgewaschen und dann mit 0,5 %iger wässeriger Lösung von Natriumthiosulfat von Jod befreit. Hieran schließt sich erneutes Wässern an. Meistens genügt die erste Behandlung größerer Objekte nicht. Man sieht dann in den Schnitten erneut Niederschläge auftreten. Die ganze Behandlung ist in solchen Fällen an den Schnitten zu wiederholen.

Statt der oben geschilderten Entfernung dieser Niederschläge nimmt der Verfasser mit Vorliebe die Behandlung der Schnitte mit l %iger wässeriger Kaliumcyanidlösung vor. Diese Lösung löst alle derartigen Niederschläge in kurzer Frist auf. Bei Benutzung einer **Kaliumcyanidlösung** darf jedoch nie vergessen werden, daß sie ein sehr starkes Gift ist und daß sie **niemals mit Säuren vermischt** werden darf.

Die Verwendung einfacher Sublimatlösungen ist kaum zu empfehlen. Dagegen empfehle ich die später besprochenen Sublimatgemische. Die Behandlung mit Jod und Natriumthiosulfat ist aber auch nach Anwendung dieser Gemische unbedingt notwendig.

§ 31. Jod. Jod kann in Dampfform und in Lösung zum Fixieren kleiner Objekte Verwendung finden. Man erwärmt Jodkristalle in einem Reagensglas und gießt die violetten Joddämpfe über den Tropfen aus, der die zu fixierenden Objekte enthält. Die Fixierung ist in Sekunden erfolgt. Das Deckgläschen oder das Uhrschälchen mit den fixierten Objekten wird dann einige Minuten auf etwa 40 ^{o}C erwärmt, wobei das Jod verdampft.

Eine weitere und sehr bequeme Anwendung des Jodes zum Fixieren ist folgende: Dem Wasser, auch Meerwasser, das Algen, Pilze usw. enthält, wird tropfenweise Jodtinktur oder *Lugolsche* Lösung zugegeben, bis zur hellbraunen Färbung. Die Tötung der Objekte erfolgt sofort, das Fixieren dauert ein bis zwei Minuten für kleine Objekte. Stücke von *Fucus* brauchen bis zu einer Stunde. Nachhärten in Formalin. Auswaschen mit 0,5 %iger Natriumthiosulfatlösung. Besonders geeignet für nachfolgende Goldimprägnation. Vielfach bleiben die Grünfärbungen erhalten. In diesem Falle bleicht man durch etwas Chlorwasser, das man dem Formalin zusetzt.

B. Fixiergemische für morphologische und anatomische Zwecke

§ 32. Die einfachen Fixiermittel werden in der Botanik nicht viel angewendet. An deren Stelle sind die Fixiergemische getreten, die mehrere einzelne Fixiermittel vereinen und so zusammengesetzt sind, daß die Nachteile der Einzelmittel vermieden wurden, aber die Vorzüge erhalten blieben.

Um es gleich zu sagen, ein allseitig befriedigendes Fixiermittel gibt es überhaupt nicht. Es gibt also kein Fixiergemisch, das alle Objekte gleich gut fixieren würde, aber für jeden Spezialzweck ein entsprechendes Fixiermittel. Einige Fixiergemische werden nun aufgeführt und kurz charakterisiert. Genaue Anweisung über die Anwendungsgebiete bringt dann der zweite Teil des Buches in den speziellen Arbeitsmethoden.

Fixiergemische ohne Quecksilbersalze

§ 33. Fixiergemisch nach *Carnoy*

Alkohol abs.	60 ccm
Eisessig	10 ccm
Chloroform	30 ccm

Das Fixiergemisch nach Carnoy dringt sehr rasch und sehr gut in die Objekte ein. Fixierdauer 12-24 Stunden. Wenn gleich zum Schneiden eingebettet werden kann, wird das Objekt mit 96 %igem Alkohol ausgewaschen. Soll aufbewahrt werden, wird mit 50 %igem Alkohol ausgewaschen und dann das Objekt in der *Straßburgerschen* Aufbewahrungsflüssigkeit aufbewahrt

§ 34. Fixiergemisch nach *Landowsky*

Aqua dest.	200 ccm
Alkohol, 96 %ig	100 ccm
Formalin, 40%ig	30 ccm
Eisessig	5ccm

Die Einwirkungsdauer ist 24 bis höchstens 48 Stunden. Die Objekte kommen dann sofort in 60 %igen Alkohol. Besonders geeignet zum Schneiden ohne Einbettung.

§ 35. *Pfeiffers* Gemisch

Formalin, 40 %ig	100 ccm
Holzessig, gereinigt.	100 ccm
Methylalkohol	100 ccm

Dieses Gemisch ist von *Pfeiffer von Wellheim* für Süßwasseralgen ausgearbeitet worden, fixiert aber auch Hefen, Pilze, Flechten, Farne und Moose. Nicht geeignet ist es für Objekte, die im Meere vorkommen. Meerwasser gibt mit dem Gemisch Niederschläge. Fixierdauer 12 bis 24 Stunden. Algen können in dem Gemisch auch einige Wochen aufbewahrt werden.

§ 36. *Juelsches* Gemisch Nr. I

Alkohol, 50 %ig	100 ccm
Zinkchlorid, fest.	2 g
Eisessig	2 ccm

Die Fixierdauer ist 24 Stunden. Nach dem Fixieren werden die Objekte direkt in 50 %igen Alkohol übergeführt. Das Gemisch dringt gut ein.

§ 37. Formalinalkohol nach *Chamberlain.* *Chamberlain* bezeichnet den Formalinalkohol als eines der besten Fixiermittel für botanische Zwecke, insbesondere bei Kryptogamen.

Alkohol, 70 %ig	100 ccm
Formalin des Handels.	6 ccm

Für anatomische Untersuchungen unübertrefflich. Sogar Mitosen bleiben manchmal bestehen. Für größere Reisen sehr zu empfehlen, da die Objekte im Formalinalkohol zugleich fixiert und sehr lange aufbewahrt werden können. Über Erweichen von in Formalin zu hart gewordenen Objekten mit 1 %igem Silbernitrat siehe § 60.

§ 38. Formessigsprit nach *Diettrich* (8). *Diettrich* gibt eine Vorschrift bekannt, die gestattet, Brennspiritus zum Fixieren zu verwenden.

Brennspiritus	100 ccm
Formol des Handels	10 ccm
Eisessig	3 ccm

Dauer der Fixierung ist 24 Stunden. Das Mittel ist nach meinen Erfahrungen sehr gut. Der Eisessig kompensiert die Eigenschaften der Pyridinbasen völlig. Hauptsächlich für anatomische Präparate und für Objekte, die schwer von Wasser durchtränkt werden. Die Objekte kommen sofort nach dem Fixieren in 60 %igen Alkohol

(8) Zitiert nach H.Geidis, *Praktische Mikroskopie 13*, 1935, S. 28f.

§ 39. Chromessigsäure nach *Flemming.* Die Chromessigsäure gehört zu den am häufigsten verwendbaren Fixiermitteln. Es ist jedoch nötig, darauf hinzuweisen, daß sie nur dann gut wirkt, wenn sie frisch ist. Schon wenn die Lösung anfängt dunkelgelb bis braun zu werden, verwendet man sie am besten nicht mehr. Grasgrün gewordene Lösungen sind völlig unbrauchbar.

Gewöhnlich wird als Zusammensetzung angegeben:

Destilliertes Wasser	100 ccm
Chromsäure in Kristallen	0,7 g
Eisessig	0,5 ccm

Nach *E.Ulbrich* gibt man der Chromessigsäure eine dem jeweiligen Zweck angepaßte Zusammensetzung. Der Chromsäureanteil fixiert besonders gut die Kerne, während das Plasma durch den Eisessiganteil fixiert wird. Die genaue Zusammensetzung der angepaßten Chromessigsäure ist bei den einzelnen Objekten im speziellen Teil dieses Buches angegeben.

Da die Chromsäure sehr hygroskopisch ist, erscheint es zweckmäßig, sich eine 1 %ige oder 10 %ige wässrige Lösung vorrätig zu halten.

Das Auswaschen der mit Chromessigsäure fixierten Objekte erfolgt mit Wasser. Sollten sich Rückstände oder Niederschläge schlecht auswaschen lassen, so entfernt man sie leicht mit Wasser, das etwas schweflige Säure enthält. Manchmal genügt auch schwach mit Salzsäure angesäuertes Wasser.

Die Färbbarkeit nach Chromfixierung ist gut. Nur Hämatoxylinfärbungen versagen danach meistens.

§ 40. Chromessigsäure - Formalin. *Nemec* hat folgende Vorschrift bekannt gegeben:

1 %ige wässrige Chromsäure	94 ccm
Formol des Handels	5 ccm
Eisessig	1 ccm

Dieses Gemisch ist für die gleichen Zwecke bestimmt wie die Chromessigsäure nach Fleming. Das Formalin verbessert den Zustand des Plasmas.

§ 41. Pikrinsäuregemisch nach *Bouin.* Das bekannte Gemisch hat folgende Zusammensetzung:

Gesättigte wässrige Pikrinsäurelösung	15 ccm
Formol des Handels	5 ccm
Eisessig	1 ccm

Die Lösung ist nicht haltbar, sie wird am besten unmittelbar vor Gebrauch gemischt. Fixierdauer 2 bis 24 Stunden. Auswaschen in 70 %igem Alkohol.

Für Zelloidineinbettung ist das Material nach Pikrinsäurefixierung nicht immer geeignet, die Durchtränkung mit Zelloidin ist unvollständig. Nach *Bolzack* (zitiert nach *Romeis*) hängt dies

mit der Bildung von Kaliumpikrat beim Fixieren zusammen. Behandelt man jedoch die mit *Bouin* fixierten Objekte mit folgender saurer Ölmischung:

Zedernholzöl	10 ccm
Alkohol	80 ccm
Origanumöl	20 ccm
Salpetersäure	10 ccm

so lassen sie sich gut einbetten und schneiden.

Die Objekte verbringt man aus 96 %igem Alkohol in diese saure Ölmischung, nach 48 Stunden wäscht man in dreimal gewechseltem 96 %igem Alkohol aus. Nun kann wie üblich in Zelloidin eingebettet werden.

§ 42. Pikrinschwefelsäure. Die Pikrinschwefelsäure ist ein Fixiergemisch für ganz spezielle Zwecke. Sie wirkt äußerst rasch ein, durchdringt auch größere Objekte, löst aber viel Zellulose auf. Ihre Zusammensetzung ist:

Wässrige konzentrierte Pikrinsäure	100,0 ccm
Eisessig	0,5 ccm
Schwefelsäure	0,5 ccm

Bei sehr empfindlichen Objekten wird die Menge der Schwefelsäure auf die Hälfte herabgesetzt. Ausgewaschen wird mit 60 %igem Alkohol.

Die Pikrinschwefelsäure wird verwendet zum Nachweis der Plasmodesmen, ferner zum Fixieren kleiner Objekte unter dem Deckglas beim Kollodiumhäutchenverfahren.

§ 43. Trichloressigsäure nach *Heidenhain.* Trichloressigsäure ist ein ganz vorzügliches Fixiermittel. Es fixiert nicht nur Eiweiß, sondern auch Muzin. Außerdem verändert es die Gerbstoffe nicht, so daß sie durch nachfolgenden Alkohol gelöst werden können. Besonders geeignet ist sie für rindenbewohnende Parasiten und Epiphyten. Die Baumrinden verfärben sich nicht. Man verwendet folgende Lösung:

Aqua dest.	90 ccm
Formalin des Handels	10 ccm
Trichloressigsäure	5 g

Dauer der Fixierung 1 bis 24 Stunden, Auswaschen in Wasser.

Fixiergemische mit Quecksilbersalzen

§ 44. Trotz der Unbequemlichkeit der Nachbehandlung mit Jod und Natriumthiosulfat haben sich die sublimathaltigen Fixiergemische zu behaupten gewußt. Die Färbeergebnisse, besonders mit Karmin- und Hämatoxylinfärbungen, sind so gut, daß man immer wieder auf sie zurückgreifen wird. Wir bringen folgende Arbeitsvorschriften:

§ 45. *Zenkers* Gemisch. Zusammensetzung:

Destilliertes Wasser	100 ccm
Kaliumdichromat	2,5 g
Natriumsulfat	1,0 g
Quecksilber-II-chlorid	5,0 g

Kurz vor Gebrauch wird noch zugesetzt:

Eisessig.	5,0 ccm

Die Dauer der Fixierung ist 24 Stunden. Die Kerne werden sehr gut fixiert. Färbbarkeit nach *Zenker* ist gut. Die Niederschläge sind reichlich.

§ 46. Sublimat-Eisessig nach *Kaiser*. Zusammensetzung:

Destilliertes Wasser	100 ccm
Quecksilber-II-chlorid	10 g
Eisessig	3 ccm

Besonders geeignet für fleischige, größere Pilze (Morcheln, Agaricazeen, Boletusarten usw.).

Die Einwirkung soll nicht länger dauern, als bis die Objekte ganz durchtränkt sind.

Dieses Fixiermittel wird kaum noch angewendet. Es ist ganz verdrängt worden von "Susa" nach *Heidenhain*

§ 47. Susa nach *Heidenhain*. Susa nach *Heidenhain* ist eines der allerbesten Fixiermittel für allgemeine Zwecke. Es besteht aus:

Aqua dest.	80 ccm
Natriumchlorid	0,5 g
Quecksilber-II-chlorid	4,5 g
Trichloressigsäure	2 g
Eisessig	4 ccm
Formol des Handels	20 ccm

Susa konserviert neben den anatomischen Einzelheiten viele Zelldetails. Fixierdauer 1 bis 24 Stunden, je nach Größe der Objekte und Durchdringbarkeit. Aus dem Fixiermittel kommen die Objekte sofort in 90 %igen Alkohol (nicht Brennspiritus), Jodalkohol usw.

§ 48. Sulimat-Alkohol. *Schaudinn* hat für die Fixierung von Flagellaten folgende Vorschrift angegeben:

Wässrige konz. Quecksilber-II-chloridlösung	100 ccm
Absoluter Alkohol	50 ccm

§ 49. *Gilsonsche* Mischung. Zusammensetzung:

96 %iger Alkohol	42 ccm
Aqua dest.	60 ccm
Eisessig	18 ccm
Salpetersäure, konz. (65%ig)	2 ccm
Wässrige konz. Quecksilber-II-chloridlösung	11 ccm

Die beiden letzten Fixiermittel dringen rasch und tief ein. Fixierdauer meistens nur Minuten für kleine Objekte.

C. Fixiermittel für quellbare pflanzliche Objekte

§ 50. Bei den Kryptogamen kommen quellbare Substanzen vor wie Schleime, Gallerten und Gummi. Diese Stoffe werden durch die bisher angeführten Fixiermittel nicht fixiert. Sollen diese quellbaren Substanzen erhalten und gefärbt werden, so ist folgender Weg einzuschlagen:

Die Objekte kommen zuerst in absoluten Alkohol zum Fixieren und dann in eine wässrige 5 %ige Lösung von Aluminiumchlorid. Zum Färben empfehlen sich *Becher*-Farben, die mit Aluminiumchlorid angesetzt worden sind, wie z.B. Alizarinzyanin (9).

Quellbare Substanzen kommen vor z.B. im Halskanal der Archegonien, in den Stengeln mancher Farne, bei Isoetes, bei Algen, besonders Blaualgen und einigen Meeresalgen.

Meeresalgen müssen mit Formalin fixiert und dann vorsichtig gewässert und in Alkohol übergeführt werden, damit die bekannten Niederschläge vermieden werden.

(9) H.Gaecks, Mikrokosmos XXVIII, Jahrg. 34/35, S. 50

D. Fixiermittel zur Verarbeitung von Herbarmaterial

§ 51. Manche heiß ersehnte Objekte bekommt man nicht in dem Zustand, in dem man sich sein Material wünscht. Man hat sich manchmal auch nur mit Herbarmaterial zu begnügen. Das Herbarmaterial verhält sich ganz verschieden.

Verhältnismäßig **sehr gut verarbeiten** lassen sich: getrocknete Pilze, Selaginella, Flechten. **Gut:** Moose, Lebermoose, Algen, Rinden, Gräser und Koniferennadeln. **Mäßig bis schlecht:** Farne, Phanerogamen.

Die Behandlung des Herbarmateriales beginnt in jedem Fall mit Einweichen in möglichst luftfreiem Wasser. Wenn die Objekte die Luft sehr hartnäckig festhalten, nimmt man eine Wasserstrahlluftpumpe zu Hilfe. Das Einweichen dauert 24 Stunden. Soll die grüne Farbe möglichst erhalten bleiben, so ist dem Wasser sehr wenig Kupfersulfat (eine Spur) und etwas Milchsäure zuzusetzen. Meistens bräunen sich die Objekte darin.

Wenn das Einweichen noch nicht zum Ziele geführt hat, das heißt, wenn die Pflanzen nicht ihre ursprünglichen Formen aufweisen, so kocht man die Objekte vorsichtig auf. Das Aufkochen erfolgt in reinem Wasser oder in Milchsäure. Das Gefäß mit den Objekten darf aber nicht direkt über einer Flamme, sondern nur in einem Wasserbade erhitzt werden. Nach dem Aufkochen können die Objekte mit SO2 wieder ergrünt werden. (Näheres siehe Methode von *Pollaccei*, § 66 Ziffer 4) Auf diese Weise können leidliche morphologische Präparate von Moosen und Flechten erhalten werden. Besonders bei den Moosen bemerkt man aber bei stärkerer Vergrößerung den Unterschied gegenüber frischem Material. Algen können nach dem Aufkochen mit Milchsäure versuchsweise fixiert (*Pfeiffers* Gemisch) und mit Alizarin-Viridin gefärbt werden.

Scheint das Material gut zu sein, so kann man versuchen, es auch auf Schnitte zu verarbeiten. Man fixiert mit Formessigsprit oder *Pfeiffer* und bettet in Zelloidin ein, wenn man nicht ohne Einbettung schneiden kann. Die Objekte werden schneidbarer, wenn sie oder die Zelloidinblöcke längere Zeit in Milchsäure, Lactophenol oder Glyzerin liegen oder darin aufgekocht werden. Von der Güte des Erhaltungszustandes hängt es dann ab, ob der plasmatische Zellinhalt mit Eau de Javelle entfernt werden muß oder nicht.

Thaler (10) fand, daß sich 30 und 40 Jahre altes Herbarmaterial noch gut hat verwerten läßt. Kernfärbung mit Kernschwarz und Gegenfärbung mit Chrysoidin ist möglich gewesen. Im allgemeinen wird man jedoch nur Membranfärbungen anwenden können.

(10) H.Thaler, *Die Verarbeitung von Herbarmaterial*, Mikrokosmos XXV, 1931/32, S.19

E. Fixiermittel für cytologische Untersuchungen

§ 52. Die bisher angeführten Fixiermittel sind für alle morphologischen und anatomischen Studien angezeigt. Für Arbeiten über genauere Vorgänge innerhalb der Zelle genügen sie jedoch nicht. Hier sind Fixiermittel am Platze, die sehr schnell töten, damit die Zellteilungsvorgänge festgehalten werden oder damit bestimmte Zellbestandteile mit genügender Klarheit dargestellt werden können. Für Kernteilungsstudien wird ganz allgemein die Verwendung der Osmiumsäure empfohlen. Die Anwendung der Osmiumsäure kann in Form von Dämpfen oder in den bekannten *Flemmingschen* Fixiergemischen erfolgen.

§ 53. Osmiumsäuredämpfe. Sehr kleine Objekte, wie kleine Algen, Pilze und Schwärmer dieser Pflanzengruppen, fixieren sehr schnell und sehr gut im Dampf der Osmiumsäure. Man gibt das Objekt in einem kleinen Wassertropfen auf einen Objektträger und hält diesen über die geöffnete Flasche mit der Osmiumsäure. Der aufsteigende Dampf genügt vollkommen zum Fixieren. Die Zeit der Einwirkung ist ganz kurz zu bemessen und schwankt zwischen 30 Sekunden und 1 - 2 Minuten. Jedenfalls dürfen keine Verfärbungen oder Schwärzungen auftreten. Die

Osmiumsäuredämpfe verdunsten dann an der Luft in wenigen Minuten vollständig. Ein Auswaschen usw. der Objekte ist nicht notwendig, kann aber mit destilliertem Wasser erfolgen.

Die Flemmingschen Fixiergemische können zum Fixieren mit Osmiumdämpfen nicht verwendet werden. Die mitwirkenden Dämpfe der Essigsäure bewirken grobe Ausflockungen in den Objekten

§ 54. Die *Flemmingschen* Fixiergemische. Als beste Fixiergemische für cytologische Zwecke gelten die beiden Gemische nach *Flemming*, auch Bonner Mischungen genannt. Es sind zwei Vorschriften in Gebrauch.

1. Die schwächere Bonner Mischung:

1 %ige wässrige Chromsäurelösung	25 ccm
1 %ige wässrige Essigsäurelösung	10 ccm
Destilliertes Wasser	55 ccm
1 %ige wässrige Osmiumsäurelösung	10 ccm

2. Die stärkere Bonner Mischung:

1 %ige wässrige Chromsäurelösung	45 ccm
2 %ige wässrige Osmiumsäure	12 ccm
Eisessig	3 ccm

Beide Mischungen sind schlecht haltbar und können nicht auf Vorrat gehalten werden; am besten werden sie unmittelbar vor Gebrauch hergestellt.

Die schwächere Mischung ist für kleine Objekte, die stärkere Mischung für etwas größere Objekte vorgesehen. Das Fixieren hat im Dunkeln zu erfolgen. Die Fixierdauer beträgt 1-2 Tage. Hernach erfolgt 24 Stunden lang Auswaschen in Leitungswasser.

Meistens wird das stärkere Gemisch angewendet.

Die Osmiumsäure schwärzt die Objekte vielfach. Diese Schwärzung muß durch Einwirken von Wasserstoffperoxid wieder entfernt werden. Man nimmt eine Lösung von 5 ccm Wasserstoffperoxid in 100 ccm 70 %igem Alkohol. Die Dauer der Einwirkung ist im allgemeinen mit 12 Stunden zu bemessen. Die Schwärzung kann auch durch Terpentinöl entfernt werden, in dem die Objekte bis zu 2 Tage verbleiben müssen.

Die beiden Bonner Mischungen dringen langsam in die Objekte ein. Größere Objekte zeigen daher vielfach verschiedene Zonen des Fixierungsstadiums.

Nach *Chamberlain* ist die Osmiumsäure weniger ein Fixierungs- und Härtemittel als ein Tötungsmittel. Nach seinen Erfahrungen genügt es, die Objekte 1 - 2 Stunden vorzufixieren in einer Chromessigsäure mit einigen Tropfen Osmiumsäurezusatz und dann fertig zu fixieren in Chromessigsäure ohne Osmiumsäurezusatz.

Die Osmiumsäuregemische haben unleugbar einige unerwünschte Eigenschaften. Deshalb hat man immer nach brauchbaren Arbeitsvorschriften gesucht, welche es gestatten würden, die teure Osmiumsäure zu umgehen. Von den zahlreichen Vorschriften führe ich nur eine an, das Mannheimer Fixiergemisch nach *Gutbrod*.

§ 55. Mannheimer Fixiergemisch nach *Gutbrod* (11). Für embryonales Pflanzenmaterial und für viele entsprechende Formen der Kryptogamen kann die Osmiumsäure vermieden werden durch Anwendung folgender Fixierungsvorschrift. Man mischt:

96 %igen Alkohol	150 ccm
Eisessig	50 ccm
Chromsäure, krist.	0,5 g
Pikrinsäure	0,5 g

Die zuerst dunkelbraune Lösung wird nach öfterem Schütteln sattgrün und ist dann verwendungsfähig. Bei zarten und kleinen Objekten verdünnt man mit der gleichen Menge destillierten

Wassers. Die Fixierdauer ist die gleiche wie bei den beiden *Flemmingschen* Gemischen, das heißt 1-2 Tage. Das Auswaschen erfolgt in 70 %igem Alkohol (zweimal wechseln!), dann 96 %igen Alkohol (ebenfalls zweimaliger Wechsel), dann folgen die Intermedien Terpineol - Benzol oder Zedernöl und das Einbetten in Paraffin.

(11) E.Gutbrod, *Praktische Mikroskopie* 13, 1935, Heft 4, S. 128

§ 56. *Regaudsches* Gemisch für Chondriosomen. Chondriosomen werden durch die beiden *Flemmingschen* Gemische oder auch durch das Mannheimer Gemisch vielfach erhalten. Speziell zu ihrer Fixierung kann das *Regaudsche* Gemisch verwendet werden:

3 %ige wässrige Lösung von Kaliumdichromat	80 ccm
Formol des Handels	20 ccm

Nach 4-tägiger Einwirkung erfolgt Nachfixierung in 3 %iger Kaliumdichromatlösung für 3-7 Tage und endlich Auswaschen in Wasser.

§57. Gemisch von *Sapehin* für Chondriosomen. Zusammensetzung:

2 %ige wässerige Kaliumdichromatlösung	50 ccm
10 %ige Auflösung des Handelsformols in Wasser	50 ccm.

Die Anwendung ist die gleiche wie bei dem Gemisch von *Regaud*.

Zerstört werden die Chondriosomen durch Fixiergemische, die Alkohol, Eisessig, sowie Sublimat und Pikrinsäure enthalten.

Die Chondriosomen färben sich mit Eisenhämatoxylin nach *Heidenhain*. Zu suchen sind sie vor allem in Sproßvegetationskegeln, z.B. bei Schachtelhalmen und Farnen. Sollte bei Kryptogamen deren Nachweis nicht glücken, so wäre ein leicht zu verarbeitendes und leicht zu beschaffendes Objekt junge Haferkeimlinge.

F. Veränderungen der Objekte durch das Fixieren

§ 58. Durch das Fixieren - das Abtöten und Härten - ändert sich die chemische Zusammensetzung der Pflanzen vollständig. Zunächst gerinnen (koagulieren) alle kolloidalen Eiweißkörper, dann bilden sich je nach dem angewandten Fixiermittel chemische Verbindungen der Eiweißkörper, die man als denaturierte Eiweißkörper anzusprechen hat. Die Membranstoffe und die Stärke verändern sich so gut wie gar nicht. Sie sind leblos und starr.

Die geringsten chemischen Veränderungen verursacht der absolute Alkohol. Seine Wirkung ist fast ausschließlich koagulierend und wasserentziehend. Formalin addiert sich an die Eiweißstoffe. Es bilden sich elastische unlösliche Massen. Salze der Schwermetalle (Sublimat, Zinkchlorid), sowie Säuren (Chromsäure, Pikrinsäure, Trichloressigsäure) verändern die Objekte chemisch am weitestgehenden.

Bei der Auswahl der Fixiermittel hat man sich von verschiedenen Gesichtspunkten leiten zu lassen: Wer nur morphologische Studien beabsichtigt, kann jedes Fixiermittel benutzen. Cytologische Untersuchungen sind an die speziell dafür vorgesehenen Fixiermittel gebunden.

Stark wasserhaltige Objekte, wie manche Algen, die bis zu 98 % Wasser enthalten können, sind ebenfalls an bestimmte Fixiermittel gebunden. Jedenfalls können sie nicht durch Alkohol allein fixiert werden, da sie sonst rettungslos schrumpfen. Schrumpfungslos fixieren Formolgemische, so Pfeiffer, Gemische mit Trichloressigsäure und vielfach Formolalkohol.

Die Möglichkeit der Färbung ist nicht nach allen Fixierungen gleich gut. Manche Färbungen gelingen am besten nach bestimmten Fixierungen. Vielfach wird aber der Einfluß des Fixiermittels auf die Färbbarkeit überschätzt. Es gelingt durch Vorbehandeln mit Beizen fast in allen Fällen einen solchen Zustand des Objektes herbeizuführen, daß Färbungen in den verschiedensten Arten ausgeführt werden können. Die notwendigen Kenntnisse und Handgriffe dazu werden in den späteren Kapiteln des Buches geboten.

G. Die Aufbewahrung des fixierten Materiales

§ 59. Nachdem die Objekte fixiert worden sind, müssen sie gründlichst ausgewaschen werden, bis kein Fixiermittel mehr vorhanden ist. Dies geschieht am zweckmäßigsten mit den sogenannten *Fairchildschen Siebeimerchen* aus Porzellan. Nach *Kaiser* kommt man vielfach auch mit einer sogenannten Teekugel aus, bei deren Verwendung daran zu denken ist, daß sie aus Metall besteht. Es ist jedoch festzuhalten, daß sich kaum ein Fixiermittel vollkommen entfernen läßt, geht es doch mit den Eiweißkörpern der Objekte in der Regel chemische Verbindungen ein. Anzustreben ist aber immer, das überflüssige, leicht auswaschbare Fixiermittel zu entfernen, soweit es wie Chrom, Jod usw. nicht als Beize für die nachfolgende Färbung erwünscht sein kann.

Auf die Entfernung des Quecksilbers nach sublimathaltigen Fixiermitteln mit Jod Natriumthiosulfatlösung sei auch hier noch einmal ausdrücklich hingewiesen.

§ 60. Nach dem Wässern können die Objekte jetzt weiterverarbeitet werden. Es ist jedoch dringend zu empfehlen, sich eine **Materialsammlung** anzulegen.

Die fixierten und ausgewaschenen Objekte kommen in eine Aufbewahrungsflüssigkeit. Als solche kommen nur zwei in Betracht: eine *wässerige Formalinlösung* oder die sogenannte *Aufbewahrungsflüssigkeit nach Straßburger*.

Formalin nimmt man 4 %ig, das heißt, man verdünnt 10 Raumteile des käuflichen Formols mit 90 Raumteilen Wasser. Die Objekte werden in Formalin unter Umständen härter als erwünscht. Vor der Verarbeitung sind die Objekte wieder mit Wasser oder Glycerin aufzuweichen. Falls dies nicht zum Ziele führt, geht man wie folgt vor:

1. die Objekte können 14 Tage in 10 %iger Zitronensäure oder
2. 8-14 Tage im Dunkeln in 10% iger Silbernitratlösung

liegen. Etwaige Silberniederschläge können nach Behandlung mit *Lugolscher* Lösung mit 1 %iger Kaliumcyanidlösung oder 5 %iger Natriumthiosulfatlösung leicht entfernt werden. Die Behandlung mit Silbernitrat verbessert übrigens bei allen Objekten die Färbbarkeit recht günstig.

Mikrokosmos VI, 1912/13, Heft 12

§ 61. Die **Aufbewahrungsflüssigkeit nach *Straßburger*** besteht aus gleichen Raumteilen Alkohol, Glycerin und Wasser. Statt des gewöhnlichen Alkoholes kann auch Isopropanol, nicht aber Methylalkohol oder Brennspiritus, genommen werden. Die beiden letztgenannten Alkohole mazerieren die Objekte in ganz starkem Maße.

Diese von *Straßburger* angegebene Aufbewahrungsflüssigkeit entspricht allen Anforderungen vollkommen. Die Objekte kommen in Glastuben und werden reichlich mit der Aufbewahrungsflüssigkeit übergossen. Der Korkstopfen der Tuben wird mit Paraffin zugeschmolzen, so daß der Abschluß möglichst vollkommen ist. Ein Etikett mit den nötigen Angaben (Art des Objektes, Zeit und Art des Fixierens) schützt vor Verwechslungen.

Eine solche Materialsammlung macht unabhängig von den Erfolgen oder Enttäuschungen auf Exkursionen, falls man gerade ein bestimmtes Objekt untersuchen will. Es ist ja eine bekannte Tatsache, daß man manche Objekte oft nur ein einziges Mal im Leben findet, oder gerade nicht dann, wenn man sie dringend benötigt. Ferner gibt die Materialsammlung Gelegenheit zum Tausch und zur Unterstützung befreundeter Botaniker. Sammelergebnisse auf Urlaubsreisen können überhaupt nicht anders verwertet werden. Hier ist Formalin für große Kryptogamen und Pfeiffer für Moose, Algen und Pilze am Platze, da die Objekte in beiden wochenlang liegen können, bis sie dann zu Hause in die *Straßburgersche* Aufbewahrungsflüssigkeit umgelegt werden können.

[Beim Anlegen einer Materialsammlung flüssiger Proben halte man sich stets vor Augen, daß nur eine zugeschmolzene Ampulle wirklich dicht ist; auch noch so gut versiegelte Probengläser müssen daher regelmäßig kontrolliert und ggf. nachgefüllt werden! Aus diesem Grunde sind glycerinhaltige Aufbewah-

rungsflüssigkeiten sehr zu empfehlen, da auch bei Verdunstung ein vollständiges Eintrocknen nicht zu befürchten ist und die Proben durch vorsichtigen Zusatz von Wasser oder Alkohol wieder gerettet werden können. Verwendet man Formalin als Aufbewahrungsflüssigkeit (Algen, Plankton) setze man stets einige Tropfen Glycerin zu! Kleine Probenröhrchen stellt man nach dem Verschließen in ein größeres verschlossenes Gefäß und übergießt alle Röhrchen mit der entsprechenden Aufbewahrungsflüssigkeit. Dies schützt wirksam vor Austrocknung und erleichtert die Kontrolle, da man nur die Flüssigkeit im großen Gefäß gelegentlich ergänzen muß. Außerdem mache man es sich zur Regel, zusätzlich zur äußeren Etikettierung ein mit weichem Bleistift beschriebenes Etikett ***in*** das Probenglas zu geben!]

H. Die Verarbeitung von kleinen und kleinsten Objekten

§ 62. Die Verarbeitung, das heißt das Fixieren, Wässern, Färben usw. ist bei allen Objekten ohne besondere Schwierigkeiten durchzuführen, solange sie mit Pinzette, Pipette oder Schnittfänger transportiert werden können. Sobald die Objekte ungefähr die Größe eines Quadratmillimeters und weniger erreichen, bereitet das Hantieren mit ihnen Schwierigkeiten. Die Anwendung eines binokularen Lupenstatives hilft zwar etwas weiter, aber schließlich kommt eine Grenze, die eine besondere Präparationstechnik erfordert.

Es gibt nun verschiedene Wege, diese Schwierigkeiten zu überbrücken. Sie richten sich nach dem persönlichen Geschmack und der persönlichen Geschicklichkeit und nach Art und Größe der Objekte.

§ 63. Massenware, das heißt Objekte, die in großer Zahl zur Verfügung stehen, bei denen auch einmal etwas verloren gehen darf, verarbeitet sich am leichtesten. Kleine Algen (*Euglena*), Sporen, Hefepilze und ähnliche Objekte können in *Spitzgläsern* behandelt werden. Nach der Einwirkungszeit der Flüssigkeiten, die ab und zu umzurühren sind, läßt man absitzen und gießt die Flüssigkeit ab. So kann Fixieren, Wässern, Färben, Beizen usw. vorgenommen werden. Eine *Handzentrifuge* ist nötig für Materialien, die zu lange in den Spitzgläsern schweben bleiben.

§ 64. Sparmaterial ist Material, das nur in geringer Menge zur Verfügung steht. Bei seiner Behandlung leisten folgende Verfahren gute Dienste:

1. Das Minimumfilter nach *Schmelzer* (12). Das Minimumfilter besteht aus einer kleinen Tasche von nicht faserndem Filtrierpapier, das die Objekte enthält und mit einer Metallklammer oder mittels Nähfaden verschlossen wurde. Im Minimumfilter bleiben die Objekte während des Fixierens, Wässerns, Färbens, Behandelns mit Intermedien bis unmittelbar vor dem Dauereinschluß auf dem Objektträger. Es empfiehlt sich, die Färbezeit an einer kleinen Probe festzustellen. Das Minimumfilter gestattet, Material für mehrere Präparate ganz gleichmäßig zu behandeln. Es ist auch geeignet, ganz kleine Schnitte unverletzt durch alle Fährnisse der Präparation zu bringen.

Zum Färben eignen sich besonders die langsam färbenden Methoden wie Alaunglycerinhämatein nach *Rawitz* oder entsprechend verdünnte *Becher*-Farben.

2. Das Aufklebeverfahren nach *Straßburger* (13) **und *Adams*** (14). Nach *Straßburger* klebt man Sporen, Schnitte usw. wie folgt auf:

Eine 1 %ige Lösung von Gummi arabicum, die mit 0,2% Kaliumdichromat versetzt ist, wird in **dünner** Schicht auf einem Objektträger ausgestrichen. Die Objekte werden auf den noch feuchten Ausstrich aufgestreut. Jetzt läßt man staubfrei auftrocknen (Objektträger umkehren!) und setzt dem Licht aus. Das Licht fixiert das Gummi arabicum in ½ - 1 Stunde gründlich. Man kann jetzt vorsichtig auswaschen, fixieren, färben usw. Die chromierte Schicht wird jedoch gelöst von Kaliumcyanid, Lösungen von Natriumthiosulfat und Eau de Javelle.

Nach *Adams* kann man kleine Objekte, auch fadenförmige Algen und Pilze, wie folgt behandeln:

Auf einem angewärmten Objektträger wird **recht dünn** folgende Gelatine ausgestrichen:

Aqua dest.	100 ccm
Gelatine	1,5 g
Glycerin	5,0 ccm
Phenolum liquef.	1,0 ccm

und zu recht dünner Schicht verrieben. Für das Ausstreichen und Verreiben muß die Gelatine geschmolzen sein, weil sie sonst störende Klumpen bildet. Hernach läßt man erkalten.

Die fixierten und ausgewaschenen Fäden werden nun auf den Objektträger verbracht, geordnet, ausgerichtet und mit einem Pinsel behutsam angedrückt (Vorsicht!). Hernach wird der Objektträger in der feuchten Kammer Formoldämpfen ausgesetzt. Nach 30 Minuten haften die Objekte so stark, daß sie anschließend 5 Minuten lang vorsichtig gewaschen werden können. Hieran schließt sich das Färben, Differenzieren usw. an.

Der Einschluß wird auf demselben Objektträger vorgenommen.

3. Das Kollodiumhäutchenverfahren nach Schmelzer (15). Benützt wird eine dünne Kollodiumlösung. *Geidies* (16) empfiehlt die in Apotheken käufliche 6 %ige Lösung. Dünnere Lösungen lassen sich leichter aufträufeln, ergeben aber keine für das Abziehen genügend festen Häutchen. Kann man die Häutchen auf dem Objektträger oder dem Deckgläschen belassen, so kann man sich dünnerer Lösungen bedienen.

Das Prinzip des Verfahrens ist folgendes: Tropft man auf Glas etwas Kollodium auf, so bildet sich ein Häutchen, das bald trocknet. Man kann es abziehen. Das Häutchen enthält alle auf dem Glase vorgefundenen Fremdkörper wie Staub usw. Bekanntlich ist dies das einfachste Mittel, Objektträger völlig staubfrei zu erhalten. Läßt man das Kollodium nicht austrocknen, sondern bloß erstarren und verbringt es nach dem Erstarren in 70 %igen Alkohol oder noch besser in 70 %igen Isopropanol, so läßt sich nach 12 bis 24 Stunden das Häutchen *in toto* abziehen.

Diese Kollodiumhäutchen haben nun dieselben Eigenschaften wie Zelloidinschnitte und werden wie diese verarbeitet. Ebenso werden nicht abgezogene Häutchen wie aufgeklebte Zelloidinschnitte behandelt. Manche Objekte bedürfen für das Abzugsverfahren erst einer Unterlage dünnen Kollodiums, wenn sie zu sehr am Glase kleben. Diese Objekte sind dann beiderseits von dünnem Kollodium umschlossen.

Das Verfahren leistet in der Hand Geübter sehr gutes, bedarf aber der Einarbeitung. Besonders zu beachten sind folgende Bedingungen:

1. Das Objekt darf nie völlig trocknen. Es würde unter Umständen schrumpfen, aber fast immer auf dem Glase sehr fest ankleben.
2. Die Objekte kommen daher zweckmäßig aus 10-20 %iger Glycerinlösung in 90 %igem Alkohol auf den Objektträger.
3. Die Objekte sollen aus hochprozentigem Alkohol kommen. Kommen sie aus 70 %igem Alkohol und darunter, so wird das aufgegossene Kollodiumhäutchen trüb bis weiß. Meistens kann ja durch Aufträufeln von Äther-Alkohol-Gemisch der Schaden gebessert werden, aber es ist doch einfacher, schon von Anfang an aus hochprozentigem Alkohol zu übertragen, falls Alkoholmaterial überhaupt vorliegt.

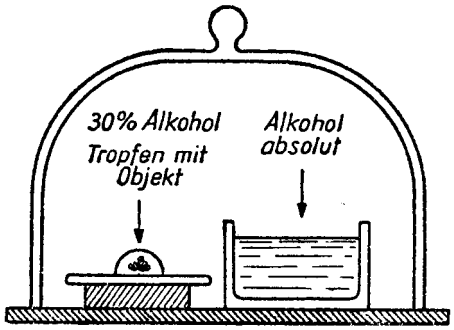
Ein aufgefundenes Objekt, z.B. eine Alge, wird nun auf dem Objektträger fixiert. Man gibt einen Tropfen eines schnell wirkenden Fixiermittels (*Lugolsche* Lösung, Pikrinschwefelsäure, Formalin usw.) darauf und sorgt während des Fixierens für Verdunstungsschutz (große feuchte Kammer). Hernach saugt man mit Pipette oder mittels eines Streifens Filtrierpapier ab, gibt steigenden Alkohol, zum Schluß Alkohol-Glycerin und dann Kollodium darauf. Ausgewaschen wird dann erst mit dem Kollodiumhäutchen.

4. Die Methode nach *Klercker* (17). Kleine Objekte, die man im hängenden Tropfen beobachtet oder kultiviert hat (Vaucheria-Schwärmer, kleine Desmidiazeen, keimende Brandsporen usw.) kann man ebenso schön nach der Methode von *Klercker* verarbeiten.

Zuerst werden die Objekte im hängenden Tropfen mit Osmiumsäuredämpfen oder Joddämpfen fixiert. Das Deckglas mit dem Objektträger kommt nun auf einer Unterlage in eine genügend große Glasschale mit einem Deckel. Dem Tropfen, in dem das Objekt liegt, gibt man nun einen Tropfen 30 %igen Alkohol zu. Neben das Deckglas stellt man ein kleines Gefäß (Fingerhut, Gläschen), das mit absolutem Alkohol gefüllt ist. Eventuell stellt man zwei solche Gefäße in die Glasschale. Die Schale wird nun gut zugedeckt. Nach 24 bis 48 Stunden liegt nun das Objekt, das ursprünglich im Wassertropfen lag, in einem Alkoholtropfen. Hierauf läßt man auf den Alkoholtropfen einen Tropfen Kollodium fallen und arbeitet weiter im Kollodiumhäutchenverfahren.

Abb.4

Schonende Überführung eines kleinen Objektes in absoluten Alkohol (§ 64, Ziff.4)



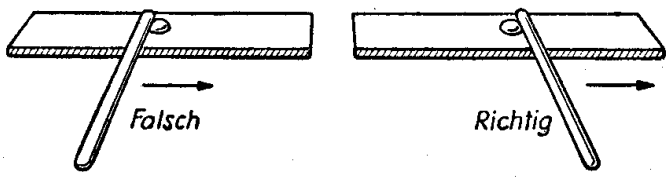
5. Das Ausstrichverfahren. Das Ausstrichverfahren wird ausschließlich bei den allerkleinsten Objekten angewandt. Bakterien, Hefepilze und ähnliches werden ausgestrichen. Das Ausstreichen von Material, das die zu untersuchenden Objekte enthält, geschieht in der bekannten Weise durch ziehendes Ausstreichen. Der lufttrockene Ausstrich wird dann fixiert usw. wie ein aufgeklebter Schnitt.

Das Ausstreichverfahren spielt in der Bakteriologie eine sehr große Rolle. Das Verfahren ist einfach durchzuführen, falls die Objekte selbst oder mit ihrem Medium (Jauche) am Objektträger nach dem Fixieren haften bleiben.

Schwieriger ist es, nicht klebendes Material zu verarbeiten. Hat man derartig konzentriertes und ausreichendes Material, daß es in der Handzentrifuge fixiert werden konnte, hilft man sich folgendermaßen: Auf dem Objektträger wird etwas Hühnereiweißlösung ausgestrichen und darauf ein Tropfen mit dem Material gebracht. Man kann auch einen Tropfen des Materiales und einen Tropfen Eiweißlösung miteinander vermischen und dann ausstreichen. Nach dem Ausstreichen läßt man etwas ankleben und fixiert in der Formalin- Räucherkammer.

Abb.5

Anfertigen von Ausstrichen (§ 64 Ziff.5)



Wer Bastelgeschick hat, wird unschwer im konkreten Fall die Verfahren abändern können, wenn es die Umstände erfordern. Eine Präparationsanleitung kann schließlich nicht alle möglichen Fälle voraussehen, sie kann nur den Leser aufs Roß setzen; reiten muß er dann selber.

(12) W.Schmelzer, Mikrokosmos XXVIII, 1934/35, S. 23

(13) E.Straßburger, *Botanisches Praktikum*, Jena, Gustav Fischer, 1923

(14) J.E.Adams in: Stain Technology 15 (1940), S. 15, zitiert nach Mikrokosmos XXXIV, 1940/41, S.72

(15) W.Schmelzer, Z. f. wissenschaftliche Mikroskopie 50, 1933, H. 3

(16) H.Geidies, Mikroskopie für Naturfreunde XI, 1933, 142 ff.

(17) Öfers. af. k. Vetensk. Akad. Förhandl. 1892 Nr. 9, S.463, zitiert nach E. Straßburger, *Botanisches Praktikum*, Jena, Gust. Fischer, 1923

Kapitel III Präparate mit Erhaltung der natürlichen Farben

Die weitere Verarbeitung des fixierten Materiales

Einbetten und Schneiden

A. Morphologische Präparate unter Erhaltung der natürlichen Farben

§ 65. Viele Kryptogamen sind so lebhaft und schön gefärbt, daß der Wunsch sich einstellt, sie in den natürlichen Farben zu präparieren. Manche Objekte, wie Moose, lassen sich auf morphologische Präparate überhaupt nicht anders verarbeiten, falls man sich nicht ein Herbarium anlegen will.

Es ist leider bis jetzt nicht möglich, kleine Stücke von Moosen oder Lebermoosen zu fixieren, grün zu färben und einzubetten. Der Grund liegt darin, daß die Farben nicht durch die Kutikula der Moose hindurchtreten können. An Farben treten neben grün und blau bei den Kryptogamen auch gelb, rot, braun und schwarz auf. Chemisch sind die Farben sehr verschieden.

Der grüne Farbstoff - das Blattgrün oder Chlorophyll - ist kein einheitlicher Körper. Er besteht in der Regel aus drei Teilen Chlorophyll A und einem Teil Chlorophyll B. Sehr häufig sind in den grünen Pflanzenteilen noch der gelbe Farbstoff Xanthophyll und Karotin vorhanden. Durch die Mischung dieser wenigen Bestandteile wird die unendliche Mannigfaltigkeit der Abstufungen in den Färbungen der grünen Pflanzen erreicht. Ein weiterer Bestandteil des grünen Farbstoffes ist Phyllozyansäure, früher Chlorophyllan genannt. Die Phyllozyansäure ist ein Enzym; durch sie verfärbt und zersetzt sich das Blattgrün beim Tode grüner Pflanzenteile von selbst. Die Phyllozyansäure wird durch Hitze zerstört.

Das Chlorophyll wird gelöst von Methylalkohol, Ethylalkohol, Isopropylalkohol usw., von Äther, von Dioxan, wobei es chemisch verändert wird. Es bilden sich Verbindungen von Chlorophyll A und B mit den Lösungsmitteln, z. B. Methylchlorophyllid.

Das Chlorophyll wird durch Säuren gebräunt unter Bildung von Phäophytin. Das Phäophytin ist frei von Magnesium und wird durch Kupfersalze wieder in eine grüne Verbindung übergeführt. Alkalien wie Kalilauge, Ammoniak bewirken eine Erhaltung der Grünfärbung durch Bildung einer Karbonsäure, des Chlorophyllins.

§ 66. Unter Berücksichtigung dieser chemischen Eigenschaften des Chlorophylls sind folgende Präparationsmethoden entwickelt worden:

1. Inaktivierung der Phyllozyansäure. Man erhitzt die Objekte für 10 - 30 Minuten auf 65^{O} C in einer 10 %igen Lösung von Kaliumacetat. Nach Abkühlen und Auswaschen in Wasser wird in Kaliacetatgelatine nach *Schömmer* eingeschlossen.

Diese Methode ist geeignet für Farne, Moose und insbesondere für empfindliche Objekte, die sich bei den folgenden Methoden bräunen. Empfindliche Objekte können nicht direkt in der Kaliacetatgelatine eingeschlossen werden. Sie müssen nach dem Wässern durch eine Stufe von 2% Kaliacetat bis 20% Kaliacetat, dann in Glycerin-Kaliumacetat und schließlich in die Gelatine überführt werden.

2. Das Kupferlaktophenol nach *Amman*. Herstellung: Man löst 9,2 g Kupferchlorid in 50 ccm Aqua dest., ferner getrennt davon 0,2 g Kupferacetat in 45 ccm Aqua dest. Nach vollständiger Lösung mischt man beide Flüssigkeiten und gibt 5 ccm Lactophenol hinzu. Die Farbe der Mischung ist rein blau. Die Lösung bleibt zwei Tage stehen und wird dann filtriert. Sie soll nicht älter als drei Wochen sein. Sobald sie sich grünlich verfärbt, ist sie unbrauchbar.

Das Lactophenol selbst bezieht man am besten fertig. Es ist unbeschränkt haltbar. Seine Zusammensetzung ist:

Phenol krist.	20 g
Milchsäure (spez. Gewicht 1,21)	20 g
Glycerin puriss. (spez. Gewicht 1,25)	40 g
Aqua dest.	20 g

Die Fixierung mit Kupferlaktophenol eignet sich am besten für Grünalgen des Süßwassers, wie *Eckert* nachgewiesen hat. Für Blaualgen sowie landbewohnende Kryptogamen eignet es sich ebensowenig wie die Kupfer-Lactophenol-Glyceringelatine nach *Ammann*. Hier bräunt sich das Einschlußmittel selbst häufig unrettbar. Über die Anwendung bei Algen ist dort nachzulesen.

3. Die Methode nach *Kisser* *(18).* Die Objekte werden in folgender Lösung fixiert:

Aqua dest.	90 ccm
Formol des Handels	8 ccm
Kupferacetat	10 Milligramm
Milchsäure oder Essigsäure.	5 Tropfen

Kisser schreibt eine 3 %ige Formalinlösung vor. Das oben angegebene Lösungsverhältnis entspricht meistens der Anforderung einer 3 %igen Lösung. Der Formalingehalt der käuflichen Formollösungen schwankt innerhalb weiterer Grenzen.

Die Fixierung geht sehr rasch vor sich und ist in 6 Stunden in allen Fällen beendet. Kleinere Objekte benötigen nur ½ - 1 Stunde (z.B. Farnprothallien, Vaucheria, Moosprotonemata). Ein längeres Fixieren als 12 Stunden ist unter allen Umständen zu vermeiden.

Das Fixierungsgemisch ist in großen Mengen zu verwenden, d. h. es sind in ihm jeweils nur einige wenige Objekte zu fixieren. Ferner sind verschiedene Objekte auch in verschiedenen Mengen der Fixierungsflüssigkeit zu behandeln. Während des Fixierens sind die *Objekte vor Licht geschützt zu halten*, da sie sonst ausbleichen; nach vollendeter Fixierung und nach dem Auswaschen sind die Objekte jedoch haltbar grün. Das gebildete Kupfer-Phyllozyanat ist gegen Licht und gegen schwache Säuren beständig. Statt Kupferacetat kann auch das Kupfersulfat benützt werden. Das Chlorid empfiehlt sich nach *Kisser* jedoch nicht, da es auch bei Gegenwart von Formalin stark mazerierend wirkt.

Zur Fixierung ist nur eine geringe Menge Kupfersalz nötig. Ist die Menge des Kupfersalzes bedeutend, so färbt sich das Eiweiß der Objekte blau, was unschön wirkt. Nach dem Fixieren muß in destilliertem Wasser ausgewaschen werden, der Einschluß erfolgt in der Glyceringelatine nach *Kaiser*. In der Hausenblasengallerte nach *Behrens* ist die Haltbarkeit nicht gut, dagegen recht gut in der Gelatine und der Lävulose-Gelatine nach *Heringa* und *ten Berge*.

Die Methode ist geeignet für Moose, Farne, Schachtelhalme und deren Vorkeime.

Kupferreduktion tritt in Lävulose-Gelatine nach *Heringa* und *ten Berge* nicht auf, wenn alles lösliche Kupfer sorgsam ausgewaschen wurde.

(18) Josef Kisser, *Voraussetzungen und Methodik für die Konservierung der Farbe grüner Pflanzenteile*. Zeitschrift f. wissenschaftl. Mikroskopie 58, 1941

4. Die Methode nach *Pollaccei*. *Pollaccei* benützt zum Fixieren eine 0,1 %ige wässerige Kupfersulfatlösung. Die Dauer der Fixierung ist 24 Stunden. Dabei verfärben sich die meisten Objekte. Ein Wiederergrünen, wie auch die Haltbarmachung der grünen Färbung, erfolgt durch kurze Behandlung mit gesättigter wässeriger Lösung von SO2 in destilliertem Wasser. Hieran schließt sich gründliches Auswaschen in Aqua dest. An. Einbetten wie oben.

Die Methoden von *Kisser* und *Pollaccei* sind auch anwendbar bei Schnitten durch unfixiertes Material. So lassen sich beispielsweise Schnitte durch Blätter und Stengel von Phanerogamen damit behandeln, die von Pilzen oder Algen befallen sind. Dabei bleiben dann die Algen ebenfalls grün und die Rostpilze braun oder gelbrot.

5. Die Methode nach *Straßburger*. Ganz kleine Objekte z.B. Sporen, Schwärmer und ähnliches können nach kurzer Fixierung (Osmiumsäuredämpfe) auch in 2 %iger Kaliumacetatlösung eingeschlossen werden, die man mit ganz wenig Kupferacetat versetzt hat. Besser ist jedoch die Einbettung in Glyceringelatine nach *Kaiser*.

Zur Erhaltung der grünen Farbe ist das Kupfer unersetzlich. In neuerer Zeit hat man auch das Zincum sulfo-carbolicum in 0,5 - 1 %iger Lösung versucht. Nach meinen Erfahrungen fixiert es

den grünen Farbstoff bei Moosen und Farnen sehr schön. Die Färbung ist jedoch in den Einschlußmedien nicht haltbar. Die Präparate bleichen rasch aus.

Für die Beurteilung der Präparate ist folgendes zu beachten: Die eingeschlossenen Objekte sehen in den Präparaten schon deswegen etwas anders aus als im lebenden Zustand, weil sie stark aufgehellt sind. Maßgebend für die Beurteilung auf Brauchbarkeit ist einzig und allein die Prüfung im Mikroskop. Gelungene Präparate zeigen die Chlorophyllkörner schön grün und ohne jede Formveränderung. Die Haltbarkeit der Präparate ist unter Umständen sehr groß. Der Verfasser besitzt Präparate von Lebermoosen, die sich in Kaliazetatgelatine über 14 Jahre unverändert grün gehalten haben.

Zum Schlusse noch eine Bemerkung: Objekte, die sich färben lassen, schließt man besser in gefärbtem Zustand ein.

In der Literatur sind noch einige andere Methoden erwähnt. Hier wurden diese Vorschriften nicht angeführt, da sie nach den Erfahrungen des Verfassers weniger leisten als die hier erwähnten Verfahren. Der Leser wird auch sicher mit den hier gebrachten Vorschriften sein Auslangen finden.

§ 67. Die übrigen nicht grünen Farbstoffe sind durch einfachere Verfahren zu konservieren. Die verschiedenen braunen, gelben, schwarzen und manche rote Farben bleiben erhalten, ohne daß besondere Maßnahmen ergriffen werden müßten. Die Objekte werden einfach in Formalin fixiert und dann eingeschlossen. Der Arbeitsgang ist dabei folgender:

1. die Objekte werden in Formalin fixiert
2. gründliches Auswässern
3. langsames Eindicken in Glycerin
4. Einschließen in Glyceringelatine

Diese einfache Methode ist anwendbar bei kleinen Objekten in toto, z.B. Sporen von Brand- und Rostpilzen, dann von Schnitten durch deren Lager, ferner bei Myxomyceten und ähnlichen Objekten. Auch das Hämatochrom mancher Luftalgen wird auf diese Weise erhalten (*Trentepohlia*).

Manche Autoren empfehlen für Sporen ein vereinfachtes Verfahren. Sie kochen die Sporen einfach in der Glyceringelatine auf dem Objektträger auf und schließen dann gleich ein. Das Verfahren ist nicht sehr schonend und nur für schnelle systematische Arbeiten geeignet. Handelt es sich um sehr dunkle Objekte wie schwarze Rußpilze, auch um dunkle Sporen, so kann das Einbetten in Lactophenolgelatine erfolgen, die sehr stark aufhellt. Schließlich können die Objekte auch mit Vorsicht gebleicht werden. Statt der Gelatine-Einbettmittel können auch die *Hoyerschen* Mittel oder andere chloralhydrathaltige Mittel zum Einschließen verwendet werden.

§ 68. Schwierigkeiten macht nur der eigentliche rote Farbstoff, wie er sich bei den Rotalgen und in den Antheridienständen mancher Torfmoose vorfindet.

Der rote Farbstoff der Rotalgen ist sehr schwer zu konservieren. Er verblaßt in der Regel beim Tode der Rotalgen. Die lebenden Rotalgen müssen fixiert werden in einer Lösung von Meerwasser 100 ccm und Chromalaun 1 g. Die Fixierdauer ist 12 - 24 Stunden. Hernach Auswaschen in Meerwasser und langsames Überführen in Süßwasser. Der Einschluß erfolgt in Glyceringelatine, die schwach mit Chromalaun versetzt worden ist.

Rotalgen lassen sich leicht mit rotem Farbstoff anfärben und gefärbt auf dauerhafte Totalpräparate verarbeiten.

Die Antheridienstände der Torfmoose können entweder mit Formalinlösungen fixiert werden, die mit Essigsäure etwas angesäuert wurden, oder nach oben geschilderter Methode mit 1 %iger Chromalaunlösung in destilliertem Wasser. Der Einschluß erfolgt in Glyceringelatine oder Lactophenolgelatine. Die Haltbarkeit ist schlecht. Die Farbe schlägt bald in blaurot und blau um, trotz der sauren Reaktion der Einschlußmittel.

B. Die Verarbeitung des fixierten Materials

§ 69. Zur Betrachtung und Untersuchung unter dem Mikroskop können die Objekte entweder als *Tota1präparate* oder als *Schnitte* Verwendung finden. Als *Tota1präparate* werden in diesem Buche alle Präparate bezeichnet, zu deren Herstellung keine Schnitte angewendet werden müssen. *Schnitte* sind dünne Scheibchen der Objekte, die mit dem Rasiermesser aus freier Hand oder besser mittels einer besonderen Vorrichtung, dem Mikrotom, hergestellt werden. Zu den Totalpräparaten gehören also alle Objekte wie kleine Pilze, Moose, Algen, die unverändert, also in toto, verarbeitet werden können. Hierher gehören dann auch alle die kleinen Objekte, die als Streupräparate, als Zupfpräparate oder im Kollodiumhäutchen präpariert werden.

Das fixierte Material ist vielfach als solches noch nicht verarbeitungsfähig. Es kann von Natur aus oder durch die Fixiermittel in unliebsamer Weise verfärbt sein oder es muß aus sonstigen Gründen von nicht interessierenden oder die Arbeiten behindernden Bestandteilen befreit werden. Dabei sind die Arbeitsmethoden für Totalobjekte oder für Schnitte grundsätzlich dieselben. Es werden nun die einzelnen Arbeitsverfahren besprochen.

I. Das Bleichen

§ 70. Das Bleichen ist derjenige chemische Arbeitsvorgang, der zu dunkle Objekte aufhellt, durchsichtig macht, ohne die morphologische Zusammensetzung zu verändern; dabei wird also nichts aus dem Objekt entfernt. Es kann durch folgende Arbeitsgänge erreicht werden:

1. Bleichen mit Schwefeldioxid. In Alkohol oder Formalin gehärtete Objekte kommen in folgende Lösung:

Alkohol 96% oder Isopropanol	100 ccm
Natriumsulfit	0,5 g
Salzsäure	einige Tropfen

Es entwickelt sich dann Schwefeldioxid (SO_2), das bleichend wirkt. Die Bleichwirkung ist nicht allzu groß, aber schonend. Man kann sich auch aus einer Apotheke eine wässerige Auflösung von SO_2 besorgen. Eine solche Lösung ist monatelang haltbar, wenn sie vor Licht geschützt aufbewahrt wird. Die Bleichwirkung ist ähnlich der oben angeführten alkoholischen Bleichlösung.

2. Bleichen mit Chlor. Freies Chlor bleicht außerordentlich intensiv und rasch. Chlorwasser ist aus Apotheken zu beziehen. Nach *Straßburger* ist das Bleichen mit Chlor am bequemsten auf folgende Weise durchzuführen:

In einen Glaszylinder, der mit einem Glasdeckel verschließbar sein muß, gibt man einige Kristalle von Kaliumchlorat und fügt einige Tropfen Salzsäure hinzu. Wenn sich nun genügend Chlorgas entwickelt hat, gießt man einige Kubikzentimeter Alkohol hinzu, in dem sich das Chlor auflöst. Man vermeide bei diesen Arbeiten, das Glas mit dem Chlor dem freien Sonnenlicht auszusetzen. Bei dieser Methode, die 1/4 - 2 Stunden beansprucht, bleichen alle braunen Pflanzenfarben, auch die durch Osmiumsäure geschwärzten Objekte. Schaden nehmen die Objekte nicht. Eiseninstrumente eignen sich für alle diese Manipulationen nicht; am besten sind Platindraht oder Instrumente aus Holz. Nimmt man bei diesem Verfahren Kaliumchlorat und als Säure statt Salzsäure Salpetersäure, so entwickelt sich nicht Chlor, sondern Sauerstoff, der ebenfalls stark bleicht und in Wohnungen besser als Chlor verwandt wird.

[Vorsicht beim Umgang mit Chloraten! Diese dürfen *niemals* mit konzentrierter Schwefelsäure oder hochprozentiger Salpetersäure zusammengebracht werden, da dann hochexplosives Chlordioxid ensteht! Man löse das Chlorat zunächst *vollständig* in Wasser und setze erst dann die Säure zu!]

3. Die Bleichmethode nach *Kopsch* (19). Diese sehr brauchbare Methode benützt ebenfalls die Bleichwirkung des freien Chlors. Man mischt eine frische 1 - 2 %ige Lösung von unzersetztem

Chlorkalk mit der gleichen Menge 1 % iger wässeriger Chromsäure. Die Mischung ist hellgelb gefärbt. Die Bleichung ist in wenigen Minuten bis Stunden erreicht, auch bei schwer bleichenden Stoffen wie Baumrinden.

Chlorkalk ist leider schlecht haltbar. Ich empfehle daher an seiner Stelle *Caporit* zu verwenden. *Caporit* ist ein Erzeugnis der *Behringwerke* und besteht fast nur aus chemisch reinem unterchlorigsaurem Kalzium. Es wird in handlichen kleinen Blechpackungen in den Handel gebracht, in denen es praktisch sehr haltbar ist; Bezug durch Apotheken, Preis für 100 g 0,60 M. Von *Caporit* nimmt man eine 1 %ige Lösung. Bei Verwendung von Brunnenwasser ergibt *Caporit* eine Trübung oder einen Niederschlag, der mittels Glaswolle abfiltriert werden muß.

Bei Verwendung von *Caporit* arbeitet man folgendermaßen: Zu 5 ccm 1 %iger *Caporitlösung* wird tropfenweise Salzsäure zugefügt, bis eine eben erkennbare Hellgelbfärbung aufgetreten ist; es bildet sich freies Chlor, das sich im Wasser auflöst. Diese Lösung bleicht sehr schnell.

Eine andere Methode wäre folgende: Zu 5 ccm 1 %iger Chromsäurelösung setzt man tropfenweise 1 %ige *Caporitlösung* zu, aber nicht bis zum Farbenumschlag nach hellzitronengelb. Diese Lösung bleibt ohne Trübung und bleicht sehr schnell. Überflüssiges Chrom kann fast augenblicklich durch Wasser mit darin aufgelöstem Schwefeldioxid entfernt werden.

Werden die Objekte in den beiden wässerigen Bleichlösungen zu sehr mazeriert und zerbrechlich, verwendet man alkoholische Lösungen. Zum Beispiel eine Mischung aus Isopropylalkohol 5 ccm und 1 %ige wässriger *Caporitlösung* 5 ccm und setzt dieser dann die Salzsäure oder die 1 %ige Chromsäurelösung zu. In dieser alkoholischen Lösung bleiben die Objekte fester in der Konsistenz und können leichter weiter verarbeitet werden.

[*Caporit* ist heute nicht mehr erhältlich, ähnliche Erzeugnisse erhält man aber über Lehrmittelhandlungen (Chlorerzeugung im Chemieunterricht); auch der hypochlorithaltige Abflußreiniger *Chlorix* kann verwendet werden; in jedem Falle sind die verdünnten Lösungen mit Salzsäure anzusäuern. Erfahrungen hinsichtlich Bleichwirkung und Mazerierung der Objekte liegen allerdings nicht vor.]

(19) R.Kopsch, Zeitschrift f. Mikroskopische anatomische Forschung, Bd. 12, 1928, zitiert nach Mikrokosmos XXI, 1927/28

4. Das Bleichen mit Chlordioxidessigsäure und mit Chlordioxidsalpetersäure. Die Chlordioxidessigsäure, eine Auflösung des gasförmigen Chlordioxids in 50 %iger Essigsäure, wurde unter dem Namen *Diaphanol* im Jahre 1922 von *P.Schulze* in die Mikroskopie eingeführt. In erster Linie war es für die zoologische und histologische Untersuchungstechnik gedacht, da es Chitin und Hornsubstanzen aller Art bleicht und weich macht. Das *Diaphanol* kann mit sehr gutem Erfolg auch zum Bleichen von botanischen Schnitten verwendet werden, das sehr schnell vor sich geht. *Diaphanol* hat jedoch einen Nachteil, das ist seine völlig ungenügende Haltbarkeit. Insbesondere verdirbt es im Licht sehr schnell und auch im Dunkeln in etwa 3 Wochen.

Nach *Drahn* und *W.Moller* (20) ist eine Auflösung des Chlordioxides in 25 %iger Salpetersäure dem Diaphanol vorzuziehen. Es ist haltbarer als Diaphanol und läßt die durch die Essigsäure verursachte Quellwirkung des Diaphanols vermissen.

Die Herstellung von Diaphanol ist geschildert von *Romeis* (21). Diese Herstellung ist nur in einem gut eingerichteten chemischen Laboratorium möglich.

Die Herstellung der Chlordioxidsalpetersäure ist nicht so umständlich und bei Übung im chemischen Arbeiten vielleicht doch manchem Leser möglich. Die Wohnung ist jedoch nicht der geeignete Raum dazu! Chlordioxidsalpetersäure ist eine Mischung von 10 Raumteilen wässriger Chlordioxidlösung und 1 Teil 25 %iger Salpetersäure. Die Herstellung der wässrigen Chlordioxidlösung wird nach *Moller* wie folgt vorgenommen:

"In ein größeres Gefäß (etwa 2-3 Liter Inhalt), das sich mit eingeschliffenem Deckel oder aufgelegter Glasscheibe gut verschließen läßt, gibt man 220 ccm dest. Wasser. In ein Becherglas gießt man vorsichtig in kleinen Portionen zu 12 ccm dest. Wasser unter Umrühren 44 ccm konzentrierte Schwefelsäure, läßt die heiß gewordene Mischung erkalten und gibt dazu 12 g Kaliumchlorat. Nun stellt man das kleinere Gefäß in den größeren Behälter und verschließt diesen vorsichtig und sorgfältig, am besten mit Vaselineabdichtung. Wegen der Giftigkeit des

sich entwickelnden Chlordioxidgases stellt man das ganze in einen unbewohnten Raum und überdeckt es außerdem noch mit einem Pappkarton als Lichtschutz, weil die Chlorgase unter der Einwirkung des Sonnenlichtes explosibel sind! In 24 bis 36 Stunden ist das sich aus dem Kaliumchlorat entwickelnde Chlordioxidgas von dem Wasser in genügender Menge aufgenommen worden und hat diesem eine schöne gelbe Färbung verliehen. Man entlüftet nun mit der nötigen Vorsicht und füllt die wässrige Chlordioxidlösung in eine braune Vorratsflasche mit eingeschliffenem und mit Vaseline abgedichtetem Stöpsel. Die wässrige Lösung ist haltbarer als die essigsaure, muß aber ebenfalls möglichst kühl und dunkel aufbewahrt werden."

Die konzentrierte Salpetersäure hat meistens einen Gehalt von 60-65%. Nach *Geidies* erhält man eine 25 %ige Salpetersäure, wenn man auf 100 ccm Wasser 37,5ccm konzentrierte Salpetersäure gibt.

Soviel über Bleichmethoden. Durch das Bleichen erhalten die Objekte einen stark sauren Charakter. Die Bleichmittel müssen daher sehr gut ausgewaschen und eventuell mit verdünntem Ammoniak neutralisiert werden. Von allen Bleichverfahren bleichen das *Diaphanol* und das salpetersaure Chlordioxid am schonendsten. Im übrigen beherzige man die Mahnung: man bleiche nur, was man unbedingt bleichen muß! Haltbarer werden die Präparate nicht durch diese Prozedur.

[Vor dem Umgang mit dem hochexplosiven und giftigem Chlordioxid kann nur nachdrücklich gewarnt werden! Die Selbstherstellung dieser Lösungen, auch nach der von *Romeis* angegeben Methode, ist für den Amateur ein Himmelfahrtskommando! Die fertigen Lösungen können dagegen unbedenklich verwendet werden.]

(20) Zitiert nach H.Geidies, Praktische Mikroskopie XIII, 1935, Heft 1, S. 27

(21) B.Romeis. *Taschenbuch der mikroskopischen Technik*, München, R.Oldenburg, 1943

II. Die Entfernung störenden Inhaltes der Zellen und der Gewebe

§ 71. Ein vom Bleichen völlig verschiedener Vorgang ist die Entfernung des störenden Inhaltes. **Die Entfernung des gesamten Zellinhaltes** ist angezeigt bei Gewebestudien an Quer- und Längsschnitten der Gefäßkryptogamen. Der Zellinhalt kann leicht entfernt werden durch die bekannte Javellesche Lauge (Eau de Javelle) und durch Kalilauge.

a) Die Javellesche Lauge stellt man sich am besten alle 14 Tage bis 3 Wochen selbst her. Dazu werden 18 g *Caporit* mit 100 ccm Wasser verrieben und 15 Minuten stehen gelassen. Hierauf fügt man 100 ccm 15 %ige Pottaschelösung (Kaliumcarbonatlösung) zu. Am besten nimmt man diese Prozedur in einer Steingut- oder Porzellanschüssel von genügender Größe vor. Es bildet sich ein voluminöser Niederschlag, den man nach Absitzenlassen durch Glaswolle abfiltriert. Die Lösung soll beim Stehen an der Luft kein Häutchen bilden, sonst ist zu wenig Pottasche verwendet worden. Das Aufbewahren geschieht im Dunkeln in Flaschen mit Glasstöpseln. Javellesche Lauge löst an Schnitten in 1/2 bis 1 Stunde den ganzen plasmatischen Inhalt und alles etwa vorhandene Holz auf, ebenso entfernt sie die Gerbstoffe und bleicht zugleich die Objekte.

Nach der Behandlung mit Javellescher Lauge, wobei sich auch etwa gebildete Trübungen von kohlensaurem Kalk aufgelöst haben, sind die Objekte mit 1 %iger Essigsäure zu neutralisieren und anschließend ausgiebigst zu wässern.

b) Die Kalilauge wird in 5%iger wässriger oder alkoholischer Lösung angewendet. Sie ist jedoch längst nicht so schonend wie die Javellesche Lauge.

§ 72. Die teilweise Entfernung des Zellinhaltes ist angezeigt bei Vorhandensein von sehr viel Stärke, Kieselsäure oder Kalk.

1. Die Entfernung der Stärke. Die Stärke wird am besten erst nach dem Schneiden entfernt. Stärkeauflösende Mittel gibt es verschiedene. Es ist von vorneherein zu beachten, daß bei chromfixierten Objekten die Stärke mitunter sehr schwierig zu entfernen ist. Am meisten wird zum Entfernen der Stärke Chloralhydrat benutzt, das sogar ganze Blätter und ähnlich große Objekte entstärkt. Für zarte Objekte nimmt man nach *Kisser* (21) folgende Lösung:

Aqua dest.	50 ccm
Chloralhydrat	80 g

Für resistentere Objekte:

Aqua dest.	20 ccm
Chloralhydrat	50 g

Die Objekte verbleiben in den Lösungen, die man erwärmen kann, bis die Stärke gequollen und aufgelöst ist. Bei grünen Objekten muß das Blattgrün vorher oder nachher noch entfernt werden, was am bequemsten durch Alkohol geschieht. Man kann aber auch eine gesättigte alkoholische Chloralhydratlösung benützen, die Blattgrün und Stärke auflöst, soweit diese Stoffe nach der Fixierung noch in den Objekten vorhanden sind.

Zur Entfernung der Stärke kann auch die **Diastase** angewendet werden. Eine 10 %ige wässerige Lösung der in Apotheken käuflichen Diastase erwärmt man auf 65 ^{O}C (Temperaturkontrolle!) und behandelt damit die Schnitte. Nach einigen Stunden ist die Stärke verzuckert. Wenn kein Einbettofen zur Verfügung steht, benützt man eine Thermosflasche oder legt im Winter das Glas mit dem Objekt in geeigneter Weise auf eine Ofenplatte. Diastase ist gegen Schwermetallsalze (Quecksilber, Kupfer usw.) empfindlich. Man verwendet daher am besten Fixiermittel ohne diese Schwermetalle, falls mit Diastase entstärkt werden soll (22).

(21) Josef Kisser, *Leitfaden der botanischen Mikrotechnik*, Jena, Gustav Fischer, 1926

(22) Nach Helmut Thaler, Mikrokosmos XXIV, 1930/31, S. 84 ff.

2. Die Entfernung der Kieselsäure (SiO_2). Kieselsäure kommt bei Kryptogamen und bei den Phanerogamen häufig vor. Für unsere Arbeiten ist das Vorkommen in Gräsern und in Schachtelhalmen von praktischer Bedeutung. Schon ein einzelner Schnitt durch einen Schachtelhalm nimmt dem Mikrotommesser jede Schärfe. Die Kieselsäure muß daher aus den Objekten vor dem Schneiden entfernt werden. Zur Entfernung der Kieselsäure gibt es als einziges Mittel nur das Auflösen in Flußsäure.

Das Arbeiten mit Flußsäure muß nun im Freien oder abseits von Wohnräumen, z.B. in der Waschküche, im Speicher, Gartenhäuschen usw. vorgenommen werden. Man beachte, daß Glasfenster, Ausgußrohre usw. durch die Flußsäure angegriffen werden. Die Glasschale und der Deckel des Arbeitsgefäßes müssen ganz mit Paraffin ausgegossen werden, wenn man nicht vorzieht, sich Gefäße aus Paraffin für diesen Zweck herzustellen.

Die fixierten Objekte kommen dann in Alkohol, hier genügt auch Brennspiritus, dem man tropfenweise und vorsichtig Flußsäure zusetzt.

Angenehmer ist zu arbeiten, wenn man in dem Alkohol zuerst etwas Natriumfluorid verteilt und dann vorsichtig Salzsäure eintröpfelt. Die Flußsäure bildet sich dann erst im Alkohol.

Die Entkieselung dauert je nach Umfang der Objekte und der Verkieselung sowie nach der Anwendung der verschiedenen Konzentrationen 24 Stunden bis 3 Tage. Geringe Verkieselungen, wie Flugsand oder kleine Bodensplitter an Flechten, können schon nach wenigen Minuten entfernt sein.

Die Flußsäure muß nach Gebrauch vorsichtig beseitigt werden. Das Arbeiten mit Flußsäure ist nicht ungefährlich, man darf daher nicht allzu sorglos damit umgehen.

[Bei allen Arbeiten mit Flußsäure ist zu beachten, daß schon geringe Mengen, eingeatmet, mit der Zeit zu schweren Knochenschäden führen; gleiches gilt für Fluoride. Außerdem macht konzentrierte Flußsäu-

re sehr schwere Verätzungen, die nur äußerst langsam heilen. Man arbeitet unter einem gut ziehenden Abzug mit Laborhandschuhen. Alle Arbeiten werden in Polyethylengefäßen vorgenommen.]

3. Die Entfernung der Kalksalze. Kalk kann sehr störend wirken. Er kommt vor als kohlensaurer Kalk bei Armleuchteralgen, bei verschiedenen Blau- und Meeresalgen, oxalsaurer Kalk ist verbreitet bei Flechten. Die Entfernung geringer Kalkmengen gelingt schon bei der Anwendung säurehaltiger Fixiermittel wie Chromsäure, Trichloressigsäure usw. Hierbei muß aber das Fixiermittel unter Umständen öfters erneuert werden. Ist eine besondere Entkalkung notwendig, so geschieht sie am besten durch 70 %igen Alkohol, dem 3 - 5 % Salpetersäure oder Salzsäure zugesetzt sind. Aufgelöst wird der kohlensaure und der oxalsaure Kalk. Nach dem Entkalken muß natürlich gut ausgewaschen werden.

4. Die Entfernung der Gerbstoffe. Gerbstoffe kommen verschiedentlich bei den Kryptogamen vor. So finden sie sich bei den Jochalgen, bei manchen Pilzen (Polyporaceen, verschiedenen Stereumarten), bei den Moosen und Farnen. Gerbstoffe werden durch längeres Behandeln mit Alkohol entfernt. Auch die Behandlung der Schnitte mit Javellescher Lauge entfernt die Gerbstoffe.

C. Einbetten und Schneiden

I. Allgemeine Bemerkungen

§ 73. Objekte, die zu dick sind, um genügend Licht durchzulassen, müssen für eine mikroskopische Betrachtung in dünne Scheiben - Schnitte genannt - zerlegt werden. Geschnitten werden kann aus freier Hand mit einem plankonkaven, breiten Rasiermesser oder mit Hilfe eines Mikrotoms. Schneiden kann man in beiden Fällen frisches und konserviertes Material ohne Einbettung oder fixiertes Material nach entsprechender Einbettung. Das Schneiden mit dem Rasiermesser aus freier Hand ist nur ein Notbehelf und wird auch nur bei sehr großer Übung solche Schnitte ergeben, welche die Verarbeitung auf Dauerpräparate wirklich lohnen.

Am besten benützt man ein vielseitig verwendbares **Schlittenmikrotom**. Solche Instrumente kommen jetzt schon für mäßigen Preis in den Handel, so daß sie sich auch Liebhaber beschaffen können. Der Verfasser arbeitet seit langem zur vollsten Zufriedenheit mit dem einfachen Schlittenmikrotom Modell H V der Firma *R.Jung* (23).

Eine Beschreibung der verschiedenen Mikrotomtypen und deren Handhabung wird hier nicht geboten. Darüber orientieren am besten die Werbeschriften der einschlägigen Firmen. Es soll hier nur gesagt werden, daß für unsere Zwecke Gefriermikrotome nicht in Frage kommen.

Die Handhabung der Mikrotome ist in allen bisher erschienenen Praktika ausführlichst dargelegt. Auf diese sei deshalb verwiesen. Es ist nicht Zweck dieses Buches, allgemein Bekanntes oder leicht Zugängliches nochmals ausführlich zu wiederholen. Das wirklich Notwendige ist bei Besprechung der einzelnen Einbettungs- und Schneidemethoden kurz gesagt worden.

(23) *R.Jung A.G.*, Heidelberg, Hebelstraße 46

II. Das Schneiden uneingebetteter Objekte

§ 74. Das Uneingebettet-Schneiden bietet sehr viele Vorteile, so daß es überall da angewendet werden sollte, wo die Methode überhaupt durchführbar erscheint. Man spart sehr viel Zeit und vermeidet schließlich auch die sonst unvermeidlichen Veränderungen der Objekte beim Einbetten.

Gerade bei den Kryptogamen ist jedoch leider das Anwendungsgebiet nicht allzu groß. Für das Uneingebettet-Schneiden kommen in Frage: Querschnitte durch Stengel und Rhizome von Farnen im weitesten Sinne, von den größeren Laub- und Lebermoosen, von Blättern und Stengeln von Phanerogamen, die parasitische Kryptogamen beherbergen. Damit dürfte im großen und ganzen das Repertoire erschöpft sein. Alle weicheren Objekte, wie Pilze oder solche, die beim Einspannen im Mikrotom Schaden erleiden können wie Flechtenapothecien, Archegonien und Antheridien der Moose, scheiden naturgemäß aus.

Die Objekte werden entweder frisch geschnitten und die einzelnen Schnitte in das Fixiermittel gebracht oder man schneidet sie nach dem Fixieren und Härten. Eine allgemeine Richtschnur kann hier nicht gegeben werden. Nur die eigene Erfahrung und die größere oder kleinere Geschicklichkeit bestimmen hier die Auswahl.

Zum Schneiden selbst klemmt man die Objekte, z.B. Stengelstücke, zwischen **Holundermark**. So einfach diese Prozedur auch aussieht, so schwierig kann sie manchmal in der Praxis werden. Ein etwa 1,5 cm lange Stück Holundermark schneidet man der Länge nach in zwei gleich große Teile. Das geschieht am besten mit einer Rasierklinge; beim Versuch, ein anderes Messer zu benutzen, erreicht man nur ein Zerbröckeln des Holundermarkes. In beide Hälften des Holundermarkes muß nun eine dem Objekt entsprechende Aushöhlung angebracht werden. Nun spannt man alles - das zu schneidende Objekt von beiden Holundermarkhälften als Mantel umhüllt - in den Objekthalter des Mikrotoms ein. Hierbei ist reichlich Gelegenheit gegeben, Bastelgeschick zu entwickeln. Manchmal ist es günstig, das Holundermark noch einmal in halbkreisförmig ausgeschnittene Holzformen zu packen, weil es sonst oben weit auseinanderklafft und dem Objekt nicht den nötigen festen Halt gibt.

Geschnitten wird mit plankonkavem Messer in sehr schiefer Schnittführung durch Holundermark und Objekt. Die erreichbare Schnittdicke hängt neben der Geschicklichkeit, die man sich erworben hat, sehr vom Zustand der Messer ab. Mit unscharfen Messern läßt sich am Mikrotom nichts Ersprießliches leisten. Die erreichbare günstigste Schnittdicke dürfte zwischen 30 µ und 15 µ liegen. Harte Objekte können nach *Kisser* durch Kochen in Wasser oder verdünntem Glycerin weicher gemacht werden, Hölzer werden auch durch Entkieseln weicher.

Das zu schneidende Objekt wird, wenn es frisch ist, mit Wasser, wenn es fixiert ist, mit Alkohol mittels eines Pinsels befeuchtet. Manche Sorten von Holundermark vertragen ein Befeuchten nicht und werden schmierig; sie sind dann nicht zu gebrauchen. Vom Messer weg kommen die Schnitte entweder in das Fixiermittel oder in Wasser, wo sie von den Holundermarkschnipseln getrennt werden können.

Manche Objekte sind an und für sich zum Uneingebettet-Schneiden recht gut geeignet, lassen sich aber schlecht zwischen Holundermark pressen. Moossporogone, Thallusstücke und ähnlich gestaltete Objekte können unter Verzicht auf Durchdringung mit Seife, Paraffin oder Stearin schnell zum Schneiden hergerichtet werden.

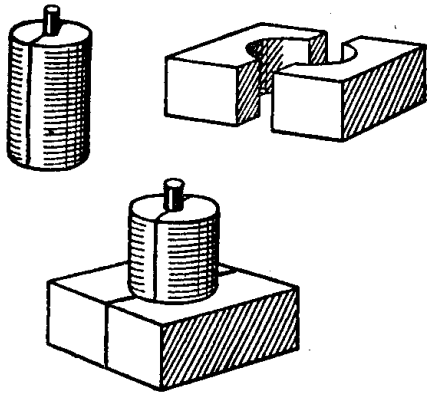
Seife, am besten **Glycerinseife,** zur Not tut es auch Rasierseife, wird mit Rasierklingen genau so in Stücke geschnitten, wie oben bei dem Holundermark angegeben worden ist (24). Der Platz für das Objekt wird nun ausgeschabt und die Höhle mit einer Verreibung der ausgeschabten. Seife in Alkohol ausgefüllt. Man kann auch die käufliche Seifeneinbettmasse dazu verwenden. Wenn nun das Objekt in die Aushöhlung gelegt ist und die beiden Seifenstücke zusammengepreßt eine halbe Stunde liegen bleiben, so verkleben sie zu einem einheitlichen Block, der sich leicht mit schräg gestelltem Messer schneiden läßt. Die Schnitte kommen in destilliertes Wasser, wo sie gründlichst von der Seife gereinigt werden. Sie können aber auch in Formalinalkohol zum Fixieren und Härten des Schneidegutes gebracht werden. In Brunnenwasser gibt Seife Niederschläge von unlöslicher Kalkseife, die sich mit verdünnter Salzsäure auflösen läßt.

Paraffin von niederem Schmelzpunkt (35 - 40 °C) ist zur schonenden Blockbildung sehr geeignet. Eine Glasplatte wird mit Glycerin etwas befeuchtet, hierauf tropft man Paraffin, legt das Objekt auf das erkaltete Paraffin und gibt wiederum flüssiges Paraffin zu. So entsteht ein Paraffinblock. Dieser Block läßt sich leicht von der Glasplatte streifen, zurechtschneiden und am Mikrotom befestigen. Geschnitten werden muß auch hier mit ganz schiefem Messer. Wenn man härtere frische Objekte so behandeln kann, muß man doch viele Objekte erst fixieren und härten.

Auch das **Stearin** läßt sich notfalls zu behelfsmäßiger Herrichtung von Objekten benützen. Stearin steht am bequemsten in den Stearinkerzen zur Verfügung. Diese Kerzen bestehen aus Stearinsäure, Palmitinsäure und etwas Paraffin. Stearin löst sich in Alkohol auf. Die Objekte werden daher zweckmäßig aus Alkohol verarbeitet, weil dann das Stearin fester haftet als sonst. Wenn die Objekte es vertragen, können sie wie Flechten (25) nach *Möbius* auf beiden Seiten in trockenem Zustand beträufelt werden. Das Schneiden erfolgt wieder mit schräg gestelltem Messer. Die Entfernung des Stearins geschieht zunächst mit Wasser, dann mit Alkohol. Auftropfen von verdünntem Ammoniak gibt die ursprüngliche Gestalt wieder.

Abb.6

Befestigen eines Objektes zum Uneingebettet-Schneiden (§ 74)



(24) Vgl. W.Seyser, *Schneiden in Seife*. Mikrokosmos XXVII, 1933/34, S. 178

(25) M.Möbius, *Botanisches Praktikum für Anfänger*, 3.Aufl., Berlin, Gebrüder Borngräber, 1919, S.131

III. Das Schneiden von eingebettetem Material

§ 75. Unter **Einbetten** versteht man das Durchtränken der zu schneidenden Objekte mit einem flüssigen Mittel, das nach dem Durchtränken erstarrt. Aus dem erstarrten Material wird dann ein das Objekt enthaltender Block herausgeschnitten. Der Block wird dann auf dem Mikrotom befestigt und mit dem Mikrotommesser in dünne Schnitte zerlegt.

Das Einbettungsmaterial soll folgende Bedingungen erfüllen:

1. es soll das Objekt nicht verändern und vor allem keine Schrumpfungen verursachen
2. es soll das Objekt schnell und ganz durchdringen
3. es soll gut schneidbar sein und die Objekte in ihrer Schneidbarkeit nicht ungünstig beeinflussen
4. es soll die Färbung der Schnitte nicht erschweren

Um es gleich zu sagen: das ideale Einbettungsmittel, das alle diese Anforderungen erfüllt, muß erst noch aufgefunden werden. In der Histologie, der Zoologie und auch in der Botanik wird die Paraffineinbettung als die beste angesehen. In der Pathologie wird fast nur noch mit dem Gefriermikrotom gearbeitet als der schnellsten Methode.

Wir werden die **Paraffineinbettung** eingehend würdigen und auch in der Praxis überall da ausführen und anwenden, wo dies möglich ist. Ergänzend werden wir die **Zelloidineinbettung**, die **Einbettung in Gelatine** und die in **Gummi arabicum** eingehend besprechen, denn gerade bei den Kryptogamen ist die Paraffineinbettung leider nicht uneingeschränkt anwendbar.

Das Einbetten und das Schneiden ist eine Kunst, die nur durch eigene Erfahrung und Übung gelernt werden kann. Die Lehrzeit bleibt keinem erspart. Wer die Technik erst erlernen muß, der übe sich an Material, das ihm reichlich zur Verfügung steht.

Das Einbetten in Paraffin

§ 76.

1. Das **Einbetten in Paraffin** ist in allen Büchern über mikroskopische Technik ausführlich geschildert, so daß ich mich hier kurz fassen und auf das beschränken kann, was beim Einbetten von Kryptogamen wichtig erscheint. Zur Durchführung der Paraffineinbettung benötigt man Paraffin von Schmelzpunkt 45 ^{O}C, eines von Schmelzpunkt 56-58 ^{O}C und einen Einbettungsofen.

Das Arbeitsverfahren ist folgendes: Aus den Objekten muß das Fixiermittel oder das Aufbewahrungsmittel durch Wässern restlos entfernt werden. Hierauf kommen die Objekte durch die

steigende Alkoholreihe bis in den absoluten Alkohol. Man verwendet gewöhnlich 40 %igen, 70 %gen, 96 %igen und 100 %igen Alkohol. Neigen die Objekte sehr zu Schrumpfungen, muß man mehr Stufen verwenden, also 40 %igen, 50 %igen, 60 %igen, 70 %igen, 80 %igen, 90 %igen und schließlich absoluten Alkohol.

Es ist nur Ethylalkohol zu verwenden, doch kann bis zum 70%igen einschließlich Brennspiritus verwendet werden. Man muß dann nur daran denken, daß vor dem Färben die Pyridinbasen durch eine kurze Behandlung der Schnitte mit Essigsäurelösung zu binden sind.

Die Dauer des Aufenthaltes in den einzelnen Stufen hängt von der Größe der Objekte ab. Sehr kleine Objekte bedürfen nur Minuten, größere Objekte verlangen 12 Stunden.

[Nach meiner Erfahrung kann der teure und obendrein sehr hygroskopische absolute Alkohol ohne Nachteile durch Isopropanol ersetzt werden. Ebenfalls gut geeignet und preisgünstig ist mit Petrolether teilvergällter absoluter Alkohol, für dessen Bezug allerdings eine spezielle Genehmigung der Branntwein-Monopolstelle erforderlich ist.]

2. Da das Paraffin nicht in Alkohol löslich ist, muß der Alkohol wieder von einem weiteren Zwischenmittel oder **Intermedium** verdrängt werden. Früher hat man als Intermedium meistens Xylol, Toluol, Chloroform, Benzol, Bergamottöl oder Terpentinöl verwendet. Von allen diesen Mitteln ist man abgekommen und verwendet jetzt meistens nur noch zwei, nämlich Methylbenzoat und Zedernholzöl. Die zuerst angeführten Intermedien entziehen den Objekten das Wasser 100 %ig. Dadurch werden sie sehr spröde und lassen sich oft nicht mehr schneiden. Die Verwendung von Methylbenzoat und von Zedernholzöl garantiert gut schneidbare Blöcke.

3. Methylbenzoat mischt sich mit Alkohol auch dann, wenn er nur 98-99 %ig ist. Dasselbe gilt von **Zedernholzöl**. Methylbenzoat kann angewendet werden bei fleischigen Objekten wie Pilzen, dann Plasmodien, weichen Meeresalgen. Bei allen anderen Objekten kann nur mit Zedernholzöl eingebettet werden.

Aus dem absoluten Alkohol kommen die Objekte in Stufen von Methylbenzoat wie folgt:

1. 2 Raumteile Alkohol 98 %ig + 1 Teil Methylbenzoat
2. 1 Raumteil Alkohol 98 %ig + 2 Teile Methylbenzoat
3. Reines Methylbenzoat, das noch einmal erneuert werden muß

Leicht schrumpfende Objekte kann man auch aus dem 96 %igen Alkohol übertragen und die angeführten Übertragungsstufen auch mit dem 96 %igen Alkohol ansetzen.

Das Objekt ist ganz mit Methylbenzoat durchtränkt, wenn es durchscheinend geworden und zu Boden gesunken ist. Man gießt dann die obere alkoholreiche Schicht des Methylbenzoates ab, entnimmt das Objekt und überträgt es in das Paraffin.

4. Bei Verwendung von **Zedernholzöl** geht man folgendermaßen vor: Es gibt zwei Sorten Zedernholzöl, das nicht eingedickte und das eingedickte. Das eingedickte Zedernholzöl ist das bekannte Öl für die Benutzung der Ölimmersion. Zum Einbetten sind beide Sorten als Intermedien zu verwenden. Das gewöhnliche, nicht eingedickte Zedernholzöl mischt sich mit Alkohol, das eingedickte mischt sich nicht mit Alkohol, wohl aber mit Xylol, Terpentinöl oder mit dem gewöhnlichen Zedernholzöl, das für die allermeisten Fälle genügt. Das Zedernholzöl verdunstet ***nicht*** beim Übertragen in das Paraffin, sondern löst sich in ihm auf. Dadurch wird der ganze Block schmiegsamer, weicher, aber ohne zu schmieren und daher viel schneidbarer. Dieselben Eigenschaften hat das eingedickte Zedernholzöl, nur ist die erweichende Wirkung auf die Objekte noch stärker. Durch die Anwendung von Zedernholzöl können Objekte in Paraffin geschnitten werden, die bei allen anderen Intermedien viel zu spröde werden, wie Flechten und Moose.

Als Zwischenstufen schaltet man zwischen dem Alkohol und dem Paraffin folgende Stufen ein :

1. 3 Raumteile Alkohol 98 %ig + 1 Teil gewöhnl. Zedernholzöl
2. 2 Raumteile Alkohol 98 %ig + 2 Teile Zedernholzöl

3. 1 Raumteil Alkohol 98 %ig + 3 Teile Zedernholzöl

In jeder dieser Stufen genügt ein Aufenthalt von 3 - 4 Stunden. Endlich kommen die Objekte in reines Zedernholzöl, in dem sie 24 Stunden verbleiben. Soll das eingedickte Zedernholzöl verwendet werden, wozu jedoch selten Veranlassung bestehen dürfte, so sind die Objekte aus Xylol oder aus dem gewöhnlichen Zedernholzöl dahinein zu übertragen.

Die Objekte werden in Zedernholzöl ganz durchsichtig und manchmal schwer erkennbar. Wenn sie milchige Trübungen aufweisen, enthalten sie noch Wasser. Das Verfahren ist dann mißglückt und das Objekt muß zurück in die Alkoholstufen. Gut durchtränkte Objekte können jetzt in das Paraffin verbracht werden.

[Mit Terpentinöl ist in der Mikrotechnik stets das ***echte*** Terpentinöl gemeint, nicht etwa der Terpentinölersatz, der zum Reinigen von Pinseln dient!]

[Ein weiteres sehr gutes Intermedium, das *Schömmer* hier noch nicht erwähnt, ist Terpineol, nicht zu verwechseln mit Terpentinöl.]

5. Das **Paraffin** wird geschmolzen im Wärmeschrank vorrätig gehalten. Die Objekte werden direkt aus dem Intermedium in das Paraffin verbracht. Früher schaltete man noch eine Zwischenstufe ein, die aus einer Lösung von Paraffin in dem Intermedium bestand. Nach neueren Erfahrungen kann diese Zwischenstufe ohne weitere Folgen wegbleiben.

Von Paraffin verwendet man eine Sorte, die bei 56-58 °C schmilzt. Früher legte man auch noch eine Stufe weiches Paraffin mit dem Schmelzpunkt von 45 °C ein. Diese Stufe kann ebenfalls ohne weiteres weggelassen werden.

Bei Verwendung von Methylbenzoat ist es zweckmäßig, die Objekte im Paraffin auf ein Wattebäuschchen zu legen, damit das verdrängte schwerere Methylbenzoat absinken kann. Das Zedernholzöl verteilt sich im Paraffin und verbleibt zum Teil im Objekt.

Die Zeitdauer der Durchtränkung der Objekte mit Paraffin ist sehr verschieden. Weitmaschige Objekte, wie Stengel, Flechten, Pilze können schon in wenigen Stunden vollkommen durchtränkt sein, Moossporogone sind es nach 8-wöchigem ununterbrochenem Aufenthalt im Wärmeschrank noch nicht. Die Zeitdauer muß für alle Objekte ausprobiert werden. Meistens läßt man die Objekte über Nacht im Einbettofen.

Manche Autoren empfehlen das Paraffin einige Male durch Schmelzen über einer Spiritusflamme von flüchtigen Substanzen zu befreien, weil sich dadurch die Schneidfähigkeit verbessere. Bei Befolgung dieses Rates, der überflüssig sein dürfte, denke man daran, ***daß eingeatmete Paraffindämpfe schwere Lungenschäden herbeiführen können***.

Nach genügend langem Aufenthalt im Paraffin kann das Material eingebettet werden. Mit einer erwärmten Metallpinzette wird nun das Objekt in ein Papierschälchen, einen Metalleinbettungsrahmen usw. eingelegt und mit flüssigem Paraffin umgossen. Zweckmäßig hat man vorher einen "Boden" von Paraffin gegossen. Nach Bildung eines oberflächlichen Häutchens, das man durch Anhauchen befördern kann, läßt man durch Eintauchen in Wasser den Block möglichst rasch erstarren. Je schneller die Abkühlung vor sich geht, desto schneidbarer wird der Block.

[Bei Anwendung nichtflüchtiger Intermedien, wie Methylbenzoat, Zedernholzöl oder Terpineol ist es sicherer, zwei Paraffinstufen zu verwenden, denn wird zu viel Intermedium mitgeschleppt, leidet die Schneidbarkeit erheblich! *Schömmer* war ein erfahrener Mann und wußte, wieviel Verunreinigung die Schneidbarkeit günstig beeinflußt.]

Das Schneiden von Paraffinblöcken

§ 77.

1. Die Paraffinblöcke können sofort geschnitten werden, wenn sie abgekühlt sind. Den zurechtgeschnittenen Block schmilzt man auf ein Holzklötzchen fest und spannt ihn in das Mikrotom

ein. Geschnitten wird mit quer gestelltem Messer. Das Einbetten ist richtig durchgeführt worden, wenn sich ohne Schwierigkeiten Schnitte von 5-10µ anfertigen lassen. Dies ist auch die häufigst angewandte Schnittdicke; dünnere Schnitte als 5µ bedürfen einer besonderen Schleifart des Messers, es muß eine ganz fein gezähnte Schneide haben, sonst werden die dünnen Schnitte zu stark zusammengepreßt.

2. Die häufigsten Fehler beim Schneiden sind folgende:

1. Das Einrollen der Schnitte kommt vor, wenn das Paraffin zu hart oder die Schnittdicke zu groß ist. Man macht dann dünnere Schnitte oder erwärmt den Block durch Eintauchen in warmes Wasser.
2. Die Schnitte schieben sich ineinander. Der Block ist zu weich oder die Schnitte sind zu dünn. Block in Wasser abkühlen, oder etwas härteres Paraffin nehmen!
3. Das Paraffin ist bröselig oder schmierig. Das Paraffin enthält zuviel Intermedium. Umbetten!
4. Die Objekte sind zu spröde. Das Objekt ist für die Paraffineinbettung nicht oder nicht gut geeignet. Abhilfe gibt mitunter ein mehrtägiges Verweilen des Blockes in Wasser. Die Objekte nehmen dann etwas Wasser auf, quellen und werden etwas weicher und schneidbarer. Dem Wasser kann etwas Glycerin zugesetzt werden.

Weiterhin treten natürlich Fehler auf, wenn das Messer nicht oder nicht mehr scharf genug geschliffen ist oder gar Scharten besitzt.

3. Das Einbetten in Paraffin gibt die Möglichkeit, sogenannte **Bänder** oder **Serien** zu schneiden, wenn der Block so zugerichtet wird, daß er die Form eines vierseitigen Prismas oder Pyramidenstumpfes besitzt. Schneidet man nun genügend schnell, ohne die Schnitte vom Messer zu entfernen, so kleben die Schnitte aneinander und bilden ein langes Band. Bei genügender Geschicklichkeit kann man ein ganzes Objekt lückenlos in zusammenhängende Schnitte zerlegen. Diese Möglichkeit gibt nur die Paraffin-Einbettungsmethode.

4. Die Paraffinschnitte müssen aufgeklebt werden, bevor sie weiterbehandelt werden können. Für das **Aufkleben** verwendet man am häufigsten Eiweißglycerin. Als Unterlage verwendet man zweckmäßig Objektträger. Deckgläser, die vielfach empfohlen worden sind, sind zu klein dazu und auch nicht billiger.

Das Eiweißglycerin besteht aus Hühnereiweiß und Glycerin zu gleichen Teilen. Beide werden gut gemischt und durch ein Faltenfilter filtriert. Man gibt einen Thymol- oder Kampferkristall zu. Es ist etwa ein Vierteljahr haltbar.

Die wirklich sauberen Objektträger werden mit einer Spur Eiweißglycerin betupft, der winzige Tropfen wird mit dem Zeigefinger verrieben und fast vollständig wieder weggewischt. Der so vorbereitete Objektträger wird mittels eines Pinsels mit destilliertem Wasser reichlich befeuchtet. Dann legt man mit Hilfe eines trockenen Pinsels die Paraffinschnitte entweder einzeln oder in Bändern auf das Wasser. Die Schnitte kommen mit der glänzenden Unterseite auf das Glas zu liegen, sie strecken sich auf dem Wasser, besonders wenn der Objektträger vorsichtig über einer kleinen Flamme oder auf einer Wärmebank erwärmt wird. ***Schmelzen darf dabei aber das Paraffin nicht***. Dann läßt man das überflüssige Wasser ablaufen und trocknet die Objektträger an einem staubfreien Ort. Danach kommen die Objektträger zurück in den Einbettofen, wo das Eiweiß koaguliert und das Paraffin schmilzt. Man kann auch das Koagulieren durch Erhitzen auf offener kleiner Flamme erreichen. Dabei soll das Paraffin möglichst nicht schmelzen. Am besten erreicht man dies so, daß man mit kreisförmigen Bewegungen das in einer Cornetpinzette eingespannte Glas 2-3mal über der Flamme rasch vorüber zieht. Den Grad der Erwärmung kann man durch Auflegen des Glases auf den Handrücken taxieren; nach einigen Versuchen ist bald die nötige Routine gesammelt.

Schließlich wird das Paraffin entfernt, indem man den Objektträger in Xylol taucht. Danach kommt der Schnitt samt dem Objektträger in Alkohol und Wasser; er kann dann gefärbt und weiterbehandelt werden.

[Bei empfindlichen Schnitten geht man über eine absteigende Alkoholreihe ins Wasser, da bei der direkten Übertragung aus Alkohol heftige Wirbel auftreten. Außerdem ist es zweckmäßig, zwei Xylol- und zwei Isopropanolstufen zu verwenden, um ein störendes Einschleppen von Paraffin in das nachgeschaltete Wasser zu vermeiden. Sind die Schnitte durch Pikrinsäure noch gelb gefärbt, setzt man der Alkoholreihe einige Tropfen Ammoniaklösung zur Entfernung derselben zu, da Pikrinsäure die Farben mit der Zeit ausbleichen läßt. – die Schnitte müssen vor dem Färben völlig farblos sein!]

5. Bei empfindlichen Objekten und dünnen Schnitten ist es zweckmäßig, nach der Behandlung mit Alkohol einen **Kollodiumguß** anzubringen. Das käufliche Kollodium der Apotheken wird mit 20 Raumteilen Methylalkohol verdünnt. Umschütteln! Man übergießt nun das vom Alkohol noch feuchte Objekt mit dem verdünnten Kollodium, gießt sofort den Überschuß ab und läßt lufttrocken werden, was im Augenblick geschehen ist. Das feine Kollodiumhäutchen wird dann in 80 %igem Isopropylalkohol gehärtet; das tritt verläßlich nach einer Stunde ein. Hieran schließt sich dann weiterhin das Färben, Differenzieren usw. bis zum Fertigmachen des Präparates an.

Das Einbetten in Zelloidin

§ 78. Die Zelloidineinbettung ist für botanische Zwecke weit besser geeignet, als sich dies aus ihrem Ruf schließen läßt; ganz besonders geeignet ist die Zelloidinmethode für das Studium der Kryptogamen. Diese Technik ist sehr wandlungsfähig und kann leicht und befriedigend den besonderen Anforderungen der einzelnen Objekte angepaßt werden. Moose werden häufig in Paraffin so spröde, daß sie beim Schneiden zersplittern, Pilze schrumpfen bis zur Unkenntlichkeit, manche Arten Flechten zerbröckeln ganz und gar.

Die unleugbaren Nachteile des Zelloidins für die Einbettung bestehen in der langen Dauer des Verfahrens und darin, daß die untere Grenze der Schnittdicke meistens praktisch bei 15µ; liegen dürfte. Die Vorteile des Verfahrens liegen darin, daß Objekte geschnitten werden können, die mit Paraffin oder einer anderen Methode eben nicht geschnitten werden können. Moose, Flechten, auch Rindenflechten, schneiden sich spielend in der Einbettung in Zelloidin.

Das Zelloidin hat folgende Eigenschaften: es ist löslich in Alkohol, Äther, zweiwertigen Phenolen, Nelkenöl, Methylbenzoat, Dioxan und Pyridin. Es ist unlöslich in Wasser, Terpineol, Isopropanol, Xylol, Toluol, Chloroform, Zedernholzöl, Origanumöl und Bergamottöl. Trocken ist es explosibel.

Für mikroskopische Zwecke wird ausschließlich ***Zelloidin-Schering in Tafeln (wasserfrei)*** gebraucht.

Zur Durchführung der normalen Zelloidineinbettung wird verwendet:

1. eine 2 %ige Lösung von Zelloidin
2. eine 4 %ige Lösung von Zelloidin
3. eine 8 %ige Lösung von Zelloidin

Diese genannten Lösungen werden hergestellt mit einer wasserfreien Mischung von Alkohol und Äther zu gleichen Teilen. Zweckmäßig kauft man sich diese Lösungen fertig. Bei Selbstherstellung kommt man bestimmt nicht billiger weg, sondern hat meistens Lösungen, die irgendeine Enttäuschung bringen. Jedenfalls halte man sich genau an die der Packung beigegebenen Gebrauchsanweisung der Herstellerfirma.

Neuerdings wird viel das von den *Behringwerken* hergestellte *Cedukol* gebraucht, das aus Zellstoff fabriziert wird. Eine Originalpackung zu 75 g *Cedukol* kostet 5 DM und gibt 500 g dicke Lösung. Das *Cedukol* ist schnell und leicht ohne vorherige Trocknung löslich.

Für das Einbetten in Zelloidin gibt es drei Wege:

1. Die klassische Methode der Einbettung. Die sorgfältig durch Passieren der Alkoholreihe entwässerten Objekte kommen in ein Gemisch von Alkohol abs. und Äther zu gleichen Teilen. Für die Alkoholreihe kann bis in die Mittelstufen Brennspiritus verwendet werden, aber nicht Methylalkohol oder Isopropanol (Hartosol). In der Alkohol-Äther-Mischung bleiben die Ob-

jekte 24 Stunden und werden dann zuerst in die 2 %ige Zelloidinlösung verbracht. In dieser Lösung müssen sie bleiben, bis sie völlig mit der Lösung durchtränkt sind. Leider kann man das den Objekten nicht ansehen. Kleine Objekte brauchen dazu nur 2-3 Tage, größere länger. Flechten benötigen dazu 4-5 Tage, Moosstämmchen ebenfalls, angeschnittene Mooskapseln bis 14 Tage. Nicht angeschnittene Sporogone schrumpfen und werden nicht völlig durchtränkt.

Aus der 2 %igen Lösung kommen die Objekte in die 4 %ige Lösung. Diese läßt man ebenso lange einwirken wie die 2 %ige Lösung. Die 4 %ige Lösung wird schließlich durch die 8 %ige Lösung ersetzt. Hierin verbleiben die Objekte ebenfalls einige Tage und dann kann man zum Gießen des Blockes schreiten.

Für das Gelingen der Zelloidineinbeitung ist unbedingt notwendig, daß das Objekt tadellos entwässert worden ist, daß die Zelloidinlösungen mit wasserfreiem Alkohol und wasserfreiem Äther hergestellt worden waren und daß während der langen Behandlung in den Lösungen nachträglich kein Wasser aus der Luft in die Lösungen gekommen ist. Der tadellose Verlauf der Einbettung ist allerdings noch kein Kriterium dafür, daß kein Wasser in die Zelloidinlösung gekommen ist. Dies zeigt sich dann erst beim Schneiden. Wenn Wasser nicht völlig ferngehalten werden konnte, bleibt die Schnittdicke unerwünscht groß. Sie beträgt dann 25-30µ. Wo diese dicken Schnitte nicht erwünscht sind, hat man daher darauf zu achten, daß das Wasser ferngehalten wird. Dazu ist notwendig, daß die Gefäße sehr gut verschlossen gehalten werden können. Am besten schließen eingeschliffene Glasdeckel. Diese müssen aber gut eingefettet sein, sonst verkleben sie und können nicht mehr geöffnet werden. Andererseits darf keine Vaseline in die Zelloidinlösung gelangen. Nach meinen Erfahrungen genügt es, gut paraffinierte Korkstopfen zu benutzen.

2. Die Glycerin-Zelloidin-Einbettunsmethode nach *Wolf* (26). Um die lange Einwirkungszeit der verschiedenen Lösungen abzukürzen, hat Wolf vorgeschlagen, das Entwässern durch Glycerin durchzuführen und die Objekte direkt aus Glycerin in die 8 %ige Lösung von Zelloidin zu übertragen.

Die Objekte werden entwässert: 6 Stunden in gewöhnlichem Glycerin, Dichte 1,23 und 27-28° Bé, anschließend 6 Stunden in wasserfreiem Glycerin, Dichte 1,26 und 31° Bé. Die Objekte werden mit faserfreiem Fließpapier etwas abgetrocknet und kommen dann sofort in 8 %ige Zelloidinlösung. Am besten hängt man sie in ein Siebeimerchen ein, so daß das Glycerin zu Boden sinken kann. Die Einbettung dauert dann nur 2 Tage für ein Objekt von den ungefähren Ausmaßen 3x6x6 mm. *Wolf* betont als besonderen Vorteil der Methode die restlose Durchtränkung der Objekte mit Zelloidin.

(26) J.Wolf , Zeitschrift für wissenschaftl. Mikroskopie, 56, 1939, S.57-62

3. Die Pyridin-Zelloidin-Methode nach *K.Bauer* (27). *Bauer* verfolgt dieselben Ziele wie *Wolf*. Nach Bauer kommen die gewässerten Objekte sogleich in folgende Lösung:

1. Pyridin pur. *Merck* 50 ccm
2. 4% ige Zelloidinlösung 50 ccm

Von der Lösung braucht man natürlich nur einige Kubikzentimeter, die allerdings nach 24 Stunden gewechselt werden muß. Nach weiteren 24 Stunden kommen die Objekte sofort in die 8% ige Zelloidinlösung. Das Pyridin bewirkt nach Bauer eine wesentliche Beschleunigung des Zelloidineintrittes. In der 8 %igen Lösung verbleibt das Objekt einige Tage.

Zu der Methode ist folgendes zu bemerken: Nicht alle Objekte vertragen das Einbringen in die Pyridin-Zelloidin-Lösung direkt aus dem Wasser. Manchmal empfiehlt es sich, aus dem Wasser in einigen Stufen in reines Pyridin und dann in die Mischung überzugehen.

Bei der Methode von *Wolf* macht es manchmal Schwierigkeiten, die Objekte in konzentriertes Glycerin ohne Schrumpfung überzuleiten. Der sicherste Weg dazu ist es, die Objekte aus 10-30 %igem Glycerin durch freiwilliges Eindunsten allmählich in konzentriertes Glycerin überzu-

führen. Das so freiwillig konzentrierte Glycerin wird erst durch das Glycerin von der Dichte 1,23 abgelöst.

(27) K.Bauer, Zeitschrift f. wissenschaftl. Mikroskopie, 58, 1941, S. 44-45

§ 79. Sind die Objekte nach einer der geschilderten Methoden genügend lange in 8 %iger Zelloidinlösung gewesen, so müssen sie in den Zelloidinblock eingeschlossen werden. Zunächst muß das Zelloidin durch langsames Verdunsten des Lösungsmittels auf 16 % eingedickt werden. Dieses Eindicken ist die letzte Klippe beim Verfahren.

Die älteste **Methode des Eindickens** ist auch die primitivste. Eine Glasdose, die mit einem Glasdeckel verschließbar ist, flachen Boden und flache Wände aufweist, wird mit soviel 8 %iger Zelloidinlösung vollgegossen, daß die Zelloidinlösung doppelt so hoch steht wie der fertige Block hoch sein soll. In diese Glasschale werden die Objekte verbracht und mit einer Nadel orientiert. Das Zelloidin soll darin eindicken. Zwischen Schalenrand und Deckel wird ein Nähfaden eingeklemmt, so daß das Lösungsmittel sehr langsam verdunsten kann. Wenn das Zelloidin fest geworden ist, schneidet man die Objekte in Blockform aus dem Zelloidin heraus und verbringt sie zum Härten in 70 %igen Alkohol.

Zum Härten der Zelloidinblöcke ist nur reiner Ethylalkohol verwendbar. Zusatz von Karbolsäure schadet nicht, aber Brennspiritus, Methylalkohol oder Isopropanol sind nicht verwendbar. Methylalkohol verhindert, selbst in allerkleinsten Mengen, eine ordentliche Härtung des Zelloidins und Isopropanol dringt zu langsam und unregelmäßig ein.

Eine bessere Methode des Eindickens ist es, die geschilderte Glasschale mit den Objekten und der 8% igen Zelloidinlösung in einen Exsikkator zu bringen. In den Exsikkator stellt man ein weiteres Schälchen mit Schwefelsäure. Um ein gleichmäßiges Eindicken des Zelloidins zu erhalten, ist es gut, von Zeit zu Zeit das Einbettungsschälchen mit dem Deckel zu verschließen. Ist das Zelloidin so hart geworden, daß es vom Fingernagel nicht mehr leicht eingedrückt werden kann, kann man das ganze Schälchen in 70 %igen Alkohol verbringen oder damit vollgießen. Nach ein paar Tagen schneidet man die Objekte heraus und härtet sie noch vollständig durch. Manche Autoren empfehlen zum Härten 80-85% igen und zum Auf- bewahren der Blökke 70 %igen Alkohol.

Für das Härten sind noch andere Verfahren veröffentlicht worden, so das Härten in Chloroform oder Chloroformdämpfen. Nach den Erfahrungen des Verfassers bietet dies keine Vorteile.

Bei manchen Objekten, insbesondere solchen, die eine ausgeprägte Kutikula aufweisen (Schachtelhalme, Moos-Sporogone usw.) zeigt sich beim Schneiden, daß sie nicht genügend mit Zelloidin durchtränkt sind. In diesem Falle höre man mit dem Schneiden sofort auf, nachdem die Objekte angeschnitten sind, und verbringe sie wieder in die 2 %ige Lösung. Jetzt, nach Eröffnung des Objektes, erhalten wir meistens eine tadellose Durchtränkung.

§ 80. *W.Schmelzer* (28) hat darauf die Methode der doppelten Einbettung begründet. Er bettet zunächst mit 4 %iger Lösung ein, schneidet mit dem Mikrotom einen sehr dünnen Span vom Objekt ab und bettet wieder wie vorher ein. Das Resultat dieser Arbeitsmethode sind gut durchdrungene Objekte.

(28) W.Schmelzer, Mikrokosmos XXVII, 1933/34, S. I71

Das Schneiden von Zelloidinblöcken

§ 81. Das Schneiden von Zelloidinblöcken hat mit ganz schräggestelltem Messer zu erfolgen. Dabei soll das Messer parallel der Diagonale des rechtwinkelig zugeschnittenen Blockes verlaufen. In fast allen Anleitungen über die Zelloidineinbettung ist zu lesen, daß die Zelloidinblöcke auf Holzklötzchen aufgekittet werden und daß dann unter steter Befeuchtung mit 70% igem Alkohol zu schneiden ist. Man hat sogar Tropfapparate konstruiert, die ein automatisches Betropfen der Blöcke ermöglichen. Die Schnitte werden dann mit einem Pinsel vom Messer entfernt und in 70 %igen Alkohol verbracht. Dieses Verfahren ist hauptsächlich für zoologische,

anatomische und pathologische Objekte angewandt worden, außerdem in Instituten, die steuerbegünstigten Alkohol in beliebiger Menge zur Verfügung haben.

Wer sich privat mit botanischen Studien befaßt, hat schon aus finanziellen Gründen Anlaß, nach anderen Wegen zu suchen. Der Hauptgrund für eine Änderung der Methode liegt aber darin, daß die Praxis bald zeigt, daß diese klassische Methode für Kryptogamen meistens überdies unbrauchbar ist. Der 70 %ige Alkohol wird allgemein nur noch zum Härten benützt. Vor dem Schneiden kommt der Block in ein anderes Medium.

Für das eigentliche Schneiden ist die Tatsache wichtig, daß sich die Zelloidinblöcke um so besser schneiden lassen,

1. je härter das Zelloidin ist
2. je gleichmäßiger die Härte zwischen dem Zelloidin und dem eingeschlossenen Objekt ist und
3. je besser die Schneidbarkeit des eingebetteten Objektes an sich ist

Das Zelloidin durchdringt nicht wie das Paraffin, das auch die einzelnen Zellen durchsetzt, die Objekte vollständig, sondern infolge seiner Molekulargröße nur die Zwischenräume zwischen den Zellen. Das Paraffin durchdringt aber, nebenbei bemerkt, die Zellen auch nicht vollständig, sonst könnte ein Paraffinblock nicht nachträglich durch Wässern, das heißt teilweise Aufnahme von Wasser, in der Schneidbarkeit verbessert werden. Durch die völlige Entwässerung und Härten ist das in Zelloidin eingebettete Objekt oft so ungünstig in seiner Schneidbarkeit verändert worden, daß es beim Schneiden splittert oder ausbricht.

Da die Zelloidinblöcke und die darin eingebetteten Objekte nachträglich verschiedene Flüssigkeiten aufzunehmen imstande sind, kann sowohl das Zelloidin gehärtet als das Objekt erweicht werden. Zelloidinblöcke vertragen:

1. Das Behandeln mit Wasser oder Glycerin sowohl in der Kälte wie in der Wärme. Selbst vorsichtiges Kochen ist darin möglich.
2. Das Behandeln mit Chlordioxidsalpetersäure zum Auflösen von Holz und Chitin. Nach *W.Moller* (29) müssen die Blöcke nach der Behandlung mit der Chlordioxidsalpetersäure einen Tag lang ausgewaschen werden mit einer Mischung zu gleichen Raumteilen von 2 %iger wässeriger Natriumthiosulfatlösung und einer 5 %igen wässerigen Natriumnitratlösung. Hierauf folgt Behandlung mit fließendem Wasser, 70 %igem Alkohol usw.
3. Das Behandeln mit Flußsäure zum Entkieseln.

Die Objekte selbst können verändert werden:

1. Durch Behandeln mit wässeriger Formalinlösung oder Formalinalkohol können sie gehärtet werden, z.B. weiche Hutpilze.
2. Durch Behandeln mit Terpineol oder mit Glycerin können die Objekte aufgeweicht werden, ohne daß das Zelloidin weicher wird. Dies ist notwendig bei Flechten, Moosen und Farnen, besonders bei Farnstengeln.

Das Zelloidin kann noch etwas gehärtet werden durch Behandeln mit Glycerin, Terpineol oder Isopropanol mit und ohne Zusatz von Chloroform.

Für das Schneiden gilt vor allem, daß nur durch eigene Erfahrung Vorteile und Fehlerquellen kennengelernt werden. Die spezielle Behandlung der Blöcke bei den einzelnen Arten von Kryptogamen wie Flechten, Moosen und Farnen wird an Ort und Stelle bei den einzelnen Übungsbeispielen genauer behandelt werden.

Die Schnitte werden beim Schneiden mit einem Pinsel vom Messer entfernt und in eine Schale in das Medium gebracht, aus dem der Block zum Schneiden gekommen ist.

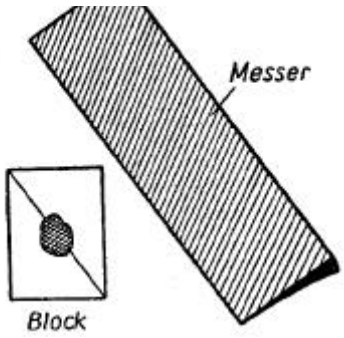


Abb.7

Schnittführung bei Zelloidinblöcken (§ 81)

(29) W.Moller, Zeitschrift für wissenschaftl. Mikroskopie 50, 1933, S. 184

Die weitere Verarbeitung der Zelloidinschnitte

§ 82.

1. Zelloidinschnitte können als **lose Schnitte** oder aufgeklebt auf Objektträger und Deckgläser weiterverarbeitet werden. Die Zelloidinschnitte müssen zunächst aus der Aufbewahrungsflüssigkeit in Wasser oder Alkohol verbracht werden, je nachdem, ob mit wässrigen oder alkoholischen Farbstofflösungen gefärbt werden soll. Da das Zelloidin von vielen Farben dauernd angefärbt wird, ist es manchmal nötig, dasselbe aus den Schnitten zu entfernen.

Die Übertragung in 50 %igen oder 30 %igen Alkohol aus Glycerin geht ohne jede Schwierigkeit. Aus Terpineol müssen die Schnitte zunächst in konzentrierten Isopropanol und dann in verdünnten 50 %igen Isopropanol und von da in den verdünnten Alkohol gebracht werden. Das Übertragen nimmt man mit einem sogenannten Schnittfänger vor oder man beläßt die Schnitte in kleinen Schalen und gießt die Flüssigkeiten zu und ab. Die Übertragung der Schnitte in Wasser hat mit einiger Vorsicht zu geschehen. Aus Glycerin können die Objekte ohne Schaden zu nehmen in Wasser verbracht werden, notfalls schaltet man eine Zwischenstufe ein von halb Glycerin und halb Wasser. Aus Terpineol müssen die Schnitte zuerst in Isopropanol, dann in 50 %igen Isopropanol und dann in Wasser gebracht werden.

Das Verbringen der Schnitte aus Isopropanol oder Alkohol in Wasser kann nicht ohne weiteres geschehen. Bei unmittelbarem Übertragen tanzen die Schnitte unter fortwährendem Rotieren im Wasser umher und zerreißen in der Regel. Durch einen Kunstgriff kann dies . jedoch vermieden werden. Man betupft das Wasser ganz kurz mit einem Stück weißer Seife - am besten Rasierseife -, so daß sich nur eine Spur der Seife im Wasser auflösen kann. Nun kann das übertragen der Schnitte ohne weiteres erfolgen.

2. In Wasser quellen manche Objekte ziemlich stark, z. B. Pilze und Flechten, so daß sich die Schnitte vergrößern und wellig verbiegen. Ist diese Veränderung nicht groß, so schadet sie nicht, da sie beim Behandeln mit Alkohol nach dem Färben wieder verschwindet. Recht häufig aber reißen sich die Objekte vom Zelloidin los und die Präparate verderben oder werden wenigstens unschön. Ist dies zu befürchten, so bleibt nur übrig, entweder in 30 %igen glycerinhaltigen oder alkoholischen Farblösungen zu färben oder das Zelloidin ganz zu entfernen.

3. Die **Entfernung des Zelloidins** wird am besten mit einem Gemisch von Alkohol absolutus und Äther zu gleichen Teilen vorgenommen. Methylbenzoat wird vielfach als Lösungsmittel empfohlen. Es erweist sich nach meinen Erfahrungen aber als nicht recht geeignet, da es nur wenig Zelloidin aufnimmt und sehr wasserempfindlich ist.

4. Das **Aufkleben der Zelloidinschnitte** empfiehlt sich im allgemeinen nicht. Die Schnitte haften eigentlich nach gar keiner Methode befriedigend am Glase, besonders dann nicht, wenn die oben erwähnten Quellungserscheinungen auftreten. Je dicker die Schnitte sind, desto schlechter haften sie. Außerdem färbt sich das Aufklebemittel in unangenehmer Weise mit.

Das Aufklebeverfahren nach *Olt.* Eine 10% ige Lösung von Gelatine in Wasser wird mit Hühnereiweiß verquirlt, aufgekocht, mit genügend Karbolsäure versetzt und durch Glaswolle filtriert. Ein stecknadelkopfgroßes Stückchen der Aufklebegelatine wird mit einem Wassertropfen auf den Objektträger verbracht, dort über einer kleinen Flamme geschmolzen und dann mit

einer Nadel möglichst dünn ausgestrichen. Die Schnitte kommen nun aus Wasser zuerst auf ein Stück faserfreies Fließpapier und werden oberflächlich abgetrocknet. Mit einer Pinzette verbringt man sie darauf auf den vorbereiteten Objektträger, wobei die Schnitte nun mit Hilfe des Fließpapieres fest angedrückt und ganz wenig mit Wasser befeuchtet werden. Stellt man nun den Objektträger 30 Minuten lang in ein Glas, auf dessen Boden etwas Formalin gegossen wurde, so härten die Formalindämpfe die Gelatine. Man kann auch noch die Objektträger einige Minuten in 4 %iger Formalinlösung nachhärten. Solche aufgeklebten Schnitte sollen nach der Literatur alle Behandlungen vornehmen lassen, wie Behandlungen mit Eau de Javelle, Chlordioxidsalpetersäure, Färben usw. Nach meinen Erfahrungen trifft dies nicht immer zu.

Eine weitere Methode ist folgende: Die Schnitte kommen aus Isopropanol, Glycerin oder Wasser auf den Objektträger und werden dort luftblasenfrei angedrückt. Dann taucht man sie für 5 Minuten in ein Gemisch von Ether-Alkohol und dann in Isopropanol. Die Schnitte kleben dann fest, ähnlich wie Kollodienhäutchen. Während bei den mit Gelatine aufgeklebten Schnitten das Zelloidin entfernt werden kann, ist dies hier natürlich nicht möglich.

Gelatine als Einbettungsmittel

§ 83. In neuerer Zeit hat die Gelatine erneut größere Bedeutung als Einbettmittel erhalten. Besonders in der forensischen Praxis bei schneller histologischer Untersuchung von beanstandeten Würsten, ferner in der Pathologie und sogar in der Zoologie bei Untersuchung sehr wasserhaltiger, fetthaltiger oder lockerer Objekte. Auch für die Untersuchung von Kryptogamen sind diese Methoden wertvoll, da sie schrumpfungsfreies Einbetten auch sehr wasserhaltiger Objekte ermöglichen (Pilze, größere Algen).

Der erste, der die Gelatineeinbettung anwandte, war *Klebs*. Ferner haben *Behrens* (1890), *Apathy* (1912) und *Migula* (1933), um nur einige Autoren zu nennen, darüber publiziert. *Behrens*, *Apathy* und *Klebs* benützen eine Glyceringelatine, *Migula* eine wässrige Lösung der Gelatine. Die Glyceringelatine wird durchschnittlich in 10% iger Lösung zum Durchtränken und in 20 %iger Lösung zum Einbetten angewendet. Dieselben Konzentrationen werden bei einfacher Gelatinelösung benützt. Gehärtet haben die Autoren die gegossenen und erstarrten Blöcke mit Alkohol (Brennspiritus, Alkohol absolutus) und dann auf dem Mikrotom wie Paraffinblöcke geschnitten.

Meine Erfahrungen mit allen diesen Mitteln sind folgende. Es ist sehr schwer, luftblasenfreie Objekte und Blöcke zu erhalten, wenn Glyceringelatine verwandt wird. Überdies schrumpfen manche Objekte sehr stark. Man muß sie unbedingt vor der Einbettung bis zum absoluten Alkohol und wieder zurück zum Wasser führen. Das Durchtränken mit Glycerin hat ebenfalls sorgsam zu geschehen. Dagegen lassen sich diese Blöcke nach Alkoholhärtung leicht und sehr dünn schneiden. Die mit Alkohol gehärtete Gelatine löst sich in warmem Wasser leicht und vollständig auf.

Enthält die Gelatine kein Glycerin, so ist es leicht, auch die empfindlichsten Objekte blasen- und schrumpfungsfrei einzublocken, eine direkte Härtung mit Alkohol ist dagegen nur unter solchen großen Schrumpfungen möglich, daß die Blöcke wertlos werden.

Das Härten der Gelatine mit Formalin, das in der Literatur öfters angegeben worden ist, eignet sich für unsere Zwecke nicht. Bei der histologischen Wurstuntersuchung, bei der diese Methode sich bewährt hat, wird vor dem Erstarren die meiste Gelatine durch Auspressen entfernt. Die restliche Gelatine stört dann weder beim Schneiden noch beim Färben im geringsten. Bei größeren Blöcken ist dies wesentlich anders. Formolgehärtete Gelatine ist bröckelig, färbt sich ungemein stark mit allen Farben an und läßt sich weder entfärben noch entfernen. Das in der Literatur angegebene Verfahren, die Schnitte mit 10 %iger Natronlauge zu behandeln, löst zwar die Gelatine auf, zerstört aber auch die Schnitte im allgemeinen viel zu sehr. Dagegen ist die Härtung nach *Neißer* mit einer Lösung von Kaliumdichromat leicht durchzuführen.

§ 84. Die einzelnen Verfahren sind nun folgende:

1. Die Gelatine-Einbettung nach *Behrens* (30) . Die gehärteten Objekte werden je nach ihrer Konsistenz verschieden behandelt:

Zartere Objekte kommen in eine Lösung von

Wasser	60 g
Gelatine	10 g
Glycerin	60 g

Als Gelatine nimmt man am besten die Marke *Einbettgelatine der Firma Dr.K.Hollborn & Söhne in Leipzig*. Zur Not geht jedoch auch Speisegelatine. Die Lösung enthält ungefähr 8% Gelatine.

Robustere Objekte kommen in eine Lösung von

Wasser	30 g
Gelatine	10 g
Glycerin	60 g

Diese Lösung enthält ungefähr 12% Gelatine.

Bei diesen, wie auch bei anderen Vorschriften, fügt man noch etwas Karbolsäure zur Verhütung von Schimmelbildung und Bakterienwachstum bei. Die Objekte bleiben nach Behrens 1-3 Stunden in der flüssigen Gelatine, eventuell muß die Luft mittels einer Luftpumpe entfernt werden. Hernach gießt man Objekte und Gelatine in eine Glasschale und läßt erstarren. Nachdem die Blöcke ausgeschnitten worden sind, härtet man in absolutem Alkohol. Pro 1 mm Blockdicke ist ein Tag Härtedauer zu rechnen. Das Schneiden erfolgt feucht unter absolutem Alkohol oder nach Durchtränkung mit Terpineol mit schräg gestelltem Messer. Die Gelatine ist mit warmem Wasser zu entfernen.

(30) Wilhelm Behrens, *Leitfaden der botanischen Mikroskopie*, Braunschweig, Verlag Harald Bruhn, 1890

2. Die Gelatine-Einbettung nach *Apathy* (31). *Apathy* hat für zoologische Zwecke eine Methode ausgearbeitet, die es gestattet, wasserhaltige Objekte, z.B. Quallen, schrumpfungsfrei einzubetten. Auch für unsere Zwecke ist die Methode sehr gut geeignet, z. B. für Tremella (Gallertpilz) und ähnliche Objekte. Zweckmäßig ist es, die Objekte im Stück mit Karmin oder Hämalaun vorzufärben. Doch sind natürlich auch nachträgliche Schnittfärbungen durchaus möglich.

Apathy stellt zuerst eine Stammlösung oder Stammgelatine her. Er löst zu diesem Zwecke 50 g Gelatine in 125 g destilliertem Wasser auf, gibt 25 g Glycerin hinzu und filtriert. Diese Stammgelatine wird über Chlorkalzium zur Kautschukkonsistenz eingedickt und in 1 qcm dikke, prismatische Stücke geschnitten; sie enthält eingedickt 60% an trockener Gelatine. In den folgenden zwei Arbeitsvorschriften wird sie nach Kubikzentimetern abgemessen und so verwendet. Die einzubettenden Objekte sollen nicht größer sein als je 6 mm in jeder Richtung.

Die Objekte müssen bis zum absoluten Alkohol gehärtet gewesen und dann langsam in Glycerin übergeführt worden sein. Zuerst kommen sie in die durchtränkende Lösung:

Stammgelatine nach *Apathy*	1 ccm
Glycerin	3 ccm
Destilliertes Wasser	6 ccm

Nach gehöriger Durchtränkung (ein Tag im Einbettofen) kommen sie in die Einbettungsmasse:

Stammgelatine nach *Apathy*	1 ccm
Glycerin	3 ccm
Destilliertes Wasser	1 ccm

worin sie ebenfalls 24 Stunden verbleiben. Die durchtränkende Lösung hat etwa 7% Gelatine, die Einbettungsmasse 17% Gelatine.

Apathy härtet seine Blöcke in absolutem Alkohol, wobei für jeden Millimeter der größten Ausdehnung ein voller Tag Einwirkungszeit gerechnet wird. Der Block wird dann mit Terpineol durchtränkt und mit schief gestelltem Messer geschnitten. Wenn er sehr hart geworden ist, wird mit quer gestelltem Messer geschnitten. Die Schnitte werden mit Glycerin-Eiweiß aufgeklebt, das man durch vorsichtiges Erhitzen koaguliert. Die Gelatine löst sich auf in einer Lösung von:

70 %igem Alkohol	100 ccm	und
Chlorkalzium kryst.	5 g	

(31) Stephan von Apathy, Zeitschrift für wissenschaftl. Mikroskopie, XXIX, 1912, S.474 .

3. Die Gelatine-Einbettung nach *Migula*. Die einfache Methode von *Migula* ist sehr brauchbar, wenn man sie etwas modifiziert und vor der Alkoholhärtung nach den Angaben von *Neißer* (32) eine Zwischenhärtung mit Kaliumdichromatlösung einschaltet. Die Arbeitsweise ist folgende:

Man benützt eine 10% ige Gelatinelösung in Wasser ohne jeden Glycerinzusatz zum Einbetten. Die Objekte müssen gut gehärtet sein und werden aus Wasser eingebettet. In der geschmolzenen Gelatine bleiben die Objekte einige Stunden. In einem Wärmeofen, im Winter sogar mit einiger Vorsicht auf einem Dauerbrandofen für Zimmerheizung, kann man die Objekte 12-24 Stunden in der Lösung belassen. Man kann dann verhältnismäßig große Objekte einbetten. Hat man keinen Einbettofen, so kann man sich im Sommer so behelfen, daß die Gelatine in einer Porzellanschale erwärmt wird; diese Schale stellt man dann auf einen Stoß von Zeitungspapier. Es dauert sehr lange, bis sie erstarrt, und es genügt ein leichtes Erwärmen auf kleiner Spiritusflamme alle 3/4 Stunden, um sie stundenlang flüssig zu erhalten.

Diese Gelatine durchdringt die Objekte sehr schnell und Schrumpfungen treten nicht auf. Die Blöcke werden so gegossen, daß sie 5 mm Gelatineschichten rund um das Objekt aufweisen.

Die **Vorhärtung** der erstarrten Blöcke erfolgt nun im vollen Tageslicht mit einer 1% igen wässrigen Lösung von Kaliumdichromat, was je nach der Größe der Blöcke bis zu 8 Tagen dauern kann. Die Blöcke werden dabei braun. Nun erfolgt ein Auswaschen in Wasser, auch fließendes Wasser aus der Leitung ist verwendbar. Darauf werden die Blöcke stufenweise in 30% igem, 70% igem und 96 %igem Alkohol gehärtet. Azeton, Brennspiritus, Isopropanol eignen sich nicht. Methyalkohol würde zwar die Gelatine gut härten, mazeriert aber in seinen geringprozentigen Stufen die Objekte zu sehr.

Vor dem Schneiden mit dem Mikrotom muß die äußerste, sehr harte Schicht der Gelatine entfernt und der Block mit Terpineol durchtränkt werden. Geschnitten wird je nach Härte mit quer oder schräg gestelltem Messer. Die Schnitte werden in Alkohol übertragen. Das Chromat im Schnitt kann mühelos mit Schwefeldioxidwasser oder mit 10% iger Natriumthiosulfatlösung entfernt werden. Sonstige Weiterverarbeitung wie bei der Methode nach *Apathy*.

Aufgeklebt werden können die Schnitte auch mit Kollodium- oder Zelloidin-Nelkenöl. Das ist eine Mischung von 4 Raumteilen 4 %igem Einbettungszelloidin oder 4 Raumteilen Kollodium mit 4,5 Raumteilen Nelkenöl.

(32) Zitiert nach Ludwig Heim, *Lehrbuch der Bakteriologie*, Stuttgart, Ferd.Enke, 1911

Gummi arabicum als Einbettungsmittel

§ 85. Gummi arabicum ist ein gutes, allerdings auch nicht überall anwendbares Einbettungsmittel. Eines der Verfahren gestattet Schnitte ohne Alkoholhärtung der Blöcke herzustellen. Das Chlorophyll wird also nicht ausgezogen und so können Schnitte durch Flechten, auch Phanerogamen mit parasitischen Algen oder Rostpilzen hergestellt werden unter Erhaltung der natürlichen Farben. Gummi arabicum kann auch mit Alkoholhärtung verwendet werden. Es eignet sich besonders für Moossporogone, Schachtelhalme, auch Rinden mit Epiphyten und ähnliche Objekte.

Gummi arabicum kann nach folgenden zwei Methoden Verwendung finden.

1. Gummiglycerin mit Alkoholhärtung nach *Fol*. Man stellt sich eine möglichst dicke wässrige Auflösung von Gummi arabicum her, was einige Tage dauert. Der Lösung muß etwas Karbolsäure zugesetzt werden, da sich sonst der Gummi sehr schnell zersetzt. Dieser Gummilösung gibt man dann 1/5 bis höchstens 1/4 ihres Volumens Glycerin zu. Von der Menge des Glycerinzusatzes hängt die Schnittfähigkeit und die Härte des Blockes ab. Dies stellt die Vorratslösung dar. Die gut mit Alkohol gehärteten und anschließend in Wasser übergeführten Objekte kommen nun in eine 3-4 fach verdünnte Vorratslösung, die man an der Luft freiwillig und staubsicher eindicken läßt, bis sie Honigkonsistenz aufweist. Nun gießt man die Lösung in ein Papierschälchen, orientiert das Objekt darin und härtet mit absolutem Alkohol vollständig. Am besten stellt man das Papierschiffchen in eine Glasschale und gießt den Alkohol in das Schälchen. Wenn das Papierschächtelchen Neigung zum Schwimmen zeigt, kann man es vor dem Einfüllen der Gummilösung mit einem Tropfen Pelikanol oder einem anderen Kleister am Boden des Gefäßes ankleben.

Zum Schneiden wird das Messer schräg gestellt. Die Schnittdicke beträgt 20-60µ. Die Schnitte kommen zuerst in Alkohol und dann in Wasser, worin sich der Gummi auflöst; sie können auch trocken mit Kollodium-Nelkenöl aufgeklebt und vor der Auflösung des Gummis mit einem Kollodiumhäutchen versehen werden.

2. Gummiglycerin ohne Alkoholhärtung nach *L.Dippell* (33). Die Gummiglycerineinbettung nach *Dippel* hat sich durchaus bewährt. Man stellt sich zunächst folgende Vorratslösung her:

Gummi arabicum	10 g
Destilliertes Wasser	10 ccm
Glycerin	20-40 Tropfen
Karbolwasser	einige Tropfen

Die Schneidbarkeit der Objekte richtet sich nach dem Glycerinzusatz, der von der Güte des verwendeten Gummis, von der Härte der Objekte und von der Dicke der Schnitte, die angestrebt werden, abhängt. Die Methode bedarf daher etwas der Einarbeitung. Je weniger Glycerin genommen wird, desto härter wird der Block, desto dünner werden die Schnitte und desto schwieriger ist der Block zu schneiden.

Die Objekte müssen gut in Alkohol oder Formalin gehärtet worden sein und kommen dann nach dem Auswaschen des Fixiermittels oder der Härteflüssigkeit in folgende Einbettlösung:

Vorratslösung	10 ccm
Destilliertes Wasser	30-40 ccm.

Zur Durchdringung läßt man die Objekte einige Tage unter Verschluß darin stehen, um dann in einer flachen Schale staubsicher (unter Seidenpapierabdachung) und freiwillig das Wasser etwa im Freien vor dem Fenster verdunsten zu lassen. Dies dauert ungefähr 8-14 Tage. Es ist nur von Anfang an genügend Lösung zu nehmen, damit das Objekt nach erfolgtem Eindicken völlig von Gummi eingeschlossen ist. Manchmal ist, um die Totaldurchdringung zu garantieren, eine Behandlung unter der Luftpumpe von Vorteil.

Das Objekt wird auf einem Holzklötzchen aufgeblockt. Nach 2 bis 3 Tagen ist der Block meistens schnittfähig. Geschnitten wird mit schräg gestelltem Messer. Die Schnittdicke beträgt je nach Geschicklichkeit 20-60µ.

Muß man die Arbeit unterbrechen und kommt man in dieser Zeit nicht zum Schneiden, verbringt man den Block in eine gut schließende Glasschale, damit er nicht knochenhart wird. Das Gummi arabicum wird aus den Schnitten mit Wasser entfernt. Aufkleben wie bei der vorigen Methode oder auch mit Gelatine; meistens wird das Aufkleben unnötig sein.

Diese Methode ist geeignet für wasserreiche Objekte wie Rhizome und Stengel von Wasserpflanzen, von Moosen aller Arten, von Laubflechten, härteren Pilzen, vor allem von Objekten, die sich in Paraffin schlecht oder gar nicht verarbeiten lassen.

(33) Zitiert nach Eduard Straßburger, *Botanisches Praktikum*, Jena, G.Fischer Verlag, S.57

[Ein weiteres sehr schonendes Einbettungsmittel ist Histowachs (Carbowachs, Polyethylenglycol). Man bringt die fixierten Objekte in eine 10 %ige wässrige Lösung dieser Substanz, läßt eindunsten und überführt dann in reines geschmolzenes Histowachs bei ca. 60 ^{O}C. Dieses ideale Einbettungsmittel hat leider bis heute den großen Nachteil, daß die damit hergestellten Blöcke kaum schneidbar sind, einmal, weil das Material beim Abkühlen wegen teilweiser Rekristallisation bröckelig wird, zum anderen, weil es nur ungenügend an den eingebetteten Objekten haftet; diese wegen ihrer bestechenden Einfachheit immer wieder einmal empfohlene Methode ist nach meinen Erfahrungen unbrauchbar! Andererseits wäre es sicherlich den Schweiß des Edlen wert, einen Hilfsstoff zu suchen, der, mit geschmolzenem Histowachs beliebig mischbar, die Rekristallisation verhindert und zugleich die Haftung am Objekt verbessert – dann wäre diese Methode ein echter Gewinn für die Mikrotechnik.]

D. Zupf- und Quetschpräparate, Mazerationen

§ 86.

1. Es muß durchaus nicht alles geschnitten werden, was in toto zum Präparieren nicht geeignet ist. Manchesmal zeigen **Zupf- und Quetschpräparate** die darzustellenden Einzelheiten besser als Schnitte. Das gilt besonders für unregelmäßig faserige Objekte.

Das Anwendungsgebiet ist allerdings beschränkt. Bei Bauchpilzen (Bovisten) im Stadium der Erweichung, bei den Fruchtformen einiger Schleimpilze z.B., sind Zupfpräparate geeigneter, den Überblick über die einzelnen Formelemente zu geben, als Schnitte. Man zupft mit einer Pinzette aus dem frischen Material kleine Partien heraus, lockert sie auf und quetscht sie vorsichtig zwischen zwei Objektträgern. Sehr zweckmäßig kann man dazu ein Kompressorium verwenden, wie es zur Trichinenschau benützt wird. Ein solches Kompressorium ist aus zwei fast 1 cm dicken Glasscheiben gebildet, die mittels Schrauben zusammengepreßt werden können. Der anzuwendende Druck ist in weiten Grenzen regulierbar und beliebig lange einzuhalten. Die Objekte können dabei unter der schwachen Vergrößerung jedes Mikroskops beobachtet werden. Unter einem solchen Kompressorium können 18-24 Präparate gleichzeitig besichtigt werden. Dies ist wünschenswert, weil natürlich längst nicht alle Präparate ansprechen.

Das Fixiermittel wird mittels Pipetten an den Rand des Kompressoriums gebracht, wobei es durch Kapillarattraktion sofort eingesaugt wird. Am besten eignen sich hierfür Formalin-Alkohol-Gemische, da sie zugleich die Objekte so härten, daß sie wie Schnitte weiter behandelt werden können. Nach dem Fixieren trennt man vorsichtig die beiden Hälften des Kompressoriums und hebt die Objekte mittels Pinsel ab. Es ist nur zu beachten, daß das Formalin genügend lange hat einwirken können. Natürlich kann man auch gleich auf der Glasplatte die Objekte in Kollodiumhäutchen einschließen und dann weiterverarbeiten. (Formalinpreßverfahren nach *Schmelzer*).

Zupfpräparate kann man natürlich auch aus Schnitten anfertigen, wenn sie nicht zu dünn sind. Besonders etwas dickere Gummischnitte von Flechten (Umklammerung der Algen durch Pilzhyphen) und Pilze (Aufbau der Pilze aus Hyphen) geben instruktive Zupfpräparate.

2. Weitergehend in der Trennung der Einzelbestandteile wie das Zerzupfen ist die **Mazeration**. Die Mazeration hat die völlige Trennung der einzelnen Elemente eines Schnittes oder kleinen

Objektes zum Ziel. Diese Methode wird hauptsächlich angewandt, um die einzelnen Aufbauelemente eines Längsschnittes zu isolieren. Dabei soll natürlich der Zellinhalt tunlichst erhalten bleiben. Dieses Ziel erreicht man mit folgender von *Kisser* (34) angegebenen Methode:

1. Die Objekte - frisch oder fixiert - werden in Pikrinsäurelösung oder 1% iger Chromsäurelösung 24 Stunden lang behandelt.
2. Anschließend kommen die Objekte in 3 %ige wässrige Wasserstoffperoxidlösung bei 45 °C oder in 3% ige wässrige oder alkoholische Schwefelsäure.

Wenn die Objekte nicht freiwillig zerfallen, dann kann man mit leichtem Druck auf das Deckglas nachhelfen. Die mazerierten Teile können in Kollodiumhäutchen gesammelt gewaschen, fixiert und gefärbt werden. Schwefelsäure löst allerdings viel von den Bestandteilen auf. Wenn man färben will, nimmt man daher besser Wasserstoffperoxid. Am wirkungsvollsten ist die Einwirkung von Wasserstoffperoxid auf mit Pikrinsäure vorbehandelte Objekte.

Über das früher viel angewandte *Schultzesche* Gemisch wird auf die Literatur (*Straßburger*) verwiesen. Vergleiche auch § 488.

(34) Josef Kisser, Mikrokosmos XX, 1926/27, S.200

Kapitel IV Farstoffe und Färben

§ 87. Zweck des Färbens. Objekte, die nicht genügend Einzelheiten erkennen lassen, da sie zu schwach oder gleichmäßig gefärbt sind, können mit Gewinn erst dann im Mikroskop studiert werden, wenn durch die Anwendung von Färbungen die Einzelheiten besser in Erscheinung treten. Zwar läßt eine tote Zelle manchmal ohne Färbung Plasma und Einschlüsse erkennen, aber der Aufbau des Kernes und die sonstigen Einzelheiten treten erst dann deutlich hervor, wenn es gelungen ist, durch Färbung optische Unterschiede der einzelnen Bestandteile zu erhalten. Die Färbungen müssen daher, wenn sie ihren Zweck erfüllen sollen, so ausgeführt werden, daß die einzelnen Elemente deutlich hervortreten und von anderen Elementen möglichst durch eine andere Farbe abstechen, mindestens aber durch eine andere Stärke der Tönung.

Die erste botanische Färbung wurde im Jahre 1843 von den Botanikern *P.Cohn* und *Göppers* in *Breslau* mit Karmin ausgeführt. Im Jahre 1865 wurde von *Böhmer* das Hämatoxylin angewandt und 1875 endlich wurde durch *Weigert* die erste Bakterienfärbung mit Methylviolett durchgeführt.

Zur Zeit verfügen Technik und Wissenschaft über eine geradezu ungeheuer große Anzahl von Farbstoffen, von denen aber nur eine kleine Auswahl in der mikroskopischen Technik Verwendung findet. Die Auswahl von Farbstoffe, die für die Bearbeitung der Kryptogamen in Frage kommt, ist noch kleiner.

Die Farbstoffe für wissenschaftliche Zwecke sind fast ausnahmslos von der Technik der Textilienfärberei übernommen worden. Da nun die Anforderungen der Textilindustrie an ihre Farben mit dem Wechsel der Spinnstoffe (Kunstseide usw.) selbst dem Wechsel unterliegen, wechselten auch manchmal die Farbstoffe. Gleichgeblieben ist jedoch der Name der Farben, hauptsächlich aus kaufmännischen Gründen. So kommt es vor, daß bewährte Farbstoffe wie z.B. Magdalarot oder Karmin dem Wissenschaftler nicht mehr zuverlässig erscheinen. Ja, es hat sogar dazu geführt, daß die Veröffentlichungen früherer Autoren nachträglich angezweifelt wurden. Sehr zu Unrecht natürlich. Jetzt werden unter der Bezeichnung *Standardisierte Farbstoffe "Bayer"* (35) Farben für wissenschaftliche Zwecke in den Handel gebracht, die ein für allemal die gleiche Zusammensetzung aufweisen.

Im folgenden wird nun das Wichtigste über Farbstoffe kurz ausgeführt. Allgemeines über organische Farben

(35) Farben für mikroskopische Zwecke auch in kleineren Mengen geben ab:
Dr.K.Hollborn & Söhne, Leipzig S 3, Hardenbergstraße 3
Dr. G. Grübler & Co., Leipzig C 1, Liebigstraße 1-b
Franckh'sche Verlagshandlung W. Keller & Co., Stuttgart S, Heusteigstraße 44

§ 88.

1. Als Farben geeignet sind chemische Verbindungen, die selbst farbig sind, d.h. das Licht selektiv absorbieren und sich fest mit dem Färbegut vereinen lassen.

2. Die in der Mikroskopie verwendbaren Farben sind, wie schon einmal erwähnt, fast alle der Färbereitechnik entnommen. Nur die künstlichen Beizenfarbstoffe nach *Becher* sind ausschließlich für die Zwecke der Wissenschaft entwickelt worden, aber auch hier wieder unter Verwendung von Farben, die in anderer Weise von der Technik schon genutzt worden waren.

Für den Mikroskopiker erweist es sich nun sowohl für das theoretische Verständnis des Färbungsvorganges als auch für die praktische Durchführung der Färbung als nützlich, ja sogar als notwendig, über Farbenchemie und über die technische Textilfärbung in den Grundzügen das Allerwichtigste kurz kennenzulernen. Auftretende Schwierigkeiten werden um so leichter behoben und viele Mißerfolge treten überhaupt gar nicht erst auf, wenn an die Stelle des planlosen Herumprobierens ernste wissenschaftliche Überlegungen treten.

3. Das Färben der Textilien wird in wässerigen Bädern vorgenommen, die Flotte genannt werden. Da die zu färbenden Objekte sehr umfangreich sind, werden die Farben und die sonstigen

Zusätze in Gewichtsprozenten der zu färbenden Textilien berechnet. In der mikroskopischen Technik ist die Farbe immer im Überschuß vorhanden.

4. Der Färbevorgang selbst ist noch nicht genügend erforscht. Teils ist er rein chemisch, teilweise ein Adsorptions- bzw. ein Absorptionsprozeß, also physikalisch.

5. Um die Farbstoffe besprechen zu können, muß man sie in irgendeiner Weise einteilen und aufzählen. Dies kann entweder nach chemischen oder nach praktischen Gesichtspunkten geschehen. Die chemische Einteilung der organischen Farben unterteilt die Farben in

1. **Azofarbstoffe**, welche die größte Gruppe darstellen. Man unterscheidet saure Azofarbstoffe, basische Azofarbstoffe oder auch Monoazofarbstoffe, Disazofarbstoffe, Benzidinfarbstoffe, Tris- und Polyazofarbstoffe.
2. **Nitroso-** und **Nitrofarbstoffe**
3. **Chinone.** Man unterscheidet Benzochinone, Naphthachinone und Anthrachinone.
4. **Di- und Triphenylmethanfarbstoffe**
5. **Xanthenfarbstoffe** mit den Unterabteilungen der Pyronine und Phthaleine
6. **Akridinfarbstoffe**
7. **Azinfarbstoffe**
8. **Oxazinfarbstoffe**
9. **Thiazinfarbstoffe**
10. **Küpenfarbstoffe**, die wieder eine große Gruppe von Farbstoffen umfassen. Hierher gehören der Indigo, die neuen Indanthrenfarbstoffe, die meisten Schwefelfarben.

Jedes Lehrbuch über Farbchemie teilt die Farben etwas anders ein, je nach dem persönlichen wissenschaftlichen Standpunkt des Verfassers.

§ 89. Die praktische Einteilung der Farbstoffe beruht auf dem Färbeeffekt bei den verschiedenen Stoffarten. Man unterscheidet hier:

1. **Basische Farbstoffe**. Sie färben Baumwolle und Kunstseide nach vorausgegangener Gerbstoffbeize. Hierher gehören z.B. Methylgrün, Methylviolett, Safranin, Fuchsin, Bismarckbraun.
2. **Saure Farbstoffe**. Sie färben Wolle, Seide und Jute. Hierher gehören z.B. Eosin, Lichtgrün, Säurefuchsin, Pikrinsäure, manche Anthrachinonfarbstoffe.
3. **Substantivische Farbstoffe**. Sie färben Baumwolle, Seide und Wolle direkt ohne vorhergehende Beize. Hierher gehören Benzoazurin, Benzopurpurin, Kongorot.
4. **Beizenfarbstoffe**. Sie färben Baumwolle, Seide und Wolle erst nach vorausgegangener Beizung. Hierher gehören Hämatoxylin, Brasilin, Karmin.
5. **Entwicklungsfarbstoffe**. Sie färben Baumwolle und Kunstseide. Hierher gehören Anilinschwarz, Paranitranilinrot. Naphtholrot, Echtrot.
6. **Küpenfarbstoffe**. Sie färben Baumwolle, Kunstseide, Wolle und Seide in der Form der Farbküpe. Hierher gehören Indigo und die Indanthrenfarben.
7. **Schwefelfarben**. Sie färben substantivisch bei Anwesenheit von Schwefelnatrium Baumwolle. Hierher gehören Vidalschwarz, Pyrogenblau.

Dazu kommen noch weitere Farben für Papier, Leder, Holz, Tapeten, Fette und Wachse und für das graphische Gewerbe. Sie sind sämtlich ohne Interesse für die Mikroskopie.

§ 90. Die **Benennung der Farbstoffe** ist nicht nach einem einheitlichen Gesichtspunkt durchgeführt worden. Meistens tragen die Farben Phantasienamen wie Gentianaviolett, Fuchsin, Echtrot usw. Oder sie haben alte Volksbezeichnungen wie Indigo, Krapp beibehalten.

Eine Bezeichnung nach dem chemischen Aufbau ist sehr schwierig, umständlich und dem Nichtchemiker nicht immer verständlich. Vielfach wird ein und derselbe Farbstoff von den verschiedensten Fabriken hergestellt und dann jedesmal mit einem anderen Namen versehen. So

kommt es, daß z.B. ein und dasselbe Grün bis zu zwanzig verschiedene Namen aufweisen kann. Wer also nur nach dem Katalog ohne Kenntnis der tatsächlichen Verhältnisse sich verschiedene Farben bestellt, kann mehrmals denselben chemischen Körper erhalten. Gerade für den Anfänger ist die Kenntnis der hier vorliegenden Verhältnisse wichtig.

Die Farben werden von den Fabriken in großen Mengen, vielfach oft mehrere hundert Kilogramm pro Arbeitsgang, hergestellt. Jeder Arbeitsgang liefert aber ein etwas unterschiedliches Produkt. Die Fabriken vermischen nun die Erzeugnisse vieler Arbeitsgänge miteinander und stellen nach Probefärbungen so eine Handelsmarke mit bestimmter, vom Verbraucher erwarteter Färbekraft her. Manchmal ist dazu die Beigabe von Neutralstoffen wie Dextrin oder Glaubersalz usw. nötig. Diese Einstellung ist für die Textilienfärberei wichtig, da ja die Farbe in der Flotte nach Gewichtsmengen angesetzt wird. Die Farbenfabriken fügen nun zu ihren Farbennamen noch Buchstaben an wie 0, G, B oder 5 B und so weiter. Diese Buchstaben sind entweder ganz willkürlich gewählt und bezeichnen nur etwas für die kaufmännische oder technische Leitung der betreffenden Fabriken Wichtiges, oder sie geben dem Verbraucher einen Hinweis und haben dann z.B. folgende Bedeutung:

0 heißt Grundton oder Originalton, das bedeutet, die Farbe ist nicht mit anderen Farben versetzt, geschönt oder verschnitten.

L heißt leicht löslich oder für Leinenfärberei, auch lackbildend.

S heißt seidefärbend, oder saure Farbe (Sulfosäure, Bisulfitverbindung).

W heißt wollefärbend, **HW** halbwolle färbend.

G heißt gelblich oder grünlich.

R heißt rot, rötlich. **RR** oder **2 R** ist dann stärker rot.

B heißt baumwollfärbend, blau**. BB**, **5 B** usw. noch blauer als der Grundton.

Eine Übersicht über alle bisher bekannt gewordenen Farben geben die Farbstofftabellen von *G. Schulz-Julius*. Der Leser dieses Buches findet als Anhang eine Zusammenstellung der wichtigsten chemischen Eigenschaften, der Löslichkeit, Echtheit, sowie der wichtigsten färberischen Eigenschaften von einigen häufig in der Literatur erwähnten organischen und anorganischen Farben.

[Am besten informiert man sich in dem mehrbändigen Werk ***Colour Index*** über die verschiedenen Farbstoffe. Hat der Farbstoff eine CI-Nummer (Color-Index-Nummer), so ist die Identifizierung eindeutig; es ist aber auch möglich, den Farbstoff über einen seiner vielen Handelsnamen aufzufinden]

Das Färben

§ 91. In der technischen Praxis hat sich das Färben zu einer hohen Kunst entwickelt. Angestrebt wird in der Färberei eine gleichmäßige egalisierende Färbung des Farbgutes. Der Färber färbt nun folgendermaßen:

Saure Farbstoffe. Bei den sauren Farben enthält der Säureanteil des Moleküls die färbende Gruppe. Die Farbe wird mit heißem Wasser gelöst. Man gibt auf die Gesamtmenge der Farblösung 10 bis 20% Glaubersalz (krist.) und 2-5% Schwefelsäure. Hiermit wird bei Wolle und Seide eine egalisierende Färbung erzielt.

Basische Farbstoffe. Der basische Anteil des Moleküls enthält die färbende Gruppe. Die basischen Farben färben tierische Fasern (Wolle, Seide) in wässriger Lösung ohne jeden Zusatz, sie färben pflanzliche Fasern (Baumwolle) nur nach Vorbehandlung mit Gerbsäure und Metallsalzen. Die Stoffe werden 24 Stunden lang mit 2-5% iger Tanninlösung behandelt, gewa-

schen und dann mit 1-2,5% iger Brechweinsteinlösung fixiert, wiederum gewaschen und dann endlich anschließend gefärbt. In den letzten Jahren hat sich immer mehr das Vorbeizen mit dem synthetischen ***Katanol*** eingebürgert.

Substantiv-färbende, direkt ziehende Farben. Diese färben Zellulose (pflanzliche Faser) direkt in wässriger Lösung mit 20 % Glaubersalzzusatz ohne beigefügte Säuren. Diese Färbungen werden waschecht gemacht durch das Nachkupfern in 2 %iger Kupfervitriollösung mit 0,3% Essigsäurezusatz.

Beizenfarbstoffe bedürfen zum Färbeeffekt einer Faser, deren Vorbehandlung mit einer Beize das Zustandekommen eines unlöslichen Farblackes auf der Faser ermöglicht. Zur Anwendung kommen z. B. Aluminium-, Chrom-, Eisen-, Zinn- und Kupfersalze. Die Beizenfarbstoffe werden sowohl auf Wolle als auch auf Baumwolle angewandt.

Entwicklungsfarbstoffe. Die Entwicklungsfarbstoffe, die verschiedensten chemischen Gruppen angehören können, werden aus ihren löslichen Komponenten erst auf der Faser erzeugt. Da die Entwicklungsfarbstoffe selbst unlöslich sind, erweisen sich die Färbungen als sehr echt.

Küpenfarbstoffe. Die Küpenfarbstoffe sind in Wasser und Alkohol unlösliche Farben. Durch Behandeln mit Alkalien und Reduktionsmitteln werden sie in lösliche Verbindungen übergeführt (verküpt). Die pflanzliche Faser nimmt die Küpe dann auf. Durch Oxydation an der Luft entsteht abermals der Farbstoff.

Schwefelfarben. Die Stoffe werden in einer soda-alkalischen Natriumsulfidlösung des Farbstoffes unter Erwärmen behandelt. Die eigentliche Färbung tritt dann auf, wenn durch Oxydation an der Luft oder mit Metallsalzlösungen der Farbstoff gebildet wird.

§ 92. In der **Mikroskopie** ist das Färben nicht minder wie in der Technik eine große Kunst und dazu auch eine schwierige Wissenschaft geworden. Angestrebt wird dabei keineswegs das Ideal der Textilfärberei, eine möglichst gleichmäßige Färbung der Objekte zu erzielen. Im Gegenteil, gerade durch die Färbung soll eine Differenzierung der einzelnen Bestandteile der Objekte ermöglicht werden.

Die Textilfärberei kennt neben den Stoffen aus einheitlichen Fasern auch kompliziertere Objekte aus Pflanzenfasern und Wolle, die in einem Farbgang verschieden gefärbt werden können, aber im großen ganzen werden bunte Stoffe durch das Weben mit verschieden gefärbten Garnen oder durch Buntdruck erzeugt.

Die mikroskopischen Objekte sind in der Regel recht kompliziert gebaute Gebilde. Eine Ausnahme machen vielleicht nur die Bakterien, an denen bei den bisher erreichten Vergrößerungen nur eine einheitliche Färbung des Bakterienleibes möglich gewesen ist. Aber auch hier schon können Sporen und Kapseln im Kontrast gefärbt werden.

Die zoologischen, histologischen und pathologischen Objekte bestehen hauptsächlich aus den verschiedensten Eiweißarten, die noch Fett, Glykogen, Kalksalze und verschiedene pathologische Bestandteile aufweisen können.

Die botanischen Objekte bestehen aus Zellulose als Grundgerüstsubstanz, Eiweiß als Lebensträger und zahlreichen, besonders der Zellulose eingelagerten Stoffen, wie Holz und Kork. Aber auch Farbstoffe wie das Blattgrün, die Blütenfarben, eine Reihe anderer Stoffe wie Harze, Fette, Öle, Stärke, Gerbstoffe und noch manches andere findet sich vor. Besonders die Kryptogamen enthalten besondere Stoffe (Chitin, Flechtensäuren), die bezüglich ihrer chemischen Bestandteile noch längst nicht alle sicher erkannt sind.

Hinsichtlich der morphologischen Gestaltung unterscheiden wir mühelos einen verwickelten Aufbau (Kern, Zellinhalt, Zellwand). Mindestens diese drei sollen verschieden gefärbt werden können. Da in der Mikroskopie differenzierte Färbungen notwendig sind, werden beim Färben die Zusätze der Textilfärberei nur dann angewandt, wenn einheitliche Objekte vorliegen oder wenn diese Zusätze erst das Färben ermöglichen.

Bei den Beizenfarbstoffen kennt die Mikroskopie gleich der Textilfärberei zwei Wege. Zunächst kann das Objekt gebeizt werden. Dieser Vorgang ist von den meisten Mikroskopikern

übersehen worden oder ihnen unbekannt, denn das Beizen wird oft schon durch das Fixieren bewirkt, wie etwa bei der Verwendung von chromhaltigen Fixiermitteln. Eine Vorbeizung mit Eisen wird bei der Eisenhämatoxylinfärbung nach *Heidenhain* angewendet. Der zweite Weg ist die Anwendung von löslichen Metallfarblacken wie bei vielen Karminfärbungen (Karmalaun, Parakarmin nach *P.Mayer*), dann Hämatoxylinfärbungen (Hämatoxylin nach *Delafield*, saures Hämalaun nach *P.Mayer*, Kernechtrot, alle *Becher*-Farben).

Entwicklungsfarbstoffe, Küpenfarbstoffe und die Schwefelfarben werden in der Mikroskopie bislang nicht verwendet.

Die Farben selbst haben als saure und basische Farben verschiedene Affinitäten zu den einzelnen Bestandteilen der Objekte (Kern, Plasma, Zellulose, Holz, Einschlüsse), und so kommt eine verschiedene Färbung der zu unterscheidenden Bestandteile zuwege.

§ 93.

1. Die technische Durchführung der Färbung in der Mikroskopie kann nun eine **progressive** oder **regressive**, eine **unmittelbare** oder mittelbare (direkte oder indirekte, auch inverse Färbung genannt) sein.

2. Progressiv ist eine Färbung dann, wenn die Farbe nur die gewünschten Bestandteile färbt. Wenn eine Farbe nur die Kerne färbt und sonst nichts, auch wenn sie noch so lange einwirkt, ist dies der Fall. Eine reine progressive Färbung haben wir in der Fettfärbung mit Sudanfarbstoffen.

3. Regressiv ist eine Färbung, wenn der Farbstoff zunächst das ganze Objekt gleichmäßig anfärbt und sich dann durch Behandeln mit bestimmten Stoffen oder Reagenzien aus denjenigen Teilen, die nicht gefärbt bleiben sollen, wieder auswaschen läßt (Differenzieren der Färbung). Dies ist der häufigste Fall in der Praxis. Das Differenzieren bedarf aber der Aufmerksamkeit, damit der Vorgang der Entfärbung nicht zu weit getrieben wird. Groß ist das Unglück der Entfärbung ja nicht, denn die Färbung kann auf jeden Fall wiederholt werden.

4. Unmittelbar oder substantivisch ist eine Färbung, wenn das Objekt die Farbe direkt in den gewünschten Teilen annimmt. Hierher gehört die Kernfärbung mit basischen organischen Farbstoffen oder mit den Farblacken (Karmin, *Becher* usw.).

5. Mittelbar, indirekt, adjektivisch oder **invers** ist die Färbung dann, wenn das Objekt zuvor durch eine Vorbehandlung mit Beizen (Tannin, Brechweinstein) in die Lage gebracht werden muß, in den gewünschten Teilen die Farbe annehmen zu können. So lassen sich invers mit sauren Farben Kernfärbungen und mit basischen Farben Plasma und Zelleinschlüsse wie Stärke färben.

6. Für das Zustandekommen einer befriedigenden Färbung sind die Voraussetzungen eine entsprechende Behandlung des Objektes und einwandfreie Farblösungen. Die Objekte müssen gehörig durchfixiert, aber nicht überfixiert sein. Ferner muß das überschüssige Fixiermittel, gegebenenfalls auch das Aufbewahrungsmittel, vollständig ausgewaschen sein. Zur Konservierung von Aufbewahrungsmitteln darf nur Karbolsäure Verwendung finden. Andere Stoffe wie Benzoesäure, Nipagin, Salizylsäure usw. beeinflussen das Färben sehr ungünstig, besonders bei basischen Farben.

Pyridin, insbesondere die sogenannten Pyridinbasen (Brennspiritus, Pyridinzelloidineinbettung), verhindern gleichfalls eine gute Färbung. Sind die Objekte mit Pyridin in Berührung gekommen, so muß der Färbung ein 1 %iges Essigsäurebad (1 Stunde) vorausgehen. Die Essigsäure ist natürlich ebenfalls wieder auszuwaschen.

Nach langer Formalineinwirkung färben basische und saure organische Farben ebenfalls schlecht. Abhilfe kann hier durch Vorbehandlung mit 1 %iger Silbernitratlösung (im Dunkeln vornehmen!) geschaffen werden. Die Dauer der Silbernitrateinwirkung kann nach jahrelangem Aufenthalt in Formalin auf 8-14 Tage zu bemessen sein. Indirekte Färbungen mit *Becher*-

Farben, manchen Hämatoxylinfarben sowie die Metallimprägnationen gelingen jedoch an Formolmaterial sehr gut.

§ 94. Wenn nötig, muß nach dem Färben das **Differenzieren** vorgenommen werden. Das Differenzieren kann bei

1. **lichtunechten Farbstoffe** wie Magdalarot, Erythrosin im Sonnenlicht vorgenommen werden. Diese Methode ist jedoch wenig im Gebrauch (Algenfärbung nach *Pfeiffer* und *Eckert*).
2. Säureunechte Farbstoffe werden mit 0,5 %igem bis 2 %igem Salzsäurealkohol, wässriger Essigsäure, Schwefelsäure in 0,5 %igen Lösungen differenziert. Bei **alkaliunechten Farbstoffen** verwendet man Sodalösungen oder verdünnte Natronlauge.
3. Bei **leichtlöslichen Farben** genügt schon das Auswaschen in Wasser oder Alkohol allein. Manche Farbstoffe, besonders die basischen und sauren organischen Farbstoffe, sind leicht auszuwaschen. Sie werden oft zu leicht bei dem Einschließen der Präparate durch die Intermedien Wasser, Alkohol, Nelkenöl usw. ausgezogen, und der Färbeerfolg ist dann in Frage gestellt. Manchmal hilft ein rasches Arbeiten über diese Kalamität hinweg, aber in der Regel kann der ursprüngliche feurige Farbton nicht erhalten bleiben. Zur Abhilfe gibt es mehrere Wege:

   a) Man verwendet zunächst Intermedien, in denen die Farbstoffe nicht löslich sind, z.B. Azeton oder Isopropylalkohol, auch tertiären Butylalkohol. Ferner kann man den Farbstoff wie Eosin in dem Intermedium (Nelkenöl) auflösen und so die Färbung in Nelkenöl erst vervollständigen. Dies sind aber nur Notbehelfe, die auch einmal versagen können.

   b) Ein weiterer Ausweg ist die Wahl eines Einschlußmittels, das einer Entwässerung nicht bedarf. So ist bei Färbungen mit organischen Farben das Einschließen in Medien, die hauptsächlich Traubenzucker enthalten, sehr gut möglich. Die Farben halten sich darin recht gut.

   c) Das beste ist es jedoch, die Färbungen in einen unlöslichen Zustand überzuführen, das heißt, nachträglich zu beizen.

Nachträgliches Beizen der Färbungen zur Erhöhung der Echtheit

§ 95. Die Lichtechtheit der mikroskopischen Färbungen ist gewöhnlich ausreichend. Voraussetzung ist nur, daß die Objekte genügend durchgefärbt und durch Wässern von allen schädlichen Stoffen (Differenzierungsmitteln) befreit worden sind. Die Präparate werden ja auch nur kurze Zeit im Mikroskop betrachtet, während sie die meiste Zeit im Dunkeln, im Präparatekasten aufbewahrt werden.

Der Widerstand gegen das Ausgewaschenwerden mit Wasser, Alkohol, Nelkenöl, Terpineol usw. kann dadurch erreicht werden, daß die Farben in den Objekten nachträglich in Verbindungen übergeführt werden, die in den genannten Medien unlöslich sind. Diesen Zweck erfüllt die Herstellung unlöslicher Farblacke.

Die gefärbten Objekte (Schnitte, Totalpräparate, Ausstriche) kommen für 10-20 Minuten in die Beizbäder. Umfangreichere Totalpräparate benötigen manchmal eine Behandlungsdauer bis zu einer Stunde, bis sie durchgebeizt sind. Hernach wird mit destilliertem Wasser sorgfältig ausgewaschen. Die Beizvorschriften sind für basische und saure Farben verschieden. Besteht über den Charakter einer Farbe Unsicherheit, so kann die Feststellung, ob die Farbe sauer oder basisch ist, leicht durch ein einfaches Experiment gemacht werden: Alle basischen Farben geben in Lösungen beim Vermischen mit Pikrinsäurelösung Niederschläge, saure Farben nicht. Das basische Chinolinblau verändert sich jedoch nicht mit Pikrinsäure.

Das Beizen von basischen Farbstoffen. Basische Farbstoffe können gebeizt werden:

1. **Mit Tannin-Brechweinstein.** Die Schnitte werden 10 Minuten lang mit einer 10 %igen Lösung von Tannin behandelt, dann ausgewaschen und ebenso lang in 3% iger Brechweinsteinlösung nachbehandelt. Hierauf erneutes Auswaschen. Der Farbton wird nicht geändert.
2. **Mit Pikrinsäure.** Die Schnitte werden mit 0,5% iger Pikrinsäurelösung 10 Minuten lang behandelt. Man kann auch eine konzentrierte alkoholische Lösung anwenden. Die Färbung wird in jedem Fall verändert. Blaue Farben werden grün, rote violett usw. Aus diesem Grunde wird das Verfahren eigentlich nur da angewandt, wo der Farbumschlag erwünscht ist. Zu empfehlen ist das Verfahren nicht.
3. **Mit Phosphormolybdänsäure oder Phosphorwolframsäure.** Dies ist unstreitig das beste und empfehlenswerteste Verfahren. Die beiden genannten Substanzen werden in 5% iger Lösung verwendet. Die Beizungsdauer ist 2-3 Minuten. Sie ergeben leuchtende Lacke. Beide Substanzen sind jedoch starke Säuren und greifen Metallinstrumente schnell an. Schließlich kann in speziellen Fällen noch weiterhin ein Salz der Molybdänsäure verwendet werden (Ammonium- und Kaliumsalz.) Näheres bei den einzelnen Färbevorschriften.

Das Beizen von sauren Farbstoffen ist leider nicht so einfach durchzuführen. Zwar bilden die sauren Farben willig mit Metallsalzen Farblacke, doch sind diese in Alkohol nur etwas schwerer löslich als die ursprüngliche Färbung, also leider nicht völlig unlöslich. Das Verfahren genügt meistens, um die Objekte die Intermedien unausgezogen passieren zu lassen. In Zuckereinschlußmedien sind sie absolut haltbar.

Eosinfarbstoffe bilden Lacke mit löslichen Bleisalzen. Man verwendet ameisensaures Blei in 0,5 %iger wässeriger Lösung.

Die Mehrzahl der sauren Farben bilden Lacke mit den Salzen der Erdalkalimetalle Kalzium und Barium. Man verwendet 0,5-1% ige wässerige Lösungen von Chlorkalzium oder Chlorbarium. Die Farbe wird etwas geändert. Das Kalziumsalz ändert den Ton nach blau, das Bariumsalz ins Rötliche um.

Substantivische Farben werden mit 0,5 % igem Kupferacetat oder -sulfat gebeizt. Dauer 1 Stunde.

[Es sei schon an dieser Stelle nachdrücklich betont, daß verbleibende Säurespuren die Haltbarkeit der Färbungen sehr negativ beeinflussen. Wird mit sauren Farblösungen gefärbt, muß sehr gründlich mit Leitungswasser (nicht mit destilliertem Wasser!) ausgewaschen werden. Die Verwendung von Natriumhydrogencarbonat zur Neutralisation ist von zweifelhaftem Wert. Pikrinsäurereste müssen schon vor dem Färben durch Waschen mit ammoniakhaltigem wässrigem Alkohol restlos beseitigt werden!]

Die gebräuchlichsten organischen Farbstoffe

§ 96. Es folgen nun die Arbeitsvorschriften für die einzelnen organischen Farbstoffe. Die hier angeführten Farbstoffe sind nicht alle unbedingt nötig, um die späteren Arbeitspläne durchzuführen, jedenfalls nicht für den Anfänger. Im Laufe der Zeit wird jedoch der Umfang der Farbstoffe bei jedem Mikroskopiker größer und größer.

Der Anfänger verwendet am besten zunächst nur die Vorschriften, die als besonders zuverlässig und dankbar gekennzeichnet sind. Die Auswahl der einzelnen Farbstoffe ist zum Teil reine Geschmackssache, besonders hinsichtlich des Farbtones. Ferner ist in Betracht zu ziehen, daß eine an und für sich gut verläßliche Färbung in der Hand einzelner versagt, während andere wieder damit glückliche Ergebnisse erzielen.

Auch die vorausgegangene Fixierung ist bei der Auswahl der Farben zu beachten. Bei den einzelnen Vorschriften sind darüber ausführliche Anmerkungen geboten.

In den Tabellen werden die folgenden Abkürzungen verwendet:

FX Fixierung
FB Färbung
DA Färbedauer
DF Differenzierung
BZ Beizung
ES Einschluß
BM Bemerkung

Vorschriften für basische organische Farben

§ 97. Die Lösungen werden mit destilliertem Wasser hergestellt. Die vielfach anempfohlenen Stammlösungen in 96 %igem Alkohol sind unnötig. Wenn die wässrigen Farblösungen einen entsprechenden Karbolzusatz aufweisen, sind sie in der Regel ausreichend haltbar, zumal wenn sie etwas Alkohol enthalten. Es ist soviel Karbolsäure zu nehmen, daß die fertige Lösung 0,25% Karbolsäure enthält. Man gibt also auf 100 ccm Farblösung 5 ccm einer 5 %igen wässrigen Karbolsäure. Acidum carbolicum liquefactum den Lösungen zuzusetzen ist falsch. Dies verursacht in der Regel Ausfällungen, die Farbe unbrauchbar machen.

§ 98. Bismarckbraun. Man löst 2 g Farbe in 15 ccm Wasser, dem 25 ccm Alkohol zugesetzt waren, durch Kochen auf. Nach dem Erkalten filtrieren.

FX Beliebig
DA 5-10 Minuten, je nach Schnittdicke
DF Salzsäurealkohol
BZ Tannin-Brechweinstein oder Phosphormolybdänsäure
BM

Bismarckbraun färbt auch in stark alkoholischen Lösungen. Es färbt Kerne und Zellwände. Beliebt war lange Zeit eine Doppelfärbung mit Methylgrün oder Bleu de Lyon.

§ 99. Chinolinblau (Zyanin). Chinolinblau ist ein sehr teuerer Farbstoff. 5 g in Substanz kosten je nach Firma 9-13 DM. Man löst 1 g Chinolinblau in 100 ccm 95 %igem Alkohol auf und gibt nach vollkommener Lösung 100 ccm Wasser zu. In Wasser allein ist die Farbe unlöslich.

FX Beliebig
DA 10-20 Minuten bis einige Tage bei schwer färbbaren Objekten
DF Alkohol, notfalls salzsaurer Alkohol
BZ Nicht möglich. Die Farbe bildet keine Lacke
BM

Chinolinblau wird fast nur noch bei Flechten zur Färbung der Gonidien gebraucht. Ferner färbt es: Chromosomen dunkelblau, Spindelfasern leicht blau, verholzte und verkorkte Membranen blau, moderndes Holz grün. Chinolinblau ist in Glycerin, Glyceringelatine und allen Harzen haltbar, außer Venetianer Terpentin.

§ 100. Chrysoidin. Man löst 1 g Farbstoff in 100 ccm Wasser auf. Die Lösung ist nur einige Wochen brauchbar. Am besten setzt man sie öfters in kleinen Mengen an.

FX Beliebig
DA 20 Minuten.
Am schönsten färben ganz verdünnte Lösungen bei entsprechend langer Färbedauer.
DF HC1-Alkohol
BZ Tannin-Brechweinstein oder Phosphormolybdänsäure
ES gebeizt in allen Medien
BM

Chrydsoidin färbt Holz orange-gelb. Es wird besonders angewandt als Nachfärbung nach Kernschwarz, blauen *Becher*-Farben und Hämatoxylinfärbungen (H. Thaler, Mikrokosmos 1930/31, S.80, und Mikrokosmos 1933/34, S.200). Chrysoidin färbt nach Formalinfixierung in 1% iger Farbstofflösung Fette braun.

§ 101. Fuchsin basisch

Vorschrift I. Man löst 1g Fuchsin in 100ccm Wasser durch Kochen. Nach dem Erkalten Filtrieren.

FX Beliebig
DA 5-10 Minuten
DF Mit salzsaurem Alkohol (70%iger Alkohol mit 1% HC1)
BZ Phosphormolybdänsäure, Phosphorwolframsäure, Tannin-Brechweinstein
ES Harze
BM

Fuchsin gewährleistet haltbare Färbungen. Man nimmt Fuchsin bei Mehrfachfärbungen immer an erster Stelle, da es sich schwer auswäscht.

Vorschrift II. Karbolfuchsin nach *Ziehl-Neelsen*: Man verreibt 1 g Fuchsin mit 10-15 ccm Alkohol im Mörser und gibt 100 ccm 5 %iges Karbolwasser hinzu. Gut haltbar.

FX Beliebig
DA 5-10 Minuten
DF Wie bei Vorschrift I
BZ Wie bei Vorschrift I
BM

Karbolfuchsin färbt außer Bakterien auch die Sporen höherer Pilze wie Morcheln und Röhrenpilze, ferner manchmal auch pflanzliche Kutikula. Hierbei ist eine Nachfärbung mit Methylenblau günstig. (H.Fischer, Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie XXIX, 1912)

Vorschrift III. Nach *Zimmermann* kann mit Fuchsin auch in violettem Farbton gefärbt werden. Man färbt mit einer der beiden obigen Vorschriften 15 Minuten. Verbringt hierauf den Schnitt in eine konzentrierte Pikrinsäurelösung in 70% igem Alkohol. Hierin wird geschwenkt, bis der dunkelviolette Ton erreicht ist. Abwaschen in 90% igem Alkohol, bis keine Farbe mehr abgeht. Das Verfahren ist eine Beizung der Fuchsinfärbung mit Pikrinsäure. Ähnliche Verfahren können mit noch anderen Farben wie Methylenblau, Malachitgrün usw. durchgeführt werden.

§ 102. Gentianaviolett, Methylviolett , Kristallviolett. Diese drei Farben werden nach der gleichen Vorschrift angewandt.

Vorschrift I. Man löst 1 g Farbstoff in 100 ccm Wasser durch Kochen auf. Nach dem Erkalten wird filtriert und 30 ccm Alkohol zugesetzt.

FX Im allgemeinen beliebig.
Färbt besonders gut nach Fixierung mit den beiden *Flemmingschen* Gemischen
DA 5-10 Minuten
DF Wässerige Essigsäure oder 2 %iger HCl-Alkohol
BM
Alle drei Farbstoffe färben Zelloidin stark an. Gentianaviolett ist Bestandteil des *Flemmingschen* Dreifarbenverfahrens.

Vorschrift II. Karbolgentiana zur Bakterienfärbung für schwer färbbare Arten wird wie Karbolfuchsin hergestellt.

Vorschrift III. Ammoniakalische Gentianaviolettlösung zur Korkfärbung. Zu konzentrierter alkoholischer Lösung von Gentianaviolett wird tropfenweise Ammoniak bis fast zur Entfärbung zugesetzt. Die Lösung ist haltbar.

DA 10-30 Minuten
DF Auswaschen der Schnitte in 5 %iger wässriger Salzsäure.
Dabei bleiben dann nur die Korkgewebe gefärbt.
BM
Wird nur mit Wasser ausgewaschen, so färbt sich neben dem Kork auch das Holz. Statt Gentianaviolett kann fast jede andere basische Anilinfarbe genommen werden.

§ 103. Kresylechtviolett. Man stellt sich eine gesättigte wässrige Lösung her.

FX Beliebig
DA 5-10 Minuten
DF In 70 %igem Alkohol
BZ
Mit Tannin-Brechweinstein, mit Phosphorwolframsäure oder mit Phosphormolybdänsäure
BM
Kresylechtviolett ist einer der echtesten Kernfarbstoffe. In wässriger Lösung färbt Kresylechtviolett metachromatisch. In Alkohol verschwindet die Metachromasie teilweise.

§ 104. Malachitgrün.

Lösung I:

Man löst 2 g Malachitgrün in 100 ccm Wasser durch Kochen auf.

Lösung II:

Man löst 2 g Malachitgrün in 100 ccm einer 2% igen Natriumthiosulfatlösung auf.

FX Beliebig
DA 5 Minuten bis einige Stunden.
Besonders gut färbt die Lösung mit Natriumthiosulfat.
DF Mit HCl-Alkohol.
War mit der natriumthiosulfathaltigen Farbe gefärbt worden, ist zuerst auszuwaschen, da sonst Niederschläge von Schwefel entstehen können.
BZ
Mit Tannin-Brechweinstein, mit Phosphormolybdänsäure oder Phosphorwolframsäure.
BM
Die einfache Farblösung, mit einigen Tropfen Schwefelsäure angesäuert, färbt wie eine saure Farbe, und zwar vornehmlich das Plasma.

§105. Methylenblau.

Vorschrift I. Man löst 2 g Methylenblau in 100 ccm Wasser durch Kochen auf. Filtrieren.

FX Beliebig
DA 5-10 Minuten, eventuell bedeutend länger
DF 1 %ige wässrige Essigsäure oder HCl-Alkohol
BZ
Mit Tannin-Brechweinstein, mit Phosphormolybdänsäure oder mit Phosphorwolframsäure

Vorschrift II. *Löfflers* alkalische Methylenblaulösung. Man mischt 30 ccm gesättigte alkoholische Methylenblaulösung mit 100 ccm 0,01 %iger Kalilauge. Die Farbe ist haltbar. Fixierung, Färben usw. wie oben bei Vorschrift I.

BM
Alte alkalische Lösungen von Methylenblau färben metachromatisch (manche Stellen werden rot).
Ungebeizt wird Methylenblau leicht durch gewöhnlichen Alkohol ausgezogen, ist aber unlöslich in Butylalkohol. Will man durch Butylalkohol einbetten, so wäscht man zuerst 1 Minute in einer Mischung von Alkohol mit Butylalkohol zu gleichen Teilen und dann in reinem Butylalkohol aus und überträgt in neuen Butylalkohol für 10-15 Minuten. Einschließen dann über Xylol, Terpineol in Caedax.
Methylenblau färbt manche Pilze und Pilzhyphen lebend. Diese lebendgefärbten Objekte werden dann fixiert mit wässriger konzentrierter Lösung von Ammoniumpikrat oder 5%igem wässerigem Ammoniummolybdat mit nachfolgender Formalinhärtung.

§ 106. Methylgrün. Man löst 1g Methylgrün in 100ccm kochend heißem Wasser auf. Methylgrün ist stark alkaliempfindlich, was bei der Verarbeitung zu beachten ist.

FX Beliebig
DA 5-10 Minuten
DF 70 %iger Alkohol, kein HCl-Alkohol
BZ
Entweder mit 5%iger wässriger Lösung von Ammoniummolybdat in Wasser oder Phosphormolybdänsäure
BM
Methylgrün färbt in normaler Lösung nur das Kerngerüst. Methylgrün färbt aber nach Schwefelbeize oder in ammoniakalischer Lösung auch das Plasma. Zur Nachfärbung wird hauptsächlich Säurefuchsin verwendet.

§ 107. Safranin. Es gibt ein wasserlösliches und ein alkohollösliches Safranin.

Vorschrift I. Man löst 2 g Safranin in 100ccm 50%igem Alkohol auf.

Vorschrift II. Man löst 1 g des alkohollöslichen Safranins in 100 ccm absolutem Alkohol auf. Ferner löst man 1 g des wasserlöslichen Safranins in 100 ccm Wasser auf. Nach vollständiger Lösung der beiden Ansätze werden beide miteinander vermischt (nach *Chamberlain*). Zum Färben verdünnt man zweckmäßig die Stammlösung mit dem gleichen Volumen Wasser.

FX Beliebig, außer Formalin.
Formalinmaterial muß wenigstens 2 Stunden mit 1 %iger Chromsäure gebeizt werden.

DA Für Kernfärbungen benötigt man 3-8 Stunden.
Histologische Gewebefärbungen benötigen mindestens 24 Stunden.

DF HCl-Alkohol

BZ
Nicht nötig, da meistens auf Metallsalzbasis beim Fixieren oder Nachbehandeln gefärbt. Sonst Tannin-Brechweinstein, Phosphormolybdänsäure oder Phosphorwolframsäure.

BM
Die Safraninfärbung gelingt nach Paraffineinbettung sehr schlecht.

Safraninfärbungen sind schlecht zu differenzieren, wenn die Objekte mit Brennspiritus in Berührung kamen. Wird Safranin als zweite Farbe nach einer *Becher*-Farbe gebraucht, so wird zweckmäßig mit wässriger Essigsäure differenziert.

Lichtgrün, zu 0,5% in Alkohol gelöst, treibt das Safranin aus unverholzten Stellen schnell aus. Auch bei Farnen und Bärlappen tritt eine Differenzierung der Gewebe auf. Man spült kurz mit Isopropylalkohol (nicht Ethylalkohol) ab und kann dann über Terpineol in Caedax einbetten.

Vorschriften für saure organische Farbstoffe

§ 108. Anilinblau wasserlöslich. Man löst 1 g Anilinblau in 100 ccm Wasser auf.

FX Beliebig

DA Man färbt 10-20 Minuten.
Bei zu rascher Färbung verdünnt man zweckmäßig die Lösung mit gleichen Teilen Wasser.

DF Alkohol, wenn nötig etwas alkalisch gemachter Alkohol.
Säuren machen die Färbung beständiger.

BZ Anilinblau ist eine saure Farbe mit schwach basischen Eigenschaften,
es läßt sich daher mit Phosphormolybdänsäure fixieren. Aus demselben Grunde färbt Anilinblau auch Zellkerne.

BM
Anilinblau färbt Kallose, einen Stoff, der nur in den Siebröhren der Phanerogamen vorkommt. Anilinblau ist Bestandteil der Spezialfärbung für pflanzliche Sexualzellen nach *H.Sieben.*

§ 109. A1izarinrot S. Man löst 5 g Alizarinrot S in 100 ccm heißem Wasser auf und filtriert nach dem Erkalten.

FX Färbt nur nach chromhaItigen Fixiermitteln gut.
Nach anderen Fixiermitteln ist die Färbung launisch, daher mit Chromalaun vorbeizen. Bei vorausgegangener Färbung mit dem *Becher*-Farbstoff Alizarinviridin färbt Alizarinrot nach allen Fixiermitteln, da diese Farbe Chromalaun enthält.

DA 2-24 Stunden. Überfärbung tritt nicht ein.
Nach dem Färben gründlich auswaschen in Leitungswasser, wobei erst der schöne rote Farbton erscheint.

BZ Wenn die Färbung ohne Chromvorbeizung gelang, muß mit Chromalaun nachgebeizt werden

ES Haltbar in allen Medien

BM
Färbt Plasma und Chromatophoren rot.

§ 110. Azokarmin B. Man löst 1 g Azokarmin B in 100 ccm Wasser durch leichtes Erwärmen auf und setzt 1 ccm Eisessig zu. Die Lösung ist gut haltbar.

FX
Färbt nur nach Fixierung mit Chromsäure oder Chromessigsäure. Nach anderen Fixiermitteln ist mit 1 %iger Chromsäure vorzubeizen (1 Stunde).

DA 1-2 Stunden in der unverdünnten Lösung.

DF
Die Azokarminfärbung kann mit vielen aromatischen Basen differenziert werden, so mit Anilinöl, Pyridin, Chinolin und Paraphenylendiamin. Man differenziert mit 20 %igem Alkohol, dem einige Tropfen Anilin pur. zugesetzt sind. Nach meinen Erfahrungen genügt der Pyridingehalt des Brennspiritus vollauf zum Differenzieren. Man kann daher reinen Brennspiritus verwenden. Die Differenzierung kann unterbrochen werden mit 96%igem Alkohol, der mit Essigsäure angesäuert ist.

ES Nur in Harzen, Glycerin zieht die Färbung in wenigen Stunden aus.

BM
Der Farbstoff färbt Kerne und Plasma, ähnlich dem Anilinblau. Spezialfarbstoff für Blaualgen und Rotalgen. Azokarmin färbt Zelloidin an, läßt sich aber mit Alkohol auswaschen.

§ 111. Benzoazurin und Benzopurpurin. Das blaue Benzoazurin und das rote Benzopurpurin werden in gleicher Weise verwendet. Man löst in 100ccm heißem Wasser zuerst 20g Glaubersalz oder Soda auf und dann so viel Farbstoff wie sich löst. Die Farben sind schwer löslich. Man filtriert durch Glaswolle oder läßt 3 bis 4 Tage lang absetzen.

FX Beliebig

DA Man färbt 1-2 Tage und spült schnell mit Wasser ab.

DF Wenn überhaupt nötig, vorsichtig mit Brunnenwasser

BZ
Die Färbungen müssen unbedingt mit 0,5 %igem Kupferacetat gebeizt werden (20 Minuten).

BM
Benzoazurin färbt Zellulose blau bis blauschwarz, das Benzopurpurin rot. Am besten verwendet man ein Gemisch beider Lösungen zu gleichen Teilen, das sehr häufig verschieden inkrustierte Zellulose verschieden färbt, so daß z.B. Gefäßbündel bei höheren Kryptogamen gegen das Grundgewebe kontrastieren. Die beiden Farbstoffe sind typische Membranfarbstoffe.

§ 112. Eosin - Jodeosin - Erythrosin. Diese drei Farbstoffe sind chemisch sehr ähnlich; sie werden daher alle drei nach gleicher Vorschrift verwandt. Von dem Eosin wird hauptsächlich das sogenannte wasserlösliche gelbe Eosin gebraucht.

Vorschrift I. Man löst 1g Farbstoff in 100 ccm Wasser auf.

FX Beliebig
DF Verdünnter Alkohol ohne Salzsäurezusatz
BZ l% ige Lösungen von Bleisalzen (Bleinitrat, Bleiformiat)
ES Am besten in Harzen, Einschluß in Zuckermedien möglich
BM

Eosin färbt Zellwände und Zellplasma. Jodeosin und Erythrosin werden bei Algenfärbungen angewendet. Eosin wird durch tertiären Butylalkohol nicht ausgezogen.

Vorschrift II. Jodwasser-Eosin nach *Palla* (36).

a) Eosin oder Methyleosin statt in Wasser in Jodwasser aufgelöst, wird zu diagnostischen Färbungen lebender niederer Pflanzen verwandt. Jodwasser wird vorrätig gehalten. In eine Glasstöpselflasche mit Aqua dest. wirft man einige Jodkristalle. Das Jodwasser-Eosin stellt man am besten jedesmal frisch her.
b) Man kann auch so verfahren, daß man mit Jodwasser fixiert und unausgewaschen mit Eosinlösung färbt. Zellkerne, Pyrenoide und Karyoide bei Algen färben sich zeitlich vor den Chromatophoren.

(36) E.Palla, Berichte Deutsche botanische Gesellschaft; Bd. XII, 1894, S.134

§ 113. Kongorot. Man löst 1 g Kongorot in 75 ccm Wasser und gibt noch 25 ccm Alkohol hinzu. Kongorot wird bereits durch Säurespuren blau gefärbt.

FX Beliebig
DA

5-10 Minuten. Tritt ein Umschlag nach Blau auf, so ist der Farblösung 1 oder 2 Tropfen Ammoniak zuzusetzen.

DF

Ist bei der Säureempfindlichkeit schlecht durchzuführen. Man färbt entweder mit verdünnten Lösungen und vermeidet damit eine Überfärbung oder man überwacht den Färbeprozeß genau.

BZ Mit l %igem Kupferacetat wie Benzoazurin
BM

Kongorot färbt Plasma und verschiedene Membranen (Zellulose, Pilzmycelien) rot. Pilzmycelien werden auch in den Geweben höherer Pflanzen gefärbt. Kongorot färbt auch Chromoplasten.

§ 114. Lichtgrün SF. Man löst 0,5 g Lichtgrün SF in 100 ccm heißem Wasser auf.

FX Beliebig
DA 5-10 Minuten
DF HCl-A1kohol
BZ

Mit Kalzium- oder Bariumchlorid. Da Lichtgrün nicht von Isopropanol ausgezogen wird, erübrigt sich das Beizen bei dessen Verwendung.

BM

Lichtgrün ist ein beliebter Plasmafarbstoff zur Nachfärbung bei Karmin, Safranin, auch nach Goldimprägnationen. Lichtgrün färbt auch Zellulose (siehe Sa-

franin). Lichtgrün wird in alkoholischen Lösungen zur Algenfärbung und zur Färbung von Pilzhyphen gebraucht. Lichtgrün färbt Zelloidin unauswaschbar und stark an.

§ 115. Naphtholschwarz. Man löst 1 g Naphtholschwarz in 100 ccm Wasser auf. Nach dem Erkalten wird filtriert.

FX Beliebig
DA 5-10 Minuten
DF HCl-Alkohol
BZ unnötig, da in Alkohol schwer löslich
BM

Naphtholschwarz kann mit Orange-G simultan angewandt werden. Nach *Merkl* nimmt man l %ige wässerige Naphtholschwarzlösung und konzentrierte wässerige Orangelösung zu gleichen Raumteilen. Die Färbedauer ist 10 Minuten. Naphtholschwarz wird besonders als Nachfärbung nach Safranin empfohlen. In der zoologischen Technik wird es häufig mit Pikrinsäurelösung kombiniert angewandt.

§ 116. Nigrosin. Man löst 1 g Nigrosin in 100 ccm heißem Wasser auf.

FX

Beliebig, am besten nach pikrinsäurehaltigen Fixiermitteln und nach Pikrinsäure selbst

DA

Man versetzt 100-200 ccm Wasser mit 1-2 Tropfen obiger Stammlösung. Färbedauer ist dann 1-3 Stunden.

DF HCl-Alkohol
BM

Wird besonders für fadenförmige Algen und Pilze, auch für Diatomeen empfohlen. Vergleiche auch Pikro-Nigrosin. Die Färbung ist haltbar in Glycerin, Venetianer Terpentin und allen Harzen, nicht aber in Glyceringelatine. Nigrosin färbt Zelloidin stark an.

§ 117. Orange G. Man löst 0,1-0,5 g in 100 ccm heißem Wasser auf.

FX Beliebig
DA 1-5 Minuten
BZ Kalzium- oder Bariumchlorid
BM

Orange färbt Zelloidin nicht an. Die Färbung ist sehr lichtecht und eine der schönsten Plasmafärbungen. Orange wird von tertiärem Butylalkohol nicht ausgezogen.

[Dem heute erhältlichen Orange-G fehlen offenbar gerade diejenigen Verunreinigungen, welche die guten Färbeeigenschaften seinerzeit bewirkt haben. Die Färbung der Erythrocyten bei der in der Zoo-Histologie oft angewandten Azan-Färbung gelingt nicht mehr einwandfrei.]

§ 118. Orseillin BB. Man löst 0,25 g Orseillin BB in 100 ccm Wasser auf.

FX Beliebig
DA 10 Minuten bis 1 Stunde. Man kann auch über Nacht färben.
DF
Brunnenwasser, verdünnter Brennspiritus oder auch HCl-Alkohol. Die Differenzierung wird unterbrochen durch Wasser, Alkohol oder Isopropanol, wenn mit Essigsäure angesäuert worden sind.
ES Caedax
BM
Orseillin B B färbt Zelloidin nicht an.

§ 119. Pikrinsäure. Pikrinsäure ist als trockenes Pulver wie auch seine Salze explosiv. Wird daher in konzentrierter wässeriger Lösung oder in angefeuchtetem Zustand bezogen.

DA
Man färbt mit dem Entwässerungsalkohol, dem man einige Tropfen der konzentrierten wässerigen Lösung beigegeben hat. Überfärbung tritt leicht ein.
BM
Pikrinsäure ist als Plasmafärbung nur zu empfehlen bei vorausgegangenen basischen Farben, die mit Pikrinsäure einen Farblack geben, z.B. mit Fuchsin mit violetter Farbe, Methylviolett mit indigoblauer Farbe. Chinolinblau ist nicht geeignet.

Die Pikrinsäure findet in Form ihres Ammoniumsalzes oder als freie Säure Anwendung in Farbgemischen zur simultanen Mehrfachfärbung. Siehe Pikrokarmin-Anilinblau (*Hollborn*). Pikrinsäure färbt rein gelb, ihr Ammoniumsalz orange. Die reine Pikrinsäurefärbung ist als solche ausgezeichnet haltbar. Pikrinsäure als Plasmafarbe wird aber besser ersetzt durch andere gelbe Farben wie Orange G, Aurantia oder Anthrazengelb.

§ 120. Pyronin G. Man löst 1 g Pyronin in 100 ccm Wasser auf.

FX Beliebig
DA Wenige Minuten
DF Mit 30 %igem Alkohol oder Brennspiritus
BM
Die Schnitte werden schnell über Isopropanol oder besser über Butylalkohol-Ethylalkohol zu gleichen Teilen und dann über reinen Butylalkohol, anschließend Terpineol, in Caedax übergeführt. Pyronin hat einen sehr angenehmen Farbton.

§ 121. Säurefuchsin. Säurefuchsin ist eine der wichtigsten Farben. Für das Arbeiten mit diesem Farbstoff sind eine Reihe von Vorschriften bekannt geworden.

Vorschrift I. Man löst 0,2-1 g Säurefuchsin in 100 ccm Wasser auf.

Vorschrift II. Man löst in 100ccm heißem Wasser der Reihe nach auf:

Säurefuchsin	1 g
Eisessig	1 ccm
Phosphormolybdänsäure	1 g

Das Gemisch soll gute Haltbarkeit aufweisen. Ich empfehle jedoch, die Farbe kurz vor Gebrauch herzustellen.

Vorschrift III. Vorschrift nach *Erös*: Man löst in 100 ccm Wasser 1 g Säurefuchsin und soviel Kalialaun wie sich löst (etwa 10-12 g).

Vorschrift IV. Vorschrift nach *Seki*: Man löst 5 g Säurefuchsin in 100 ccm 5 %iger Karbolsäurelösung auf.

Alle Farblösungen können auch heiß angewandt werden, falls die Objekte sich schlecht anfärben. Im allgemeinen wird man mit Vorschrift I sein Auslangen finden.

FX Beliebig
DA 5-10 Minuten
DF
Überfärbungen werden schon durch destilliertes Wasser korrigiert. Unterbrochen wird das Differenzieren durch Wasser oder Alkohol, dem einige Tropfen Essigsäure zugefügt sind.
ES
Nur in Caedax oder anderen Harzen. Manche Autoren empfehlen, dem Harz einen Splitter Salizylsäure beizufügen, um die Haltbarkeit zu erhöhen. Nach meiner Erfahrung ist dies unnötig, wenn das Objekt durch Wasser und Alkohol geführt worden war, die einen Essigsäurezusatz aufwiesen. Die Färbung ist aber auch zu beizen, und zwar entweder mit 1 %iger Phosphormolybdänsäure oder einer 1 %igen Lösung eines wasserlöslichen Zinnsalzes (Zinn-II-chlorid).
BM
Alle Farblösungen können lange aufbewahrt werden.

Vorschriften für Beizenfarbstoffe

§ 122. Alle Beizenfarbstoffe sind saure Farbstoffe. Durch die Verbindung mit einer basischen Beize erhalten sie die Eigenschaften einer basischen Farbe. Der entstehende färbende Farblack ist basisch. Die Beizenfarbstoffe gestatten haltbare und reine Kernfärbungen oder Kern- und Plasmafärbungen, je nach dem Arbeitsgang. Dabei sind die einzelnen Zell- oder Gewebsbestandteile schön differenziert.

Die Beize wird bei den Beizenfarbstoffen in der Mehrzahl der Arbeitsvorschriften mit der Farbe vereint zu einem Farblack angewandt. Als Beizen kommen nur Metallsalze zur Verwendung, und zwar Salze des Aluminiums, Chroms, Eisens und des Berylliums. Auch Borax findet vereinzelt Anwendung.

Als Beizenfarbstoffe werden verwendet: Karmin, Hämatoxylin, Kernechtrot und verschiedene weitere künstliche Farbstoffe, die sogenannten *Becher*-Farben.

Färbungen mit Karmin

Vorschriften unter Verwendung von Cochenille und Karmin

§ 123. Alaun-Cochenille nach *Chamberlain*. Die Farblösung hat folgende Zusammensetzung:

Gepulverte Cochenille	50 g
Kalialaun	5 g
Dest.Wasser	500 ccm

Man löst zuerst den Alaun in Wasser und kocht unter Zufügen der gepulverten Cochenille bis auf 2/3 der Menge ein und filtriert dann ab. Karbolzusatz verhindert Schimmeln. Diese Vorschrift wird deshalb gebracht, weil sie nur noch selten erwähnt wird und die Färbeergebnisse gleich schön sind in der Stückfärbung wie in der Schnittfärbung.

§ 124. Alaunkarmin, wässrig nach *Grennacher*. Man kocht 1/2 bis 1 g Karmin *Merck* in 100 ccm 5 %iger wässriger Alaunlösung etwa 20 Minuten lang und filtriert nach dem Erkalten. Es kann Kalialaun oder Ammoniumalaun genommen werden. Karbolzusatz.

FX

Alle Karminfärbungen gelingen am schönsten nach Fixierungen, die Quecksilber enthalten. Das sich bildende karminsaure Quecksilber hat eine schöne feurige Farbe.

Die Färbungen gelingen auch nach Fixierungen mit Pikrinsäure, nach den Flemmingschen Gemischen und manchmal auch nach Formalin.

DA

Für Schnittfärbung rechnet man 2-4 Stunden. Überfärben tritt nicht ein, deshalb können die Objekte unbedenklich auch länger in der Farbe verbleiben. Dieses Karmin färbt auch unverholzte Zellmembranen. Für Stückfärbung benötigt man 2 Tage. Dann Auswaschen.

DF Fällt weg, da eine reine Kernfärbung resultiert.

BM

Diese Vorschrift wird viel gebraucht, da sie im Gegensatz zu den Boraxkarminen nicht überfärbt und eine reine Kernfärbung liefert. Notfalls kann an den Schnitten mit dem bekannten HCl-Alkohol die Differenzierung vorgenommen werden.

§125. Boraxkarmin, alkoholisch nach *Grennacher*.

Vorschrift I. Man löst 4-5 g des fertigen Farbgemisches von *Grübler* (*Leipzig*) in 100 ccm kochenden Wassers und filtriert, bis die Lösung klar abläuft. Hierauf fügt man nach dem Erkalten 100 g Alkohol (96 %ig) hinzu.

Vorschrift II. Man löst in 100 ccm destilliertem Wasser 4 g Borax und 3 g Karmin *Merck* auf. Das Borax wird im Wasser gelöst und dann erhitzt. Nach dem Erhitzen löst sich auch das zugesetzte Karmin auf. Abkühlen. Zusatz von 100 ccm 90 %igem Alkohol.

Die Stücke kommen aus 50 %igem Alkohol in die Farblösung. Dauer der Stückfärbung 2 Tage. Hernach ohne Waschen zum Differenzieren sofort in 70 %igen Alkohol mit 0,5-1% Salzsäure. Diese Färbevorschrift wird fast nur für Stückfärbung benützt. Boraxkarmin färbt Kerne tiefrot und die übrigen Zellbestandteile schwächer rot.

§ 126. Methylkarmin, alkoholisch nach *Schwarz*. In neuer Zeit führen manche Autoren darüber Klage, daß die Karminfärbungen früher mit den damals unreineren Karminsorten besser gewesen seien als heutzutage. Besonders wird die Durchdringungsfähigkeit der Farbstoffe bei Stückfärbung heute als kleiner angesehen wie ehedem.

Fritz Schwarz (Zeitschrift f. wissenschaftliche Mikroskopie Bd.50, Heft 3) hat für die heute erhältlichen Karminsorten eine Vorschrift zur Stückfärbung bekanntgegeben, die stärker, jedoch sonst in gleicher Weise färbt wie *Grennachers* alkoholisches Boraxkarmin und besonders für die neueren Karminsorten ausgearbeitet worden ist. Vorschrift:

Destilliertes Wasser	200 ccm
Borax	4 g
Karmin *Merck*	4 g

Die Mischung wird mindestens eine volle Stunde lang gekocht. Nach *Schwarz* ist diese lange Kochdauer wesentlich für die Güte der Farbe. Dabei verdampft das Wasser bis auf 50 ccm. Noch während des Kochens füllt man mit destilliertem Wasser auf 100 ccm auf und läßt dann langsam abkühlen. Die noch etwas warme Mischung wird unter Umschwenken nach und nach in kleinen Portionen mit 100 ccm absolutem Methylalkohol versetzt. Abkühlen. Nach 24 Stunden filtrieren. Es darf sich kein nennenswerter Rückstand zeigen. Fixieren der Objekte, Färben

wie *Grennachers* Boraxkarmin. Differenzieren der Stücke mit 50 %igem Alkohol, der 0,5-1 ccm Salzsäure enthält. Dauer des Differenzierens 1-2 Tage.

Geeignet für Stücke bis 1 cm im Durchmesser. Die geeignete Schnittdicke ist 15-40µ.

§ 127. Chromalaunkarmin nach *Fyg*. Man löst in 100ccm heißem Wasser zuerst 6g Chromalaun. Nachdem die Lösung vollständig ist, gibt man 1g Karmin *Merck* hinzu und kocht 15 Minuten. Filtrieren nach dem Erkalten. Karbolzusatz.

FX
: Quecksilberhaltige Fixiermittel, Pikrinsäure. Ungeeignet sind *Flemmingsche* Gemische und andere chromhaltige Fixiermittel.

DA 1/2 Stunde bis 24 Stunden

DF Wenn nötig, 0,5% iger HCl-Alkohol. Überfärbung tritt selten ein.

ES Caedax

BM
: Kernfärbung für Schnitte. Für Stückfärbung weniger geeignet. Die Färbung ist eine scharfe, schwarzblaue Kernfärbung, das übrige Gewebe schwach blauviolett. Als Nachfärbung wird von *Fyg* besonders Säurefuchsin-Pikrinsäure empfohlen.

§ 128. Muzikarmin. Muzikarmin wird am besten gebrauchsfertig bezogen. Selbstherstellung möglich, wenn auch umständlich. 1g Karmin *Merck* wird mit 0,5g Aluminiumchlorid und 2ccm destilliertem Wasser gemischt und über kleiner Flamme 2 Minuten erhitzt, bis das Ganze recht dunkel geworden ist. Hierauf setzt man langsam unter Umrühren 100ccm 50%igen Alkohol zu. Diese Stammlösung ist haltbar.

Färben: Zum Gebrauch wird eine 10%ige Lösung in Wasser hergestellt,

DA 2-12 Stunden.

BM
: Spezialfarbe für Schleime und Gallerten. Besonders schön für Niglitineinschluß nach *Eckert* als Gegenfarbe für grüne und blaue *Becher*-Farben-Vorschriften unter Verwendung von Karminsäure

§ 129. Karmalaun nach *P. Mayer*. In heißem destillierten Wasser in der Menge von 200 ccm werden gelöst: 10 g Kalialaun und 1 g Karminsäure *Merck*. Nach dem Erkalten wird filtriert und 1ccm Formol oder etwas Karbol zugesetzt. Ältere Lösungen sind vor Gebrauch zu filtrieren.

FX Beliebig. Die Farbe färbt nach allen Fixierungen.

DA
: Die Färbedauer muß in jedem einzelnen Falle ausprobiert werden. Sie differiert von 10 Minuten bis 6 Stunden. Färbung nur für Schnitte. Stückfärbung siehe Eisenalaunkarmin nach *de Grot*.

§ 130. Eisenalaunkarmin nach *de Grot*. Zu 200 ccm Karmalaun, der in § 129 angeführten Vorschrift *ohne Karbolzusatz* gibt man 0,1 g Eisenalaunpulver und 2 Tropfen Salzsäure sowie einen Thymolkristall.

FX Beliebig

DA
: Besonders für Stückfärbung geeignet. Färbedauer 2 Tage mit nachfolgendem ebenso langem Auswaschen in Wasser.

DF
: Im allgemeinen nicht nötig. Sonst mit l %iger Kalialaunlösung oder 0,5 %iger wässriger Salzsäure möglich.

BM

Schnittfärbung ist natürlich auch mit Eisenalaunkarmin nach *de Grot* möglich. Für Schnittfärbung wird zweckmäßig die Farbe mit 4 Raumteilen einer 5% igen Kalialaunlösung verdünnt. Färbedauer dann 1/2 bis einige Stunden. Plasmanachfärbung mit Lichtgrün SF .

§ 131. Parakarmin nach *P.Mayer* (alkoholisch). Unter Erwärmen auf dem Wasserbade (Vorsicht!) wird folgende Lösung angefertigt:

70%iger Alkohol	100 ccm
Aluminiumchlorid	0,5 g
Kalziumchlorid	4,0 g
Karminsäure *Merck*	1,0 g

Nach dem Erkalten filtriert man. Die Lösung ist lange haltbar. Fixierung: siehe § 124 Alaunkarmin nach *Grennacher*. Färbung: Schnittfärbung und Stückfärbung werden mit der gleichen Farbe durchgeführt. Auswaschen mit 70 %igem Alkohol.

DF

Differenzierung wird erreicht, wenn mit alkoholischer Aluminiumchloridlösung oder essigsaurem Alkohol ausgewaschen wird. (2-5 Tropfen Eisessig auf 100 ccm Alkohol).

BM

Karmalaun und Parakarmin färben nur Objekte, die nicht alkalisch reagieren.

§ 132. Karminessigsäure nach *Schneider*. Die Karminessigsäure nach *Schneider* wird für diagnostische Schnellfärbungen gebraucht vor allem an cytologischem Material. Die Objekte werden lebend in heiße Karminessigsäure gebracht. In kochender 45 %iger Essigsäure löst man gepulvertes Karmin *Merck* bis zur Sättigung auf, läßt erkalten und filtriert. Wird heiß angewandt. Die Färbung ist jedoch nur einige Tage haltbar. Nach *Zacharia*s können Färbungen damit mit 1 %igem Ferriammoniumsulfat geschwärzt und etwas haltbarer gemacht werden.

Karminessigsäure kann auch mit Karminsäure angefertigt werden, wenn etwas Aluminiumchlorid und Kalziumchlorid zugefügt wird.

§ 133. Schlußbemerkungen zu den Karminfärbungen. Die Zeit der bevorzugten Verwendung von Karminfärbungen ist vorüber. Sie sind durch die Hämatoxylinfärbungen und teilweise auch durch die *Becher*-Farben verdrängt worden. Dem Anfänger seien sie trotzdem warm empfohlen, weil sie sehr sicher im Erfolg und einfach in der Anwendung sind, besonders bei der Stückfärbung. Nach dem Schneiden kann - ebenso natürlich auch bei Totalpräparaten wie Algen und Pilzen - das Plasma mit Lichtgrün FS oder mit Anilinblau gegengefärbt werden. Die Verbindung der Karmine mit Pikrinsäure hat sich nicht recht bewährt. Jedenfalls sind deren Erfolge umstritten. Arbeitsvorschriften über Pikrokarmine siehe bei *Straßburger*! Wässriges Boraxkarmin mazeriert, es ist deshalb hier nicht aufgenommen worden.

Für Zelloidineinbettung ist Stückfärbung anzuwenden. Eine Schnittfärbung ist nur nach Auflösung des Zelloidins durchzuführen. Alle Karmine färben Zelloidin stark an.

Karminfärbungen werden schokoladenbraun, wenn sie längere Zeit mit Brennspiritus in Berührung kommen. Man kann also nicht den HCl-Alkohol zum Differenzieren mit Brennspiritus ansetzen. Die schokoladebraune Färbung ist überdies nicht so haltbar und unschön im Ton.

Färbungen mit Hämatoxylin

§ 134. Für das Färben mit Hämatoxylin sind im Laufe der Jahre recht viele Vorschriften veröffentlicht worden. Hier wird wieder nur eine Auswahl gebracht, und zwar wurden die einzelnen Lösungen so ausgesucht, daß jede der Vorschriften tatsächlich eine Farbe mit etwas anderen Eigenschaften ergibt. Überflüssig ist daher keine. Die Farblösungen für getrenntes Beizen und

Färben können recht gut selbst hergestellt werden. Die anderen Farblösungen bezieht man besser in gebrauchsfertigem Zustand von einer renommierten Firma.

[Hämatoxylin, der Extrakt des Blauholzbaumes, ist ein hellbraunes, alkohollösliches Pulver, das keinerlei Färbekraft besitzt. Durch Oxidation (Luft, NaJO3, Fe-III-Salze) geht es in Hämatein über, das den eigentlichen Farbstoff darstellt. Die natürliche Reifung durch Luft dauert einige Wochen, gewöhnlich oxidiert man mit 0,2 g NaJO3 pro 1 g Hämatoxylin, wobei ein Überschuß zu vermeiden ist. Aus diesem Grund nimmt man besser 0,2 g KJO3, das weniger wirksames Jodat enthält.

Die Färbung erfolgt stets in saurer Lösung, welche ein Beizensalz enthält. Hierbei beladen sich die Schnitte mit Hämatein, erscheinen jedoch auch nach der Färbung noch ziemlich farblos, da sich der eigentliche Farbstoff erst im alkalischen Milieu bildet.

Aus diesem Grunde schließt sich an die Färbung grundsätzlich ein gründliches Wässern in Leitungswasser an (Bläuen der Schnitte), wobei der tiefviolette Farbstoff entsteht. Destilliertes Wasser oder Regenwasser können nicht zur Bläuung verwendet werden, auch sehr weiches Wasser ist ungeeignet. Notfalls bläut man mit Wasser, dem man etwas Natriumhydrogencarbonat zugesetzt hat.

Eisenhaltige Färbelösungen färben schon in saurem Milieu tief schwarz, allerdings muß auch hier „gebläut“ werden, damit der Farbstoff in eine haltbare Form überführt wird.

Da bei allen Hämatoxylinfärbungen saure Lösungen zur Anwendung kommen, kann das nachträgliche Wässern gar nicht sorgfältig genug vorgenommen werden!

Die Hämatoxylinfärbung gehört zu den ältesten Methoden der Mikrotechnik. Wegen ihrer großen Haltbarkeit und den vielen Variationsmöglichkeiten zählt sie auch heute noch zu den Standardmethoden!

Gewöhnlich schließt sich an die Hämatoxylinfärbung eine Gegenfärbung mit einem sauren Farbstoff an.]

Verfahren mit getrenntem Beizen und Färben

§ 135. Eisenhämatoxylin nach *Heidenhain.* Zur Durchführung der Färbung benötigt man folgende zwei Lösungen:

1. Man fertigt zunächst eine 1,5% ige wässrige Lösung von Eisenalaun an. Die Kristalle dürfen nicht verwittert sein. Manche Autoren empfehlen, den Gehalt an Eisenalaun auf 2,5% zu steigern. Im allgemeinen ist dies nicht notwendig, wenn auch verdünntere Lösungen etwas langsamer wirken als die stärkeren. Die Eisenalaunlösung ist hält sich nur 3-4 Wochen.
2. Man löst 0,5 g Hämatoxylin in 100 ccm Wasser auf. Zuerst löst man das gepulverte Hämatoxylin in 10 ccm 96 %igem Alkohol auf und setzt nach vollkommener Lösung das Wasser zu. Diese Hämatoxylinlösung soll 3 Wochen lang reifen, d.h. das Hämatoxylin muß durch Sauerstoffaufnahme aus der Luft in Hämatein übergeführt werden. Zur Beschleunigung des Reifungsprozesses kann man auf 500 ccm Hämatoxylinlösung 0,2 g Natriumjodat (NaJO3) zusetzen. Zu 100 ccm der Hämatoxylinlösung also 0,04 g. Die Lösung reift dann in 24-28 Stunden. Dunkel oder gar schwarz gewordene Lösungen kann man nicht mehr benützen.

FX Am besten in quecksilberhaItigen Fixiermitteln

FB

Die Schnitte werden für 12-24 Stunden in der Eisenalaunlösung gebeizt. Kurzes Abspülen in Wasser. Hierauf erfolgt das Schwärzen in der Hämatoxylinlösung innerhalb einer Zeit von 12-24 Stunden. Abspülen in Leitungswasser.

DF

Mit ungebrauchter Eisenalaunlösung. Durch das Differenzieren werden nacheinander alle gefärbten Objektstellen wieder entfärbt, wenn man lange genug differenziert.

BM

Die Eisenhämatoxylinfärbung dient hauptsächlich zum Färben von Zellteilungsfiguren. Sie kann aber auch benützt werden, um die Gonidien der Algen, die Sporen der Ascomyceten usw. zur Darstellung zu bringen. Man hat nur das Differenzieren zu überwachen und im geeigneten Augenblick zu unterbrechen. An das Differenzieren schließt sich gründliches Auswaschen mit Wasser an. Ge-

färbt werden vor allem Kerne und Polkörperchen, achromatische Spindeln und manchmal die Zellgrenzen. Nachfärbung kann geschehen mit Lichtgrün, Bordeaux oder Säurefuchsin.

§ 136. Eisenhämatoxylin nach *Häggqvist* (37). Das Eisenhämatoxylin nach *Heidenhain* hat verschiedentliche Nachteile. Es ist an eine bestimmte Fixierung gebunden und die einzelnen Lösungen sind entweder wenig haltbar oder an bestimmte Reifestadien gebunden. Diese Nachteile vermeidet das Eisenhämatoxylin nach *Häggqvist*, das daher ganz besonders zu empfehlen ist. Man benötigt zwei Lösungen:

Lösung I: Dest. Wasser 100 ccm und Eisen-III-chlorid krist. 5 g

Lösung II: Dest. Wasser 100 ccm und Hämatoxylin 1 g

Die Eisenchloridlösung ist absolut haltbar. Die Hämatoxylinlösung ist sofort gebrauchsfertig. Frische Lösungen ergeben einen dunkelvioletten Farbton, ältere einen schwarzen.

FX Beliebig, die Färbung gelingt immer gut.

FB

Die Objekte werden 1 Stunde in der Eisenchloridlösung gebeizt. Nach Abspülen in destilliertem Wasser färbt man ebenfalls 1 Stunde in der Hämatoxylinlösung.

DF

Das Differenzieren geschieht entweder mit salzsaurem Alkohol oder aber mit 0,5 %iger wässriger Eisenchloridlösung, wobei die Kontrolle leichter ist als bei Anwendung des salzsauren Alkohols. Hernach gründliches Auswaschen in Wasser.

ES Nur in neutralen Harzen

BM

Die Methode ist für Zelloidinschnitte bestens geeignet, da das Zelloidin beim Differenzieren vollkommen entfärbt wird. Die Färbungen sind in viel kürzerer Zeit zu erzielen als bei der Eisenhämatoxylinfärbung nach *Heidenhain*.

(37) G.Häggqvist, Zeitschrift f. wissenschaftl. Mikroskopie 50, 1933, S.77

§ 137. Kupfer-Hämatoxylinfärbung nach *Benda*. Diese Färbung ist ausgearbeitet worden, um auch Objekte mit Chromfixierungen genau so färben zu können, wie es die Eisenhämatoxylinfärbung nach *Heidenhain* ermöglicht. Die Färbung ist eigentlich durch die Eisenhämatoxylinfärbung nach *Häggqvist* in gewissem Sinne überholt worden. Sie gestattet jedoch ein besonders langsames und sorgsames Differenzieren und deshalb wird sie in diesem Buche noch mit aufgeführt.

FX

Beliebig, die Färbung gelingt besonders nach Anwendung der beiden *Flemmingschen* Gemische und nach anderen chromhaItigen Fixiermitteln.

FB

1. Die Schnitte kommen für 48 Stunden in eine konzentrierte wässrige Lösung von Kupferacetat.
2. Hieran schließt sich ein Auswaschen.
3. Nach dem Auswaschen verbringt man die Schnitte in 1 %ige wässrige Hämatoxylinlösung bis zum völligen Schwarzwerden.

DF

Das Differenzieren nimmt man in folgender Lösung vor: Destilliertes Wasser 500 ccm, Salzsäure l ccm Hieran schließt sich erneutes Auswaschen an. Nach dem Auswaschen müssen die Schnitte mit frischer Lösung von Kupferacetat

gebläut werden. Dann endgültiges Auswaschen und weiteres Behandeln. Das Färbeergebnis ist wie bei den beiden Eisenhämatoxylinfärbungen.

ES Nur in neutralen Harzen.

Verfahren mit Beize und Farbstoff in einer Lösung

I. Ältere Vorschriften

§ 138. Hämatoxylin nach *Böhmer* (Alaunhämatoxylin). Die Hämatoxylinfärbung nach *Böhmer* wird vielfach der *Heidenhainschen* Eisenhämatoxylinfärbung vorgezogen. Sie ist jedenfalls sehr einfach auszuführen und leicht zu überwachen. Es gibt zwei Modifikationen:

Vorschrift I.

Lösung 1: Destilliertes Wasser 240 ccm und Kalialaun 1 g
Lösung 2: 96 %iger Alkohol 15 ccm und Hämatoxylin 1 g

Die Lösung 2 kann erst verwendet werden, wenn sie braun geworden ist.

FX Beliebig

FB

In ein Uhrschälchen gießt man zu einigen Kubikzentimetern der Lösung 1 einige Tropfen der Lösung 2. Die Objekte färben sich darin sehr rasch.

DF

Die Differenzierung erfolgt mit salzsaurem Alkohol. Dann Auswaschen und Nachbläuen mit ammoniakalischem Alkohol.

Vorschrift II.

Lösung 1: Alkohol abs. 10 ccm und Hämatoxylin 1 g
Lösung 2: Destilliertes Wasser 200 ccm und Kalialaun 20 g

Nachdem beide Lösungen 24 Stunden gestanden haben, mischt man sie miteinander. In offener Schale läßt man sie 8-10 Tage reifen und filtriert sie dann durch Glaswolle. Die Lösungen sind lange haltbar!

FX Beliebig
FB Die Schnitte färben sich innerhalb von 5-10 Minuten.
DF In salzsaurem Alkohol, dann Waschen und Bläuen.

§ 139. Hämatoxylin nach *Delafield*. Man benötigt zunächst folgende zwei Lösungen:

1. Destilliertes Wasser 100 ccm und Ammoniakalaun 15 g. Diese Lösung läßt man unter öfterern Umschütteln einige Tage stehen, bis sich eine gesättigte Lösung gebildet hat. Es bleibt dabei in der Flasche immer eine Menge ungelösten Alauns zurück. Abgießen, Filtrieren!
2. Absoluter Alkohol 6 ccm und Hämatoxylin 1 g

Das Hämatoxylin nach *Delafield* wird folgendermaßen hergestellt. Lösung 2 gießt man *tropfenweise* unter fortwährendem Umschütteln in Lösung 1. Die Mischung läßt man nun offen an der Luft und am Licht stehen, bis sie dunkel genug geworden ist. Das ist in der Regel in einer Woche der Fall. Nun werden noch 25 ccm Methylalkohol und 25 ccm reines Glycerin zugesetzt. Schließlich wird mit Glaswolle filtriert und die Farblösung in drei Flaschen von je 50 ccm abgefüllt. Es ist besonders darauf zu achten, daß die Korkstopfen gut schließen. In diesen Fla-

schen hat die Farblösung noch gut 2 Monate zu stehen, bevor sie gebrauchsfertig ist. In gut verschlossenen Flaschen ist die Farbe lange haltbar.

Chamberlain berichtet, daß er Hämatoxylin nach Delafield noch nach 20 Jahren voll gebrauchsfertig gefunden hat.

FX Am besten Alkohol abs.

FB

Die Färbedauer ist 5-10 Minuten. Hämatoxylin nach *Delafield* hat in der Botanik eine gewisse Berühmtheit erhalten. Es färbt Zellkerne, auch in stärkehaltigen Zellen. Es ist eine Spezialfärbung für Pektinstoffe. In Kombination mit Safranin ist es auch zur Untersuchung von Kernteilungsfiguren geeignet (*Straßburger*).

DF

Salzsaurer Alkohol. Nach dem Differenzieren muß mit etwas ammoniakalischem Alkohol die schöne purpurne Farbe wieder hergestellt werden. Zelloidin läßt sich beim Differenzieren völlig entfärben.

§ 140. Saures Hämatoxylin nach *Ehrlich*. Lösungsvorschrift: Man löst 2 g Hämatoxylin in 100 cm Alkohol auf. Hierauf werden 100 ccm destilliertes Wasser, 100 ccm Glycerin puriss., 10 ccm Eisessig und 3 g Kalialaun zugefügt. Das Gemisch wird mit Seidenpapier zugedeckt, um Verunreinigung durch Staub zu vermeiden, und 14 Tage in einer Schale zur Reifung bis zur dunkelroten Färbung stehen gelassen. Hierauf ist es gebrauchsfertig und in gut verkorkter Flasche jahrelang haltbar.

FX Beliebig
FB Man färbt 5-10 Minuten. Auswaschen mit 50 %igem Alkohol.
DF

Wenn nötig mit HCl-Alkohol. Überfärbung tritt fast nie ein. Nach dem Differenzieren Bläuen mit ammoniakalischem Alkohol.

BM Hämatoxylin nach *Ehrlich* färbt das Zelloidin überhaupt nicht an.

§ 141. Hämatoxylin nach *Hansen*. Herstellungsvorschrift:

1.	Absoluter Alkohol	10 ccm	und	Hämatoxylin	1 g
2.	Destilliertes Wasser	200 ccm	und	Kalialaun	20 g
3.	Destilliertes Wasser	16 ccm	und	Kaliumpermanganat	1 g

Nachdem die drei Lösungen 24 Stunden gestanden haben, mischt man Lösung 1 und Lösung 2 miteinander und gießt sie in eine Porzellanschale. In dieser Porzellanschale erwärmt man nun das Gemisch und unter stetem Erwärmen und stetem Umrühren gibt man tropfenweise 3 ccm der Lösung 3 zu. Ist dies geschehen, erwärmt man bis zum Aufkochen und läßt die Farbe 1/2 Minute sieden, kühlt dann *schnell* ab und filtriert durch Glaswolle. Die Farblösung ist sofort gebrauchsfertig.

FX Am besten Formalin
DA 5-10 Minuten
DF Mit salzsaurem Alkohol. Nachbläuen!

§ 142. Saures Hämalaun nach *P.Mayer*. In 100 ccm destilliertem Wasser werden 1 g Hämatoxylin gelöst, 5 g Kalialaun und 0,02g [ist 0,2 g gemeint?] Natriumjodat (NaJO3) gegeben. Nach völligem Lösen dieser Bestandteile gibt man 5 g Chloralhydrat und 0,1 g kristallisierte Zitronensäure zu. Die Lösung ist rotviolett und lange haltbar.

Grübler und *Hollborn* bringen auch fertige Mischungen in Pulverform in den Handel, die nur in der angegebenen Menge destillierten Wassers aufzulösen sind, um eine gute gebrauchsfertige Farblösung zu erhalten.

FX Beliebig, außer Formalin

FB

Die Schnitte kommen aus *destilliertem* Wasser in die Farblösung. Die Färbung erfolgt in 1-10 Minuten. Auswaschen in destilliertem Wasser. Übertragen in Leitungswasser, in dem der schöne blaue Ton erscheint. Zum Bläuen kann auch mit bestem Erfolg hier - wie bei allen Hämatoxylinfärbungen überhaupt - eine l %ige wässrige Lösung von Kupferacetat genommen werden.

DF

Wenn nötig, wird die Differenzierung vorgenommen entweder in 5 %iger Kalialaunlösung oder in HCl-Alkohol. Hiernach wieder Auswaschen und erneutes Bläuen.

§ 143. Glycerin-Alaun-Hämatein-Lösung nach *Rawitz*. In 100ccm destilliertem Wasser werden 0,5g Hämatein *(nicht Hämatoxy1in!)* gelöst. Das Lösen wird durch leichtes Erwärmen beschleunigt. In diese noch warme Lösung kommen 3 g Ammoniumalaun. Nach dem Erkalten fügt man noch 100 g Glycerin pur. hinzu.

FX Beliebig

FB

Die unverdünnte Lösung färbt innerhalb von 5 bis 20 Minuten. Die schönsten Färbungen erreicht man jedoch mit ganz verdünnten Lösungen. Man gibt auf 100ccm destilliertes Wasser 1-3 Tropfen der Farbe und färbt 24-48 Stunden. Durch die verdünnte Lösung wird Zelloidin nicht im geringsten angefärbt.

DF In 1 %igem HCl-Alkohol. Nachbläuen!

ES Neutrale Harze

BM

Für Kryptogamenfärbung wird die Glycerin-Alaun-Hämatein-Färbung nach *Rawitz* von keiner anderen Hämatoxylinfärbung an Güte der Färbung, Verlässlichkeit des Ergebnisses und Sicherheit der Überwachung erreicht. Notwendig ist nur eine einwandfreie Farbe, deren Güte wesentlich von dem verwendeten Alaun und Glycerin abhängt

II. Neuere Vorschriften

§ 144. Eisenhämatoxylin nach *Weigert*. Man benötigt zwei Lösungen:

1.	96 %iger Alkohol	100 ccm
	Hämatoxylin	1 g
2.	Destilliertes Wasser	95 ccm
	FeCl3-Lösung, offic.	4 ccm
	Salzsäure	1 ccm.

Diese beiden Teillösungen sind haltbar.

FX Beliebig, am besten jedoch Formalin.

FB

Unmittelbar vor Gebrauch mischt man Lösung 1 und Lösung 2 zu gleichen Teilen. Die Mischung ist tiefschwarz und nur wenige Stunden haltbar. Die Färbedauer ist kurz. Man kann aber beliebig lange färben, da ein Überfärben kaum eintritt. Eventuell nimmt man bei langsamer Färbung eine neue Farbmischung.

DF

Kaum nötig; wenn ja, mit salzsaurem Alkohol; hernach Auswaschen mit Wasser, Bläuen.

BM

Eisenhämatoxylin nach *Weigert* ergibt eine sehr reine Kernfärbung. Nachfärbung besonders mit Eosin oder Säurefuchsin (Rubin S).

§ 145. Molybdän-Hämatoxylin nach *Held*. Man löst 1 g Hämatoxylin in 100 ccm 70 %igem Alkohol auf und setzt dazu 2-3 Messerspitzen Molybdänsäure. Umschütteln! Es muß immer ein Überschuß von ungelöster Molybdänsäure vorhanden sein. Die Farblösung färbt frühestens 4 Wochen nach der Herstellung. Sie ist fast unbegrenzt haltbar und färbt mit den Jahren immer besser.

FX Beliebig.
FB

In 50 ccm destilliertes Wasser gibt man 2-4 Tropfen der Farblösung und färbt innerhalb 12-24 Stunden.

DF

Leitungswasser 10 Minuten bis mehrere Tage. Salzsaurer Alkohol wird nur in Ausnahmefällen angewendet werden müssen.

Färbungen mit künstlichen organischen Beizenfarbstoffen (*Becher-Farben*)

§ 146. Die natürlichen Beizenfarbstoffe Karmin und Hämatoxylin ergeben sehr schöne Färbungen. Vom Hämatoxylin kann man ohne Übertreibung sagen, daß es in der Histologie und Pathologie auch heute noch der meistgebrauchte Farbstoff ist. Die sogenannte H-E-Färbung (Hämatoxilin-Eosin) ist eigentlich ***die*** Färbung in den Laboratorien. Hämatoxylin und auch Karmin halten sich jedoch schlecht in Kanadabalsam und überhaupt nicht in Glyceringelatine, so daß wirkliche Dauerpräparate erst dann möglich wurden, als die *Behringwerke* ihr *Caedax* den Mikroskopikern schenkten.

Die Anilinfarben spielen nur in der Bakteriologie wirklich eine Rolle. In der Histologie, Zoologie und Botanik verwendet man sie weniger. Der Grund dafür ist vor allem der, daß die Beizenfarbstoffe viel schönere und prägnantere Kernfärbungen abgeben.

Becher hat nun in schönen und umfassenden Untersuchungen nach Beizenfarbstoffen gesucht, die Vorteile der natürlichen Beizenfarbstoffe hinsichtlich der Färbungsfähigkeit aufweisen und zugleich in allen Medien wirklich haltbar sind. Dieses Ziel hat *Becher* wirklich erreicht. Der Verfasser besitzt Algen, die mit Alizarin-Viridin nach *Becher* gefärbt, in Glyceringelatine eingeschlossen, sich bereits über 14 Jahre vollkommen unverändert gehalten haben. Färbungen mit künstlichen organischen Beizenfarbstoffen können tatsächlich in allen Medien eingeschlossen werden. Man kann daher bei ihrer Anwendung das Einschlußmedium nur nach den optischen Eigenschaften der Medien auswählen.

Für botanische Zwecke ist allerdings nur eine beschränkte Anzahl von künstlichen Beizenfarbstoffen verwendbar. Immerhin haben wir unter den Farben Rot, Grün und Blau verschiedene Nuancen zur Auswahl, und das reicht wirklich aus.

Die Färbungen können mit Farblacken in einem Arbeitsgang oder mit getrenntem Beizen und Färben erzielt werden. Die Farblacke überfärben nie, was ein weiterer Vorzug dieser Farbengruppe ist.

Verfahren mit getrenntem Beizen und Färben

§ 147. Naphthazarin und Naphthopurpurin. Naphthazarin ergibt eine schwarzblaue Färbung und Naphthopurpurin eine dunkelrote. Die Verarbeitungsweise ist bei beiden Farben die gleiche. Man benötigt folgende zwei Lösungen:

1. Destilliertes Wasser 100 ccm und Eisenalaun 1 g
2. Destilliertes Wasser 100 ccm und Naphthazarin oder Naphthopurpurin 1 g

FX Beliebig.
FB

Man beizt die Objekte 12-24 Stunden in Lösung 1. Dann schwenkt man ab und färbt in Lösung 2. Zelloidin färbt sich unauswaschbar an. Das Zelloidin wird daher zweckmäßig vorher entfernt. In der Farblösung bleiben die Objekte bis die gewünschte Färbung erreicht ist oder auch 24 Stunden.

DF

Bei diesem getrennten Verfahren ist in der Regel stärkeres Differenzieren notwendig. Dieses kann vorgenommen werden mit l0-20 %igem salzsaurem Alkohol, mit 5 %iger Phosphormolybdänsäure oder mit 5 %iger Phosphorwolframsäure. Phosphorwolframsäure verändert manchmal den Farbton. Hernach Auswaschen mit Wasser. Zu schwach ausgefallene Färbungen können - wie überhaupt alle *Becher*-Färbungen - mit einer 5 %igen wässrigen Lösung von Kobaltchlorid nachträglich dunkler gefärbt werden. Meistens resultiert ein dunkler blauer Farbton.

§ 148. Alizarinzyanin RR, Alizarindunkelgrün, Alizarinviridin. Diese drei Farbstoffe können nach gleicher Vorschrift angewendet werden. Man benötigt folgende zwei Lösungen:

1.	Destilliertes Wasser 100 ccm	und	Chromalaun	1 g
2.	Destilliertes Wasser 100 ccm	und	Alizarinzyanin	1 g

Statt Alizarinzyanin kann auch die gleiche Menge von Alizarindunkelgrün oder Alizarinviridin genommen werden.

FX Beliebig.
FB Wie oben bei Naphthazarin.
DF Wie oben bei Naphthazarin.

Diese von Becher empfohlenen regressiven Färbungen scheinen wenig gebräuchlich geworden zu sein, obwohl sie bei einiger Einarbeitung nur Gutes leisten. Sie sind besonders zu empfehlen bei Objekten, die sich mit den Farblacken nicht oder nur unwillig färben. Am meisten gebraucht werden wegen ihrer Einfachheit die Verfahren mit Beize und Farbe in einer Lösung.

Verfahren mit Beize und Farbstoff in einer Lösung

§ 149. A1izarinviridin nach *Becher*. Man löst in 100 ccm 5 %iger, kochender wässriger Chromalaunlösung so viel Farbstoff auf, wie sich lösen kann. Das sind ungefähr 0,5-1,0 g. Die Lösung läßt man wenigstens 5 Minuten lang tüchtig kochen. Einen Tag nach dem Abkühlen filtriert man ab. Die Lösung ist jahrelang haltbar. Bei älteren Lösungen kann erneutes Filtrieren notwendig werden, besonders, wenn sich reichlich Alizarinviridin aufgelöst hat.

FX Beliebig. Sehr geeignet ist das *Pfeiffersche* Gemisch.

Da

In der Originallösung färben sich die meisten Objekte in wenigen Stunden. In Farblösungen, die mit 2 bis 5 Teilen Wasser verdünnt wurden, dauert die Färbung bis zu 12 Stunden.

DF

Die Farblösung überfärbt nicht. Geringe Farbabschwächung tritt beim Passieren von Glycerin ohnehin ein, was man berücksichtigen muß, wenn in Glycerin oder in Glyceringelatine eingeschlossen werden soll.

BM

Alizarinviridin ist bei Kryptogamen als Universalfarbstoff anzusprechen. Es lassen sich fast alle Objekte damit färben. Zudem ist die Färbung ein sehr angenehmes Grün.

Es färben sich: Kerne, Kernkörperchen, Chromatophoren, Zellwände bei Farnen, Bärlappen. Totalfärbungen von Algen und niederen Pilzen sind möglich, ferner Gonidienfärbung bei Flechten.

Schleime und Gallerten bleiben ungefärbt. Zelloidin wird unauswaschbar angefärbt.

[An dieser Stelle sei eine Anmerkung zu den grünen Farbstoffen der Mikrotechnik gestattet.

Es ist leicht, Farbstoffe zu sythetisieren, welche blaues oder grünes Licht absorbieren und die dem entsprechend gelb oder rot aussehen (Komplementärfarbe). Dagegen nimmt die Zahl derjenigen Farbstoffe, die gelbes Licht absorbieren und die deshalb blau aussehen, schon deutlich ab, und Farbstoffe, die ausschließlich rotes Licht absorbieren und damit einen rein grünen Farbton besitzen, sind ganz selten.

Zudem läßt sich zeigen, daß bei Verschiebung des Absorptionsmaximums von blau über grün und gelb nach rot die Moleküle immer instabiler und damit zum Färben immer ungeeigneter werden, es sei denn, man stabilisiert z.B. durch die Bildung von Komplexen oder von Farblacken. Dem entsprechend werden in der Mikrotechnik nur vier grüne Farbstoffe verwendet: Methylgrün, Malachitgrün, Lichtgrün und Alizarinviridin, wobei nur Alizarinviridin, zusammen mit einer Beize angewendet, eine wirklich stabile Färbung ergibt.

Leider besitzen die genannten Farbstoffe alle einen unangenehmen Blaustich, was gerade bei der Nachfärbung von Algen stört. Bis heute ist es nicht gelungen, Farbstoffe aufzufinden, welche den leuchtend grünen Farbton vieler Algen nachahmen, und gelbgrüne Farbstoffe, die zum Nachfärben der Chrysophyceen geeignet wären, gibt es ebenfalls nicht. *Schömmers* Angaben über die Farbechtheit des Alizarinviridins sind korrekt - vom Farbton her ist auch dieser Farbstoff nur ein Notbehelf.]

§ 150. Säurealizarinblau nach *Becher*. Man löst in 100 ccm destilliertem Wasser 10 g Aluminiumsulfat und 0,5 g Säurealizarinblau auf. Die Lösung läßt man gut 10 Minuten kochen. Nach 24 Stunden wird filtriert.

FX Beliebig.

DA Die Lösung färbt die meisten Objekte in wenigen Stunden.

DF

Säurealizarinblau färbt Zelloidin an, das Zelloidin entfärbt sich jedoch beim Differenzieren.

Die 5 %ige Phosphormolybdänsäure stabilisiert beim Differenzieren die blaue Farbe. Die 5 %ige Phosphorwolframsäure verwandelt die blaue Farbe in rote Farbe um. Man kann daher mit Säurealizarinblau in Blau und in Rot färben.

BM

Für die weitere Behandlung der Objekte ist von Wichtigkeit, daß *schwacher* Alkohol die Farbe etwas auszieht, *hochprozentiger* nicht. Man hat daher etwas stärker zu färben, als die fertigen Präparate gefärbt sein sollen.

§ 151. Anthrazenblau nach *Becher*. Anthrazenblau nach *Becher* wird in zwei Formen in den Handel gebracht, als Anthrazenblau siccum und als Anthrazenblau WR extra in Teigform, neuerdings auch in Pulverform.

Vorschrift I

Destilliertes Wasser	100	ccm
Aluminiumsulfat	5	g
Antrazenblau, Teigform	0,5	g

Die Lösung läßt man 10 Minuten lang kochen, dann erkalten und filtriert nach 24 Stunden. Die Farblösung ist jahrelang haltbar.

FX Beliebig

DA Die Farblösung färbt in einigen Stunden.

DF

Wie bei allen *Becher-Farben*; Zelloidin wird von Anthrazenblau nach dieser Vorschrift kaum angefärbt.

Vorschrift II

Destilliertes Wasser	100	ccm
Aluminiumchlorid	5	g
Anthrazenblau sicc.	0,2	g

Die Mischung muß mindestens 10 Minuten kochen. Abkühlen lassen und nach 24 Stunden Filtrieren.

FX Beliebig
FB

Die Färbung dauert bei botanischen Objekten bis 24 Stunden. Anthrazenblau sicc. standardisiert färbt williger als Anthrazenblau WR extra, aber in einem rotstichigen Ton. Die Farbe nach dieser Vorschrift löst bei den Schnitten etwa vorhandene Kalziumoxalatkristalle auf, was auf den Gehalt an Aluminiumchlorid zurückzuführen ist.

Vorschrift III

Leunig (38) gibt an, daß der rotviolette Ton der Anthrazenblaufärbungen in einen dunklen schwarzblauen Ton umgewandelt werden kann. Für botanische Zwecke hat sich nach *Leunig* folgendes Verfahren bewährt:

Man nimmt von der Anthrazenblaulösung 10 Tropfen, von einer 3 %igen Eisenalaunlösung 1 Tropfen und vermischt beide in einem Uhrschälchen. Diese Mischung ist 2 Stunden brauchbar. Die Färbung wird innerhalb von 1-2 Stunden erreicht. Die Farblösung muß daher schon nach einer Stunde gewechselt werden, falls die Färbung nicht bereits genügend fortgeschritten ist. Bereits verdorbene Farbe bildet unlösliche Niederschläge in den Objekten. Nach der Färbung muß gründlich gespült werden. Bei Phanerogamenschnitten kann das Holz mit Safranin gegengefärbt werden.

(38) L.Leunig, Mikrokosmos XXIX, 1935/36

§ 152. Alizarinzyanin RR, Alizarinzyanin G. Beide Farbstoffe sind für botanische Zwecke sehr gut brauchbar. Herstellungsvorschrift:

Destilliertes Wasser	100	ccm
Aluminiumchlorid oder -sulfat	5	g
Alizarinzyanin	0,2	g

Die Mischung muß mindestens 10 Minuten kochen. Nach 24 Stunden wird abfiltriert.

FX Beliebig.
FB

Die beiden Farbstoffe färben schön blau. Die Sorte RR ist manchmal rotstichig, d.h. geht ins Violette. Alizarinzyanin ist empfindlich gegen Basen. Die Objekte müssen daher unter Umständen mit verdünnter Essigsäure vorbehandelt werden. Die Färbedauer ist schwankend. Sie umfaßt den Zeitraum von 5 Minuten bis einige Stunden, je nach dem Objekt. Alizarinzyanin gestattet ein nachträgliches Beizen in 1 %iger Chromsäure und gegenfärben mit Safranin.

§ 153. Gallein nach *Becher*. Herstellungsvorschrift:

Destilliertes Wasser	100	ccm
Kalialaun oder Aluminiumsulfat	5	g
Gallein	0,2	g

Die Mischung muß mindestens 10 Minuten kochen. Nach 24 Stunden wird abfiltriert. Die Farbe ist haltbar.

FX Beliebig.

FB

Die Farblösung färbt sehr rasch. Oft sind die Objekte bereits nach 10 Minuten vollkommen durchgefärbt. Die Kerne sind rot gefärbt, wie bei Karmalaun. Das Plasma ist schwach gefärbt. Die Plasmafärbung kann durch Differenzieren entfernt werden.

DF

Die Differenzierung ist bereits durch den Salzsäurealkohol üblicher Konzentration zu erreichen.

§ 154. Gallozyanin nach *Becher*. Herstellungsvorschrift:

Destilliertes Wasser	100	ccm
Chromalaun	5	g
Gallozyanin	0,15	g

Die Farblösung muß mindestens 10 Minuten kochen. Nach 24 Stunden filtrieren. Die Lösung ist nur etwa 1 Woche haltbar. Frisch hergestellte Lösungen färben am dankbarsten.

FX Beliebig.

FB

Gallozyanin färbt innerhalb von 24-48 Stunden das Chromatin tiefblau bis schwarz.

DF Wenn nötig, wie bei Säurealizarinblau.

§155. Naphthazarin nach *Becher*. Vorschrift:

Destilliertes Wasser	100	ccm
Aluminiumchlorid oder –sulfat	5	g
Naphthazarin	0,1	g

Die Mischung muß 5 Minuten lang kochen. Nach 24 Stunden wird filtriert.

FX Beliebig.

FB Die Färbung dauert 12-24 Stunden. Die Farbe ist tief schwarzblau.

DF Überfärben tritt nicht ein. Zelloidin wird angefärbt.

§ 156. Naphthopurpurin nach *Becher*. Vorschrift:

Destilliertes Wasser	100	ccm
Aluminiumchlorid oder –sulfat	5	g
Naphthopurpurin	0,3	g

Die Mischung muß 5 Minuten lang kochen. Nach 24 Stunden Wird filtriert.

FX Beliebig.
FB Die Färbung erfolgt in dunkelrotem Tone. Färbedauer 12-24 Stunden

§ 157. Kernechtrot (*Hollborn*) *stand. Bayer.* Vorschrift:

Destilliertes Wasser	100	ccm
Aluminiumsulfat	5	g
Kernechtrot	0,2	g

Die Mischung muß ungefähr 10 Minuten kochen. Nach 24 Stunden filtriert man ab.

FX
Kernechtrot färbt nach Chromessigsäure, Pikrinsäure und nach quecksilberhaltigen Fixiermitteln.
DA 2-3 Tage
DF Überfärbung tritt nicht ein
BM
Kernechtrot färbt Zellkerne, Chromatophoren und verholzte Zellwände, ferner Phanerogamen und einige Algen. Bei den meisten Kryptogamen versagt es. Empfehlenswerte Gegenfärbungen sind bei cytologischen Objekten: Anilinblau, bei histologischen Schnitten: Kernschwarz, Hämatoxylin.

Kapitel V

Die Praxis der mikroskopischen Färbetechnik

Färbungen in einer Farbe - sukzedane Mehrfachfärbungen

§ 158. Der Anfänger in der Mikroskopie hat zwei Ideale. Neben einer möglichst großen Vergrößerung wünscht er seine Präparate möglichst bunt gefärbt zu sehen. Hier gilt es jedoch, sich zu bescheiden. Man kann nicht Zellteilungen, Zellkerneinzelheiten, Membranstoffe, Fett, Eiweißkristalloide, Chlorophyll und was es sonst noch gibt in ein und demselben Objekt darstellen, womöglich dies alles noch mit einem einzigen Farbgemisch in einer einzigen Lösung!

Vor dem Färben eines Objektes muß daher vor allem Klarheit darüber herrschen, was färberisch dargestellt werden soll. Dabei - und erst recht bei der Farbenwahl - ist auf die chemische Eigenheit des Objektes und der Farben gebührende Rücksicht zu nehmen. Die in Auswahl stehenden Färbemöglichkeiten werden dadurch aus der theoretisch großen Mannigfaltigkeit sehr rasch auf einige wenige Möglichkeiten vermindert.

Die sichersten Ergebnisse erzielt der Anfänger mit den einfachen Färbungen durch natürliche und künstliche Beizenfarbstoffe. Färbungen mit Eisenalaunkarmin nach *de Grot*, mit Hämatoxylin nach *Delafield* oder dem sauren Hämalaun nach *P.Mayer* werden ebensowenig enttäuschen wie eine Färbung mit Alizarinviridin nach *Becher*. Bei den Beizenfarbstoffen werden dann alle Bestandteile der Objekte gefärbt sein. Wir finden die Kerne am stärksten gefärbt und die plasmatischen Bestandteile abgestuft in der gleichen Tönung.

Färbt sich das Plasma nicht mit - manche Farbvorschriften sind so ausgearbeitet worden, daß dies der Fall ist -, so kann durch eine einfache Gegenfärbung mit einer sauren Farbe der plasmatische Inhalt für sich in einer anderen Farbe gefärbt werden. Solche Färbungen, bei denen verschiedene Farbstoffe zeitlich nacheinander angewandt werden, nennt man *sukzedane Färbungen*. Diese sukzedanen Färbungen ergeben in der Regel bessere und sicherere Ergebnisse als die Färbungen mit gleichzeitiger Anwendung verschiedener Farben in einem Gemisch, den *Simultanfärbungen*.

In den Arbeitsvorschriften für die einfachen Farbauflösungen im vorausgegangenen Kapitel dieses Buches sind auch Zeiten für die Färbedauer angegeben. Diese Zeiten sind natürlich sehr veränderlich. Schon eine alte Farblösung färbt anders als eine frisch hergestellte, auch die einzelnen Objekte verhalten sich sehr verschieden, je nach chemischer Zusammensetzung, Aufbewahrungsalter, Fixation usw. Dünne Schnitte färben schneller durch als dicke. Sehr schöne Färbungen erhält man häufig durch die Anwendung ganz verdünnter Farblösungen bei Einhaltung entsprechend langer Färbezeiten.

Auf den folgenden Seiten werden nun verschiedene Mehrfachfärbungen besprochen. Vor diesen Ausführungen wird noch eine tabellarische Übersicht über die Färbungsmöglichkeiten für Kerne, für Plasma und für Membranen gebracht, dabei werden allerdings auch Darstellungsmöglichkeiten angegeben, die erst in einem späteren Kapitel geschildert werden können.

Bei allen Doppelfärbungen beginne man zuerst mit der Kernfarbe oder mit derjenigen Farbe, die den verholzten Teil zuerst färbt. Eine Ausnahme macht nur die Anwendung der *Becher-Farben*. Diese kommen stets zuerst. Mit Karmin und Hämatoxylin wird auch in der Regel zuerst gefärbt, diese Farbstoffe können aber je nachdem auch erst im zweiten Farbgang Anwendung finden.

Bei allen Färbungen liegt das Geheimnis des Erfolges in der individuellen Behandlung der Objekte. Eine rein mechanische Arbeitsweise – so zusagen nach Kochbuch - ist in der mikroskopischen Technik nicht am Platze. Damit soll natürlich nicht uferloses Experimentieren angeraten sein. Nicht ein Suchen neuer Arbeitsvorschriften, sondern ein Einarbeiten in die gegebenen Richtlinien wird dem Leser den Ausweg aus Mißerfolgen zeigen. Es ist auch nicht notwendig, alle Vorschriften durchzuarbeiten. Gerade am Anfang kommt man mit weiser Selbstbeschränkung am weitesten.

§ 159.

Übersicht über die wichtigsten Färbemöglichkeiten von Kernen, Plasma und Membranen

I. Kernfärbungen. Kerne färben sich mit allen denjenigen Farben, die Seide zu färben vermögen.

Der ruhende Kern. Direkte Färbung mit:

1. allen basischen organischen Farbstoffen
2. den basischen Farblacken der Beizenfarbstoffe (Karmin, Hämatoxylin, Brasilin, Kernechtrot, *Becher*-Farben)
3. einigen wenigen sauren Farbstoffen, die schwach basisch reagierende Gruppen aufweisen wie Anilinblau, Azokarmin
4. Metallimprägnationen (Goldimprägnation, Silberimprägnation, Imprägnation mit Schwefelblei und Osmiumsäure)
5. Indirekte Färbung mit sauren Farben unter gleichzeitiger Anwendung von Säurebeizen (Jod-Eosin nach *Palla*)
6. Nuklealreaktion nach *Feulgen*

Der sich teilende Kern.

Amitotische Teilung

Färbung wie der Ruhekern, außerdem mit Pikro-Nigrosin.

Mitotische Teilung:

1. Methylgrün-Essigsäure nach *Straßburger*
2. Karminessigsäure nach *Schneider*
3. Eisen-Hämatoxylin-Färbungen nach *Heidenhain, Häggqvist und Benda*
4. Safranin
5. *Flemmings* Dreifarbenverfahren
6. *Geidis* Dreifarbenverfahren
7. Vierfarbenfärbung nach *Johannsen*
8. Nuklealreaktion nach *Feulgen*

II. Plasmafärbungen. Das Plasma färbt sich mit allen Farstoffen, welche Wolle färben. Plasma färbt sich direkt:

1. mit allen sauren organischen Farben, vornehmlich den sauren Sulfofarben
2. mit allen Beizenfarbstoffen, wenn ein Farblack angewendet wird indirekt (invers)
3. mit basischen Farbstoffen nach Vorbeizung mit Tannin-Brechweinstein

III. Membranfärbungen. Die pflanzlichen Membranen färben sich mit den verschiedensten Farbstoffen. Ausschließliche Membranfarbstoffe existieren nicht.

Membranen der Phanerogamen

Zellulose färbt sich:

1. mit manchen Hämatoxylinen (*Held, Delafield, Hämalaun*), mit Muzikarmin und *Becher*-Farben
2. mit einigen sauren Anilinfarben wie Naphtholschwarz, Eosin und Anilinblau substantivisch, nach Metallbeize mit fast allen sauren Farben

3. mit Benzidinfarben wie Diaminblau, Kongorot, Benzopurpurin, Benzoazurin, Deltapurpurin in alkalischer Lösung substantiv
4. substantiv mit Bismarckbraun. Mit den anderen basischen Anilinfarben nach Beizung mit Tannin-Brechweinstein.
5. mit Kernschwarz, Tannin-Eisenchlorid

Verholzte Membranen färben sich:

1. mit basischen Anilinfarben wie Chrysoidin, Safranin, Brillantgrün, Gentianaviolett, Chinolinblau, Malachitgrün, Fuchsin
2. mit Pikrinsäure

Bemerkung: Wie zuerst *Kisser* nachgewiesen hat, gelingt die Färbung verholzter Membranen auch nach Entfernung des inkrustierten Holzstoffes. Der Holzstoff ist daher nicht Träger der Farbreaktion [?].

Verkorkte Membranen färben sich:

1. mit ammoniakalischem Gentianaviolett oder fast allen anderen basischen organischen Farbstoffen in ammoniakalischer Lösung.

Die gebräuchlichsten

Holz-Zellulose-Doppelfärbungen bei Phanerogamen sind folgende:

Farbstoffe		Holz	Zellulose
Auraviol nach *Geidies* (Simultanfärbung)		gelbrot	blaugrün
Alizarinviridin	Safranin	rot	grün
Anthrazenblau	Safranin	rot	blau
Chinolinblau	Säurefuchsin	blau	rot
Chrysoidin	Hämalaun	gelb	blau
Chrysoidin	Benzoazurin	gelb	blau
Fuchsin bas.	Kernschwarz	rot	schwarz
Fuchsin bas.	Hämalaun	rot	blau
Fuchsin bas.	Anilinblau	rot	blau
Malachitgrün	Benzopurpurin	grün	rot
Pikrinsäure	Nigrosin	gelb	blauschwarz
Pikrinsäure	Anilinblau	gelb	blau
Safranin	Lichtgrün	rot	grün
Safranin	Anilinblau	rot	blau
Safranin	Berliner Blau	rot	blau

Membranen der Kryptogamen

Membranen der Algen. Grünalgen, Armleuchteralgen und Meeresalgen färben sich mit:

1. den meisten basischen organischen Farben. Verwendung nur an Schnitten durch Flechten. An Totalpräparaten von Algen kann die Membran nicht gefärbt werden, da sonst der Zellinhalt nicht mehr sichtbar ist.
2. An Schnitten durch größere Algen, besonders durch saure Farben wie Anilinblau, Eosin, Säurefuchsin.

Membranen der Pilze.

Allgemeine Färbung mit:

1. Eisen-Tannin, Methylenblau und Lichtgrün SF

Kalloseähnliche Membranen und chitinähnliche Membranen färben sich mit

2. den meisten Benzidinfarbstoffen, mit Anilinblau, *Delafields* Hämatoxylin, mit manchen Eosinen, Orseillin BB, Rubin S, Säurefuchsin, nach den Methoden zur Färbung der säurefesten Bakterien

Memebranen der Flechten.

Gonidien färben sich:

1. mit basischen Anilinfarben, besonders mit Chinolinblau und Methylenblau
2. mit Säurefuchsin, Azokarmin B und Orseillin BB
3. mit Hämatoxylin nach *Ehrlich* und *Böhmer*, Alaun-Glycerin-Hämatein nach *Rawitz*, *Becher*-Farben
4. mit Eisenhämatoxylin nach *Häggqvist* und *Heidenhain*

Pilzhyphen

färben sich mit Pyronin. Pyronin färbt alle Membranen, ebenso Chrysoidin. Teilweise färben Orseillin BB, Azokarmin B, Säurefuchsin und Eosin, Erythrosin.

Membranen der Moose. Färbung nur an Schnitten möglich

1. mit Bismarckbraun
2. mit *Becher*-Farben, besonders Alizarinviridin
3. mit Safranin-Anilinblau und
4. Säurefuchsin-Jodgrün

Membranen der Farne. Farne, Bärlappe, Schachtelhalme, Wasserfarne.

Einfache Färbungen: Auraviol nach *Geidies*, Hämatoxylin nach *Held*, *Becher*-Farben, Safranin

Differenzierte Gefäßbündelfärbungen: *Delafields* Hämatoxylin-Safranin, Safranin-Anilinblau, Safranin-Lichtgrün, Magdalarot-Anilinblau

In den Tabellen werden die folgenden Abkürzungen verwendet:

FX Fixierung
FB Färbung
DA Färbedauer
DF Differenzierung
BZ Beizung
ES Einschluß
BM Bemerkung

Vorschriften für sukzedane Mehrfachfärbungen

I. Wässrige Farblösungen

§ 160. Hämatoxylin-Eosin. Diese Doppelfärbung ist in allen zweigen der Mikroskopie als die für allgemeine Zwecke leistungsfähigste, fast nie versagende Doppelfärbung, widerspruchlos anerkannt. Sie ist nicht geeignet für cytologische Studien. Für cytologische Studien ist die Eisenalaun-Hämatoxylin-Färbung unübertroffen.

FX

Formalin, Sublimat oder beliebig.

FB

1. Vorfärbung mit einer der Hämatoxylinfärbungen. Recht häufig wird Hämalaun nach *P.Mayer* genommen, auch Alaun-Glycerin-Hämatein nach *Rawitz* ist sehr zu empfehlen.
2. Differenzieren und Auswaschen.
3. Färben mit 1% iger Lösung von Eosin, auch Jodeosin oder Erythrosin
4. Auswaschen in Wasser.

ES

Überführen durch Azeton oder Butylalkohol in Terpineol, dann Xylol und Caedax.

BM

Zu beachten ist, daß nicht jede Hämatoxylinfärbung jedes Objekt gleich gut färbt. Dasselbe gilt bei den roten Farbstoffen. Aufschluß erteilen die Angaben im speziellen Teil des Buches bei den einzelnen Gruppen der Kryptogamen.

§ 161. Hämalaun-Safranin. Doppelfärbung für Holz-Zellulose-Darstellung.

FX Chromhaltige Fixiermittel oder Vorbeizen mit Chromsäure

FB

1. Färben der Schnitte 12 Stunden in Safranin.
2. Differenzieren in 1 %igem HC1-Alkohol, bis nur noch die verholzten Membranen gefärbt sind.
3. Auswaschen mit destilliertem Wasser.
4. Nachfärben mit Hämalaun.

§ 162. Hämalaun-Erythrosin-Orange nach *Mathis*. *J.Mathis* (39) gab folgende Dreifachfärbung bekannt:

FX Beliebig, am besten chromhaltige Fixiermittel

FB

1. Färben mit Hämalaun, Abspülen in Aqua dest.
2. Waschen mit Brunnenwasser.
3. Überfärben mit Erythrosin.
4. *Ohne zu Wässern* behandeln mit Orange-G-Lösung, und zwar 10 Tropfen gesättigte wässrige Orange-G-Lösung in 10 ccm 96 %igem Alkohol.

ES Abspülen in Alkohol, absolutem Alkohol, Terpineol, Caedax

(39) J.Mathis, Zeitschrift f. wissenschaftl. Mikroskopie 1938, 54, S.428

§ 163. *Delafields* Hämatoxylin-Safranin. *Chamberlain* empfiehlt diese Kombination besonders für Querschnitte aus frischem Material und Alkoholfixierung. Natürlich ist auch chromfi-

xiertes Material danach zu behandeln. Geeignet für Gefäßbündeldarstellungen, auch bei Farnen und Bärlappen.

FX Alkohol abs., chromhaltige Fixiermittel

FB

1. Safraninfärbung 24 Stunden.
2. Differenzierung der Safraninfärbung mit 50 %igem Alkohol oder salzsaurem Alkohol, bis sich die Rotfärbung auf die darzustellenden Objekte beschränkt.
3. Wässern, höchstens 5 Minuten.
4. *Delafields* Hämatoxylin 3-30 Minuten.
5. Wenn nötig differenzieren in 50 ccm Wasser mit 1 Tropfen Salzsäure
6. Bläuen in Brunnenwasser mit einigen Tropfen Salmiakgeist.

ES Alkoholreihe, Terpineol, Caedax.

§ 164. Malachitgrün-Kongorot.

FX

Beliebig. Frisch geschnittene Objekte werden in Alkohol fixiert und nach einer halben Stunde gleich in die Farblösungen gebracht.

FB

1. Wässerige Malachitgrünlösung für 6 Stunden oder über Nacht; Differenzieren.
2. Auswaschen und Beizen, erneutes Auswaschen.
3. Kongorotlösung 15 Minuten.
4. Auswaschen, beizen in Kupferacetat, auswaschen.

ES Alkoholreihe, Terpineol, Caedax

§ 165. Methylenblau-Eosin nach *Mallory*.

FX

Zenkersche Flüssigkeit. Manchmal gelingt die Färbung nach anderen Fixiermitteln bei Nachchromierung.

FB

Zur Durchführung der Färbung werden benötigt:

1. Eine 5 %ige wässerige Lösung von Eosin gelblich.
2. Folgende Methylenblaulösung:

Destilliertes Wasser	100 ccm
Methylenblau med.	1 g
Borax	1 g

Die Durchführung der Färbung geschieht nun folgendermaßen:

a) Färbung in der Eosinlösung für 20 Minuten bis einige Stunden.
b) Auswaschen in Wasser.
c) Methylenblaulösung 1 Teil mit 9 Teilen Wasser verdünnt für 30-60 Minuten, eventuell länger. Während dieser Zeit sollen die Objekte ab und zu bewegt werden.
d) Auswaschen mit Wasser.
e) Differenzieren mit 96 %igem Alkohol. Wenn das Differenzieren Schwierigkeiten macht, wird empfohlen, dem Alkohol einige Tropfen einer 10 %igen alkoholischen Lösung von Colophonium beizugeben.

ES Terpineol, Caedax

§ 166. Die Färbemethode nach *Gram* für Ausstriche. Diese Methode ist ausgearbeitet worden für die Zwecke der Bakterienfärbung. Mit dieser Gramfärbung können aber mehr Objekte dargestellt werden. Geeignet ist die Methode z.B. für die Darstellung der Mitosen, für Hefepilze und Strahlenpilze.

1. Fixieren der Ausstriche entweder durch Hitze über der Flamme oder mit Alkohol
2. Färbung mit 1 %iger Gentianaviolettlösung 20 Sekunden bis 2 Minuten. An Farbstoffen können statt Gentianaviolett alle Pararosanilinfarbstoffe sowie Jodgrün und Viktoriablau verwendet werden.
3. Ohne Wasserabspülung mit Jodjodkalilösung behandeln (Jod 1g, Kaliumjodid 2g, Wasser 300 ccm).
4. Entfärben mit Alkohol. Brennspiritus genügt. Abschwenken, bis keine Farbwolken mehr abgehen.
5. Nachfärben mit verdünntem Bismarckbraun oder mit Fuchsin.
6. Abspülen.
7. Entwässern durch Trocknen

§ 167. Die Färbemethode nach *Gram-Claudius* für Schnitte. Zur Durchführung der Färbung werden benötigt:

a) eine 1 %ige Gentianaviolettlösung in Wasser.
b) eine gesättigte Pikrinsäurelösung, die noch mit gleichen Teilen Wasser verdünnt wird.

FB

Die Färbung kann an Zelloidinschnitten erst nach Entfernung des Zelloidins ausgeführt werden.

1. Die Schnitte werden mit einer Karminfarbe vorgefärbt. *Claudius* schreibt in seiner Originalvorschrift Lithionkarmin vor. Lithionkarmin färbt aber botanische Objekte nicht oder schlecht. Man färbt daher mit einer anderen rotfärbenden Karminvorschrift (Parakarmin nach *P.Mayer*, Eisenalaunkarmin nach *de Grot* usw.).
2. Auswaschen.
3. Färben mit Gentianaviolett 2 Minuten, dann Abspülen mit Wasser.
4. Pikrinsäure 2 Minuten, dann Abspülen mit Wasser.
5. Abtrocknen des Schnittes mit Fließpapier.
6. Nelkenöl, abtupfen, eventuell Wiederholen usw.

ES Terpineol, Xylol, Caedax

BM

Diese Methode gestattet den Nachweis von Bakterien und Strahlenpilzen in Pilzgallen und in der Mykorhiza. Vergleiche auch: *Gram*-Simultanfärbung nach *Hollborn* mit Viktoriablau-Pyronin (§ 187)

§ 168. Safranin-Gentianaviolett-Orange (*Flemmings* Dreifachfärbung). Diese Färbung ist die berühmteste Färbung für das Studium der Zellkerne und ihrer Teilungsstadien.

FX

Am besten die *Flemmingschen* Gemische. Auch andere chromhaltige Fixierungen können verwandt werden. Andere Fixierungen verlangen eine Chrombeize mit 1 %iger Chromsäurelösung.

FB

1. Die Schnitte werden zuerst mit Safranin gefärbt. Wenn nötig, wird differenziert und in Aqua dest. übertragen.
2. Hierauf gelangen die Schnitte in 1 %ige wässrige Gentianaviolettlösung. Die Färbedauer schwankt zwischen 2 und 10 Minuten.
3. Abspülen in Leitungswasser und anschließend
4. Färbung mit Orange-G-Lösung 0,1 %ig für 5 Minuten.
5. Abspülen mit Wasser und Differenzieren des Gentianavioletts mit Alkohol. Geht hier beim Schwenken nicht genügend Farbe ab, so kommen die Schnitte in Nelkenöl, worin sie gegebenenfalls zu Ende differenziert werden können.

BM

Gelungene Präparate zeigen Chromosomen rot, die Spindelfasern bläulich und das Plasma gelbbraun. Nach *Straßburger* muß die Färbung hinsichtlich der Zeitspannen für die einzelnen Stufen für jedes Objekt ausprobiert werden. Darin liegt, wie *Geidies* (40) ausführt, ein großer Unsicherheitsfaktor. *Geidies* hat nun die Färbung abgeändert, indem er das Orange-G durch Lichtgrün ersetzt hat. Die Methode ist nun viel sicherer geworden, weil das Lichtgrün besser unter dem Mikroskop beobachtet werden kann.

(40) H.Geidies, *Praktische Mikroskopie*, Bd. XIII, 1935, S.159

§ 169. Safranin-Gentianaviolett-Lichtgrün nach *Geidies*.

FX Chromhaltige Fixiermittel.

FB

Ich bringe hier die Färbevorschrift nach der Originalschilderung von *Geidies*. Zur Verwendung kommen folgende Lösungen:

A. Safranin 2 g werden in 60 ccm 50 %igem Alkohol gelöst.
B. 1 %ige wässerige Gentianaviolettlösung.
C. Lichtgrün (*Standardisiert Bayer*) 0,5 g in 100 ccm 90 %gem Alkohol gelöst.

Die Arbeitsvorschrift ist nun folgende:

1. Färben mit Safranin 1/2-1 Stunde.
2. Abspülen mit Wasser.
3. Ohne Alkoholdifferenzierung Färben in Gentianaviolett 1-5 Minuten.
4. Abspülen in destilliertem Wasser.
5. Kurzes Entfärben in 96 %igem Alkohol.
6. Verbringen in die Lichtgrünlösung, etwa 30-60 Sekunden (unter Mikroskopkontrolle!), bis die rote Plasmafärbung verschwunden ist.
7. Abspülen und kurz Entwässern in 96 %igem Alkohol.
8. Aufhellen in Nelkenöl 1 Minute.
9. Abspülen in 96 %igem Alkohol

ES Terpineol, Caedax.

§ 170. Nachfärbungen nach *Becher*-Färbungen werden angewandt, um das Plasma besser hervortreten zu lassen oder um Kontrastfärbungen an Geweben herbeizuführen wie die Holz-Zellulose-Doppelfärbung.

Becher selbst empfiehlt die Nachfärbungen nach dunklen Kernfärbungen mit Alizarinrot S oder mit Säurefuchsin. Für Säurefuchsin gibt *Becher* eine ausführliche Anweisung. Man stellt sich nach ihm folgende Stammlösung her:

Pikrinsäurelösung, kalt ges.	1000 ccm
Säurefuchsinlösung 2%ig, wässrig	50 ccm.

Diese Mischung ist unbegrenzt haltbar.

Nach Vollendung der Kernfärbung mit den *Becher*-Farben färbt man nach mit:

Stammlösung	60 ccm
Essigsäure 2 %ig	0,3 ccm.

Die Färbedauer ist 5 Minuten. Auswaschen in Wasser, das mit etwas der oben angeführten Pikrinsäurelösung versetzt worden ist. Weiterhin angesäuerter Alkohol, dann Terpineol, Xylol und Caedax.

Alizarinviridin in einfacher wässeriger 1 %iger Lösung kann als Nachfärbung nach roten *Becher*-Kernfärbungen gebraucht werden.

Die *Becher*-Farbstoffe lassen sich für histologische Zwecke, besonders bei Phanerogamen, aber auch sonst, mit Safranin kombinieren. Ich führe die Schnittfärbung nach *Gaecks* an (41). Die Schnitte werden, wenn nötig, mit Eau de Javelle vorbehandelt, mit Essigsäure und Aqua dest. ausgewaschen.

FB

1. 2 Stunden lang in 1 %iger wässeriger Chromsäurelösung beizen.
2. Destilliertes Wasser für 1 Stunde.
3. Färben mit Alizarinzyanin RR oder mit Alizarinviridin 1 bis 2 Tage.
4. Auswaschen in destilliertem Wasser.
5. Safranin 4-5 Stunden.
6. Durchführen durch die Alkoholstufen. Hier genügt Brennspiritus.

ES Terpineol, Caedax.

(41) H.Gaecks, Mikrokosmos, XXIV, 1930/31

II. Alkoholische Farblösungen

§ 171. Safranin-Lichtgrün.

FX

Chromhaltige Fixiermittel oder 2-stündiges Vorbeizen mit 1 %iger wässriger Chromsäurelösung

FB

1. Färben mit Safranin (alkoholisch) 24 Stunden.
2. Abschwenken in 50 %igem Alkohol.
3. 1 %ige alkoholische Lichtgrünlösung. Dauer 2-3 Minuten. Das Lichtgrün treibt das Safranin aus den nicht verholzten Stellen aus. So erfolgt eine automatische Differenzierung der Färbung.
4. Auswaschen in Wasser.

ES Überführen über Isopropanolstufen in Terpineol und Caedax.

BM

Safranin-Lichtgrün ist eine der schönsten und sichersten Färbungen. Es werden die Gefäßbündel nicht nur bei den Phanerogamen, sondern auch bei den Gefäßkryptogamen hervorragend dargestellt.

§ 172. Safranin-Anilinblau steht der soeben geschilderten Färbung an Schönheit kaum nach.

FB

1. Färben in Safranin 24 Stunden.
2. Behandeln in 50 %igem Alkohol, bis die Farbe im Zelluloseteil sehr schwach geworden ist. Völlig entfärbt werden soll die Zellulose jedoch nicht.
3. Färben in Anilinblau, zu 1% in 90 %igem Alkohol aufgelöst.
4. Abschwenken in reinem Alkohol (90 %ig) 2-5 Sekunden.
5. Differenzieren in Alkohol, der einige Tropfen Salzsäure enthält, für 5-10 Sekunden.
6. 90 %iger Alkohol mit einer Spur Ammoniak 1-2 Minuten.
7. Reiner 90 %iger Isopropanol.

ES Isopropanol, Terpineol, Caedax.

BM

Verholzte und verkorkte Membranen färben sich rot, Zellulosemembranen blau.

§ 173. Magdalarot-Anilinblau nach *Pfeiffer-Chamberlain*. Man benötigt folgende zwei Lösungen:

A. 85 %iger Alkohol 100 ccm mit Magdalarot 0,5 g.

B. 85 %iger Alkohol 100 ccm mit Anilinblau 1 g

Die Färbung geht folgendermaßen vonstatten:

FB

1. Färben der Objekte mit Magdalarot. Nach Chamberlain kann die Farbe bis 24 Stunden einwirken.
2. Hierauf 90 %iger Alkohol für 1 Minute.
3. Färben in der Anilinblaulösung für 3-30 Minuten. Die Zeit muß ausprobiert werden.
4. Auswaschen in Alkohol.
5. Differenzieren - nur wenige Sekunden! - in salzsaurem Alkohol (1Tropfen HCl in 30 ccm 90 %igem Alkohol) Der Ton von Anilinblau verstärkt sich beim Differenzieren, während das Magdalarot abgeschwächt wird. Ist die Färbezeit mit Anilinblau oder die Differenzierung im salzsauren Alkohol zu kurz bemessen gewesen, wäscht sich die Blaufärbung aus. Zu starke Blaufärbung kann in 96 %igem Alkohol gemindert werden. Überfärbungen mit Magdalarot M 148 können am Sonnenlicht differenziert werden, auch dann noch, wenn die Präparate bereits fertiggestellt sind. Verwendet man eine andere Marke, muß man eben die Färbung mit Magdalarot entweder nicht überfärben oder schon vor Anwendung von Anilinblau entsprechend differenzieren.
6. Absoluter Alkohol 5 - 6 Sekunden.

ES Terpineol, Caedax oder gleich in Venetianer Terpentin

Von Magdalarot existieren mehrere Handelssorten. Die Marke M 148 "*des Handels*" von *Grübler & Co in Leipzig, Katalog M 17,* gestattet das Differenzieren im Sonnenlicht nach den Angaben von *Pfeiffer.*

Die übrigen Sorten von Magdalarot können natürlich ebenfalls gebraucht werden, wenn man sich mit dem Differenzieren mit salzsaurem Alkohol begnügt.

§ 174. Anilinblau-Erythrosin nach *Pfeiffer*, modifiziert von *Eckert* (42). Diese Doppelfärbung wurde ursprünglich von *Pfeiffer v.Wellheim* als Magdalarot-Anilinblau-Färbung für Algen veröffentlicht. *Eckert* hat nun mitgeteilt, daß statt des Magdalarotes ein anderer Farbstoff wie Erythrosin, Jodeosin, oder Pyronin und statt des Anilinblau etwa Lichtgrün verwendet werden kann. Somit ergeben sich verschiedene Kombinationen. *Eckert* gibt im einzelnen folgende Arbeitsvorschriften für die Einzelfärbung und für die Doppelfärbungen:

Einzelfärbung mit Anilinblau. Man löst Anilinblau "wasserlöslich" bis zur Sättigung in 80 %igem Alkohol oder Isopropanol auf. Die zu färbenden Objekte kommen in wenige Kubikzentimeter von 80 %igem Alkohol oder Isopropanol. Zur Ansäuerung gibt man 1 Tropfen Essigsäure zu und einige Tropfen der Anilinblaulösung. Die Färbezeit beträgt einige Stunden. Ausgewaschen wird in absolutem Alkohol oder Isopropanol.

Einzelfärbung mit Erythrosin. Man löst Erythrosin bis zur Sättigung in 85-90 %igem Alkohol oder Isopropanol auf. Die zu färbenden Objekte kommen in 5 ccm 90 %igen Alkohol oder Isopropanol, dem 1-2 Tropfen der oben angegebenen konzentrierten Lösung zugefügt worden sind. Die Färbezeit beträgt einige Stunden. Das Differenzieren erfolgt in HCl-Alkohol (80 %iger Alkohol); es ist auch im grellen Sonnenlicht möglich wie bei Magdalarot M 148.

Doppelfärbung mit Anilinblau-Erythrosin.

Vorschrift I für kleine Totalpräparate. Man färbt zuerst mit Erythrosin wie bei der Einzelfärbung, aber 3-6 Stunden, bis eine deutliche Überfärbung eingetreten ist. Hierauf spült man kurz mit Alkohol ab und färbt 1-10 Minuten in Anilinblau nach. Die Objekte färben sich blaßviolett. Hierauf taucht man die Objekte kurz in 0,25% igen HCl-Alkohol und spült wieder in neutralem Alkohol ab. Färbeergebnisse: Kerne und Pyrenoide rot; Chromatophoren dunkelblau; Plasma hellblau.

Vorschrift II für Schnittfärbung. Die Schnitte kommen in so wenig Isopropanol, daß sie gerade bedeckt sind. Hierauf wird die Erythrosinlösung zugegossen. Färbedauer im einzelnen wie oben. Auswaschen mit Alkohol oder Isopropanol. Aufgießen von Anilinblaulösung, die mit drei Teilen Alkohol verdünnt worden ist. Der Schnitt bekommt ein blaurotes Aussehen. Vorsicht vor Überfärbung mit Anilinblau! Auswaschen ganz kurz in 90 %igem Alkohol und Überführen in Isopropanol.

Anilinblau färbt das Zelloidin an. Zelloidin muß vorher aus den Schnitten entfernt werden.

(42) F.Eckert, *Das Präparieren von Algen*, Stuttgart, Franckh'sche Verlagshandlung, 1939

§ 175. *Eckert* hat nun diese Färbemethoden mit zwei sauren Farben erweitert. Er gibt Arbeitsvorschriften für eine Jodeosin-Anilinblau-Färbung, Jodeosin-Lichtgrün-Färbung, Pyronin-Anilinblau-Färbung und eine Pyronin-Lichtgrün-Färbung. Die Lösungsvorschriften für die einzelnen Farben sind dabei folgende:

Jodeosinlösung. Jodeosin *stand. Bayer* wird in 10 ccm destilliertem Wasser gelöst, und zwar so viel wie sich überhaupt lösen kann. Dann gibt man 40 ccm Isopropanol zu.

Pyroninlösung. Man löst in 10 ccm destilliertem Wasser so viel Farbstoff wie sich lösen kann und gibt dann 40 ccm Isopropanol dazu.

Lichtgrünlösung. Man löst so viel Lichtgrün in 10 ccm 96 %igem Alkohol auf wie sich lösen kann. Zur eigentlichen Färbung wird diese Stammlösung noch mit drei Teilen 96 %igem Alko-

hol verdünnt. Färbedauer ist hier 10-20 Minuten. Auswaschen nicht mit Alkohol, der die Farbe sofort auszieht, sondern mit Isopropanol, der 3-5 mal gewechselt werden soll, bis keine Farbwolken mehr sichtbar werden.

Die Doppelfärbungen werden wie folgt ausgeführt:

Doppelfärbung Jodeosin-Anilinblau

FB

1. Vorfärben der Schnitte mit oben angeführter Jodeosinlösung. Dauer der Färbung 10-30 Minuten.
2. Abwaschen mit 90 %igem Alkohol.
3. Färben mit 1:3 verdünnter konzentrierter Anilinblaulösung.
4. Abschwenken mit 90 %igem Alkohol.
5. Isopropanol dreimal wechseln.

ES Terpineol - Xylol - Caedax

Doppelfärbung Jodeosin-Lichtgrün

Die Färbung wird durchgeführt wie bei Jodeosin-Anilinblau, nur daß statt Anilinblau eben Lichtgrünlösung verwendet wird.

Doppelfärbung Pyronin-Anlinlau (Lichtgrün)

FB

1. Man färbt die Schnitte mit der Pyroninlösung etwa 30 Minuten.
2. Auswaschen mit 90 %igem Alkohol.
3. Aufgießen von 1:3 verdünnter Anilinblau- oder Lichtgrünlösung bis die Schnitte blaurot oder braunrot verfärbt sind. Dauer der Färbung 1-10 Minuten.
4. Auswaschen in 90 %igem Alkohol *ganz kurz* und Überführen in Isopropanol.

BM

Die Färbungen nach *Pfeiffer-Eckert* sind besonders für das Färben von Algen ausgearbeitet worden. Für Totalpräparate sowie Schnitte an Meeresalgen sind alle Verfahren geeignet, Paraffinschnitte können nur mit Jodeosin-Anilinblau oder Jodeosin-Lichtgrün gefärbt werden, Freihandschnitte können mit allen Kombinationen behandelt werden.

Voraussetzung für das Gelingen der Färbungen ist Fixierung in Chromessigsäure.

§ 176. Vierfachfärbung nach *Johannsen*. *D.A.Johannsen* berichtet (43) über eine Vierfachfärbung für pflanzliche Schnitte (Paraffinschnitte). Gebraucht werden folgende Lösungen:

1. Safraninlösung

Safranin O	4 g
Ethylenglykolmonomethylether	200 ccm
50 %iger Alkohol	200 ccm
40 %iges Formalin	15 ccm
Natriumacetat	3 g

2. Methylviolettlösung

Destilliertes Wasser	100 ccm
Methylviolett 2 B	1 g

3. Fastgreenlösung.

Fastgreen ist eine englische Handelsmarke des Echtgrüns (Dinitroseresorzin). Deutsche Handelsmarken können ebenso gebraucht werden.

Nelkenöl	5 ccm
Ethylenglykolmonomethylether	5 ccm

Hierin löst man so viel Dinitroseresorzin auf, wie sich in einigen Tagen löst. Nach dem Auflösen der Farbe gibt man noch zu:

95 %igen Alkohol	30 ccm
tertiären Butylalkohol	30 ccm
Eisessig	2-3 Tropfen

Diese Farblösung muß vor Gebrauch ein paar Tage alt sein.

5. Orange-G-Lösung.

Man löst in einer Mischung von:

Nelkenöl	50 ccm
Ethylenglykolmonomethylether	50 ccm

so viel Orange G auf, wie sich in ein paar Tagen lösen läßt. Nach vollständiger Lösung gibt man noch zu:

Ethylenglykolmonomethylether	50 ccm
95 %igen Alkohol	50 ccm

Das Charakteristische dieser Farblösungen sind die Lösungsmittel. Der von *Johannsen* benützte Ethylenglykolmonomethylether ist identisch mit dem Glykolmonomethylether der *Behringwerke*. (Preis 1 kg etwa 2 DM)

Die Durchführung verläuft nun folgendermaßen:

FB

1. Die entparaffinierten Schnitte kommen in 70 %igen Alkohol.
2. Färben in der Safranilösung 24-48 Stunden.
3. Abspülen in Leitungswasser.
4. Färben in der Methylvilettlösung10-15 Minuten.
5. Abspülen in Leitungswasser.
6. Eintauchen und Abspülen für 5 Sekunden in einer Mischung von:

95 %igem Alkohol	33 ccm
tertiärem Butylalkohol	33 ccm
Ethylenglykolmonomethylether	33 ccm

7. Färben in der Dinitroseresorzinlösung während 10 Minuten.
8. Abspülen in einer Mischung von:

95 %igem Alkohol	33 ccm
tertiärem Butylalkohol	33 ccm
Ethylenglykolmonomethylether	33 ccm

9. Färben in der Orange-G-Lösung für 5 Minuten.
10. Kurzes Abspülen in einer Mischung von:

Nelkenöl	33 ccm
95 %igem Alkohol	33 ccm
Ethylenglykolmonomethylether	33 ccm

11. Nachspülen in einer Mischung von.

Nelkenöl	33 ccm
Alkohol absolut	33 ccm
Xylol	33 ccm

12. Spülen in Xylol, das mit einer Spur absoluten Alkohols versetzt ist.
13. Spülen zweimal in Xylol, Einbetten in Caedax.

BM

Die Differenzierung erfolgt automatisch beim Einhalten der vorgeschriebenen Arbeitsweise. Die Färbung ist geeignet für pilzbefallene Phanerogamen (Rostpilze, Brandpilze), ferner für Flechten und parasitische Algen. Im einzelnen färben sich:

Chromatin in Teilung	rot
Chromatin in Ruhe	purpur
Nukleolus	grün, violett bis rotgelb
Kernsaft	farblos bis grünlich
Spindelfasern	purpurrot
unverholzte Zellwände	grünlich-orange
verholzte Zellwände	rot
kutinisierte Zellwände	rötlich purpur
Mittellamellen	grün
Sklereiden	leuchtend rot
Kollenchymzellen	grün bis gelbgrün
Cytoplasma	orange
Stärkekörner	tief rotes Zentrum, Schale grün und orange
Plastiden	gelbgrün bis grün
Casparische Streifen	dunkelrot
Endodermis	gelb
Pilzmycelien	lichtgrün

Der Erfolg tritt nur bei präziser Arbeit ein!

(43) Zitiert nach W.Röckl, Mikrokornos, Bd, XXXIII, 1939/40

§ 177. Eisenbeizenfärbungen nach *Pfeiffer v.Wellheim.* *Pfeiffer* (44) hat besonders für das Färben von Süßwasseralgen folgende, sehr schöne Eisenbeizenfärbungen entwickelt, die jede Konkurrenz mit den neueren Färbemethoden aushalten und die nur empfohlen werden können.

FX

Als Fixiermittel sind geeignet die Chromessigsäure nach *Flemming* und das *Pfeiffersche* Gemisch.

FB

Man stellt sich zunächst eine Stammlösung der Beize her. In 96 %igem Alkohol löst man so viel neutrales reinstes Eisenchlorid auf, wie sich in einigen Tagen löst. Die zu färbenden Algen oder anderen Objekte kommen nun in 96 %igen Alkohol, dem so viel Eisenbeizenstammlösung zugesetzt wird, bis eine deutliche Gelbfärbung eintritt. Dauer der Beizung: 24 Stunden!

Nun wäscht man mit 96%igem Alkohol so lange aus, bis aller gelber Farbstoff verschwunden ist. Dazu ist vier- bis achtmaliger Alkoholwechsel nötig. Die so vorbehandelten Algen können dann in folgender Weise gefärbt werden:

1. Mit Echtgrün (Dinitroseresorzin).

Benützt wird dazu eine konzentrierte Lösung (Stammlösung) von Dinitroseresorzin in 98 %igem Alkohol. Die Lösung ist braun. Die eigentliche Färbung der Algen wird vorgenommen in einer Lösung von:

90 %igem Alkohol	5 ccm
Dinitroseresorzinstammlösung	5 ccm
Salzsäure.	1 Tropfen

Die Färbung dauert 3-6 Stunden. Färbt sich die Gebrauchslösung grün, so ist das Eisenchlorid zu wenig ausgewaschen worden. Die Lösung ist durch eine neue zu ersetzen. Man differenziert mit 1 %igem HCl-Alkohol. Auswaschen mit Alkohol. Dann Isopropanol, Xylol, Caedax.

2. Mit Gallussäure.

Gallussäure (nicht Tannin) färbt die Algen in grauer bis schwarzer Farbe. Die Stammlösung der Gallussäure ist eine konzentrierte Lösung in 95 %igem Alkohol. Sie ist jedoch schlecht haltbar und wird am besten jedesmal frisch angesetzt. Die Färbung der Algen geschieht auf folgende Art:

Die Algen kommen in 96 %igen Alkohol, dem einige Tropfen der Stammlösung zugefügt worden waren. Färbedauer 1 bis 2 Stunden. Differenzieren in l %igem Salzsäurealkohol. Auswaschen in Alkohol usw.

3.Mit Gallein.

Gallein färbt die Algen in graublauer bis stahlblauer Farbe. Man fertigt sich als Stammlösung eine konzentrierte Lösung von Gallein in 96 %igem Alkohol an. Zur Färbung der Algen benützt man folgende Mischung:

80 %iger Alkohol.	5-9 Teile
Galleinstammlösung	1 Teil

BM

Pfeiffer empfiehlt für die Färbungen mit Echtgrün, mit Gallussäure und Gallein eine Nachfärbung mit Indulin. Die vorgefärbten Algen kommen unter Umschwenken einige Minuten in eine 1:1 verdünnte konzentrierte alkoholische Indulinlösung. Auswaschen mit Alkohol. Besonders die Zellgrenzen treten prägnant blau hervor.

Mit Karminsäure.

Mit Karminsäure werden die Algen tiefschwarz gefärbt. Man bereitet als Stammlösung eine konzentrierte Karminsäurelösung in 50 %igem (nicht 96 %igem!) Alkohol. Die Algen werden für diese Karminsäurefärbung vorgebeizt mit:

50 %iger Alkohol	10 ccm
Eisenchloridstammlösung	5 Tropfen

Das Auswaschen geschieht ebenfalls mit 50 %igem Alkohol. Das eigentliche Färben nimmt man vor in 5 ccm 50 %igem Alkohol, dem man einige Tropfen der Karminsäurelösung zugesetzt hat. Färbedauer: einige Stunden. Auswaschen mit 50 %igem Alkohol, dann Überführen in starken Alkohol.

(44) Pfeiffer, R.v.Wellheim: Pringsheims Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik, Bd. 26, 1894

(44) Österreichische botanische Zeitschrift Bd. 48, Heft 2 und 3, 1898

§ 178. Kombinationen der *Pfeifferschen* Färbungen mit anderen Färbungen. Die Färbung mit Echtgrün (Dinitroseresorzin) kann als Nachfärbung nach Hämatoxylinfärbung, nach Kernschwarzfärbung sowie nach Goldimprägnation und Bleisulfidimprägnation zur Anwendung kommen. Die vorgefärbten Algen kommen in die Eisenbeize und werden gefärbt wie die nicht vorbehandelten Algen. Hämatoxylinfärbungen bleichen allerdings manchmal aus.

Vorschriften für simultane Mehrfachfärbungen

§ 179. Wirksame simultane Mehrfachfärbungen erscheinen recht erwünscht, weil sie in einem einzigen Arbeitsgang automatisch alles Wünschenswerte in verschiedenen Färbungen darstellen. Der Mensch will eben immer und überall seine Ziele mit möglichst wenig Arbeit erreichen.

Es ist gleich zu betonen, daß beliebige Farben natürlich nicht ohne weiteres miteinander gemischt werden können. So geben basische und saure Farben, in wässerigen Lösungen gemischt, einen neuen chemischen Körper, der nicht immer löslich zu sein braucht. So ergeben z.B. Eosin und Methylenblau das eosinsaure Methylenblau, das in Wasser unlöslich und zu den Farblacken zu rechnen ist. Derartige Lacke sind häufig in Alkohol löslich und können als Farben verwendet werden.

Wirklich gute Simultanfärbungen gibt es nur wenige. Die Herstellung solcher Lösungen ist sehr schwierig, und man tut unter allen Umständen gut daran, sie gebrauchsfertig zu kaufen.

Diese Färbungen sind für die Herstellung von Dauerpräparaten nicht immer gut geeignet. Man hat die Färbung der Einzelbestandteile nicht in der Hand und eine eventuelle Beizung macht Schwierigkeiten. Daher ist die Haltbarkeit nicht immer befriedigend. Zur Herstellung diagnostischer Präparate sind aber alle unübertrefflich, da sie in kürzester Zeit zum Ziele führen. Besonders ist dies der Fall, wenn sie Fixierung und Färbung in einem einzigen Arbeitsgang gestatten. Fast alle diese Mehrfachfärbungen sind Spezialfärbungen für eng begrenzte Anwendungsgebiete.

§ 180. Eosin-Anlinblau nach *H.Sieben*. Die Eosin-Anilinblau-Simultanfärbung nach *Sieben* ist eine Spezialfärbung für pflanzliche Sexualzellen.

Lösungsvorschrift :

Kalkhaltiges Leitungswasser	100	ccm
Eosin	3	g
Anilinblau	0,2	g

Manche Städte haben kein kalkhaltiges Leitungswasser, sondern Flußwasser, das filtriert und manchmal mit chlorhaltigen Chemikalien versetzt ist. Solches Wasser ist unbrauchbar. Man wird aber bei einigem Suchen bald einen Brunnen in der Umgebung vorfinden, der das gewünschte Wasser führt.

FX Alkoholische Fixiermittel.
DA 1-3 Stunden, dann Abspülen.
DF
HCl-Alkohol (1 Tropfen HCl auf 200 ccm 96%igen Alkohol).
BM
An ruhenden Zellen Zytoplasma tiefblau, Kerngerüst hellblau, Nukleolus rot, an sich teilenden Zellen Spindelfasern blau, Chromosomen rot.

§ 181. Safranin-Lichtgrün-Simultanfärbung nach *R.Fischer* (45). Die Farblösung kann selbst hergestellt werden.

Alkohol 70 %ig	100	ccm
Essigsäure 78 %ig	3	ccm
Lichtgrün SF	0,1	g
Safranin O W *Grübler*	0,15	g

Die Lösung fixiert und färbt zugleich! Man kann natürlich auch vorfixierte Objekte darin färben, am besten chromfixierte Objekte. Die unverdünnte Lösung färbt in 30-60 Minuten. Man kann auch nicht eingebettete Schnitte von höheren Pflanzen darin färben. Sonstige geeignete Objekte sind Algen, mikroskopische Pilze und ähnliche Objekte. Der Fortgang der Färbung ist alle 10 Minuten zu kontrollieren.

Es färben sich: Membranen rosa bis rot; Pyrenoide leuchtend grün; Pektin und Gallerten orange; Zellkern blau bis violett; Plasma hellgrün; chromatische Teile dunkel-violett.

(45) R.Fischer, Mikrokosmos XXIX, 1935/36, S.159

§ 182. Auraviolett nach *Geidies*. Die Zusammensetzung dieses Farbstoffes ist nicht bekanntgegeben. Herstellung der Lösung: Man löst eine Originalpackung in der vorgeschriebenen Menge heißem (nicht kochendem!) Wasser auf.

DA 8-24 Stunden und länger
DF
Wenn überhaupt nötig, genügt meistens der reine Alkohol. In stark überfärbten Objekten kann HCl-Alkohol nötig werden.
BM
Gibt bei Phanerogamen eine schöne Doppelfärbung (Holz rot, Zellulose blauschwarz). Bei den Gefäßkryptogamen färbt in der Regel nur der rote Anteil der Farbe, obwohl kein Holz vorliegt. Die Färbung ist sehr sauber und die Präparate sehen oft wie Federzeichnungen aus.

§ 183. Farbgemisch nach *Pianese*. Das Farbgemisch nach *Pianese* hat folgende Zusammensetzung:

Malachitgrün	0,5 g
Fuchsin S	0,1 g
Martiusgelb	0,01 g

Zur Herstellung der Lösung löst man 0,6 g des Farbgemisches, das man am besten von *Dr.Grübler* in Leipzig bezieht, in 50 ccm Alkohol von 96% auf und fügt dann noch 150 ccm destilliertes Wasser hinzu.

FX Chromsäure oder Chromessigsäure.
DA 30 Minuten, muß überwacht werden.
DF Nicht nötig.
ES Alkohol - Terpineol - Caedax
BM
Die Färbung nach *Pianese* dient zur Darstellung cytologischer Einzelheiten. Ursprünglich für rein medizinische Bedürfnisse (Krebsdiagnose) entwickelt, wird sie jetzt auch in der Botanik angewandt, so z.B. von *Kolumbe* zur Färbung von Flechten.

§ 184. Pikrokarmin-Anlinlau (*Hollborn*). Herstellung der Lösung: Eine Originalpackung wird in 100 ccm heißem Wasser aufgelöst.

FX Am besten Chromsäure.
DA 1-6 Stunden unter Überwachung, bis der Färbeeffekt genügt.
DF Nicht nötig.
BM Polychromatische Färbung der einzelnen Elemente.

§ 185. Pikro-Nigrosin (*Grübler*). Am einfachsten stellt man sich die Lösung her durch Auflösen von 1,25 g des Simultanfarbgemisches nach *Grübler* in 100 ccm warmen destilliertem Wasser. Selbstherstellung ist möglich: Zu einer gesättigten wässerigen Pikrinsäurelösung wird soviel wässerige Nigrosinlösung zugesetzt, bis die Flüssigkeit olivgrün erscheint.

FX
Die Objekte, z.B. Algen oder dünne Schnitte, können unfixiert behandelt werden. Es können natürlich auch beliebig fixierte Objekte gefärbt werden.
DA Meistens nur wenige Minuten.
BM

An Schnitten Holzteile gelb, nicht verholzte Teile schwarz. Ferner bei Algen und Pilzen Kernfärbung. Hier ist die Färbung an Totalpräparaten besser als an Schnitten.

§ 186. *Giemsa*-Färbung. Die Färbung erfolgt mit einer Lösung von Azur II und Eosin und stellt eine verbesserte *Romanowsky*-Färbung dar. Selbstherstellung ist nicht möglich. Die Giemsa-Farblösung enthält Eosin, Methylenblau und Methylenazur in Methylalkohol gelöst. *Giemsa* hat seine Methode entwickelt zur Untersuchung von Blut auf parasitische Protozoen. Das Verfahren ist aber auch anwendbar bei der Untersuchung von Bakterien, Amöben, sowie amöbenähnlichen Zuständen der Schleimpilze, bei Hefen, Algen sowie ähnlichen Objekten;

1. Die Färbung von Ausstrichen

Die Objekte werden mit ihrem Medium ausgestrichen. Klebt das Medium nicht, so kann man den Objektträger mit einer hauchdünnen Schicht *frischen* Hühnereiweißes zuvor überziehen. Nachdem diese Schicht dann trocken geworden ist, wird der Ausstrich angefertigt.

Vorschrift für trockene Ausstriche

1. Fixieren des lufttrockenen Ausstriches (Bakterien- oder Blutausstrich) 10-15 Minuten lang in absolutem Alkohol *oder* 1 Minute mit Methylalkohol.
2. Verdünnung der Farblösung mit destilliertem Wasser in weitem Glase *unter Umschütteln*, und zwar 1 Tropfen der Farbe auf je 1 ccm des Wassers. Anwärmen der Lösung auf 40-50 °C
3. Übergießen der fixierten Ausstriche mit der frisch bereiteten Verdünnung der *Giemsa*-Lösung. Färbedauer 10-15 Minuten.
4. Abwaschen mit destilliertem Wasser.
5. Abtupfen mit nicht faserndem Fließpapier. Trocknen.
6. Einschluß in Caedax.

Vorschrift für feuchte Ausstriche

1. Fixieren der feuchten Ausstriche in Sublimat-Alkohol. Dauer 12-24 Stunden.
2. Kurzes Abspülen in Wasser.
3. Entfernung des Sublimates in folgender Lösung:

Aqua dest.	100 ccm
Lugol	3 ccm
Kaliumjodid	2 g

Dauer der Einwirkung 10 Minuten

4. Abwaschen und Jodentfernung in 0,5% iger wässriger Lösung von Natriumthiosulfat. Dauer der Einwirkung 10 Minuten.
5. Waschen für 5 Minuten in fließendem Wasser.
6. Färben in *Giemsa*-Lösung (Verdünnung wie oben) 1 bis 12 Stunden (Öfters überprüfen!).
7. Abspülen in destilliertem Wasser.
8. Hindurchführen durch folgende Stufen:

Azeton	95 ccm	+	Xylol 5 ccm
Azeton	70 ccm	+	Xylol 30 ccm
Azeton	30 ccm	+	Xylol 70 ccm
Xylol			

9. Einbetten in (verdicktes) Zedernholzöl oder in Caedax.

2. Vorschrift für Schnittfärbung (46)

(46) Zitiert nach 0.Seifried - E.Heidegger, *Pathologische Mikroskopie*, Stuttgart, Ferd.Enke Verlag, 1933

FX
Zenker und andere sublimathaltige Fixiermittel. Entfernung des Sublimates und des Jodes in üblicher Weise.

FB
Die Färbung geschieht mit folgender Lösung:

Destilliertes Wasser	50 ccm
Natriumbikarbonatlösung 0.5 %ig	2 Tropfen
Reiner Methylalkohol	1,5 ccm
Giemsa-Originallösung	1,75 ccm

DF In 96 %igem reinem Alkohol (kein Brennspiritus!)

ES
Entwässern entweder in tertiären Butylalkohol oder in der schon oben angeführten Azetonreihe.

Für Objekte aus *formolhaltigen Fixiermitteln* muß die Methode etwas abgeändert werden. Man färbt mit folgender Lösung:

Destilliertes Wasser	50 ccm
Reiner Methylalkohol	1,5 ccm
Giemsa-Originallösung	1,75 ccm

DF
In 95 %igem Alkohol mit Zusatz von einigen Tropfen einer alkoholischen Lösung von Kolophonium.

ES Entwässern, Xylol, Zedernholzöl oder Caedax.

§ 187. *Gram*-Simultanfärbung mit Viktoriablau-Pyronin (*Hollborn*) (47). Man bezieht die Farbe am besten von *Hollborn* in *Leipzig*. Es werden 1 g der Substanz in 50 ccm heißem Alkohol (Wasserbad!) aufgelöst und dann 50 ccm Glycerin zugefügt. Nach dem Erkalten wird filtriert. Diese fertige Stammlösung kann auch käuflich erworben werden. Zum Gebrauch nimmt man:

Stammlösung	1 ccm
Alkohol	1 ccm
Destilliertes Wasser	1 ccm

DA Ausstriche oder Schnitte 5-10 Minuten.
ES Abspülen in Alkohol. Xylol, Caedax.
BM *Gram*-positive Bakterien färben sich blau, die *Gram*-negativen rot.

(47) K.Hollborn, Zentralblatt f. Bakteriologie, I. Abt.Originale, Bd. 136, S.507

Die Verarbeitung von schwierig zu färbenden Objekten

§ 188.

1. Die Kryptogamen weisen eine größere Anzahl von schwierig zu färbenden Objekten auf. Die Farbstoffe müssen eben am Objekt haften können, um zu färben. Eine schlechte Haftung kann

verbessert, eine fehlende Haftung kann durch geeignete chemische Behandlung - einer Beize - geschaffen werden. In der Literatur findet sich manchmal für Beize der Ausdruck Mordant. Das Abtöten und das Fixieren schafft in der Regel erst die Voraussetzung zur Farbstoffannahme.

2. Nach Alkoholfixierung ist die Färbbarkeit mit allen Farbstoffen anerkanntermaßen gut. Ebenso färben sich die Objekte nach Fixierung mit Sublimat und Trichloressigsäure vorzüglich.

3. Der Formalinfixierung wird vielfach schlechte Färbbarkeit zugeschrieben. Dies ist nur bedingt richtig. Formalin verändert die chemischen Eigenschaften der Objekte sehr, doch läßt es eine große Anzahl von Färbungen ohne weiteres zu. Ich nenne hier nur die *Becher*-Farben, verschiedene Hämatoxylinvorschriften, die Imprägnationen mit Metallen und Metallsalzen, sowie alle Färbungen nach Beizungen mit Eisenchlorid (*Pfeiffer*).

Material, das lange in Formalin gelegen hat, kann bedeutend verbessert werden durch Behandeln mit einer l %iger Lösung von Silbernitrat, Salpetersäure und Zitronensäure, wie schon in einem früheren Kapitel ausgeführt worden ist.

Das Formalin hat in Gemischen z.B. mit Trichloressigsäure oder im *Pfeifferschen* Gemisch keine nachteiligen Folgen für die Färbbarkeit mit basischen oder sauren organischen Farbstoffen.

4. Osmiumsäure und Pikrinsäure schwächen im allgemeinen die Färbbarkeit sehr. Die Färbbarkeit nach Pikrinsäure kann kaum verbessert werden. Die Färbbarkeit nach Osmiumsäure kann verbessert werden

a) Mit 1 %iger wässriger Kaliumdichromatlösung.
b) mit offizinellem Chlorwasser.
c) mit 3 %iger Perhydrollösung.

Am besten wendet man Osmiumsäure nur in Dampfform an. Hier verdunstet sie wieder nach Sekunden oder Minuten und behindert die Färbung nicht.

5. Salizylsäure, Thymol, Nipagin und Benzoesäure werden manchmal als Desinfektionsmittel der Aufbewahrungsflüssigkeit zugesetzt. Sie behindern die Färbbarkeit ganz erheblich und werden am besten durch Karbolsäure ersetzt.

6. Brennspiritus als alleiniges Fixiermittel, als Aufbewahrungsflüssigkeit oder als Intermedium behindert die Färbung ebenfalls erheblich. Dem Übel kann aber restlos abgeholfen werden durch Behandeln der Schnitte mit verdünnter Essigsäure, wodurch die Pyridinbasen gebunden werden.

7. Lange aufbewahrtes Material, insbesondere Material, das in den Tropen fixiert und zu Schiff über den Äquator in fixiertem Zustand verschickt worden ist, färbt sich oft ganz verwaschen. Aus unbekannter Ursache entstehen hier störende Stoffe. Nach *R.Totze* (48) läßt sich hier Abhilfe schaffen durch Behandeln mit SO2-Wasser für 30 Minuten. Hierauf wird ausgewaschen. Die Färbung begegnet dann keinerlei weiteren Schwierigkeiten.

Einige Farbstoffe färben nur nach bestimmten Fixierungen. Dies hängt damit zusammen, daß diese Farbstoffe schon zu den eigentlichen Beizenfarbstoffen gehören.

(48) R.Totze, Mikrokosmos XXIX, 1935/36, S.98

8. Safranin färbt bekanntlich am besten nach Chromfixierung. Nach anderen Fixierungen kann die Chrombeizung nachgeholt werden mit l %iger wässriger Chromsäurelösung oder Kaliumdichromatlösung. Soll unbedingt mit Safranin gefärbt werden, und nimmt das Objekt die Farbe unwillig an, so kann nach *Kurtis* die stärker färbende freie Base dazu verwendet werden. Dazu bereitet man sich folgende Lösungen:

Lösung I. 300 ccm 4 %ige Formalinlösung + Ammoniumcarbonat 1 g

Lösung II. Konzentrierte alkoholische Safraninlösung

Zur Anwendung kommt folgendes Gemisch:

Lösung I	80 ccm
Lösung II	20 ccm

Die Färbedauer ist 24 Stunden. Differenzieren mit Alkohol. Zum Nachfärben empfiehlt sich Pikro-Naphtholschwarz.

Die Safraninbase kann auch frei hergestellt werden und in Wasser gelöst zum Färben Anwendung finden. 100 ccm 1 %ige Safraninlösung werden mit einigen Tropfen wässriger Kalilauge versetzt (etwa 2-3 mg Kaliumhydroxid). Der entstehende Niederschlag wird durch Schütteln mit Chloroform gelöst, danach gießt man das Chloroform ab und läßt es verdunsten. Der Rückstand wird nun in Aqua dest. aufgelöst und ist zum Färben bereit.

9. Mangelnde färbende Kraft der Farbstoffe kann auch durch Zusätze zu den Farblösungen gesteigert werden.

Basische Farbstoffe färben stärker, wenn die Lösungen freies Alkali aufweisen, wie z.B. bei Methylenblau nach *Löffler*.

Saure Farbstoffe färben in saurer Lösung stärker. Als solche Zusätze können Ameisensäure, Essigsäure, Milchsäure und Lactophenol Verwendung finden. Saure Farben können durch stark saure Zusätze wie freies Jod zu Eosin zu Kernfärbungen Verwendung finden.

10. Manche Objekte färben sich besser, wenn sie selbst durch Beizen vorbereitet sind. Die Grundregel für das vorbereitende Beizen ist folgende:

Basische Farbstoffe erfordern saure Beizen.

Saure Farbstoffe erfordern basische Beizen.

Von diesen Regeln macht man bei den Beizenfarbstoffen praktischen Gebrauch. Soweit andere Beizungen verwendet werden können, sind sie an entsprechenden Stellen des Buches angeführt.

Kapitel VI: Imprägnationen mit Metallen und Metallsalzen, Nuklealreaktion

Imprägnationen mit Metallen und Metallsalzen

In den Tabellen werden die folgenden Abkürzungen verwendet:

FX Fixierung
FB Färbung
DA Färbedauer
DF Differenzierung
BZ Beizung
ES Einschluß
BM Bemerkung

§ 189. Den vielen organischen Farben gegenüber sind die Imprägnationen mit Metallen und Metallverbindungen der Zahl nach verschwindend klein. Ihre tatsächliche Bedeutung in der Praxis ist jedoch groß, zumal die Verfahren teilweise Probleme zu lösen gestatten, die mit organischen Farbstoffen nicht bewältigt werden können. So ist die unverletzte Oberhaut der Moose nicht durchlässig für Farbstoffe, wohl aber für manche Metallverbindungen. Für die Untersuchung und Präparation der Kryptogamen sind folgende Verfahren von Bedeutung:

§ 190. Gold-Imprägnation nach *Nabias*. Mit der Goldimprägnation kann alles dargestellt werden, was sich mit Jod imprägnieren läßt, vor allem Eiweiß. Arbeitsvorschriften darüber sind mehrfach veröffentlicht worden. Unstreitig am besten ist die Methode von *Nabias* (49). *Bouseck* hat gefunden, daß diese Methode ausgezeichnet haltbare und schöne Ergebnisse zeitigt (50). Ich kann dies aus eigenen Erfahrungen nur bestätigen. *Eckert* wies ihre Brauchbarkeit für die Algenpräparation nach. Die Verwendbarkeit der Goldimprägnation ist jedoch weit umfangreicher, sie ist außerdem bei Pilzen und Moosen, jedoch nicht bei den Flechten anwendbar. Zur Ausführung der Goldimprägnation benötigt man:

1. Kaliumjodidlösung nach Gram (Jod 1 g, Kaliumjodid 2 g und Wasser 300 ccm). Diese Lösung wird auch *Lugolsche* Lösung genannt.
2. Eine 0,2 %ige wässrige Lösung von Goldchlorid.

Neben Goldchlorid ist auch Goldchlorwasserstoffsäure brauchbar, wie er durch Auflösen von Bruchgold in Königswasser und Auskristallisieren leicht erhältlich ist. Dabei entstehen die Kupferchloridkristalle besonders schön und können leicht entfernt werden.

Wasserfreies Goldchlorid enthält	64,85 % Gold.
Kristallisiertes Chlorid enthält	53 % Gold
Goldchlorwasserstoffsäure enthält	47,70 % Gold

Für die praktische Durchführung der Goldimprägnation ist der Goldgehalt der einzelnen Goldsalze unerheblich.

3. eine 2 %ige Lösung von Resorzin in Wasser.
4. eine 5 %ige wässrige Lösung von Natriumthiosulfat.

FX

Die Goldimprägnation ist nach fast allen Fixierungen möglich. Besonders gelingt sie nach Alkohol, ferner nach Sublimat, *Flemmings* Chromessigsäure, nach *Pfeiffer* und nach Formalin. Endlich natürlich nach *Lugolsche*r Lösung.

FB

Die ausgewaschenen Objekte kommen in die Kaliumjodidösung. Diese Lösung wird gewöhnlich 1:1 oder 1:2 mit destilliertem Wasser verdünnt. Diese Jodie-

rung ist der bestimmende Faktor für den Ausfall der Goldimprägnation. Je länger die Objekte in der Jodlösung verbleiben, desto intensiver fällt die Färbung aus. Die Objekte färben sich gelb bis braunrot. Auch das Zelloidin in Zelloidinschnitten färbt sich mit Jod an. Die Zeitdauer der Jodierung beträgt 1-2 Stunden und länger. Hernach werden die Objekte in destilliertem Wasser geschwenkt. Zelloidinschnitte müssen so lange gewässert werden, bis das Zelloidin völlig entfärbt worden ist, sonst scheidet sich nachher auch im Zelloidin Gold ab. Sollte diese Jodierung nicht genügen, so muß das Zelloidin aufgelöst werden. Die Zeitdauer des Jodierens und des Auswaschens ist für jedes Objekt gesondert auszuprobieren. Genauere Angaben können nicht gemacht werden. Es hängt alles von der Menge des vorhandenen Eiweißes ab, von der Dicke der Objekte und Schnitte und der Durchlässigkeit für Lösungen.

Nach dem Abspülen kommen nun die Objekte im Dunkeln in die Goldchloridlösung für 30 Minuten und länger. Hier scheidet sich soviel Gold ab, wie dem Jodgehalt entspricht. Die Objekte erhalten eine goldgelbe Farbe, die von dem gebildeten Goldjodid herrührt. Nun werden die Objekte herausgenommen, in destilliertem Wasser abgespült und in die Resorzinlösung zur Bräunung verbracht. Je nach Art des Objektes und der Menge des Goldjodides geht die Reduzierung zu metallischem Gold sehr rasch schon in diffusem Tageslicht oder selbst in vollem Sonnenschein langsam vor sich. Hierauf wiederholtes Wässern und viertelstündiges Fixieren in 5 %iger Natriumthiosulfatlösung. Erneutes Auswaschen, Alkoholstufen, Terpineol, Caedax. Der Einschluß ist jedoch in allen Medien möglich, auch in Glyceringelatine. Der Farbton entspricht genau dem bekannten Purpurbraun der Auskopierpapiere.

DF

Zu dunkle Präparate können differenziert werden in 5 %igem Natriumthiosulfat, dem etwas Gelbes Blutlaugensalz zugesetzt worden ist. Dieses Reagens bildet bekanntlich den photographischen Abschwächer nach *Farmer*.

Verfehlte Vergoldungen können mit l %igem Kaliumcyanid aufgelöst werden. Das Verfahren kann dann erneut durchgeführt werden.

[Der chemische Vorgang ist folgender: Zunächst nehmen die Objekte KJ auf, welches dann mit H[AuCl4] zu unlöslichem K[AuJ4] reagiert; das oxidierend wirkende Jod der *Lugolschen* Lösung verhindert eine Reduktion des dreiwertigen Goldes zu elementarem Gold. Diese Reduktion geschieht dann durch Resorcin, das als photographischer Entwickler wirkt.]

(49) C.Nabias in Comptes rend. Soc.Biol., Paris 1904 und 1905

(50) R.M.Bouseck in Mikrokosmos XXIII, 1929/30, S.146

§ 191. Goldimprägnation modifiziert nach *Eckert* für Algen. Die Goldimprägnation bei Algen nimmt man nach *Eckert* wie folgt vor:

1. Töten der Algen mit Osmiumsäuredämpfen oder mit einem Tropfen Formalin.
2. Auswaschen im Reagensglas mit destilliertem Wasser.
3. Fixieren mit Chromessigsäure nach *Flemming*. Dauer der Fixierung 10-15 Minuten.
4. Auswaschen mit destilliertem Wasser 1/2-1 Stunde, nicht länger, nur bis die gelbe Färbung des Fixiermittels völlig verschwunden ist!
5. Behandeln für 2 Stunden in folgender Lösung:

Dest. Wasser	200 ccm
Kaliumjodid	0,5 g
Jod	0,5 g

6. Auswaschen in destilliertem Wasser, bis Geruch und Farbe der Jodlösung vollständig verschwunden ist.
7. Goldchloridlösung 0,2 %ig für 2-6 Stunden.
8. Auswaschen in destilliertem Wasser bei 4-6 maligem Wasserwechsel.
9. 2 %ige Resorzinlösung und Einwirkung von Sonnenlicht, bis die Schwärzung genügend ist.
10. Einlegen in 5 %ige Natriumthiosulfatlösung.
11. Auswaschen, 10 %iges Glycerin, freiwilliges Eindicken usw. Der Einschluß ist in allen Medien möglich.

§ 192. SiIberimprägnationen. Silberimprägnationen werden in der mikroskopischen Technik häufig angewendet. So in der Medizin zur Darstellung der *Spirochaeta pallida* und anderer Spirillen und Spirochäten, ferner zur histologischen Untersuchung des Gehirns und zum Nachweis von Kalk. In der botanischen Technik erweisen sich die Silberimprägnationen für Spezialzwecke recht brauchbar. Das Silber kann in verschiedener Weise in die Objekte eingeführt werden.

§ 193. Jodsilberverfahren nach *Straßburger*. Man verbringt die Objekte wie bei der Goldimprägnation in die *Lugolsche* Lösung und nach dem Waschen in eine 1 %ige Silbernitratlösung. Es bildet sich Silberjodid, das in Wasser unlöslich ist. Dieses Silberjodid hat merkwürdige Eigenschaften. Es ist zwar lichtempfindlich, aber die Reduktion durch das Licht wird durch das Lagern im Dunkeln wieder rückgängig gemacht. Silberbromid und Silberchlorid haben bekanntlich diese Eigenschaften nicht. Das Silberjodid hat die Fähigkeit, sich mit allen basischen Farbstoffen und einigen sauren Farbstoffen anzufärben. Bekanntlich wurde darauf das Diachromie genannte Dreifarbenphotographie-Verfahren aufgebaut.

Dieses Silberjodid ist nach Belichtung zu entwickeln mit folgendem Entwickler:

Destilliertes Wasser	100 ccm
Natriumsulfit	10 g
Hydrochinon	2 g

Nach *Straßburger* gibt man noch zu 1ccm dieses Entwicklers einen Tropfen einer 10 %igen Kaliumcarbonatlösung; das Objekt bräunt sich, die Färbung kann durch eine 0,2 %ige Goldchloridlösung wie eine Photokopie nachträglich getont werden.

§ 194. Silbernitratverfahren nach *Straßburger*. Insbesondere für Stärkekörner geeignet. Die *trockenen* Stärkekörner werden mit 5 %iger Silbernitratlösung behandelt, so daß sie sich damit vollsaugen, worauf sie oberflächlich abgetrocknet werden. Sodann verbringt man sie in 0,75%ige Kochsalzlösung. Dabei entsteht Silberchlorid, das wie oben am Licht reduziert wird. Trocknen, Einschluß in Harze.

§ 195. Imprägnation mit Osmium.

FX

Die Objekte werden fixiert in einem Gemisch von l %iger wässriger Osmiumsäure und l %iger Chromsäure zu gleichen Teilen. Beliebig fixiertes Material wird nachträglich mit l %iger wässriger Osmiumsäure behandelt. Dauer der Behandlung 12-24 Stunden im Dunkeln. Hernach wird grünlich ausgewaschen.

FB

Die Schwärzung erfolgt in rohem Holzessig und dauert 1-2 Tage. Man kann auch eine 2 %ige wässrige Pyrogallussäurelösung oder eine 2 %ige Tanninlösung nehmen. Bei dieser Behandlung schwärzen sich alle Bestandteile der Zellen verschieden stark wie bei einer Farblösung.

DF

Mit 0,25 %iger Kaliumpermanganatlösung während 1-4 Minuten. Darauf l %ige wässrige Oxalsäurelösung für 5 Minuten zur Entfernung des überflüssigen Permanganates.

§ 196. Rutheniumrot ist keine organische Farbe, sondern Rutheniumsesquichlorid. Es wird am besten in kleinen Mengen in Glasampullen gekauft; im Dunkeln aufbewahrt ist es haltbar. Nach Entnahme einer Probe schmilzt man die Ampulle wieder zu.

FB

Man benützt eine Lösung 1:5000 oder 1:10000 in heißem destillierten Wasser, der nach Abkühlen noch einige Tropfen Ammoniak zugefügt werden. Diese Lösung ist lichtempfindlich und hält auch im Dunkeln nur kurze Zeit. Rutheniumrot löst sich nicht in Alkohol, Glycerin, Nelkenöl, dagegen leicht in Wasser. Gefärbt wird am besten mit der oben angeführten ammoniakalischen Lösung.

DA Die Färbedauer muß ausprobiert werden.

BM Rutheniumrot färbt:

a) den Casparischen Streifen bei Equisetum rot (Gegenfärbung mit Methylenblau).
b) Pektin und Glykose bei Pilzen.
c) die Gallertscheiden einiger Algen wie *Nostoc, Zygnema und Gloecapsa*.

§ 197. Kernschwarz. Kernschwarz ist eine Eisentinte von nicht näher bekanntgegebener Zusammensetzung. Man bezieht entweder die fertige Lösung oder das trockene Farbpulver, das man nach Vorschrift der Herstellerfirma auflöst.

FX Beliebig.
FB Aus destilliertem Wasser kommen die Objekte in die Lösung.
DA Minuten bis Stunden.
DF Salzsaurer Alkohol.
BM

Kerne und unverholzte Zellwände schwarz bis blau. Kernschwarz färbt Zelloidin stark an!

§ 198. Tannin-Eisenchlorid-Färbung. Die Tannin-Eisenchlorid-Färbung war in der Zeit vor dem Aufkommen der organischen Farben eine gern gebrauchte Färbung. Man benötigt zwei Lösungen:

Lösung I.

Destilliertes Wasser	50 ccm
Tannin	1 g
Karbolsäure	1 Tropfen

Lösung II.

Destilliertes Wasser	160 ccm
Eisenchlorid	1 g

Die Tannin-Eisenchlorid-Färbung eignet sich vor allem zur Schnittfärbung. Der Zellinhalt wird am besten vorher mit Eau de Javelle entfernt.

FX Beliebig.
FB

Die Objekte kommen 3 Minuten in Lösung I und sofort ohne Abspülen in Lösung II. Hier sofort Umschwenken und dann nach 10-20 Sekunden in frische Lösung II.

DA 2 Minuten; Abspülen.
BM

Das Resultat ist eine blauviolette bis schwarze Färbung. Durch Behandlung mit 5 %iger wässriger Zitronensäure läßt sich diese Färbung in einen grünen angenehmen Ton umwandeln.

§ 199. Schwefeleisen-Imprägnation nach *Kisser* (51). Diese Methode ist eine reine Plasmafärbung, die sich nach *Kisser* besonders zur Nachfärbung nach Kernechtrot eignet.

FB

1. Die Objekte kommen 12 Stunden in eine 1 %ige wässrige Lösung von Schwefelnatrium oder Schwefelammonium.
2. Auswaschen mit destilliertem Wasser.
3. 30 Minuten behandeln in folgender Lösung:

Destilliertes Wasser	100 ccm
Gelbes Blutlaugensalz	20 g
Salzsäure	1 ccm

4. Auswaschen

(51) Josef Kisser, Mikrokosmos XXVIII, 1934/35, S.113

§ 200. Imprägnation mit Schwefelblei. Bei der Goldimprägnation ist die färbende Substanz kolloidales metallisches Gold. Das Verfahren ist vom Sonnenlicht abhängig. In ähnlicher Weise lassen sich sehr schöne, kastanienbraune Imprägnationen von Bleisulfid erhalten. Diese Färbung ist sehr haltbar und das Verfahren vom Licht unabhängig. Das ganze Verfahren kann im Tageslicht vorgenommen werden.

FX Beliebig.
FB

Die Objekte kommen wie bei der Goldimprägnierung.

1. in die Jodjodkalilösung und nach kurzem Wässern
2. in eine frisch hergestellte Lösung von 0,5-1 g Bleiacetat in 100 ccm Wasser. Die Lösung hält sich nur etwa 1 Stunde, dann trübt sie sich. Zeitdauer der Verbleiung 15 Minuten. Wässern.
3. Hierauf erfolgt die Schwärzung in 0,5 %iger frischer Lösung von Natriumsulfid.

Der resultierende Ton ist ein schönes Kastanienbraun, das aus Bleisulfid besteht und absolut beständig ist.

Bleiformiat oder Bleinitrat sind in ihren Lösungen beständig. Das Arbeiten mit ihnen wäre daher viel angenehmer. Die resultierenden Farbtöne sind jedoch weniger schöne Sepiatöne.

DF

Eine Differenzierung ist hier nicht möglich und die Dosierung des Farbtones muß bei der Jodierung erfolgen. Auflösen der Verbleiung ist mit Kaliumcyanidlösung möglich.

§ 201. Imprägnationen mit Berliner Blau.

I. Verfahren mit löslichem Berliner Blau.

Das sogenannte lösliche Berliner Blau ist Kaliumferriferrozyanid. Es färbt in oxalsaurer Lösung unverholzte Zellwände. Herstellung der Lösung:

1 g lösliches Berliner Blau und 0,25 g Oxalsäure werden mit sehr wenig destilliertem Wasser übergossen und unter mehrmaligem Umrühren (Reibschale, Pistill!) einige Stunden, eventuell über Nacht, stehen gelassen. Hierauf füllt man auf 100 ccm mit Wasser auf.

Die Färbedauer beträgt einige Stunden, Gegenfärbung der verholzten Elemente mit Fuchsin ist möglich. Die Färbung ist nur in neutralen Harzen haltbar.

II. Verfahren mit unlöslichem Berliner Blau.

Das gewöhnliche Berliner Blau - Ferriferrozyanid - ist in Wasser und in Alkohol unlöslich und wird durch eine chemische Reaktion in den zu imprägnierenden Objekten erzeugt. Man behandelt die Objekte mit einer 1 %igen wässrigen Eisen-III-salzlösung (z.B. FeCl3), wäscht gut aus und bläut dann mit einer 10 %igen wässrigen Lösung von gelbem Blutlaugensalz, die mit ein paar Tropfen Salzsäure angesäuert worden ist. Fällt die Färbung zu schwach aus, kann der Prozeß wiederholt werden. Diese Berliner-Blau-Imprägnation ist auch in Glycerin und Glyceringelatine sowie in Hausenblasengallerte haltbar.

§ 202. Darstellung von Gerbstoffen mit Eisensalzen. Schnitte aus frischem Material oder formolfixierten Objekten, unter Umständen auch kleine Totalpräparate, werden mit l %iger Ferrosulfatlösung behandelt. Die Stellen, die Gerbstoffe enthalten, färben sich blauschwarz oder grünschwarz.

Die Nuklealreaktion nach *Feulgen*

§ 203. Die Nuklealreaktion nach *Feulgen* gestattet das Färben der Kerne in absolut echter Weise. Gefärbt werden aber nur Kernsubstanzen vom Typus der Thymonukleinsäure. Wo diese Substanzen fehlen, versagt daher diese Methode. Die Methode ist geeignet für Schnitte und kleine Totalpräparate. Zur praktischen Ausführung werden gebraucht:

1. Normal-Salzsäure (n-Salzsäure).

   Am besten fertig bezogen. Selbstherstellung: 82,5 ccm konzentrierter Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,19 werden mit destilliertem Wasser auf 1000 ccm verdünnt.

2. Fuchsinschweflige Säure (*Schiffs* Reagens).

   1 g Parafuchsin wird in einem Erlenmeyerkolben mit 200 ccm kochendem destillierten Wasser übergossen und unter Umschütteln gelöst. Auf 50 °C abgekühlt wird es in ein Aufbewahrungsgefäß mit Glasstopfen filtriert. Zur Lösung gibt man 20 ccm n-Salzsäure und kühlt auf 25 °C ab. Jetzt gibt man 1 g reines gepulvertes Natriumbisulfit zu und verschließt sorgfältig. Es bildet sich die schwach gelblich gefärbte fuchsinschweflige Säure. Manche Autoren geben als Farbe Fuchsin an.

Fuchsin enthält immer etwas Parafuchsin. Diese Lösungen reagieren aber schwächer als die mit Parafuchsin hergestellten Lösungen.

3. Waschflüssigkeit (SO2-haltiges Wasser).

Leitungswasser	200 ccm
10 %ige Natriumbisulfitlösung	10 ccm
n-Salzsäure	10 ccm

Gut verschlossen aufbewahren.

Die Durchführung der Nuklealreaktion nach *Feulgen* ist einfach, aber an die Anwendung von Wärme gebunden. Die Objekte - Schnitte, Algen usw. – kommen

1. in ein Becherglas von 200 ccm Fassungsvermögen und werden hier einige Zeit bei 60 °C mit n-Salzsäure behandelt. Dieser Vorgang ist eine Hydrolyse. Die Dauer der Behandlung hängt ab von dem verwendeten Fixiermittel und der Größe der Objekte. (Siehe weiter unten!).
2. Nach Beendigung der Hydrolyse werden die Objekte zur Unterbrechung des Prozesses in kalte n-Salzsäurelösung verbracht, und dann in destilliertem Wasser ausgewaschen. Schnitte brauchen nur kurz abgewaschen zu werden, größere Objekte benötigen eventuell 1 Stunde.
3. Nach dem Waschen kommen die Objekte in die fuchsinschweflige Säure für 1-3-6 Stunden und länger. Überfärbung tritt nie ein, d.h. es wird nie mehr gefärbt, als durch die Hydrolyse vorbereitet ist. In die fuchsinschweflige Säure sollen die Objekte mit möglichst wenig anhaftendem Wasser übertragen werden, da sonst die fuchsinschweflige Säure bereits durch das Wasser zersetzt werden kann.

Die Nuklealreaktion nach *Feulgen* ist ein chemischer Nachweis von Aldehyden. Es werden daher die Aldehyde überall nachgewiesen, wo sie sich vorfinden. So färben sich z.B. bei Pflanzen verholzte Zellwände, Versteifungskörper der Gefäßtracheiden, Kork und gar manche dünne Kutikulaarten.

Das Hauptergebnis der Nuklealfärbung ist eine Kernfärbung von blaustichigem Rot. Es können alle bekannten optisch günstigen Plasmafärbungen damit kombiniert werden.

Bei der Durchführung der Nuklealreaktion hat man schon beim Fixieren darauf zu achten, daß keine Fixiermittel Verwendung finden, die Aldehyde abspalten oder oxydierend wirken.

Die Hydrolysedauer hängt auch vom Fixiermittel ab. Geeignet sind folgende Fixiermittel:

1. 6 %ige wässrige Sublimatlösung 100 ccm mit Eisessig 2 ccm; Hydrolysezeit ca. 4 Minuten.
2. 96 %iger Alkohol 60 ccm mit Eisessig 40 ccm; Hydrolysezeit ca. 4-8 Minuten.
3. Gemisch von *Carnoy*:

Alkohol, 96%ig	60 ccm
Chloroform	30 ccm
Eisessig	10 ccm

Hydrolysedauer: 8 Minuten.

4. *Bouinsche* Lösung; Hydrolysedauer 15-22 Minuten.
5. Chromessigsäure nach *Flemming*; Hydrolysedauer 5-15 Minuten.
6. *Zenkers* Gemisch; Hydrolysedauer 5 Minuten.

Die Hydrolysedauer ändert sich natürlich auch mit den Objekten. Die angegebenen Zeiten beziehen sich auf Schnitte. Totalpräparate können andere Zeiten benötigen.

Die Nuklealreaktion ist mehr ein Instrument wissenschaftlicher Forschung zum Nachweis der Thymonukleinsäure als eine Präparationsmethode für allgemeine Zwecke. Mit ihr ist es z.B. gelungen, den Chromidialapparat der Blaualgen zu erkennen. Das Hauptanwendungsgebiet dürfte jedoch die Pathologie bleiben, wo Abbauerscheinungen im Zellkern damit studiert werden können.

Kapitel VII Einschließen und Fertigmachen der Präparate

A. Das Einschließen der Präparate

§ 204. Die Objekte haben nun, vom Sammeln des Materials angefangen über die gesamte Präparation einen weiten Weg zurückgelegt. Was so mühevoll fixiert, geschnitten, gefärbt und gebeizt ist, soll nun als Dauerpräparat endgültig der Sammlung einverleibt werden. Zum Einschließen zwischen Objektträger und Deckglas steht eine große Anzahl von Einschlußmitteln oder Medien zur Verfügung. Es können natürlich längst nicht alle bekannten Medien hier behandelt werden, doch hat der Leser soviel Auswahl, daß er bestimmt für jedes Objekt und jeden Zweck ein oder zwei Medien zur Verfügung hat.

Die Wahl der Einschlußmittel wird nun nach zwei Gesichtspunkten vorgenommen:

1. Es müssen die optischen Eigenschaften des Mediums so beschaffen sein, daß das Objekt am günstigsten beobachtet werden kann.
2. Es müssen die chemischen Eigenschaften des Mediums so beschaffen sein, daß eine möglichst lange Lebensdauer der Präparate garantiert ist.

Unter Berücksichtigung der Eigenarten der Objekte und der Medien ist dann der weitere Präparationsweg vorgezeichnet.

Die optischen Eigenschaften eines Mediums werden durch seinen Brechungsexponenten gekennzeichnet. Die Brechungsexponenten der meisten Einschlußmittel sind bekannt. Die beste Einbettung findet ein Objekt dann, wenn die Brechungsexponenten von Objekt und Einschlußmedium ziemlich differieren. Dies gilt vor allem für ungefärbte Objekte, bei gefärbten Objekten ist dies nicht so entscheidend.

Es gibt nun flüssig bleibende, weich bleibende und völlig trocknende, erstarrende Einschlußmittel. In chemischer Hinsicht sind die Medien sehr verschieden. Die besten sind unstreitig diejenigen, die neutral sind und es auch bleiben.

Flüssige Medien

Von den flüssigen Medien haben nur **Glycerin**, Lösungen von **Kaliumacetat** und eventuell **Paraffinum liquidum** praktische Bedeutung. Nach Literaturangaben sind noch eine größere Reihe anderer Medien versucht worden wie Formalinlösungen, Zuckerlösungen, Lösung von Chloralhydrat in Kampfer, Borglycerin nach *Berens* usw. Diese Lösungen verdunsten entweder mit Sicherheit oder die gelösten Stoffe kristallisieren aus. Die Präparate sind dann endgültig verdorben.

§ 205. Glycerin.

1. Glycerin konzentriert oder mit 50% Wasser verdünnt wird häufig zum Einschließen verwendet. Das Glycerin muß chemisch rein sein. Am besten ist doppelt destilliertes Glycerin. In Glycerin halten sich das Blattgrün, Färbungen mit Sudan und mit *Becher*-Farben, Imprägnationen mit Gold, Bleisulfid und Osmium; Karminfärbungen halten sich gut, Hämatoxylinfärbungen nicht.

Vielfach wird Glycerin nur als Einschlußmittel genommen, weil es vermeintlich ein sehr rasches und einfaches Arbeiten ermöglicht. Bevorzugt werden kleine Objekte.

Glycerin ist in den allermeisten Fällen durch andere Einschlußmittel zu ersetzen, die sicherer zu verarbeiten sind und die einen ähnlichen Brechungsexponenten aufweisen. Die Brechungsexponenten von Glycerin und seinen gebräuchlichsten Gemischen sind folgende:

Gemisch	Brechungsexponent
Glycerin puriss.	1,456
Glycerin + Aqua dest. zu gleichen Teilen	1,397
Glycerin mit Chloralhydrat gesättigt	1,51
Glycerin mit Cadmiumchlorid gesättigt	1,54
Glycerin mit Zinkjodid gesättigt	1,56

Von den Kryptogamen sind mir bisher eigentlich nur zwei Objekte bekannt geworden, die sich nur in Glycerin ohne jede Schrumpfung einschließen lassen sollen, nämlich *Volvox globator* und die jüngsten Stadien von Moosembryonen.

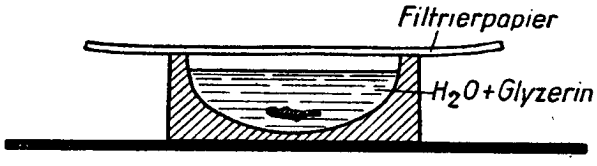
2. Obwohl das Glycerin in den meisten Fällen entbehrt werden kann, soll jeder mikroskopierende Botaniker die Technik der Herstellung einwandfreier Glycerinpräparate beherrschen.

In Glycerin schließt man nur kleine Objekte ein wie Algen, Pilze, kleine Schnitte usw. Die Objekte müssen aus Wasser schonend in Glycerin übergeführt werden. Dies geschieht dadurch, daß sie aus 10% igem Glycerinwasser durch Verdunsten des Wassers allmählich in konzentriertes Glycerin gelangen.

Auf einem Objektträger macht man nun mit Glyceringelatine einen Ring (52), dessen Höhe von der Stärke des einzubettenden Objektes abhängt. Nach seiner Erstarrung wird das Glycerin mit dem Objekt in den Ring verbracht und das Deckglas aufgedeckt. In den allermeisten Fällen bleibt eine kleine Luftblase im Glycerin. Nach Meinung verschiedener Autoren ist diese Luftblase vielleicht auch notwendig, damit später nach dem Lackverschluß das Glycerin durch Wärmeausdehnung den Lackrahmen nicht beschädigt. Das Deckglas wird nun mit einer entsprechend zugeschnittenen Pappscheibe zugedeckt und das Ganze in eine Objektpinzette geklemmt. Wenn die Oberfläche des Gelatineringes einigermaßen eben war, ist der Abschluß jetzt so gut, daß mittels Pipetten, Wasser und Fließpapier etwa übergetretenes Glycerin entfernt werden kann.

Wer über keine Ringmaschine zum Ziehen der Gelatineringe verfügt, kann sich nach *Eckert* behelfen (53). Auf den Objektträger wird ein Tropfen Glyceringelatine aufgetragen und nach dem Erstarren aus diesem Tropfen eine Kammer für das Objekt herausgeschnitten. Diese Kammer muß mit destilliertem Wasser ausgewaschen werden. Hierauf ist sie bereit zum Einbetten. Nach Austrocknen des Zwischenraumes zwischen Deckglas und Objektträger wird dieser von dem Rande her mit Caedax oder Canadabalsam ausgefüllt, ohne daß die Pappscheibe beschmutzt wird. Nach völligem Trocknen des Lackrahmens kann die Objektpinzette entfernt werden. Solche Präparate sind dauernd haltbar. Ganz ängstliche Gemüter können nun noch abschließend einen weiteren Lackrahmen anbringen.

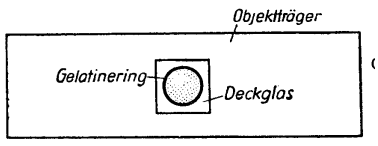
Abb.8



Langsames Eindicken von verdünntem Glycerin unter Staubschutz

(§ 205 Ziff.2)

Abb.9

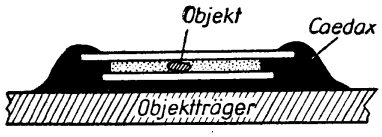


Herstellung eines Glycerin-Dauerpräparates unter Benutzung eines Gelatineringes

(§ 205 Ziff.2)

3. Eine weitere sehr elegante Methode, haltbare Glycerinpräparate herzustellen, ist folgende von *W.Diehl* beschriebene (54). Man benötigt ein kleineres und ein größeres Deckglas, die im übrigen rund oder eckig sein können. Auf das größere Deckglas kommt in die Mitte das Objekt mit einem Tropfen Glycerin. Es wird mit dem kleineren Deckglas zugedeckt. *Das Glycerin darf den Rand des größeren Deckglases nicht erreichen.* Auf den Objektträger hat man mittlerweile einen gehörigen Tropfen Caedax oder Canadabalsam gegeben. Und nun kommt die Geschicklichkeitsprobe! Das größere Deckglas wird aufgehoben und umgedreht und dann mit dem kleinen Deckglas direkt auf den Balsamtropfen gesetzt. Der Balsam breitet sich nun aus, dringt, wie es die beigegebene Abbildung zeigt, in den Zwischenraum der zwei Deckgläser ein und über den Rand des größeren Deckglases hinweg. Die ganze Sache ist nicht so schwierig, wie sie sich zunächst ansieht. Einarbeitung ist natürlich notwendig.

Abb.10



Optischer Schnitt durch ein Glycerin-Dauerpräparat nach *Diehl*

(§ 205 Ziff.3)

(52) W.Seyser, Gelatinering. Im Mikrokosmos XXVI, 1932/33, S.183

(53) F.Eckert, Zeitschrift f. wissenschaftl. Mikroskopie, Bd. 50, 1933, S.213

(54) Zitiert nach: Mikrokosmos XXIII, 1929/30

§ 206. Kaliumacetat. Von Kaliumacetat lösen sich 250 g in 100 ccm Wasser. Der Brechungsindex dieser Lösung ist 1,370. Am meisten angewendet wird eine Lösung von 1 g Kaliumacetat in 1 ccm Wasser. Das Überführen der Objekte in das Kaliumacetat geschieht hier durch das Durchlaufenlassen durch eine Stufenleiter wie 10 %ige, 20 %ige, 30 %ige, 50 %ige, 80 %ige und 100 %ige Lösung. Treten Schrumpfungen auf, was selten vorkommt, muß man die Reihe wieder zurückgehen. Das Chlorophyll hält sich in Kaliumacetat; die Objekte dunkeln manchmal in dem Medium nach. Zum Einschließen bedient man sich ebenfalls eines Ringes, der aus Bienenwachs oder Gelatine sein kann. Zum Umranden benützt man Caedax oder ähnliche Harze. Kaliumacetat bleibt als Einbettungsmedium unverändert.

§ 207. Paraffinum liquidum. Paraffinum liquidum hat einen Brechungsexponenten von 1,482. Nach *Schmelzer* macht man den Lackrahmen zum Einschließen am besten aus einer Mischung von Bienenwachs und Colophonium. Man kann ihn natürlich mit jedem Medium machen, das sich nicht in Paraffinum liquidum löst, daher auch mit Syndeticon oder Gelatine. In Paraffinum liquidum können die Objekte nicht aus Wasser und Alkohol, wohl aber aus Benzol, Äther, Chloroform, Terpineol, Xylol und Amylalkohol überführt werden. In Paraffinum liquidum halten sich auch sehr empfindliche Färbungen wie Giemsa, Tolluidinblau, Thionin usw. sehr gut.

Erstarrende Medien

§ 208. Weitaus am häufigsten werden Medien angewandt, die nach der Fertigstellung der Präparate früher oder später erstarren. Wir verfügen über wasserhaltige erstarrende Einschlußmittel und über Öle und Harze, die entweder selbst erstarren oder in organischen Lösungsmitteln aufgelöst sind. Zuerst erfolgt die Besprechung der wasserhaltigen Einschlußmittel.

Gelatine als Einschlußmittel

§ 209. Glyceringelatine nach *Kaiser*. Die Einbettgelatine nach *Kaiser* ist wohl die älteste und bekannteste. Herstellungsvorschrift:

Destilliertes Wasser	42 ccm
Glycerin pur.	38 ccm
Gelatine	7 g
Karbolzusatz	

Von der Selbstherstellung ist, wie bei allen anderen gelatinehaltigen Einbettmitteln, dringend abzuraten. Man erhält in der Regel keine klaren Medien. Die gewöhnliche gebleichte Küchengelatine kann nicht benützt werden, da sie durch das Bleichen zuviel Schwefeldioxid enthält. Ferner kommt es bestimmt teurer, sich das Medium selbst herzustellen als es käuflich zu erwerben.

Glyceringelatine ist ein Medium, das immer leicht sauer reagiert. Sie enthält etwa 11,5% Gelatine. Der Brechungsexponent ist 1,42 bis 1,44. Nach *Romeis* beträgt er 1,474.

Haltbar in Glyceringelatine sind das Chlorophyll nach Kupferfixierung und nach Inaktivierung der Phyllozyansäure, die Färbungen mit *Becher*-Farbstoffen, die Imprägnationen mit Gold und mit Bleisulfid. Befriedigend halten sich basische Anilinfarben manchmal nach Beizung. Karmin und Hämatoxylinfärbungen halten sich in allen Gelatineeinbettmitteln nicht!

§ 210. Glycerin-Hausenblasengallerte nach *Behrens*. Hausenblase ist Fischleim. Die beste Sorte ist im Handel unter der Bezeichnung *Colla piscium Saliansky raspatum* erhältlich. Die Originalvorschrift von *Behrens* lautet:

Kampferwasser	100 ccm
Glycerin	100 g
Hausenblase	25 g

Nach meinen Erfahrungen schützt der Kampfer nicht genügend vor Schimmelpilzen. Man ersetzt ihn deshalb besser durch Karbolsäure. Das Medium enthält etwa 8% Hausenblase. Die Glycerin-Hausenblasengallerte nach *Behrens* ist eine wasserhelle Gallerte, deren Brechungsexponent kleiner ist als der Glyceringelatine nach *Kaiser*. Genau bekannt ist er nicht. Zarte Einzelheiten ungefärbter Objekte präsentieren sich daher in ihr schöner und ausdrucksvoller. Färbungen halten sich aber darin weniger gut als in der Glyceringelatine nach *Kaiser*.

§ 211. Glyceringelatine nach *Kisser* (55). *Kisser* hat eine wasserärmere Gelatine ausgearbeitet, die nach Angabe des Autors ohne Lackrahmen dauernd klar bleibt. Herstellungsvorschrift:

Destilliertes Wasser	175 ccm
Glycerin pur.	150 g
Gelatine	50 g
Karbolsäure	2 g

Das Einschlußmedium enthält 18% Gelatine und soviel Glycerin, daß ein Sprödewerden ausgeschlossen ist. Haltbarkeit der Objekte wie in Glyceringelatine nach Kaiser.

(55) Josef Kisser, Zeitschrift f. wissenschaftl. Mikroskopie 51, 1935, S.376

§ 212. Kaliumacetatgelatine nach *Schömmer* (56). Herstellungsvorschrift: Zu Glyceringelatine nach Kaiser werden 20 Gewichtsprozent Kaliumacetat gegeben. In Glyceringelatine ohne Karbolzusatz tritt Schimmelpilzbildung auf. Dieses Medium braucht ebenfalls keinen Lackrahmen, da es so stark hygroskopisch ist, daß der Wassergehalt konstant gehalten wird. Haltbarkeit der einzelnen Färbungen usw. wie bei den vorhergehenden Gelatineeinbettungsmitteln.

(56) Franz Schömmer, Mikrokosmos XXVI, 1932133, S. 175

§ 213. Lactophenol-Glyceringelatine nach *Amman.* Zusammensetzung:

Destilliertes Wasser	35 ccm
Gelatine	7 g
Glycerin	45 g
Lactophenol	12 ccm

Durch den Gehalt an Phenol und Milchsäure ist das Medium stark sauer. Dieses Einschlußmittel hellt sehr auf und hat ungefähr denselben Brechungsexponenten wie Canadabalsam. Lactophenol-Glyceringelatine nach *Amman* ist ein Spezialmedium zum Einbetten ungefärbter Objekte, wenn starke Aufhellung erwünscht ist. (Sporenpulver!)

§ 214. Kupfer-Lactophenol-Glyceringelatine nach *Amman.* Die Zusammensetzung ist genau wie vorhergehendes Mittel, nur daß statt Lactophenol eben das Kupferlactophenol verwendet wird. Das Medium ist nicht haltbar. An der Luft schon entfärbt sich der obere Teil in der Vorratsflasche gelblich und verdirbt damit. Nach *Eckert* ist die Haltbarkeit des Chlorophylls der Grünalgen in dem Medium gut. Moose können darin jedoch nicht eingebettet werden, durch lösliche Stoffe der Moose wird das ganze Einschlußmittel innerhalb der Präparate braun bis schwarz.

§ 215. Lävulose-Gelatine nach *Heringa* und *ten Berge*. Zusammensetzung:

Destilliertes Wasser	15 g
Gelatine	1,125 g
Lävulose	26 g
Kalialaun	0,075 g

Bei der Herstellung (57) löst man zuerst die Lävulose in destilliertem Wasser auf. Zweckmäßig benützt man einen Einbettofen (56 ^{O}C) und läßt das zugedeckte Glas darin über Nacht stehen. Inzwischen hat man die Gelatine (*Heringa* schreibt Gelatine für histologische Zwecke der *Lijm- und Gelatinefabrik zu Delft, Holland* vor) eine halbe Stunde aufquellen lassen. Die gequollene Gelatine löst man nun in der Lävulose auf, setzt den Alaun zu und filtriert auf einem Warmwassertrichter.

Das Einschlußmittel ist leicht honiggelb gefärbt. Es trocknet sehr schnell unter der Gefahr der Luftblasenbildung und muß spätestens nach 48 Stunden mit einem Lackrahmen versehen werden.

In diesem Einschlußmittel halten sich alle gefärbten Präparate sehr gut, bis auf Karmin- und Hämatoxylinfärbungen. Gut ist auch die Haltbarkeit des Chlorophylls.

Die Herstellung der Lävulose-Gelatine ist schwierig.

Ein Mittel mit ähnlichen Eigenschaften ist der einfache Lävulosesyrup nach *Heringa*.

Man löst 20 g Lävulose in 15 ccm destilliertem Wasser durch längeres mäßiges Erwärmen auf. Überführen der Objekte aus Wasser. Ein Lackrahmen ist nicht unbedingt erforderlich. Der Lävulosesyrup erhärtet wie Canadabalsam.

(57) T.Péterfi: *Methodik der wissenschaftlichen Biologie*, Bd.I. Allgemeine Morphologie. S. 587 u.f. Berlin, Julius Springer, 1928

§ 216. Glucose-Gelatine. Die organischen Färbungen würden sich sehr gut in glucosehaltigen Medien halten. Eine Glucose-Glyceringelatine ist aber nicht möglich, da sie nicht haltbar ist. Sie bräunt sich bald nach der Herstellung in der Vorratsflasche.

§ 217. Niglitin nach *Eckert* (58). Niglitin ist vermutlich eine Glyceringelatine nicht näher bekannt gewordener Zusammensetzung, die ein unlösliches schwarzes Füllmittel enthält. Es wird in zwei nach dem Füllmittel verschiedenen Stärkegraden hergestellt und ist von *Hollborn* in *Leipzig* zu beziehen. Niglitin ist ein Spezialmedium für die Darstellung ungefärbter oder gefärbter Schleimhüllen bei Süßwasseralgen. Die Fixierung erfolgt in Chromessigsäure, das Färben mit Alizarinviridin nach *Becher*. Die Übertragung geschieht aus Glycerin. Die Algen zeigen sich in leuchtenden Farben, ähnlich dem Dunkelfeldeffekt.

(58) F.Eckert, *Praktische Mikroskopie* XI, 1933 und XII, 1934

§ 218.

1. Das Arbeiten mit den Gelatineeinschlußmitteln ist nicht schwierig. Die einzuschließenden Objekte werden aus Glycerin übertragen, nur bei der Lävulose-Gelatine nach *Heringa* und *ten Berge* überträgt man besser aus Wasser. Zeigen sich die Objekte gegen Schrumpfung sehr empfindlich, so werden sie nicht aus Glycerin, sondern aus den Einschlußmitteln übertragen, die 5-10 fach verdünnt wurden. Das Medium läßt man dann langsam freiwillig eindicken. Wenn das Medium anfängt dick zu werden, wird leicht erwärmt, ihm die Objekte entnommen und diese in neuem erwärmten Medium eingeschlossen.

Das Einschließen kann in verschiedener Weise erfolgen.

a) Man erwärmt einen Teil des Mediums in einem Reagensglas im Wasserbade und entnimmt diesem mittels einer Pipette das verflüssigte Medium.

b) Oder man schneidet aus dem Medium in der Vorratsflasche ein kleines Stück heraus, verbringt es auf den Objektträger und erwärmt vorsichtig über kleiner Spiritusflamme. Luftblasen bilden sich leicht, können aber in der Regel durch eine angewärmte Nadel entfernt werden. Hierauf kommt das Objekt in das verflüssigte Medium. Zuletzt legt man ein angewärmtes oder angehauchtes Deckglas auf. Durch das Anhauchen bildet sich ein feiner Wasserüberzug, der weitgehend die Bildung von Luftblasen verhindert.

Wenn der Objektträger mit dem Medium auf einer zugedeckten Petrischale liegt, die mit warmem Wasser gefüllt ist, kann man ohne jede Hast und Aufregung das Einschließen auch großer Objekte unter großen Deckgläsern vornehmen.

2. Es lassen sich sehr große Formate von Objektträgern und Deckgläsern verwenden, so daß ganze Moose eingeschlossen werden können.

Bei eingeschlossenen, umfangreichen Objekten tut man gut, für einige Tage bis zum endgültigen, festen Erstarren kleine, mit Bleischrot gefüllte Glastuben auf die Deckgläser zu stellen. So kann Gewicht und Ort der Beschwerung leicht gewechselt werden. Blei selbst soll mit der Gelatine nicht in Berührung kommen, da es sich teilweise auflöst und dann zu Trübungen Anlaß gibt. Um das zu starke Quetschen der Objekte oder eine unregelmäßig schiefe Lage der Deckgläser zu vermeiden, werden in der bekannten Weise Splitter von Deckgläschen oder andere geeignete Objekte (Splitter von Hollundermark, aber keine Sandkörnchen) unterlegt.

Kleine Objekte können natürlich auch in derselben Weise wie bei den Glycerinpräparaten eingebettet werden.

Bei der Anfertigung besonders großformatiger Glyceringelatinepräparate braucht man auf das Austreten der Glyceringelatine und ihr Überfließen keine Rücksicht zu nehmen. Die Präparate lassen sich trotzdem ausgezeichnet mit einem Lackrahmen versehen. Bei großen Formaten kommt es recht häufig vor, daß beim Trocknen vom Deckglasrande her Lücken in der Gelatine entstehen. Diese füllt man unbekümmert mit geschmolzenem Medium unter Benützung eines Spatels auf.

§ 219. Über Lackrahmen für Gelatinepräparate sehe man nach: Umrahmungspaste nach *Kousal*, und bei Kopal-Emaillacke. § 239, § 242.

Gummi arabicum als Einschlußmittel

§ 220.

1. Gummi arabicum ist eines der ältesten Einschlußmittel. Es wird auch heute noch in der Botanik und besonders in der Zoologie viel benützt, so daß angenommen werden muß, daß schätzenswerte Eigenschaften des Mittels vorliegen müssen. Dies ist in der Tat der Fall. Die Präparate sind mit den Gummimedien leicht herzustellen, auch der Lackrahmen. Ferner können die Gummimedien durch Zusätze wie Chloralhydrat, Phenol, Milchsäure, Kaliumacetat und anderem mehr in ihren optischen und chemischen Eigenschaften weitestgehend beeinflußt werden.

2. Ein nicht zu vermeidender, ungeheuer großer Nachteil ist jedoch die Frostempfindlichkeit der fertigen Präparate. Durch Frost verdirbt jedes Gummipräparat so vollständig, wie nur irgend denkbar. Dies gilt auch für jene Präparate, die mit einem Lackrahmen versehen worden waren. Diese Methoden eignen sich daher eigentlich nur für warme Länder, in denen Frostgefahr nicht besteht. In Mitteleuropa können Präparate durch Versagen einer Heizungsanlage oder durch einen Umzug bei kalter Jahreszeit leicht zu Verlust kommen. Damit ist über die Brauchbarkeit der Gummi-Einschlußmittel alles gesagt.

Die Gummi-Einschlußmittel werden jedoch trotzdem ausführlich besprochen, um dem Leser die Präparationsmethoden vollständig zur Kenntnis zu bringen. Die verschiedenen Einschlußmittel kann man sich leicht selbst herstellen. Man verwendet ausgesucht helle Stücke von Gummi arabicum [kein Pulver!], um ein möglichst helles Einschlußmittel zu erhalten.

3. Gummi arabicum ist erhärteter Milchsaft von verschiedenen Arten der Gattung *Acacia*. Die beste Sorte ist das Gummi von *Acacia verek*, das sogenannte *Nilgummi* oder *Kordofangummi*. Für unsere Zwecke weniger geeignet ist das *Senegalgummi*. Andere Gummisorten, besonders wenn sie gelb oder rotbraun sind, sind für Einschlußmittel nicht zu gebrauchen.

Chemisch besteht Gummi arabicum aus den Kalk- und Alkalisalzen des Arabins. Es ist offizinell und wird in Apotheken vorrätig gehalten.

4. Die ausgesuchten hellen Stücke von Gummi arabicum werden in einer Weithalsflasche mit kaltem destillierten Wasser übergossen und darin aufgelöst, was einige Tage in Anspruch nimmt. Zu dieser Lösung können nun die verschiedensten Zusätze gegeben werden wie Chloralhydrat, Glycerin, Kaliumacetat, Zucker usw. Ein Desinfektionsmittel schützt vor Verderb. Zum Schluß filtriert man durch Glaswolle. Das Filtrieren dauert manchmal mehrere Tage, je nachdem Verunreinigungen im Gummi sind und je nach dem Wassergehalt der Lösung.

Die Aufbewahrung erfolgt am besten ebenfalls in Weithalsflaschen. Die Härtungsfähigkeit hängt ganz von dem Prozentsatz an Glycerin ab. Gute Erhärtung zeigen nur jene Medien, bei denen die Menge des Glycerins erheblich kleiner als die des Gummis ist. Anderenfalls härtet nur der Randstreifen etwas oder die Härtung unterbleibt vollends.

Die Zusammensetzung der bekanntesten Gummi-Einschlußmittel ist nun folgende:

§ 221. Gummi-Syrup nach Apathy (1892).

Destilliertes Wasser	50 ccm
Gummi arabicum	50 g
Rohrzucker	50 g

ferner einige Tropfen Karbolwasser oder Formalin

n = 1,524.

§ 222. Gummi-Glycerin nach *Apathy* (1912)

Destilliertes Wasser	50 ccm
Glycerin	50 g
Gummi arabicum	50 g
5 %iges Formalin	10 ccm

§ 223. *Fauresche* Lösung (1917)

Destilliertes Wasser	100 g
Glycerin	40 g
Chloralhydrat	100 g
Gummi arabicum	60 g

Liquido *Faure* ist ursprünglich für die Präparation von kleinen Arthropoden ausgearbeitet worden. Es hatte für diesen Zweck noch einen Zusatz von Kokain. Die Arthropoden wurden lebend in das Medium verbracht, in dem sie sehr rasch betäubt werden. Sie strecken sich dann und präparieren sich sehr schön. Liquido *Faure* hellt auch sehr dunkle ungefärbte Pflanzenschnitte gut auf, z.B. Fungi imperfecti in Blättern. Das Medium löst die Stärke auf.

§ 224. *Berlese*-Lösung

Destilliertes Wasser	50 ccm
Glycerin	20 ccm
Gummi arabicum	30 g
Chloralhydrat	100 - 200 g

Liquido *Berlesei* ist eine Weiterentwicklung von Liquido *Faure*. Es kann, wie oben angegeben ist, in zwei Stärken angefertigt werden. Die angeführten Mengen Chloralhydrat lösen sich tatsächlich in der geringen Menge Wasser auf. Nicht für gefärbte Schnitte. Günstiges Medium für dunkle Objekte in natürlichen Farben (Fungi imperfecti, Arthropoden). Die Trocknung der Präparate hat im Exsikkator zu geschehen. Der Lackrahmen ist schnellstens [?] anzulegen.

§ 225. Gummisyrup nach *Becher* und *Demoll*

Destilliertes Wasser	40 ccm
Gummi arabicum	20 g
Lävulose (Fruchtzucker)	20 g

Einige Tropfen Karbolwasser zum Desinfizieren

Zum Einschluß von Präparaten, die mit organischen Farben gefärbt worden sind. Haltbar sind alle Färbungen bis auf die Hämatoxylinfärbungen.

§ 226. Gummiglycerin nach *Farrant*

Destilliertes Wasser	33 ccm
Glycerin	33 g
Gummi arabicum	33 g
Arsenige Säure	0,1 g

Basische Farben halten sich verhältnismäßig gut, da sie von der arsenigen Säure gewissermaßen gebeizt werden.

§ 227. Lactophenolgummi nach *Amman* (1896)

Destilliertes Wasser	50 ccm
Gummi arabicum	38 g
Glucose (Traubenzucker)	5 g
Lactophenol	6 g

Das Einschlußmittel trocknet auffallend rasch. Die Milchsäure kristallisiert aber in jedem Fall aus, was unter Umständen sehr störend empfunden wird. Das Mittel wird daher kaum angewandt.

§ 228. *Hoyers* Einschlußmedium Nr.I. Dieses Einschlußmittel wird für Karmin- und Hämatoxylinfärbungen empfohlen. Die Haltbarkeit ist jedoch nicht befriedigend.

Herstellungsvorschrift: Man füllt Gummi arabicum in ein Glas bis zu 2/3 der Höhe und gießt, bis das Gummi gerade bedeckt ist, Wasser darauf, das 10% Glycerin und 3% Chloralhydrat aufgelöst enthält. n = 1,524.

§ 229. *Hoyers* Einschlußmedium Nr.II. Für Färbungen mit organischen Farbstoffen. Die Herstellung ist wie bei *Hoyer* I, jedoch begießt man das Gummi arabicum mit der in jeder Apotheke käuflichen offizinellen Kaliumacetatlösung (33,3 %ig), jedoch nicht mit Natriumacetatlösung. n = 1,524

Bemerkungen: Die Gummi-Einschlußmittel empfehlen sich besonders dann, wenn in rascher Folge eine größere Anzahl von Präparaten angefertigt werden sollen, an deren Haltbarkeit keine allzu große Anforderung gestellt wird, besonders für die Anfertigung von Zeichnungen oder Mikrophotographien für wissenschaftliche Arbeiten. Metallimprägnationen halten sich sehr gut in den Medien.

Harze und Öle als Einschlußmittel

§ 230. Hierher gehören folgende Medien: **Caedax, Canadabalsam, Venetianer Terpentin, Euparal, Sandarac und Zedernholzöl.** Diese Medien haben einen bedeutend höheren Brechungsindex als die bisher besprochenen Einschlußmedien. Sie eignen sich daher nur für gefärbte Objekte, da alle anderen zu hell werden, ja für das Auge sogar gänzlich verschwinden können. Die einzuschließenden Objekte müssen entweder aus dem Lösungsmittel des Harzes oder aus einem Medium übertragen werden, das sich mit dem Einschlußmittel mischen läßt.

§ 231. Caedax. Caedax ist ein völlig neutrales synthetisches Einschlußmittel der *Behringwerke*. n = 1,55. Es ist vollkommen farblos und dunkelt nicht nach. Es erhärtet in kurzer Zeit. Die Präparate können aus Terpineol oder aus Xylol übertragen werden. Bei Schnitten empfehle ich Terpineol. Das überschüssige Terpineol kann von den Schnitten mit nicht faserndem Filtrierpapier entfernt werden. Der Verfasser hat gefunden, daß in wenigen Tagen ganz beträchtliche Mengen Terpineol verdampfen, so daß eine ins Gewicht fallende Verzögerung des Erstarrens des Caedax nicht eintritt.

Terpineol ist zudem sehr tolerant gegen Wasser. Aus Brennspiritus, ja sogar aus 90 %igem Alkohol kann in Terpineol übergeführt werden. Nur sollen die Objekte dann ungefähr eine halbe Stunde in viel Terpineol liegen, um Zeit zu haben, das Wasser abzugeben.

Bei Xylolbenützung kann das Xylol, besonders bei Totalpräparaten, zu rasch verdampfen. Es treten dann im fertigen Präparat Luftblasen auf. Bei Terpineolübertragung besteht diese Gefahr nicht.

Caedax ist das ideale Einschlußmittel, das wärmstens und ohne jeden Vorbehalt empfohlen werden kann. In Caedax halten sich auch empfindliche Färbungen ausgezeichnet. Nur Karmin macht vielleicht eine Ausnahme, da es sich besser in sauren als in neutralen Medien hält. Wenn man dem Caedax aber ein kleines Kriställchen Salizylsäure beim Einschließen beigibt, ist auch dies behoben.

[Die ausgezeichneten Eigenschaften von Caedax können auch aus heutiger Sicht nur bestätigt werden! Leider ist dieses Einschlußmittel wegen seines hohen PCB-Gehaltes nicht mehr im Handel. Ältere Mikroskopiker verwenden es noch heute. Die Trocknung der Präparate muß allerdings im Trockenschrank bei 50 ^{O}C erfolgen.]

§ 232. Canadabalsam. Canadabalsam ist das Harz von *Pinus balsam, Pinus canadense* oder *Abies traversi.* n = 1,541-1,547 (*Romeis*). Canadabalsam ist löslich in Ether, Chloroform, Terpineol, Xylol, Methylbenzoat, Benzol, Terpentinöl usw. In der Regel verwendet man eine honigdicke Lösung in Xylol. Canadabalsam ist sauer und wird nach dem Erstarren rasch gelb. Canadabalsam in Chloroform oder Benzol gelöst erhärtet sehr rasch.

Gefärbte Präparate halten sich in Canadabalsam nur bedingt und nur kürzere Zeit.
Trockener Balsam, d.h. nicht gelöster Balsam, wird zur Anfertigung von Dünnschliffen verwendet.

§ 233. Neutraler Canadabalsam. Um die Haltbarkeit gefärbter Präparate in Canadabalsam zu erhöhen, kann man den Canadabalsam neutralisieren. Die Neutralisation ist jedoch keine verbürgt dauernde. Er wird unter verschiedenen Bezeichnungen in den Handel gebracht. Seit Caedax im Handel zu haben ist, braucht Canadabalsam nicht mehr verwendet zu werden.

§ 234. Venetianer Terpentin.

1. Harz von *Larix decidua* und verschiedenen *Pinus*-Arten. Venetianer Terpentin ist in Alkohol löslich. Es gibt verschiedene käufliche Einschlußmittel aus Venetianer Terpentin.

Terpentin nach *Voßler*. n = 1,533. Das Medium besteht aus gleichen Volumina Terpentin und 96 %igem Alkohol.

Terpentin nach *Suchaneck*. n = 1,504. Das Medium besteht aus Terpentin und absolutem Alkohol zu gleichen Volumenteilen. Es ist mit Kalk neutralisiert. Die Farben sind hier haltbarer als in Terpentin nach *Voßler*.

Die empfehlenswerteste Sorte ist nach meinen Erfahrungen der rectifizierte Venetianer Terpentin von *Hollborn*. Die Objekte werden aus absolutem Alkohol eingeschlossen. Man erspart also die Xylol- oder Terpineolpassage. Terpentin ist jedoch nur geeignet für Färbungen, die nicht durch Alkohol ausgezogen werden.

2. Das Arbeiten mit dem Venetianer Terpentin unterscheidet sich für unempfindliche Objekte in nichts von dem Einschließen in anderen Harzen. Die Objekte, z.B. Schnitte, die mit Magdalarot-Anilinblau gefärbt worden waren, kommen aus dem absoluten Alkohol in den Venetianer Terpentin und werden darin eingeschlossen.

3. Das Einschließen zarter Objekte wie Algen, die mit den *Pfeifferschen* Färbungen gefärbt wurden, muß mit größter Vorsicht vorgenommen werden. Die Algen vertragen ein direktes Übertragen in dicken Venetianer Terpentin nicht, sie schrumpfen. Um diese Schrumpfung zu vermeiden, müssen sie zuerst in 10-20 %igen Venetianer Terpentin verbracht werden, den man dann langsam eindicken läßt. Wenn das Einschlußmittel dick genug ist, kann eingeschlossen werden.

Dieser Prozeß ist nun leider dadurch erschwert, daß der verdünnte Venetianer Terpentin sehr viel Wasser anzieht, und zwar um so mehr, je verdünnter er ist. Dabei trübt er sich. Erst wenn der Venetianer Terpentin ungefähr Glycerinkonsistenz aufweist, ist er für weiteres Arbeiten an der Luft praktisch unempfindlich gegen die Feuchtigkeit der Luft. Das Eindicken muß daher mit Hilfe eines Exsikkators bewerkstelligt werden. Den Exsikkator beschickt man mit ausgeglühtem Kalziumchlorid [oder Blaugel], das öfters gebraucht werden kann. Wenn es viel Alkohol aufgenommen hat, wird es unter Beobachtung der nötigen Vorsicht einfach angezündet. Der Alkohol brennt dann ab.

Die Objekte kommen aus absolutem Alkohol in eine 10-20 %ige Lösung von festem Venetianer Terpentin in absolutem Alkohol. Diese Lösung gießen wir in eine breitere Schale, deren oberer Rand durch Eintauchen in geschmolzenes Paraffin mit einem 3 mm hohen Paraffinrand versehen worden ist; er verhindert nun verläßlich ein Hinaufkriechen des Harzes an den Rändern der Schale.

Die einzubettenden Algen kommen, wie oben bereits ausgeführt wurde, in die Schale mit dem verdünnten Terpentin und werden dem Eindicken im Exsikkator überlassen. Hierbei muß nun rasch und vorsichtig gearbeitet werden. Zunächst wird der Exsikkator mit dem Kalziumchlorid beschickt, dann sehr rasch die Verdünnung des Venetianer Terpentins hergestellt und sofort in den Exsikkator verbracht, der sofort zugedeckt wird. Das übertragen der Algen aus dem absoluten Alkohol in die 20 %ige Terpentinlösung hat nun sehr schnell zu erfolgen, wobei der Exsikkator möglichst nur kurz gelüftet wird.

Die Verdünnung des Terpentins auf 20 % kann mit absolutem Alkohol oder mit Isopropanol erfolgen. Der Isopropanol ist bedeutend weniger feuchtigkeitsempfindlich als der gewöhnliche absolute Alkohol.

Den Exsikkator stellt man ins Dunkle, damit die Farben nicht verblassen. Das Eindicken wird unterbrochen, wenn das Harz dickflüssig genug geworden ist. Die Schnelligkeit des Eindickens hängt von der Menge des Chlorkalziums ab. Ist die Chlorkalziummenge zu groß, kann das Eindicken schnell zu weit getrieben werden. Eigene Erfahrungen müssen hier gesammelt werden. Zu dicker Terpentin kann mit Alkohol oder Isopropanol, *tropfenweise* zugesetzt, etwas verflüssigt werden.

Einschließen auf dem Objektträger wie bei Caedax. Das Erhärten dauert 4-8 Wochen und noch länger. *Eckert* empfiehlt einen Lackrahmen aus Japanlack oder *Wittschem* Zement.

Diese langsame Methode ist geeignet für Algen, Prothallien von Farnen und Schachtelhalmen, Moosprotonemata und ähnliche Objekte.

Venetianer Terpentin ist jetzt eigentlich ziemlich überflüssig geworden. Es diente vornehmlich zum Einschließen der Algen, weil diese in Xylol regelmäßig schrumpften. Seit der Einführung des Isopropanols und des Terpineols können auch derartig empfindliche Objekte einfach und sicher in Caedax eingeschlossen werden.

§ 235. Euparal. Euparal ist ein Gemisch des Harzes Sandarac mit Eukalyptusöl und Paraldehyd. (Nach P.Mayer, *Einführung in die Mikroskopie*. 1922, S.63) Euparal ist schon mit 90 %igem, ja zur Not mit 80 %igem Alkohol mischbar, d.h., die Objekte können daraus in Euparal übertragen werden. Die Erhärtung braucht erheblich länger [?] als bei Caedax. n = 1,535.

Euparal löst augenblicklich das Zelloidin auf, woran man beim Einschließen von Zelloidinschnitten zu denken hat.

In Euparal halten sich Färbungen recht gut.

§ 236. Sandarac-Einschlußmittel nach *McClung* (59). Sandarac in Dioxan gelöst gibt ein dem Euparal ähnliches Einschlußmittel. Der Brechungsexponent ist etwas niedriger als der des Canadabalsams.

Herstellung: In Dioxan werden helle Stücke von Sandarac gelöst, die Lösung filtriert und dann eingedickt. Hierauf wird zu 9 Teilen des Konzentrates 1 Teil Camsal zugefügt. Nach der Vermischung wird filtriert und durch Verdunsten so weit eingedickt, daß eine dem Canadabalsam ähnliche dicke Lösung entsteht.

Bemerkung:

1. **Dioxan ist leicht brennbar und auch in Dampfform giftig!**
2. Sandarac ist das Harz (*Resina sandaraca*) von *Callitris quadrivalvis*, einer nordafrikanischen strauchförmigen Nadelholzgattung. Es ist offizinell und in Apotheken erhältlich. Andere Sandarac-Arten, sogenannter australischer, sowie der deutsche Sandarac (Harz des einheimischen Wacholders) oder der spanische Sandarac (Kolophonium) sind für diese Zwecke nicht brauchbar. Sandarac besteht zu 95% aus freien Harzsäuren.

3. Camsal ist eine durch Verreiben hergestellte Mischung von Kampfer und Salol. Man arbeitet so, daß etwas Kampfer ungelöst zurückbleibt.

(59) C.E.McClung, *Handbook of microscopical technique. For Workers in animal and plant tissues.* New York 1937, P.B.Hoeber.

§ 237. Eingedicktes Zedernholzöl. n = 1,515. Eingedicktes Zedernholzöl ist früher sehr viel verwandt worden für empfindliche Färbungen, die sich in ihm sehr gut halten. Zedernholzöl ist ein völlig neutrales Einschlußmittel, das nur sehr empfindlich gegen Wasserspuren ist und leider sehr langsam trocknet. Die Objekte werden aus Xylol oder aus Benzol in das eingedickte Zedernholzöl übertragen. Zedernholzöl wird jetzt bestens durch Caedax ersetzt.

B. Das Fertigmachen der Präparate

§ 238.

1. Ist das Objekt nun glücklich eingeschlossen, so muß es, wenn es das Medium erfordert, noch mit einem Lackrahmen entlang des Deckglasrandes versehen werden. Zum Schluß kommt dann noch die Bezeichnung auf Etiketten.

2. Cädax und Canadabalsam, endlich Euparal und die Terpentin-Einschlußmittel bedürfen eines Lackrandes nicht. Dasselbe gilt für Präparate aus Glyceringelatine nach *Kisser* und Acetatgelatine nach *Schömmer*.

Für Lacke und Lackrahmen, besonders für Glyzeringelatinepräparate, sind sehr viele Vorschriften bekannt geworden. Der Lackrahmen soll absolut dicht am Deckglas und am Objektträger haften und sich gegenüber dem Einschlußmittel chemisch völlig indifferent und physikalisch völlig unlöslich verhalten. Lackrahmen, die ganz hart auftrocknen, springen gern bei dünnen Schichten auch bei sauberster Ausführung ab, da sie den Wärmeausdehnungen des Einschlußmediums nicht genügend Widerstand entgegensetzen. Daher sind die besten Lackrahmen diejenigen, die aus einem Material angefertigt werden, das immer etwas elastisch bleibt.

3. Bei glycerinhaltigen Medien ist es die größte Sorge, das Glas vollständig vom Glycerin zu befreien. Die beste Reinigungsmethode für Glycerinpräparate ist folgendes von *Neumann* und *Hueber* angegebene Verfahren:

Alle von dem Glycerin benetzten Stellen bestreut man mit feinstgepulvertem Tragant, das in allen Apotheken erhältlich ist. Tragant bildet nach 2-3 Tagen mit Glycerin eine wachsartige halbweiche Masse. Man kann sie mit einem Messer abkratzen. Hierauf umrandet man mit Copallack, Japanlack oder der *Kousalschen* Paste.

4. Die Entfernung der Gelatinereste bei großformatigen Präparaten macht dann keine Schwierigkeiten, wenn das Medium eine längere Trockenzeit gestattet. Nach einem Vierteljahr ist die Glyceringelatine soweit erstarrt und fest geworden, daß nach *Seyser* (60) die Präparate mit einem großen weichen Pinsel und viel kaltem Wasser abgebürstet oder abgepinselt werden können. Hierauf wird getrocknet und anschließend der Lackrahmen angebracht. Bei vorsichtiger Arbeitsweise können auch die Gummiglycerinpräparate nach dieser Methode gereinigt werden.

(60) W.Seyser, Mikrokosmos XXVII, 1933/34, S.71

5. Bei Medien, die diese großzügige Behandlung nicht gestatten, wie Lävulosegelatine nach *Heringa* und *ten Berge* oder Lactophenolgelatine, muß eben mit viel Geduld mittels kleiner Wattebäuschchen an Pinzetten so viel des überschüssigen Mediums entfernt werden so gut es eben geht. Man kann auch hier das Tragantpulver zu Hilfe nehmen. Das Reinigen geht auch verhältnismäßig gut, wenn die Wattebäuschchen mit Isopropanol befeuchtet worden sind. An Umrandungsmitteln werden folgende ausgeführt:

§ 239. Umrandungspaste nach Kousal (61). In einem Porzellantiegel verreibt man in gutem Leinöl Mennige, bis eine steife Paste entsteht. Hierauf wird die Paste etwa 3-4 Stunden lang gekocht. Langsam wird Bienenwachs zugesetzt, so lange bis das Gemisch kein Wachs mehr aufnimmt. Dabei wird immer gut umgerührt. Zum Schluß wird noch etwas Dammarharz zugesetzt. Die Mengen müssen so abgepaßt werden, daß die Masse vom Rührholz nicht mehr abfällt, sondern hängenbleibt. Ich empfehle, sich die Umrandungspaste von *Hollborn* oder *Grübler* anfertigen zu lassen.

Diese Umrandungspaste dürfte zur Zeit der allerbeste Verschluß sein für Glyceringelatine, Glycerin, Phenol, Glycerinmilchsäure und ähnliche Einschlußmedien. Sie haftet tatsächlich auch dann fest, wenn noch Reste des Einschlußmittels nicht haben entfernt werden können. Mit der Umrandungspaste von *Kousal* ist ein wirklich brauchbarer Verschluß für glycerinhaltige Medien bekanntgegeben worden.

Aufgetragen wird die Paste mit heißem Deckglasspatel. Ist der Spatel zu kühl, so wird der Rahmen zu dick und klobig. Wen die rotbraune Farbe der Paste stört, der kann sie durch Beimengung von Ruß schwarz färben lassen.

(61) Josef Kousal, Mikrokosmos XXXI, 1937/38, S.86

§ 240. Japanischer Mikroskopierlack. Der Japanische Mikroskopierlack ist erhältlich in der Drogerie *Max Troplowitz* in *Eisenach (Thüringen)*, außerdem bei *Hollborn* in *Leipzig*. Er ist Lack vom japanischen Lackbaum in Xylol gelöst.

§ 241. Goldsize.

1. Goldsize ist ein Leinöllack, der nach dem Auftrocknen nicht von Immersionsöl angegriffen wird.

2. Goldsize und Japanlack haften nicht gut auf mit Glycerin verunreinigtem Glase. Sollen Glyceringelatinepräparate mit Goldsize oder Japanlack umschlossen werden, so ist dies nach dem Verfahren von *Ruijter* (62) durchaus möglich. Man verzichtet zunächst auf eine peinlich genaue Reinigung der Präparate und begnügt sich mit einer sauberen Entfernung des überschüssigen Einschlußmittels. Nun stellt man einen dünnen Lackrand her mit folgendem erwärmten Mittel:

20 %ige Gelatinelösung	90 ccm
5 %ige Kaliumdichromatlösung	10 ccm
Karbolzusatz	

Beide Bestandteile sind für sich allein unbegrenzt haltbar. Die Mischung ist nur im Dunkeln und nur begrenzt haltbar. Zweckmäßig mischt man erst kurz vor der Anwendung die nötige Menge. Nach dem Erstarren setzt man das Präparat dem Licht aus, am besten der Sonne. Das gefärbte Objekt schützt man gegen Ausbleichung durch Auflegen eines zurechtgeschnittenen Pappkartons. Durch die Belichtung wird die Chromatgelatine absolut unlöslich in Wasser. In der Sonne geschieht dies schon nach 5-10 Minuten. Im zerstreuten Tageslicht erst nach 3-5 Stunden. Das Verfahren gelingt auch an trüben Tagen, da die Härtung hauptsächlich durch die nicht sichtbaren ultravioletten Strahlen erfolgt.

Nach der Härtung wäscht man das Präparat ruhig mit Wasser oder auch Chloroform von dem etwa noch vorhandenen Einschlußmittel ab, trocknet sorgfältig und kann dann den Lackrahmen endgültig ziehen.

Beide genannte Lackrahmen trocknen langsam auf. Sie werden nie vollständig hart und spröde. Man vermeide nur den Fehler, den Rand aus Chromatgelatine zu umfangreich zu machen. Ist die Chromatgelatine nämlich zu dick, reißt sie später ein und lockert den aufsitzenden Rahmen aus Japanlack oder Goldsize. Der Goldsizerand ist übrigens dann am besten, wenn er aus zwei dünnen Lagen besteht, die allerdings in einem Zeitintervall von einem Vierteljahr anzulegen wären. Die *Kousalsche* Umrandungspaste ist in ihrer Anwendung einfacher.

(62) A.Ruijter, Zeitschrift f. wissenschaftl. Mikroskopie, Bd.51, 1935, S.374

§ 242. Kopal-Emaillack. *Romeis* empfiehlt nachdrücklichst die von *Kamptner* angegebenen Kopal-Emaillacke, besonders den sehr schnell trocknenden *Superiol*-Emaillack der *Firma 0.Fritze* in Wien I, Hoher Markt Nr.11. Dieser Lack trocknet innerhalb von 2 Stunden.

§ 243. *Krönigs* Deckglaskitt. *Krönigs* Deckglaskitt wurde früher viel verwendet. Man erwirbt ihn am besten käuflich. Er besteht aus 2 Teilen Wachs und 7-9 Teilen Kolophonium, die zusammengeschmolzen werden. Wird mit der Zeit leicht undicht.

§ 244.

1. Im Handel sind noch eine Reihe entweder in Alkohol oder in Xylol gelöster Lacke erhältlich, wie der schwarze Lack und der weiße Lack, beide in Xylol gelöst und beide bei *Hollborn* erhältlich. Ferner Deckglaslack *Hollborn* in Alkohol gelöst, ebenso ein Maskenlack usw.

2. Will man den Harzpräparaten einen Lackrand verleihen, so halte man sich an die selbstverständliche Regel, daß der Lack das Einschlußmedium nicht auflösen darf. Man umrandet daher Präparate in Euparal oder Terpentin mit japanischem Mikroskopierlack und Cädaxpräparate mit Euparal usw. Damit soll das Kapitel der Lackrahmen geschlossen werden.

[Vor einem Mißverständnis sei an dieser Stelle gewarnt! Lackränder dienen niemals als Verdunstungsschutz, sie sollen lediglich ein Abspringen des Deckglases und ein Verpilzen des Präparates verhindern. Verwendet man Einschlußmittel, die Wasser abgeben, wie z.B. Glyceringelatine, so darf der Lackring erst dann aufgetragen werden, wenn der Verdunstungsvorgang abgeschlossen ist!]

§ 245. Die Beschriftung der fertigen Präparate muß in gefälliger Form erfolgen. Man klebt links und rechts des Deckglases die käuflichen Etiketten auf und schreibt darauf die nötigen Notizen. Links kommt die Art des Objektes, Datum der Herstellung und Name des Herstellers. Rechts kommt eine kurze Angabe über Präparation. Der Benützer dieses Buches kann die ganze Präparation in Zahlen angeben, wenn er die Arbeitsvorschriften dieses Buches anwendet. Die Zahlen der Paragraphen über Fixierung, Färbung usw. besagen dann alles Wissenswerte.

Wer darüber hinaus noch Unterschiede machen will, kann die Angaben links entweder auf verschiedenfarbigem Papier (Farne weiß, Moose grün, Algen blau usw.) oder in verschiedenfarbiger Tinte machen.

§ 246. Eine größere **Sammlung** muß nach einem bestimmten Plan geordnet werden. Am zweckmäßigsten erscheint es, die Präparate fortlaufend zu numerieren und auch so aufzubewahren. Parallel damit kann dann ein Präparatejournal oder besser eine Kartothek eingerichtet werden. Besonders die Kartothek kann später umgruppiert werden, falls der ursprüngliche Einteilungsgrundsatz geändert werden soll. Die Einteilungsgrundsätze ergeben sich von selbst aus der Hauptarbeitsrichtung. Meistens nimmt man die Einteilung nach den systematisch-floristischen oder anatomisch-cytologischen Gesichtspunkten vor. Eine geordnete Sammlung bringt doppelte Freude.

C. Einige notwendige technische Bemerkungen

§ 247.

Es ist hier am Platze, einige notwendige **technische Hinweise** gesondert im Zusammenhang zu geben, die nicht gut im laufenden Text zerstreut werden konnten. Sie würden dort bei nachträglichem Suchen sehr schwer wieder aufgefunden und müßten überdies bei den einzelnen Kapiteln teilweise wiederholt werden.

1. Robuste Objekte, z.B. Querschnitte durch Farnstengel, können ohne Schaden aus Wasser in Alkohol, daraus in Xylol oder Terpineol und dann in Caedax verbracht werden.

2. Die meisten Objekte, auch Schnitte, sind dieser Behandlung nicht gewachsen. Sie werden dabei deformiert. Sie schrumpfen, verbiegen sich oder zerreißen. Am empfindlichsten sind die Algen. Wer gelernt hat, zarte Algen tadellos zu präparieren, bringt jedes Objekt durch alle Fährnisse.

Die Deformationen sind dann am größten, wenn das Übertragen von einem Medium in ein anderes erfolgt, wobei diese sich sehr rasch miteinander vermischen, wie Wasser-Alkohol, oder wenn der osmotische Druck sonstwie bedeutend geändert wird, wie bei Wasser-Glycerin. Besonders Totalpräparate schrumpfen dann stark. Der Übertritt Wasser-Isopropanol oder Glycerin-Isopropanol ist weniger gefährlich. Ebenso ist es nicht möglich, alles direkt aus Wasser in Glycerin oder Glyceringelatine zu übertragen.

3. Die Objekte müssen aus Wasser sehr oft in Alkohol überführt werden, sei es zum Einbetten der Blöcke in Zelloidin oder zum Einschließen gefärbter Objekte in Caedax, Venetianer Terpentin oder Euparal. Dazu dient die stufenweise Überführung. Ein Satz von sieben Glastuben mit 10 %igem, 30 %igem, 50 %igem, 70 %igem, 80 %igem, 90 %igem und endlich absolutem Alkohol ist die geeignete Apparatur dazu. Die Objekte kommen für Stunden oder Tage in jede Stufe. Dieselben Stufen kann man mit Glycerin ansetzen. Man wird jedoch die unliebsame Beobachtung machen, daß die stufenweise, schrumpfungsfreie Übertragung z.B. von Stengelstükken in Glycerin nicht immer gelingt.

Sehr empfindliche Objekte können nicht die steigende Reihe hinaufgeführt werden. Die einzelnen Stufen sind zu groß. Man hilft sich dann folgendermaßen:

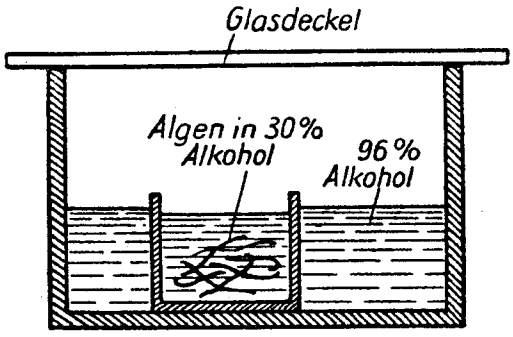


Abb.11

Überführen von Algen aus 30 %igem Alkohol in 96 %igen Alkohol

(§ 247 Ziff.3)

a) Überführen von Algen aus Wasser in 96 %igen Alkohol. *H.Broer* (63) gibt eine elegante Methode der Überführung bekannt. Wie die Abbildung zeigt, sind die Algen in einem kleinen Gefäß in 30 %igem Alkohol. In den 30 %igen Alkohol können die meisten Objekte direkt aus Wasser oder wenigstens gefahrlos stufenweise übertragen werden. Das kleine Gefäß ist in einer größeren Schale untergebracht und von 96 %igem Alkohol umgeben. Schließlich wird das größere Gefäß durch einen gut schließenden Glasdeckel verschlossen. Der 96 %ige Alkohol zieht aus dem 30 %igen Alkohol das Wasser an, so daß die Algen bald in 96 %igen Alkohol zu liegen kommen.

(63) H.Broer, Mikrokosmos XXVII, 1933/34, S.4

b) Überführen von Algen aus Wasser über Glycerin in Alkohol. Die Objekte kommen in 10 %iges Glycerin in eine Glasschale. Die Schale deckt man mit Seidenpapier zu und läßt das Wasser abdunsten. Der Prozeß kann auch im Exsikkator vorgenommen werden. Nachdem das Objekt in Glycerin liegt, kann es mit Alkohol oder Isopropanol, ohne Schrumpfungen zu befürchten, ausgewaschen werden. Siehe auch § 205.

c) Überführen von Objekten in Glyceringelatine. In geschmolzene Glyceringelatine können viele Objekte direkt aus Wasser oder Glycerin übertragen werden. Noch schonender ist es, die Glyceringelatine mit 5-10 Teilen Wasser zu verdünnen und mit dem Objekt, wie oben geschildert, abdunsten zu lassen, bis das Medium fest oder nahezu fest geworden ist. Nach leichtem Erwärmen kann dann das Einschließen auf dem Objektträger vorgenommen werden.

d) Ebenso schwierig ist die Übertragung mancher Objekte in Harze. Besonders behutsam hat das Einbetten in Venetianer Terpentin zu geschehen. Darüber lese man nach bei § 234.

In Caedax oder Canadabalsam können die Medien nicht aus Alkohol, sondern nur aus Terpineol oder Xylol eingebettet werden. Dabei schrumpfen empfindliche Objekte mitunter bedeutend, besonders Algen, Moosprotonemata, Pilzmycelien und andere mehr. *Stüssi* (64) fand, daß Zwischenstufen von Xylol mit gekochtem Leinöl steigend bis zu reinem Leinöl dies verhindern. Aus Leinöl können die Algen dann schrumpfungsfrei in Canadabalsam eingeschlossen werden. *Eckert* (65) fand, daß Algen aus Isopropanol über Xylol schrumpfungsfrei eingeschlossen werden können. Er verbringt die Algen in verdünntes Glycerin, läßt staubfrei eindicken (Seidenpapier als Deckel) und wäscht das konzentrierte Glycerin mit Isopropanol aus. Aus Isopropanol kommen die Algen dann in Xylol und anschließend in Caedax.

(64) Stüssi, Mikrokosmos XX, 1926/27, S.24

(65) F.Eckert, *Das Präparieren von Algen.* Stuttgart, Franckhsche Verlagshandlung, 1939

Die Verwendung des Dioxans

§ 248. Das Dioxan ist Dioxyethylen, also der Diether des Glykols. Es schmilzt bei +11 °C und siedet bei 102 °C. Mit wasserfreien Säuren und mit Halogenen verbindet es sich zu oxoniumartigen Verbindungen. Dioxan mischt sich in jedem Verhältnis mit Wasser, mit Alkohol, Benzol, Xylol und mit geschmolzenem Paraffin. Dioxan löst Canadabalsam, Dammarharz, Sandarac, manche Metallsalze, ferner Pikrinsäure, Jod und viele Farbstoffe. Es löst auch Zelloidin. Dioxan ist brennbar und feuergefährlich.

Das Dioxan wurde von *Heinz Graupner* in die Mikroskopie eingeführt.

Dioxan ist leider ein heimtückisches Gift! Seine Dämpfe bringen beim Einatmen unter Umständen schwere Gesundheitsschädigungen; selbst wenn es von der Haut aus resorbiert wird und auf diese Weise in den Körper gelangt, kommt es zu ernsten Störungen. Bei sorglosem, unsachgemäßem Umgang mit Dioxan haben sich schon wiederholt Todesfälle ereignet. Auch ist es gefährlich, wenn der Paraffinschrank im Laboratorium nicht innerhalb eines Abzuges steht. Wegen dieser großen Gefährlichkeit wurde in diesem Buche nur in ganz wenigen Ausnahmefällen auf Arbeitsvorschriften mit Dioxan hingewiesen.

Der Vollständigkeit halber werden nun an dieser Stelle einige Arbeitsvorschriften für die verschiedenartigen Verwendungen des Dioxans geboten.

[Eine weitere Gefahr besteht darin, daß Dioxan, wie jeder Ether, mit der Zeit hochexplosive Peroxide bildet, die beim Verdampfen des Dioxans zurückbleiben und dann sehr heftig detonieren können. Man prüft auf diese Stoffe, indem man Dioxan mit einer Kaliumjodidlösung mischt und mit wenig verdünnter Schwefelsäure ansäuert. Eine Braunfärbung (elementares Jod) zeigt Peroxide an. Peroxidhaltiges Dioxan ist sofort zu entsorgen!]

§ 249. Dioxan als Intermedium bei der Paraffineinbettung (66). Die Objekte werden am besten aus 80 %igem Alkohol in Dioxan übergeführt. Bei unmittelbarem Überführen aus den Fixiergemischen - was meistens an und für sich möglich ist - schrumpfen die Objekte in der Regel zu sehr. Die Objekte kommen nun in Glastuben, die 1-2 cm hoch mit ausgeglühtem Kalziumchlorid beschickt sind. Auf die Kalziumchloridschicht legt man etwas Watte und gießt das Dioxan auf. Die Objekte legt man zweckmäßig nicht auf die Watte, sondern verbringt sie in Siebeimerchen, die auf die Watte gelegt werden oder die man schwimmen läßt. Das Dioxan entfernt nun Wasser und Alkohol aus den Objekten. Es wird einige Male gewechselt. Die Ob-

jekte kommen anschließend in eine Dioxanstufe, die mit Paraffin gesättigt ist. Hierauf erfolgt Einbetten in Paraffin. Kurz umrissen ist der Arbeitsvorgang also folgender:

Dioxan I	1-3 Stunden
Dioxan II	1-3 Stunden
Dioxan III	1-3 Stunden
Dioxan-Paraffin	1/4-1 Stunde
Paraffin	24 Stunden
Einbetten	

(66) P.Huber, Mikrokosmos XXXV, 1941/42, S.179

§ 250. Dioxan als Intermedium beim Färben von Schnitten. Man kann den Alkohol allein oder auch Alkohol und jedes Wasser vermeiden, wenn die Schnitte es wünschenswert erscheinen lassen. Die bekanntgegebenen Methoden beschränken sich auf Färbungen mit Hämatoxylin.

A. Vermeidung von Alkohol. Nach *Graupner* und *F.Huber* werden Paraffinschnitte wie folgt mit Hämalaun ohne Alkoholbenutzung gefärbt.

1. Entparaffinieren in Xylol
2. Methylbenzoat 1 Minute
3. Drei Stufen von Dioxan je 5 Minuten
4. Destilliertes Wasser
5. Färben in Hämalaun

    a) Leitungswasser
    b) Eosin
    c) Destilliertes Wasser

    oder

    a) Differenzieren in Dioxan + Wasser zu gleichen Teilen mit einigen Tropfen Salzsäure
    b) Bläuen der Schnitte in 80 %igem Dioxan, mit Natriumhydrogencarbonat gesättigt
    c) 90 %iges Dioxan
    d) 90 %iges Dioxan mit 0,1% Eosin
    e) 90 %iges Dioxan

6. 3 Stufen Dioxan
7. Methylbenzoat für 1 Minute
8. Xylol für 3-5 Minuten
9. Einschließen in Caedax

B. Vermeidung von Alkohol und von Wasser. Diese Methode ist für leicht quellbare Objekte geeignet. Die Paraffinschnitte werden mit Xylol von Paraffin befreit.

1. Xylol, zweimal wechseln
2. Dioxan, zweimal wechseln
3. Dioxan mit Zusatz von 0,1% Eisenchlorid 30 Minuten
4. Abspülen mit 80 %igem Dioxan

5. Färben in folgender Lösung:

Dioxan	40	ccm
Destilliertes Wasser	8	ccm
Eisessig	2	ccm
Hämatoxylin	2,5	g

Nach vollständiger Lösung zugeben:

Natriumalaun	2,5	g

Schütteln der Lösung und Filtrieren!

6. 80 %iges Dioxan mit Zusatz von 1% Pikrinsäure
7. Differenzieren
8. 80 %iges Dioxan mit Lithiumcarbonat gesättigt
9. 90 %iges Dioxan
10. 90 %iges Dioxan mit 0,1% Erythrosin
11. Nachspülen mit 90 %igem Dioxan
12. reines Dioxan
13. Xylol, zweimal
14. Einschluß in Caedax

Bemerkung: Für die Bearbeitung der Kryptogamen ist Dioxan entbehrlich! Die Beschäftigung mit der Mikroskopie kann also völlig gefahrlos gestaltet werden.

Die Haltbarkeit der Präparate

§ 251. Sehr zum Leidwesen des mikroskopierenden Naturfreundes verderben häufig seine Dauerpräparate. Die Ursachen für dieses Verderben sind mannigfaltiger Art.

1. Die Präparate verblassen. Das Verblassen gefärbter Präparate wird meistens auf die mangelnde Lichtechtheit der Farbstoffe zurückgeführt. Dies ist nicht richtig! Auch lichtunechte Farbstoffe halten sich bei geeigneten Einschlußmedien unbegrenzt, wenn sie nicht unnötig stundenlang der Sonne ausgesetzt werden. Auch eine häufige Betrachtung im Mikroskop schadet nicht.

Die Farben werden aber häufig von Einschlußmedien chemisch verändert, d.h. zu Leukoverbindungen reduziert. So ist dies sehr regelmäßig beim gewöhnlichen Canadabalsam der Fall, der ätherische Öle enthält. Abhilfe schafft hier nur die Verwendung wirklich neutraler Harze, wie Caedax.

Die organischen Farbstoffe können alle, wie in früheren Abschnitten dieses Buches ausführlich geschildert worden ist, durch Beizen viel dauerhafter gemacht werden. Die verschiedenen Beizen sind bei den Verarbeitungsvorschriften der einzelnen Farben angeführt worden.

Eine Grundbedingung für die Haltbarkeit ist ferner, daß vor dem Einschluß alle löslichen Chemikalien restlos aus den Präparaten ausgewaschen werden, z.B. die Pikrinsäure und alle Beizen für basische Farbstoffe, ferner Spuren der Differenzierungsmittel (salzsaurer Alkohol, Alaunlösungen).

Selbstverständlich müssen Objektträger und Deckgläser auch chemisch rein sein, es dürfen auch nicht Spuren von Brennspiritus oder anderen Reinigungsmitteln zurückgeblieben sein.

Das Chlorophyll ist an sich recht gut haltbar. Ich habe solche Präparate (Moose) bereits über 14 Jahre, die heute noch unverändert sind. Auswaschen aller löslichen Stoffe vor dem Einschließen ist Bedingung für die Haltbarkeit.

Daß man keine ungeeigneten Einschlußmittel verwenden kann, ist eigentlich selbstverständlich. Man beachte daher die speziellen Angaben bei den einzelnen Arbeitsvorschriften genau. In Glyceringelatine halten sich die Färbungen mit den künstlichen Beizenfarbstoffen nach *Becher*

unbedingt. Ebenso die Imprägnationen mit Gold und mit Bleisulfid. Anilinfarben halten sich nach dem Beizen vielfach befriedigend in ihr.

2. Der Lackrand haftet nicht. Der Lackrand kann auf Glas nur dann haften, wenn die Gläser wirklich fettfrei waren. Man verwende daher nur gut gereinigte Objektträger und Deckgläser und beschmutze sie nicht während der Präparation. Der Lackrahmen hält am besten, wenn er nicht spröde auftrocknet. Goldsize, Japanischer Mikroskopierlack, die Umrandungspaste nach *Kousal* z.B. entsprechen gut dieser Bedingung. Spröde auftrocknende Lacke reißen gerne ein, und dann löst sich das Glas vom Lack bei den unvermeidlichen Temperaturschwankungen innerhalb der Jahreszeiten.

ZWEITER TEIL

Spezielle Untersuchungsmethoden

Kapitel VIII Bakterien

A. Allgemeines über Bakterien

§ 252.

1. Wer sich mit Kryptogamen befaßt, soll auch das Wesentlichste über Bakterien studieren. Das ist durchaus auch mit bescheidenen Mitteln und ohne große Apparatur möglich.

Seit *Ferdinand Cohn* bezeichnet man als Bakterien "Kleinste, einzellige chlorophyllfreie pflanzliche Lebewesen von kugeliger, zylindrischer oder schraubenförmiger Gestalt, die sich durch Zweiteilung vermehren, teils beweglich, teils unbeweglich sind und von denen eine ganze Reihe endogene Dauersporen bildet." Diese Definition trifft auf die eigentlichen Bakterien zu. Obwohl die Fadenbakterien nach dieser Begriffsbestimmung nicht mehr zu den Bakterien gehören, werden sie hier angereiht und - wie üblich - zu den Bakterien gerechnet.

2. Bei den Bakterien unterscheidet man folgende Formen:

A. Eigentliche Bakterien:

1. Kugelbakterien, Kokken, Coccaceae. Die Kugelbakterien kommen als Kettenkokken (Streptokokken), Traubenkokken (Staphylokokken), Sarzinen (kubisch angeordnete Verbände gleich den Warenballen), zu vieren verbunden als Tetracoccen, zu zweien als Diplococcen und als einzelne Kokken vor.
2. Stäbchenbakterien, Bacteriaceae. Hierzu zählen: Bakterien (ohne Sporenbildung), Bazillen (mit Sporenbildung).
3. Schraubenbakterien, Spirillaceae. Dazu rechnen Vibrionen (kurze schwach gebogene Zellen, kommaförmig), Spirillen (Zellen lang, korkenzieherartig gewunden). Vielfach zählt man hierher auch noch die Spirochäten. Doch sind die Spirochäten zweifelsohne tierische Lebewesen.

B. Fadenbakterien

1. Scheidenbakterien, Chlamydobacteriaceae. Stäbchenförmige Zellen bilden Fäden, die mit einer gemeinsamen Scheide umgeben sind. Sporenbildung ist häufig vorhanden
2. Strahlenpilze, Aktinomycetaceae. Fäden mit echten monopodialen Verzweigungen.
3. Schleimbakterien, Mycobacteriaceae. Das sind stäbchenförmige Bakterien, die als Abschluß einer Vegetationsperiode ähnlich den Schleimpilzen größere Fruchtkörper bilden.

Es gibt auch biologische Gruppen von Bakterien, die sehr gut charakterisiert sind, so daß sie besser in diesem Zusammenhang betrachtet werden. Hierher gehören:

a) Schwefelbakterien
b) Eisenbakterien
c) Purpurbakterien.

In diesen Gruppen finden sich morphologisch Stäbchen, Kugelbakterien und Scheidenbakterien.

Cytologie und Fortpflanzung der Bakterien

§ 253. Die Länge des einzelnen Bakteriums schwankt zwischen 1μ bis mehrere 4μ , die Breite von 0,5 bis 2μ. Die Bakterienzelle enthält keinen Kern. Der Bakterienkörper setzt sich zusammen aus dem sich stark färbenden Protoplasmakörper und einer äußeren Hülle, dem Ektoplasma. Durch Verquellung des Ektoplasmas entstehen die Kapseln und schleimigen Hüllen, die auch die Ursache für die sogenannte Kahmhaut und Zooglöen sind.

Der Protoplasmakörper besteht nur aus Entoplasma und aus der Chromatinsubstanz. Das Entoplasma ist ein wabenförmiges, schwach färbbares Gerüstwerk, in dessen Maschen die Chromatinsubstanz verteilt ist. Entoplasma und Chromatinsubstanz sind also innig miteinander vermischt, wenn diese Vermischung auch nicht immer und überall gleichmäßig ist. Erscheint das Chromatin an den Polen der Bakterien besonders angehäuft, dann spricht man von Polkörnern. Die Kernsubstanz ist also nicht in einem Kern lokalisiert, sondern über die ganze Bakterienzelle verteilt.

Die Bakteriengeißeln sind lange Fortsätze des Ektoplasmas.
Die fadenförmigen Scheidenbakterien bilden Scheiden aus, innerhalb deren dann die einzelnen Bakterien vorzufinden sind. Die einzelnen Bakterien sind manchmal durch Plasmodesmen verbunden.

Innerhalb der Bakterienzelle können verschiedene Einschlüsse auftreten. Die wichtigsten davon sind: Fetttröpfchen, wie bei *Spirillum volutans*; Glykogen, zähflüssige Tropfen von kolloidalem Schwefel, Farbstoffe. Manche Bakterien sondern Farbstoffe ab, bleiben dabei selbst aber ungefärbt.

§ 254.

1. Die **Fortpflanzung der Bakterien** geschieht ungeschlechtlich durch Querteilung, die durchschnittlich alle 20 Minuten erfolgen kann. Diese rasche Fortpflanzung erklärt das rapide Wachstum von Kulturen oder das schnelle Verderben von Nahrungsmitteln bei günstigen Fortpflanzungsbedingungen. Nach *Eyferth-Schoenichen* ist berechnet worden, daß theoretisch aus einem einzigen Bakterium nach 4-6 Tagen eine Bakterienmenge von 1350 Millionen Kubikkilometern entstehen könnte, wenn der Nahrungsvorrat usw. dies zulassen würde.

Sind die Nährstoffe aufgebraucht, so treten häufig von der üblichen Gestalt abweichende Formen auf, die man pleomorphe Formen nennt. So kann man Zweigbildung, Kolbenformen, längere Teilstücke von Kokken und Bakterienagglomerate beobachten.

2. Die Bazillen bilden **Sporen**. Innerhalb der Zellen entstehen ovale oder runde Endosporen, die sehr ausdauernd sind und die Art über widrige Umstände hinwegretten sollen.

3. Die Scheidenbakterien können neben Sporen noch **Konidien** bilden, kleine Zellen, die sich aus dem Verbande lösen und die Mutterzellen neuer Fäden werden.

§ 255.

1. Zum Studium der Bakterien erweisen sich **Kulturen** als absolut notwendig. Für unsere Zwecke reichen aber die leicht erhältlichen Rohkulturen im allgemeinen aus, besonders dann, wenn die erwünschten Bakterien darin so angereichert werden, daß man sie untersuchen kann.

2. **Reinkulturen** zu erzeugen ist schwierig, bei vielen Bakterien sind sie überhaupt noch nicht möglich gewesen. Sie stellen verwertbare wissenschaftliche Ergebnisse nur dann in Aussicht, wenn sie mit der nötigen Sorgfalt und mit der erforderlichen Apparatur angelegt werden können. Derartige Arbeiten sind also in der Regel an gut eingerichtete Laboratorien gebunden.

Einfache orientierende Versuche über Reinkulturen können jedoch auch mit bescheidenen Mitteln durchgeführt werden. Da diese Methoden der Reinkultur, die sogenannten bakteriologischen Arbeitsmethoden, auch für die Züchtung anderer Kryptogamen angewendet werden, ist eine kurze Schilderung am Platze. Der Leser findet diese Schilderung in § 12 bis § 16.

Der beimpfte Nährboden muß dann unter Bedingungen gehalten werden, welche das Bakterienwachstum günstig beeinflussen. Licht brauchen Bakterien nicht. Im Gegenteil, Licht ist hier geradezu schädlich. Dagegen ist Wärme vielfach notwendig und dann die Verwendung eines Brutschrankes unerläßlich. Saprophyten wachsen aber im allgemeinen bei Zimmertemperatur.

§ 256. Die meisten Bakterien wachsen bei Zutritt von Luft, d.h. bei Vorhandensein von Sauerstoff. Diese Bakterien heißen aerobe Bakterien. Anaerobe Bakterien sind solche, deren Wachstum durch die Gegenwart von Sauerstoff gehemmt oder unmöglich gemacht wird. Für ihre Kultur hat man ingeniöse Apparaturen ersonnen. Ihre Schilderung würde hier zu weit führen, es muß auf die bakteriologische Literatur verwiesen werden.

Um anaerobe Bakterien kennenzulernen, kann man folgende zwei einfache Methoden anwenden.

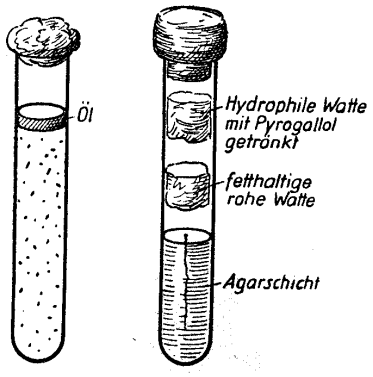
1. In einem Reagensglas mit flüssigem Nährmedium wird zum vollkommenen Luftabschluß ziemlich weit oben eine etwa 0,5 cm breite Lage Paraffinum liquidum oder Salatöl aufgegossen. Es ist nur so viel Sauerstoff vorhanden, wie in dem Nährmedium aufgelöst ist, also unmittelbar nach dem Aufkochen so gut wie gar keiner. Das Beimpfen kann auch nach Auflage des Ölringes mit einer Pipette erfolgen.

2. Stichkultur in festem Nährboden im Reagensglas mit dem Verschluß nach *Wright-Burri.* Die Ausführung der Kultur ist ohne weitschweifige Beschreibung aus der Abb.12 ersichtlich. Über dem festen Nährboden kommt ein Stopfen fetthaltiger roher Watte, darüber ein zweiter aus hydrophiler Verbandwatte. Mit einer Pipette wird dieser mit einer Mischung von 1 ccm 44 %iger Pyrogallollösung und 1 ccm 20 %iger Kalilauge vorsichtig getränkt. Man verschließt sofort mit einem Gummistopfen und dichtet, wenn es nötig ist, noch mit Plastilin gut ab.

Abb.12

Kulturen anaerober Bakterien im Reagensglas

(§ 256 Ziff.1 und 2)



Der Sauerstoff ist in kürzester Zeit absorbiert. Die flüssigen Nährmedien müssen unmittelbar nach dem Sterilisieren beimpft werden. Plattenkulturen von anaeroben Bakterien sind viel umständlicher durchzuführen. Entweder braucht man eine sehr teure und komplizierte Apparatur, die es gestattet, die Bakterien unter einer Wasserstoffatmosphäre zu kultivieren, oder man muß sich nach der Methode von *Kißkalt* behelfen (67). Die Herstellung einer anaeroben Plattenkultur beschreibt *Kißkalt* wie folgt:

"Zum Anlegen von Kulturen unter Pyrogallussäure rollt man zunächst Plastilin zu Stangen von der Länge des Umfanges der unteren Hälfte einer Petri-Schale aus, legt sie ringförmig auf eine Glasscheibe, stellt in die Mitte ein Glasschälchen mit so niederem Rande, daß dieser nicht eine darüber gestülpte Petri-Schale berührt, und legt etwas Watte hinein. Dann macht man sich eine Lösung von 7-8 g Ätzkali in 30 ccm destilliertem Wasser und eine von 5 g Pyrogallussäure in 10 ccm heißem destilliertem Wasser und gießt von letzterer je 2 ccm in die Schälchen. Nun gießt man die Platten; in das erste Röhrchen bringt man mit der Pipette einen Tropfen und legt daraus wie gewöhnlich 3 Verdünnungen an. Sobald der Agar fest ist, gießt man je 5 ccm Kalilauge zur Pyrogallussäure, stülpt die gegossenen Platten (ohne Deckel) darüber auf den Ring und drückt das Plastilin fest. Hat man keine passenden kleinen Schälchen, so kann man auch einen Wattebausch direkt auf die Glasscheibe legen und mit den Flüssigkeiten übergießen".

Als Kulturmedium verwendet man bei Anaerobiern sehr häufig Zuckeragar. Zuckeragar ist gewöhnlicher Agar, dem 0,3-0,5% Traubenzucker oder Milchzucker zugesetzt worden sind.

(67) Kißkalt und Hartmann, *Praktikum der Bakteriologie und Protozoologie*. I. Teil: Bakteriologie. Jena 1914, Gustav Fischer, S.69

Fixiermethoden der Bakterien

A. Das Fixieren von Ausstrichen

§ 257.

1.*Robert Koch* stellte 1877 fest, daß Bakterien in dünner Schicht auf dem Objektträger oder dem Deckglas ausgebreitet und angetrocknet ihre Form sehr gut behalten, wenn sie in einfachster Weise durch Hitze fixiert werden. Man entnimmt etwas bakterienhaltiges Material mit dem ausgeglühten und wieder völlig erkaltetem Platindraht und streicht es in möglichst dünner Schicht auf dem Glase aus. Zweckmäßig wird dabei das Glas - Objektträger oder Deckglas - mit einer *Cornetschen* Pinzette gehalten. Bei Material, das nicht gut klebt, kann man auf den Objektträger zuerst einen kleinen Tropfen von sterilem Eiweiß oder Blutserum geben und verteilen. Das Eiweiß wird am besten frisch genommen und mit 1 bis 2 Teilen destillierten Wassers verdünnt.

Blutserum läßt sich dadurch gewinnen, daß man Blut (Schlachthof, Metzger) in einen hohen Zylinder einlaufen läßt und das Gerinnen abwartet. Nach dem Absetzen des Blutkuchens, am besten erst nach 12-24 Stunden, gießt man das Serum vorsichtig ab und versetzt es mit 0,5 %iger Karbolsäure. Dieses Serum ist jahrelang haltbar. Wem die Beschaffung dieses Serums zu umständlich ist, der kann aus einer Apotheke sogenanntes Normalserum oder irgendeinen abgelaufenen, d.h. zu Heilzwecken wegen Überalterung nicht mehr verwendungsfähigen Serumimpfstoff erwerben.

Der Ausstrich muß nun vollkommen lufttrocken werden, was in einigen Minuten geschehen ist. Hierauf erfolgt die Fixierung durch Hitze. Mit der Schichtseite nach oben zieht man den Objektträger durch die blaue Flamme des Bunsenbrenners oder 4-5 mal durch eine Spiritusflamme. Das richtige Fixieren ist durchaus Erfahrungssache und übrigens bald gelernt. Das Präparat darf nicht in der Flamme schmoren. Man beschreibt mit der Hand einen entweder waagrechten oder senkrechten Kreis von etwa 35-40 cm Durchmesser, zu dem man sich etwa eine Sekunde Zeit nimmt. (Mitzählen: 21 -22 -23) Bei der Kreisbewegung führt man jedesmal das Präparat durch die Flamme. Das Präparat ist nun fixiert.

2. Fixieren mit Alkohol, Methylalkohol usw. Statt des Fixierens durch Erhitzen kann eine Fixierung der Ausstriche auch mit absolutem Alkohol, mit Methylalkohol, mit Alkohol-Äther-Mischung oder Sublimatalkohol erfolgen. Diese Fixierung eignet sich besonders zur Durchführung der Polfärbung bei bipolaren Bakterien. Die Fixiermittel läßt man eine Stunde einwirken. Methylalkohol fixiert bereits in 2-3 Minuten.

3. Osmiumsäuredämpfe fixieren auch Ausstriche sehr gut. Die Ausstriche werden feucht den Dämpfen ausgesetzt. Dauer der Fixierung ist 1/2-2 Minuten. Nachhärten in Alkohol. Abspülen nach der Fixierung mit eben erkennbar gefärbter, ganz schwacher Lösung von Kaliumpermanganat. Abspülen mit destilliertem Wasser. Färben.

Bemerkung: Bei Ausstrichen, die Fett enhalten (Milch, Käse), muß dieses vor dem Färben mit Äther oder Chloroform entfernt werden.

B. Das Fixieren von Bakterien in Schnitten

§ 258. In Gewebeschnitten sind Bakterien nur durch Färbung nachzuweisen. Die zu untersuchenden Objekte (z.B. Bakterienknöllchen, Wurzel und Stengelstücke, Käse) werden in Stücke von etwa 5-8 mm Seitenlänge geschnitten. Diese Stücke werden als Ganzes fixiert. Uneinge-

bettetes Material gibt in der Regel keine genügend dünnen Schnitte. Zur Fixierung verwendet man Alkohol, Sublimatalkohol und *Pfeiffersches* Gemisch.

C. Bakterienrasen

§ 259. Schwefelbakterien und Myxobakterien können in größeren Flocken oder mit Teilen des festen Nährbodens in Formalin, *Pfeifferschem* Gemisch oder Sublimatalkohol *in toto* fixiert und weiterbehandelt werden. Nach Sublimatalkohol darf die Entfernung des Quecksilbers mit Jodalkohol nicht vergessen werden.

Färbemethoden der Bakterien

1. Die einfache Färbung des Ausstriches

§ 260. Zum Färben der Bakterien werden ausschließlich basische Anilinfarben benützt. Am häufigsten sind Methylenblau, Methylviolett, Gentianaviolett, Kristallviolett, Fuchsin und Bismarckbraun. Oft verwendet werden noch Safranin und Thionin, aber fast alle basischen Anilinfarben sind brauchbar. Methylenblaulösungen vertragen starkes Erhitzen nicht, die Lösungen der anderen Farben dagegen gut.

Bakterien lassen sich zum Teil auch noch mit anderen Farbstoffe darstellen, so mit einigen sauren Farben, manchen Hämatoxylinrezepturen, manchen *Becher*-Farben und mit der Goldimprägnation. Aber diese Methoden sind für die diagnostischen Bakterienfärbungen nicht sicher genug und auch zu umständlich.

Es sind sehr zahlreiche Vorschriften zur Bakterienfärbung, besonders in der medizinischen Literatur, veröffentlicht worden. Dem Zweck dieses Buches entsprechend werden nur einige allgemein verwendbare Färbemethoden angegeben.

Zur einfachen Färbung fixierter Ausstriche verwendet man eine verdünnte wässrige Auflösung des Farbstoffes. Man tropft auf den Objektträger so viel Farblösung auf, daß der ganze Ausstrich schwappend von Farbe bedeckt ist; der Objektträger kann dann über der Flamme erwärmt werden. Die Färbedauer ist 3-30 Sekunden, man muß es für die einzelnen Farbstoffe ausprobieren. Hierauf erfolgt Abspülen mit Wasser. Zur Beurteilung der Färbung kann jetzt ein Deckglas aufgelegt werden. Das Präparat ist nun fertig zum Studium unter dem Mikroskop.

Für Dauerpräparate läßt man den Ausstrich vollkommen trocknen, gibt einen Tropfen Caedax und ein Deckglas darauf. Ausstriche können auch ohne Deckglas mit der Ölimmersion studiert und als Dauerpräparat aufbewahrt werden.

Für die Färbung ist zu beachten:

a) Starke Lösungen färben rascher als verdünnte, überfärben aber leicht. Besonders leicht überfärbt Gentianaviolett, Methylviolett und Kristallviolett.

b) Verdünnte Lösungen färben langsamer, geben aber vielfach schönere, reinere Bilder. Besonders rein färben Methylenblau und Thionin.

Die Lösungen zur Bakterienfärbung müssen jedesmal frisch bereitet sein, um störende Niederschläge mit Sicherheit zu vermeiden. Mindestens ist ein jedesmaliges Filtrieren notwendig. Am einfachsten ist es, sich alkoholische Stammlösungen (5g Farbstoff in 100 ccm 96 %igen Alkohol gelöst) vorrätig zu halten. Unmittelbar vor Gebrauch vermischt man dann 5 Tropfen der alkoholischen Stammlösung mit 50-100 Tropfen destilliertem Wasser und verwendet dann diese Mischung zur Bakterienfärbung.

2. Färbung schwer färbbarer Bakterien

Nicht alle Bakterien färben sich nach der eben geschilderten Methode. Zwar kann man durch Erwärmen des mit der Farblösung versehenen Objektträgers über der Flamme etwas nachhelfen, es empfiehlt sich aber, der Farbe eine Beize zuzusetzen. Als Beizen kommen in Frage Kalilau-

ge, Karbolwasser und Anilin. Anilin wird kaum mehr angewendet. Für die Zwecke unseres Buches ist es entbehrlich.

Für schwer färbbare Bakterien verwendet man am besten *Löfflers* alkalische Methylenblaulösung, Karbolfuchsin nach *Ziehl-Neelsen*, Karbolgentianalösung oder *Giemsa*-Färbung.

3. Die Färbemethode nach *Gram*

Mit den bisher genannten Färbemethoden können Bakterien in Ausstrichen gefärbt und damit nachgewiesen werden. Es gibt aber eine Färbemethode - die Methode nach *Gram* -, die es gestattet, die Bakterien nach ihrem färberischen Verhalten in zwei große Gruppen einzuteilen. Diese Methode beruht darauf, daß Jod mit den Farbstoffen der Pararosaniline, dann noch mit Viktoriablau, eine neue chemische Verbindung eingeht, die von manchen Bakterien - eben den sogenannten gram-positiven - sehr schwer wieder abgegeben wird. In der praktischen Medizin hat diese Methode größte Bedeutung erlangt. Für die Diagnose einer Infektionserkrankung ist es wichtig zu wissen, ob im untersuchten Material überhaupt gram-positive Bakterien vorkommen oder nicht.

Über die Durchführung der Färbung siehe § 166, 167, 187.
Bei Benützung der *Gram-Simultanfärbung Hollborn* färben sich:

Gram-positiv (blau bis violett)

Bacillus der Mäuseseptikämie
Bacillus pyocyaneus
Bacillus des Rauschbrandes
Bacillus des Schweinerotlaufs
Bacillus emphysematosus
Diplokokkus pneumon. Fraenkel
Enterokokken
Leprabacillus
Mikrococcus tetragenus
Milzbrandbacillus
die sogenannten Kartoffelbazillen
Mycel des Aktinomyces
Soorpilz
Staphylococcus pyogenes aureus
Staphylococcus pyogenes albus
Staphylococcus pyogenes citreus
Streptococcus pyogenes
Tetanusbacillus
Tuberkelbacillus
viele Fäulnisbakterien
die Pilze der Sporotrichose
Heubacillus

Diphtheriebacillus und erysipelat

Gram-negativ (rot)

Bacillus Bang
Bacillus des malignen Ödems
Bacillus des Rhinoskleroms
Bazillen der Bubonenpest
Bazillen der Hühnercholera
Bazillen der Kaninchenseptikämie
Bazillen des Typhus abdominalis
Bazillen der Wild- und Rinderseuche
Bazillen des Rotzes
Bacterium coli
Proteus vulgaris
Choleravibrionen
Vibrio metschnikoff
Diplococcus catarrhalis
Influenzabazillen
Menigokokken
Mikrokokken des Maltafiebers
Pneumoniebacillus
Rekurrensspirillen
Syphilisspirochäten
Gonokokken

Bei der Färbung nach *Gram*, besonders bei der Färbung mit Gentianaviolett, gibt es Übergänge. Manche Bakterien sind bei kurzer Alkoholbehandlung positiv und bei längerer Alkoholbehandlung negativ. Für unsere Zwecke empfehle ich besonders die *Gram-Simultanfärbung nach Hollborn* mit Viktoriablau-Pyronin.

4. Die Sporenfärbung

Die Bazillensporen nehmen die einfache Färbung nicht an. Zur Sporenfärbung müssen die Ausstriche vorgebeizt werden. Der Färbungsvorgang spielt sich dann folgendermaßen ab:

Sporenfärbung nach *Möller*

1. Die fixierten Ausstriche werden 5-10 Minuten mit 5 %iger wässriger Chromsäurelösung vorgebeizt, dann Abspülen in Wasser.
2. Färben mit Karbolfuchsin nach *Ziehl*.
3. Entfärben mit 5 %iger Schwefelsäure. Hierfür werden nur Sekunden benötigt.
4. Abspülen mit Wasser.
5. Nachfärben mit dünner Methylenblaulösung. Abspülen mit Wasser.
6. Behandeln mit 1 %iger Tanninlösung.
7. Abspülen, Trocknen, Caedax oder
8. Alkohol, Xylol oder Terpineol, Caedax

Die Sporen erscheinen rot, die Bazillen blau.

5. Die Geißelfärbung

Die Darstellung der Bakteriengeißeln ist eine sehr schwierige Prozedur. Das Gelingen der Methoden hängt davon ab, daß junge 8-12 stündige Agarkulturen zur Verfügung stehen und daß *vollkommen fettfreie Deckgläser oder Objektträger* Verwendung finden. Hier wird die Methode nach *Peppler* geschildert. Wegen weiterer färberischer Methoden sei auf die bakteriologische Literatur verwiesen.

Zur Anfertigung des Präparates müssen die Bakterien sehr verdünnt ausgestrichen werden. Man nimmt fünf Objektträger und versieht jeden davon mit einem Tropfen Leitungswasser. Mit der Platinöse bringt man nun wenig Kultur in den ersten Tropfen und vermischt. Ein Tropfen des Gemisches wird auf den zweiten Objektträger gebracht und wieder verrührt. Man verfährt nun so weiter, bis man beim fünften Objektträger angekommen ist. Dieser fünfte Objektträger ergibt dann das zu färbende Präparat. Man läßt lufttrocken werden und fixiert vorsichtig in der Flamme. Hierauf wird der Ausstrich 1-5 Minuten (ausprobieren!) ohne Erwärmen mit der Beize nach *Peppler* behandelt. Abspülen mit Leitungswasser. Erwärmen mit Gentianaviolettlösung nach *Peppler*, anschließendes Abspülen mit Leitungswasser. Vorsichtig trocknen. Caedax.

Die zum Verfahren nach Peppler benötigte Beize und Farblösung bezieht man am besten fertig von *Grübler* oder *Hollborn*. Die Selbstherstellung lohnt nicht, weil sie schwierig ist. Nur der Vollständigkeit halber folgen hier die Herstellungsvorschriften.

Beize nach *Peppler*

20 g Tannin werden in 80 ccm destilliertem Wasser unter Erwärmen aufgelöst. Nach Abkühlung auf 20 °C fügt man 2,5 %ige schwefelsäurefreie Chromsäurelösung, und zwar in einer Menge von 15 ccm, zu. Nachdem die Beize eine Woche gestanden hat, filtrieren. Vor Gebrauch ebenfalls filtrieren.

Gentianaviolett *nach Peppler*

Konzentrierte alkoholische Gentianaviolettlösung	10 ccm
Acidum carbolicum liquefactum	2,5 ccm
Destilliertes Wasser	90 ccm.

Nach dem Absitzen filtrieren! Vor Gebrauch filtrieren!

Eine weitere, sehr einfache Art der Geißeldarstellung ist folgende. Als Untersuchungsmaterial benützen wir größere Bakterienformen, wie sie besonders in der Stalljauche vorkommen. Dünne Ausstriche von verdünnter Jauche auf Deckgläsern läßt man langsam an der Luft trocknen. Die Ausstriche werden nicht fixiert, sondern unverändert in Luft eingeschlossen betrachtet. Das Deckglas wird auf einen passend zugeschnittenen Kartonrahmen (Postkarte) aufgeklebt. Der Kartonrahmen wird nun ebenfalls auf den Objektträger aufgeklebt. Untersuchung mit Ölimmersion. Bei der Beobachtung ist das Licht ziemlich abzublenden, auch schiefe Beleuchtung ist manchmal günstig. Soll das Präparat dauernd aufbewahrt werden, so ist im Kartenrahmen ein Ausschnitt von einigen Millimetern zu lassen, sonst beschlägt das Glas von Feuchtigkeit.

Manchmal sind Geißeln durch das Tuscheverfahren oder durch Goldimprägnation sichtbar zu machen. Die schönsten Bilder ergibt die Beobachtung im Dunkelfeld.

6. Kapselfärbung und Kapseldarstellung nach *Burri*

Manche Bakterien weisen eine deutliche Kapsel auf. Vielfach ist diese Kapsel schon erkennbar an Präparaten, die mit *Löfflers* Methylenblau, Karbolfuchsin oder nach *Gram* oder *Giemsa* gefärbt worden sind.

1. Färbevorschrift nach *Räbiger*

Man benützt folgende Farbstofflösung: 100 ccm 40 %iges Formol und 15 g Gentianaviolett. Nach 24 Stunden filtriert man die Lösung. Aufbewahren in braunem Glase.

Der Bakterienaufstrich wird nur lufttrocken, nicht fixiert, mit der Farbe beträufelt. Die Färbedauer ist 20 Sekunden. Abspülen in Wasser. Untersuchen in Wasser. Die Kapseln sind blau, die Bazillen dicker als sonst bei anderen Färbeverfahren. Bei Einschluß in Caedax verschwindet vielfach die Kapsel oder wird undeutlich.

2. Das Tusche-Verfahren nach *Burri*

Eine weitere einfache und sehr sichere Art der Kapseldarstellung ist das Tusche-Verfahren nach *Burri*. Dazu benützt man die sterile *Pelikantusche von Günther und Wagner für mikroskopische Zwecke*. Sehr zweckmäßig ist eine Verpackung in Tubenform (*Grübler*). Ein Tropfen des Untersuchungsmateriales wird auf dem Objektträger mit einem Tropfen Tusche vermischt und dünn ausgestrichen. Nach dem Lufttrocknen Caedax und Deckglas. Man kann auch, eventuell nach Serumzusatz, den trockenen Ausstrich fixieren und mit einer basischen Anilinfarbe färben.

Resultat: Bakterien gefärbt, Kapseln ungefärbt auf dunklem Grunde. Bei Einschluß in Caedax bleibt die Kapsel erhalten.

7. Färbung säurefester Bakterien

Die säurefesten Bakterien besitzen Fette oder Wachs und färben sich daher mit gewöhnlichen Anilinfarben nicht. Zum Färben sind Beizenfarbstoffe nötig. Einmal mit Beizenfarbstoffen gefärbt, zeigen sie sich als säure-, alkali- und alkoholfest.

Das Verfahren ist folgendes:

1. Man färbt den fixierten Ausstrich mit Karbolfuchsin 3-5 Minuten unter Erwärmen über der Flamme bis zum Auftreten von Dämpfen.
2. Abspülen mit Wasser.
3. Behandeln mit einer Lösung 100 ccm 70 %igem Alkohol und 1 ccm Salzsäure, bis die rote Farbe verschwunden ist.
4. Abspülen mit Wasser.
5. Nun erfolgt Färbung mit *Löfflers* Methylenblau, Abspülen mit Wasser, Tanninbeizung, Trocknen, Caedax, Deckglas.

Färbeerfolg: Säurefeste Bakterien, auch Chitin in Schnitten von Insekten: rot. Gewebe und andere Bakterien: blau.
Säurefeste Bakterien sind zahlreich im Pflanzenfressermist aufzufinden.

B. Ausgewählte Beispiele zur Bearbeitung der Bakterien

I. Bakterien im engeren Sinne

§ 261. Bakterien sind fast allgegenwärtig. In der Luft, im Wasser, in der Erde in und an allen toten, verderbenden und verwesenden organischen Stoffen, im Munde und im Darmkanal von Mensch und Tieren, überall finden sich Bakterien. Eine große Rolle spielen sie als Erreger von Krankheiten. Doch sind manche unter ihnen eine unentbehrliche Hilfe des Menschen in der Land- und Milchwirtschaft und der Essigindustrie. An Untersuchungsmaterial fehlt es daher nie. Die Beschäftigung mit den Bakterien hat sich zu bedeutenden Disziplinen in der Medizin, Technologie und Landwirtschaft entwickelt.

In diesem Buche können daher nur einige wenige Beispiele angeführt werden. Sie sind so ausgewählt, daß die Beschaffung des Materials leicht ist, die Bearbeitung ohne Schwierigkeiten und ohne Gefahren für die Gesundheit durchgeführt und doch alles Wesentliche über Arbeitsmethode und Eigenschaften der Bakterien kennengelernt werden kann. Krankheitserreger bei Mensch und Tier haben wir aus unseren Betrachtungen völlig auszuschalten. Die Beschäftigung mit ihnen ist nach der Gesetzgebung den Ärzten und Tierärzten vorbehalten und auch bei diesen an eine besondere Erlaubnis der Polizeibehörde geknüpft, soweit es sich nicht um rein diagnostische Untersuchungen handelt. Es bleiben interessante Untersuchungsobjekte genug übrig. Im übrigen sind Ausstrichpräparate pathogener Bakterien wie von Milzbrand, Cholera, Tuberkulose und Gonorrhoe usw. käuflich bei *Hollborn* und anderen Firmen zu erwerben.

Wir untersuchen nun einige in bunter Reihe aufgeführte Objekte, an denen wir besonders die botanisch interessanten Eigenschaften studieren werden.

Zahnschleimbakterien

§ 262. Der weiße Belag der Zähne des Menschen und der Haustiere wird von zahlreichen Bakterien bewohnt. Wir fertigen Ausstriche an und behandeln zunächst einen Ausstrich mit Jodjodkaliumlösung. Nach dem Abspülen mit Wasser untersuchen wir. Häufig sind dicke, sich blaufärbende Fäden vorhanden, die als *Bacillus maximus buccalis* bezeichnet werden. Andere dünnere Fäden färben sich gelb. Sie werden mit *Leptothrix innominata* bezeichnet. *Jodococcus vulgaris* färbt sich blauviolett. Häufig findet sich noch *Spirochaeta dentium*, *Vibrio buccalis* und noch manch andere Formen (Straßburger).

Andere Ausstriche färben wir mit *Gram-Simultanfärbung nach Hollborn* und mit einfachen Färbungen.

Fäulniserreger

§ 263. Fäulniserreger sind allgemein verbreitet und stellen sich immer ein, wenn man rohes oder gekochtes Fleisch oder Hühnereiweiß mit etwas Wasser der Fäulnis überläßt. Meistens treten Bakterien aller Formen auf. Weitaus das häufigste ist *Proteus vulgaris*. Wir färben Ausstrichpräparate.

Kotbakterien

§ 264. Im Stuhle des Menschen und im Kote der Fleischfresser finden sich bei mikroskopischer Untersuchung derartige Mengen von Bakterien, daß man annehmen möchte, der Kot bestünde überhaupt nur aus Bakterien. Das häufigste Bakterium ist *Bacterium coli commune*.

Im Miste der Pflanzenfresser, besonders wenn er einige Zeit auf Haufen gelegen ist, finden wir an Ausstrichen wirklich alle Formen von Bakterien, die es zu geben scheint.

Wir färben Ausstriche nach den verschiedensten Verfahren.

Jauchebakterien

§ 265. Jauche, besonders aus Schweinestallungen, enthält in der Regel sehr viele Spirillen. Spirillen können wir auch erreichen durch einfache Aufgüsse von Stroh. Es kommen da sehr große Formen vor, wie z.B. *Spirillum undula majus, Sp. volutans* und andere. Spirillen enthalten, besonders aber *Sp. volutans*, das nach letzterem benannte Volutin.

Wir färben Ausstriche nach den verschiedensten Methoden, auch auf Volutin (s. § 293 Ziff. 6).

Essigsäurebakterien

§ 266. Essigsäurebakterien können leicht aus der Luft aufgefangen werden. Wenn offene Schalen mit Bier oder Wein, am besten filtriert, an der Luft stehen, wird der Inhalt bald sauer. An der Oberfläche bildet sich eine Kahmhaut.

Das Mikroskop zeigt uns, ob wir Glück gehabt und die gewünschten Bakterien oder auch Hefen sich eingestellt haben. Eine gallertige feste Haut deutet auf *Bacterium xylinum* hin, eine sehr dünne, staubähnliche Haut auf *Bacterium ascendens* oder *Bacterium viniazetati*. Es gibt noch eine Reihe anderer Essigsäurebakterien. Einzelheiten müssen der Literatur entnommen werden, z.B. *Henneberg, Gärungsbakteriologisches Praktikum, Berlin 1909*.

Wir fertigen Ausstriche an und färben nach den verschiedenen Methoden.

Bakterien der sauren Milch

§ 267. Zum Leidwesen der Hausfrauen wird Milch bekanntlich beim Stehen leicht sauer. An der Säuerung sind Bakterien, und zwar die sogenannten Milchsäurebakterien, schuld. Säuert die Milch bei Zimmertemperatur, so findet sich fast immer *Streptococcus lactis*. Geht die Säuerung bei 45-50 ^{O}C vonstatten, so zeigen sich in der Regel die Lactobazillen. Ausstriche müssen vor dem Färben nach dem Fixieren entfettet werden (Ether, Chloroform).

Die Ausstriche färben wir nach den verschiedenen Methoden.

Bakterien im Käse (68)

§ 268. Die Käsereifung wird zum Teil ebenfalls durch Bakterien hervorgerufen. Zur Untersuchung ziehen wir verschiedene Sorten Hart- und Weichkäse heran. Von Hartkäse fertigen wir Schnitte an. Kleine Stücke der Rinde mit anhängendem Käse fixieren wir in Formalin. Einbetten erfolgt entweder in Paraffin oder Zelloidin. Käse ist sehr dicht und braucht sehr lange, bis er vom Einbettungsmedium durchdrungen ist. Die Schnitte sollen etwa 10µ Dicke haben. Wir färben nach *Gram*, am besten nach der *Gram-Simultanfärbung nach Hollborn*. Die Bakterien sind in und unmittelbar unter der Rinde in dichter Schicht zu sehen.

Von Weichkäse fertigt man einfache Klatschpräparate an. Der Objektträger wird ohne große Gewalt auf eine frisch hergestellte Schnittfläche aufgedrückt und nach einigen Sekunden wieder entfernt. Eingedrückt werden darf der Käse dabei nicht. Der Abklatsch wird nun wie ein Ausstrich mit Alkohol gehärtet, mit Chloroform entfettet und dann gefärbt.

Mikrotomschnitte sind nicht so einfach herzustellen, da die Weichkäse sich schlecht einbetten. Nach *Gutsche* führt man die Objekte bis in 4 %iges Zelloidin, härtet dieses und führt dann über Benzol, Benzolparaffin in reines Paraffin und bettet dort ein.

Zur Färbung empfiehlt sich neben der *Gramschen* Färbung besonders das Metyhlenblau. Neben den Bakterien werden auch die vielfach vorhandenen Schimmelpilze schön dargestellt.

(68) Thaler, Mikrokosmos XXXII, 1938/39, S.95; Mikrokosmos XXXIII, 1939/40, S.14

Bakterienknöllchen der Leguminosen

§ 269. An den Wurzeln der meisten Leguminosen finden sich Knöllchen, gallenartige Auswüchse, die durch die Tätigkeit des *Bacillus radicicola* verursacht werden. Bei der Lupine, Erbse, Bohne und Wicke werden wir nicht umsonst suchen. Fast alle unsere einheimischen

Kleearten weisen längliche, wurstförmige Knöllchen auf, die allerdings z.T. sehr klein sind im Vergleich zu den Knöllchen der oben genannten Pflanzen. Jüngere Knöllchen, besonders im frühen Sommer, zeigen die typischen Bakterienformen, die älteren Knöllchen im Herbst beherbergen die sogenannten Bakterioiden, also pleomorphe Formen.

Untersuchungstechnik:

1. Ausstriche mit angeschnittenen frischen Bakterienknöllchen oder zerzupften Schnitten.
2. Schnitte, senkrecht zur Längsachse des Wurzelstieles, entweder durch frisches Material ohne Einbettung oder nach Einbettung (Paraffin).

Günstige Fixierung:

1. Chromessigsäure, Formalin oder *Pfeiffer*.

Die Färbung kann erfolgen:

1. Nach *Hiltner* mit Säurefuchsin und Methylenblau. Die Bakterien erscheinen rot, das Knöllchengewebe blau und die Schleimfäden sind ungefärbt.
2. Mit Safranin-Gentianaviolett-Orange.
3. Mit *Becher*-Farben und Safranin oder Goldimprägnation mit oder ohne Gegenfärbung mit Lichtgrün.

Zu sehen sind an den Schnitten besonders große Zellen, die prall mit Bakterien erfüllt sind.

Bakteriosen der Kulturpflanzen

§ 270. Unter einer Bakteriose versteht man eine Pflanzenkrankheit, die durch Bakterien hervorgerufen wird. Solche Bakteriosen sind viele bekanntgeworden. Unsicher ist jedoch, ob in jedem Falle die Bakterien die Ursache oder nur eine Begleiterscheinung darstellen. Jedenfalls treten die Bakterien an lebenden Pflanzen auf, was die Bakteriosen, wenigstens am Anfang, von der gewöhnlichen Fäulnis unterscheidet.

Bei der Kartoffel treten mehrere Bakteriosen auf. Am bekanntesten ist die Knollenbakteriose (Naßfäule, Wurzelfäule). Im Herbst schon auf dem Acker oder später beim Lagern zeigen die Kartoffelknollen Faulstellen, die mit einer Schleimmasse erfüllt sind. Darin finden sich *Bacillus amylobacter* (mit spitzen Enden) und *Bacillus solaniperda* mit stumpfen Enden. Zuweilen tritt häufig auch die Ringbakteriose der Kartoffel auf. Im zeitigen Frühjahr zeigt sich, daß manche Kartoffel nach der Saat nicht aufgegangen ist oder daß die Pflanzen kränkeln. Die Stengel erscheinen glasig und werden später durchscheinend braunfleckig. In der Knolle und in allen Gefäßbündeln finden wir *Bacillus solanacearum.* Bei der Schwarzbeinigkeit der Kartoffel finden sich in den Gefäßen eine Reihe von Bakterien.

Weitere Bakteriosen finden sich an weißen Rüben (die Braunbakteriose der Rübe), an Zucker- und Futterrüben. Wer darauf achtet, kann sicher das eine oder das andere Material finden. Man vergesse auch den Küchengarten nicht zu überprüfen.

Die Untersuchungstechnik ist dieselbe wie bei den Bakterienknöllchen. Bei den Ausstrichen finden sich nicht nur die Bakterien, sondern auch Stärkekörner und zerfallende Gewebsteile vor. Die Schnitte führt man so, daß immer gesunde und kranke Teile der Pflanzen im Schnitt zu sehen sind.

Bakteriosen kommen auch an Holzgewächsen vor. Hier verursachen die Bakterien keine Erweichungen und Fäulnis, sondern krebsartige Wucherungen oder geschlossene Beulen, die auch als Tuberkeln bezeichnet werden. In der heimatlichen Flora sind derartige Bakteriosen selten.

Der Krebs der Eschen wird als Bakteriose aufgefaßt. *Sorauer* beschuldigt ebenfalls Bakterien für den Gummifluß (Gummosis) der Kirschbäume.

Auf Urlaubsreisen nach dem Süden ist dagegen leicht Untersuchungsmaterial erhältlich. An der Olive (*Olea europaea*) treten häufig knollenartige Anschwellungen der Zweige (Tuberkeln) auf. Als Erreger gilt *Bacillus oleae*.

Ebenso häufig ist eine ähnliche Tuberkulose an der Aleppokiefer (*Pinus halepensis*), die in Norditalien und Südfrankreich in größeren Waldbeständen vorkommt. Als Erreger wird der *Bacillus pini* angesehen. Man versuche, die Tuberkeln uneingebettet zu schneiden. Even- tuell bettet man in Zelloidin ein und behandelt den Zelloidinblock mit Glycerin. Man kann den Block sogar in Glycerin kurz kochen.

Färbungsverfahren wie an Schnitten durch Bakterienknöllchen.

Sporenbildende Bakterien

§ 271. Sporenbildende Bakterien sind in Erde, Stroh, Heu usw. allgemein zu finden. Ihre Bekanntschaft macht man gewöhnlich bereits bei den ersten Versuchen, Kartoffeln als Nährmedien zuzubereiten. Die gekochten Kartoffeln schneiden wir mit einem ausgeglühten Messer in zwei Hälften und verbringen sie sofort unter eine Glasschale. Bei der Probebebrütung werden wir recht häufig vom Schalenrand her Kolonien des *Bacillus mycoides* vorfinden. Ähnliche Bazillen erhält man, wenn man abgewaschene Stücke von Rettich, Sellerie oder verschiedene Rüben usw. kocht und dann in sterilen Petrischalen unter Kultur nimmt. Meistens entwickeln sich nach 2-3 Tagen schon bei Zimmertemperatur tautropfenartige Bakterienkulturen. Diese Bakterien können nach der Ausstrichmethode auf Gelatine oder Kartoffeln in Reinkultur erhalten werden.

Ein beliebtes Versuchsobjekt ist für die sporenbildenden Bakterien der Heubacillus (*Bacillus subtilis*). Er wird mit Sicherheit auf folgende Weise erhalten:

Wir bereiten aus Heu und wenig Wasser zunächst einen Auszug und lassen ihn in der Wärme (Ofen, Brutschrank) 4-5 Stunden stehen. Hierauf wird der Auszug abgegossen und mit der gleichen Menge Brunnenwasser verdünnt; in einem Erlenmeyerkolben mit Watteverschluß kochen wir ihn eine Stunde lang. Nach dem Erkalten lassen wir nun den Kolben warm stehen, am besten im Brutschrank. Es bildet sich bald eine Kahmhaut von *Bacillus subtilis*.

Die Sporen aller dieser Bakterien bilden sich am ehesten in einer kleinen Kultur im hängenden Tropfen, weil sich hier das Nährmedium am schnellsten erschöpft. Im hängenden Tropfen können wir bereits 6-8 Stunden nach Anlage der Kultur Sporenbildung erwarten. In neuer Nährlösung keimen die Sporen wieder aus. An Ausstrichpräparaten färben wir die Bazillen, die Sporen und die keimenden Sporen mit Anilinfarben.

Thermophile Bakterien

§ 272. Thermophile Bakterien sind sporenbildende Bazillen, die ihr Wachstumsoptimum bei sehr hohen Temperaturen haben. Auf sterilen Kartoffeln impfen wir Material von oberflächlichen Bodenschichten aus und kultivieren im Brutschrank bei 56-58 ^{O}C. Nach 2 Bis 4 Stunden erfolgt bereits üppiges Wachstum.

Stickstoffbindende Bakterien

§ 273. *Bacterium acetobacter* kommt in der Erde vor. Er ist ein sehr interessantes Bacterium. Die einzelnen Bakterien sind so groß und genau so geformt wie Hefezellen. Nach *Löhnis* gelingt eine Anreicherungskultur meistens nach folgenden Verfahren:

1. Fünf Gramm natürlicher Gartenerde, nicht getrocknet, werden mit 100 ccm Wasser geschüttelt, stehen gelassen und der Extrakt abgegossen. Dazu gibt man 0,05 g KH2PO4 und 1-2 g Mannit. Das Ganze kommt in einen Erlenmeyerkolben. Zuletzt stellt man einen Filtrierpapierstreifen in den Kolben, und zwar so, daß ein Teil aus dem Wasser herausragt. Nach 5-10 Tagen bei 20-30 ^{O}C erscheint *Acetobakter* meistens gut und mit *Bacterium radiobakter* vergesellschaftet. *B.acetobakter* siedelt sich mit Vorliebe auf dem Filtrierpapier als gelbbrauner Belag

an. Wenn man Pech hat, erscheinen Buttersäurebakterien, der Versuch ist dann mit einer anderen Erdprobe zu wiederholen.

2. Der mannithaltige Erdextrakt kann auch mit Gipsblöckchen zusammen angewendet werden. Man kann dann gleichzeitig verschiedene Erdproben auf dem Gipsblöckchen nebeneinander aussäen, was sehr verschiedene Bilder ergibt.

Ausstriche werden nach verschiedenen Methoden gefärbt.

Anaerobe Bakterien

§ 274. Anaerobe Bakterien gibt es in großer Anzahl. Die meisten von ihnen kommen überall da vor, wo Fäulnis auftreten kann, also im Wasser, in der Erde und in Leichen. Auch einige Krankheitserreger werden von den Anaerobiern gestellt wie die Erreger des Gasbrandes, des malignen Ödems und des Wundstarrkrampfes. Hierher gehören auch viele Purpur- und Schwefelbakterien.

Von den nicht pathogenen Bakterien seien genannt *Bacillus putrificus* (Bienstock), *Bacillus amylobacter* und *Bacillus butyricus*. Die beiden letztgenannten, die wir untersuchen wollen, unterhalten die Buttersäuregärung der Milch. Sie kommen weitverbreitet vor in unsauber gewonnener Milch und in der Erde, besonders auf Bauernhöfen.

Um ihre Züchtung zu erleichtern, setzen wir zunächst eine Anreicherungskultur an. Ein halber Liter entrahmter roher Milch in einem Glaskolben wird mit etwa 1 g Erde geimpft und 30 Minuten im Wasserbade gekocht. Dadurch werden alle sporenfreien Bakterien abgetötet, während die Sporen am Leben bleiben; so wird eine Auslese geschaffen. Während des Erkaltens wird die Flasche zugekorkt, jedoch nicht allzu fest, und dann auf einen Teller in den Brutschrank gestellt. Vorsicht! Manchmal zerspringt die Flasche. Der Brutschrank ist nicht unbedingt notwendig, nur geht das Wachstum bei Zimmertemperatur wesentlich langsamer vor sich. Tags darauf zeigt lebhafter Gestank die Bildung der Buttersäure an, während die Milch teilweise geronnen ist.

Untersuchung der Milch im hängenden Tropfen! Von dieser Milch versuchen wir Reinkulturen anzulegen, und zwar auf Zuckeragar und Zuckergelatine.

Über die Anlage von anaeroben Kulturen siehe bei § 256. In den Kulturen findet man bei den Buttersäurebakterien in der Regel zwei Arten, den *Bacillus butyricus Botkin* und den *Bacillus amylobacter*, der noch die synonymen Bezeichnungen *Bacillus butyricus Prazmowsky* oder *Clostridium butyricum* führt. Wird er auf Kartoffelschnitzeln kultiviert, so zeigt er einen Granulosegehalt und gibt im Ausstrich mit Jodlösungen eine Blaufärbung. Dadurch kann er von dem *Bacillus butyricus Botkin* unterschieden werden.

Färbung wie bei den aeroben Bakterien.

II. Strahlenpilze - Aktinomyceten

§ 275. Die Strahlenpilze sind 1µ breite Fadenpilze mit echtem monopodialen Verzweigungen. Sie leben im Wasser und im Erdboden, wo sie auf abgestorbenen Pflanzenteilen, Mist und Heu vorkommen. Einige Arten finden sich als Krankheitserreger bei Mensch, Rind, Ziege, Hund und Eidechsen. Strahlenpilze müssen fast immer durch Roh- oder Anreicherungskulturen gewonnen werden. Einige einfache Methoden dazu sind folgende:

1.Methode nach *Berestnew*

In eine Schale mit sterilem feuchten Sand steckt man senkrecht zur Oberfläche etwa 3-6 cm lange Strohpartikel, wie man sie im Herbst auf den Stoppeläckern findet. Das Ganze wird mit einer großen Glasschale zugedeckt. Nach etwa 2-3 Wochen zeigen sich an infizierten Strohstückchen trockene, kreidige Beläge, welche aus Aktinomyceten bestehen. In der Zwischenzeit werden an manchen Strohhalmen auch Schimmelpilze aufgehen. Diese Strohhalme entfernt

man am besten, wenn man das Ganze in den Brutschrank bei 38-40 ^{O}C stellt; im Temperaturintervall von 48-60 ^{O}C, erhält man thermophile Arten.

2. Methode nach *Kostka*

Eine Rohkultur erhält man nach *Kostka*, wenn man in Erlenmeyerkolben Erde mit Nährlösungen bei ca. 40 ^{O}C hält.

Leitungswasser	100	ccm
Stärke	1	g
KNO3	0,6	g
K2HPO4	0,1	g

Man erhält meistens *Actinomyces coelicolor* und *A.diastaticus*.

Leitungswasser	100	ccm
Filtrierpapier	6	g
NH4Cl	0,1	g
K2HPO4	0,1	g

Man erhält *A.cellulosae*, besonders auf herausragenden Papierstreifen.

3. Methode nach *Levy* und *Neukirch* (69)

Nach *Levy* und *Neukirch* ist die bequemste Methode folgende: Gelatineplatten oder Glyceringelatineplatten mit 2% Glycerin werden mit dem Ausgangsmaterial besät und bei 10-15 ^{O}C gehalten. Die günstigste Kulturzeit ist das Frühjahr, dann wieder der Herbst und der Winter. Bei dieser niederen Temperatur wachsen die Sporen der Erdbakterien, und diese selbst fast gar nicht, während Aktinomyces bereits gut wächst. Die Kulturdauer beträgt 8-12 Tage und länger, bis zu 30 Tagen.

(69) Neukirch, *Über Aktinomyceten.* Dissertation Straßburg 1902

4. Reinkulturmethoden

Auf den Rohkulturen angegangene isolierte Kolonien können für Reinkulturen verwendet werden, falls es wünschenswert erscheint. Die Arten der Gattung *Aktinomyces* zeigen auf verschiedenen Nährmedien verschiedenes Verhalten im Wachstum, so daß die systematische Bearbeitung sehr erschwert ist.

In homogenen Medien wie Bouillon bildet das sich reich verzweigende Mycel kugelige Kolonien, die wie Watteflöckchen aussehen. Der Durchmesser beträgt zwei bis mehrere Millimeter. Auf festen Nährböden sind die Wucherungen flach, glatt, später erheben sie sich warzenartig über die Nährböden; dabei bilden sich Lufthyphen mit den Konidien. Dadurch entsteht ein trockener, kreidiger Belag auf der Kultur, der die verschiedensten Farben aufweisen kann.

Gelatine wird von manchen Arten verflüssigt. In flüssigen Nährmedien entwickeln sich die meisten Kolonien schwimmend auf der Oberfläche. Im hängenden Tropfen kann man nach 2-5 Tagen die Sporenbildung durch Fragmentation, d.h. Zerfall in Sporen erreichen.

§ 276. Untersuchungstechnik. Lebende Aktinomyces-Fäden lassen sich mit stark verdünnter, eben noch blau erscheinender Lösung von Methylenblau in Wasser färben. Junge Fäden färben sich dabei diffus gleichmäßig hellblau und zeigen manchmal stark dunkelblau gefärbte Körner. Altere Fäden zeigen das Außenplasma dunkel und das Innenplasma hellblau gefärbt.

An lebenden Fäden läßt sich fernerhin mit Jodjodkalilösung eine differenzierte Färbung erreichen. Es färben sich die Außenmembranen undeutlich hellgelb, das Außenplasma braun und die Körner dunkelbraun.

Destilliertes Wasser	200 ccm
Kaliumjodid	1 g
Jod	2 g

Fixierung: Die Fixierung kann geschehen mit der oben angegebenen Jodlösung, mit Formalin, Formalinalkohol, Alkohol und *Zenkerscher* Flüssigkeit. Letztere ist besonders für ganze Kulturen auf Gelatineböden zu verwenden.

Färbung: Die Färbung nach *Ziehl-Neelsen* und die Sporenfärbemethoden versagen. Am meisten angewendet werden

1. die Färbung nach *Gram* und
2. die Färbung getrennt mit Methylenblau und mit Eosin.
3. Auch die Goldimprägnation kann angewendet werden.

Man versäume nicht, die Konidienbildung und die Bildung von Fragmentationssporen auf Dauerpräparate zu verarbeiten. Bei der Konidienbildung sticht man entsprechende Kolonien aus den Gelatinenährböden aus und bettet als Ganzes ein. Paraffin oder Zelloidin kann verwendet werden. Die Fragmentationssporen streicht man am besten aus dem hängenden Tropfen aus. Töten mit Osmiumsäuredämpfen, anschließend Fixierung mit Alkohol und Färben. Über die Systematik usw. siehe: *Lieske*, *Morphologie und Biologie der Strahlenpilze*, Berlin, Gebr.Bornträger, 1921.

III. Schleimbakterien - Myxobacteriaceae

§ 277.

1. Im vegetativen Zustand bestehen die Schleimbakterien aus einem Schwarm von Stäbchen in einer schleimigen Hülle. Bei der Fruktifikation kriechen sie zusammen und bilden Fruchtkörper, ähnlich den Schleimpilzen. Sie bewohnen in der Regel Mist von Tieren, besonders den von Pflanzenfressern. *Polyangium vitellinum* kommt auf altem, feucht liegendem Holz vor. Schleimbakterien wird man nur durch Zufall im Herbst im Walde auf alter Losung finden. Fast immer sind Rohkulturen zu ihrer Gewinnung nötig.

In großen Petrischalen, die oben und unten mit Filtrierpapier ausgekleidet sind, wird eine niedrige Lage von Mist ausgebreitet. Man setzt so viel Wasser zu, als Mist und Fließpapier aufsaugen können. Den Rest des Wassers gießt man wieder ab. Die Kulturen werden bei 28-30 ^{O}C gehalten. Nach 1-2 Tagen begießt man erneut. Die richtige Feuchtigkeitsmenge ist ausschlaggebend für den Erfolg. Trockenheit läßt Schimmelpilze, zu viel Feuchtigkeit Bakterien überhandnehmen. Das Auftreten von *Pilolobus* zeigt den richtigen Feuchtigkeitsgrad an.

2. Für die Anlage der Kulturen versuche man frischen Mist und Mist, der schon längere Zeit im Freien gelegen hat. Es treten in der Regel auf:

Pferdemist und Rindermist: *Myxococcus rubescens, Myxococcus virescens*;

Losung von Damwild: *Chondromyces crocatus, Chondromyces serpens*;

Hasen- oder Kaninchenmist (im Spätherbst gesammelt): *Polyangium fuscum*;

Feldmäusemist: *Myxococcus coralloides, Chondromyces erectus*.

Die wachsenden Schleimbakterien sind auf den Rohkulturen nicht leicht zu finden. Am schnellsten entdeckt man sie mit dem Binokular bei 20-40 facher Vergrößerung, sowie sie Fruchtkörper gebildet haben.

Reinkulturen kann man versuchen auf sterilisiertem Mist, sowie auf Kartoffel- oder Heudekokt-Agar, Mistdekokt-Agar usw .

3.Untersuchungstechnik.

a) Ausstriche: Färbung mit basischen Anilinfarben.
b) Fruchtkörper: Fixieren mit Formalin und Einbetten in toto in Glyceringelatine.

Fixieren mit Formalin und Einbetten nebst anschließendem Kulturmedium in Zelloidin oder Paraffin. Schnitte. Färben mit Karbolfuchsin oder Kresylechtviolett.

IV. Scheidenbakterien - Chlamydobacteriaceae

§ 278. Zu den Scheidenbakterien gehören die eigentlichen Fadenbakterien, ferner eine größere Zahl von Schwefel- und von Eisenbakterien. Zu den beiden letzteren zählen aber auch Formen, die den eigentlichen oder auch den Schleimbakterien zugerechnet werden müssen. Es ist daher schwierig, eine Einteilung zu finden, die allen Anforderungen gerecht wird.

Ich teile diese Bakterien für die Besprechung der Präparation und Kultur so ein, daß unter Scheidenbakterien nur die eigentlichen Fadenbakterien behandelt werden. Die Schwefelbakterien und Eisenbakterien bleiben dann als biologische Gruppen vereint, was für die Darstellung der Kulturverfahren von Wert sein dürfte.

Im Gegensatz zu den einfachen oder Haplobakterien bestehen diese Arten aus Fäden, die einfach sind oder eine pseudodichotomische Verzweigung aufweisen. Die Fadenbakterien sind typische Bewohner des Sumpfwassers und des Abwassers. Wir finden sie besonders in der polysaproben Zone, oft mit Zooglöen und Schwefelbakterien vergesellschaftet.

Wir untersuchen *Sphaerotilus natans* und *Cladothrix dichotoma*. Beide Formen sind durch Sammeln oder durch Rohkulturen zu gewinnen.

1. *Sphaerotilus.*

Kultur: In einem größeren Einmachglas, das hernach mit einer Glasplatte zugedeckt wird, bringen wir Wasser aus der polysaproben Zone. Auf 1 Liter geben wir 0,5 g *Liebigs Fleischextrakt* oder die entsprechende Menge Fleischbrühe. Auf dem Wasser läßt man einige Stückchen - am besten altes, faulendes - Holz schwimmen. *Sphaerotilus* setzt sich mit Vorliebe an diese Hölzer an und bildet darauf weißliche Überzüge.

Präparation: Die abgeschabten Rasen werden mit Formalin fixiert, ausgewaschen und mit den üblichen Anilinfarben gefärbt. Beizung. Einschluß als Zupfpräparat oder Verreibung in *Burri*-Tusche oder Niglitin nach *Eckert*. *Sphaerotilus* hat eine bis 10µ dicke schleimige Scheide. Ferner können die Fäden am Objektträger angetrocknet und in Caedax eingeschlossen werden.

2. *Cladothrix dichotoma*.

Diese Art kommt in reinem Wasser von Waldtümpeln und Dorfteichen vor. *Cladothrix dichotoma* wird häufig zu den Eisenbakterien gerechnet, was wohl auf Verwechslungen mit anderen Eisenbakterien zurückgeführt werden kann.

Kultur: Ein Einmachglas wird mit Tümpelwasser gefüllt und ebenso, wie oben bei *Sphaerotilus* geschildert wurde, mit Fleischextrakt oder Bouillon versetzt. Das Beimpfen geschieht mit einem Büschel von *Cladothrix* oder mit Schlamm, Blättern usw. *Cladothrix* findet sich dann *an den Wänden* des Glases ein. Vielfach erscheint *Cladothrix* schon in den *Sphaerotilus*-Kulturen.

Beide Bakterien zeigen sich in den Kulturen sehr empfindlich gegen eine saure Beschaffenheit der Nährlösung. Schwach alkalische Lösung ist am zuträglichsten. Man setzt etwas kohlensauren Kalk hinzu.

Präparation: Formolfixierung, Ausstriche oder Zupfpräparat, Färbung mit basischen Anilinfarben und mit *Giemsa*.

V. Schwefelbakterien - Thiobacteriaceae

§ 279. Die Schwefelbakterien gehören zu den größten Bakterien. Sie lagern in sich Schwefel in Tröpfchen ab, manche dazu noch kohlensauren oder oxalsauren Kalk. Zu ihnen gehören Fadenbakterien und Einzelbakterien wie Spirillen, Stäbchen, Kokken. Sie sind farblos oder rot. Ein Teil der Purpurbakterien gehört ebenfalls zu den Schwefelbakterien. Sie bewohnen die polysaprobe Zone der Abwässer von Fabriken und Städten, kommen auch in den faulenden Algenhaufen am Meeresstrande und in den verschmutzten Hafengewässern vor.

Die Materialbeschaffung kann bei den festsitzenden Formen am einfachsten durch Sammeln erfolgen, wobei man das Sammelgut gleich mit Formalin fixiert. Die einzelligen freien Schwefelbakterien erhält man am besten durch Kulturen. *Bavendam* (70) gibt ausführliche Anweisungen zu einfachen Kulturen.

Nach *Bavendam* empfehlen sich folgende einfache Methoden:

(70) Bavendam, Die farblosen und roten Schwefelbakterien. Sammlung: Pflanzenforschung Heft 2. Jena, Gustav Fischer, 1924.

a) Kultur farbloser Schwefelbakterien.

Man geht aus von den natürlichen Vorkommen und reichert sie an.

Thiothrix kommt hauptsächlich in fließenden Gewässern vor. Man verschafft sich daher von geeigneten Standorten Blätter und Stengel von Wasserpflanzen als Impfmaterial nebst etwas Schlamm. Zur Anlage der eigentlichen Kultur benützt man weite Einmachgläser, Wassergläser oder Schalen. Auf den Boden des Glases bringt man den Schlamm, steckt dann die Blätter in ihn hinein und gießt mit Nährlösung auf. Das Ganze deckt man mit einer Glasscheibe zu. *Die Kulturen stellt man ins Dunkle.* Tierleichen (Würmer, Schnecken usw.)sind peinlich fernzuhalten.

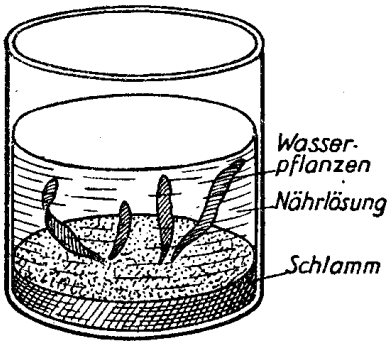


Abb.13

Schema der Anlage einer Kultur von Schwefelbakterien

(§ 279)

Beggiotoa kommt nur in Faulschlamm, besonders in ruhenden Gewässern vor. Der Schlamm wird in den Kulturgefäßen möglichst glatt gestrichen. Die im Teich vorgefundenen abgestorbenen Blätter usw. müssen unter den Schlamm gelegt werden. *Kultur im Dunkeln, Tierleichen entfernen!*

Schlamm aus marinen Standorten wird genau so verarbeitet, nur muß dann als Nährlösung Meerwasser verwendet werden. Die Kulturen werden mit Glasschalen zugedeckt.

Als Nährlösung verwendet *Bavendam* das am Fundort vorgefundene Wasser, das mit Leitungswasser notfalls ergänzt werden kann. Bei sehr fauligem Material wird von vornherein nur Leitungswasser verwendet. Dem Schlamm muß man unbedingt gepulverten, nicht gebrannten Gips, etwas Natriumsulfat und Magnesiumsulfat zusetzen; man kann auch Natriumsulfat und Kalziumcarbonat beifügen. Von jedem Salz gibt man so viel, daß in 1 Liter der Nährlösung dann ein Teelöffel voll (5 g) enthalten ist.

b) Kultur roter Schwefelbakterien

Die Kulturen roter Schwefelbakterien gelingen leichter als die Kulturen der farblosen oder weißen Schwefelbakterien. Als Ausgangsmaterial kommt ganz genau dasselbe in Betracht wie bei den farblosen Formen. Nur die abgeänderte Kulturmethode schafft die Bedingungen für das Gedeihen und Auftreten der roten Formen. *Lamprocystis* zum Beispiel bedeckt Wasserpflanzen, besonders gerne *Chara* oder *Zostera*. *Chromatium* bedeckt mehr den Schlamm.

Als Kulturgefäße verwendet man hohe Flaschen aus hellem Glase oder hohe Zylinder; die Milchflaschen für Kleinkinder sind sehr passend. Die Kulturen werden grundsätzlich genau so angelegt wie bei den farblosen Formen, auch der Zusatz der Salze ist derselbe. *Die Kulturen werden jedoch in helles Licht am Fenster gestellt.*

Mit den Methoden von *Bavendam* können daher aus demselben Ausgangsmaterial entweder farblose oder rote Schwefelbakterien erhalten werden.

Reinkulturen sind äußerst schwierig und nur bei Anwendung einer komplizierten Apparatur zu erreichen. Es muß dafür auf das Buch von *Bavendam* verwiesen werden.

§ 280. Untersuchung und Präparation. Die einfachen Bakterienformen werden genau so untersucht, gefärbt und präpariert wie Bakterien überhaupt. Besonders sei die Darstellung im Tuscheausstrich nach *Burri* empfohlen. Auch die Geißelfärbung nach *Löffler* gibt gute Resultate.

Die fadenförmigen Schwefelbakterien werden am besten mit Formalin fixiert und mit verdünntem Gentianaviolett gefärbt. Einschluß nach Beizung mit Phosphorwolframsäure und Übertragen über 90 %igem Alkohol und Terpineol in Caedax, oder einfacher, ebenfalls nach Beizung als sorgsam hergestelltes Zupfpräparat in der Lävulose-Gelatine nach *Heringa* und *ten Berge*.

Die Schwefeltröpfchen bestehen aus kolloidalem Schwefel. Durch Behandeln mit wässriger Pikrinsäurelösung kann man den Schwefel auskristallisieren lassen. Es entstehen dann helle, dünne Täfelchen (monokline Prismen) oder dunkelbraune rhombische Oktaeder. Die Schwefeltröpfchen sind unlöslich in Wasser und Salzsäure, löslich dagegen in *absolutem* Alkohol, in Lösungen von Natriumsulfit und sehr leicht in Schwefelkohlenstoff.

Mit Osmiumsäure färben sich die Schwefeltröpfchen braun. Präparate davon können in Glyceringelatine oder Hausenblasengallerte nach *Behrens* hergestellt werden.

Von den größeren Formen treten in den Kulturen am häufigsten auf:

Thiotrix: unbewegliche, festgewachsene Fäden. Am häufigsten ist *Thiotrix nivea*.

Beggiotoa: frei bewegliche Formen, fast wie Blaualgen, nur ohne Farbstoff. *B.mirabilis* ist eine sehr große Art und 16-45µ dick. Diese Art kommt nur in Salz- und Brackwasser vor. Andere Arten, z.B. *B.alba* kommen im Süßwasser vor auf schwefelwasserstoffhaltigem Schlamm.

Lamprocystis: eine rote Form, stellt sich meistens in mehreren Arten ein.

VI. Eisenbakterien

§ 281. Die Eisenbakterien sind eine Gruppe Bakterien, die das im Boden und im Wasser vielfach vorkommende Eisen-II-hydrogencarbonat zu rotem Eisen-III-oxidhydrat oxidiert und auf ihrem Körper niederschlägt. Die bei dieser Oxidation gewonnene Energie gestattet den Eisenbakterien die Assimilation der Kohlensäure.

Die Eisenbakterien gehören entweder den Scheidenbakterien oder den eigentlichen einfachen Bakterien an.

Zu den Scheidenbakterien zählen die Arten *Leptothrix (Chlamydothrix) ochracea, L. crassa* und *Crenothrix polyspora*, zu den einfachen Bakterien zählen *Gallionella ferruginea* und *Sideromonas confervarum.*

Eisenbakterien sind in der Natur weit verbreitet und kommen überall da vor, wo Eisen zur Verfügung steht. Besonders finden sie sich daher in Gegenden, wo eisenhaltige Mineralquellen oder Eisenerze auftreten. So sind sie z.B. im Frankenwald ungemein häufig, besonders in der Gegend von *Bad Steben*. Manchmal siedeln sie sich in Wasserwerken und Wasserleitungen an, wo sie zu Betriebsstörungen Anlaß geben können; sie finden sich fast regelmäßig in Mooren,

besonders den Moorgräben, wo schillernde gelbe oder rostrote Niederschläge auf ihre Anwesenheit hindeuten. Auch in Ackererde habe ich sie gelegentlich vorgefunden.

§ 282. Kultur der Eisenbakterien. Wenn es nicht gelingt, in der freien Natur taugliches Material zu sammeln, müssen Kulturen angelegt werden. Dazu können folgende Wege eingeschlagen werden:

1. Man läßt Wasser aus einer Eisenquelle oder einem verseuchten Brunnen einige Stunden stehen. Es bilden sich häufig schon nach wenigen Stunden frische Fäden, die sich leicht untersuchen lassen. (*Geeignet für Leptothrix*)

2. Anreicherungskultur nach *Winogradsky*. In einen 50 cm hohen Meßzylinder bringt man eine Handvoll gut ausgekochtes Heu und stopft es am Boden gut ein; darauf kommt ein Teelöffel voll frisch gefälltes Eisenoxidhydrat. Das Ganze füllt man mit Leitungswasser auf, oder besser mit Wasser von einem Standort, der die Bedingungen für das Vorkommen von Eisenbakterien erfüllt. Es treten bald braune Flöckchen auf, die sich sowohl am Wasserspiegel als auch an der Gefäßwand ansiedeln. Meistens handelt es sich um *Leptothrix crassa*.

3. *Molisch* und *Adler* (71) haben gefunden, daß das Eisen durch Mangan ersetzt werden kann. *Molisch* gibt folgende Nährlösungen an:

Nährlösung I nach *Molisch*:

Sumpfwasser	1000	g
Eisenammoniumzitrat	0,050	g

Nährlösung II nach *Molisch*:

Sumpfwasser	1000	g
Manganum phospholacticum	0,025	g

Nährlösung III nach *Molisch*:

Sumpfwasser	1000	g
Manganpepton	0,025	g

Man kommt aber mit den eisenhaltigen Nährlösungen allein gut aus, außerdem lassen die mit Mangansalzen gezogenen Bakterien die später geschilderte Berlinerblaureaktion nicht zu.

In diesen Lösungen können Anreicherungskulturen mit den in den Rohkulturen aufgefundenen *Leptothrix*-Arten erhalten werden.

Auch auf Gelatineplatten wachsen *Leptothrix*-Arten gut. *Molisch* gibt an:

Torfwasser	1000	ccm
Manganpepton	0,250	g
Gelatine	100	g

Die Lösung wird vor dem Erstarren mit Normalkalilauge schwach alkalisch gemacht. Das Torfwasser gewinnt *Molisch* durch Auskochen eines faustgroßen Brockens Torf. Das Manganpepton bezog *Molisch* von der chemischen Fabrik *List* in *Seelze* bei *Hannover*. Das optimale Wachstum erfolgte bei 25 ^{O}C.

4. Es gelingt in Wasser mit Pepton allein, also ohne Eisen oder Mangansalze, *Leptothrix* farblos, d.h. ohne Oxidabscheidung, zu kultivieren.

5. Kultur von *Gallionella* nach *Lieske*. Die Kultur von *Gallionella* ist schwierig und vom Glück abhängig. Hat man *Gallionella* gefunden, dann füllt man Sand und Blätter vom Standort in ein

Becherglas, gießt Leitungswasser darauf und wirft in das Glas einige Stücke dünnen Eisendrahtes oder dünne Nägel, welche die Blätter berühren sollen; man kann die Blätter auch mit dem Draht umwickeln. An der Berührungsstelle von Blättern und Draht bilden sich nach 3 bis 4 Tagen die Kulturen von *Gallionella*.

(71) Molisch, *Die Eisenbakterien*. Jena, Gustav Fischer, 1910

§ 283. Untersuchungstechnik der Eisenbakterien. Wir untersuchen folgende Arten: *Leptothrix, Crenothrix, Gallionella und Sideromonas*.

1. *Leptothrix,* besonders *L.crassa,* ist leicht durch Kultur zu beschaffen. Die ockergelben Niederschläge in der Natur bestehen meistens aus bereits leeren, von den Bakterienfäden wieder verlassenen Eisenscheiden.

a) Junge Fäden mit Scheiden aus Kulturen werden auf dem Deckglas vorsichtig ausgestrichen oder verteilt. Fixierung mit Formalin. Nach Antrocknen an der Luft oder auf einem dünnen Eiweißanstrich, nach Formalinfixierung Färben mit Anilinfarben wie Gentianaviolett, Kresylechtviolett, Fuchsin. Zu sehen sind ungefärbte Scheiden und gefärbte Bakterien. Wird vor dem Färben das Eisen mit verdünnter Salzsäure entfernt, so zeigen sich nach der Färbung mit Gentianaviolett deutliche Plasmodesmen zwischen den einzelnen Bakterien.

b) Die Bakterienfäden werden nach der Formolfixierung behandelt mit einer Lösung aus 50 ccm 4 %iger Lösung von gelbem Blutlaugensalz und 50 ccm 4-5 %iger Salzsäure. Die Berlinerblaureaktion geben jedoch nur die jüngeren Stadien der Fäden. Es färben sich die eisenhaltigen Gallerten tiefblau, die Bakterien bleiben ungefärbt und können mit Fuchsin in roter Farbe gegengefärbt werden.

2. *Crenothrix* kann schwer kultiviert werden. Außerdem ist das Bakterium, wenn es einmal auftritt, immer in Massenvegetation vorhanden, z.B. in Wasserwerken. Es weist Mikro- und Makrogonidien auf. Präparationstechnik wie bei *Leptothrix.*

3. *Gallionella* war schon dem Altmeister *Ehrenberg* bekannt, der diese Art zu den Diatomeen gestellt hat. Sie kommt in Mineralquellen vor, der klassische Fundort ist das Eisenwasser von *Karlsbad.*

Wir präparieren wie folgt: In Wasser, das *Gallionella* enthält, verteilen wir einige Deckgläschen, auch auf der Oberfläche des Wassers lassen wir einige Deckgläschen schwimmen, die wir an den Ecken mit einigen kleinen Korkstückchen versehen haben. Nach 1-2 Tagen nehmen wir die Deckgläschen vorsichtig aus dem Wasser heraus und lassen nach Formalinfixierung an der Luft trocknen. Eine Seite der Deckgläschen wird dann blank geputzt. Das Färben usw. geschieht wie bei den anderen Eisenbakterien. Zu sehen sind dichotonisch verzweigte Bäumchen von Stielen. Die Stiele sind bandartig und gedreht. An der Spitze eines Stielchens sitzt je ein Bakterium. *Gallionella* ist nierenförmig und ähnelt Spirillen oder Vibrionen. Die Stielchen sind sehr zerbrechlich. Ein Kollodiumguß ist vor dem Färben bzw. der Berlinerblaureaktion sehr zu empfehlen.

Einschluß nach Trocknen in Caedax.

4. *Sideromonas* kommt an vielen Fadenalgen in Form gelber oder brauner Verdickungen vor, wenn diese Algen in eisenhaltigen Gewässern wachsen. Der Durchmesser der Knöllchen schwankt zwischen 10-100µ. Diese Knöllchen werden seit *Kützing* (1853) als Psichormium-Bildung beschrieben. Die bedeckten Algenzellen sind dunkler und inhaltsreicher.

Zur Untersuchung fixieren wir die Algenfäden nach *Cholodny* mit Formalin, lösen mit verdünnter Salzsäure das Eisen auf und behandeln mit *Lugolscher* Lösung. Die Bakterien sind dann gut sichtbar. Dauerpräparate können hergestellt werden durch Goldimprägnation nach *Nabias* oder die bei den anderen Eisenbakterien angegebenen Färbemethoden.

VII. Purpurbakterien - Rhodobacteriaceae

§ 284.

1. Purpurbakterien sind Bakterien, die durch zwei besondere Farbstoffe, Bakteriopurpurin und Bakteriochlorin, in verschiedenen Abschattierungen rot gefärbt sind. Ein Teil der Purpurbakterien gehört zu den Schwefelbakterien. Die eigentlichen Purpurbakterien nach *Molisch* sind schwefelfreie Organismen. Sie sind in der Natur weit verbreitet und besiedeln faulende Blätter, Leichen kleiner Wassertiere und ähnliche Substrate. Es sind immer kleine Formen. Man gewinnt sie ausschließlich durch Kulturen.

2. Kulturmethode nach *Molisch*. In ein hohes, enges, zylindrisches Glasgefäß (Meßzylinder) verbringt man auf den Boden etwas Heu und einige Stücke von einem hartgekochten Hühnerei; ein Rindsknochen oder tote Regenwürmer tun es auch. Darauf legt man eine Schicht Graben- oder Teichschlamm und füllt mit Teichwasser auf. Die toten Regenwürmer kann man auch auf den Schlamm legen. Sie bedecken sich ganz mit den Purpurbakterien.

Den Glaszylinder schließt man oben luftdicht mit einem Glas ab. Das Ganze stellt man nun an ein sonniges Fenster und überläßt es der Fäulnis. Nach 1-2 Monaten verraten rote Flecken oder auch eine rote Gesamtfärbung das Auftreten der Purpurbakterien.

3. Untersuchungstechnik. Es gibt Bakterien, Spirillen und Kokken, die vielfach zu Familien in Gallertklümpchen vereinigt sind. Man versäume hier nicht die Präparation nach dem Tuscheverfahren nach *Burri*; weiterhin sind sie natürlich mit den bekannten organischen Farbstoffen zu färben, auch mit Karbolfuchsin und mit wässrigem Anilinblau. Vielfach muß man jedoch lange und unter Erwärmen färben oder nach der Methode der Färbung von säurefesten Bakterien.

Kapitel IX: Algen

Allgemeines über Algen

§ 285.

1. Unter der Sammelbezeichnung Algen versteht man sehr verschiedene Gruppen von gefäßlosen Kryptogamen. Fast alle führen Chlorophyll, das jedoch häufig durch andere Farbstoffe überdeckt wird, so daß die Algen auch gelb, rot, blau, braun und violett gefärbt sein können.

Die Algen, wenigstens die Süßwasseralgen, sind in der Regel leicht zugänglich. Da zudem viele Algen zu dem Schönsten gehören, das uns das Mikroskop entschleiern kann, sind sie viel untersucht worden. Daher gibt es ein reiches Schrifttum über Züchtung, mikroskopische Untersuchungstechnik, Morphologie und Systematik.

In diesem Praktikum wird die Präparationstechnik in folgender Reihenfolge besprochen: Blaualgen, Kieselalgen, Flagellaten, Armleuchteralgen, Zieralgen und Grünalgen sowie anschließend die Braun- und Rotalgen.

2. Grünalgen sind bei Exkursionen meistens leicht zu beschaffen, und Kulturen haben daher vielfach nur den Zweck, das Untersuchungsmaterial einige Zeit lebend zu erhalten; die niederen Grünalgen sind häufig ohne Schwierigkeiten zu halten, die höheren Formen stellen dagegen solche Ansprüche, daß es meistens mißlingt, sie zu Hause zu halten. Die einfachste Rohkultur besteht nun darin, gesammelte Algen in einem größeren Gefäß mit Wasser aus dem natürlichen Standort zu halten. Die Algen sind manchmal empfindlich gegen direktes Sonnenlicht, immer aber gegen Schwermetallspuren im Wasser und Tabakrauch in der Luft. Besonders schwierig zu halten sind die *Spirogyra*-Arten.

3. Am besten stellt man die Rohkultur in der von *Strugger* (72) angegebenen Weise her. Man benützt dazu Standgefäße von 10 ccm Durchmesser und einer Höhe von nicht über 40 cm. Der Boden wird mit einem halben Teelöffel voll getrockneten Hühnereiweiß (es ist unter der Bezeichnung *Albumen ex ovis* oder *Albumen Ovi siccum* in Apotheken käuflich) oder einem Stückchen Emmentaler Käse bedeckt. Schmelzkäse ist jedoch nicht verwendbar, da er oft konservierende Fremdzusätze enthält. Darüber kommt etwa 5 ccm sterilisierte Gartenerde (gekocht oder abgebrüht, eventuell noch getrocknet) und schließlich 1 cm hoch steriler Sand. Aufgefüllt wird mit sterilem Leitungswasser. Zum Zudecken wird eine Glasschale benützt. Kultiviert man Algen, die keine organische Nahrung vertragen, dann werden die Eiweißstoffe am Boden weggelassen.

Nach *Strugger* lassen sich in diesen so vorbereiteten Gefäßen kultivieren:

1. *Euglenen*. Von dem Fang aus der Exkursion gibt man einige Tropfen der Algenaufschwemmung in das Wasser. Kein direktes Sonnenlicht! Nach ungefähr 14 Tagen erfolgt im Schatten gute Vermehrung.
2. *Desmidiazeen*.
3. *Oedogonien und Cladophora*.
4. *Spirogyra und Zygnema*.

Die unter 2-4 genannten Algen werden in einigen Stücken in das Wasser übergeführt, sonst wie oben bei Nr.l. Manche Arten gedeihen allerdings besser in größeren Aquarien.

Blaualgen stellen fast gar keine Ansprüche in den Kulturen, nur Nährlösungen und Ruhe werden von ihnen verlangt. Armleuchteralgen werden in Aquarien mit Sandunterlage mit den Rhizoiden verpflanzt, wo sie dann meistens gut gedeihen und jahrelang gehalten werden können.

(72) Strugger, Mikrokosmos XXVI, 1932/33, S.76

4. Meeresalgen zu kultivieren, dürfte dem Binnenländer sehr schwer gelingen. Da der Versuch jedoch nicht kostspielig ist, kann er immerhin unternommen werden, wenn man zufällig über Material verfügen sollte.

Das in Apotheken käufliche Seesalz kann nach dem natürlichen Salzgehalt, das ist durchschnittlich 3,5%, in destilliertem Wasser gelöst werden. Hernach leitet man Kohlensäure bis zur Sättigung in das Aquarium und läßt einige Tage stehen.

Im allgemeinen wird man sich darauf beschränken, bei Ferienaufenthalt an der Wasserkante seine Fänge so lange frisch zu erhalten, bis alles in Ruhe untersucht und fixiert worden ist.

Nach *Kostka* sollen sich Keimlinge von Florideen und manchen Braunalgen leicht erhalten lassen. Thallus-Teile mit den reifen Sporangien, die man über Nacht in Schalen liegen läßt, entleeren die Sporen, welche zur Auskeimung gebracht werden können.

Fixiermethoden für Algen

§ 286.

I. Entsprechend der überaus großen Artenzahl der Algen sind sehr viele und verschiedene Fixiermittel in der Literatur aufzufinden. Die wichtigsten davon sollen hier in einer Übersicht zusammengestellt werden.

1. Formalin in 2-4 %iger wässeriger Lösung. Man mischt also 1 Teil käufliches Formol mit 9 oder 18 Teilen Wasser.
2. Chromessigsäure nach *Flemming*. Zum Fixieren von Meeresalgen setzt man das Fixiermittel nicht mit destilliertem Wasser, sondern mit Meerwasser an.
3. *Pfeiffersches* Gemisch.
4. Sublimat-Eisessig.
5. Chromsäure in 0,5-1 iger wässeriger Lösung.
6. Doppelfixierung mit Chromsäure und Sublimat nach *Eckert*. Vorfixieren mit Chromsäure oder Chromessigsäure bis zur vollständigen Bleichung der Farbstoffe, was eine halbe bis 5 Stunden dauern kann, dann 30 Minuten Auswaschen und anschließend Nachfixieren während 24-48 Stunden mit Sublimat-Eisessig.
7. Pikrinsäure und *Bouinsches* Gemisch.
8. Jodalkohol. Alkohol von 45% wird mit Jodtinktur weingelb gefärbt.
9. Jodwasser. Dem Wasser, das die Algen enthält, wird tropfenweise Jodtinktur bis zur Hellgelbfärbung zugesetzt. Auswaschen mit 50 igem Alkohol, ferner Entfernung des Jodes mit Natriumthiosulfat.
10. *Flemmings* Gemische.
11. Die *Perenyische* Lösung Nr. I (schwache Lösung):

0,5 %ige wässerige Chromsäure	3 ccm
10 %ige Salpetersäure	4 ccm
90 %iger Alkohol	3 ccm

Die *Perenyische* Lösung Nr. II (starke Lösung)

1 %ige Chromsäure	3 ccm
20 %ige Salpetersäure	3 ccm
90 %iger Alkohol	4 ccm

Die beiden Lösungen nach *Pereny* dienen zum Fixieren und Entkalken von mit Kalk inkrustierten Algen. Nur kurz haltbar!

12. Osmiumsäure und Osmiumsäuredämpfe.
13. Kupferlactophenol entweder allein oder nach kurzer Formalinfixierung, manchmal auch im Gemisch mit Formalin.

Das Fixieren der Algen wird zweckmäßig, so weit es überhaupt durchführbar ist, sofort an Ort und Stelle vorgenommen, wobei immer sehr reichlich Fixiermittel anzuwenden ist. Eine Ausnahme macht nur die Osmiumsäure, die man, zumal in Form der Dämpfe, nur zu Hause für ganz spezielle Zwecke anwendet.

II. Nachdem das Fixiermittel ausgewaschen worden ist, kann das Material sofort verarbeitet werden. Soll es jedoch aufbewahrt werden, so kann man mit Vorteil für die meisten Algen den Glycerinspiritus nach *Eckert* (73) anwenden. Seine Zusammensetzung ist:

Destilliertes Wasser	750 ccm
Brennspiritus	150 ccm
Glycerin	100 ccm

Dieser Glycerinspiritus ist klar und dauernd haltbar. Nach meinen Erfahrungen mazeriert er etwas, was allerdings nur bei den höher organisierten Meeresalgen in Erscheinung tritt. Hier verwendet man besser die Glycerin-Alkohol-Wassermischung nach *Straßburger* (§ 61).

(72) Eckert, Mikrokosmos XXVIII, 1934/35, S.128

Färbemethoden für Algen

§ 287. Genau wie bei den Fixiermitteln kann nur eine fürs erste orientierende Übersicht geboten werden. Das Nähere ist bei den einzelnen Untergruppen nachzulesen.

Die Färbemethoden sind bei den Algen natürlich je nach den einzelnen Gruppen sehr verschieden.

Basische Anilinfarbstoffe finden nur bei den Blaualgen Anwendung und beschränkt auch bei den Diatomeen. Bei Grünalgen färben die basischen Anilinfarben nicht nur Kerne und Chromatophoren, sondern auch die Zellmembranen, wodurch sie unbrauchbar werden. Ausnahmen: Safranin, Magdalarot.

Saure Anilinfarbstoffe werden verwendet, so Lichtgrün, Pyronin, Anilinblau, Erythrosin, Nigrosin, Azokarmin B.

Beizenfarbstoffe sind sehr geeignet, wenn bei Fixierung und Vorbeizung auf ihre Eigenart Rücksicht genommen worden war. Es können Verwendung finden: Karmine, Hämatoxyline, *Becher*-Farben und Echtrot. Eine der besten Färbungen bei Grünalgen, Blaualgen, Kieselalgen und Zieralgen ist das Alaun-Glycerin-Hämatein nach *Rawitz* in großer Verdünnung, etwa 3 Tropfen auf 30 ccm Wasser. Die Eisenbeizenfärbungen nach *Pfeiffer von Wellheim* sind bestens bekannt. Ferner werden viel angewandt Kernschwarz in Verbindung mit sauren Anilinfarben, zudem die Goldimprägnation.

I. Unterabteilung: BLAUALGEN - CYANOPHYCEAE

A. Allgemeines

§ 288.

1. Die Blaualgen, *Cyanophyceae*, auch *Schizophyceae* genannt, haben seit langen Zeiten größtes Interesse beansprucht, da sie der Forschung sehr viele Rätsel aufgegeben haben und noch aufgeben. Die Blaualgen werden jetzt allgemein als Pflanzen ohne Zellkern und ohne Chromatophor aufgefaßt. Sie erscheinen also zunächst ziemlich primitiv.

Die Anschauungen über den inneren Bau der Blaualgen haben ziemlich gewechselt und damit die Benennungen der einzelnen Teile, welche die Autoren vorgefunden haben. Es ist nicht leicht, sich hier ohne weiteres zurecht zu finden. In den folgenden Zeilen wird in Anlehnung an

Geitler (74) versucht, die einzelnen Begriffe kurz zu umreißen. Gleichzeitig ist damit eine Sichtung der sehr verworrenen Nomenklatur verbunden.

(74) Geitler, *Handbuch der Pflanzenanatomie, II.Abt. Bd.VI, Schizophyceae*, Berlin 1936, Gebr.Borntraeger

Hier wird aufgeführt:

2. Protoplast: Der Protoplast ist die einzelne Blaualgenzelle, ein Algenfaden besteht daher aus mehreren Protoplasten. Der Protoplast zeigt eine Differenzierung in zwei Schichtungen, das Chromatoplasma und das Zentroplasma.

3. Chromatoplasma: Das Chromatoplasma ist der periphere Teil des Protoplasten. Es scheint der alleinige Träger der Assimilationsfarbstoffe zu sein, die in ihm als gelöst angenommen werden müssen oder als Suspension allerkleinster Tröpfchen. An Farbstoffen finden sich vor Chlorophyll, Karotinoide, die wasserlöslichen Phykozyane und Phykoerythrine, endlich das Xanthophyll. Das Chromatoplasma wird als feinkörnig bis homogen angenommen. Es enthält als Einschlüsse die Cyanophyzinkörner (synonyme Bezeichnung: Ektoplasten), die nicht teilungsfähig sind und oft eckig-kristalloid aussehen.

4. Zentroplasma: Das Zentroplasma wird als farblos und als wabenförmig angenommen und besitzt einige Einschlüsse. Es ist nun sehr veränderlich in seinen Einschlüssen, da es auch der Ort der Aufstapelung der Reservestoffe ist, die sich zum Teil mitfärben lassen.

5. In den Wabenräumen liegen die Endoplasten, zähflüssige bis gallertige Ballen. Liegen diese Endoplasten sehr dicht, so bilden sie einen Klumpen, der den Zentralkörper der älteren Literatur darstellt. Mit den Endoplasten identisch dürften die Anäbinkörper nach *Fischer* sein. Vielleicht sind es auch nur Reservestoffe (Assimilate), die im Zentralkörper aufgespeichert sind.

6. In den Wabenwänden des Zentroplasmas ist eine chromatische Substanz eingebettet, die eine positive Nuklealreaktion zeigt. Sie erscheint bald als Netz, bald in Körnchen oder Stäbchen aufgelöst. Diese chromatische Substanz bildet in ihrer Gesamtheit den Chromidialapparat nach *Guilliermond.*

7. Das Zentroplasma enthält noch weitere Einschlüsse, und zwar kleinere oder größere Kugeln, die Metachromatinkörper nach *Guillermond*, die hauptsächlich aus Volutin bestehen. Sie heißen noch: rote Körner nach *Bütschli*, Zentralkörner nach *Kohl*, Chromatinkörner nach *Nadson*, Alphagranules nach *Garner*. Zum Teil sind es auch Epiplasten nach *Baumgärtel*. Die Metachromatinkörner treten bei den Algen meistens in alten Kulturen auf, wenn das Nährsubstrat ziemlich erschöpft ist.

8. Zellwand: Der Protoplast ist nicht nackt, sondern von einer Haut umgeben, die bei manchen Arten sehr kräftig ist. Nach *Correns* zeigt diese Haut eine feine Netzstruktur. Manche Gattungen haben außerdem noch eine Hülle aus Gallerte oder Schleim.

9. Abnormer Zellinhalt: Die bisher angeführten Bestandteile sind als normale Zellbausteine anzusehen. Sie sind in wechselnder Zahl und Menge vorhanden und brauchen nicht alle auffindbar zu sein. Nicht mit ihnen verwechselt werden dürfen einige Degenerationserscheinungen, die ebenso gut als Alterserscheinungen auftreten können.

> Vakuolisation tritt bei manchen vielzelligen Verbänden auf. Nicht selten ist sie in Heterocysten.
>
> Keritomie (Wabenbildung) kommt anscheinend nur bei den *Oszillatorien* vor. Dabei verwandeln sich Zentroplasma und Chromatoplasma in einen tröpfchenartigen Zustand

und bilden große Waben. Im Gegensatz zu der Vakuolisation sind die entstehenden Hohlräume eckig begrenzt.

Gasvakuolenbildung. In den einzelnen Zellen bilden sich Gasvakuolen, die meistens nur einen Mantel um das Zentroplasma bilden, und zwar an den Lieblingsorten der Cyanophyzinkörner, aus deren Zersetzung (Gärung) sie entstehen. Synonyme Bezeichnungen der Gasvakuolen sind: Pseudovakuolen nach *Lemmermann* und rote Körner nach *Richter*.

Der Protoplast ist bei den Blaualgen entweder einzeln oder in Verbänden vorhanden. Vielfach sind die Algenverbände in Gallerthüllen oder einfach gebauten Scheiden eingeschlossen.

Fixiermittel für Blaualgen

§ 289. Die Zahl der bei den Blaualgen verwendbaren Fixiermittel ist gering. Es kommen in Betracht Formalin, Chromsäurelösung, Chromessigsäurelösung, *Pfeiffer*, Jodalkohol und die beiden *Perenyischen* Gemische.

Färbemethoden für Blaualgen

§ 290. Für morphologische Präparate können bei Blaualgen folgende Methoden angewandt werden: Erhaltung der Naturfarbe, Färbung mit *Becher*-Farben (Anthrazenblau, Alizarin-Viridin), Färbung mit Azokarmin B, Goldimprägnation nach *Nabias-Eckert*.

Für cytologische Präparate stehen zur Verfügung:

Hämatoxylinfärbungen, insbesondere

a) Eisenhämatoxylin nach *Heidenhain und Häggqvist*.
b) Alaun-Glycerin-Hämatein nach *Rawitz*.
c) Hämatoxylin nach *Delafield*.

Ferner Chinolinblau-Erythrosin, Methylenblau allein oder in Verbindung mit Eosin, Essigkarmin nach *Schneider*, Safranin, Jodgrün, Methylgrün, Malachitgrün, Gentianaviolett, Fuchsin, Eisenechtgrün nach *Pfeiffer*, Nuklealreaktion nach *Feulgen*.

B. Ausgewählte Beispiele zur Bearbeitung der Blaualgen

I. Materialbeschaffung

§ 291.

1. Blaualgen zu bekommen ist im allgemeinen leicht. Sie finden sich an allen möglichen feuchten Standorten, an feuchten Wänden, in Regenpfützen, als Plankton im Süßwasser. Überdies sind sie leicht in Rohkulturen zu erzielen.

2. Rohkulturen von Blaualgen. Blaualgen erhält man fast stets, wenn man Erde von Äckern und Wegen, Schlamm von ausgetrockneten Gräben und Teichen usw. in Reagensröhrchen mit Flußwasser, zur Not auch Leitungswasser, überschichtet und einige Zeit stehen läßt. Das Röhrchen verschließt man mit einem Wattepfropf. Die angesetzte Kultur ist also nicht steril. Etwa aufgetretene Blaualgen züchtet man bei Bedarf weiter entweder in sterilen Nährlösungen oder auch auf Gipsblöckchen, die in Nährlösungen tauchen. Neben den Blaualgen finden sich in der Regel Amöben und Bakterien ein, die aber nicht stören.

3. Schalenkultur. Im Freien vorgefundene Blaualgen halten sich sehr lange, wenn sie in Schalen gehalten werden, in denen über einen Lehmgrund etwas Nährlösung geschichtet wurde. Eventuell Zudecken mit Glasscheibe.

II. Die Anfertigung morphologischer Präparate

§ 292.

1. Von allen Blaualgen lassen sich Übersichtspräparate in den natürlichen Farben leicht herstellen. Die Blaualgen werden entweder im hängenden Tropfen auf dem Objektträger mit Osmiumsäuredämpfen fixiert (1-2 Minuten) oder man gibt zum Wasser mit den Algen so viel Formalin, daß eine 2 ige Lösung entsteht und fixiert 5-12 Stunden. Die Osmiumsäuredämpfe verdunsten in wenigen Minuten, das Formalin muß ausgewaschen werden.

Migula (75) gibt als sehr brauchbar ein kurzes Erhitzen der Blaualgen mit Wasser im Reagensglas auf 70-80 ^{O}C an.

Die auf irgendeine Weise fixierten Blaualgen kommen nun in einem Uhrglas in verdünntes Glycerin oder verdünnte Glyceringelatine (1 Teil Einbettgelatine + 30 Teile Wasser). Man bedeckt in bekannter Weise mit Seidenpapier und läßt eindicken. Ist die Gelatine fest geworden, können die Algen in frischer, erwärmter Glyceringelatine eingeschlossen werden. Da die Algenfarbstoffe teilweise in Glycerin und Wasser löslich sind, verblassen die Präparate ziemlich rasch.

(75) D.W.Migu1a, Die Spaltalgen. Stuttgart, Franckh'sche Verlagshandlung, o. J.

2. Es empfehlen sich daher Totalfärbungen mit *Becher*-Farben, besonders Alizarinviridin oder Alizarinzyanin. Ferner ist empfehlenswert Azokarmin B oder die Goldimprägnation.

Für das Studium der Blaualgen wählen wir die Arten wie folgt aus:

Einfachste Thallus-Formen zeigen die *Chroococcaceae*. Exemplare der Arten *Chroococcus* finden wir an nassen Felsen oder Wänden, an Brunnen usw. Zu sehen sind einfache kugelige Zellen, häufig im Verband durch Gallerthüllen vereinigt. Im Zelleib ist eine Differenzierung nicht sichtbar.

Die Gattung *Aphanothece* hat meistens auffallend prachtvoll blaue oder grüne Lager bis Kirschgröße. In den Paludarien der botanischen Gärten wird man nie umsonst nach ihnen suchen.

Einfache fadenförmige Kolonien finden sich bei den *Oscillatorien*. *Oscillatorien* sind leicht erhältlich. Die schöne Alge *Arthrospira jenneri* ist nicht allzu selten. Man findet sie in verschlammten, eiweißreichen Tümpeln.

Arten der Gattung *Lyngbya* sind im Meere und im Süßwasser verbreitet. Die Fäden liegen in Scheiden eingebettet.

An morphologischen Besonderheiten können Plasmodesmen, Gallerthüllen, Heterocysten und Dauerzellen beobachtet werden.

Plasmodesmen: Bei manchen Formen, deutlich besonders bei *Stigonema* und *Tolypothrix*, treten Plasmodesmen auf, und zwar ist zwischen zwei Zellen nur ein einziger zarter Faden nachweisbar.

Darstellung der Plasmodesmen:

a) Nach *Kohl*. *Lebende* Algenfäden werden mit Karbolfuchsin (6 ccm alkoholische gesättigte Fuchsinlösung und 100 ccm 3 %ige wässrige Karbolsäurelösung) auf dem Objektträger einige Male bis zum Dampfaufsteigen erhitzt und sofort in Wasser abgekühlt. Beizen mit Pikrinsäure, Einschluß über Isopropanol, Xylol oder Terpineol in Caedax.
b) Mit Gentianaviolett nach Formalinfixierung. Der Nachweis der Plasmodesmen gelingt manchmal sehr schwer. Sie kommen nur vor bei Arten, die in Zellfäden und Scheiden differenziert sind.

Gallerthüllen. Die Darstellung der Gallerthüllen geschieht am besten nach Fixierung mit *Pfeiffer* und Färbung mit *Becher*-Farben plus Färbung mit Muzikarmin durch Einschluß in Niglitin nach *Eckert-Lindauer*.

Heterocysten. Neben den gewöhnlichen Zellen finden sich die sogenannten Heterocysten oder Grenzzellen. Bei den *Oscillatorien* fehlen sie. Die Heterocysten sind ganz eigenartige Gebilde. Sie entstehen aus gewöhnlichen Zellen unter Vergrößerung. Die Wand verdickt sich und die Farbstoffe verschwinden. Die Plasmodesmen bleiben erhalten, wobei richtige Tüpfel in der verdickten Wand entstehen. Die Assimilationsstoffe verschwinden. Vor den Tüpfelkanälen ist häufig ein größeres Cyanophycinkörnchen, das sich gut färben läßt. Die Heterocysten gehen unter Verflüssigung der Endoplasten zugrunde. Sie werden als Reste funktionslos gewordener Fortpflanzungsorgane aufgefaßt.

Ein dankbares Untersuchungsobjekt für Heterocysten ist *Anabaena azollae*. Diese Alge ist in einer Höhlung der oberen fleischigen schwimmenden Blattlappen enthalten. Siehe unter Wasserfarne.

Zur Darstellung streicht man von den schleimigen Lagern eine kleine Menge sehr dünn auf Objektträgern aus, die vorher mit Eiweißglycerin wie zum Aufkleben von Paraffinschnitten vorbehandelt worden waren. Man läßt 24 Stunden antrocknen oder fixiert in Alkohol oder Formalin.

Bei genauerem Arbeiten wird man mit Osmiumsäuredämpfen fixieren, mit Formalin nachbehandeln und eventuell ein Kollodiumhäutchen anbringen. Die Färbung kann erfolgen:

1. mit Chinolinblau-Erythrosin,
2. mit *Delafields* Hämatoxylin allein,
3. mit Eisenhämatoxylin-Eosin.

Sollen die Cyanophycinkörner vor den Tüpfelkanälen zur Anschauung gebracht werden, geht man nach § 293, Ziffer 4 vor.

Dauerzellen: Dauerzellen oder Sporen kommen vor bei den *Nostoc*-Arten und bei den *Rivularia*-Arten. Sie finden sich ferner bei *Anabaena* und *Gloeotrichia*. *Gloeotrichia* sitzt regelmäßig auf der Unterseite von Seerosenblättern in Gallertklumpen von 1 mm bis 1 cm Durchmesser.

Die Dauerzellen entstehen aus den gewöhnlichen vegetativen Zellen. Sie sind etwas größer als diese und besitzen eine dickere und festere Membran. Im Protoplasten schwinden die Assimilationsfarbstoffe unter Steigerung der Reservestoffspeicherung. Hauptsächlich bilden sich viele große Cyanophycinkörner. Plasmodesmen verschwinden, der Chromidialapparat wird reduziert. Die Dauerzellen überstehen schlechte Zeiten und keimen dann bei Wiederkehr günstiger Bedingungen wieder aus.

Die Fixierung und Färbung kann nach den bisher geschilderten morphologischen Methoden geschehen, man kann sie auch wie die Heterocysten färben.

Hormocysten sind Dauerstadien einzelner oder mehrerer Protoplasten, also von ganzen Fadenabschnitten. Darstellung wie morphologische Präparate.

III. Die Anfertigung cytologischer Präparate

A. Einfache cytologische Präparate

§ 293.

1. Cytologische Untersuchungen an Blaualgen gehören zu den schwierigsten mikroskopischen Arbeiten. Die Objekte sind klein, können aber von geschickter Hand trotz ihrer Kleinheit nach der Paraffinmethode eingebettet und geschnitten werden. Dazu kommt, daß die Verhältnisse innerhalb der Blaualgenzelle sehr verschieden beurteilt wurden und noch werden.

Die zur Darstellung der morphologischen Übersichtsbilder angegebenen Methoden können auch teilweise alle Einzelheiten innerhalb der Zellen darstellen. Sehr gut geeignet sind Azokar-

min B und Goldimprägnation nach *Nabias-Eckert*. Diese beiden Methoden färben alle Einschlüsse in einer einheitlichen Farbe.

Es sind aber auch Darstellungen in zwei Farben möglich. Einige dieser Methoden mögen hier Platz finden für denjenigen Leser, der Zeit, Muße und Geduld genug hat. Alle Färbungen können an den ganzen Algen ausgeführt werden. Sollte die hier gewonnene Übersicht nicht genügen, muß in Paraffin eingebettet werden, und zwar ganze Stränge von *Oscillatorien*, *Nostoc*-Kugeln oder andere Kolonien. Gallertige Formen lassen sich gut in Paraffin einbetten und schneiden; in den Schnitten finden sich dann immer unter vielen unbrauchbaren Stellen auch die gewünschten Stadien. Die Schnitte sollen möglichst dünn, nur 3-5µ dick sein.

Es folgen nun Methoden zur differenzierten Färbung der einzelnen Zellbestandteile.

2. Chromatoplasma und Zentroplasma. Zur Darstellung der beiden Zellbestandteile eignen sich am besten *Oscillatorien* und kleine Planktonformen. Die *Oscillatorien* werden gewaschen, um Verunreinigungen zu entfernen, und kommen dann für 5 Minuten in eine 1 %ige Chromsäurelösung zum Fixieren. Nach dem Auswaschen färbt man die Blaualgen nach *Straßburger* mit Methylenblau und Eosin; das Färben kann in einem Blockschälchen geschehen. Die Algen können aber auch im Kollodiumhäutchenverfahren verarbeitet werden.

Das Farbgemisch nach *Straßburger* hat die Zusammensetzung: 4 ccm Methylenblau wässerig konzentriert und 1 ccm Eosin wässrig konzentriert. Nach einer Färbezeit von 3 Minuten ist die Färbung vollendet. Das Zentroplasma ist blau, das Zytoplasma rosenrot gefärbt. Teilungsfiguren des Zentralkörpers, sogenannte Pseudomitosen, sind sehr schön zu sehen.

Die gefärbten freien Oscillatoriafäden können auf dem Objektträger nach entsprechender Lagerung angetrocknet und dann nach vollständiger Trocknung (keine künstliche Wärme!) mit Caedax eingeschlossen werden. Schonender ist das Hindurchführen durch eine Reihe von tertiärem Isobutylalkohol, Xylol und dann Einschluß in Caedax.

Methylenblau färbt in Verdünnungen von 1:10000 oder 1:100000 in 1-24 Stunden bei den lebenden Blaualgen das Zentroplasma, jedoch nicht das Ektoplasma.

Andere Arten wie *Oscillatoria* kann man an Quetschpräparaten sehr gut behandeln. Ich nenne zum Beispiel *Nostoc*. Stecknadelkopfgroße Stückchen des Materials werden zwischen zwei Deckgläschen oder Objektträger gequetscht, so daß die Fäden genügend isoliert sind. Die beiden Gläser werden dann je 24 Stunden mit 50 %igem, 75 %igem und 96 %igem Alkohol behandelt. Man kann die Härtung auch mit Formalin durchführen (Formalinpreßverfahren). Nach dem Trocknen der Gläser wird wie oben geschildert verfahren.

Ähnliche Färbungen, wie nach *Straßburger* mit Methylenblau- Eosin, erhält man nach *Chamberlain* mit Chinolinblau-Erythrosin oder auch Magdalarot-Anilinblau.

Besonders geeignet zur Darstellung des Zentroplasmas und seiner Teilungen ist die Eisen-Hämatoxylin-Färbung nach *Heidenhain* sowohl an aufgeklebten ganzen Algen als an Schnitten. Gegenfärbung ist Eosin.

Auch das Alaun-Glycerin-Hämatein nach *Rawitz* mit Gegenfärbung mit Eosin ist zu empfehlen.

3. Metachromatinkörper. Lebende Blaualgen werden mit unverdünntem *Löfflerschen* Methylenblau gefärbt. Hierbei färben sich die Zentralkörper blau und die Metachromatinkörper rot bis rotviolett.

Eine ähnliche Färbung gibt nach Chromsäurefixierung Magdalarot-Anilinblau und die anderen ähnlichen Färbungen für Algen nach *Pfeiffer*.

Nach Fixierung mit Sublimatalkohol oder mit Jodalkohol allein färbt *Delafields* Hämatoxylin die Metachromatinkörper rot bis purpur.

4. Cyanophycinkörner: Lebende Algen werden mit heißer Karminessigsäure nach *Schneider* behandelt. Die Cyanophycinkörner färben sich rot.

5. Chromidialapparat: An fixierten Algen ist der Chromidialapparat darstellbar

a) mit basischen Farben, besonders Fuchsin, und
b) mit der Nuklealreaktion nach *Feulgen*.

6. Die bisher angegebenen Färbungen sind für morphologische Gebilde innerhalb der Zelle ausgebildet. Es sind jedoch auch einige mikrochemische Reaktionen ausgearbeitet worden. Ich führe an:

a) Den Nachweis von Glykogen. Die Glykogeneinschlüsse im Endoplasten sind besonders schön nach der Methode von *Fischer* (76) am besten an Schnitten nachzuweisen. Die Objekte werden mit Alkohol fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Schnitte kommen aus Alkohol für 10 Minuten in 10 %ige wässrige Tanninlösung, abspülen mit 10 %iger Lösung von Kaliumdichromat in Wasser, abspülen in Wasser. 10 Minuten lang färben mit wässriger Safraninlösung. Abspülen in Wasser, eventuell Beizen mit Phosphorwolframsäure. Schnelle Entwässerung in Alkohol, Terpineol, Caedax. Das Glykogen ist rot gefärbt.

b) Nachweis des Phykozyans nach *Kohl*. Es gibt folgende zwei Methoden:

   aa) Lebende Blaualgen werden mit *Löfflers* Methylenblau gefärbt, dann mit Wasser abgespült, mit *Lugol* behandelt, durch steigenden Alkohol gebracht, sodann über Nelkenöl in Caedax eingeschlossen. Das Phykozyan ist in Form von violettschwarzen Granulae sichtbar.
   bb) Sublimatfixierte Algen werden gefärbt mit Säurefuchsin (in Anilinwasser aufgelöst) und dann anschließend mit wässriger Pikrinsäure differenziert. Das Phykozyan bildet rote Granula. Anmerkung: Herstellung von Anilinwasser-Farblösungen: 5 ccm Anilin werden mit 100 ccm destilliertem Wasser einige Minuten kräftig geschüttelt. Hierauf filtriert man durch ein angefeuchtetes Faltenfilter. Zu 100 ccm des so gewonnenen Anilinwassers gibt man ungefähr 10 ccm gesättigte alkoholische Farblösung. Die Anilinwasser- Farblösungen sind nur ganz kurz haltbar.

c) Nachweis des Volutins. Das Volutin besteht wahrscheinlich aus einer Verbindung von Nukleinsäuren. Zum Nachweis überfärbt man die Objekte

   aa) mit einer Farblösung aus 1 ccm gesättigter alkoholischer Methylenblaulösung und 10 ccm destilliertem Wasser. Das Volutin tritt dunkelblau hervor, wenn man mit l %iger wässriger Schwefelsäure differenziert.
   bb) mit Karbolfuchsin und differenziert anschließend mit l %iger wässriger Schwefelsäure. Hier bleibt überhaupt nur das Volutin gefärbt, und zwar in schwarzem Ton.

(76) A.Fischer, Die Zelle der Zyanophyceen. Botanische Zeitung, 1905, Heft IV/VI

B. Präparate zur Fortpflanzung der Blaualgen

§ 294.

1. Eine geschlechtliche Fortpflanzung ist bei den Blaualgen nicht bekannt. .

2. Die Vermehrung geschieht durch einfache Zellteilung.

Zellteilung: Man kann kaum einen Algenfaden untersuchen, ohne auf Teilungsstadien zu stoßen; häufig sind 70% aller Zellen in der Teilung begriffen. Bei der Zellteilung, die neuerdings als Zellfurchung bezeichnet wird, teilt sich der Protoplast in zwei gleich große Teile, die durch eine vorspringende Ringfurche abgetrennt werden. Der Inhalt des Protoplasten wird vermutlich gleichmäßig der Menge nach verteilt. Der gelappte oder sternförmige Zentralkörper wurde früher für den Zellkern gehalten und seine Teilung als mitotische Teilung angesprochen. Als man den Irrtum erkannte, sprach man von Pseudomitosen. Die Zellteilung läßt sich leicht im Präparat festhalten. Günstige Untersuchungsobjekte sind dazu die breiteren *Oscillatoria*-Formen.

Fixierung: Chromessigsäure.

Färbung:

a) Einfache Färbung mit den früher genannten Verfahren für morphologische Präparate, insbesondere Azokarmin oder die Goldimprägnation.
b) Die Methoden zur Darstellung des Chromatoplasmas und Zentroplasmas mit Magdalarot-Erythrosin, Chinolinblau-Erythrosin und natürlich auch Methylenblau-Eosin nach *Straßburger*. Anwendbar sind natürlich auch die feineren cytologischen Methoden wie die Nuklealreaktion nach *Feulgen* und die Darstellung der Cyanophyzinkörper.

3. Hormogonienbildung. *Geitler* definiert die Hormogonien als wenig- bis vielzellige Stücke von Zellfäden, die aus der Scheide ausschlüpfen und sich aktiv bewegen. Bereits Keimlinge aus Dauerzellen können Hormogonien bilden, sie kommen bei manchen Arten besonders häufig vor. Da sie sehr reich an Inhaltsstoffen sind, färben sie sich stärker als die Fadenreste.

Günstige Untersuchungsobjekte sind landbewohnende *Stigonema*-Arten, wie die verbreiteten *Stigonema ocellatum*, ferner auch *Rivularien.* Besonders dankbar ist *Calothrix confervicola*, die häufig an größeren Algen der westlichen Ostsee ist, sowie fast alle anderen marinen *Calothrix*-Arten. Darstellung wie die allgemeinen morphologischen Präparate.

4. Dauerzellen und Heterozysten können auch als Fortpflanzungsorgane funktionieren. Beide Zellarten können nach winterlichen Ruhezeiten wieder zu Fäden auskeimen.

5. Vermehrung durch Sporen. Bei einigen wenigen Blaualgen kommt eine Vermehrung durch kleine Sporen vor. Früher wurden diese Sporen als Konidien bezeichnet. *Geitler* unterscheidet Endosporen und Exosporen. Beide Sporenarten kommen vor bei *Chamaesiphonalen*. Eine Zelle wird zum Sporangium und bildet eine große Zahl kleiner Sporen. *Chamaesiphon* kommt in mehreren Arten an Steinen und pflanzen von Gebirgsbächen vor. Auch *Dermocarpa* hat Endosporen. Präparationstechnik wie bei morphologischen und cytologischen Präparaten bereits angegeben.

§ 295. Bemerkungen zur Präparationstechnik der Blaualgen. Die Blaualgen vertragen bei ihrer großen Widerstandsfähigkeit ein abgekürztes Übertragungsverfahren beim Einschließen. Aus dem Waschwasser können sie unmittelbar in 50-70 %igen Alkohol übertragen werden. Hier bleiben sie 24 Stunden bis Tage. Das Weiterbehandeln geschieht sofort mit Isopropanol, und zwar nur 30 Minuten. Anschließend kommen die Algen sofort in Venetianer Terpentin, Euparal oder über Xylol in Caedax. Auch ein Antrocknen auf dem Deckglas vertragen sie recht gut.

Zur Erhaltung der natürlichen Farbe schließt man Blaualgen in Glycerin oder *Hoyer II* ein. *Becher*-Färbungen und Goldimprägnierungen können auch unbedenklich in Glyceringelatine eingeschlossen werden.

II. Unterabteilung: KIESELALGEN - DIATOMEAE

A. Allgemeines

§ 296.

1. Die Kieselalgen gehören schon seit langer Zeit zu den geschätztesten Objekten der Liebhaber-Mikroskopiker; der Grund für diese Beliebtheit ist die Formenschönheit und überaus große Mannigfaltigkeit des Kieselpanzers. Allein im Süßwasser leben über 500 Arten, insgesamt gibt es weit über 5000 Arten. Keiner wird an den Kieselalgen völlig vorbeigehen und die meisten Naturfreunde werden sich eine Sammlung von Diatomeenpräparaten anlegen.

2. Kieselalgen (Diatomeen) sind überaus häufig. Auf Exkursionen benötigt man unbedingt ein kleines Taschenmikroskop (einen sogenannten Algensucher) mit etwa 100facher Vergrößerung. Solche kosten zwischen 5 und 8 RM. An Ort und Stelle kann damit festgestellt werden, ob in den Aufsammlungen tatsächlich verschiedene Arten vorhanden sind. Über die bevorzugten Fundorte der einzelnen Arten ist in den Florenwerken nachzulesen.

Schon beim Sammeln achte man darauf, so wenig Fremdkörper (Schlamm, Detritus usw.) mitzunehmen wie möglich, da dies ja die spätere Präparationsarbeit zu Hause bedeutend vereinfacht. Material mit vielen Fremdkörpern trachte man lebend nach Hause zu bekommen und durch Anlegen von Rohkulturen anzureichern. Dazu wird Schlamm in flachen Tellern ausgebreitet und höchstens mit 1-2 cm hohem Wasser übergossen. Die Diatomeen sammeln sich sodann an der Oberfläche des Schlammes an. Das Material kann auch in kleinen Musselinsäckchen in kleine Teller mit Wasser gelegt werden. Die Diatomeen wandern dann in das von Detritus freie Wasser über, aus dem sie abzentrifugiert werden können.

Das Vorkommen der Diatomeen ist jahreszeitlichen Schwankungen unterworfen. Ihr Vegetationsmaximum ist im Frühjahr, im Sommer und im Winter sind sie spärlich, der Herbst beschert uns ein Nebenmaximum.

Diatomeen aus Planktonfängen können in der Regel ohne besondere Umstände verarbeitet werden. Beim Sammeln ist darauf Rücksicht zu nehmen, ob man nur Schalenpräparate anfertigen will, oder ob Färbungen ins Auge gefaßt werden. Im ersten Falle können die Sammelgefäße randvoll gefüllt und ohne Rücksicht auf Fäulnis gut verkorkt heimgetragen werden, anderenfalls ist für viel Luft zu sorgen.

§ 297. Bei der **Anlage von Rohkulturen** kann man folgende Wege gehen: Man legt die Schlammkulturen in flachen Tellern an, wie oben bereits angegeben ist. Den nötigen Zufluß von Frischwasser und Abfluß des verbrauchten Wassers regelt man durch Saugdochte. Aus einem etwas erhöhten Wasserglas A kann man Wasser zutropfen lassen, in ein tiefer stehendes Wasserglas B kann man das überschüssige Wasser abtropfen lassen. Statt Dochten kann man auch Fließpapierstreifen verwenden.

Hat man nur sehr wenig Exemplare, die man vermehren möchte, muß man zur **Kultur im hängenden Tropfen** seine Zuflucht nehmen. Als Nährflüssigkeit für den hängenden Tropfen benützt man das Wasser vom natürlichen Standort, das man durch Kohle filtriert und im Reagensglas durch Aufkochen sterilisiert hat. Will oder kann man das Wasser vom natürlichen Standort nicht als Nährlösung verwenden, muß man künstliche Kulturflüssigkeiten verwenden. Hinweise dafür werden in der Literatur viele gegeben. Ich erwähne folgende Vorschriften:

1. Nach *Straßburger* kann man mit gutem Erfolg Bach- oder Teichwasser benützen, in das man Grasstückchen, Moosräschen oder Pflanzenfressermist verbracht hat.

2. Planktonformen können auch in Nährlösungen nach *Knop* kultiviert werden, wenn man pro Liter Nährflüssigkeit 2-3 Tropfen Wasserglaslösung hinzugibt. Auch feste Nährböden eignen sich zur Kultur der Diatomeen. Ich führe an:

1. Agar für Süßwasser-Diatomeen nach *Sten Wiedling* (77):

Leitungswasser	1 Liter
Agar-Agar	10 g
Ammoniumnitrat	0,2 g
Dinatriumphosphat	0,2 g
Magnesiumphosphat	0,1 g
Eisen-III-zitrat	0,04 g
Wasserglas	2-3 Tropfen

Ist das Leitungswasser kalkarm, so setzt man noch 0,1 g Kalziumchlorid oder Kalziumnitrat hinzu. Der Nährboden muß schwach alkalische Reaktion aufweisen, etwa pH 7,6-7,8.

2. Agar für Meeres-Diatomeen nach *Sten Wiedling*

Meerwasser	1 Liter
Agar-Agar	10 g
Kalziumnitrat	0,2 g
Dinatriumphosphat	0,2 g
Eisen-III-zitrat	0,04 g

3. Agar für Süßwasser-Diatomeen nach *Richter*

Destilliertes Wasser	1 Liter
Agar-Agar (stark gewässsert)	18 g
Dikaliumphosphat	0,2 g
Kaliumnitrat	0,2 g
Magnesiumsulfat	0,05 g
Kaliumsilicat pur.	0,01 g

Für Meeresdiatomeen kommt noch ein Zusatz von 10 g Natriumchlorid hinzu.

Die Kulturen versprechen dann am meisten Erfolg, wenn die betreffende Art in der freien Natur ihr Wachstumsoptimum zeigt. Die Aussaat auf den festen Nährboden erfolgt nach den Methoden der Bakteriologie mit Platindraht. Es wachsen nicht alle Diatomeen gleich gut. Hauptsächlich wachsen die kleinen *Navicula*- und *Nitschia*-Arten.

In den Kulturen entarten viele Formen bis zur Aufgabe des Kieselpanzers und bis zur Plasmodienbildung. Diese Abnormitäten treten auf bei Änderungen der Züchtungsbedingungen.

(77) Sten Wiedling, Mikrokosmos XXXVI, 1942143, S.61

§ 298. Fixiermittel für Diatomeen. Zum Fixieren der Diatomeen werden benützt:

1. Chromessigsäure nach *Flemming.*
2. Das *Pfeiffersche* Gemisch.
3. Wässrige Chromsäurelösung.
4. Sublimatessig.
5. Das Gemisch nach *Bouin*

Fixiert werden die Diatomeen nur dann, wenn sie auf gefärbte Präparate verarbeitet werden sollen. Für die Anfertigung von Schalenpräparaten ist die Fixierung natürlich überflüssig, doch kann fixiertes Material selbstverständlich auch auf Schalenpräparate verarbeitet werden.

§ 299. Färbemethoden für Diatomeen. Zum Färben der Diatomeen können folgende Vorschrifen verwendet werden:

a) Morphologische Übersichtspräparate

1. Bismarckbraun nach Fixierung mit Chromsäure oder Chromessigsäure.
2. Färbungen mit *Becher*-Farben nach Fixierung mit *Pfeiffer*, Chromsäure und Chromessigsäure.
3. Azokarmin B nach Chromsäure.

b) Cytologische Darstellungen

1. Hämatoxylinfärbungen mit Nachfärbungen mit Alizarinviridin oder Alizarinrot nach Fixierung mit Chromsäure und Sublimateisessig nach *Eckert.*
2. Goldimprägnation mit Nachfärbung grüner Farbstoffe wie Echtgrün, Lichtgrün, nach Fixierung mit Chromessigsäure.
3. Ferner sind noch die Algenfärbungen von *Pfeiffer von Wellheim* anwendbar, jedoch nur nach Fixierung mit dem *Pfeifferschen* Gemisch.

B. Ausgewählte Beispiele zur Bearbeitung der Kieselalgen

§ 300.

1. Die Diatomeen sind zwar überreich in der Natur vorhanden, können aber nicht so gesammelt werden wie andere Kryptogamen. Die größeren Kryptogamen können ja schon beim Sammeln ausgewählt werden. Es wird bei den Diatomeen wohl selten möglich sein, nur eine einzige Art auf einer Exkursion in einem Präparatenglas aufzusammeln.

2. Man hat also immer mehr oder weniger Gemische von Diatomeen vor sich. Wer daher Präparate nur einer Art herstellen will, sieht sich häufig Schwierigkeiten gegenüber. Gelingt das Aufsammeln oder Kultivieren einer reinen Art nicht, so müssen die Arten unter dem Binokular bei etwa 40-50facher Vergrößerung ausgesucht werden. Dieses Aussuchen kann man auch bei bereits gefärbtem Material oder auch bei den präparierten Kieselschalen vornehmen.

3. Die einzelnen Diatomeen werden dabei in einer Uhrschale oder auch auf einem Objektträger ausgebreitet und die ausgesuchten Formen mit einer Schweinsborste von den anderen getrennt, schließlich aufgenommen und in eine vorbereitete weitere Uhrschale übertragen. Als Schweinsborsten eignen sich am besten Augenwimpern vom Schwein, die man an einem Glasstab oder Holzstab ankittet. Es empfiehlt sich die Anfertigung einer ganzen Reihe solcher Instrumente, wobei die Länge der Augenwimper von 3 mm bis 2 cm wechseln kann. Solche Borsten sind in der Praxis vielfach verwendbar.

§ 301. Lebendfärbungen von Diatomeen. Diatomeen können mit 0,001 %iger wässriger Methylenblaulösung lebend gefärbt werden. Zu sehen sind dabei die Kerne und die sogenannten *Bütschlischen* Kugeln, die aus Volutin bestehen. Sie kommen im Zytoplasma und im Zellsaft vor. Der Zellsaft läßt sich bei lebenden Diatomeen mit Neutralrot färben in einer Verdünnung von 1:10000 bis zur Verdünnung von 1:100000.

Die Feststellung, ob Gallertenumhüllungen vorhanden sind, unternimmt man an Tuschevereibungen.

§ 302. Morphologische Übersichtsbilder.

1. Zur Darstellung von Übersichtsbildern über die allgemeinen morphologischen Verhältnisse wählt man möglichst große Formen aus. Bequem ist es, wenn viel Material zur Verfügung steht. Geeignet erscheint nach *Straßburger* besonders Material von *Pinnularien*, speziell *Pinnularia viridis*, die bis 180μ lang und 25μ, breit wird. Diese Art ist im Süßwasser allgemein verbreitet;

Pinnularia major wird sogar 300µ, lang und 30µ, breit. Es ist kaum möglich, ein einzelnes Exemplar zu präparieren. Man wird immer einige Tropfen einer Aufschwemmung als Massenware verarbeiten. Die Untersuchungstechnik ist einfach.

Fixierung: Chromessigsäure nach Flemming oder *Pfeiffersches* Gemisch.
Färbung: Bismarckbraun.
Einschluß: Über Terpineol oder Xylol in Caedax.

ferner Färbung mit *Becher*-Farben, besonders Alizarinviridin, Einschluß in Caedax, Euparal, auch in Glyceringelatine.

2. An diesen Präparaten sind zu sehen die Zellkerne und die Chromatophoren. Letztere haben nun die verschiedenste Gestalt, vielfach sind auch Pyrenoide vorhanden.

Gallerthüllen bleiben erhalten bei der Fixation mit *Pfeifferschem* Gemisch, wenn die Einwirkungszeit nicht länger als 5-6 Stunden beträgt. Nach der Färbung mit Alizarinviridin können die Gallerten mit Muzikarmin gefärbt werden. Die Muzikarminstammlösung wird 1:9 mit destilliertem Wasser verdünnt. Die Färbezeit ist dabei 2-8 Stunden. Schleime und Gallerten werden dadurch rot gefärbt. Einschluß in Glyceringelatine oder besser in Niglitin nach *Eckert*.

Porenkanäle. Die Gallerthüllen werden aus dem Innern der Diatomeen durch die Porenkanäle ausgeschieden. Sie finden sich besonders an den Enden. Als Kanäle sind sie nur auf der Gürtelbandseite zu suchen. Auf den Schalenansichten zeigen sie sich als Poren ähnlich den Hoftüpfeln. Sie werden nach *Eckert* kenntlich gemacht durch die Goldimprägnation nach *Pfeifferfixierung*; dabei erscheinen sie schwarz.

§ 303. Cytologische Untersuchungen. Die cytologischen Verhältnisse lassen sich mit allen gebräuchlichen Methoden darstellen. So färben Karmine den Ruhekern fast immer ganz zuverlässig.

Kern und Kernteilungsfiguren. Für Diatomeen besonders werden folgende Arbeitsvorschriften geschildert:

1. Lebendes Material kommt für einige Stunden in Pikro-Nigrosin. Die Zeit ist jedesmal auszuprobieren. Hier werden die Algen fixiert und gefärbt. Nun schließt sich Auswaschen in Wasser an. Behandeln mit Alkohol und Überführen in Glycerin. Hier ist Einschluß möglich oder man geht über Isopropanol in Xylol und schließt in neutralen Harzen ein.

2. Fixiertes Material kann gefärbt werden:

a) mit Hämalaun nach *Mayer*.
b) mit Alaun-Glycerin-Hämatein nach *Rawitz*. Man fixiert mit Sublimateisessig oder mit der Doppelfixierung mit Chromsublimat nach *Eckert*. Wenn nötig, müssen die Chromatophoren gebleicht werden. Die Färbungen mit verdünnten Lösungen dauern viele Stunden bis einige Tage und ergeben sehr scharfe Darstellungen der Kerne. Nachfärbungen der Chromatophoren sind möglich mit Alizarinrot S, Eosin
c) mit der Goldimprägnation in der Modifikation von *Eckert*. Die Ergebnisse der Goldimprägnation sind: Kerne, Lininfäden und Chromosomen schwarz, Pyrenoide dunkelbraunrot, Chromatophoren hellrot bis farblos. Nachfärbung mit grünen Farbstoffen wie Lichtgrün.
d) Von den Algenfärbungen nach *Pfeiffer* empfehlen sich besonders die Färbung mit Karminsäure-Indulin.

Das Fixieren, Auswaschen und Färben geschieht als Massenware mit den Spitzkelchen oder einer Handzentrifuge. Zweckmäßig erscheint es, die gewählte Färbung erst an größeren Algen wie Grünalgen einzuüben, bevor man so kleine Objekte behandelt.

Bei einiger Übung ist das Färben und das Präparieren der Zelleinzelheiten an ganzen Diatomeen nicht allzu schwierig. Viel schwieriger ist dann schon die Deutung und Beobachtung der

gefärbten Einzelheiten in den Präparaten. Das *Pinnularia*-Material ist, wie schon eingangs erwähnt, zu den ersten Studien am geeignetsten. Kann man kein reines Material einer einzigen Art auftreiben, so ist es am zweckmäßigsten, wenn man unsortierte Proben verarbeitet. Daß sich die einzelnen Arten färberisch verschieden verhalten und nicht gleichmäßig färben, muß man in Kauf nehmen.

Sehr interessant sind Präparate von Kieselalgen aus besonderen Lebensgebieten.

Planktonformen besitzen besondere Schwebeeinrichtungen (Gallertfortsätze), manche Formen auch mit Plasmafortsätzen, die mit Niglitin (Gallerten) oder mit *Becher*-Farben (Plasmafortsätze) in Glyceringelatine zur Darstellung gebracht werden können. In Süßwasser kommen vor *Fragillaria, Cyclotella, Melosira, Synedra, Asterionella* und andere mehr.

Die schönsten Formen hat das Meer, aus dessen Plankton die schönen großen Formen wie *Gyrosigma, Donkinia, Campylodiscus, Surirella, Biddulphia*, um nur einige Formen zu nennen, stammen. Besonders schöne Proben sind im Plankton wärmerer Meere vorzufinden (78).

In Moospolstern findet sich ebenfalls eine Spezialflora. Hier treffen wir auf *Orthosira spinosa, 0.mirabilis, Achnanthidium coarctatum.*

Salinengewässer, Abläufe von Mineralbrunnen, Thermalquellen und ähnliche Orte versäume man nie abzufischen, wenn man dazu Gelegenheit bekommen sollte.

(78) Plankton aus verschiedenen Meeren ist zuweilen erhältlich bei der Franckh'schen Verlagshandlung, Stuttgart oder aus Universitätsinstituten.

§ 304. Präparate zur Fortpflanzung der Diatomeen. Die Diatomeen vermehren sich durch Teilung. In Rohkulturen sind bei gutem Gedeihen, besonders in der Hauptvegetationszeit, immer Teilungsstadien zu finden. Wer Glück hat, findet auch bei Massenvorkommen Freien Teilungsstadien. Sie sind gar nicht so selten. Man muß nur mit Geduld unter dem binokularen Stativ seine Fänge durchmustern, dann stößt man schon auf die Teilungsstadien.

Die Vorgänge bei der Teilung sind äußerst kompliziert. Wegen ihres Studiums muß auf die Literatur verwiesen werden. Die technische Darstellung im Präparat geschieht durch eine klare Kerndarstellung, z.B. mit Hämatoxylinfärbungen oder mit Karminsäure nach *Pfeiffer*. Bei Gegenfärbung mit einer grünen Plasmafarbe kann auch das Verhalten des Chromatophors studiert werden.

Kopulationsvorgänge und Auxosporen müssen in der Hauptvegetationsperiode der Diatomeen gesucht werden, also im Frühjahr und Herbst. Das Auffinden von Auxosporen ist eine reine Glückssache, doch dürften Auxosporen in der richtigen Zeit nicht so selten sein, wie man anzunehmen geneigt ist.

Mikrosporen sind als große Seltenheit bei *Biddulphia* und *Coscinodiscus* im Winter an der französischen Küste gefunden worden.

Dauerzellen werden von manchen marinen Planktonformen gebildet, die dann auf dem Meeresgrund den Winter überdauern. Mikrosporen und Dauerzellen können immerhin als Zufallsfunde in Planktonfängen gefunden werden. Die Präparationstechnik wäre dann wie oben bei den Teilungsstadien oder mit Goldimprägnation zu versuchen.

§ 305. Darstellung der Schalen. Die Darstellung der Diatomeen-Schalen, die aus Kieselsäure bestehen, ist eine für das Bestimmen der Formen fast unerläßliche Präparation. Deshalb wird von vielen auf das Färben und Präparieren des Zellinhaltes der Kieselalgen ganz verzichtet und nur eine Sammlung von Präparaten der Kieselschalen angefertigt.

Zur Darstellung der Kieselschalen ist die Zerstörung der organischen Substanz der Diatomeen Voraussetzung. Natürlich strebt man auch die möglichst vollständige Entfernung von fremden Beimischungen wie Sand usw. an. Für diese Art der Präparation sind viele Methoden veröffentlicht worden. Hier soll nur eine Auswahl derjenigen Methoden gebracht werden, die zu Hause in Wohnräumen wirklich ohne Gesundheitsschädigungen durchgeführt werden können.

Das Diatomeenmaterial muß zunächst möglichst befreit werden von fremden Beimengungen; das geschieht durch folgende Arbeitsgänge:

§ 306.

I. Grobe Reinigung mit Sieben und Schlämmen.

Man muß eine Garnitur Metallsiebe mit verschiedenen Maschenweiten zur Verfügung haben. Es genügen im allgemeinen fünf verschiedene Nummern. Solche Metallsiebsätze sind erhältlich z.B. bei *J.D.Möller* in *Wedel* in *Holstein*, bei *Dr.Grübler* in *Leipzig* und in vielen anderen Geschäften für mikroskopischen Bedarf. Auch Seidengazesiebe sind im Gebrauch, sie sind aber nicht so haltbar wie die Metallsiebe. Man spannt sie mit Gummiringen über Glasfilter, so daß sie völlig straff aufsitzen.

Man bringt kleinere Mengen des Materials auf das Sieb mit den größten Öffnungen. Unter Wasserzufluß pinselt man mit weicherem Pinsel die Diatomeen durch das Sieb. Im Auffanggefäß schweben die leichteren Schlammteilchen noch eine Zeitlang im Wasser, während die Diatomeen sich rascher setzen. Gießt man nun das Wasser ab, nachdem sich der Diatomeenbodensatz gebildet hat, kann man beides voneinander trennen. Auf den Bodensatz gießt man nun Wasser, schüttelt um, läßt absetzen, gießt ab und wiederholt die Manipulation einige Male. Dadurch erhält man schließlich ein ziemlich reines Diatomeenmaterial. Auf dem Sieb bleiben die größeren Beimengungen zurück. Je nach Wahl der Siebnummer kann man das gewonnene Diatomeenmaterial schon der Größe nach sortieren. Über die mittleren Nummern bei diesem Arbeitsvorgang zu gehen, hat jedoch gar keinen Zweck. Ein Mißstand ist hier in Kauf zu nehmen, es gehen viel Diatomeen verloren, auch wenn man sorgsam arbeitet.

Epiphytische Diatomeen an anderen Algen, an Schilfstengeln, an größeren untergetauchten Wasserpflanzen usw. werden zuerst in Wasser abgepinselt, dann läßt man absetzen, bevor sie wie oben geschlämmt und gesiebt werden.

Man kann das Algenmaterial auch 5 Minuten in Wasser kochen, dem einige Tropfen Salpetersäure beigefügt wurden. Vorsicht vor Säuredämpfen! Am besten im Freien vornehmen! Planktonmaterial kann ebenso behandelt werden. Wenn jedoch der Gehalt an Phytoplankton groß ist, wird man erst nach Entfernung der organischen Bestandteile sieben.

II. Entfernung der organischen Bestandteile

Die beigemengten und in den Schalen vorhandenen organischen Stoffe müssen nun zerstört werden. Dafür sind in der Literatur sehr viele Vorschriften angeführt. Der Leser wird sicher mit der hier gebotenen Auslese sein Auslangen finden.

a) Methode nach *Miliarakis* (79). Diese Methode ist für wenig Material geeignet. In einer Glasschale werden die Diatomeen erst mit einigen Tropfen konzentrierter Schwefelsäure überdeckt. Nach etwa 1/2-3/4 Stunden gibt man etwas 20 %ige wässerige Chromsäure, dann nach dem Verlauf einer weiteren halben Stunde 30 %ige und in gleichen Zeitintervallen immer etwas konzentriertere Chromsäure zu. Schließlich verdünnt man in einer Zentrifuge mit viel Wasser und wässert bis zur neutralen Reaktion.

(79) S. Miliarakis, *Die Verkieselung*, Würzburg 1884

b) Methode mit Salzsäure und Kaliumchlorat. Diese Methode setzt größere Materialmengen voraus. In einem Becherglas werden die Diatomeen mit kalter Salzsäure übergossen, in die man einige Kristalle von Kaliumchlorat wirft. Die Prozedur hat der Salzsäuredämpfe wegen unbedingt in unbewohnten Räumen oder unter dem Abzug zu erfolgen. Die Reaktion braucht 1-2 Wochen. Alle Tage gibt man etwas Kaliumchlorat zu, bis die Diatomeenmasse weiß geworden ist.

Bisweilen führt diese Methode nicht völlig zum Ziel, wie eine mikroskopische Kontrolle einer kleinen Probe zeigt. In diesem Falle bringt man das Material für 2 Tage in starkes Ammoniak, wäscht gut und gibt für 3-4 Tage kalte Salpetersäure zu. Hernach muß ausgewaschen wer-

den, bis das Wasser neutral ist. Das Aussüßen kann hier und bei den anderen Methoden unter Mithilfe von Ammoniak beschleunigt werden.

c) Methode mit Kaliumpermanganat nach *H.v.Schönfeld* (80). Konzentriertes Diatomeenmaterial wird in einem Becherglas mit wenig Wasser versetzt. In das Wasser wirft man so viel Kristalle von Kaliumpermanganat hinein, daß eine ungefähr 10 %ige Lösung entsteht. Das Becherglas wird einige Tage warm gestellt. Hierauf ergänzt man das Wasser auf das Doppelte und gibt 0,5 g gebrannte Magnesia hinzu. Nach 3 Stunden tropft man in Intervallen von je 10 Minuten je 1 g Salzsäure bis zur Entfärbung zu. Auswaschen, Aussüßen. Diese Methode ergibt sehr reines Material und ist auch für zarte, feine Formen als schonend zu empfehlen.

[Vorsicht! Es entwickelt sich bei der Zugabe von Salzsäure in großen Mengen freies Chlor! Falls am Ende der Prozedur Braunstein zurückbleibt, setzt man bis zur Entfärbung Oxalsäure zu.]

(80) G.Niemann, Mikrokosmos I, 1907/08, S.78

d) Methode mit Schwefelsäure und Kaliumdichromat. Diese Methode ist hinsichtlich der chemischen Wirkung ähnlich der Methode von *Miliarakis*. Sie ist für größere Materialmengen berechnet.

Zur Auflösung von Kalk wird das Material erst 24 Stunden lang mit Salzsäure übergossen stehen gelassen. Hierauf süßt man aus, gießt das Wasser ab und übergießt das Material mit ungefähr der sechsfachen Menge seines Gewichtes mit konzentrierter Schwefelsäure, worin alles Organische durch Verkohlung schwarz wird. Nach 24 Stunden gibt man etwas pulverisiertes Kaliumdichromat hinzu. Während einer Woche rührt man öfters mit einem Glasstab um. Auswaschen, Aussüßen. Ergibt die mikroskopische Prüfung, daß noch organische Substanz vorhanden ist, behandelt man die Masse 24 Stunden lang mit Ammoniak und kocht dann mit einem erbsengroßen Stück venetianer Seife aus (Vorsicht!). Auswaschen.

e) Methode mit Natriumperoxyd nach *Marpmann* (81). Meeresdiatomeen kommen im Plankton in großen Mengen vor und bilden somit einen großen Teil der Fischnahrung. Diatomeen sind also auch im Magen-Darm-Kanal der Friedfische zu finden. Im Binnenland kann man z.B. aus dem Darm von Fischen Diatomeen des Meeres gewinnen.

Der Magen-Darm-Kanal der Heringe, Sardinen, Schollen und anderer Plattfische, oder auch Plankton mit vielen Tieren, kommt in ein Becherglas mit etwas Wasser. Man fügt eine Messerspitze Natriumperoxyd zu. Während einiger Tage rührt man ab und zu mit einem Glasstab um, notfalls erwärmt man etwas oder setzt nochmals etwas Natriumperoxyd zu. Dann wäscht man mit Wasser aus. Vorhandene Kalkkörper lösen sich nach Zugabe von Essigsäure oder Salzsäure.

(81) G.Marpmann, Zeitschrift für angewandte Mikroskopie, Bd. XllI, 1918, S.183

f) Aufschließen von fossilem Material. Diatomeen kommen auch fossil vor. Am bekanntesten sind sie unter dem Namen Kieselgur. Zum Teil sind mächtige Lager vorhanden, so in der Lüneburger Heide, in Franzensbad, bei Königsberg, ferner in Mexiko, Lappland und an anderen Orten.

Manche Kieselgurvorkommen sind so rein, daß sie einer Reinigung kaum bedürfen. Durch Schlämmen im Reagensglas können sie vollkommen brauchbar präpariert werden. Soweit die Vorkommen pulverig oder leicht zerreiblich sind, werden sie nach einer der bisher geschilderten Methoden verarbeitet.

Enthält sonst ziemlich reines fossiles Material noch Spuren organischer Substanzen (Bitumen), was sich durch Braunfärbung anzeigt, so verfärbt man am besten nach *H.Fischer* (82) folgendermaßen: In einem Erlenmeyerkolben oder Reagensglas übergießt man eine kleine Probe mit Schwefelsäure und kocht (Abzug, Vorsicht!) etwa 10 Minuten lang vorsichtig. Manchmal kommt man ohne Kochen aus, wenn man die Säure über Nacht einwirken läßt. In die jedenfalls abgekühlte Masse gibt man nach und nach Kaliumnitrat, bis die Masse wieder hell und klar

geworden ist. Es erfolgt nun ein sehr gewissenhaftes Auswaschen, bis jede Spur von Säure entfernt worden ist. Hieran schließt sich dann das Ausschlämmen an.

Die Schalen fossiler Diatomeen sind bedeutend zerbrechlicher als diejenigen rezenter Arten. Man tut daher bei größerem Zusammenhang des Materials gut, es nicht mechanisch zu zerreiben. Viel besser ist es, die Massen mit einer bei 40 ^{O}C gesättigten wässrigen Lösung von kristallisiertem Natriumsulfat zu durchtränken. Beim Abkühlen und Auskristallisieren des Salzes werden die Massen zerkleinert; notfalls wiederholt man diese Prozedur einige Male. Anschließend folgt nun die vorsichtige Verarbeitung nach den oben geschilderten Verfahren.

In kalkhaltigen Gesteinen eingeschlossene Diatomeen können durch Auflösen des Gesteins mit verdünnter Salzsäure gewonnen werden. Bei in Säuren unlöslichen Gesteinen sind Dünnschliffe notwendig, wenn die Diatomeen untersucht werden sollen.

(82) Heinrich Fischer, Mikrokosmos XXIX, 1935/36, S.5

III. Abschließende Reinigung der Schalen

Das nach einem der oben geschilderten Verfahren gewonnene Schalenmaterial, *das vollkommen ausgesüßt sein muß*, wird nun zur letzten Reinigung nochmals gesiebt und geschlämmt. Zu dieser Arbeit benützt man am besten Gaze der Nummer 20-21. Hierbei ist so lange mit neuem Wasser aufzugießen, bis das Wasser ganz rein abläuft. Damit ist dann der letzte Schlamm fortgespült. Die Diatomeen sind auf dem Sieb verblieben. Man nimmt letzteres nun vom Trichter ab und spritzt es über einem Uhrschälchen von 5-6 cm Durchmesser ab und wäscht es sauber nach. Wenn man nun die Uhrschälchen vorsichtig in drehende Bewegungen versetzt, steigen die Diatomeen in weißen Wölkchen auf, während Sand usw. in der Mitte des Uhrglases liegen bleibt. Die Schalen der Kieselalgen saugt man nun mit Pipetten ab und füllt sie in die kleinen Aufbewahrungsröhrchen, am besten in Alkohol.

Die Schalen sind zum Präparieren bereit. Sie können so aber auch unbegrenzt aufbewahrt werden.

Der Einschluß der Schalen in Dauerpräparaten

§ 307.

A. Die Einschlußmittel.

Die Diatomeenschalen haben einen Brechungsindex von 1,43. Wenn sie also in ein Medium von n = 1,4-1,5 gebracht werden, verschwinden sie für das beobachtende Auge. Die üblichen Einschlußmittel sind für Diatomeenschalen deshalb unbrauchbar. Im Laufe der Zeit sind eine sehr große Zahl von Diatomeen-Einschlußmittel in der Literatur bekanntgegeben worden. *Migula* (83) hat eine sehr lesenswerte Übersicht über die meisten dieser Mittel gegeben, der ich in den wesentlichsten Zügen folgen werde.

Die Schönheit der Schalenzeichnung kommt nur dann zur vollen Darstellung, wenn die Feinheit der Zeichnung und die optischen Eigenschaften des Einschlußmittels aufeinander abgestimmt sind. *Je feiner die Struktur der Schale ist, desto höher soll der Brechungsindex des Einschlußmediums sein!*

(83) D.W.Migula, Mikrokosmos XXV, 1930/31, S.46

An verläßlichen, haltbaren Einschlußmitteln stehen nach *Migula* zur Verfügung:

1. Eine Lösung von gereinigtem Styrax in Terpentinöl oder Xylol. n = 1,58-1,63. Die Lösung ist hellgelb.

2. Das aus dem Styrax hergestellte wasserklare Styresin mit demselben Brechungsexponenten wie Styrax. Es kosten 10 g Styraxlösung etwa 0,30 DM und 10 g Styresin etwa 4,50 DM.

Die Anwendung ist folgende: Auf einen fettfrei gereinigten Objektträger bringt man einen Tropfen der die Diatomeen enthaltenden Flüssigkeit und läßt diese vollkommen verdunsten. Dabei ist es notwendig, daß die Diatomeen dünn genug verstreut sind. Am besten gelingt dies, wenn die Diatomeen in Wasser liegen. Ist der Objektträger absolut trocken, gibt man einen Tropfen Terpentinöl oder Xylol darauf, damit die Luft aus den Objekten entweicht. Bevor dieser Tropfen vollkommen verdunstet ist, kommt ein Tropfen Styraxlösung und das Deckglas darauf. Ein Lackrahmen ist vollkommen unnötig. Styresin wird genau so verarbeitet wie Styrax.

Man kann bei der Präparation auch noch etwas anders verfahren. Auf den mit Diatomeen vorbereiteten Objektträger tropft man einen Tropfen einer dünnflüssigen Styraxlösung und läßt unter einem Glassturz staubfrei so lange trocknen, bis die Styraxlösung *fast* festgeworden ist. Unter dem Mikroskop kann kontrolliert werden, ob die Luft aus den Diatomeen verschwunden ist. Wenn nicht, dann erhitzt man vorsichtig, bis die Luft verschwunden ist. Zum Schluß wird mit einem Deckglas zugedeckt, das auch einen Tropfen Styrax aufweist.

Aus optischen Gründen ist es besser, den Wassertropfen mit den Diatomeen auf das Deckglas zu geben, antrocknen zu lassen und dann mit der Styraxlösung versehen auf den Objektträger zu kitten. Bei Anwendung der Ölimmersion liegen die Diatomeen näher dem Objektiv.

Bei der Herstellung von sogenannten Testpräparaten soll zwischen Deckglas und Diatomeen möglichst wenig Raum vorhanden sein. Hier werden die Deckgläser mit den Diatomeen auf einem Platinblech als Unterlage kurz bis zur Rotglut erhitzt und dann das Präparat fertiggestellt.

3. Das Einschlußmittel nach *Kolbe-Wislouch*. Dieses Mittel wird meistens kurz das *Kolbe*-Mittel genannt. Es ist zu beziehen von der *Firma Paul Altmann-Berlin NW 16, Luisenstraße 47*. Der Preis ist für ein Röhrchen zur Anfertigung von ungefähr 150 Präparaten 1,50 DM.

Das *Kolbe*-Mittel besteht aus 1 Teil Piperin sowie 2 Teilen Cumaron und 0,75 Teilen Quecksilberjodid. Es wird in Form kleiner Kügelchen geliefert. Sein Brechungsindex beträgt 1,65, seine Farbe ist hellgelb. Der Gebrauch des *Kolbe*-Mittels ist folgender:

Das Diatomeenmaterial wird wie gewöhnlich auf einem Deckglas aufgetrocknet. Auf dem Objektträger wird ein halbes Kügelchen *Kolbe*-Mittel durch Erhitzen verflüssigt. Man legt das Deckglas auf und drückt leicht an, eventuell unter Erwärmen. Bei zu starkem Erwärmen kann sich das Mittel bräunen. Sind die Luftblasen hartnäckig, erwärme man lieber wiederholt leicht als einmal zu stark. Nach dem Erkalten kann übergetretenes Einschlußmittel mit dem Messer abgekratzt werden. Es empfiehlt sich ein fester Lackrahmen um das Deckglas, um ein Abspringen zu vermeiden.

4. Das gelbe Medium. Das gelbe Medium spielt nach *Migula* eine große Rolle in der Diatomeentechnik. Sein Brechungsindex von 2,2-2,4 ist einer der größten überhaupt. Nach *Migula* ist es durchaus haltbar, wenn es richtig hergestellt worden ist. Zu kaufen ist es kaum und muß daher selbst hergestellt werden. Wegen der außergewöhnlichen Giftigkeit der verwendeten Stoffe ist seine Herstellung nur mit allergrößter Vorsicht durchzuführen. Wer über keinen Abzug verfügt, muß diese Arbeiten im Freien oder im Waschhaus machen und setzt dabei am besten noch eine Gasmaske auf.

In einer Porzellanschale werden im Sandbade 20 g Arsenbromid geschmolzen. Unter fortwährendem Umrühren mit einem Glasstab werden dem Schmelzfluß 20 g pulverisiertes Realgar zugesetzt und bis zur vollständigen Lösung erhitzt. Man prüft mit einer Lupe erstarrte Tropfen auf einem Objektträger, die man gegen Schluß des Prozesses herstellt, ob sich alles gelöst hat. Dieses Realgar soll so rein wie möglich sein. Von dessen Güte hängt überhaupt die Brauchbarkeit des gelben Mediums ab. Man beziehe es daher unter Angabe des Verwendungszweckes von *Merck* in *Darmstadt*.

Wenn das Realgar vollkommen gelöst erscheint, löst man noch 6,5 g pulverisierten feinsten Schwefel auf. Man kann auf keinen Fall gewöhnliche Schwefelblumen benützen, sondern verwende feinste, chemisch abgeschiedene Sorten, die man ebenfalls zweckmäßig von *Merck* in *Darmstadt* oder *Chemie-Heyden* in *Dresden* bezieht.

Das fertige Produkt wird nun auf vollkommen gereinigte (Kollodiumverfahren!) Objektträger oder Glasplatten ausgegossen und nach dem Erstarren abgenommen. Das Mittel ist spröde, dunkelgrüngelb und durchscheinend. Es enthält immer etwas Verunreinigungen, die anscheinend unvermeidlich sind.

Der Gebrauch des gelben Mittels ist einfach. Die Diatomeen werden auf ein Deckglas aufgebracht wie üblich. Auf einem Objektträger erhitzt man ein kleines Stückchen des gelben Mediums, wodurch es flüssig wird. Dann legt man das Deckglas auf und drückt leicht an. Sollten in den Diatomeen Luftblasen auftreten, so können diese durch mäßiges Erhitzen entfernt werden. Im gelben Medium treten nach *Migula* immer unvermeidbare Luftblasen auf. Das gelbe Medium macht auch die feinsten Zeichnungen sichtbar. Für große Diatomeen ist es jedoch nicht geeignet, da diese in ihm völlig schwarz erscheinen.

5. Das weiße Medium. Unter dem Namen weißes Medium sind vor 60 Jahren Einschlußmittel bekannt geworden, die aus Zinnchlorid, Glycerin und Gelatine bestehen oder Zinnchlorid in anderen Rezepturen enthalten. Nach *Migula* sind diese Medien sehr hygroskopisch und nicht haltbar, ja fast gar nicht verarbeitbar. Deswegen sei auf die Schilderung der Herstellung hier verzichtet. Interessenten finden sie bei *Straßburger*.

6. Neuere Mittel. Neuerdings hat die chemische Industrie unter Verzicht auf extrem hohe optische Eigenschaften haltbare Harzeinschlußmedien hergestellt, die einfach zu verarbeiten sind. Ich führe an:

> Diatopan (84) von *Dr.Grübler & Co.* in *Leipzig*. n = 1,6238. Preis 10 g 3,50 DM. Diatopan wird in kleinen Perlen geliefert und ist xylollöslich. Ein kleines Stückchen wird auf dem Objektträger durch Erwärmen verflüssigt. Das Deckglas mit dem in einem Xyloltropfen befindlichen Diatomeen wird vorsichtig aufgedrückt.
>
> (84) W.Dobberthien, Mikroskopie für Naturfreunde XI, 1933, S.263
>
> Tolufix I, n = 1,5437, und Tolufix II, n = 1,5900. Beide von *Dr.Hollborn* in *Leipzig*. Diese beiden Mittel sind farblos und alkohollöslich. Tolufix I eignet sich für größere Diatomeen mit mittelmäßiger Schwierigkeit wie *Synedra, Coscinodiscus, Pinnularia, Navicula*, Tolufix II soll nach *Eckert* (85) praktisch die gleichen Ergebnisse erreichen wie das *Kolbe*-Mittel, also geeignet sein für Diatomeen wie *Pleurosigma angulatum, Surirella gemma, Nitschia linearis* und ähnliche.
>
> (85) Franz Eckert, Neue Diatomeeneinschlußmittel, Mikroskopie für Naturfreunde X, 1932, S.164
>
> Medium H I, n = 1,5603, und Medium H II, n=1,5986. Beide von *Dr.Hollborn* in *Leipzig*. Diese beiden Mittel sind xylollöslich. Die optischen Eigenschaften sind dieselben wie bei den Mitteln Tolufix I und II.

Die Verarbeitung der Mittel ist einfach. Die Diatomeen kommen auf Deckgläser, wo sie antrocknen. Tolufix II und Medium H I werden mittels eines Glasstabes in Tropfenform unmittelbar auf das Diatomeenmaterial verbracht. Das Deckglas wird nun sofort umgedreht und auf einen Objektträger angedrückt unter leichtem Erwärmen bis die Luftblasen aus den Diatomeen entfernt sind.

Bei den Mitteln Tolufix I und Medium H II ist die Arbeitsweise folgende: Die Glasstäbe zur Entnahme eines Tropfens Einschlußmittels müssen leicht angewärmt werden, bevor sie in die zähen Medien eingetaucht werden. Nach *Eckert* dreht man einen Glasstab schnell um seine eigene Achse und kann so einen Tropfen herausheben, den man sofort auf ein vorbereitetes Deckglas verbringt und wie oben geschildert weiterbehandelt.

Hyrax, ein neueres Mittel mit n = 1,8-2 hat viele Hoffnungen erweckt. Nach *Migula* hat es diese Hoffnungen jedoch deswegen ziemlich enttäuscht, da es vielfach auskristallisiert und dann die Präparate unbrauchbar macht.

Zusammenfassend kann über die Diatomeeneinschlußmittel gesagt werden, daß die meisten Anforderungen durch Styraxlösung oder die neueren Mittel Diatopan sowie Tolufix und Medi-

um H erfüllt werden. Gilt es nur, Diatomeen unter sehr günstigen optischen Verhältnissen kurze Zeit zu beobachten, so kommt Monobromnaphthalin in Betracht, n = 1,661. Als Einschlußmittel hat es sich ebenfalls nicht bewährt.

[Weitere hochbrechende Flüssigkeiten sind 1-Methoxinaphthalin, Tetrabromethan und Dijodmethan; die letzteren beiden sind ziemlich giftig. Man kann durchsichtige Kunststoffe in diesen Flüssigkeiten lösen, so daß honigdicke Lösungen entstehen, in welche man die Diatomeen einschließt. Wegen der Flüchtigkeit der hochbrechenden Komponente sind derartige Präparate allerdings nur für kürzere Beobachtungen - bestenfalls einige Wochen - geeignet. Seit einiger Zeit ist als hochbrechendes Einschlußmittel für echte Dauerpräparate wieder Styrax auf dem Markt.]

B. Herstellung von Präparaten

Bei der Anführung der einzelnen Mittel wurde schon darauf hingewiesen, wie einfache Präparate hergestellt werden.

Streupräparate. Die einfachen Präparate heißen Streupräparate. Diese Streupräparate können mit jedem Einschlußmittel hergestellt werden. Zu beachten ist nur, daß die Diatomeen so dünn verteilt werden, daß sie sich nicht überall überdecken.

Neben den Streupräparaten gibt es noch die Typenplatten oder Reihen- und Kreispräparate. Erstmalig hergestellt wurden sie von *I.D.Moeller*, der es fertiggebracht hatte, auf einem einzigen Objektträger 4000 Diatomeen wohl geordnet in Reihen unter einem Deckglas zu vereinigen. *Moeller* hat das Geheimnis seiner Arbeitsweise mit in sein Grab genommen. Es ist jedoch nicht allzu schwierig, 10-25 Diatomeen, besonders größere Formen, in Reihen, Kreisen oder sonst ornamental geordnet auf einem Objektträger aufzumontieren.

Die Deckgläser müssen peinlichst gereinigt und mit der Fixierungsflüssigkeit nach *Debes* versehen werden. Ein kleinerer Tropfen dieser Flüssigkeit in die Mitte des Objektträgers gebracht, verteilt sich von selbst. Diese Fixierungsflüssigkeit nach *Debes* erwirbt man am besten käuflich. Sie besteht aus einer Auflösung von Hausenblase in Eisessig, der Alkohol und Isobutanol zugesetzt sind. Preis bei *Hollborn* für 100 ccm 0,80 DM. Die Selbstherstellung lohnt nicht und ist sehr schwierig. Die Lösung ist nur im Dunkeln und bei kühler Lagerung haltbar (86). Neuerdings bringt das Laboratorium *A.Elger* in *Eutin* (*Holstein*) eine nicht verderbliche, synthetische Aufklebelösung in den Handel.

Die Diatomeen werden unter dem Binokular ausgesucht, mit einer 3 mm langen Schweinsborste (siehe § 3) aufgenommen und auf das vorbereitete Deckglas gelegt. Diese Arbeit ist eine kniffelige Geduldsprobe, besonders wenn die Diatomeen schön in Reih und Glied zu stehen kommen sollen. Die Technik der Anfertigung solcher Präparate unter Benützung des gewöhnlichen Mikroskopes schildert *K.E.Schmidt* (87) in sehr anschaulicher Weise. Nachdem das Deckgläschen belegt ist, wird es zum Ankleben der Diatomeen leicht angehaucht (Übungssache!), dann läßt man trocknen. Zur Entfernung der Luft kommt nach dem Trocknen das Deckglas in Xylol. Schließlich kommt ein Tropfen Styraxlösung auf das Deckgläschen, man dreht vorsichtig um und legt auf einen Objektträger auf.

Andere Einschlußmittel als Styrax oder Styresin sind bei Reihenpräparaten nicht verwendbar, da die *Debessche* Flüssigkeit keine starke Erwärmung gestattet. Es ist nur möglich, das Xylol aus dem Deckglas vor dem Auflegen auf den Objektträger durch Behandeln auf der ca. 50 ^{O}C warmen Wärmebank während etwa einer Stunde zu entfernen. Hier muß aber der Objektträger ebenfalls vorgewärmt sein, bevor man das Deckglas auflegen kann.

Bekanntlich sind solche Typenpräparate auch käuflich zu erwerben. Bezugsquellen dafür sind *I.D.Moeller* in *Wedel* und *Elger* in *Eutin*, beide in *Holstein*.

(86) Herstellungsvorschrift bei Hustedt, *Die Kieselalgen Deutschlands und der Schweiz*, Leipzig 1939, Akademische Verlagsanstalt

(87) In Mikrokosmos XXI, 1937/38, S.57

§ 308. Querschnitte durch Diatomeen. Einen wirklich vollständigen Einblick in den Aufbau der Diatomeen und ihrer Schalen erhält man erst, wenn auch Querschnitte studiert werden. Bei der Kleinheit der Objekte ist die Herstellung entsprechender Präparate eine sehr schwierige Arbeit, die nur wirklich Geübten gelingen dürfte. Nach *Straßburger* gibt es dazu zwei Wege:

Fixierte und gefärbte Diatomeen, also mit dem ganzen Zellinhalt, werden in Gummi arabicum eingebettet. Auf einem Objektträger wird ein Tropfen Kollodium aufgebracht. Nach Abtrocknen dieses Kollodiumtropfens kommt ein Tropfen dicker Gummilösung darauf (Vergleiche § 467 Ziff.2). Die Diatomeen kommen aus Wasser oder Glycerin in diesen Tropfen Gummilösung. Man kann versuchen, unter dem Mikroskop mit Hilfe einer Schweinsborste die Diatomeen so weit wie möglich auszurichten. Nach dem Trocknen schließt man den Tropfen wieder mit einem Kollodiumhäutchen ab. Die Diatomeen können mit dem Kollodium vom Objektträger entfernt werden. Der Tropfen kann als solcher meistens noch nicht geschnitten werden.

Auf einem Kartonblatt (Postkarte) wird der Kollodiummantel mittels eines neuen Tropfens Gummi-arabicum-Lösung aufgeklebt und nun wird nach dem Trocknen dieses Kartonblatt geschnitten. Die Objekte schneiden sich schlecht und die Messer werden durch die Kieselsäure stark mitgenommen. Die weitere Behandlung ist wie bei den Gummischnitten, also Aufkleben auf einen Objektträger, Kollodiumguß, Entfernen des Gummis, Alkohol, Xylol, Caedax.

Ein anderer Weg, besonders für Schalen, ist der, in Canadabalsam einzudicken und Dünnschliffe herzustellen. Vorzüglich geeignet für Kieselgurstücke

III. Unterabteilung: FLAGELLATEN -FLAGELLATAEA

Allgemeines

§ 309.

1. Die Flagellaten umfassen Formen der verschiedensten Arten. Einige sind unbestritten reine Pflanzen, andere erscheinen als typische Tiere. Dazwischen gibt es viele Übergänge. So kommt es, daß Botaniker und Zoologen die Flagellaten in ihr Arbeitsgebiet einbezogen haben.

Meine Darstellung beschränke ich hier auf Formen, die man als Pflanzen ansprechen kann. Wegen der *Trypanosomen* und anderen parasitären Formen sei auf die medizinische Literatur verwiesen. Die Flagellaten sind keine einheitliche Gruppe. Sie umfassen Formen mit Geißeln. Neben diesem einheitlichen Merkmal finden wir wenig gemeinsame sonstige Eigenschaften.

Hier werden behandelt:

1. *Euglenen*
2. *Chrysomonaden, Chloromonaden, Cryptomonaden*
3. *Dinoflagellaten oder Peridineen*

Die *Volvocales* werden neuerdings nicht mehr zu den Flagellaten, sondern zu den Grünalgen gestellt. Sie haben dort auch in diesem Buche ihren Platz gefunden.

2. Die Materialbeschaffung ist im allgemeinen leicht. Flagellaten kommen überall da vor, wo nährstoffreiches Wasser vorliegt, also hauptsächlich in Abwässern von Fabriken, in Jaucherinnen, Regenpfützen usw. Findet man ausgetrocknete Wasserstellen, in denen Flagellaten vermutet werden können, nehmen wir Schlamm mit nach Hause und versuchen eine Rohkultur, die fast immer gelingen dürfte. Manchmal bilden die Flagellaten, besonders *Euglena*, dicke dunkelgrüne Beläge auf Jaucheabflußrinnen, so daß das Material in Hülle und Fülle zur Verfügung steht, wenn man in der Lage ist, Exkursionen in die Dörfer zu machen.

3. Für Kulturen verwende man die einfachen Rohkulturen nach *Strugger*, die man schon in Reagensgläschen ansetzen kann. *W.Stempel* empfiehlt für die Kulturen von *Euglena* folgende Nährlösung (88):

Redestilliertes Wasser	100 ccm
Pepton (*Witte*)	0,50 g

Traubenzucker	0,50 g
Zitronensäure	0,20 g
Magnesiumsulfat	0,02 g
Kaliumdihydrogenphosphat (KH2PO4)	0,05 g

Es wird nur diese Lösung benützt und kein Schlamm zugesetzt. Hierbei erhält man relativ saubere Speziesreinkulturen, wenn beim Beimpfen einige Sorgfalt verwendet wird.

Viele kleine Arten der Gruppe der Flagellaten wird man als Zufallsfunde unter dem Mikroskop aufstöbern.

Dinoflagellaten sind typische Planktonbewohner, die nur in reinem Wasser auftreten. Fließendes Wasser meiden sie. Sie werden mit dem Planktonnetz erbeutet.

Alle Flagellaten sollten lebend beobachtet werden, da es kaum eine Präparationsmethode gibt, die ihre Formen vollkommen unverändert erhält. Nicht nur der Anfänger wird hier Enttäuschungen erleben. Eine Ausnahme machen nur die Dinoflagellaten, die einen starren Panzer aufweisen.

(88) W.Stempel, *Leitfaden für das mikroskopisch-zoologische Praktikum*, Jena, Gustav Fischer, 1925

§ 310. Fixierung der Flagellaten. Zur Fixierung der Flagellaten kommen Kupferlactophenol nach *Ammon*, 4 %iges Formalin für starre ametabole Flagellaten, Pikrinsäure, Sublimat-Eisessig und Osmiumsäure in Frage.

§ 311. Färbungen an Flagellaten. Zur Färbung an Flagellaten können Verwendung finden:

- Hämalaun nach *Mayer*
- Eisen-Hämatoxylin nach *Heidenhain* und *Häggqvist*
- Boraxkarmin und andere Karminfärbungen
- Alizarinviridin nach *Becher*
- Goldimprägnation mit und ohne Nachfärbung mit Lichtgrün
- Safranin-Lichtgrün
- Gentianaviolett
- Magdalarot-Anilinblau nach *Pfeiffer*
- *Giemsa*-Färbung, besonders für farblose Formen und für Ausstriche.

B. Ausgewählte Beispiele zur Bearbeitung der Flagellaten

1. Gruppe: *Euglenales*

§ 312. Zur Einarbeitung in das schwierige Gebiet der Präparation von Flagellaten befassen wir uns zunächst mit *Euglena* und den verwandten Arten. *Euglena* steht in der Regel reichhaltig zur Verfügung. Wir versuchen an diesem Material folgende Methoden:

1. Wir fixieren eine Aufschwemmung in Wasser, möglichst ohne Schlammbeigaben, mit Kupferlactophenol. Das *Euglena*-Material wird mit der Zentrifuge vorsichtig gewaschen und, wenn es die Formen vertragen, in destilliertes Wasser verbracht. Nun gibt man reichlich Kupferlactophenol hinzu. Man vergesse nicht, daß dieses Fixiermittel möglichst frisch hergestellt sein soll. Nach 24 Stunden schreitet man zur Einbettung. Dieselbe kann in Kupferlactophenol, in Lactophenol-Glyceringelatine und in Kupferlactophenol-Glyceringelatine erfolgen. In den Präparaten wird die grüne Farbe der Chromatophoren sowie die Form der Algen sehr gut erhalten.

2. Wir fixieren eine Aufschwemmung von *Euglena*-Material mit Sublimat-Eisessig, am besten mit heißem (70 ^{O}C). Man übergießt das Material einfach damit. Dauer der Fixierung ist 12-24 Stunden. Hierauf wäscht man mit Wasser aus, überführt in 20 %igen Alkohol, dem man tropfenweise *Lugolsche* Lösung zugibt. Hier verbleiben die Flagellaten, bis keine Entfärbung mehr eintritt. Anschließend erfolgt Auswaschen in 20 %igem Alkohol, Überführen in destilliertes

Wasser und schließlich Behandeln mit 2,5 %iger Natriumthiosulfatlösung. Nach 30 Minuten wäscht man wieder aus und färbt entweder mit Alizarin-Viridin nach *Becher*, Alaun-Glycerin-Hämatein nach *Rawitz*, Hämalaun nach *Mayer* oder wendet die Goldimprägnation an. Die letztlich genannten Färbungen können mit roten oder grünen sauren Farben kombiniert werden.

Alle diese Verfahren setzen sehr viel Material voraus und den Gebrauch einer Zentrifuge. Mit Spitzkelchen kommt man nicht gut aus, weil die Senkungsgeschwindigkeit zu klein ist.

3. Darstellung der Geißel

a) Um die Geißel darzustellen, sind Ausstrichpräparate notwendig. Man fixiert nach *Stempel* *Euglena*-Material mit 96 %igem Alkohol. Nach 24 Stunden bringt man eine kleine Menge auf einen Objektträger, wo man es sorgsam verteilt oder ausstreicht. Hier läßt man es antrocknen. Nach dem Trocknen legt man ein Deckglas auf, das an den Ecken mit einem Deckglaskitt befestigt wird. Ein flüssiger Lack ist nicht verwendbar, da er unter das Deckglas kriechen würde. Die Objekte liegen in Luft. Die Geißeln sind sehr deutlich zu sehen. Die Flagellaten selbst sind geschrumpft und zeigen keine Einzelheiten.

b) Bessere Präparate erhält man durch Abklatschen von Deckgläschen, Ausstrichen auf Deckgläschen mit oder ohne Eiweiß und Fixieren mit Sublimateisessig oder *Bouin* und sorgsames Färben der Geißeln nach *Löffler*. Die fixierten Ausstriche klemmt man in eine Cornetpinzette, übergießt sie mit einigen Tropfen der *Löfflerschen* Beize und erwärmt über der Flamme etwa eine Minute, bis Dämpfe aufsteigen. Hierauf wäscht man ab. Diese ganze Prozedur ist dreimal zu wiederholen. Schließlich färbt man 3 Minuten mit heißem Karbolfuchsin. Endlich Auswaschen und Einschließen nach Passage durch Alkohol und Terpineol in Caedax.

4. Zytologische Präparate. Bei dem in der Zentrifuge mit Sublimat oder *Bouin* fixierten Material sind nach den Färbungen mit Alaun-Glycerin-Hämatein nach *Rawitz* oder Goldimprägnation zytologische Einzelheiten zu erkennen. Teilungsstadien von *Euglena* trifft man in der Regel in frischen Kulturen an.

2. Gruppe: *Chrysomonaden, Chloromonaden*

§ 313. Hierher gehören viele sehr kleine Formen, die sehr undankbar in der Präparation sind. Man kann die bei *Euglena* angeführten Verfahren versuchen.

Eines der wenigen dankbaren Untersuchungsobjekte ist *Hydrurus foetidus*, das bis 30 cm lange, sehr verschiedenartige Gallertstränge bildet, in denen die einzelnen Zellen eingebettet sind. Es kommt in kalten Bächen vor, wo es an Steinen und Holz festsitzt.

Fixierung: Pikrinsäure.
Färbung: Alizarinviridin

oder Fixierung mit Sublimat-Eisessig mit nachfolgender Färbung mit Hämalaun nach *Mayer* oder Goldimprägnation.

Objekte mit starker Färbung können in Harzen eingeschlossen werden. Im allgemeinen aber ist die Goldimprägnierung oder die Färbung mit Alizarinviridin nur so stark, daß ein Einschluß in Glyceringelatine in Frage kommt.

3. Gruppe: *Dinoflagellaten*

§ 314.

1. *Dinoflagellaten* oder *Peridineen* sind Planktonbewohner. Sie kommen im Süßwasser und im Meere vor.

Fixierung: Zur Fixierung wendet man nach *Eckert* am besten Chromessigsäure nach *Flemming* an in folgender Zusammensetzung:

1 %ige wässrige Chromessigsäure	70 ccm
Destilliertes Wasser	90 ccm
Eisessig	5 ccm

Färben: Zum Färben eignen sich fast alle Verfahren mit Ausnahme der Karmine und Hämatoxylinfärbungen. Übersichtspräparate färbt man zweckmäßig mit Bismarckbraun. Zytologische Einzelheiten kann man darstellen mit Kernechtrot, Goldimprägnation mit Nachfärbung von Lichtgrün. Nach *Stempel* lassen sich Dinoflagellaten nach Formolfixierung mit Parakarmin nach *Mayer* färben.

Zur Untersuchung suche man sich Material von *Ceratium hirundinella* zu verschaffen. Diese Art wird bis 400µ lang. *Ceratium cornutum* wird bis 150µ lang. Die übrigen Arten sind fast alle nur ein Drittel so lang. Die beiden oben erwähnten Arten kommen in größeren Sümpfen zwischen Wasserpflanzen oder im Plankton vor. Die Fänge fixiert man am besten an Ort und Stelle, da sonst zu leicht Absterbeerscheinungen auftreten.

Die Fortpflanzung geschieht durch Zellteilung in zweierlei Weise:

a) Es wird die Hülle unter Gallertbildung gesprengt. Der Protoplast teilt sich nun in 2 oder 4 Zellen, die sich mit neuen Hüllen umgeben.

b) Die zweite Art der Teilung erfolgt in der Längsachse oder schief dazu. Auch die Hülle nimmt an der Teilung teil.

c) Bei ungünstigen Lebensbedingungen treten auch Dauersporen auf. Alle diese Formen können in den Planktonfängen enthalten sein. Die Dauersporen oder Zysten befinden sich manchmal im Schlamm der Teiche, besonders gegen den Winter zu.

Nach *Huber* und *Nipkow* (89) können solche Dauersporen zum Keimen gebracht werden. In 50 oder 100 ccm fassenden weißen Milchflaschen wird frisches Brunnenwasser oder Teichwasser gefüllt und einige Gramm Schlamm mit den Sporen hineingerührt. Bei 15-25 ^{O}C keimen die Sporen bald und wachsen zu neuen *Ceratien* aus. Vorteilhaft sind Spuren von Soda im Wasser, etwa 0,1 Promille. Nährlösungen nach *Knop* oder *Klebs* haben sich hier nicht bewährt.

(89) Zitiert nach G.Kostka, *Prakt. Anleitung zur Kultur der Mikroorganismen*, Stuttgart, Franckh'sche Verlagshandlung, 1924

2. Marine Arten von *Peridineen* können nach Küster (90) auf folgende einfache Art erhalten werden: Man sammelt am Strande angeschwemmte Algen wie Fucus und läßt sie mit Meerwasser übergossen faulen. Bei Auftreten von *Peridineen* impft man mit diesem Material folgende Nährlösung:

Meerwasser	1000 ccm
Rohrzucker	1,50 g
Weinstein oder Weinsäure	0,01 g
Stärke	0,15 g
Konzentrierter Fucus-Dekokt	3,50 g

Die marinen Formen wachsen im Gegensatz zu den Formen des Süßwassers besser in leicht sauren Medien, daher der Zusatz der Weinsäure.

(90) Küster, Archiv für Protistenkunde II, 1908, S.351

3.Einschluß: Die Flagellaten werden in Glyceringelatine oder in Harzen eingeschlossen. Man vergleiche die Methoden bei sehr kleinen Objekten.

IV. Unterabteilung: ARMLEUCHTERALGEN - CHARACEAE

A. Allgemeines

§ 3l5.

l. Die Armleuchteralgen fehlen in keiner Lokalflora, wenn sie auch vielleicht in manchen Landschaften gesucht sein wollen. Wir finden sie in Teichen, Bächen und Gräben. Schnell fließende Gewässer meiden sie meistens. Im Meere kommen sie an den Küsten selten vor, doch sind sie im Brackwasser oft reichlich.

Die Armleuchteralgen sind Algen von einigen Zentimeter Größe bis zur Länge von einem Meter, besonders groß sind die tropischen Arten.

Beim Sammeln der Armleuchteralgen denke man daran, daß manche Arten oft tiefe Wurzeln und auch Wurzelknöllchen aufweisen, die wir in den Kreis unserer Untersuchungen einbeziehen wollen.

An Ort und Stelle waschen wir die gesammelten Algen so gut es geht und fixieren gleich am Fundort genügend Material. Nach meinen Erfahrungen vertragen gerade die Armleuchteralgen besonders im Hochsommer auch kleine Transporte schlecht und faulen sehr rasch. Wenn man zu Hause Kulturen in einem Aquarium anlegen will, so müssen die Armleuchteralgen möglichst unverletzt mit allen Wurzeln in Gefäßen mit viel Wasser transportiert werden. Sorgsam eingepflanzt, lassen sich die Kulturen jahrelang zu Hause halten.

2. Keimlinge von Dauersporen erhält man durch Kultur von Schlammproben aus Standorten von *Charazeen*. Man schöpft von dem Schlamm, nachdem man einige alte Armleuchteralgen ausgerissen hat. Die Kulturanlage ist dieselbe wie bei den farblosen Schwefelbakterien.

Hält man *Charazeen* zu Hause im Aquarium, so fehlen die Keimlinge selten in den ersten Monaten des Frühjahres.

§ 3l6. Fixieren der Armleuchteralgen. Zum Fixieren der Armleuchteralgen kann eine Reihe von Fixiermitteln Verwendung finden, je nachdem, was im Präparat speziell dargestellt werden soll.

l. Fixierung der natürlichen Farbe. Die grüne Farbe der vegetativen Sprosse und die rote Farbe der Fortpflanzungsorgane lassen sich leicht konservieren. Man verwendet die saure kupferhaltige Formalinlösung nach *Kisse*r mit nachfolgendem Einschluß in Glyceringelatine. Diese Methode empfiehlt sich jedoch nur für kleine zarte Formen.

2. Fixierung für zytologische Untersuchungen.

a) Chromessigsäure nach *Flemming* in folgender Abänderung nach *Ulbrich*:

Destilliertes Wasser	100 ccm
Chromsäure	1 g
Eisessig	1 g

Die Fixierungsdauer ist 24 Stunden. Bei Arten mit starken Kalkinkrustationen ist es eventuell notwendig, diese mit Salzsäure oder besser Ameisensäure gänzlich zu entfernen.

b) Konzentrierte wässerige Pikrinsäurelösung.
c) Das starke *Flemmingsche* Gemisch, auch das *Mannheimer* Gemisch.
d) Alkoholische Sublimatlösung, besonders zur Fixierung der Stachelkugeln bei *Nitella*.
e) Trichloressigsäureformalin für stärkereiche Objekte, wenn die Stärke aus den Schnitten entfernt werden soll. Die Stärke läßt sich bekanntlich nicht immer gut entfernen, wenn mit Chromessigsäure fixiert worden war .

§ 3l7. Einbetten und Schneiden. Das Einbetten von Zweigen, Sproßachsen und Wurzelknöllchen in Paraffin geht ohne Schwierigkeiten vor sich. Ebenso das Einbetten in Zelloidin. Die Schwierigkeiten häufen sich aber bei den Fortpflanzungsorganen. Eiknospen (Zygoten) brauchen 2 Monate Zeit, bis sie ganz mit Paraffin durchtränkt sind. Schnittdicke 30µ. In Zelloidin brauchen diese Objekte ebensolange Zeit zur Durchtränkung wie in Paraffin. Am schnellsten geht die Glycerinmethode nach *Wolf*. Schnittdicke 30-50µ.

Die Behelfseinbettung mit Gummi arabicum ist sehr gut geeignet. Schnittdicke 30-50µ.

§ 318. Färbung von Armleuchteralgen. Zur Färbung von Armleuchteralgen können Karminfärbungen, Hämatoxylin nach *Delafield*, Glycerin-Alaun-Hämatein nach *Rawitz*, Pikro-Nigrosin, besonders für die Kerne der Internodien, *Becher*-Farben, Berlinerblauimprägnation, Dreifachfärbung nach *Flemming-Geidis* und Eisenhämatoxylin-Säurefuchsin verwendet werden.

B. Ausgewählte Beispiele zur Bearbeitung der Armleuchteralgen

a. Lebendbeobachtung

§ 3l9. Wenn lebende unberindete *Nitella* zur Verfügung stehen, soll die Beobachtung der Plasmaströmung in den Internodialzellen nicht versäumt werden. Die Chlorophyllkörner sind in einer Plasmaschicht eingebettet, die ruhig liegt und auch die Chlorophyllkörner festhält. Innerhalb dieser ruhenden Schicht findet sich aber das Plasma in einer ziemlich starken Strömung, so daß das Plasma innerhalb des Internodiums rotiert. Es bewegt sich ganz im Kreise herum. Das sich bewegende Plasma führt auch die aus Eiweiß bestehenden Stachelkugeln oder Wimperkörperchen mit sich und ebenfalls zahlreiche Zellkerne. *Es ist dies der mächtigste Plasmastrom, der bei Pflanzen überhaupt bekannt geworden ist.*

Die Stachelkugeln lassen sich an lebenden Armleuchteralgen mit äußerst verdünnten Methylenblaulösungen nach 3 bis 24-stündiger Einwirkung färben, wobei deren Rotation sehr gut beobachtet werden kann.

b. Die vegetativen Organe - Morphologie und Zytologie

§ 320.

l. Zum Studium des vegetativen Aufbaues fertigen wir farbtreue Präparate an von kleinen Zweigen mit Internodien, Knoten, Sproßachsen und Wurzeln.

Fixierung: Nach *Kisser* (§ 66 Ziffer 3).

Einschluß: In Gelatine nach *Kisser*. Glyceringelatine nach *Kaiser*, Lactophenolgelatine, Azetatgelatine.

Mehr als die Totalpräparate zeigen uns Schnitte. Wir untersuchen Längs- und Querschnitte von Knoten, Sproßachsen, Sproßknöllchen, Internodialzellen.

Fixierung: Chromessigsäure, unter Umständen noch besonders entkalken, *Perenyische* Lösungen.

Färbung: Eisenhämatoxylin-Eosin (Säurefuchsin); Pikro-Nigrosin für Internodialzellen.

2. Sproßachsen zeigen sehr schöne Übersichtsbilder. da sich die Internodien noch nicht gestreckt haben. Längsschnitte durch Sproßachsen (Scheitelzellen) färben sich sehr schön mit Safranin-Gentianaviolett-Orange oder Safranin-Gentianaviolett-Lichtgrün. Übersichtsbilder können mit Anilinblau-Magdalarot oder mit *Becher*-Farben gefärbt werden.

3. Internodien sind aus einer einzigen Zelle gebildet, die mehrere Zentimeter lang werden kann. Die Internodien enthalten zahlreiche Kerne, die sich beim Wachstum der Zelle zum Teil amitotisch teilen. Nach *Straßburger* zeigen Algen, die am Vormittag fixiert werden, die meisten Kernteilungen. Am besten sind unberindete *Nitella*-Arten für diese Untersuchungen. Bei *Nitella* kommt man manchmal mit Totalpräparaten aus.

Zur Untersuchung nehmen wir die obere Hälfte der Internodien und fertigen Längs- und Querschnitte an. Längsschnitte zeigen die Kerne. Querschnitte zeigen die Rindenzellen. Für deren Studium sind besonders ältere Stengel verschiedener *Chara*-Arten instruktiv.

4. Die Blätter zeigen ähnliche Verhältnisse wie die Internodien. Dünne Objekte können *in toto* gefärbt werden.

5. Sproßknöllchen und Wurzelknöllchen. Ähnliche Bilder zeigen ferner die Sproßknöllchen. Solche finden sich bei *Tolypellopsis stelligera*, wo sie sechsstrahlig-sternförmig sind. Ferner bei *Chara baltica* und bei *Ch. aspera*, wo sie rundlich einzellig sind, und bei *Ch. fragilis*, wo sie unregelmäßig erdbeerartig geformt sind. Sproßachsen und Knöllchen sind sehr reich an Stärke. Vor der Färbung ist die Stärke zu entfernen.

6. Die Stärke kann auch in den Schnitten zur Darstellung gebracht werden:

a) Ungefärbte Schnitte (nach Einbettung in Gummiglycerin ohne Alkoholhärtung von *Chara*-Zweigen), die noch das Chlorophyll enthalten, können in *Hoyer* oder vorsichtig in möglichst wenig warmer Glyceringelatine oder noch besser in Lävulosegelatine nach *Heringa* und *ten Berge* eingeschlossen werden.
b) Durch inverse Färbung nach Beizung mit Tannin-Brechweinstein und Färben mit basischen Farben, besonders Gentianaviolett.
c) Weitere Darstellungen der Stärke in Schnitten siehe *Straßburger*, Botanisches Praktikum, S.112-113.

7. Präparate von isolierten Stärkekörnern. Von angeschnittenen Flächen können mit einem Skalpell leicht isolierte Stärkekörner abgekratzt werden. Ihre mikroskopische Darstellung kann nach folgenden Methoden geschehen:

a) Versilberung nach *Correns* (91). Die Stärke wird zunächst getrocknet. Dazu kann man notfalls den Küchenherd oder den Zimmerofen benützen. Die Temperatur soll dabei 40-50 ^{O}C betragen. Hierauf verrührt man sie mit einer 5 %igen wässrigen Lösung von Silbernitrat. Hernach wird mit 10 %iger Kochsalzlösung übergossen und umgerührt. Die Reduktion zu Silber erfolgt im Sonnenlicht. Auswaschen, Alkohol, Terpineol, Caedax.
b) Die getrockneten Stärkekörner werden ungefähr eine Stunde lang behandelt mit einer 1 %igen wässrigen Lösung einer basischen Farbe wie Fuchsin, Malachitgrün oder Kristallviolett. Auswaschen. Nach dem Auswaschen wird mit konzentrierter Pikrinsäurelösung oder Kalziumnitratlösung gebeizt. Die Kalziumnitratlösung nimmt man am besten 1 %ig. Nun wird getrocknet. Terpineol, Caedax.
   Nicht geeignet ist Glyceringelatine.
   Nach beiden angeführten Methoden zeigen die Stärkekörner eine deutliche Schichtung.

(91) Correns, *Jahrbuch für wissenschaftliche Botanik*, Bd. XXIII, 1892

8. Die Wurzeln der Armleuchteralgen haben einen analogen Aufbau wie die Sprosse. Nur fehlen die Chlorophyllkörner und die Rindenzellen. Die Präparation ist dieselbe wie bei den Sproßachsen.

9. Stachelkugeln. In den chlorophyllführenden Zellen finden sich bei manchen Arten eigentümliche Körper aus Eiweiß, die Stachelkugeln oder Wimperkörperchen. Zum Teil sind es ganz einfache Eiweißballen, zum Teil stachelige Kugeln.

Schöne Stachelkugeln kommen vor bei *Nitella syncarpa, Nitella flexilis, N. opaca* und *N. capitata*. Bei den *Chara*-Arten sind es meistens formlose Ballen, so bei *Chara fragilis und Ch. hispida.*

Um uns überhaupt über das Vorkommen zu orientieren, legen wir, wie schon eingangs erwähnt, die Armleuchteralgen in stark verdünnte Methylenblaulösung (1:1000 bis 1:10000). Die Stachelkugeln färben sich dann blau.

Die Darstellung der Stachelkugeln in Dauerpräparaten gelingt wie folgt:

a) Nach Fixierung mit Sublimatalkohol mit basischem Fuchsin oder Lithionkarmin nach *Orth*. Lithionkarmin wird hergestellt, indem man 3 g Karmin in 100 ccm wässriger, kalt gesättigter Lösung von Lithiumcarbonat auflöst. Aufkochen, Filtrieren.

   Die Färbedauer ist 5-30 Minuten und länger. Nach dem Färben nicht mit Wasser abspülen, sondern 30 Minuten lang in Salzsäurealkohol differenzieren. Dann erst abspülen und waschen. Die Stachelkugeln färben sich rot.

b) Nach Fixierung der lebenden Algen mit Blutlaugensalz-Essigsäure und Nachfärben mit Eisenchlorid (92). Fixierlösung:

Gelbes Blutlaugensalz, 10 %ige wäss. Lösung	50 ccm
Eisessig	50 ccm
Destilliertes Wasser	50 ccm

   Bei der Herstellung der Lösung verdünnt man zuerst den Eisessig mit Wasser und setzt dann die Lösung von gelbem Blutlaugensalz zu. Die Fixierdauer ist eine Stunde. Hernach wird mit 60 %igem Alkohol ausgewaschen und anschließend mit 96 %igem Alkohol das Chlorophyll entfernt. Durch Behandeln mit 1-2 %iger wässriger oder auch alkoholischer Eisenchloridlösung tritt eine Blaufärbung der Objekte auf.

   Es färben sich im einzelnen: Stachelkugeln und Nukleolen stark blau, Chromatinkörner schwach blau, Plasma ungefärbt bis schwach blau.

(92) E.Zacharias, Botanische Zeitung 1883, S.211

C. Präparate zur Fortpflanzung der Armleuchteralgen

§ 32l.

1. Sporen treten bei den Armleuchteralgen nicht auf. Die einzige ungeschlechtliche Fortpflanzung erfolgt durch Knöllchen, welche den Winter überdauern, und durch Ausläufer. Die geschlechtliche Fortpflanzung ist die Regel. Die Armleuchteralgen verfügen über Antheridien und Archegonien. Die Produktion der Sexualorgane ist so üppig, daß man Algen ohne Sexualorgane kaum vorfindet.

2. Antheridien. Die Antheridien sind im reifen Zustand lebhaft gelb oder rot gefärbte Kugeln. Sie sind meistens 200-500µ im Durchmesser. Immer stehen sie am Ende von Blättern und Blättchen. Sie sitzen dabei auf einer ausgeprägten Basalzelle.

Ganz junge Formen sind kugelige Zellen. Diese kugelige Zelle teilt sich nun in acht sogenannte Oktanten, deren Aufbau sehr kompliziert ist. An reifen oder fast reifen Antheridien läßt sich bei Zupfpräparaten erkennen, daß die spermatogenen Fäden an einem Köpfchen des sogenannten Manubriums angeheftet sind. Über die sehr interessante Entwicklung des Antheridiums ist bei *Oltmann* nachzulesen.

Nachdem wir uns an Zupf- und Quetschpräparaten orientiert haben, werden uns auch Schnitte verständlich erscheinen. Wir fertigen Längsschnitte durch Antheridien verschiedenen Alters an und auch Zupfpräparate.

Fixierung: Chromessigsäure, *Pfeiffers* Gemisch.

Einbettung: Glyceringummi oder Zelloidin.

Schnittfärbung: Dicke der Schnitte 30-40µ. Die Antheridien haben die Neigung, sich überaus rasch und stark zu überfärben. Junge Antheridien färben sich gut mit Safranin-Gentianaviolett-Lichtgrün. Ältere Stadien färbt man besser mit Eisenhämatoxylin. Beim Differenzieren der Schnitte kann keine Rücksicht auf andere Stellen des Präparates genommen werden, die oft völlig farblos erscheinen. Mit *Becher*-Farben wie Alizarinviridin oder Alizarinzyanin kann eine einfache Übersichtsfärbung leicht erzielt werden. Einschluß der Schnitte in Euparal, Venetianer Terpentin oder Caedax.

Zupfpräparate werden mit *Becher*-Farben oder Magdalarot-Anilinblau oder den ähnlichen Kombinationen nach *Eckert* gefärbt.

3. Spermatozoide. Die reifen Antheridien platzen und entlassen die spermatogenen Fäden in das Wasser. Die Wand dieser Fäden verquillt und entläßt die Spermatozoide. Die Untersuchung der Spermatozoide ist schwierig. Man fertigt Ausstriche, die mit Osmiumsäuredämpfen fixiert werden. Kollodiumhäutchen! Das Färben kann mit dem *Flemmingschen* Dreifarbenverfahren oder mit Eisenhämatoxylin geschehen, Nachfärbung mit Säurefuchsin.

4. Oogonien. Die Eiknospen stehen in nächster Nähe über oder unter den Antheridien. Sie enthalten in der Mitte ein einziges großes Oogonium, das von spiralig gewundenen Rindenzellen umgeben ist. Am Ende sitzt das Krönchen. Die Eiknospen sind zwischen 500 und 1300µ groß. Das Oogonium enthält sehr viel Stärke.

Am besten sind Schnitte durch nicht eingebettetes, frisches Material anzufertigen. Das Einbetten in Glyceringummi kann empfohlen werden. In Paraffin jedoch brauchen Eiknospen mindestens 2 Monate zur Durchtränkung, ebenso lange in Zelloidin. Schneller geht das Durchtränken mit den genannten Medien, wenn die Kieselsäure der Oberfläche mit Flußsäure entfernt wird. Die Kieselsäure wird von den Hüllschläuchen der Rinde abgesondert.

Man hat auch schon vorgeschlagen, unter dem Binokular die Hüllschläuche abzupräparieren und dadurch das reife Oogonium freizulegen.

Färbemethoden:

a) An Totalpräparaten Fixierung und Färbung des Oogoniums mit Blutlaugensalz-Essigsäure nach der Methode der Darstellung der Stachelkugeln.
b) Totalfärbung (Stückfärbung) mit Boraxkarmin und anderen Karminen und Differenzieren im Schnitt.
c) Färben der Schnitte mit *Becher*-Farben.
d) *Junge Stadien* von Oogonien und auch von Antheridien können mit Hämatoxylin nach *Delafield* gefärbt werden oder mit Safranin-Gentianaviolett-Lichtgrün.

5.Zygote. Die befruchtete Eizelle (die Zygote) kommt nach einer Ruheperiode im Frühjahr zum Auskeimen. Wir fertigen Totalpräparate unter Erhaltung der natürlichen Farben an.

Bemerkung: Bei allen Färbungen ist es von großem Vorteil, wenn die Stärke entfernt worden ist, z.B. mit alkoholischer Lösung von Chloralhydrat. Vergleiche auch § 72 Ziff. 1.

V. Unterabteilung: KONJUGATEN - CONJUGATAE

A. Allgemeines

§ 322. Die Konjugaten, sowohl die Zieralgen (*Desmidiazeen*) als auch die Jochalgen (*Zygnematazeen*) sind wie die Kieselalgen seit langem Lieblingsobjekte der mikroskopierenden Botaniker. Sie bieten des Interessanten und des Schönen in Hülle und Fülle und sind reichlich in jeder Lokalflora vorhanden.

Die Zieralgen sind besonders reichlich in den Hoch- und Torfmooren des Voralpenlandes vorzufinden. Die Jochalgen bevölkern im Frühjahr fast jeden Dorftümpel. An Material fehlt es also keineswegs.

Kulturen können nach *Strugger* angelegt werden (§ 285 Ziff. 2).

§ 323. Fixieren der Konjugaten.

Fixiermittel zur Erhaltung der grünen Farbe:

1. Formol-Kupferlactophenol.
2. Kupferlactophenol in Kombination mit nachfolgendem *Pfeifferschen* Gemisch.
3. Osmiumsäuredämpfe.

Sonstige Fixiermittel:

1. Chromessigsäure nach *Flemming*.
2. *Pfeiffersches* Gemisch.
3. Kombinierte Chromessigsäure-Sublimatfixierung nach *Eckert*, besonders für Desmidiazeen

§ 324. Färbemethoden für Desmidiazeen. Zum Färben der Desmidiazeen stehen zur Verfügung:

1. Hämatoxylin, allein oder in Kombination mit Echtgrün, Alizarinviridin, Alizarinrot.
2. Glycerin-Alaun-Hämateinlösung nach *Rawitz*.
3. Alizarinviridin.
4. Die *Pfeifferschen* Eisenbeizungen.
5. Kernschwarz mit Nachfärbungen in Rot oder Grün.
6. Magdalarot-Anilinblau.
7. Die Nuklealreaktion nach *Feulgen*.

§ 325. Färbemethoden für Zygnematazeen. Hier sind zu empfehlen:

1. Goldimprägriation mit Nachfärbungen von Lichtgrün und Echtgrün.
2. Kernschwarz mit Nachfärbungen.
3. Die *Pfeifferschen* Eisenbeizenfärbungen.

B. Ausgewählte Beispiele zur Bearbeitung der Konjugaten

§ 326. Bei der ungemein reichhaltigen Formenfülle der Konjugaten ist es geboten, hier nur einige wenige Beispiele anzuführen. Auch kann auf die Biologie unmöglich mehr als in ganz bescheidener Weise eingegangen werden.

a. Desmidiazeen

§ 327.

1. Die Konjugaten, insbesondere die Desmidiazeen, sind sehr dankbare Objekte für die Präparation in natürlichen Farben. So gibt *Bruhns* (93) für die von *Hornfeld* angefertigten Desmidiazeenpräparate eine vollkommene Haltbarkeit von 30 Jahren an!

(93) Bruhns, Mikrokosmos XXIII, 1929/30, S.81

2. Präparate nach *Hornfeld* in natürlicher Farbe. Die Desmidiazeen werden nur ganz kurz fixiert. Dazu sind Osmiumsäuredämpfe (1 Minute), *Pfeiffer* oder Formalin 20-30 Minuten geeignet. Dann wird ausgewaschen – gründlichst! - und in reinem Glycerin eingeschlossen. Damit die Algen nicht zerdrückt werden, erhält das Deckgläschen an den Ecken kleine Deckglassplitter mit Caedax aufgekittet. Der Caedax muß natürlich vollkommen trocken sein, bevor das Deckglas verwendet wird. Man sorgt deshalb für einen genügenden Vorrat solcher Deckgläser.

Über den Einschluß in Glycerin siehe § 205 Ziffer 2 und 3.

3. Präparate nach *Amman-Eckert* in natürlichen Farben.

> Vorschrift A: Diese Methode eignet sich für Algen aus stehenden Gewässern. Die Algen werden zwei Stunden mit dem *Pfeifferschen* Gemisch vorfixiert und dann sorgfältig ausgewaschen für 10-12 Stunden in Kupferlactophenol verbracht. Nach Auswaschen mit destilliertem Wasser erfolgt Einschluß in Glycerin, Glyceringelatine oder Lactophenolgelatine.
>
> Vorschrift B: Diese Methode eignet sich für Algen aus fließenden Gewässern. Zu 20 ccm 4 %iger Formalinlösung wird kurz vor Gebrauch 2 ccm Kupferlactophenol zugesetzt. Die Algen müssen vor dem Fixieren mit destilliertem Wasser ausgewaschen werden, um Niederschläge von Kupfercarbonat zu vermeiden. Fixierdauer 10-30Stunden. Auswaschen! Einschluß in Glycerin, Glyceringelatine oder Lactophenolgelatine.

§ 328. Morphologische Präparate nach Färbung. Für Übersichtsbilder empfehlen sich die *Becher*-Farbstoffe, vor allem Alizarinviridin. Einschluß in Glyceringelatine oder in Caedax.

Die Form und die äußere Gestalt der Desmidiazeen ist sehr abwechslungsreich.
Es weisen auf:

- Einfache längliche Form: *Mesotaenium, Penium, Pleurotaenium*.
- Halbmondförmige Form: Alle *Closterium*-Arten. Diesen Arten begegnet man am meisten. Fast kein Schlamm und keine Wasserpflanze ist frei von *Closterium*-Arten.
- Sternartige Formen: Die Gattungen *Staurastrum, Micrasterias*.
- Gelappte und gerundete Doppelformen: Die Arten der Gattung *Cosmarium*.
- In Kolonien treten auf : *Desmium, Bambusina, Spondilosium*.

§ 329. Zytologische Präparate.

1. Für gewandte Mikroskopiker sind an Zieralgen viele interessantes Details zu sehen. Wir untersuchen eine *Closterium*-Art.

In die Augen fällt zuerst der zierliche Ch1orophyllkörper , der in jeder Zellhälfte vorhanden ist. Innerhalb des Grünkörpers finden sich regelmäßig Pyrenoide. Die beiden Chlorophyllkörper sind durch eine Plasmabrücke verbunden, in welcher der Kern liegt. Die Zellwand besteht aus mindestens zwei Schichten, von denen sich die innere mit Rutheniumrot färbt. In der Zellwand

sind für die meisten Arten Poren nachgewiesen. Diese Poren sind Organe zur Schleim- und Gallertabscheidung.

Für Desmidiazeen ist die empfehlenswerteste Färbung die mit einer Hämatoxylinvorschrift:

- Hämatoxylin nach *Delafield*.
- Hämalaun nach *Mayer*.
- Alaun-Glycerin-Hämatein nach *Rawitz*.

Sehr zu empfehlen sind Nachfärbungen mit roten sauren Farben wie Säurefuchsin, Erythrosin oder Eosin.

2. *Roeckl* (94) färbte Zieralgen mit der Nuklealreaktion nach *Feulgen*. Der Zellkern färbt sich nicht, vermutlich weil er sich aus Hefenukleinsäuren aufbaut. Hervorragend gefärbt wird die Zellmembran. Sie erscheint glasartig durchsichtig und rot getönt. Stärke wird rot gefärbt.

Die Arbeitsweise von *Roeckl* ist folgende:

a) Fixieren in Chromessigsäure nach *Flemming*.
b) Hydrolyse 5 Minuten.
c) Fuchsinschweflige Säure 2 Stunden.
d) Nachfärben mit 1 %iger wässriger Indigokarminlösung.

Die näheren Verhältnisse der Zellwand, der räumliche Aufbau des Chromatophors und die Porenkanäle müssen an Schnitten untersucht werden. Als Objekte wählt man möglichst große *Closterium*-Arten. Zur Einbettung empfiehlt sich die Gummi-arabicum-Methode. Geschickte Hände können auch in Paraffin einbetten.

(94) Roeckl, Mikrokosmos XXXI, 1937/38, S.173, Mikrokosmos XXXII, 1938/39, S.65

§ 330. Fortpflanzung.

1. Die ungeschlechtliche Vermehrung ist eine einfache Zellteilung. Die beiden Schalenhälften weichen auseinander, und zwar an der Einschnürungsstelle. In jede Hälfte tritt nun ein Teil des Zellinhaltes aus der Schalenhälfte und ergänzt die halbe Alge zu einer ganzen Alge. Schließlich bildet sich auch wieder die Schale. Solche Stadien findet man nicht selten bei der Durchmusterung reichlicher Vorkommen. Die Zellteilung erfolgt am häufigsten in der Nacht. Wenn man in der Lage ist, z.B. bei Kulturen, so fixiere man das Material um Mitternacht.

Die Untersuchungstechnik ist dieselbe wie oben bei den zytologischen Präparaten angegeben.

2. Die geschlechtliche Vermehrung, die Konjugation, besteht in einer Verschmelzung zweier Zellen. Bei *Closterium* legen sich zwei Zellen parallel, bei *Staurastrum* und *Cosmarium* kreuzweise aneinander und treiben in der Mitte je einen Kopulationskanal. Die Inhalte beider Zellen treten aus und vereinigen sich innerhalb einer Gallerthülle. Auf diese Weise bildet sich die Zygote oder Zygospore. Diese umhüllt sich mit einer Membran, die wie die Zellhaut der Desmidiazeen mit Stacheln versehen ist. Nach einer Ruhepause keimt sie aus.

Die Untersuchungstechnik ist dieselbe wie bei der zytologischen Präparation angegeben.

b. Zygnematazeen

§ 331. Morphologische Präparate

Präparate in natürlichen Farben. Die morphologischen Präparate werden nach den gleichen Arbeitsvorschriften wie bei den Desmidiazeen angefertigt. Der Grünkörper mancher Algen ist jedoch schwach gefärbt. Hier ist eine Färbung mit Alizarinviridin und Einschluß in Glyceringelatine nach *Kaiser* oder Lävulosegelatine nach *Heringa* und *ten Berge* ins Auge zu fassen. Ebenso empfiehlt sich Kernschwarz mit Nachfärbungen von Lichtgrün. Von den *Pfeiffer*-

Färbungen ist besonders die Färbung mit Eisenkarmin zu empfehlen, die rein schwarze, gestochen scharfe Bilder im Mikroskop zeigt.

§ 332. Zytologische Präparate

1. Die Form und die Gestalt der Zygnematazeen oder Jochalgen ist viel einförmiger als die der Zieralgen. Sie sind alle fadenförmig. Die Zellen sind ohne Mitteleinschnürung und ohne Stacheln, Höcker usw. Sehr häufig ist eine Gallerthülle vorhanden.

2. Der Chromatophor ist bei *Spirogyra* ein wandständiges Spiralband. Bei *Zygnema* ist der Chromatophor ein Doppelstern, bei *Zygogonium*, *Mougeotia* und *Debarya* besteht es aus Platten. Pyrenoide sind in der Regel vorhanden.

3. Der Zellkern ist meistens gut sichtbar und mit Plasmafäden ungefähr in der Mitte der Zelle aufgehängt oder der Chromatophorenplatte aufgelagert.

4. Die ungeschlechtliche Vermehrung ist eine Zellteilung durch Querteilung der Fäden. Der Zellteilung geht eine Kernteilung voraus. Die Kernteilung spielt sich nachts zwischen 11 und 1 Uhr Ortszeit ab. Will man diese Verhältnisse studieren, so muß man um diese Zeit fixieren, am besten in mehreren durch 30 Minuten getrennten Zeitabschnitten. Am bequemsten ist es dann, die Algen *en bloc* zu färben und dann die gefärbten Algen durchzumustern.

5. Die Konjugation verläuft so, daß die ganzen Fäden sich paarweise aneinanderlegen, entweder parallel oder spiralig umwunden. Die einzelnen Zellen treiben Kopulationsäste vor, die sich auf halbem Wege treffen. Die Membranen lösen sich auf und die Zellinhalte verschmelzen. Der Inhalt einer Zelle begibt sich völlig in die andere Zelle hinein.

6. Die Zygospore ist das Endprodukt der Konjugation.

7. Dauerzellen. Ohne Kopulation bilden sich manchmal Zysten innerhalb der Fäden durch Kontraktion des Inhaltes, ohne daß eine Konjugation vorausging.

In der Natur zeigen sich Konjugationserscheinungen und Zygosporen im Juli und August. Man wird bei aufmerksamen Suchen schon mit einer Lupe die schwarzen Zygosporen beim Sammeln erkennen.

Der Kopulationsvorgang selbst kann unter dem Mikroskop verfolgt werden. Man hat nur darauf zu achten, daß die Fäden nicht durch das Deckglas gedrückt werden. Man legt also Deckglasstützen unter oder benützt eine kleine feuchte Kammer zur Beobachtung im hängenden Tropfen.

8. Künstliche Herbeiführung der Kopulation. Im Frühjahr und Sommer bis in den August hinein können *Spirogyra*-Fäden zu Hause zur Kopulation angeregt werden, wenn die Algen in eine 2-4 %ige Rohrzuckerlösung verbracht und in die Sonne gestellt werden. Der Zuckerlösung kann auch eine Nährlösung beigefügt sein.

9. Die Präparationstechnik der zytologischen Untersuchungen ist im allgemeinen dieselbe wie bei den Desmidiazeen. Die Besonderheiten sind folgende:

Bei älteren dickhäutigen schwarzen Zygoten sind Totalfärbungen erst nach Bleichung möglich. Schnitte sind sehr schwer durchzuführen. Man kann sich nach *Straßburger* dadurch helfen, daß die Objekte unter dem Deckglas leicht gequetscht werden. Dadurch reißt die Zygotenwand, der Inhalt tritt heraus und kann gefärbt werden.

Fixier- und Färbemethoden nach § 324 und § 325. Besonders zu empfehlen ist die Goldimprägnation mit Nachfärbung von Lichtgrün. Bei Teilungsfiguren ist auch eine der Eisen-Hämatoxylin-Färbungen zu versuchen.

Einschluß je nach der Färbung in Glyceringelatine oder in Harze.

VI. Unterabteilung: GRÜNALGEN - CHLOROPHYCEAE

A. Allgemeines

§ 333. Die Grünalgen umfassen eine sehr große Anzahl von Algen des Süßwassers und des Meeres. Ihnen allen gemeinsam ist das Vorhandensein von Chlorophyll und die dadurch bedingte grüne Farbe. Diese grüne Farbe ist bei wenigen Vertretern durch Hämatochrom verdeckt.

Die Materialbeschaffung stößt auf keine Schwierigkeit, nur die marinen Arten sind nicht immer erhältlich. Grünalgen kommen aber nicht nur im Wasser selbst vor, sondern auch an feuchten Standorten wie Baumrinden, Felsen, faulenden Hutpilzen, moderndem Holz, feuchten Fenstern von Stallungen und Gewächshäusern. Schließlich gibt es eine Reihe von Algen, die parasitisch in Tieren und höheren Pflanzen leben. Man versäume nicht, beim Sammeln auch auf diese Arten zu achten. Genauere Angaben sind der Algenflora von *Lindauer* und anderen floristischen Werken zu entnehmen. Einige diesbezügliche Hinweise werden auch bei den Übungsbeispielen gemacht.

§ 334. Fixierungsvorschriften für Grünalgen.

1. Die Fixierung unter Erhaltung der grünen Farbe wird nach den Vorschriften vorgenommen, wie für Desmidiazeen angegeben.
2. Die farbtreue Fixation des Hämatochroms geschieht mit 4 %iger wässriger Formalinlösung. Dauer der Einwirkung 4-6 Stunden. Die Präparate mit Hämatochrom werden am besten in Kaliumacetatlösung oder Kaliazetatgelatine eingebettet.
3. Chromessigsäure nach *Flemming*.
4. *Pfeiffersches* Gemisch.
5. Doppelfixierung mit Chromsäure und nachfolgendem Sublimat-Eisessig.

Für Meeresalgen wird die Chromessigsäure zweckmäßig mit Meerwasser angesetzt. Siehe § 344 Ziffer 2 und 3.

§ 335. Färbungen von Grünalgen. Für die Färbungen an Grünalgen können nach *Eckert* und nach eigenen Erfahrungen besonders empfohlen werden:

1. Für *Volvocales*: Alizarinviridin, Alizarinzyanin, Kernechtrot, Goldimprägnation mit Nachfärbungen, Hämatoxylin, besonders Hämalaun nach *Mayer*, Alaun-Glycerin-Hämatein nach *Rawitz* und *Delafields* Hämatoxylin. Für die Wabenstruktur basische Anilinfarben, besonders Gentianaviolett.
2. *Protococcales* und *Chaetophorales*: Die unter 1. genannten Färbungen, auch die Gallertfärbung mit Muzikarmin.
3. *Siphonocladiales, Siphonales* und *Heterocontae*: Alle Färbungen wie unter 1. mit Ausnahme der Hämatoxylinfärbungen, ferner Malachitgrün mit Beizung.

B. Ausgewählte Beispiele zur Bearbeitung der Grünalgen

a. Volvox und seine Verwandten

§ 336.

1. Diese Gruppe, auch als Phytomonaden bezeichnet, ist bekannt durch ihre sehr interessanten Vertreter *Volvox, Gonium, Hämatococcus, Stephanosphaera, Chlamydomonas* und andere. Allen gemeinsam ist das Auftreten in Kolonieform. Sie sind stets grün gefärbt durch Chlorophyll, das aber durch das rote Hämatochrom ersetzt oder verdeckt werden kann. *Volvox* wird bis 800µ groß, alle übrigen Arten sind bedeutend kleiner.

Alle Arten sind sehr empfindlich gegen Wasserentzug. Man bettet sie ein in Kaliumacetat, Glycerin oder Zuckerlösungen. Der Einschluß in Venetianer Terpentin ist möglich, wenn auch etwas Glück dazu gehört. In den anderen Medien treten in der Regel starke Schrumpfungen auf.

2. *Volvox* ist in stehenden Gewässern häufig. Bekannt ist das Massenvorkommen in der Binnenalster in Hamburg.

Die Algen bilden kugelförmige Kolonien. Die Zellen sind in der Peripherie der Hohlkugel gelegen und stehen durch Plasmabrücken in gegenseitiger Verbindung. Die ungeschlechtliche Vermehrung erfolgt durch Tochterkolonien, die im Inneren der Kugel entstehen. Geschlechtliche Fortpflanzung erfolgt unter Bildung von Antheridien und Oogonien. Die nach der Befruchtung auftretenden Oosporen sind etwa 75µ groß und braunrot.

Volvox kann nach der Methode von *Strugger* kultiviert werden. Nach *E.Uspanski* und *W.J.Uspanskaja* (95) fehlt den meisten Nährlösungen der für Volvox unumgängliche höhere Eisengehalt. Sie empfehlen folgende Lösung:

Redestilliertes Wasser	100	ccm
KNO3	25	mg
MgSO4	25	mg
Ca(NO3)2	100	mg
KH2PO4	25	mg
K2CO3	34,5	mg
Fe2(SO4)3	1,25	mg

[Man setzt Stammlösungen der Konzentrationen g/liter an; 1 ml einer Stammlösung von 25 g/liter enthält dann 25 mg]

Das Eisen der Nährlösung oder die ganze Nährlösung sind im Sommer alle 10 Tage, im Winter alle 20 Tage zu ersetzen. *Uspanski* berichtet, daß *Volvox globator* in dieser Nährlösung auch geschlechtliche Fortpflanzung zeigte.

Die Lebendbeobachtung von *Volvox* kann nicht genügend empfohlen werden, da sie alles zeigt, was zu sehen ist. Ein wirklich ganz kleiner Tropfen *Lugolscher* Lösung zur Beobachtungsflüssigkeit zugesetzt bringt den Kern sehr deutlich zur Beobachtung.

Volvox kann verschiedentlich auf Dauerpräparate verarbeitet werden. Die Erhaltung der natürlichen Farbe hat genau nach den Vorschriften bei den Desmidiazeen zu erfolgen.

Färbungen. *Eckert* empfiehlt besonders die Goldimprägnation nach Fixierung mit Chromessigsäure. *Chamberlain* empfiehlt die Färbung mit Magdalarot-Anilinblau und den Einschluß in Venetianer Terpentin. Möglich ist auch der Einschluß in Kaliumacetat oder Zuckerlösungen. Die Wabenstruktur wird am besten dargestellt durch die Färbung mit einer basischen Farbe wie Gentianaviolett, Kristallviolett, Toluidinblau, Methylenblau, Malachitgrün. Diese Farben können mit Pikrinsäure, Phosphorwolframsäure oder Phosphormolybdänsäure fixiert werden.

Übersichtsfärbungen können auch mit *Becher*-Färbungen vorgenommen werden. Nach *Chamberlain* kann bei großer Vorsicht und mit einigem Glück *Volvox* in Paraffin und Zelloidin eingebettet und geschnitten werden, wie eine Abbildung in seinem Werke dartut (*Methods in Plants Histology*).

(95) Zeitschrift f. Botanik 1925, S. 273-308, zitiert nach Mikrokosmos XXII, 1928/29, S.196

3. Die übrigen Volvocalen sind viel seltener. Doch findet sich in Weihwasserkesseln auf Friedhöfen oder in Regenpfützen hin und wieder *Haematococcus*. Seltener sind schon die allerdings sehr schönen *Stephanosphaera, Gonium* und *Eudorina.*

Hat man *Haematococcus* gefunden, so kann man durch Übergießen mit Wasser oder dünner hellgelber Erdabkochung die Bildung von Schwärmern erreichen. Nach *Pringsheim* (96) kann

man die Schwärmerbildung entweder auf Agar mit 0,1 % Asparagingehalt oder auf Agar folgender Zusammensetzung erreichen:

Redestilliertes Wasser	100 ccm
Agar-Agar	2 g
KNO3	100 mg
MgSO4	20 mg
K2HPO4	20 mg

Die Aussaaten auf diesen beiden Nährsubstraten sind zuerst grün und verfärben sich dann über braun nach rot, sowie ein Mangel an Stickstoff eintritt. Nach Übergießen mit Wasser tritt dann die Schwärmerbildung ein. Am geeignetsten ist eine neutrale Reaktion der Nährmedien.

Präparation: Wie bei *Volvox*.

(96) Pringsheim, *Beiträge zur Biologie der Pflanzen II*, 1914, S.413

b. Protococcales

§ 337. Von Algen dieser Gruppe suchen wir einige typische Vertreter zu erhalten. Wir besprechen:

1. *Tetraspora*. Die Algen der Gattung *Tetraspora* sind schwierig zu bestimmen. Sie sind jedoch häufig und geben, besonders bei der Darstellung nach dem Niglitin-Verfahren, sehr schöne Präparate. Alle Arten bilden blasige, schwachgrüne Gallertlager, zum Teil festsitzend, zum Teil schwimmend. Die Algen zeichnen sich sehr schön von der Gallerte ab. Die Gallertgeißeln sind allerdings kaum darzustellen.

Fixierung: Chromessigsäure.
Färbung: Alizarinviridin und Einschluß in Niglitin.

2. *Chlorococcum*. *Chlorococcum humilicum* ist überall gemein an den Bäumen, Brettern und Mauern. Es ist mitten in der Großstadt an den Alleebäumen zu finden. Die günstigste Zeit für das Sammeln ist die feuchte Zeit von Herbstende bis Winteranfang. Die Zellen sind klein, das Chromatophor ist glockenförmig.

Fixierung: Formalin, Chromessigsäure, Osmiumsäuredämpfe.
Färbung: Goldimprägnation, Alizarinviridin nach *Becher*.
Einschluß: Glyceringelatine, Caedax.

3. Parasitische Grünalgen sind häufig. Nur werden sie in der Regel nicht erkannt oder übersehen, Am verbreitetsten sind Arten der Gattung *Chlorotrichum*. Bei uns in Mitteleuropa kommen vor:

- *Chlorotrichum bienne* (auch *Endosphaera biennis* genannt) in *Potamogeton luceus* (Laichkraut) und *Sparganum* (Igelkolben).
- *Chl. lemnae* in *Lemna trisurca*. In den Paludarien botanischer Gärten wird man kaum umsonst darnach suchen.
- *Chl. knyanum* in *Elodea canadense* (Wasserpest).
- *Chl. rubrum* in *Mentha aquatica* (Wasserminze) und *Peplis portula* (Gemeiner Sumpfquendel).
- *Chl. lactum* in *Lychnis flos cuculi* (Lichtnelke).
- *Chl. Archerianum* in *Sphagnum*-Arten.
- *Chl. viride* in *Rumex obtusifoliu*s (Sauerampfer)

Ebenfalls parasitär ist *Phyllobium dimorphum*, das in den Blattrippen *von Lysimachia numularia* und *Ajuga reptens* kleine knollige Auftreibungen hervorruft. Man suche im Sommer und Herbst. Die parasitischen Algen werden bis 400µ groß. Wenn man eine Lupe zu Hilfe nimmt, verraten sich die Algen in der Regel durch rote Punkte oder Anschwellungen an Blättern und Stengeln.

Totalpräparate sind wenig lohnend. Man wird Schnitte durch die befallenen Teile anfertigen.

Färbung der Schnitte: Safranin, *Delafields* Hämatoxylin, *Becher*-Farben mit Nachfärbung mit Säurefuchsin, Vierfachfärbung nach *Johannsen*, Goldimprägnation, Jodeosin-Lichtgrün.

4. *Pleurococcus* kommt an denselben Orten vor wie *Chlorococcum*. Selbst auf faulenden Hutpilzen ist es zu finden. Sehr häufig sind Teilungszustände. Der Chloroplast ist plattenförmig. Die Algen sind ohne Gallerte.

Darstellung: Goldimprägnation und sonst wie *Chlorococcum*.

5. *Pediastrum*. Die Gattung *Pediastrum* weist vielgestaltige, nicht leicht zu bestimmende Arten auf, die aber sehr schöne Präparate ergeben. Sie sind alle klein und bilden scheibenförmige Kolonien. Ganz kleine Formen können nach der Methode von *Yamanouchi* wie folgt dargestellt werden.

1. Die Algen werden lebend in einem kleinen Tropfen von destilliertem Wasser auf einen blank geputzten Objektträger verbracht.
2. Fixieren mit Osmiumsäuredämpfen und staubfrei antrocknen lassen.
3. Färben mit alkoholischer Safraninlösung während 4 Tagen.
4. Auswaschen in Wasser für 5 Minuten.
5. Färben in wässerigem Gentianaviolett 2 Tage.
6. Auswaschen in Wasser, etwa 5-10 Sekunden.
7. Färben mit wässriger Orange-G-Lösung, 3 Minuten.
8. 96% iger Alkohol, etwa 5 Sekunden.
9. Absoluter Alkohol 1 Minute.
10. Nelkenöl, je nach Algenspezies bis 6 Stunden. Das Nelkenöl differenziert die Färbung, was jedoch im Mikroskop überwacht werden muß.
11. Xylol 5 Minuten.
12. 12. Caedax

Man vergleiche auch die doch schonendere Verarbeitung kleiner Objekte im hängenden Tropfen nach § 16 und §§ 62-64. *Eckert* empfiehlt besonders Goldimprägnation.

6. *Hydrodictyon*, das Wassernetz, ist ein begehrtes Untersuchungsobjekt. Die Kolonie bildet ein großmaschiges, schlauchartiges Netz. Die Größe des Netzes schwankt zwischen 10 und 60 cm.

Präparation: Wie bei *Volvox*. Einschluß in Harzen.

7. *Chlorella*. Diese Alge ist in der Wahl des Standortes nicht wählerisch. Wir finden Arten in der Vorratsflasche für destilliertes Wasser, in Aquarien, in Symbiose mit Tieren (*Hydra*), im Saftfluß der Bäume usw. Der Chloroplast ist glockenförmig. Die Alge ist von Gallerte umgeben.

Präparation: Wie bei *Tetraspora.*

8. *Protosiphon botryoides* finden wir als millimetergroße Kügelchen an feuchten Teichrändern und mit Vorliebe in verlassenen Ziegeleien. Die Kugel ist mit einem fädigen, verzweigten Rhizomteil im Schlamm befestigt, der nur mit größter Geduld und Geschicklichkeit nach Fixierung mit Formalin unter dem Binokular freizulegen ist. *Protosiphon* enthält viele Zellkerne. Die

Vermehrung erfolgt durch Zystenbildung oder Teilung in 4-16 Tochterzellen. Die Alge ist häufig. Sie kann leicht zu Hause auf Schlamm in flachen Schalen gehalten werden.

Wir fertigen Schnitte an nach Einbettung in Zelloidin, die wir senkrecht, d.h. in der Richtung des Rhizoms anlegen.

Fixierung: Formalin, Chromessigsäure nach *Flemming*.
Färbung: Alaun-Glycerin-Hämatein nach *Rawitz*.
Eisenhämatoxylin nach *Häggqvist*.
Säurefuchsin, Magdalarot-Anilinblau
und die anderen ähnlichen Färbungen.

Für Totalpräparate ist die Alge zu groß.

c. Chaetophorales (Conferven)

§ 338. Von der Gruppe der *Chaetophoralen* besprechen wir folgende Arten:

1. *Ulothrix* hat Arten im Meere, besonders zahlreich aber im süßen Wasser. *Ulothrix* bildet rein grüne, unverzweigte Fäden. Der Chloroplast ist breit bandförmig oder gürtelförmig. Im Süßwasser ist *Ulothrix zonata* häufig, die bis 30 cm lange flutende Lager bildet.

Präparation wie die anderer Grünalgen, insbesondere Goldimprägnation und Alizarinviridin nach *Becher*.
Einschluß: Glyceringelatine und Harze

2. *Ulva lactuca* ist in Nord- und Ostsee das ganze Jahr über häufig und wird oft an Land gespült. *Ulva* ist allen als Meersalat bekannt, die sich, wenn auch nur kurz, an der Waterkant aufgehalten haben. Der Thallus besteht aus zwei Zellschichten. Die Randpartien des Thallus bilden Schwärmzellen, deshalb sind die Randzellen oft entleert. Wir fertigen Totalpräparate und nach Einbettung auch Querschnitte durch den Thallus an.

Färbung: *Becher*-Farben, Nachfärbung mit Lichtgrün, Magdalarot-Anilinblau anderen ähnlichen Verfahren, Goldimprägnation, Imprägnation mit Schwefelblei.

3. *Enteromorpha* kommt in Nord- und Ostsee, und zwar an den Küsten, in großen Massen vor. Hier ist es vor allem *Enteromorpha compressa*. *E. intestinalis* kommt auch im Süßwasser vor, und ich fand diese Art einmal in einem Bache in den Allgäuer Alpen.

Präparation: Wie bei *Ulva*.

4. *Trentepohlia* bildet verzweigte Fäden mit reichlich Hämatochrom. Fast immer kommen kugelige Gametangien vor. Es gibt mehrere Arten, von denen *Tr. aurea* oder *iolithius* häufiger anzutreffen sind.

Fixierung: Formalin und Einbetten in Glyceringelatine oder Kaliumacetat. Chromessigsäure mit nachfolgender Alkoholbehandlung zur Entfernung des Hämatochroms.
Färbung: Färbung mit *Becher*-Farben, Goldimprägnation und *Pfeifferschen* Eisenbeizungen.

5. *Oedogonium*. Diese Gattung weist zahlreiche, systematisch schwierig zu behandelnde Arten auf. Über die sehr interessante komplizierte Fortpflanzung sei auf die Literatur (*Oltmann*) hingewiesen. Der Chloroplast ist netzartig gelappt. Bei der Vermehrung treten Zoosporen auf. Bei der geschlechtlichen Vermehrung werden Oogonien und Antheridien gebildet. Antheridien bilden sich oft an den sogenannten Zwergmännchen. Nach der Befruchtung bilden sich rotgefärbte Zygoten mit verdickter Membran.

Alle Vertreter der *Oedogonium*-Gruppe sind kleine Algen, die aufgesucht werden wollen. Sie sind jedoch häufiger, als man anzunehmen geneigt ist, wenn man einige Zeit umsonst nach ihnen gesucht hat. Sie kommen hauptsächlich im fließenden Wasser kleiner Gräben vor. Übertragung in stilles Wasser, also die Anlage einer Rohkultur, löst fast immer die Bildung der Zoosporen und auch die Oedogonium-Bildung aus. Nährsalzlösungen verhindern jedoch die Erzeugung der Sexualorgane.

Oedogonium undulatum ist nicht selten. Ebenso *Oed. borsinianum*. Man beachte kleine grüne Anflüge in Gräben.

Fixierung: *Pfeiffer* und Chromessigsäure nach *Flemming*.
Färbung und Darstellung: Am besten ist Goldimprägnation nach *Eckert* sowie Alizarinviridin nach *Becher*. Auch Anthrazenblau ist brauchbar.

Weiterhin können Oedogonien nach *Chamberlain* mit Eisenhämatoxylin nach Chromsäurefixierung gefärbt werden, was besonders vorteilhaft die Antheridien, die Zellkerne und die Pyrenoide darstellt.

Färbt man mit Anilinblau, so werden besser die Membranen und der andere Zellinhalt gefärbt.
Einschluß: Entweder in Glyceringelatine, in Lävulosegelatine nach *Heringa* und *ten Berge* oder in Venetianer Terpentin.

d. Siphonocladiales

§ 339. Die *Siphonocladialen* haben viele Kerne in ihren Zellen. Meist sind es reich verzweigte Formen.

1. *Cladophora*. Arten der Gattung *Cladophora* sind leicht erhältlich. Im Meere kommen vor: *Cl. rupestris, Cl. sericea* und *Cl. lanosa.* Alle diese Arten sind häufig. Ebenso häufig ist im Süßwasser *Cl. glomerata*, die gut durchlüftetes Wasser bevorzugt und daher an Wasserwehren, in Gebirgsbächen, an Seeufern vorkommt. Der Thallus ist büschelförmig und reich verzweigt. An kleinen Steinen festgewachsene *Cladophora* ist sehr geeignet, für uns als Versuchskaninchen zu dienen, da sie einige Zeit zu Hause aushält.

Legen wir am Abend frisch heimgetragene *Cladophora* in flache Schalen mit nur 1 cm Wasserhöhe, so werden häufig nach 1-2 Tagen Schwärmsporen gebildet. Die oberen Zellen werden zu Sporangien.

Fixierung: Osmiumsäuredämpfe für Schwärmsporen (Einschluß in Gelatine, in Glycerin oder Kaliumacetat).

Für ungeleerte Sporangien und vegetative Fäden: Chromessigsäure, Pikrinsäure, auch *Lugolsche* Lösung mit nachfolgendem Formalin.
Färbung: *Becher*-Farben, Goldimprägnation, Magdalarot, Azokarmin B, Säurefuchsin.
Einschluß: Glyceringelatine, Venetianer Terpentin, Caedax.

Hierher gehören einige sehr interessante, aber in der Regel sehr schwer erreichbare Formen wie *Dasycladus, Acetabularia* und *Sphaeroplea*. Der Leser sollte nicht unversucht lassen, sich diese lohnenden Untersuchungsobjekte gelegentlich doch zu beschaffen.

2. *Dasycladus claviformis* ist eine häufige, bis 5 cm lange Alge des Mittelländischen Meeres. Die Alge ist manchmal von Lehrmittelhandlungen oder botanischen Instituten zu erhalten.

Dasycladus ist stark mit Kalk inkrustiert. Der Thallus ist dunkelgrün, keulenförmig und so von sparrigen Seitenästchen besetzt, daß er einer Bürste ähnelt. Den Seitenästchen entspringen auch wieder Wirtelastzellen und zahlreichen Sporangien.

Schnitte durch den Hauptstamm zeigen an den Wirtelästen erster Ordnung Tüpfelkanäle von diesen in die Hauptstämme. Der Hauptstamm weist keine Zellwände auf.

3. *Acetabularia* ist ebenfalls eine Alge des Mittelländischen Meeres. Die Alge wird bis 10 cm hoch. Sie gleicht einem kleinen Blätterpilz. Gleich *Dasycladus* ist die Kalkinkrustation reichlich.

An jugendlichen Schirmen sind zahlreiche Haartriebe in pinselförmiger Anordnung zu sehen. An der Basis der sterilen Haartriebe entwickeln sich die fertilen Gametangienschirme, während die sterilen Wirtel verschwinden. In den einzelnen Teilen der pilzähnlichen Gametangienscheibe entwickeln sich zahlreiche Cysten (Aplanosporen).

Die Fixierung der Meeresalgen hat man meistens nicht in der Hand. Gewöhnlich erhält man sogenanntes Alkoholmaterial oder formolfixierte Exemplare.

Schnitte (Paraffin, Zelloidin) färbt man mit *Becher*-Farben oder Goldimprägnation, Schwefelbleiimprägnation und Nachfärbung mit Lichtgrün oder Anilinblau. Wie *Acetabularia* wird auch *Dasycladus* behandelt.

4. *Sphaeroplea* ist eine Fadenalge des Süßwassers. Leider ist sie ziemlich selten. Sie bildet hellgrüne Watten im zeitigen Frühjahr. Seichte Tümpel werden von ihr bevorzugt. Die Alge schwimmt frei umher wie *Spirogya*. Aus den vegetativen Fäden entstehen ohne äußerlich erkennbare Ursachen und ohne äußere Veränderung Antheridien und Oogonien.

Fixierung: Chromessigsäure oder *Pfeiffer*.
Färbung: Goldimprägnation, Kernschwarz

e. Siphonales und Heterocontae

§ 340. Die *Siphonales* weisen einen fädigen, reichlich verzweigten Thallus auf, der meistens ohne Querwände ist. Sie finden sich im Meere und im Süßwasser. Wir besprechen:

1. *Bryopsis plumosa*, der grüne Federtang, findet sich in der Ostsee und bei Helgoland sowie im Mittelländischen Meere. Er wird bis 10 cm lang. Die Fiederästchen bilden sich direkt in Gametangien um.

2. *Halimeda* und *Codium* sind große Algen des Mittelländischen Meeres. Beide haben ein bizarres Aussehen. *Halimeda* hat Ähnlichkeit mit einem Opuntienkaktus. Aus den einzelnen Gliedern sprossen die Sporangienstände büschelweise hervor. *Codium* besteht aus Büscheln stielrunder, dunkelgrüner und wurmähnlicher Thalli. Die Gametangien treten einzeln an den Rindenschläuchen auf.

Von *Halimeda* und *Codium* fertigen wir Schnitte durch die Thalli und die Sporangien an.

Fixierung: Chromessigsäure, Formalin.
Färbung: Alizarinviridin nach *Becher*, Goldimprägnation, Goldimprägnation-Lichtgrün, Imprägnation mit Schwefelblei.

3. *Vaucheria*. Die Arten der Gattung *Vaucheria* kommen reichlich im Süßwasser vor, aber auch auf feuchter Erde, so an Wegrändern, auf nassen Äckern usw. Es kommen viele Arten vor, die sich nur bestimmen lassen, wenn die Antheridien und Oogonien bekannt sind. Die Zellschläuche sind mit Plasma erfüllt, das zahlreiche kleine Chlorophyllkörper und kleine Kerne enthält.

Die ungeschlechtliche Fortpflanzung geschieht durch die Bildung von großen Zoosporen. Diese Zoosporen kann man jederzeit erhalten, wenn man

1. die mehrere Tage feucht gehaltene Alge (z. B. von Wegränder) mit Wasser übergießt,
2. Kulturen in 0,2 %igen Nährlösungen einige Tage dunkel hält.

Die Fadenenden färben sich dann dunkel und bilden sich in Sporangien um. Bald schwärmen die Sporen aus.

Präparation der Schwärmsporen:

1. Fixierung mit Osmiumsäuredämpfen und Färbung mit Karmin- Lichtgrün.
2. Fixierung kurz mit Osmiumsäuredämpfen und Einschluß in Kaliumacetat oder Glyceringelatine nach *Kaiser* oder Lävulose-Gelatine nach *Heringa* und *ten Berge*.
3. Fixierung mit Chromessigsäure und Färbung mit Alizarinviridin oder Goldimprägnation.
4. *Chamberlain* empfiehlt Färbung mit Magdalarot und leichte Nachfärbung mit Anilinblau. Einschluß in Venetianer Terpentin.
5. Schnitte durch die Sporangien färbt man mit Safranin-Gentianaviolett-Orange G.

Die geschlechtliche Fortpflanzung. Die Geschlechtsorgane von *Vaucheria* sind so oft und so ausführlich beschrieben worden, daß hier auf die Literatur verwiesen werden kann. Die Kulturen bilden die Geschlechtsorgane, wenn man sie in 2-4 %ige Rohrzuckerlösung bringt und dem Licht aussetzt.

Die erdbewohnenden *Vaucheria*-Formen lassen sich in folgender Weise zur Fruktifikation bringen: Man bringt sie samt der Unterlage in Petrischalen, schneidet sie kurz ab und bedeckt sie mit Wasser (Leitungswasser, Flußwasser). Nach 8 Tagen gießt man so viel Wasser ab, daß nur noch der Boden, nicht aber die Algen mit Wasser bedeckt ist, worauf nach einigen Tagen Fruktifikation eintritt (nach *Straßburger*). Zum Fixieren kann man das Wasser abgießen und über die ganze Kultur Chromessigsäurelösung gießen.

Die einzelnen fruktifizierenden Äste schneidet man unter Benützung des Binokulars mit kleiner Schere ab. Es ist unmöglich, einen *Vaucheria*-Rasen mit Nadeln zu entwirren. Die Algenfäden nehmen dabei zu viel Schaden.

Untersuchungstechnik: Wie bei den Zoosporen.

§ 341. Die zu den *Heterocontae* gehörenden Algen sind sehr klein und dürften im allgemeinen nur Zufallsfunde abgeben. Eine Ausnahme macht allein *Botrydium*.

Botrydium granulatum bildet schwärzlichgrüne Blasen von ungefähr 1-2 mm Durchmesser. Die Alge kommt an denselben Orten vor wie *Protosyphon botryoides*, mit dem sie oft verwechselt wird. Dauersporen werden in den Rhizoiden gebildet. Zoosporen bilden sich zahlreich in der oberirdischen Zellblase. Sie treten durch eine Öffnung am Scheitel aus.

Untersuchungstechnik wie bei *Protosyphon*.

§ 342. Schlußbemerkung zur Präparation der Grünalgen. Die Grünalgen sind besonders gegen Wasserentzug sehr empfindlich. Das Überführen in Glycerin hat durch langsames Eindicken stattzufinden. Ebenso langsam muß in Harz überführt werden, nachdem das Glycerin durch Isopropanol entfernt worden ist.

Ganz besondere Vorsicht verlangen die *Vaucheria*-Arten. Hier verbürgt ein langsames staubfreies Eindicken in einem Exsikkator den befriedigenden Arbeitsabschluß.

VII. Unterabteilung: BRAUNALGEN - PHAEOPHYCEAE

A. Allgemeines

§ 343. Die Braunalgen kommen fast alle im Meere vor. Im Süßwasser finden sich Braunalgen nur ausnahmsweise wie *Pleurocladia lacustris*, die an Wasserpflanzen, Steinen usw. für die Gegenden um Berlin und um Plön nachgewiesen werden konnte.

Zu den Braunalgen gehören Algen sehr ungleicher Organisation. Allen gemeinsam sind die gelb oder braun gefärbten Chromatophoren. Die Färbung wird hervorgerufen durch die Farbstoffe Fucoxanthin, Karotin und Xanthophyll.

Für den Binnenländer ist die Materialbeschaffung mit Schwierigkeiten verbunden. Wer es ermöglichen kann, besuche einmal die Inseln Helgoland und Baltrum, bei welcher Gelegenheit genügend Material gesammelt werden kann. Als literarische Ausrüstung für eine solche Sammeltour empfehle ich auf das wärmste: *Dr.P.Kuckuck, Der Strandwanderer, München,*

J.F.Lehmanns Verlag, l933. Man kann mit dem Büchlein auch Fischern zeigen, was man mit ihrer Hilfe zu erhalten hofft. Eine sehr große Zahl von Arten sind schon am Strand bei Ebbe erreichbar. Tiefer wachsende Arten können vielfach von einem Kahn aus mit einem Rechen erreicht werden.

Wer keine Reise nach der Wasserkante unternehmen kann, ist wie bei allem Material auf Tausch, Bezug durch biologische Stationen oder Lehrmittelhandlungen angewiesen.

§ 344. Fixierung von Braunalgen. Die Fixiermittel müsssen alle mit Meerwasser angesetzt werden. Auch zum Auswaschen zunächst Meerwasser verwenden. Dazu kann man zu Hause künstliches Meerwasser verwenden, das leicht selbst herstellbar ist.

Meersalz ist in Drogerien [und Aquarienhandlungen!]käuflich. Man löst es in der erforderlichen Menge in Leitungswasser auf.

Salzgehalt pro 1 Liter:

Ostsee	11 g
Nordsee	33 g
Mittelmeer	26-48 g

Ist Seesalz gerade nicht käuflich, so mischt man:

Natriumchlorid	27,2 g
Magnesiumchlorid	3,8 g
Magnesiumsulfat	1,6 g

Von dieser Mischung löst man die entsprechende Menge in einem Liter Wasser auf, und man hat das künstliche Meerwasser zum Auswaschen der Fixiermittel. Beim weiteren Wässern verringert man den Salzgehalt stufenweise, bis man bei reinem Wasser angelangt ist. Dadurch vermeidet man Schrumpfungen und sonstige Deformationen bei den Objekten.

Das etwa nötige Entkalken nimmt man nach dem Auswaschen des Meerwassers vor.

Als Fixiermittel nimmt man:

1. Meerwasser-Formalin nach *Migula* (97)

Meerwasser	100 ccm
Formol 40 %ig	50 ccm

Die Dauer der Einwirkung ist bei derben Formen 2-3 Stunden, bei zarteren Formen nur l/2 Stunde.

Zur Aufbewahrung kann man folgende Mischung verwenden:

Meerwasser	200 ccm
Glycerin	10 ccm mit einigen Tropfen Karbol.

Hierin halten sich die Algen monatelang. Man kann natürlich die Algen auch auswaschen und nach Ubertragung in destilliertes Wasser in der *Straßburgerschen* Aufbewahrungsflüssigkeit aufbewahren.

(97) D.W.Migula, *Meeresalgen u. Armleuchtergewächse*, Stuttgart, Franckh'sche Verlagshandlung, S.1, 1922

2. Chromessigsäure für derbe Formen. *Eckert* empfiehlt:

Meerwasser	150 ccm
Eisessig	5 ccm
Chromsäure	0,7 g

Die Chromessigsäure hat so lange einzuwirken, bis die Algen gebleicht sind. Dies dauert unter Umständen einige Tage.

3. Chromessigsäure für zartere Formen.

a) *Ulbrich* empfiehlt:

Meerwasser	100 ccm
Essigsäure	1 ccm
Chromsäure	0,3 g

b) *Straßburger* gibt an:

Meerwasser	400 ccm
Eisessig	0,04 ccm
Chromsäure	1 g

Dauer der Fixierung 12-24 Stunden. Auswaschen in Meerwasser für 3 Stunden, hieraus Überführen in destilliertes Wasser.

4. Jodwasser für zarte Formen. Zu Meerwasser wird so viel *Lugolsche* Lösung gegeben, daß das Meerwasser hellgelb erscheint. Dauer der Fixierung eine Minute.

Auswaschen mit Meerwasser. Behandeln mit 5 %iger Natriumthiosulfatlösung, stufenweise Überführung in destilliertes Wasser.

Bemerkung: Alle Fixiermittel, die Alkohol enthalten, können für Meeresalgen nicht verwendet werden!

§ 345. Einbetten und Schneiden. Manche Objekte lassen sich recht gut uneingebettet schneiden. Zum Einbetten kann man verwenden

- Paraffin
- Zelloidin
- Gummi arabicum
- Cellosol.

Cellosol wurde von *Eckert* speziell für das Einbetten und Schneiden von *Fucus* entwickelt, es ist ein zelloidinartiger Stoff. Cellosol löst sich entweder in Dioxan oder in dem "Cellosollösungsmittel nach *Hollborn*".

Die einzubettenden Objekte wandern, wie bei Zelloidin, durch drei Stufen:

1. Die Objekte kommen aus Isopropanol in reines Cellosollösungsmittel.
2. Cellosol 1:3 gelöst für 2-3 Tage
3. Cellosol 1:1 gelöst für 8 Tage
4. Eindicken unter Staubschutz an der Luft für 2-4 Tage.

Gehärtet wird der Cellosolblock nicht. Aus Stabilitätsgründen wird er mit einem Paraffinmantel umgeben und dann geschnitten. Die Schnittdicke ist bis 70µ.

§ 346. Das Färben von Braunalgen

A. Morphologische Präparate

Kleinere Algen können gut *in toto* gefärbt werden. Bei manchen ist Bleichen notwendig bevor man färben kann. Angewendet werden:

1. Magdalarot-Ainilinblau und ähnliche Färbungen.
2. Azokarmin B.
3. Alizarinviridin und andere *Becher*-Farben.
4. Goldimprägnation mit und ohne Nachfärbung mit Lichtgrün.
5. Kernschwarz

Einschließen je nach Verträglichkeit der Farben in Glyceringelatine, Venetianer Terpentin und Caedax.

B. Zytologische Färbungen an Schnitten

1. Stückfärbungen mit Karmin und Hämatoxylinfärbungen, eventuell mit Nachfärbungen komplementärer saurer Farben.
2. Schnittfärbungen mit Alizarinviridin oder Anthrazenblau.
3. Eisenhämatoxylin nach *Heidenhain* und *Häggqvist* mit Nachfärbungen von Säurefuchsin.
4. Goldimprägnation.

C. Differenzierte Färbung der Fortpflanzungsorgane

Eckert und *Dohrer* (98) haben die Kombinationsfärbungen mit zwei sauren Farben für die Bedürfnisse der Algenfärbung weiter ausgebaut. Nähere Schilderung der Vorschriften siehe § 174 und § 175. Die Färbungen erfolgen an ziemlich dicken Schnitten, und zwar von 50-70µ.

Für Paraffinschnitte sind geeignet: Jodeosin-Anilinblau und Jodeosin-Lichtgrün.

Für alle anderen Schnitte können außer den eben genannten alle im § 175 aufgeführten Färbungen angewendet werden.

(98) Eckert-Dohrer, Mikrokosmos XXX, l936/37, S.92

B. Ausgewählte Beispiele zur Bearbeitung der Braunalgen

§ 347. Die angeführten Beispiele umfassen Arten, die in der Ostsee und in der Nordsee häufig vorkommen.

I. Morphologische Präparate

Die kleineren Formen wie *Ectocarpus, Pilayella und Sorocarpus* können *in toto* gefärbt und eingeschlossen werden. Zum Färben können einige Anilinfarben wie Bismarckbraun oder Malachitgrün Verwendung finden (Beizen!). Ferner empfehlen sich die *Becher*-Farben, besonders, wie immer, Alizarinviridin. Eingeschlossen wird entweder in Gelatine, Venetianer Terpentin oder Caedax. (siehe auch § 346)

Von den größeren Formen fertigt man Schnitte durch die Thalli an. Zu sehen ist der Aufbau des Thallus aus den verschiedenen Schichten, der Aufbau der Schwimmorgane usw. Hier färbt man mit Karmin (Stückfärbungen), Hämalaun, Alaun-Glycerin-Hämatein nach *Rawitz* und mit *Becher*-Farben.

Zu studieren ist der Aufbau der vegetativen Organe bei *Fucus serratus, F. vesicolosus,* dann aber auch bei *Cystosira, Dictyota, Laminaria* und *Chorda*.

§ 348.

II. Präparate zur Fortpflanzung.

Das Interessanteste an den Braunalgen sind die Fortpflanzungsorgane. Diese finden sich entweder außen und ungeschützt am Thallus oder in eigenen Aushöhlungen, den Konzeptakeln.

Fortpflanzungsorgane außen am Thallus. Hierher gehören folgende Formen:

l. *Ectocarpus*. Die Gattung *Ectocarpus* bevölkert die nördlichen Meere in großer Arten- und Individuenzahl. *Ectocarpus siliculosus* ist an den deutschen Küsten häufig. Der Tang erinnert im vegetativen Aufbau an eine *Cladophora*. Die Sporangien sind bei *Ectocarpus siliculosus* einfächerig oder mehrfächerig.

> Färbungen: Magdalarot-Anilinblau und ähnliche Färbungen, Goldimprägnation, Lichtgrün, *Becher*-Farben, Kernschwarz-Echtgrün

2. *Pilayella litoralis* ist oft ohne Lupe von *Ectocarpus* kaum zu unterscheiden. Findet sich das ganze Jahr hindurch.

> Färbungen : Wie bei *Ectocarpus*

3. *Sphacelaria* kommt in mehreren Arten in der Nordsee (Helgoland) und Ostsee vor. Dieser Tang bildet kleine Rasen von l-5 cm Höhe. Die Alge kommt das ganze Jahr hindurch vor. Charakteristisch ist eine große Scheitelzelle, in der fast immer Mitosen aufzufinden sind, da das Wachstum sehr stark ist.

> Fixierung: Schwache *Flemmingsche* Mischung.
> Färbung: Eisenhämatoxylin oder Alaun-Glycerin-Hämatein nach *Rawitz*, Nachfärbung von Orange G oder Eosin. Ferner Färbung mit Magdalarot-Anilinblau.

4. *Cutleria multifida* ist eine Alge der Nordsee. Das Lager ist aufrecht, bis 20 cm hoch, fächerförmig ausgebreitet und zerschlissen. Die Pflanze ähnelt mancher Strauchflechte. Diese Form der Pflanze trägt die Gametangien außen am Thallus. Die Antheridien und Oogonien stehen aber dabei auf verschiedenen Pflanzen.

Von *Cutleria multifida* existiert noch eine zweite Form, welche die Sporangien trägt, also den Sporophyten darstellt. Diese Form ist so verschieden von der ersten, daß sie als *Aglaozonia* beschrieben und für eine andere Art gehalten worden ist. Sie ist dorsiventral gebaut, ausgebreitet, lappig und hat mehrere Zentimeter im Durchmesser. Die Sporangien sind auf der Oberseite.

> Fixierung: Chromessigsäure.
> Färbung: Schnittfärbung mit Eisenhämatoxylin oder *Becher*-Farben.

5. *Laminaria*. Die Arten der Gattung *Laminaria* bewohnen hauptsächlich die arktischen Meere. In deutschen Meeren kommen drei Arten vor*: Laminaria saccharina, L. digitata* und *L. cloustoni*.

Laminaria digitata ist nicht selten und kommt auf Riffen vor, die bei Ebbe frei werden. *Laminaria* ist eine Alge mit Generationswechsel. Der Thallus ist ein großes gestieltes Blatt, das vielfach Längsrisse aufweist. Diese allbekannte Form stellt den Sporophyten dar. Der sporentragende Teil, der Sorus, ist an der dunkleren Färbung bereits mit unbewaffnetem Auge erkennbar. Bei *L. saccharina* durchzieht der Sorus das Blatt bandartig. Bei den anderen Arten sind die Sori fleckartig verteilt.

Wir fertigen Längs- und Querschnitte durch das Blatt und die Sori an.

Färbung: Paraffinschnitte: Jodeosin-Anilinblau, Jodeosin-Lichtgrün. Zelloidinschnitte und Freihandschnitte außer den oben genannten noch Magdalarot-Anilinblau und die anderen weiteren Kombinationen. (siehe § 175).

Die Sporangien werden in der äußersten Rindenschicht gebildet und sind von einer Schleimkappe eingehüllt. Blatt und Stiel der *Laminaria* haben richtige verschiedene Gewebe. Man kann Mark und Rindenschicht unterscheiden.

Der Gametophyt der Laminarien wurde verschiedentlich durch Kultur aus den Sporen erzielt. Es gibt weibliche und männliche Gametophyten, die nur aus wenigen Zellen bestehen. Wegen des näheren darüber muß auf *Oltmann* verwiesen werden. Die Gametophyten der Laminarien dürften bis jetzt nur wenige Botaniker gesehen haben.

6. *Chorda filum* ist ebenfalls eine *Laminaria*-Art. Der Thallus ist bis 5 mm dick, drehrund und bis 3 m lang. Die Alge ist in der Nord- und Ostsee häufig.

Der untere Teil des Thallus ist steril. Die Sori bilden sich an dichten Ständen im oberen Teil des Thallus und bedecken zuletzt den ganzen Sproß. An Querschnitten sieht man zwischen den Sori das sogenannte Assimilationsgewebe.

Untersuchungstechnik: Wie bei *Laminaria*

Fortpflanzungsorgane in Vertiefungen des Thallus. Hierher gehören die höchst entwickelten Braunalgen, die *Fucales*. Die Fortpflanzung ist eine geschlechtliche. Die Antheridien und Oogonien befinden sich in den Konzeptakeln. Diese Konzeptakeln sind flaschenförmige Hohlräume im Thallus mit enger Öffnung nach außen.

Die *Fucales* sind sehr stattliche Algen, sie werden bis zu 2 m lang. Untersuchungsmaterial ist im allgemeinen leicht zu erlangen. Die Algen kommen in der Brandungszone vor und werden häufig an den Strand gespült.

7. *Fucus* ist der typische Hauptvertreter der Familie. *Fucus vesiculosus* weist Schwimmblasen auf. Die Alge ist zweihäusig. Die Konzeptakeln sind in besonderen Ständen vereinigt, welche Fruchtkörper genannt werden. Über das ganze Laub zerstreut sind Haargruben oder Fasergrübchen, die wie die Konzeptakeln gebaut sind, aber steril bleiben.

Wir fertigen Querschnitte an durch den Thallus einschließlich der Rippe, durch Thallusteile mit den Haargruben und durch Fruchtkörper mit Konzeptakeln.

Fixierung: Formalin, Chromessigsäure.
Einbettung: Zelloidin, Cellosol und Paraffin. Man bettet von den Konzeptakeln kleinere Stücke ein, nicht ganze Querschnitte. *Fucus* ist gut in Paraffin schneidbar.
Färbung: Kernfärbungen mit Eisenhämatoxylin oder Safranin-Gentianaviolett-Lichtgrün. Doppelfärbung der Sexualzellen nach *Eckert-Dohrer*. Vergleiche § 174, § 175.

Zu sehen ist an Thallusquerschnitten die differenzierte Rinden- und Hyphenschicht. Die Rindenschicht besteht aus annähernd isodiametrischen Zellen. Die langgestreckten Hyphen sind die zugfesten Elemente, die aber auch als Leitungsbahnen Dienst tun. Sie umschließen zahlreiche Markzellen, besonders in der Rippe.

Die Konzeptakeln zeigen je nach Geschlecht Antheridien oder Oogonien. Einzelheiten an den Sexualorganen können nur an sehr dünnen Paraffinschnitten mit Eisenhämatoxylinfärbung studiert werden. Diese Untersuchungen sind technisch sehr schwierig und setzen einwandfrei fixiertes Material voraus.

8. *Ascophyllum nodosum*, der Knotentang der Nordsee, hat gestielte ockergelbe Fruchtkörper.

9. Bei *Himanthalia* entspringen einem bodenständigen becherförmigen Gebilde riemenförmige Thalli, die Fruchtkörper darstellen; sie tragen die Fortpflanzungsorgane.

10. *Halydris* endlich hat zwittrige Fruchtkörper, die schotenförmig sind und an der Spitze der oberen Zweige stehen. Untersuchungstechnik: Wie bei *Fucus* und *Laminaria*.

VIII. Unterabteilung: ROTALGEN - RHODOPHYCEAE (FLORIDEEN)

A. Allgemeines

§ 349. Die Rotalgen oder Florideen sind eine Gruppe von Algen, die sehr verschieden im äußeren Aufbau und dazu von hoher Organisationsstufe sind. Allen gemeinsam ist ein roter Farbstoff, der aus Phykoerythrin, Karotin und manchmal auch aus Phykozyan besteht und der das stets vorhandene Chlorophyll oft vollständig verdeckt.

Das zweite einende Band ist die Fortpflanzungsweise. Die Fortpflanzung geschieht entweder ungeschlechtlich durch Sporen oder geschlechtlich durch einen sehr komplizierten Sexualakt, als dessen Ergebnis eine eigenartige Kapselfrucht, das Cystokarp, auftritt.

Weitaus die meisten Florideen kommen im Meere vor, nur eine sehr kleine Anzahl bewohnt das Süßwasser.

Die Besprechung der Präparationstechnik und der Übungsbeispiele erfolgt aus Zweckmäßigkeitsgründen für die Formen des Süßwassers und des Meeres getrennt.

§ 350. Fixierung der Rotalgen.

A. Süßwasserformen.

1. Chromsäure nach *Ulbrich* in folgender Zusammensetzung:

Destilliertes Wasser	100 ccm
Eisessig	1 ccm
Chromsäure	0,5 g

Besonders geeignet für *Batrachospermum*.

2. Chromessigsäure nach *Flemming* (siehe § 39) wird von *Eckert* für die anderen Süßwasserflorideen angeraten.

3. *Pfeiffer*.

4. Die farbtreue Fixation mit Formol-Kupferlactophenol.

§ 351.

B. Meeresflorideen.

1. Nach *Chamberlain* fixiert ausgezeichnet:

Meerwasser	100 ccm
Formol des Handels	10 cm.

Darin können auch die fixierten Objekte lange Zeit aufbewahrt werden. Besonders für Totalpräparate von kleinen Arten.

2. Für die Anfertigung von Schnitten empfiehlt *Chamberlain*:

Meerwasser	400 ccm
Eisessig	0,4 ccm
Chromsäure	l g

Will man Kernteilungsfiguren fixieren, so muß man noch so viel Osmiumsäure zugeben, daß die angewendete Menge des Fixiermittels 1% Osmiumsäure enthält. Dauer der Einwirkung 24-48 Stunden und dann anschließend Auswaschen in Meerwasser. Sonst weiterbehandeln wie bei den Braunalgen geschildert.

3. Nach *Eckert-Dohrer* verwendet man zweckmäßig für die Florideen folgende Vorschrift:

Meerwasser	150 ccm
Eisessig	5 ccm
Chromsäure	0,7 g

4. *Straßburger* empfiehlt für zytologische Studien das schwächere *Flemmingsche* Gemisch.

5. Mit Kalk inkrustierte Formen fixiert man nach *Chamberlain* mit

Meerwasser	100 ccm
Eisessig	1 ccm
Chromsäure	1 g

Die Fixierdauer beträgt 24 Stunden, innerhalb welcher Zeit 3-4 mal die Fixierlösung erneuert werden muß. Auswaschen mit Meerwasser, allmähliches Überführen in destilliertes Wasser.

§ 352. Das Färben der Rotalgen.

A. Süßwasserformen.

Für morphologische Übersichtsbilder:

1. Alizarinviridin, eventuell mit Einschluß in Niglitin I zur Gallertdarstellung
2. Hämalaun nach *P.Mayer* oder Alaun-Glycerin-Hämatein nach *Rawitz*.

Für anatomisch-cytologische Präparate:

1. Azokarmin B.
2. Kernechtrot.
3. Goldimprägnation mit Nachfärbung von Echtgrün oder Lichtgrün.

§ 353.

B. Meeresflorideen

1. Boraxkarmin und andere Karminfärbungen wie Eisenalaunkarmin nach *de Grot*, Methylkarmin nach *Schwarz*.
2. Hämalaun nach *P.Mayer* oder Alaun-Glycerin-Hämatein nach *Rawitz*.
3. *Becher*-Farben.
4. Eisenhämatoxylin nach *Heidenhain* und *Häggqvist*.
5. Safranin-Gentianaviolett-Orange-G (Lichtgrün).
6. Die Färbungen nach Eckert-Dohrer zur zweifach färberischen Darstellung der Sexualzellen (§ 346 c, siehe auch § 175).

§ 354. Einbetten und Schneiden. Wie bei den Braunalgen (§ 345).

B. Ausgewählte Beispiele zur Bearbeitung der Rotalgen

I. Süßwasser-Florideen

§ 355.

I. Die Froschlaichalge (*Batrachospermum*) kommt in Deutschland mit 3 Arten in schnell fließendem Wasser vor, z.T. auch in Brunnen. Am häufigsten ist *B. moniliforme*. Bei Batrachospermum beobachten wir:

1. Die Jugendform, die wesentlich anders aussieht als die spätere Form. Diese Jugendformen wurden früher als eigene Arten angesehen. So bildet *Chantransia chalybea* die Jugendform zu *B. moniliforme*. Auf der Jugendform finden sich bereits Monosporen.
2. Die ausgewachsene Form. Diese bildet 2-20 cm lange Büschel. Der Thallus ist fadenförmig, stielrund, gallertig und trägt Büschel von wirteligen Seitenästen. Diese Form trägt auch die Geschlechtsorgane. Tetrasporenbildung kommt bei Batrachospermum nicht vor.

Batrachospermum ist besonders geeignet zum Studium der Geschlechtsorgane der Rotalgen, wenn Meeres-Rotalgen nicht zur Verfügung stehen. Besonders auffallend sind die freistehenden Karpogone und Antheridienstände. Sie finden sich an Material, das im Herbst gesammelt wird. Zu sehen sind:

a) Die Antheridien. Die männlichen Ästchen sind den vegetativen sehr ähnlich. An den Endzellen der Ästchen sprossen die rundlichen Spermatongien (Antheridien) hervor. Aus jedem Antheridium wird nur ein einziges Spermatium entwickelt.
b) Die weiblichen Äste sind kürzer als die vegetativen und müssen erst unter diesen gesucht werden. Das Karpogon ist im wesentlichen eine keulenförmige große Zelle. Der obere Teil fungiert als Trichogyne, der untere Teil als Eizelle. Nach der Befruchtung sprossen aus dem Bauchteil des Karpogons Zellfäden hervor, die Gonimoblasten. Diese bilden dann Sporen, die Karposporen. Um die Gonimoblasten bilden sich einhüllende Fäden. Die von Fäden eingehüllten Gonimoblasten werden als Hüllfrucht oder Zystokarp bezeichnet.

Fixierung: Schwache *Flemmingsche* Mischung, Chromessigsäure.
Färbung: Eisen-Hämatoxylin nach *Heidenhain-Häggqvist*, Alaun-Glycerin-Hämatein nach *Rawitz*, *Becher*-Farben, besonders Alizarinviridin. Goldimprägnation mit Nachfärbung von Lichtgrün.
Einschluß: Je nach Verträglichkeit in Glycerin-Niglitin, Venetianer Terpentin, Caedax.

II. *Thorea ramosissima* kommt in Flüssen festsitzend vor. Sie ist leider sehr selten. *Thorea* bildet bis 15 cm lange Zellfäden. Geschlechtliche Fortpflanzung ist unbekannt.
Neben Totalpräparaten fertigen wir auch Querschnitte durch den Thallus an.

II. Meeres-FIorideen

1. Morphologische Präparate

§ 356. Unter den Meeresflorideen treffen wir verschiedene Thallusformen an. Fadenförmige oder gefiederte Thalli wechseln ab mit gallertigen, blattartigen und krustenförmigen Formen.

a) Fadenförmige oder einfach gefiederte Formen

1. *Bangia fuscopurpurea* bildet feine purpurrote Fäden. Das Chromatophor ist sternförmig.
2. *Polysiphonia* kommt in einigen Arten vor, auch mit büschelig verzweigten Ästchen. Das Lager ist bis 20 cm hoch.
3. *Rhodomelia subfusca* (Lager 10-20 cm lang) und *Plocamium coccineum* hat schwach knorpeliges Laub. Diese beiden letztgenannten sind sehr zierliche häufige Formen.
4. *Ceramium rubrum* und *C. deslongchampii* werden bis 15 cm lang.
5. *Chantransia* kommt in zwei Arten, die allerdings sehr klein sind, vor. Die Höhe des Rasens beträgt 1-2 mm. Sie sind ganz einfach organisierte Algen.

Die bisher genannten Arten eignen sich fast alle für Totalpräparate. Die Erhaltung der natürlichen Farbe bei Meeresflorideen erfolgt mit l %iger wässriger Chromalaunlösung, die natürlich mit Meerwasser anzufertigen ist. Die Dauer der Behandlung beträgt 12-24 Stunden. Der Einschluß nach Auswaschen erfolgt in Glycerin, das ebenfalls mit Chromalaun schwach angesäuert ist. Diese Präparate sind jedoch nicht allzulange haltbar. Es empfiehlt sich daher, die Rotalgen mit Chromessigsäure zu fixieren, mit Alkohol ganz zu entfärben und dann mit Azokarmin B zu färben.

b) Gallertige und knorpelige Thalli weisen auf:

6. *Nemalion multifidum* mit gallertigen, vielfach verzweigten Fäden.
7. *Chondrus crispus* hat gelappte Thalli.
8. *Polydes rotundus* hat bis 2 mm dicke drehrunde Thalli.
9. *Furellaria fastigiata* ist zwergförmig. Die Zystokarpien treten im Winter auf.

Von den genannten Formen fertigen wir Schnitte an.

Einbettung: Paraffin.
Färbung: Jodeosin-Anilinblau, Karmin, Hämalaun, *Becher*-Farben.

c) BlattartigerThallus

Hierher gehören die schönsten Florideen wie die *Delesseria*-Arten. Ich nenne nur die bekanntesten:

10. *Delesseria sinuosa, D. alata, D. sanguinea.* Bei *D. sanguinea* und *D. sinuosa* werden die Blätter von einer dicken Mittelrippe durchzogen. Die Zystokarpien treten bei *D. sanguinea* im Winter an der Mittelrippe als gestielte Kügelchen auf, wenn der blattartige Thallus bereits verloren gegangen ist.

    Wir präparieren ein Stück des Thallus als Totalpräparat. Ferner fertigen wir Schnitte durch den Thallus und die Mittelrippe an.

    Fixieren: Chromessigsäure.
    Färbung: Totalpräparate mit Azokarmin, mit Alizarinviridin, mit Naphthopurpurin nach *Becher*.

    Einbetten: Paraffin, Zelloidin, Cellosol, Gummi arabicum, uneingebettet schneiden.
    Färbung der Schnitte: Jodeosin-Anilinblau, Magdalarot-Anilinblau, Karminfärbungen, Eisenhämatoxylin nach *Heidenhain und Häggqvist*

d) Krustenförmiger Thallus

Krustenförmige Thalli auf Steinen oder auch auf anderen Algen, z.B. Laminarien, oder freie inkrustierte Thalli weisen auf:

11. *Hildenbrandia prototypus*. Diese Alge wird nur 0,5 mm dick.
12. *Corallina rubens* an Felsen und auch an *Fucus*. *Cruoria pellita, Lithothamnion polymorphum*. Diese Tange sind so mit Kalk inkrustiert, daß sie sehr zerbrechlich sind.

    Das Fixieren erfolgt nach *Chamberlain* mit der für diese Algen vorgesehenen starken Chromessigsäure. Eventuell muß der Kalk noch eigens aufgelöst werden.

    Wir fertigen Quer- und Längsschnitte an. Einbetten in Paraffin, Zelloidin, Gummi arabicum.

    Färbung: Eisen-Hämatoxylin nach *Heidenheim und Häggqvist*, Safranin-Gentianaviolett-Orange (Lichtgrün), Goldimprägnation

An den Schnitten ist folgendes zu sehen:

Beim krustenförmigen Thallus besteht der Hypothallus aus aufrechten Zellreihen (Rindenzellen). Die Basalschicht aus fächerförmig zusammenfließenden Zellreihen. Die Sporangien stehen in Vertiefungen.

Bei freien Thalli zeigen die *Corallina*-Arten nichtverkalkte "Gelenke". Die Fortpflanzungsorgane sind an den Spitzen der Sprosse eingesenkt.

2. Präparate zur Fortpflanzung

§ 357. Die ungeschlechtliche Fortpflanzung erfolgt in erster Linie durch Sporen. Monosporen sind selten, sie kommen bei *Nemalion* vor und *Chantransia*. Tetrasporen sind die Regel. Sie entstehen in Tetrasporangien. Die Tetrasporangien kommen an Fruchtästen vor. Solche Fruchtäste finden sich z.B. bei *Plumaria* und allen reich verzweigten Formen.

Bei *Corallina, Hildenbrandia* und überhaupt bei allen dicken Arten kommen die Tetrasporen in versenkten Konzeptakeln vor, die in den Rindenschichten zu suchen sind. Die Tetrasporen sind in der Regel lebhaft rot gefärbt und stechen von den Thalluszellen ab.

Die Bildungsvorgänge der Tetrasporen können sehr verwickelt sein. Zu ihrem Studium muß auf Spezialwerke verwiesen werden. Untersuchungstechnik: Totalpräparate und Schnitte wie bei den Thalli angegeben.

§ 358. Die geschlechtliche Fortpflanzung der Florideen gehört zu den interessantesten, aber auch schwierigsten botanischen Studien. Wer sich jedoch bescheidene Ziele steckt und auf Zellkernstudien verzichtet, kann zufällig erhaltenes Material recht gut verarbeiten. Wichtig ist vor allem ausreichende Fixierung von einwandfrei gesammeltem Material, das, wenn irgend möglich, sofort beim Sammeln fixiert werden soll. Zum Studium sei auf *Oltmann* hingewiesen. Hier soll nur kurz gesagt werden, was leicht gesehen werden kann.

a) Antheridien finden sich an den Antheridienständen. Sie können ganz frei sein oder auch durch Gallerten zusammengehalten werden. Vielfach sind die Antheridien in flachen Antheridienhaufen an der Oberfläche oder nahe der Oberfläche anzutreffen, ähnlich den Tetrasporangien. Wieder bei anderen Arten sind die Antheridienstände in Konzeptakeln vereint, die sich im Gewebe des blattartigen Thallus oder an den Sproßenden vorfinden. Freie Antheridienstände hat z.B. *Polysiphonia*. Krustenförmige Antheridien weisen *Delessaria* auf. *Delessaria* hat eigene männliche Sprosse.

b) Karpogonien. Das weibliche Organ der Florideen wird vom Karpogon gebildet. Das Karpogon bildet das Endglied einer kurzen Zellreihe, des Karpogonastes, der jedoch sehr kompliziert gebaut sein kann. Bei manchen Florideen ist der Karpogonast mit einer sogenannten Auxiliarzelle zum Prokarp verbunden. Über diese sehr interessanten, aber schwierigen Verhältnisse muß auf die Literatur verwiesen werden.

Die Trichogyne ist steter Begleiter des Karpogons. Auf dem breiteren Basalteil des Karpogons erhebt sich die meistens haarartige Trichogyne. Die Trichogyne ist meistens gerade, doch kommen auch andere komplizierte Formen vor.

Die Antheridien produzieren die unbeweglichen Spermatien, die passiv an die Trichogyne gelangen und das Karpogon befruchten. Das befruchtete Karpogon entwickelt nun die Kapselfrucht, das Cystokarp, welches dem Sporophyten entspricht und die Sporen - die Karposporen - hervorbringen. Aus den Karposporen entwickelt sich nach der Keimung wieder die Alge.

Untersuchungstechnik: Frisches Material wird nach den § 351 und § 353 behandelt. Zystokarpien kann man sich als Binnenländer am einfachsten verschaffen, wenn man in einer Apotheke Isländisches Moos ("Carragen") kauft. Carragen ist nach dem deutschen Arzneibuch der von der Haftscheibe abgerissene, an der Sonne getrocknete Thallus entweder von *Chondrus crispus* oder von *Gigartina mamillosa*. Die Zystokarpien bilden bei *Chondrus crispus* etwas gestreckte, warzenförmige, flache Erhebungen auf dem Thallus. Bei *Gigartina* sind die Zystokarpien zitzenförmige Erhebungen. Vielfach ist der Erhaltungszustand so gut, daß morphologische Präparate, auch Schnitte, hergestellt werden können.

Man weicht das Material in etwa 3 %iger Kochsalzlösung auf und gibt dann Formalin hinzu, wenn keine Volumenzunahme mehr ersichtlich ist. Auswaschen mit Wasser mit fallendem Kochsalzgehalt und Behandeln der Stücke mit einer 5 %igen wässrigen Lösung von Aluminiumchlorid. Färben mit *Becher*-Farben. Für das Färben mit alkoholischen Farben ist das Material besser nicht frisch zu schneiden, sondern nach Auswaschen in Paraffin oder Zelloidin einzubetten und zu schneiden.

Färbungen: Magdalarot-Anilinblau, Jodeosin-Anilinblau. Einwandfrei fixiertes Material färbt man nach *Chamberlain* am besten mit Eisen-Hämatoxylin und färbt mit Safranin nach. Dies gibt sehr schöne Resultate bei Antheridien und Cystokarpien.

Kapitel X: Pilze

I. Allgemeines über Pilze

§ 359. Zu den Pilzen (Fungi, Mycetes) gehört eine überaus große Anzahl von Arten. Allein an Pilzen mit größeren Fruchtkörpern kommen in Mitteleuropa über 2000 Arten vor. Da viele mikroskopisch kleine Pilze als Entwicklungsstadien größerer Pilze angesehen werden müssen, ist die Zahl der kleinen oder niederen Pilze nur annähernd anzugeben. Die Verbreitung der Pilze ist so groß wie die Verbreitung von Wald und Wiese. Schimmel- und Hefepilze sind allgegenwärtig. Ohne Rücksicht auf systematische Einteilungen werden hier mit den Pilzen auch die Schleimpilze und die Algenpilze behandelt.

Für die Darstellung der Präparationsmethoden und der Besprechung der Übungsbeispiele werden höhere Pilze - die Hutpilze und größeren Ascomyceten - und niedere Pilze unterschieden. Niedere Pilze sind in diesem Zusamenhang alle Pilze, zu deren Beobachtung unbedingt Lupe oder Mikroskop gebraucht werden. Diese Einteilung erfolgt rein willkürlich und nur aus praktischen Gesichtspunkten.

Pilze sind im allgemeinen leicht zugänglich und die technische Bearbeitung stellt keine Schwierigkeit dar.

§ 360. Die Untersuchung lebender Pilze.

1. Kleinpilze sollen grundsätzlich frisch, d.h. lebend betrachtet werden. Soweit es sich um Wasserformen handelt, bietet das keine Schwierigkeiten. Manche an der Luft wachsende Pilze - Schimmelpilze, auch parasitische Pilze wie *Phytophtora* - lassen sich nicht mit Wasser benetzen. Sie verlieren ihre Sporen und verkleben zu unkenntlichen Massen, wenn sie mit Wasser in Verbindung kommen. Ihre Untersuchung nimmt man in der *Abelschen* Flüssigkeit vor, in der sie sich nicht verändern und die Sporen nicht abfallen.

2. *Abelsche* Flüssigkeit (99):

96 %iger Alkohol	25 ccm
Liquor Ammonii caustici	25 ccm
Glycerin	15 ccm
Destilliertes Wasser	30 ccm

Wenn die Objekte eingeschlossen werden sollen, ohne daß gefärbt wird, so kann dies unmittelbar aus der *Abelschen* Flüssigkeit geschehen. Bei staubfreiem Eindunsten bleibt nur noch Glycerin zurück, von wo aus in Glyceringelatine oder, hier bedeutend besser, in Hausenblasengallerte nach *Behrens* übertragen wird. Diese Präparation ohne Färbung ist für sehr viele kleine Formen angezeigt, so Schimmelpilze, Hefen, auch Mehltaupilze, Rußpilze und ähnliche Objekte.

(99) Abel, *Bakteriologisches Taschenbuch*, Würzburg, Curt Kabitzsch 1913. S.104

Fixiermethoden für Pilze

§ 361.

I. Höhere Pilze. Bei den großen Pilzen wird allgemein angeraten, möglichst große Stücke, unter Umständen ganze Hüte, zu fixieren und erst nach der Fixierung das Zerteilen in kleinere Stücke vorzunehmen. Deformationen und Verluste an Milchsaft werden hier so am besten vermieden.

Zum Fixieren stehen zur Verfügung:

1. Chromessigsäure, die nach *Ulbrich* ein vorzügliches Mittel zum Fixieren der Pilze ist.

Destilliertes Wasser	100 ccm
Eisessig	1,5 ccm
Chromsäure	0,5 g

   Die Fixierdauer ist 24 Stunden. Sehr geeignet für Hutpilze wie *Russula, Psalliota,* weichere *Polyporus*-Arten, *Coprinus, Cantharellus* und *Peziza,* überhaupt für nicht allzu weiche Arten.

2. Sublimat-Eisessig nach *Kaiser*

Destilliertes Wasser	100 ccm
Sublimat	10 g
Eisessig	3 g

   Fixierdauer 3-24 Stunden. Besonders für fleischige Formen wie *Boletus, Morchella, Helvella, Scleroderma* und *Phallus impudicus.* Statt Sublimat-Eisessig können auch andere quecksilberhaltige Fixiermittel verwendet werden.

3. Formol-Alkohol nach *Chamberlain* hat den Vorzug, daß auch fleischige Formen darin gut gehärtet werden.

4. Fixiergemisch nach *Pfeiffer* ist für Pilze aller Art sehr gut geeignet. Fixierdauer 24 Stunden.

5. Für Pilze mit Milchsaftschläuchen nimmt man zum Fixieren absoluten Alkohol, eventuell Brennspiritus. Der Milchsaft gerinnt und färbt sich später bei Behandlung mit Hämalaun dunkel. Fixierdauer 24 Stunden.

6. Für Pilzsporen kann die Osmiumsäure in Dampfform angewendet werden. Fixierdauer eine Minute.

§ 362.

II. Niedere Pilze. Unter den niederen Pilzen gibt es sehr viele saprophytische oder parasitische Arten, die ohne ihre Unterlage oder ohne ihre Wirte gar nicht präpariert werden können. Schon beim Fixieren ist deshalb Wert darauf zu legen, daß die Fixiermittel auch zur Fixierung des Wirtes oder der Unterlage geeignet sind.

Für die niederen Pilze stehen an Fixiermitteln zur Verfügung:

1. Chromessigsäure nach *Flemming,* die nach *Ulbrich* den verschiedenen Pilzarten angepaßt werden kann, um die schonendste Fixierung zu erreichen. Folgende Tabelle zeigt die Zusammensetzung für einige Gruppen von Kleinpilzen.

Objekt	Chromsäure	Essigsäure	Wasser
Mucor	0,5 g	1 ccm	100 ccm
Aspergillus	1,0 g	3 ccm	100 ccm
Saprolegnia	0,3 g	1 ccm	100 ccm
Uredineen *Erysiphe* *Peronospora*	0,5 g	1,5 ccm	100 ccm
Myxomyceten	0,7 g	0,3 ccm	100 ccm

Man läßt die Blätter oder die Pilzrasen auf der Fixierlösung schwimmen. Nach einem Tag hat sich durch Diffusion das Fixiermittel überallhin verteilt und man kann die Objekte zur Luftentfernung in Aceton verbringen, worauf sie sich gut auswaschen lassen.

2. Formalin ist besonders geeignet für Pilze, die im Wasser wachsen wie *Saprolegnia*. Man gibt der Kulturflüssigkeit soviel Formol zu, daß eine 4 %ige Formalinlösung entsteht.

3. Formalin-Alkohol nach *Chamberlain*, besonders für an der Luft wachsende Formen, die sehr schlecht von wässrigen Fixiermitteln benetzt werden.

4. Jod als Zusatz zu Wasser oder Alkohol ist ein ausgezeichnetes Fixiermittel, besonders wenn die Goldimprägnierung angewendet werden soll. Dem Wasser oder Alkohol gibt man tropfenweise so viel Jodtinktur oder *Lugolsche* Lösung zu, daß eine weingelbe Lösung entsteht. Dauer der Einwirkung eine Minute. Anschließend kann gleich zur Vergoldung geschritten werden.

5. Osmiumsäuredämpfe für Kleinstformen.

6. Konzentrierte wässerige Pikrinsäure, besonders für Schleimpilze.

7. Die schwächere *Flemmingsche* Lösung, besonders für Schleimpilze.

§ 363. Einbetten und Schneiden. Pilze schneiden sich im allgemeinen in Paraffin und in Zelloidin gut. Paraffinschnitte für zytologische Studien sind 5-7µ dick anzufertigen.

Zelloidinblöcke werden am besten in Terpineol aufbewahrt und auch in Terpineol geschnitten. Nur Blöcke mit holzartig harten Formen werden in Glycerin gelegt und auch in Glycerin geschnitten.

Gummi arabicum ist geeignet für Objekte, die sehr stark schrumpfen wie *Tremella*. Auch geeignet für Pilze auf Rindenstückchen. Schnittdicke 20-50µ. Die Schnitte quellen hernach in Wasser wieder auf, wobei alle Schrumpfungen verschwinden.

§ 364. Färbemethoden für höhere Pilze

A. Morphologische und histologische Färbungen. Der Aufbau der Pilze aus einzelnen Hyphen und Mycelsträngen ist auch an ungefärbten Schnitten sehr gut zu erkennen. Besonders instruktiv sind Zupfpräparate aus nicht zu dünnen Schnitten. Zelloidin ist aus den Schnitten vor dem Zerzupfen selbstverständlich zu entfernen.

Für die Färbung von Pilzhyphen und Mycelsträngen sind eine große Anzahl von Farbstoffen verwendbar. Allerdings färbt sich nicht jedes Objekt mit jedem beliebigen Farbstoff. Für die

Beurteilung des Färbeergebnisses muß man sich vor Augen halten, daß sich mit den meisten Farbstoffen nur der plasmatische Inhalt (wenn vorhanden!) färbt und die sehr kleinen Kerne, aber fast nie die Kutikula der Hyphen. Alte Mycelschläuche sind oft mit Luft oder Wasser gefüllt.

Färbemethoden für Pilzhyphen und Mycelien:

1. In lebendem Zustande färbt man mit ganz verdünnter Hämatoxylinlösung blau. So färbt sich *Mucor rhizophilus* in frischen Schnitten von *Marchantia polymorpha*.
2. Fixiertes Material färbt man mit verschiedenen Hämatoxylinrezepturen wie *Ehrlich, Delafield, Böhmer, Rawitz.*
3. *Becher*-Farben, speziell Alizarinviridin, ferner Alizarinzyanin, Naphthazarin und Naphthopurpurin.
4. Basische und saure Anilinfarben wie Bismarckbraun, Methylenblau nach *Löffler*, Kresylechtviolett, Säurefuchsin, Eosin, Lichtgrün, Orseillin BB, Orange G, Kongorot.
5. Eisen-Tannin-Färbung.
6. Benzoazurin und Rosaazurin zu gleichen Teilen gemischt.
7. Boraxkarmin mit Nachfärbungen von Lichtgrün.

Wenn es sich um besonderen Inhalt in den Pilzmycelien handelt, so kann dieser färberisch dargestellt werden. Milchsaftschläuche z.B. bei *Lactuaria*-Arten färben sich nach Alkoholhärtung mit Hämatoxylinfärbungen dunkel. Die Wahl der Färbung, ob Eisenhämatoxylin, Hämalaun, Alaun-Glycerin-Hämatein usw. ist nicht von Bedeutung.

Pilzhyphen enthalten manchmal Öl oder Fett. Solche Hyphen färben sich nach Formolfixierung mit Sudan III rot. Nach *Chamberlain* kann man das Sudan in Milchsäure lösen oder nach *Fischer* mit folgender Lösung anwenden:

Alkohol 96%ig	5 ccm
Glycerin	5 ccm
Sudan III	0,01g

Einschluß in Glyceringelatine. Leider ist die Färbung nicht lange haltbar.

§ 365.

B. Zytologische Färbungen. Die Färbung der Kerne der Pilze kann geschehen mit:

1. Eisenhämatoxylin-Eosin.
2. Kresylechtviolett.
3. Goldimprägnation und Imprägnation mit Schwefelblei.
4. Methylgrün-Säurefuchsin.
5. Safranin-Gentianaviolett-Lichtgrün.
6. Safranin-Lichtgrün

§ 366. Färbemethoden für niedere Pilze. Bei den niederen Pilzen können angewandt werden:

1. Hämatoxylinfärbungen wie *Delafields* Hämatoxylin, *Weigerts* Eisenhämatoxylin.
2. Safranin (30Minuten) - Gentianaviolett (15 Minuten), Lichtgrün (kurze Zeit) nach *Straßburger*.
3. Magdalarot-Anilinblau mit Einschluß in Venetianer Terpentin oder Caedax.
4. Pikrokarmin-Anilinblau.
5. Pikro-Nigrosin.
6. Säurefuchsin, Orseillin BB, Eosin.
7. Goldimprägnation, Imprägnation mit Schwefelblei.

8. Nach Formalinfixierung färbt Giemsa 1:10 verdünnt in der Zeit von 12-24 Stunden. Zum Differenzieren verwendet man 0,25 %ige wässrige Essigsäure. Auswaschen mit destilliertem Wasser. Gelungene Färbungen mit Giemsafärbung zeigen die Kerne blau, das Mycel blaßblau. das Protoplasma rot und die Fruktifikationsträger grünlich. Die Färbung kann mit Phosphormolybdänsäurelösung fixiert werden.
9. Manchmal färbt auch das alkalische Methylenblau nach *Löffler* bei einer Einwirkungszeit von 1-2 Stunden.

§ 367. Pilzhyphen im Gewebe höherer Pflanzen können wie folgt dargestellt werden:

1. Ganze Blätter werden fixiert und dann mit Chlor gebleicht bis sie ganz weiß sind. Die Färbung geschieht dann

a) mit *Delafieldschem* Hämatoxylin und Eosin
b) mit Anilinblau und Bismarckbraun oder Anilinblau und Orseillin BB in essigsaurer Lösung
c) mit Benzoazurin und Rosaazurin

Wenn die Blätter dick sind, ist es zweckmäßig, die organischen Inhaltssubstanzen zu entfernen. Dies geschieht mit folgendem alkalischen Alkohol:

40 %iger Alkohol	100 ccm
Kaliumhydroxyd	20 g .

Gewöhnlich genügt eine Behandlung von einer Stunde Dauer.

Die oben geschilderten Methoden sind gegeignet für Pilze wie *Peronospora*, *Albugo* und *Phytophtora*.

2. Für Schnitte und sehr kleine dünne Blätter kann auch die Methode von *G.D.Alcorn* und *C.C.Yeager* (100) verwendet werden. Man verwendet folgende Lösungen:

I.	3 %ige wässrige Essigsäure	100 ccm
	Orseillin BB	0,25 g

II. *Sartorysche* Flüssigkeit

Kristallisiertes Phenol	10 ccm
Syrupdicke Milchsäure	20 ccm
Glycerin	40 ccm
Destilliertes Wasser	20 ccm

Zum Färben benützt man eine Mischung von 1 Raumteil der Orseillinlösung mit 10 Teilen der *Sartoryschen* Flüssigkeit. Die Objekte kommen 5 Minuten in die Farblösung. Nach meinen Erfahrungen kann statt der *Sartoryschen* Flüssigkeit auch Lactophenol genommen werden.

(100) G.D.Alcorn und C.C.Yeager, *Stain Technology XII*, 1937, S.157

II. Ausgewählte Übungsbeispiele zur Bearbeitung der höheren Pilze

§ 368.

A. Der vegetative Aufbau der höheren Pilze

Bei höheren Pilzen ist kein Mangel an Material. Solange Schneedecke und Frost fehlen, findet man in jedem Jahre so viel Pilze, daß man sie kaum verarbeiten kann. Aber selbst im Winter kann man in Delikatessengeschäften noch Champignon und Trüffeln kaufen.

Aus dem Stiele eines Champignon fertigen wir Längs- und Querschnitte an. Zu sehen sind fadenförmige Hyphen. Bei den Längsschnitten erkennen wir zahlreiche kleine Kerne an der Hyphenwand und die Tüpfel an den Verbindungsstellen zweier Hyphen; bei Querschnitten sehen wir an günstig getroffenen Hyphen Tüpfel.

Psalliota-Arten zeigen die eben geschilderten einfachen Formelemente.

Amanita-Arten zeigen verzweigte Hyphen mit angeschwollenen Verzweigungen. Ähnliche Verhältnisse zeigt das Stroma über den sporentragenden Teilen.

Lactuaria zeigt Milchgänge (§ 364 A Ziff. 7). Die anatomischen Verhältnisse sind einförmig und bei allen größeren Pilzen einander sehr ähnlich. Größere Abwechslung zeigen die sporenbildenden Teile der Pilze.

§ 369.

B. Sporenbildung bei Basidomyceten

Bei den höheren Basidomyceten umkleidet das Hymenalgewebe Blätter, Röhren, Zapfen oder bedeckt bei den einfacheren Formen einfach die Oberfläche der Pilze.

Die Bauchpilze (*Gasteromyceten*) haben geschlossene Fruchtträger. Die Außenwand heißt Peridie, der gesamte Inhalt wird als Gleba bezeichnet. Die Gleba ist gekammert, sie ist von einem Basidienhymenium ausgekleidet oder erfüllt von ziemlich locker verflochtenen Hyphen, deren Endzweige die Basidien darstellen. Bei der sogenannten Stinkmorchel (*Ithophallus impudicus*) ist der morchelähnliche eigentliche Fruchtkörper mit der Gleba außen überzogen. Bei der Sporenreife verflüssigt sich die Gleba. Vor der Verarbeitung des Materials überzeugen wir uns durch ein Zupfpräparat davon, daß die Objekte die gewünschten Stadien enthalten. Gerade bei den reifen Hutpilzen fallen die Sporen sehr leicht und in Massen ab, so daß zum Schlusse bei unbedachter Verarbeitung der Anfänger recht enttäuscht ist. Für den Anfang wählt man am besten die jüngeren Exemplare. Die Sporen bilden sich auf den keulenförmigen Basidien. Am Ende jeder Basidie treten vier Sterigmen aus, von denen jeder je eine Spore trägt. Zwischen den Basidien sind sehr häufig Paraphysen festzustellen.

Interessant ist die Entwicklung der Basidie, die wir kurz verfolgen wollen. Die Sporen der Basidomyceten sind verschiedengeschlechtlich. Sie keimen zu einem Mycel, dem bekannten Pilzmycel, aus, das praktisch unbegrenzt weiterwachsen kann. Sexualorgane werden an ihm nicht ausgebildet.

Treffen jedoch zwei verschiedengeschlechtliche Mycelien aufeinander, so verschmelzen zwei Zellen miteinander. Die beiden Kerne legen sich paarweise aneinander, ohne miteinander zu verschmelzen; diese Fusionszelle wächst nun zu einem Mycel aus. Von jetzt an bilden sich die Schnallen. Neben den Kernen entsteht eine Ausbuchtung - Schnalle -, in die ein Kern wandert und sich teilt; ebenso teilt sich der am Ort gebliebene Kern. Die Tochterkerne, die sich bilden, verteilen sich nun so, daß bei der nun nach der Kernteilung auftretenden Scheidewand in die alte und in die neue Mycelzelle je ein Paar verschiedengeschlechtlicher Kerne eingewandert sind. Auf diese Weise entsteht unter fortwährender Bildung neuer Schnallen ein in allen Zellen paarkerniges – dikaryotisches - Schnallenmycel, das jahrelang fortwachsen kann.

Der Fruchtkörper besteht ebenfalls aus paarkernigen Hyphen. In der Hymeniumschicht entstehen durch Anschwellen endständige Hyphen, die Basidien. In den Basidien verschmelzen die beiden Kerne miteinander, worauf eine Reduktionsteilung einsetzt und vier haploide Kerne entstehen, die in die Basidiosporen durch die Sterigmen einwandern.

Wir untersuchen nun eine *Amanita*- oder *Psalliota*-Art, eine *Boletus*-Art, einen *Polyporus* und einige *Bovist*-Arten. Wenn verfügbar, untersuchen wir den Kartoffelbovist (*Scleroderma vulgare*), der in halbreifem Zustande bereits gefärbte Sporen hat und sich in jedem Reifezustand sehr gut einbetten und schneiden läßt. Von allen Arten untersuchen wir halbreife und reife Zustände.

Fixierung: *Pfeiffer*, Formalin-Alkohol, Sublimatgemische.
Einbetten: Zelloidin und Paraffin. Für die Entwicklung der Basidien und der Sporen ist nur die Paraffineinbettung möglich. Die Schnittdicke ist hier 5µ. Kollodiumschutzhäutchen.

Die Schnittrichtung ist immer senkrecht zur Hauptachse des Hymeniums, bei Blätterpilzen also so, daß der Schnitt, wenn mehrere Blätter geschnitten werden, wie ein Kamm aussieht. Die Röhrenschicht wird parallel zur Hutunterfläche geschnitten, so daß der Schnitt wie ein Gitter aussieht. Bei den Stachelpilzen schneidet man so, daß die Stacheln in der Längsachse getroffen werden, bei *Clavaria* senkrecht zur Pilzachse, bei der Trüffel und den Bovisten senkrecht zur Pilzoberfläche.

Färbung mit Alizarinviridin und anderen *Becher*-Farben, Alaun-Glycerin-Hämatein nach *Rawitz*, Eisenhämatoxylin mit Säurefuchsin oder Eosin. Sind die Sporen von Natur aus genügend gefärbt, so genügt Säurefuchsin oder Lichtgrün allein.

§ 370.

C. Sporenbildung bei den Ascomyceten.

1. Bei den Ascomyceten entstehen die Sporen in einem Schlauch, dem Ascus. Die Asci sind zahlreich im Hymenium enthalten; ihre Bildung ist sehr kompliziert.

Die Ascomyceten weisen Sexualorgane auf, und zwar sogenannte Gametangien. Im einfachsten Falle wachsen aus dem Mycel zwei örtlich benachbarte Gametangien aus, die miteinander verschmelzen. Nach der Verschmelzung bilden sie einen Sporenschlauch aus, den Ascus. Bei den höheren Ascomyceten sind die Gametangien in die Antheridien und die Ascogone verschieden ausgestaltet. Ein gutes Untersuchungsobjekt dafür ist die in Wäldern häufige *Pyronema confluens*.

Die Hyphen der Gametophyten schwellen zu den Gametangien an. Das Ascogon trägt auf seinem Scheitel eine langgestreckte gebogene vielkernige Papille, die Trichogyne. Bei Berührung zwischen Trichogyne und Antheridium schwindet die Trennungswand und die männlichen Kerne wandern in das Ascogon ein. Die Kerne legen sich paarweise aneinander. Das Ascogon treibt zahlreiche Schläuche aus, die ascogenen Hyphen, in welche die Kernpaare hineinwandern.

2. Diese ascogenen Hyphen stellen den Sporophyten dar. Der Sporophyt ist also unentwirrbar mit dem Gametophyten verflochten und beide zusammen bilden den Fruchtkörper.

Die ascogenen Hyphen wachsen nun unter komplizierter Zellteilung etwas in die Länge und bilden Endzellen aus, die zwei verschiedengeschlechtliche Kerne enthalten. Erst die Endzelle bildet den Ascus. Die Spitze der Endzelle krümmt sich rückwärts zu einem Haken, dessen Kernpaar sich gleichzeitig teilt (konjugiert). Zwei verschiedengeschlechtliche Kerne bleiben in der Spitze, wo sie verschmelzen, je einer wandert in den Haken und den Stiel. Querwände sondern die Spitze von Stiel und Haken ab. Diese Spitze wächst nun zum Ascus aus. Aus dem Spitzenkern entsteht unter dreimaliger Kernteilung (einschließlich der Reduktionsteilung) die Zahl von 8 Kernen. Hieraus gehen unter freier Zellbildung die 8 Sporen im Ascus hervor.

Untersuchungsobjekte:

1. *Morchella esculenta* oder eine andere Morchel-Art. Auch Lorcheln (*Gyromitra*) sind brauchbar.
2. *Tuber rufum*, die Trüffel.
3. *Xylaria* findet sich häufig auf modernden Laubholzstümpfen.

An den Morcheln sehen wir das Hymenium mit den Asci die Vertiefungen des Hutes auskleiden, ebenso sind die Asci auf dem Hut bei *Gyromitra*, bei *Xylaria* außen und unten am dunklen Fruchtkörper. Bei der Trüffel befinden sich die Asci in den Gängen, die den ganzen Fruchtkörper durchziehen

Fixierung: Wie bei den höheren Basidomyceten.

Färbung: Blockfärbung mit Alaunkarmin.

Schnittfärbungen:

1. Eisen-Hämatoxylin nach *Heidenhain* oder *Häggqvist*.
2. Alaun-Glycerin-Hämatein nach *Rawitz*.
3. Kresylechtviolett.
4. Safranin-Gentianaviolett-Orange G (Lichtgrün).
5. *Delafields* Hämatoxylin.
6. Goldimprägnation.
7. Imprägnation mit Schwefelblei.

§ 371.

D. Die Sporen der höheren Pilze.

1. Die Sporen sind die einzigen Vermehrungsorgane der höheren Pilze. Sie sind leicht zu gewinnen. Legen wir einen reifen Blätterpilz auf einen Teller (die Blätterseite nach unten), so bekommen wir über Nacht große Mengen von Sporen auf den Teller. Man kann auch Stücke der Pilze in einer Kochflasche mit etwas Brunnenwasser kräftig schütteln. Die Sporen verteilen sich dann im Wasser.

Ob die Sporen gefärbt sind, sieht man schon an den Blättern; sind diese gefärbt, sind es auch die Sporen. Gefärbte Sporen haben z.B. die Tintlinge wie *Coprinus porzellanum*, dann die wildgewachsenen *Champignon*-Arten.

2. Zur Färbung eignen sich die helleren Sporen natürlich am besten. Sie werden nach der Methode der Untersuchung von kleinsten Objekten in Ausstrichen verarbeitet (§ 62-64, Ziff. 5).

Zur Färbung verwendet man:

1. Goldimprägnation.
2. *Delafields* Hämatoxylin.
3. Giemsafärbung.
4. Methylenblau mit Nachfärbung mit Eosin.

Mit Methylenblau in alkalischer Lösung läßt sich nach *Heim* (101) eine metachromatische Rotfärbung am Rande und im Inneren der Sporen von Basidomyceten erreichen. Man benützt folgende Lösung: Zuerst schüttet man 5 g Methylenblau in 100 ccm Alkohol und läßt es einige Tage stehen. Von der Lösung über dem Bodensatz gießt man 3 ccm in 10 ccm 0,01 %ige wässrige Kalilauge. Damit färbt man die Ausstriche. Trocknen der Ausstriche nach dem Wässern an der Luft. Caedax.

(101) L.Heim, Zeitschr. f. wissenschaftl. Mikroskopie 53, 1936, S.4-9.

3. Manche Pilzsporen keimen sehr leicht und lassen sich auf dem Objektträger züchten. Die Kulturen gelingen jedoch nur bei sterilem Arbeiten. Sonst überwuchern Bakterien und Schimmelpilze die ganze Kultur.

Nach *Schnegg* (102) keimen am leichtesten die Sporen der Holzbewohner, so der bekannte Stockschwamm (*Pholiota mutabilis*), dann der Hallimasch (*Armillia mellea*). Ferner können benützt werden der Bläuling (*Russuliopsis laccata*) und natürlich der Champignon (*Psalliota campestris*), von dem man aus Züchtereien leicht Mycelien erhalten kann.

(102) H.Schnegg, *Unsere Speisepilze*, München 1918, S.22.

4. Manche *Coprinus*-Arten lassen sich sehr leicht in Mistrohkulturen züchten.

Die Aussaat der Sporen geschieht am besten auf Agar (0,5% Agar und 3% Malzextrakt) in Petri-Schalen oder auch auf Objektträgern mit ganz dünner Agarschicht. Die Verwendung von Objektträgern hat den Vorteil, daß nach Angehen der Kultur wie bei Ausstrichen fixiert und gefärbt werden kann, wenn der Ausstrich genügend dünn war. Die Aussaat muß selbstverständlich ganz dünn vorgenommen werden. Vor der Verteilung der Sporen in Wasser, muß dieses natürlich durch Kochen sterilisiert worden sein.

Hat man keine Pilze zur Hand, so kann man sich vielfach *Coprinus*-Arten durch eine Mistrohkultur verschaffen. Pflanzenfressermist (am handlichsten verarbeitet sich Pferdemist) wird in einer großen feuchten Kammer gehalten. Es erscheinen die verschiedensten Kleinpilze und als letzte nach einigen Wochen die *Coprinus*-Arten. Sie bilden gestauchte, tonnenförmige Fruchtkörperanlagen, die ganz von weißem Flaum eingehüllt sind. Bei der Reife zerfließen die Hüte zu einer schwärzlichen Masse.

In Erlenmeyer-Kolben mit Brotbreimistdekokt treten nach Beimpfen mit der Sporenmasse rhizomorphenartige Mycelien und später auch Fruchtkörper auf.

Fixierung: Die Objektträgerkulturen werden mit Formalin oder mit Osmiumsäuredämpfen fixiert.

Färbung: Hämatoxylin-Eosin oder *Giemsa*.

§ 372.

E. Chemische und mikrochemische Untersuchungen an höheren Pilzen

Bei systematischen Untersuchungen der schwierigen Gattung *Russula* hat man neuerdings - ähnlich wie schon längere Zeit bei den Flechten, chemische Reaktionen zu Hilfe genommen. Diese chemischen Reaktionen sind empirisch gewonnene Erkenntnisse. Ihr Zustandekommen ist noch nicht hinreichend geklärt. Hier können nur einige Beispiele angeführt werden:

§ 373. Für makroskopische Untersuchungen benützt man:

1. Eine 10 %ige wässrige Lösung von Eisensulfat. Die Lamellenoberfläche, der Stiel und das Fleisch des Stieles in der Höhe der Lamellen färben sich damit fleischrötlich bis grau. Exsikkaten färben sich meistens oliv. Die Färbungen sind für die einzelnen Arten charakteristisch.
2. Eine 2% ige wässrige Phenollösung färbt fast alle Täublinge schokoladenbraun. Nur *Russula olivacea* färbt sich damit lilaweinrot bis purpurn, manchmal schwarz bis schwarzgrün.
3. Anilin färbt *Russula xerampelina* intensiv kupferrot.
4. Sulfovanilin. Herstellungsvorschrift:

Schwefelsäure	8 ccm
Vanilin	1 g
Destilliertes Wasser	2-4 ccm

Sulfovanilin färbt makroskopisch schmutzig purpur bis blaurot bei *Russula aurosa*, bei *R. minitula* eosin bis karminrot.

§ 374. Die mikrochemischen Untersuchungen sind viel wichtiger als die makroskopischen Untersuchungen. Die mikrochemischen Untersuchungen erstrecken sich auf die Sporen und auf die Zystiden.

Die Sporen, die bei allen *Russula*-Arten mit Leisten oder Spitzen - den sogenannten Protuberanzen - versehen sind, werden mit Jod untersucht. Das Jod benützt man in der Form des

Reagens nach *Melzer* oder nach *Gilbert*. Diese Reagentien haben folgende Zusammensetzungen:

Reagens nach *Melzer*

Destilliertes Wasser	20 ccm
Kaliumjodid	1,5 g
Jod	0,5 g
Chloralhydrat	20 g

Reagens nach *Gilbert*

Destilliertes Wasser	20 ccm
Kaliumjodid	1 g
Jod	0,3 g
Chloralhydrat	20 g

Mit diesem Hilfsmittel färben sich alle Protuberanzen der Sporen dunkelblau bis schwarz. Sie können dann bequem studiert werden.

Die Zystiden färben sich an frischen Schnitten mit Sulfovanilin mehr oder weniger blau, auch an Exsikkaten. Hier braucht die Reaktion jedoch einige Zeit bis zu ihrem Auftreten. Die Färbungen sind je nach Art verschieden. Auch das Sulfoformol färbt die Zystiden charakteristisch von hellblau bis braun.

Zusammensetzung des Sulfoformols:

Destilliertes Wasser	25 Tropfen
Schwefelsäure	5 ccm
40 %iges Formalin	75 Tropfen

Über Haltbarkeit der Färbungen bei etwaigen Einschlüssen in Glyceringelatine oder Harzen liegen Veröffentlichungen nicht vor. Wegen weiterer Einzelheiten muß auf die Literatur verwiesen werden (103, 104)

Von den chemischen Bestandteilen der Pilze beanspruchen noch größeres Interesse die Pilzgifte und die Pilzfarben.

(103) R.Singer, Monographie der Gattung Russula in Hedwigia, Organ für Kryptogamenkunde Bd. LXVI, Heft 314, Dresden 1926

(104) J.Schäffer, Russula-Monographie in Annales Mycologici Band XXXI, 1933, Band XXXII, Berlin, R.Friedländer, 1934

§ 375. Die Pilzgifte. Bei der Wichtigkeit der Pilzgifte sollen einige kurze Bemerkungen darüber hier Platz finden, obwohl ihre Besprechung hier etwas aus dem Rahmen des Buches fällt. Die Pilzgifte sind in den letzten Jahren eingehend studiert worden; trotzdem sind die feststehenden Kenntnisse darüber nicht allzu groß. Die wichtigsten Pilzgifte sind: Cholin, Muskarin, Pilzatropin, Phallin und die Helvellasäure.

Die ersten drei kommen hauptsächlich vor im Fliegenpilz (*Amanita muscaria*), im Perlpilz (*Amanita rubescens*), im Pantherpilz (*Amanita pantherius*), im Satanspilz (*Boletus satanas*) und im Speitäubling (*Russula emetica*).

Die Knollenblätterpilze (*Amanita phalloides, Amanita verna*) enthalten Phallin, Phalloidin, Bulbosin. Von diesen Giften ist kaum mehr bekannt als ihre biologische oder besser gesagt toxische Wirkung.

Die Helvellasäure kommt in den Lorcheln vor (*Helvella infula, Gyromitra esculenta*). Die Helvellasäure kann bereits durch heißes Wasser ausgezogen werden.

Das Cholin oder Amanitin - C5H15NO2 - ist eine Base, die mit verdünnter Salzsäure in Form des kristallisierbaren salzsauren Salzes unschwer aus den Pilzen ausgezogen werden kann. Es ist löslich in Wasser und in Alkohol. Das pikrinsaure Cholin kristallisiert ebenfalls.

Das Muskarin ist Oxycholin - C5H15NO3 – es bildet sehr giftige Kristalle, die leicht zerfließlich sind.

Das Pilzatropin ist dem Atropin sehr ähnlich, vielleicht sogar damit identisch.

§ 376. Die Pilzfarbstoffe. Über die den Pilzen eigentümlichen Farbstoffe seien folgende Angaben gemacht:

Der orangerote Farbstoff des Fliegenpilzes ist das Muscarufin, ein Farbstoff, der sich chemisch vom Benzochinon ableitet. Er kann in rhombischen Kristallen erhalten werden, wenn die gefärbte Pilzhaut mit Eisessig oder Dioxan ausgezogen wird. Ferner sind näher bekannt die Polyporsäure (aus Pilzen der Gattung *Polyporus*). Sie löst sich in verdünntem Ammoniak mit violetter Farbe, ist löslich in Aceton und kristallisiert daraus in glänzenden, braunvioletten Blättchen.

Atromentin kommt im Samtfuß (*Paxillus atromentosus*) vor. Kristallisiert aus Eisessig in glänzenden, bronzefarbenen Kristallen.

Boletol ist der gelbe Farbstoff der *Boletus*-Arten. Es bildet rote Nadeln. An der Luft läuft es im angeschnittenen Pilzkörper infolge Veränderung durch eine Enzymwirkung blau an. Boletol ist ein Anthrachinonfarbstoff.

III. Ausgewählte Übungsbeispiele zur Bearbeitung der niederen Pilze

§ 377. Das Heer der niederen Pilze ist so groß, daß es nur in einigen Unterabteilungen aufgeteilt besprochen werden kann. In diesem Buche werden sie in folgender Reihenfolge behandelt: Schleimpilze, Algenpilze, niedere Basidomyceten, niedere Ascomyceten und *Fungi imperfecti*.

Bei den niederen Pilzen lassen sich die histologischen und cytologischen Einzelheiten nicht mehr trennen.

Bei der Präparationstechnik der niederen Pilze gilt für die Anfertigung ungefärbter Dauerpräparate dasselbe wie von den Mycelien und Hyphen der höheren Pilze. Präparate in Glyceringelatine oder Hausenblasengallerte nach *Behrens* zeigen oft ohne Färbung alle Einzelheiten in wunderbarer Naturtreue. Zur Bestimmung sind diese Präparate völlig ausreichend, zumal recht viele niedere Pilze über Eigenfärbungen verfügen.

I. Unterabteilung: SCHLEIMPILZE - MYXOMYCETES

A. Allgemeines

§ 378. Die Schleimpilze sind Kosmopoliten. Ihre wenigen Arten kommen überall in der ganzen Welt vor. Anscheinend gibt es hier keine Arten, die nur in den Tropen oder nur in der gemäßigten Zone heimisch sind.

Die Schleimpilze erfreuen sich gerade neuerdings des Interesses der Fachbotaniker und der Naturfreunde. Da sie in ihrem Leben in vielgestaltiger Form auftreten, ist ihr Studium trotz des äußerlich anscheinend sehr einfachen Baues sehr anregend. Erst bei der Präparation enthüllen sie ihre Geheimnisse. Eine eingehende Beschäftigung mit den Schleimpilzen erfordert geduldiges Studium unter Benützung von Spezialliteratur.

Die Schleimpilze sind chlorophyllfreie Organismen, die mit wenigen Ausnahmen alle saprophytisch leben. Die vegetativen Zustände sind hautlose bewegliche Protoplasmamassen, die Plasmodien. Die Plasmodien können zu bedeutender Größe heranwachsen.

Die Sporen werden entweder frei oder in geschlossenen Fruchtkörpern gebildet. Diese Fruchtkörper sind sehr verschiedenartig und meistens klein. Sie keimen zu Schwärmern aus, die wieder zu beweglichen Amöben werden; diese Amöben endlich schließen sich wieder zu Plasmodien zusammen.

Die Schleimpilze kommen in großer Zahl während der ganzen Vegetationsperiode überall da vor, wo pflanzliche Reste faulen, sei es im Walde an abgefallenem Laube, an Baumstümpfen,

sei es im Garten am Komposthaufen oder auf Feld und Wiese an gemähtem Gras und Getreide in Regenzeiten. Nur ganz wenige sind Parasiten.

Meist werden die Fruchtkörper gefunden, und auch sie in der Regel erst bei genauerem Suchen. Nur wenige Arten können ohne Lupe gesehen werden, es bleibt oft nichts anderes übrig, als Laub und morsches Holz mit der Lupe abzusuchen.

Unmittelbar nach warmen Regen kommen auch die Plasmodien ans Tageslicht, während sie sonst unter Laub und in morschen Baumstümpfen vegetieren. Zwar gibt es auch größere Plasmodien, in der Regel sind sie aber klein. Oft findet man sie in der Umwandlung zu den Fruchtkörpern. Diese Umwandlungsstadien bringt man selten unverändert nach Hause, noch während des Transportes vollzieht sich häufig die Reifung des Sporangiums.

Wenn man kein Sammlerglück hat, versuche man Rohkulturen. Im Spätsommer und im Herbst trage man allerhand faulende Substrate - Laub, Nadeln, faulendes Heu, Stroh, alte Gerberlohe, alten Mist von Misthaufen usw. - nach Hause. Unter der Glasglocke kommen dann etwa vorhandene Schleimpilze zum Fruchten.

Das Sammeln aller Formen von Schleimpilzen hat mit großer Sorgfalt zu geschehen. Am besten versieht man sich mit einer Anzahl kleiner Glastuben, leeren Zündholzschachteln und ähnlichen Behältern. Zustände, die man sich zu erhalten wünscht, gibt man bereits am Fundort in das Fixiermittel in engen Glastuben, damit durch Schütteln nicht zuviel verdorben wird. Sporentragende Sporangien gibt man in leere Glastuben, damit man zu Hause die Sporen zu Zuchtversuchen und zur Präparation zur Verfügung hat.

§ 379. Fixierung der Schleimpilze. Dazu stehen eine Reihe von Fixiermitteln zur Verfügung, die hier angeführt werden. Welches bei den einzelnen Zustandsformen der Schleimpilze anzuwenden ist, wird dann bei den Übungsbeispielen erwähnt werden.

1. Chromessigsäure nach *Flemming*, die nach *Straßburger* hier am besten folgende Zusammensetzung hat:

Chromsäure	0,7 g
Essigsäure	0,3 g
Wasser	100 ccm

   Die Fixierdauer ist 24 Stunden. Dann erfolgt Übertragung in 20 %igen Alkohol und weiter steigend in Alkohol usw.

2. Absoluter Alkohol.
3. Konzentrierte wässerige Pikrinsäure, auch Pikrinschwefelsäure.
4. Alkoholische Sublimatlösung.
5. *Zenkersche* Flüssigkeit.
6. Osmiumsäure, 2 %ige wässrige Lösung und auch in Dampfform.
7. *Flemmings* schwache Lösung.
8. Formalin.
9. Formalin-Alkohol

§ 380. Einbetten und Schneiden.

1. Paraffin: Besonders für Formen wie reife, festere Fruchtkörper. Einbetten über Zedernöl.
2. Zelloidin: Für weichere, gallertartige Formen wie Plasmodien, unreife Fruchtkörperzustände. Die Zelloidinblöcke werden in Terpineol behandelt und mit Terpineol geschnitten. Statt Terpineol kann man auch Glycerin anwenden.
3. Gummi arabicum: Behelfsmäßiges Einbetten kleinerer Stücke.

§ 381. Färbungsmethoden. Zum Färben stehen zur Verfügung:

1. Hämatoxylin, möglichst alte Lösungen nach *Ehrlich, Delafield, Rawitz*.
2. Basische Anilinfarben wie Gentianaviolett, Methylgrün, Malachitgrün, Methylenblau, Chinolinblau.
3. Saure Anilinfarben wie Säurefuchsin, Pyronin, Azokarmin B, Orseillin BB, Lichtgrün.
4. Pikrokarmin-Anilinblau.
5. Goldimprägnation.
6. Giemsa und Eisenhämatoxylin für Sporenfärbungen

§ 382. Einschließen. Glyceringelatine, Hausenblasengallerte nach *Behrens* für ganze Fruchtkörper. Zedernöl, Venetianer Terpentin, Caedax für Schnitte, Ausstriche von Sporen und für Plasmodien.

B. Ausgewählte Übungsbeispiele zur Bearbeitung der Schleimpilze

§ 383. Das Sporangium hat die verschiedensten Formen und Größen. Auf den ersten Blick hin erscheint es in der Regel einfach, und erst das unter dem Mikroskop betrachtete Objekt enthüllt den komplizierten Bau des Kapilitiums, der Sporen, der Kalkinkrustation usw.

1. Arten des Sporangiums. Außenständige Sporangien an säulenförmigen Fruchtkörpern, die zu mehreren zusammenstehen, finden sich bei *Ceratomyxa mucida*. Dieser Pilz ist etwa 1 mm hoch und schleimig. Er findet sich häufig an faulenden Fichtenstümpfen.

Färbung: Säurefuchsin nach Fixierung mit *Pfeiffer* oder auch Pikrinsäure.

Sporen innerhalb von Sporangien, die wenigstens in der Jugend geschlossen sind, finden sich bei allen anderen Vertretern. Einfache kugelige, birnenförmige oder längliche Sporangien auf Stielen haben *Cibraria*-Arten (auf faulem Holz), *Lamproderma*-Arten (faules Holz, Laub), *Craterium, Diderma, Physarium*. Sporangienbüschel an Stielen haben *Badhamia, Leocarpus*; sitzende kugelige Sporangien weisen auf *Diderma spumarioides*. Sitzende, miteinander verwachsende Sporangien, sogenannte Aethallien, bilden *Amaurochaete, Brefeldia, Lindbladia, Mucilago spongiosa*. Ein Aethalium bildet gewissermaßen einen Sorus von Sporangien.

Plasmodiokarpien - wurmförmige Fruchtkörper, welche die einzelnen Sporangien nicht erkennen lassen - hat *Physarium*.

2. Reife Sporangien fixieren wir in Formalin, auch in Formalin-Alkohol. Nach dem Wässern muß das Überführen in Glycerin vorsichtig durch Eindunsten geschehen. Bei den Schleimpilzen hat sich besonders die *Hantsche* Flüssigkeit bewährt (105):

Glycerin	10 ccm
Destilliertes Wasser	20 ccm
Methylalkohol	30 ccm

(105) Schinz, *Myxogasteres* in Rabenhorst Kryptogamenflora, X. Abteilung, Leipzig, Akademische Verlagsgesellschaft, 1920, S.76

Die Objekte kommen entweder aus Wasser oder aus verdünntem Alkohol in die *Hantsche* Flüssigkeit. Bei staubfreiem Verdunsten von Wasser und Methylalkohol bleiben die Objekte schließlich schrumpfungsfrei im Glycerin liegen.

Der Einschluß erfolgt nun entweder *in toto* in Glyceringelatine oder als Zupfpräparat in Liquido *Faure*. Manche kleine Objekte können mit Teilen der Unterlage eingeschlossen werden, geben aber dann nur Präparate für Lupenbetrachtung im Auflicht ab. Liquido *Faure* zeigt be-

sonders schön die Sporen und die Capilitiumsfasern sowie die Peridie. Hier sind Zupfpräparate oft schöner und instruktiver als Schnitte.

3. Manche Arten der Schleimpilze haben besondere Einschlüsse. *Dictydium cancellatum*, das in Deutschland überaus häufig ist, hat auf der Sporangienwand zerstreute Granulationen, sogenannte Dictydinkörner.

4. Die Capilitiums-Fasern haben die mannigfachste Form und Ausbildung. Z.T. sind sie freie Elateren oder miteinander verbundene Röhren und Fasern. In letzterem Falle sind oft Kalkkörper oder Knoten aus kohlensaurem Kalk als kugelige oder sternförmige Kristallkonkremente vorhanden. Vielfach ist das Capilitiums-Netz mit einer Columella fest verbunden.

Die Kalkkörper können gesondert dargestellt werden. Nach *Straßburger* färben sich Kalkinkrusten folgendermaßen:

a) mit Goldchlorid rot bis blauviolett
b) mit Eisenvitriol rostrot
c) mit Nickelsulfat blaßgrün
d) mit Kobaltchlorid lila
e) mit Silbernitrat schwarz

Man behandelt die in Wasser liegenden Zupfpräparate mit einer dieser Metallsalzlösungen. Meistens wird die blaßgrüne Nickelfärbung die geeignetste sein.

5. Unreife Sporangien mit allen Übergängen aus den Plasmodien werden an Schnitten untersucht und zeigen das Werden der Sporen, der Columella und der Capilitiums-Fasern, die alle aus Amöben entstehen.

Fixierung: Man kann mit und ohne Erhalt der Kalkkörperchen fixieren, einbetten und schneiden. Wenn man den Kalk erhalten will, ist jede freie Säure zu vermeiden; im Interesse der Mikrotommesser verzichtet man jedoch besser auf die Erhaltung der Kalkkörperchen. Da es sich um die Erhaltung von zytologischen Einzelheiten handelt, ist die Fixierung darnach einzurichten. Man wendet *Pfeiffers* Gemisch, Chromessigsäure nach *Flemming*, die *Flemmingschen* Gemische oder die Mannheimer Mischung an.

Einbetten: Am besten in Paraffin. Schnitte von 5-10µ.

Färben: Mit Hämatoxylin-Eosin, Eisenhämatoxylin-Säurefuchsin, Goldimprägnation, Magdalarot-Lichtgrün oder Anilinblau, *Becher*-Farben.

6. Sporen und Sporenkeimung. Die Untersuchung der Sporen stößt auf keine Schwierigkeiten.

7. Sporenfärbung. Die Sporen werden in Wasser verteilt und auf den Objektträgern ausgestrichen, eventuell unter Zuhilfenahme von Eiweiß. Fixieren mit Osmiumsäuredämpfen oder Joddämpfen. Färben mit Goldimprägnation, mit Giemsa oder mit basischen Anilinfarben und Gegenfärben mit komplementären sauren Farben. Auch *Delafields* Hämatoxylin mit Nachfärbung von Säurefuchsin empfiehlt sich.

8. Sporenkeimung. Die Sporen sind meistens irgendwie gefärbt. In der Größe schwanken sie zwischen 5 und 20µ. Ihre Oberfläche ist verschieden gestaltet. Bei *Ceratomyxia* sind die Sporen vierkernig, bei allen anderen Arten einkernig.

Die Keimung ist ein Herausschlüpfen des protoplasmatischen Inhaltes aus der Sporenmembran, die im Wasser einreißt. Aus der Spore tritt ein Schwärmer aus.

Den Keimversuch macht man im hängenden Tropfen mit Brunnenwasser. Die Keimung erfolgt innerhalb von 30 Minuten bis mehreren Stunden. Zur Aussaat benützt man frische, eben reif gewordene Sporen. Sporen von Herbarmaterial keimen nicht mehr. Leider keimen durchaus nicht alle Sporen, die man auffindet. Am leichtesten keimt *Didymium difforme*.

Die Untersuchung dieser Schwärmer ist sehr schwierig. Der Tropfen wird ausgestrichen und mit Osmiumsäuredämpfen fixiert. Gefärbt wird mit Eisenhämatoxylin unter Nachfärbung mit Säurefuchsin oder mit Giemsa. Zu sehen sind Schwärmer mit und ohne Geißeln und die zytologischen Einzelheiten.

§ 384. Das Plasmodium.

1. Hat der hängende Tropfen ergeben, daß ein bestimmtes Sporenmaterial keimfähig ist, kann man versuchen, Plasmodien zu ziehen. Die Kultur ist in einem größeren Gefäß, etwa einer Petri-Schale anzusetzen. Man gibt etwas von dem Substrat mit den gefundenen Sporen hinein und füllt etwas Wasser auf. Die Kultur ist nicht steril. Die entwickelnden Bakterien geben das Futter ab für die Amöben und Plasmodien.

2. Besonders geeignet für Kulturen ist nach *Constantineanu* (106) folgende Nährlösung:

Destilliertes Wasser	100	ccm
Knopsches Nährsalz	1	g
Dextrin	5	g
Glukose	0,5	g

Die Flüssigkeit soll im Kulturgefäß nicht höher stehen als 1 cm; ein halber Zentimeter dürfte im allgemeinen das Richtige sein. Man kann auch Filtrierpapier mit dieser Lösung befeuchten und dann mit einer Glasschale bedecken.

Die Schwärmer verlieren bald ihre Geißeln, vermehren sich durch Teilung und gehen in Amöben über. Diese Amöben wiederum vereinigen sich zu Plasmodien. Das Plasmodium, das im allgemeinen sehr lichtscheu ist, ist beweglich. Nach einiger Zeit bilden sich wieder Fruchtkörper.

Außer dem oben bereits erwähnten *Didymium* kann man auch bei den meisten Arten von *Physarium, Amaurochaete, Stemmonitis* auf Keimung rechnen.

Gewöhnlich wird in der Literatur folgender Weg zur Gewinnung von Plasmodien angegeben: Infiziertes Material, z.B. Blätter, Mist, auch Stengel der Saubohne oder morsches Holz werden in größeren Schalen, die mit Fließpapier ausgeschlagen sind, mit einer Glasglocke zugedeckt und feucht gehalten. Nach einigen Tagen erscheinen die Fruchtkörper, wenn eben keimfähige Sporen oder bereits Amöben vorhanden sind. So prompt und sicher wie manche Aufsätze es erscheinen lassen, tritt der Erfolg aber nicht ein. Wenn Fruchtkörper aufgetreten sind, lassen sich nicht nur Schwärmer, sondern auch Amöben im hängenden Tropfen gewinnen; dazu wird kein destilliertes Wasser, sondern ein wässeriger Auszug aus den Substraten verwendet.

(106) Constantineanu, Ann. Mycol. IV, 1906, S.49

§ 385. Präparation der Amöben. Die amöbenhaltigen Medien werden auf mit Eiweiß bestrichenen Objektträgern ausgestrichen, fixiert und gefärbt. Zum Färben benützt man wie bei den Schwärmern

a) Eisenhämatoxylin mit Säurefuchsin oder Erythrosin.
b) Alaun-Glycerin-Hämatein nach *Rawitz*.
c) Giemsa-Färbung.
d) *Straßburger* rühmt besonders die Färbung nach *Laveran* mit *Borrels* Blau (107). Die Ausstriche werden 10 Minuten lang mit absolutem Alkohol fixiert und dann gefärbt mit folgender Mischung:

Destilliertes Wasser	6 ccm
Borrels Blau	1 ccm
Wässrige Eosinlösung, 0,1 %ig	4 ccm

Die gefärbten Präparate werden mit 5 %iger wässriger Tanninlösung differenziert und gebeizt. Es zeigen sich das Endoplasma violett, das Ektoplasma blau, der Zellkern purpurn, Vakuolen, Bakterien blau.

e) Eine weitere dankbare Färbung ist die mit Boraxkarmin oder *Delafieldschem* Hämatoxylin.

(107) *Borrels* Blau besteht aus 100 ccm destilliertem Wasser, 1 g Methylenblau, 1 g Silberoxid. Diese Mischung läßt man im Dunkeln 3 Wochen lang reifen. Gelegentlich durchschütteln, am Schlusse vor Gebrauch durch Glaswolle filtrieren.

§ 386. Präparation der Plasmodien. In Kulturen wird es nicht allzu häufig gelingen, Plasmodien zu erhalten. Kleine Plasmodien können, wenn sie auftreten, als Totalpräparate verarbeitet werden.

Färbung erfolgt mit *Becher*-, Karmin- oder Hämatoxylinfarben.

Am ehesten erhält man Plasmodien noch durch Sammeln. Unmittelbar nach warmen Regen findet man sie in den Wäldern. Es sind schleimige Klumpen, weiß, gelb, gelbrot, purpurrot. Zuerst sind sie heller gefärbt, später werden sie dunkler. Die Größe schwankt zwischen wenigen Quadratmillimetern bis zu einem Quadratmeter, z.B. bei *Fuligo septica*.

Manchmal gelingt es, daheim auf dem Objektträger oder in einer Petri-Schale von abgeschnittenen Stückchen von Plasmodien kleine Tochterplasmodien zu erhalten, die sich zu Totalpräparaten eignen.

Die vorgefundenen Plasmodien fixiert man nun in Stückchen in Sublimat-Eisessig, Formalin-Alkohol, Chromessigsäure. Dann fertigt man nach Einbettung in Paraffin 5µ dicke Schnitte an und färbt nach zytologischen Methoden mit Eisenhämatoxylin, Goldimprägnation, Safranin-Gentianaviolett-Lichtgrün. Man kann natürlich auch einfache Karmin-, *Becher*- und Hämatoxylinfärbungen vornehmen.

§ 387. Parasitische Plasmodien

1. Einige wenige Schleimpilze sind Parasiten. Sie bewohnen in Form von Amöben und Plasmodien höhere Pflanzen. Die Plasmodien verwandeln sich noch innerhalb der Wirtspflanzen in einen Sporenhaufen. Die befallenen Pflanzenteile werden in Gallen verwandelt.

2. *Plasmodiophora brassica* ist häufig in Kohlarten, Rettich, Rüben; sie verursacht bei diesen Pflanzen die Kohlhernie. Material bekommen wir leicht von Kleingärtnern. Zu untersuchen ist Material vom Frühjahr, Sommer und Herbst in den verschiedenen Entwicklungsstadien.

3. *Sorosphaera veronica* bildet Gallen und Verbiegungen an Stengeln von *Veronica*-Arten. Zu untersuchen sind die aufgetriebenen Teile.

Fixierung: Trichloressigsäurehaltige Fixiermittel, Pikrinsäure, Chromessigsäure.
Färbung: Grüne oder blaue *Becher*-Farben mit Orseillin BB als nachfolgende Plasmafärbung, zytologische Färbungen mit Safranin-Gentianaviolett-Lichtgrün, Goldimprägnation-Lichtgrün, Eisenhämatoxylin-Säurefuchsin.

Man bettet am besten in Paraffin ein und fertigt Schnitte von 5-10µ an. Zelloidinschnitte sind für zytologische Untersuchungen zu dick.

II. Unterabteilung: ALGENPILZE - PHYCOMYCETES

A. Allgemeines

§ 388. Die Algenpilze sind so klein, daß sie meistens erst mit der Lupe entdeckt werden. Trotzdem ist es nicht schwierig, Material zu erhalten. Die wasserbewohnenden Arten - Abwasserpilze oder Saprophyten und die Bewohner toter, verwesender Kleintiere - können leicht durch Kulturen erhalten werden. Die parasitischen Formen lassen schon durch auffallende Veränderungen der befallenen Pflanzen ihr Vorhandensein erkennen.

Die Algenpilze sind dadurch ausgezeichnet, daß sie eine geschlechtliche Vermehrung zeigen. Wir untersuchen aus den beiden Gruppen der *Oomyceten* und der *Zygomyceten* einige Vertreter.

§ 389. Fixierung und Färbung. Die Untersuchungstechnik bereitet keine Schwierigkeiten. Die Wasserformen werden mit formalin- oder sublimathaltigen Fixiermitteln fixiert. Das hat den nicht zu unterschätzenden Vorzug, daß das Material zugleich desinfiziert wird. Färberisch bestehen gar keine Schwierigkeiten, die Pilze färben sich fast mit allen Farbstoffen. Die parasitischen Formen werden mit *Pfeiffers* Gemisch, mit Chromessigsäure, mit Formalinalkohol oder mit Trichloressigsäure fixiert.

Die Schimmelpilze untersucht man zunächst ungefärbt mit der *Abelschen* Flüssigkeit, eventuell werden sie auch ungefärbt eingeschlossen. Vergleiche § 360 Ziff. 2.

B. Ausgewählte Beispiele zur Bearbeitung der Algenpilze

1.Oomyceten

§ 390.

1. Untersuchungsmaterial von Oomyceten zu erhalten ist nicht schwierig, solange man es nicht unbedingt auf ein bestimmtes Material abgesehen hat. Die Oomyceten sind sehr artenreich und die eine oder andere Form findet man sicher, wenn man sein Augenmerk auf die bevorzugten Wohnplätze richtet.

Die kleineren Oomyceten findet man an Pollen verschiedener Pflanzen in Waldtümpeln, auf größeren Oomyceten wie Saprolegnien, an *Euglena* und anderen Flagellaten. Notfalls versuchen wir Rohkulturen, indem wir Pollen von Kiefern zu Hause mit Sumpfwasser von Waldtümpeln übergießen und einige Tage stehen lassen. Auch höhere Pflanzen kommen als Wohnstätten in Betracht. *Synchytrium*-Arten finden sich als gelbe oder rote Punkte in Gallen an Blättern von *Taraxacum officinale*, an *Lysimachia nummularia*, an *Gagea*-Arten, an *Anemona nemorosa*, an *Viola veronica*, *Myosotis palustris* und ähnlichen Phanerogamen.

2. *Synchytrium endobioticum* verursacht den gefürchteten Kartoffelkrebs. Material darüber ist von der Landwirtschaft oder von Staatlichen Saatzuchtanstalten zu erhalten, die mit der Prüfung von Saatgut betraut sind.

3. *Olpidium brassicae* kommt in den Zellen junger Kohlpflanzen vor, die dadurch faulen und umfallen. Die veränderten Pflanzenteile werden mit Formalin, Formalinalkohol oder besser mit Chromessigsäure, Trichloressigsäure oder Sublimateisessig fixiert.

Schnitte färbt man dann mit Hämatoxylin-Eosin, Safranin-Lichtgrün, Goldimprägnation oder mit *Becher*-Farben, Eisenhämatoxylin-Säurefuchsin oder der Vierfachfärbung nach *Johannsen*. Zu sehen ist dann der Parasit in seinen verschiedenen Stadien.

Beim Kartoffelkrebs sind im besonderen zu sehen:

An Sommermaterial: Dünne, nicht polygonale Zellen.

An Herbstmaterial: Große Zellen, körniges Plasma, Sorus in Zoosporenbildung.

Die Tumoranlage der Kartoffel zeigt sogenannte Rosetten, die verholzte Reaktionsprodukte des Wirtes sind. Sie färben sich schön mit Safranin-Lichtgrün.

Die größeren Oomyceten sind sehr leicht zu beschaffen. Man kann sich mit Sicherheit in kürzester Zeit fast alle der folgenden Materialien zu Übungen verschaffen. .

4. Wasserpilze. Wasserbewohnende Phykomyceten müssen mit einem Köder eingefangen werden. Äpfel, Rüben, Zweigstücke, verschiedene tote Wasserpflanzen werden in Netzen (sogenannte Ballnetze der Kinder) in ungefähr 0,5 m Tiefe in Teichen, Bächen und Gräben für zwei Wochen versenkt und am Lande verankert, so daß sie bequem wieder an Land gebracht werden können. An solchen Ködern sammelt sich nun eine mannigfache Pilzflora an.

5. Abwasserpilze. Die verschmutzten Abwässer der Großstädte und mancher Fabriken (Zuckerfabriken, Stärkefabriken) stellen ganz ergiebige Fundstätten für Kleinpilze dar. Gesammelt werden sie am Köder, wie es unter 4. angegeben ist. Diese Abwasserpilze sind noch recht wenig durchforscht; insbesondere seien Großstädter auf dieses Spezialgebiet hingewiesen!

6. *Saprolegnia*-Arten und verwandte Arten wie *Achlya, Leptomitus* und *Aphanomyces* leben in Sumpf- und Faulwasser. Dort bevölkern sie neben faulenden Pflanzenresten insbesondere die Leichen von Kleintieren wie Würmern und Insekten. *Saprolegnia*-Arten kommen in Karpfenteichen und bei Aquarienfischen vor.

Manchmal trifft man *Saprolegnia*-Rasen bei Exkursionen im Freien an. Am sichersten erhält man sie durch Kultur. Sumpfwasser oder Wasser aus mit Fäkalien verunreinigten Gräben wird daheim in Glaswannen aufgestellt. Als Köder verwendet man tote Ameisen, Fliegen, Mücken, Blattläuse oder besser ganz kleine Stückchen Fleisch und gekochtes Hühnereiweiß. Nach einigen Tagen zeigen sich *Saprolegnia*-Rasen, die natürlich keine Reinkultur sind.

Reinkulturen von *Saprolegnia* sind nicht schwierig zu erreichen. Unter dem Binokular isoliert man Hyphen einer bestimmten Art und überträgt sie zunächst in eine Gelatinetropfenkultur (5 %ige Gelatine) in hohlgeschliffenen Objektträgern. Nach 48 Stunden impft man auf sterile Kulturmedien über. Als Kulturmedien kann man Abkochungen von Erbsen (5 g Erbsen in 100 ccm Wasser), 1 %igen Peptonagar oder 1 %ige Peptongelatine verwenden. Die Reaktion der Nährmedien soll neutral, höchstens schwach alkalisch, aber nicht sauer sein.

Untersuchungstechnik: Die Wasserpilze werden fixiert mit Formalin, Jodwasser, Chromessigsäure oder schwachem *Flemmingschen* Gemisch.

Saprolegnia kann man an kleinen Tieren wie Ameisen usw. mit diesen nach dem Formalinpreßverfahren nach *Schmelzer* fixieren.

Alle Wasserpilze können in Kollodiumhäutchen eingeschlossen werden.
Zur Färbung kann man Pikrokarmin-Anilinblau, Hämatoxylin nach *Delafield, Rawitz, Böhmer*, Magdalarot-Anilinblau, Safranin-Lichtgrün, Methylenblau, auch Giemsa, Eisenhämatoxylin-Säurefuchsin, Goldimprägnierung und verschiedene *Becher*-Farben verwenden.

7. *Peronospora*, *Albugo*, *Phytophtora*. Zu den Oomyceten gehören noch einige überaus häufige und schädliche Parasiten.

Peronospora bildet den falschen Mehltau der Rüben, der Luzerne und anderer Kleearten. Auf dem Weinstock kommt an den Blättern *Plasmopara viticola* vor, der falsche Mehltau der Rebe. An Hopfenblättern finden wir im Frühjahr *Pseudoperonospora humuli*, wo es rotbraune winkelige Flecken erzeugt.

Bei all diesen Arten finden sich Oosporen im ergriffenen Gewebe gegen Ende der Entwicklung. Das Mycel in den Geweben weist kleine kugelförmige oder längere verzweigte Haustorien auf. Zur Untersuchung sind Schnitte durch die Blätter nötig.

Albugo candida ist gemein auf allen oberirdischen Teilen von Cruciferen. Es bildet dort den weißen Rost. Besonders häufig ist der Parasit auf dem Hirtentäschel *Capsella bursa-pastoris*.

Phytophtora. Die wichtigste Art ist *P. infestans* auf den Blättern der Kartoffel. Besonders in feuchtwarmen Sommern ist der Pilz sehr verbreitet. Andere Arten sind *P. fagi* auf Buchenkeimlingen, *P. spinacia* auf Spinat und *P. sparsa* auf Rosen.

Kartoffelblätter mit braunen Flecken werden zu Hause in ein Wasserglas gestellt und dieses mit einer Glasglocke zugedeckt. In dieser improvisierten feuchten Kammer zeigt sich bald ein weißer Schimmel auf den befallenen Blättern.

Die Luftäste der *Phytophtora* werden in *Abelscher* Flüssigkeit untersucht und von da aus wie Schimmelpilze entweder ungefärbt oder nach Färbung in Glyceringelatine, in Lävulosegelatine nach *Heringa* und *ten Berge* eingeschlossen.

Blätter werden mit *Pfeiffer* oder Chromessigsäure fixiert. Auch *Flemmings* Gemisch oder die Mannheimer Mischung sind angebracht.

Schnitte werden gefärbt mit Alizarinviridin oder anderen *Becher*-Farben, Safranin-Gentiallaviolett-Orange G (Lichtgrün), Orseillin BB in *Sartoryscher* Flüssigkeit, Goldimprägnation.

Über die Färbung der Hyphen innerhalb der ganzen Blätter siehe auch § 367: Färbemethoden der niederen Pilze.

2. Zygomyceten

§ 391.

1. Zygomyceten sind überaus leicht zu erlangen. Sie wachsen auf Mist, Brot, Kartoffeln, Hutpilzen, sobald diese Objekte zu faulen beginnen. Einige kommen auch auf Insekten vor. Wir untersuchen Arten der Gattungen *Mucor, Rhizopus, Pilolobus, Sporodillia* und *Empusa*.

Mucor, Pilolobus und *Rhizopus* finden sich auf jeder Rohkultur von Schimmelpilzen ein. Ebenso reichlich erhält man sie, wenn man Pferdemist (frisch abgesetzten, noch geballten Mist) oder Rindermist unter Glasglocken feucht hält. Die Anlage dieser Rohkulturen ist einfach. Außer den bereits genannten Mistsorten kann man auch Mist von Schweinen, Rehen, Hasen, Kaninchen, weniger von Fleischfressern verwenden. Dieser Mist wird angefeuchtet auf eine Unterlage von Fließpapier oder Sägespänen (besonders für Rindermist geeignet) verbracht und mit einer Glasglocke überdeckt. Die Kulturen halte man bei Zimmertemperatur. Im Brutschrank wachsen wieder andere Arten als bei Kultur im Zimmer. Man wird in jedem Fall eine reichliche Pilzflora erhalten. Zuerst erscheinen *Mucor*-Arten, später tritt *Pilolobus* auf. Anschließend finden wir Ascomyceten und nach 4 Wochen gegen Schluß zeigen sich einige Basidomyceten wie *Coprinus*.

2. *Mucor mucedo* ist eine der prachtvollsten Schimmelformen. *M. racemosus* tritt auf Brot und anderen faulenden pflanzenresten auf. Er ist bräunlich. *M. ramannianus* kommt häufig in der Walderde vor. Seine Rasen sind rosenrot. Man erhält ihn, wenn man Gelatineplatten mit Walderde beimpft.

Die Mucorineen bilden in der Regel Sporangien mit vielen Sporen. Außerdem kennt man Zygosporen, die auftreten, wenn zwei verschiedengeschlechtliche Mucorhyphen miteinander kopulieren können. Die Bedingungen des Auftretens von Zygosporen sind noch nicht genau bekannt. Am sichersten erhält man sie in Massenkulturen auf Mist, da hier die verschiedensten Sporen ausgekeimt sind. Die beste Zeit für diese Kultur ist das Frühjahr.

Wenn eine Mistkultur gutes Wachstum zeigt, störe man sie gar nicht und sehe erst nach einer Woche nach, ob sich Zygosporen, das sind schwarze, stachelige Kugeln, bilden. Die Zygospore ist ein Ruhestadium der Pflanze.

Mucor racemosus bildet in gärfähigen flüssigen Medien durch Sprossung Gemmen wie die eigentlichen Hefepilze.

3. *Sporodinia* kommt zerstreut an fleischigen Hutpilzen vor, wenn sie zu faulen beginnen. *Sporodinia* zeigt immer eine große Anzahl von Zygosporen, so daß das Objekt die auf das Suchen verwandte Mühe reichlich lohnt. Manchmal erscheint es auf Rohkulturen von Hutpilzen unter der Glasglocke.

4. *Pilolobus cristallinus*, der Schleuderschimmel, erscheint ziemlich häufig unter der Glasglokke auf Pferdemist. Die Sporangien werden mit großer Gewalt dem Licht entgegengeschleudert.

5. *Empusa muscae* findet sich auf der Stubenfliege im Herbst. Man sammelt Fliegen ein, die noch nicht getrocknet und mit dem Sporenhof umgeben sind.

Die Untersuchungstechnik ist einfach: Lebenduntersuchung in der *Abelschen* Flüssigkeit.

Fixierung erfolgt durch Sublimatalkohol, Jodalkohol oder *Pfeiffers* Gemisch. Die Fliegen werden mit der *Gilsonschen* Mischung fixiert.

Färbung: Totalfärbungen mit *Becher*-Farben, Pikrokarmin-Anilinblau, Magdalarot-Anilinblau und die übrigen ähnlichen Färbungen.

Schnitte durch Pilolobus färbt man mit Eisenhämatoxylin-Säurefuchsin, Goldimprägnation-Lichtgrün, Hämatoxylin-Eosin, *Delafields* Hämatoxylin.

Wo es die Färbung gestattet, bette man in Glyceringelatine oder Lävulosegelatine nach *Heringa* und *ten Berge* ein. Der Einschluß in Harzen ist auch möglich. Nur halten die Köpfchen der Mucorineen in Totalpräparaten das Wasser hartnäckig fest. Vor dem Einschließen in Caedax, Venetianer Terpentin usw. müssen die Objekte *mehrere Monate* in Alkohol und Karbolxylol gelegen haben, damit die Köpfchen sicher entwässert sind. Darauf wies besonders auch *Schmelzer* hin (108)

(108) Schmelzer, Mikroskopie für Naturfreunde XI, 1933, Heft 9

III. Unterabteilung: NIEDERE BASIDOMYCETEN

A. Allgemeines

§ 392. Die niederen Basidomyceten treten bereits im Frühjahr auf, sobald die Blätter erscheinen, und verschwinden auch erst im späten Herbst, wenn die Blätter fallen. Untersuchungsmaterial gibt es daher in Hülle und Fülle wie überall bei den Pilzen. Die reichste Ausbeute bieten Felder, Wiesen, Waldränder. Der Wald selbst beherbergt wenige Formen.

Die meisten Parasiten fallen dadurch auf, daß die Blätter der Wirtspflanzen irgendwelche Flecken zeigen, gelbliche, rötliche, graue, braune und schwarze. Am deutlichsten sind die Flekke auf den Blattunterseiten. Die Getreidefelder beherbergen die Brandpilze, die ohne weiteres dem Auge auffallen. Am besten ist es immer, gleich an Ort und Stelle Stücke der befallenen Pflanzen in die Fixierungsflüssigkeiten zu legen.

§ 393. Fixierung. Zum Fixieren benützen wir Chromessigsäure, Trichloressigsäure, Formalinalkohol, *Pfeiffer*, Jodalkohol und Osmiumsäuredämpfe. Chlorophyllerhaltende Fixierungen vgl. § 66.

§ 394. Färbungen. Die Färbung bietet keine Besonderheiten. Es können alle in § 366 für Kleinpilze angeführten Färbungen angewendet werden. Auch die Vierfachfärbung nach *Johannsen* ist vielfach am Platze; siehe § 176.

B. Ausgewählte Übungsbeispiele zur Bearbeitung der niederen Basidomyceten

a. Brandpilze

§ 395.

1. Die Brandpilze (*Ustilagineen*) sind von hoher wirtschaftlicher Bedeutung. Sie werden daher von der Landwirtschaft systematisch und energisch bekämpft. Trotzdem findet man in jedem Feld bei einiger Aufmerksamkeit einige brandige Ähren, besonders bei Gerste und Hafer.

2. Sporen. Zunächst untersuchen wir die Sporen brandiger Ähren. Die Ähren werden mit den Sporen in *Pfeiffer* oder Formalinalkohol fixiert und dann erst zerzupft. Nach dem Auswaschen werden die Sporen langsam in Glycerin übergeführt, gegen das sie sehr empfindlich sind und in dem sie leicht schrumpfen. Man bringt sie daher in 20 ccm Wasser und 1 ccm Glycerin und läßt freiwillig unter Staubschutz bis auf das Glycerin verdunsten. Dann kann man die Sporen in

Glyceringelatine, Liquido *Faure*, Lävulosegelatine nach *Heringa* und *ten Berge* einschließen. Die dunkleren Sporen schließt man besser in Liquido *Faure* ein, in dem sie sehr aufgehellt werden. Die Sporen haben mannigfache Formen und sind für jede Art typisch.

Keimversuche: Die Spore keimt zu einem fadenförmigen Schlauch, dem Promycel aus, das seinerseits Konidien bildet. In der Natur überwintern die Sporen im Boden oder in den Getreidespeichern und keimen erst im Frühjahr aus, wenn die gebildeten Konidien Gelegenheit haben, junge Keimpflanzen zu infizieren. Bei manchen Arten werden erst die Blüten infiziert (*Ustilago tritici*), hier sind die Sporen schon im Getreidekorn vor der Aussaat enthalten.

Für Kulturen ist Bierwürze die geeignetste Flüssigkeit. Man legt die Kulturen auf Objektträgern oder Uhrgläsern an. Die Brandsporen keimen fruktifikativ, sie sind daher als Chlamydosporen anzusehen. Die an den Basidien entstehenden Konidien keimen zu hefeähnlichen Sproßkonidien aus.

Die Verarbeitung des gekeimten Materials auf Präparate erfordert besondere manuelle Geschicklichkeit. Man streicht die an gekeimten Stadien reiche Bierwürze entweder aus oder man bringt kleine Tropfen auf einen Objektträger. Zweckmäßig hat man ihn vorher dünn mit Eiweiß präpariert. Die Objektträger dürfen nicht völlig trocken werden, sondern werden in Formalindämpfen fixiert.

Nach dem Fixieren werden die Ausstriche wie Schnitte weiterbehandelt. Die Fixierung kann auch mit Joddämpfen und nachträglichem Erhärten der Eiweißschicht in Formalin erfolgen. Sehr zweckmäßig ist hier die Anbringung eines Kollodiumhäutchens. Die Keimstadien lassen sich nun färben. Dazu empfehlen sich *Delafields* Hämatoxylin, Hämalaun-Eosin (Säurefuchsin), Goldimprägnation-Lichtgrün oder Eisenhämatoxylin.

3. Histologische Untersuchungen. Durch befallene Körner können natürlich auch Schnitte angelegt werden. Wir untersuchen aber vor allem auch noch nicht völlig veränderte Körner. Bei Ähren, die eben aus den obersten Blattscheiden herauskommen, ist die Samenschale dunkelgrün und nach oben stark verdickt; an der Stelle der Samenknospe erscheint ein knäuelartiges, dicht verschlungenes Mycelgeflecht. Besonders geeignet für Untersuchungen sind mit *Tilletia tritici* befallene Weizenkörner.

Fixierung: *Pfeiffer*, Formalinalkohol, Trichloressigsäure.

Einbetten: Am besten Zelloidin. Der Block wird mit Glycerin oder Terpineol behandelt.

Färbung: Schnitte mit gefärbten Sporen werden nur einer Kontrastfärbung mit einer sauren Farbe wie Lichtgrün oder Säurefuchsin unterzogen. Sonst empfehlen sich *Delafields* Hämatoxylin-Säurefuchsin, Goldimprägnation nach *Nabias*-Lichtgrün.

Für Paraffinschnitte, die aber eines Kollodiumschutzhäutchens bedürfen, gab *H.Kockegey* (109) für Körner mit Jugendformen der Brandpilze eine sehr schöne Färbung bekannt:

Zur Durchführung benötigt man folgende drei Lösungen:

1.	Destilliertes Wasser	10 ccm
	Alkohol 96 %ig.	10 ccm
	Nigrosin	0,l g
2.	Destilliertes Wasser	10 ccm
	Alkohol 96 %ig	10 ccm
	Fuchsin S	0,1 g
3.	Alkohol 96 %ig	10 ccm
	Sudan	0,1 g

Unmittelbar vor Gebrauch mischt man 15 ccm Lösung 1, 10 ccm Lösung 3 und 7 ccm Lösung 2 und färbt damit die Schnitte. Es färbt sich damit

- Epidermis (Spelzen, Haare) grün
- Aleuronzellen und Fett rot
- hyaline Schicht rotbraun
- das Kotyledongewebe hellbraun bis lila
- Hefen und Sporen farblos

Empfehlenswerte Objekte sind besonders befallene Getreidekörner und die Brandbeulen des Maises (*Ustilago maydis*). Von besonderem botanischem Interesse sind die Brandpilze auf den Polygonaceen, auch auf Hirsearten.

(109) H.Kockegey, Zeitschrift f. das gesamte Getreidewesen XII, 1920, S.184

Urocystis occulta, der Roggenstengelbrand, befällt weniger die Ähren als vielmehr die vegetativen Teile des Roggens. Zuerst sieht man weißliche Streifen an Stengeln und Blättern. Diese Teile enthalten noch Mycel. Treten die Sporen auf, werden die Streifen braun und brechen dann auf. Die befallenen Pflanzen zeigen meistens vertrocknete Ähren, was ihr Aufsuchen erleichtert.

Sehr häufig findet man auf Anemonen (*Anemona nemorosa, A.ranunculoide*) und anderen Ranunculaceen den Brandpilz *Urocystis anemonis.* Er erzeugt an Stengeln und Blättern auffallende Auftreibungen.

In Gewächshäusern findet man hier und da auf Palmen (*Phoenix*-Arten und anderen) den Pilz *Graphiola phoenicis.* Wenn man diesen Pilz erhalten kann, bildet er ein dankbares Objekt. Zuerst treten Schwielen auf den befallenen Blättern auf, die dann aufbrechen und ein 1-2 mm hohes Fadenbüschel ausbilden, zwischen denen dann die Sporen liegen.

b. Rostpilze

§ 396.

1. Die Rostpilze (*Uredineen*) treten in unserer Flora in großer Artenfülle und in weitester Verbreitung auf. Praktisch ist kein einziges Getreidefeld frei von ihnen.

Alle Rostpilze sind obligate Parasiten. In künstlichen Kulturen treten nur die ersten Sporen-Keimungsstadien auf. In den Wirtspflanzen bildet sich ein verzweigtes, gekammertes Mycel, das intrazellulär wächst und dessen Zellen häufig mit gelbem oder rötlichem Öl erfüllt sind. Daher zeigen die befallenen Pflanzenteile rötliche, rostartige Flecke.

2. Sporen. Das Mycel bildet Sporenlager unter der Epidermis; sie platzt und gibt die Sporenlager frei. Bei den Rostpilzen kommen vier verschiedene Sporenarten vor: Teleutosporen (Wintersporen), die nach einer Ruhepause keimen. Aecidiosporen und Uredosporen (Sommersporen) zur Verbreitung der Pilze im Sommer und - sehr selten – Konidiosporen (Pyknosporen), die in Pyknidien gebildet werden. Alle diese Sporen werden wie die Sporen der Brandpilze untersucht und präpariert.

3. Kulturversuche an Sporen.

Die meisten Teleutosporen keimen erst nach einer winterlichen Ruheperiode im nächsten Sommer, manche allerdings sofort nach der Reife. Der einfachste Keimversuch besteht darin, die befallenen Blätter in der feuchten Kammer zu halten. Bei sofort keimfähigen Arten bemerkt man schon nach 3-4 Tagen einen schimmelartigen Überzug von Promycel. Diese Arten wähle man zu Kulturversuchen. Als Nährlösung ist meistens schon Brunnenwasser oder die Nährlösung nach *Knop* ausreichend.

Eine Art, deren Teleutosporen sofort keimen, ist *Puccinia traillii*. Sie kommt auf *Phragmites communis*, dem Schilfrohr, vor. Im Herbst ist fast jedes Schilfvorkommen damit infiziert. Die

Teleutosporenlager sind auf beiden Blattseiten linear polsterförmig, fest und schwarzbraun und einige Millimeter lang. Die schwarzen Streifen fallen schon beim Vorbeigehen auf.

Hat man beim Suchen kein Glück, so muß man eben beliebige andere Arten sammeln und sie überwintern lassen. Das gesammelte Material - man sammelt möglichst spät im Jahre - bringt man in weitmaschige Gazebeutel oder kleine Netze und hängt es im Freien auf, wo es Wind, Regen, Schnee und Frost ausgesetzt bleibt. Mitte März erst trocknet man es langsam, z.B. auf dem Speicher, und bewahrt es danach staubsicher auf. Mitte Mai legt man dann den Keimversuch an. Dazu benützt man, wie geschildert wurde, die große feuchte Kammer. Schon nach 24 Stunden setzt die Keimung ein und in 2 bis 3 Tagen sind die Promycelien ausgebildet.

Uredosporen keimen leicht und sofort in Wasser aus. Am bequemsten sind Objektträgerkulturen. Präparation wie bei den Brandpilzen.

Aecidiosporen keimen fast nur auf den Blättern der Wirtspflanzen aus. Die Kultur ist daher unmöglich.

4. Histologische Untersuchungen an befallenen Blättern werden wie folgt angestellt:

a) Totalpräparate in natürlichen Farben. Von den Blättern der Gräser können kleine Stücke mit den roten Teleutosporen oder den Uredosporenlagern als naturfarbige Totalpräparate angefertigt werden. Man fixiert nach den Methoden von *Pollaccei* und *Kisser* (§ 66 Ziff. 3 u. 4).
b) Schnitte in natürlichen Farben. Befallene Blätter lassen sich leicht noch lebend in genügend dünne Schnitte zerlegen. Gut schneiden sich vor allem die etwas dickeren Blätter von Schilf, Huflattich und ähnlichen Objekten. Die Schnitte werden behandelt wie bei den Totalpräparaten nach *Kisser* und *Pollaccei* ausgeführt ist. Das Grün der Phanerogamen hält sich besonders gut in Lävulosegelatine nach *Heringa* und *ten Berge*.
c) Gefärbte Schnitte. Die so hergestellten Schnitte lassen sich natürlich auch färben. Besser tut man jedoch daran, Paraffinschnitte oder Zelloidinschnitte zu verwenden. Zur Fixierung verwendet man Alkohol-Eisessig, *Juel*, Chromessigsäure, Trichloressigsäure, *Pfeiffer*, Formessigsprit.

Die Schnitte müssen vor dem Färben gebleicht werden. Sporenlager, besonders Teleutosporenlager, geben an Querschnitten interessante Bilder. Längsschnitte empfehlen sich hier nicht.

Färbung:

Für unreife Sporenlager und Lager mit Promycel: Goldimprägnation, Imprägnation mit Schwefelblei, Kresylechtviolett, *Becher*-Farbstoffe, Vierfachfärbung nach *Johannsen*.

Hyphen in von Rostpilzen befallenen Geweben werden besser an Längsschnitten studiert.

Färbung: Kongorotlösung unter Zusatz einiger Tropfen Ammoniak, Eisenhämatoxylin-Säurefuchsin.

Die Hyphen können auch dadurch dargestellt werden, daß man die Blätter, z.B. dünne Blätter von kleineren Gräsern, mit Osmiumsäurelösung fixiert. Die Hyphen werden infolge des Ölgehaltes tiefschwarz, das andere Gewebe bleibt heller. Fixiert man derbere Objekte, muß man nachträglich schneiden. Die Imprägnierung ist dieselbe, nur dringt die Osmiumsäure in dickere Gewebe nur langsam und unregelmäßig ein.

Die Rostpilze haben in ihrem Lebenskreis vielfach einen Wirtswechsel. Auf dem ersten Wirt erfolgt der Aecidien-Lebenskreis, auf dem zweiten Wirt finden sich die Uredosporen- und die Teleutosporen-Generationen vor. Beide Lebenskreise können auch auf einem einzigen Wirt vorkommen.

5. Empfehlenswerte Untersuchungsobjekte sind nun folgende häufige Arten:

Uromycis pisi. Uredo- und Teleutosporen auf der Erbse, Aecidiosporen auf einer Wolfsmilch (*Euphorbia cyparissias*).

Puccinia graminis. Teleuto- und Uredosporen auf zahlreichen Gramineen, besonders auf Getreide. Aecidien auf *Berberis* und *Mahonia*.

Puccinia coronata. Teleutosporen und Uredosporen auf verschiedenen Gräsern, besonders Hafer. Aecidien auf *Rhamnus frangula*.

Puccinia traillii. Teleutosporen auf *Phragmites communis*. Aecidien auf *Rumex acetosa*.

Coleosporium tussilaginis. Teleutosporen und Uredsporen auf *Tussilago farfara*. Aecidien auf den Nadeln von *Pinus silvestris*.

Gymnosporangium sabinae. Teleutosporen auf *Juniperus sabinae* und Aecidien auf *Pirus communis*, den "Birnenrost" erzeugend.

Ferner gibt es noch eine sehr große Anzahl von Rostpilzen auf vielen Phanerogamen und einige Arten auch auf Kryptogamen. Schon von der Gattung *Preccinia* kennt man allein 1200 Arten.

c. Exobasidien

§ 397.

1. Die Exobasidien sind eine kleine Gruppe parasitischer Basidomyceten. Das Mycel lebt im Innern von Pflanzenteilen und bildet die Basidien an gallertartigen Auftreibungen der Wirtspflanzen. Die Basidien durchbrechen die Oberfläche dieser Gallen und stehen frei. Die Sporen keimen in Nährlösungen zu hefeähnlichen Konidienformen aus.

2. Auf jedem Spaziergang im Sommer kann man in Wäldern an verschiedenen *Vaccinium*-Arten rosarote Gallen finden, die von *Exobasidium vaccinii* herrühren. Bevorzugt befallen wird die Preißelbeere.

Wir fertigen Schnitte an durch die verschiedenen Altersstufen der Gallen. Zu sehen sind die Mycelfäden sowie die keulenförmigen Basidien mit den Sporen. Fixierung und Färbung wie bei *Albugo* und *Peronospora* angegeben (§ 390 Ziff.7).

3. Gelegentlich kann man noch folgende beide Arten auffinden:

Exobasidium rhododendri erzeugt Gallen - volkstümlich Saftäpfel genannt - an Blättern der Alpenrose.

Microstoma juglandis erzeugt bei Walnußblättern auf der Unterseite braune Flecke. Aus den Spaltöffnungen ragen die punktförmigen weißen Konidienträger hervor.

Präparation (feuchte Kammer!) wie bei *Phytophtora*. Die Schnitte ergeben besonders mit der Vierfachfärbung nach *Johannsen* sehr schöne Übersichtsbilder (§ 176).

IV. Unterabteilung: NIEDERE ASCOMYCETEN

A. Allgemeines

§ 398. Die kleinen Ascomyceten bilden die umfangreichste Abteilung der Pilze, die Anzahl der Arten ist außerordentlich groß. Dabei sind die einzelnen Arten z.T. sehr voneinander verschieden, teilweise sind sie reine Parasiten und erzeugen Krankheiten bei Pflanzen und bei Tieren, teilweise sind sie technisch wichtig wie die Hefen, immer aber sind es sehr interessante und vielfach formenreiche Objekte.

Viele Ascomyceten wachsen in Rohkulturen auf Pflanzenfressermist, sie treten auf, sobald die Phycomycetenflora verschwunden ist. Häufig finden wir *Sordaria, Chaetomium, Aseobolus, Telebolus, Ascophanus.*

Liegt der Mist von Hasen, Kaninchen oder Hirschen auf Fließpapier, so wachsen diese Pilze gerne auf das Papier hinaus und fruktifizieren dort. Für die Anlage von Reinkulturen ist zu beachten, daß die Sporen häufig erst dann keimen, wenn sie den Tierkörper passiert haben, deshalb sind Reinkulturen von diesen Arten nicht zu erhalten. Immerhin wird man genügend Arten vorfinden, die zur Anlegung einer Reinkultur willfährig genug sind.

§ 399. Fixieren und Färben. Dem Formenreichtum entsprechend ist auch die mikroskopische Präparationstechnik sehr verschieden. Hefen und hefeähnliche Pilze sind schwierig zu färben. Die dafür entwickelten Spezialmethoden werden an geeigneter Stelle geschildert. Sonst kann wegen der Fixier- und Färbemethoden auf die Übersichten bei den Kleinpilzen in § 362, 366 und 367 verwiesen werden.

Für die Übungsbeispiele wurden nur leicht erreichbare und typische Vertreter ausgesucht.

B. Ausgewählte Beispiele zur Bearbeitung der niederen Ascomyceten

1. Hemiascineae

§ 400. Die Hemiascineen sind eine kleine Gruppe. Im allgemeinen sind sie selten und werden leicht übersehen. Häufiger und daher leichter zu bekommen ist *Protomyces macrosporus*. Das Mycel lebt interzellulär, also parasitisch, und entwickelt Haustorien. Das Sporangium ist blasig und entläßt die Sporen nach Zerreißen.

Protomyces bildet an Doldenblütlern dicke Schwielen, und zwar an Stengeln und Blättern. Besonders gern findet er sich auf *Aegopodium podagraria*, dem gemeinen Geißfuß, der bei uns an Hecken, Gebüschen und in Gärten verbreitet ist.

Es empfehlen sich Quer- und Längsschnitte durch die befallenen Teile.

> Fixierung: *Pfeiffer*, Formalinalkohol, Trichloressigsäure.
> Färbung: Goldimprägnation, Safranin-Lichtgrün und *Becher*-Farben mit Nachfärbung von komplementären sauren Farben

2. Saccharomycetacea

§ 401.

1. Die Saccharomycetaceae oder Hefen gehören neben den Bakterien zu den technisch wichtigsten Pilzen. Ohne sie wäre die Bäckerei, die Bierbrauerei und Winzerei nicht denkbar. Schließlich umfassen sie auch parasitische Formen. Es ist daher berechtigt, auf die Hefen etwas näher einzugehen als dies allgemein üblich ist. Die Hefen gehören zu den schwierigsten Objekten der mikroskopischen Technik.

2. Materialbeschaffung. Hefen sind in der Natur weit verbreitet. In Blüten, soweit sie Honig führen, auf Früchten, in der Erde der Gärten und Weinberge, überall finden sich zahlreiche He-

fearten vor. In der Technik rechnet man zu den Hefen die Sproßhefen, die Spalthefen und die hefeähnlichen Pilze.

3. Die Sproßhefen (Hefen, die sich durch Sprossung vermehren) sind:

Saccharomyces cerevisiae, die Bierhefe, deren zahlreiche Unterarten in den Bierbrauereien die Gärung verursachen. Sie ist in flüssiger Form mit Bierwürze vermengt und auch als sogenannte Preßhefe in Brauereien zu bekommen. Die Zellen sind oval.

Saccharomyces pastorianus ist eine wilde Hefe, die in Brauereien gefürchtet ist, da ihr Auftreten dem Bier einen bitteren Geschmack verleiht. Man erhält sie vielfach durch Kultur aus dem Boden und Faßbelägen in Bierkellern. Die Hefezellen sind oval bis länglich.

Wilde *Saccharomycetes*-Arten erhält man auch durch Kulturen der Beläge von Obst und Weintrauben.

Hansenia apiculata ist sehr verbreitet und tritt immer auf, wenn Johannisbeeren oder Stachelbeeren vergären; die Zellen sind zitronenförmig.

Hansenia apiculata parasitica kommt ungemein häufig im Darm der Schildläuse vor (Ausstriche aus zerdrückten Schildläusen!).

4. Die Spalthefen (*Schizosaccharomyceten*) vermehren sich nicht durch Sprossung, sondern durch Abspalten neuer Hefen wie die Blaualgen.

Schizosaccharomyces octopus kann leicht erreicht werden, wenn Korinthen oder getrocknete Weinbeeren aus dem Balkan oder der Türkei der freiwilligen Gärung unterworfen werden; die Zellen sind länglich. In heißen Klimaten ist sie neben anderen Spalthefen an Stelle unserer Sproßhefe weit verbreitet; das Hirsebier der Neger wird mit Spalthefen erzeugt.

5. Unter den wilden Hefen gibt es auch einige gefärbte Arten. Die Farbe tritt natürlich deutlich nur in der Kultur auf.

Grau:	*S. conglomeratus, S. sphäricus*
Braun:	*S. flavescens, S. badius*
Gelbrot, rosa:	*S. glutinis, S. rotundus, S. longus*
Schwarz:	*S. niger*

Man erhält diese wilden Hefen, wenn man Luftkeime auf gekochte Kartoffeln fallen läßt oder wenn Boden und sonstige Erdproben der Gärprobe unterworfen werden; dazu verwendet man nur ganz schwache Zuckerlösungen, da die Gärkraft dieser Hefen sehr gering ist.

§ 402. Hefeähnliche Pilze. Dazu wird eine Reihe von Pilzen gerechnet, die man vielfach nicht näher kennt, die aber imstande sind, die Gärung zu unterhalten. Soweit sie häufiger sind und bei Kulturversuchen leicht auftreten, werden sie hier besprochen.

Torula ähnelt der Hefe in der Form und auch in der Sprossung. Sie bildet keine Endosporen und keinen Schimmel und ist in der Erde und in den Bierbrauereien ungeheuer weit verbreitet. Am leichtesten erhält man *Torula* aus den Wurzelhauben von Grünmalz (also gekeimter Gerste), wo sie große Kolonien bildet.

Mycoderma. Die *Mycoderma*-Arten bilden auf den Gärbottichen die Kahmhaut. Die Zellen sind kurz und wurstförmig.

Oidium. Oidium lactis bildet auf der Oberfläche saurer Milch ein weißes Mycel. In gärungsfähigen Flüssigkeiten bildet sie hefeähnliche Zellen aus. *Oidium* findet sich außerdem in Preßhefe, auf Käserinden, in Lagerfässern, Bottichen, Leitungen.

Es gibt noch manch andere Zustandsformen (Konidien) höherer Pilze, die Gärungen hervorrufen und hefeähnliches Aussehen haben. Man trifft sie bei Versuchen reichlich an; von Hefe sind sie leicht zu unterscheiden, da sie keine Sporen bilden, sondern nur sprossen.

Im Schleimfluß frisch abgesägter Baumstümpfe finden sich *Endomyces magnusii* und *E. vernalis* neben einigen anderen. An Ort und Stelle steril entnommene Proben (Alkohol und Messer mitführen!) können ohne Schädigung in Gläsern heimgetragen werden; Kulturen wer-

den dann mit Würzgelatine angelegt. Neben Bakterien und Hefekolonien finden sich dann die schleimig glänzenden Kolonien von Endomyces. Eine Ascusbildung ist in der Kultur sehr selten. Neben *Endomyces* kommen noch eine Reihe anderer spezifischer Pilze in den Schleimflüssen der Bäume vor wie *Epicoccum purpurascens*, *Ascobolus*-Arten und *Cladosporium*-Arten.

Kulturmethoden für Hefen

§ 403.

I. Rohkulturen werden angelegt, indem man die auf Hefe zu untersuchenden Medien wie Erde, Blüten, Fruchtschalen usw. in gärungsfähige Flüssigkeiten bringt; es gibt eigene Gärkölbchen aus Glas zur bequemen Vornahme solcher Versuche.

II. Reinkulturen verlangen eine verfeinerte Arbeitsweise. Zur Anstellung von Hefereinkulturen eignen sich folgende Kulturmedien:

1. Hefewasser: 25 g Hefe werden in 100 ccm destillierten Wasser 30 Minuten lang gekocht und noch heiß filtriert. Dann werden nochmals 100 ccm Wasser zugegeben und es wird nochmals eine halbe Stunde gekocht. Das Hefewasser wird heiß in die sterilisierten Gefäße gefüllt.
2. Wässrige Auszüge aus getrockneten Pflaumen, Rosinen, Kirschen. Die Auszüge werden sterilisiert.
3. Sterilisierte Bierwürze.
4. Hefewasser der Vorschrift 1 wird mit etwas Traubenzucker versetzt. Die Zuchtversuche können auch im hängenden Tropfen in der feuchten Kammer vorgenommen werden. Vergleiche dazu auch die Tröpfchenkultur nach *P.Lindner* (§ 16 Ziffer 3).

Für Plattenkulturen setzt man dem Agar-Agar oder der Gelatine etwas von den oben unter 1-4 erwähnten Kulturmedien zu. Die Zucht und Kulturmethoden für Gärungserreger sind genau so umfangreich und genial ausgedacht wie für die pathogenen Bakterien. Bei unseren Studien kommt man mit den einfachen Methoden und mit dem hängenden Tropfen aus.

III. Sporulation der Hefen

Bei der Fruktifikation erzeugt die Hefezelle Sporen. Die Sporen sind Endosporen. Die Sporulation der Hefen kann auf folgende Weise erreicht werden:

1. Gipsblockmethode. Sterilisierte Gipsblöcke mit glatter Oberfläche tränkt man mit Nährlösung oder auch nur mit Wasser und besät sie mit Hefe. In verschlossenem Glasgefäß kultiviert man die Hefe bei ungefähr 25 ^{O}C.
2. Methode nach *Kohl*. In sterilisierten Erlenmeyer-Kolben gibt man sehr wenig verdünnte Nährlösung, so daß der Boden eben bedeckt ist. Dann wird Hefe darin gut verschüttelt. Im Verlaufe von 24 Stunden bei einer Kultur zwischen 15-25 ^{O}C finden sich Sporen in allen Stadien vor. Der Glaskolben wird verschlossen gehalten.
3. Sporenkeimung. Hefe mit Sporen wird im hängenden Tropfen in Kultur genommen. Bei der Sporenkeimung können mehrere Sporen miteinander verschmelzen. Auch kommt bei manchen Arten die Bildung eines Promycels vor, z.B. bei *Saccheromycodes ludwigii*, die im Schleimfluß alter lebender Bäume, besonders bei Eichen, aufgefunden werden kann.

§ 404. Fixierung und Färbung der Hefen. Zur Untersuchungstechnik der Hefen sind sehr viele Arbeitsvorschriften veröffentlicht worden. Die Hefen sind sehr schwierige Objekte, und man soll sich erst dann an sie wagen, wenn man in der Färbetechnik wirklich schon geübt ist.

Die Hefezellen sind sehr klein. An ihnen ist zu sehen: Membran, Kern, Zytoplasma, Nukleolen, kleine Granula und endlich die Sporen. Das meiste sieht man schon nach der Behand-

lung mit *Lugolscher* Lösung. Der Kern ist wie bei allen Pilzen sehr klein und an den verschiedensten Stellen der Zelle zu finden. Im einzelnen kann man anwenden:

1. Ausstreichen lebender Hefe in feiner Verteilung mit steriler Tusche nach dem Verfahren von *Burri*.
2. Fixierung in *Pfeiffer*, Auswaschen und Einschluß ungefärbt in Hausenblasengallerte nach *Behrens*.
3. Färben nach der *Gramschen* Methode der Bakterienfärbung mit Gentianaviolett und *Lugolscher* Lösung.
4. Weniger leistungsfähig sind Färbungen von Ausstrichen mit Karbolfuchsin, *Löfflers* Methylenblau.
5. An lebender trockener Hefe gelingt die Vitalfärbung mit Methylenblaulösung 1:10000.
6. Ausstriche werden mit Osmiumsäuredämpfen fixiert, dann mit Methylalkohol gehärtet (eine Minute) und mit *Delafields* Hämatoxylin oder Alaunglycerin-Hämatein nach *Rawitz* gefärbt.
7. *Chamberlain* empfiehlt folgendes Verfahren:
   Frisch kultivierte Hefe wird 12 Stunden lang in konzentrierter wässeriger Sublimatlösung fixiert. Auswaschen, Jodentfernung, Auswaschen, langsames Überführen in absoluten Methylalkohol. Von dieser Aufschwemmung gebe man einen sehr kleinen Tropfen auf einen Objektträger. Zu diesem Tropfen setze man einen Tropfen Wasser, damit die Hefezellen wieder aufquellen, streiche dünn aus und lasse antrocknen. Die Färbung geschieht mit einer Mischung von wässrigem Fuchsin und Methylgrün. Einschluß ist möglich in Glycerin, Lävulosegelatine und Caedax.
8. Man kann auch Hefe in *Pfeiffer* fixieren, auswaschen und mit *Becher*-Farben oder Pikrokarmin-Anilinblau färben. Auswaschen und Einschluß in Lävulosegelatine nach *Heringa* und *ten Berge*.

Die metachromatischen Granula in den Hefezellen, die aus Eiweißkristalloiden bestehen, können wie folgt dargestellt werden:

1. Lebende Hefe wird mit heißer Essigkarminlösung nach *Schneider* behandelt.
2. Fixierte Hefe zeigt die metachromatischen Granula rot nach Färbung mit Säurefuchsin oder Safranin.
3. Man färbt lebende Hefe mit einer Lösung aus 10 ccm 10 %iger wässriger Methylenblaulösung und 10-20 Tropfen 5 %iger Lösung von Natriumhydrogencarbonat in Wasser. Die Färbung gelingt nach eineinhalbstündiger Einwirkung der Farblösung. Setzt man der Hefe einen Tropfen Formalinlösung zu, so geht die Färbung sehr viel rascher vonstatten. Wenn nötig, differenziert man mit 1 %iger Schwefelsäure. Die Färbung kann mit Phosphorwolframsäure gebeizt werden. Einschluß in Lävulosegelatine nach *Heringa* und *ten Berge*.

Bei den Färbungen der Hefe nimmt man zweckmäßig eine Zentrifuge zu Hilfe, wenn es sich nicht um Ausstriche handelt.

3. Exoascaceae

§ 405. Hierher gehören wenige Arten, einige häufigere von *Taphrina* untersuchen wir. *Taphrina* ist ein obligater Parasit, der leicht auf Exkursionen gefunden werden kann, denn die befallenen . Pflanzenteile zeigen auffällige Veränderungen.

Taphrina aurea verursacht auf der Blattunterseite von Pappelblättern gelbe Gallen. *T. johansoni* weiße Gallen.

Die häufige Art *Taphrina pruni* verursacht auf Zwetschgenbäumen deformierte Früchte, die als Narrentaschen, Schoten oder Hungerzwetschgen bekannt sind; die jungen Früchte bleiben grün und kernlos, sind weich und leicht zu schneiden.

Taphrina carpini bildet Hexenbesen auf *Carpinus betulus*.

Fixierung: *Pfeiffers* Gemisch, Formessigsprit nach *Dittrich*, Formalinalkohol, Trichloressigsäure.

Färbung:

Pilzhyphen im Gewebe werden gefärbt an Schnitten mit Indolblau-Eosin nach *Migula* (110), *Delafields* Hämatoxylin-Säurefuchsin, Bismarckbraun-Anilinblau, Anilinblau-Orseillin BB.

Die Asci werden am besten an Schnitten dargestellt mit Goldimprägnation, Pikrokarmin-Anilinblau oder *Becher*-Farben.

Die Asci befinden sich auf der Oberfläche der Blätter und Früchte, man achte schon beim Sammeln darauf, daß sie nicht abgestreift werden. Eventuell Kultur in der feuchten Kammer.

(110) D.W.Migula, Praktische Mikroskopie XIII. 1935. Heft 10. S.303

4. Plectascineae

§ 406.

1. Hierher gehören einige Fäulnis- und einige Schimmelpilze, die, oder wenigstens ihre Sporen, fast allgegenwärtig und daher mit Leichtigkeit zu erreichen sind. Sie können sich auf jedem organischen Substrat entwickeln, so daß mit verschiedenen Kulturmethoden wenigstens eine Gruppenauslese auf den Rohkulturen automatisch eintritt.

Am leichtesten erreichbar sind die Fäulnispilze des Obstes. Auf reifem Obst sind stets nach längerer Lagerung Faulpilze anzutreffen. Zur Kultur verwendet man am besten nicht Material von der Fruchtoberfläche, sondern steril entnommenes aus Faulstellen (Fruchtstückchen), das man auf Gelatineplatten in die feuchte Kammer legt. Der Pilz wächst dann bald aus und schreitet auch zur Sporenbildung. Reinkulturen gelingen leicht auf steriler Obstsaftgelatine oder gezuckerter Mineralsalzlösung.

2. Die auf Früchten auftretenden Schimmelpilze und Faulpilze gehören keineswegs alle zu den *Plectascineae*. Es treten auch Vertreter der *Zygomyceten* und der *Fungi imperfecti* auf. An Obst treten fast regelmäßig folgende Faulpilze auf:

Apfel:

Penicillium crustaceum (gehört zu den *Plectascineae*). *Mucor piriformis* (gehört zu den *Zygomyceten*) *Fusarium putrifaciens* (gehört zu den *Fungi imperfecti*) *Gloeosporium album* (gehört zu den *Fungi imperfecti*).

Birnen:

Mucor piriformis (gehört zu den *Zygomyceten*) *Rhizopus nigricans* (gehört zu den *Zygomyceten*) *Botrytis cinerea* (gehört zu den *Fungi imperfecti*) *Sclerotinia fructigena* (gehört zu den *Ascomyceten*).

Kirschen:

Sclerotinia cinerea (gehört zu den *Ascomyceten*) *Botrytis cinerea* (gehört zu den *Fungi imperfecti*) *Gloeosporium fructigenium* (gehört zu den *Fungi imperfecti*).

Zwetschgen:

Mucor racemosus (gehört zu den *Zygomyceten*) *Penicillium crustaceum* (gehört zu den *Plectascineae*) *Rhizopus nigricans* (gehört zu den *Zygomyceten*).

Trauben, Stachelbeeren, Johannisbeeren:

Botrytis cinerea (gehört zu den *Fungi imperfecti*) *Penicillium crustaceum* (gehört zu den *Plectascineae*) *Rhizopus nigricans* (gehört zu den *Zygomyceten*).

3. Andere Schimmelpilze finden sich auf Brot, eingemachten Früchten, auf Käse, an feuchten Wänden, die mit Leimfarben gestrichen sind, und ähnlichen Orten und Substraten. So finden sich gerne ein

auf gesäuertem Roggenbrot:	*Aspergillus glaucus*,
auf Semmeln:	*Rhizopus nigricans*,
auf Heu:	*Aspergillus fumigatus*,
auf Roquefort und Gorgonzolakäse:	*Penicillium roqueforti*,
auf Camembert und Briekäse:	*Penicillium camemberti*.

Über die Kultur von Schimmelpilzen siehe § 391 Ziff. 1 u. 2. Hier soll nur kurz noch die Methode der Kultur und der Präparation auf ein und demselben Objektträger von Klineberger (111) besprochen werden. Die Methode hat folgende Arbeitsgänge:

1. Man benützt einen gereinigten Objektträger, den man in der Flamme sterilisiert.
2. Als Nährlösung bringt man *eine sehr kleine Menge Nährflüssigkeit*, etwa 1-2 mg (sterile Bierwürze, Abkochungen von Getreidekörnern, Früchten usw.) in Tropfen auf den Objektträger.
3. Aufsäen mit Platindraht von möglichst wenigen Sporen.
4. Kultur in der feuchten Kammer.
5. Fixieren mit Alkohol-Ether.
6. Wässern.
7. Färben z.B. mit Methylenblau (Beizen mit Phosphorwolframsäure) oder mit anderen geeigneten Färbungen (vergleiche § 366).
8. Einschluß je nach Färbung in Lävulosegelatine, Glyceringelatine oder Caedax

Als Übungsbeispiele wählen wir die hierher gehörigen Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* aus.

(111) Klineberger, Zentralblatt f. Bakt. I. Abt.108, 1928, S.207

4. *Aspergillus. A.glaucus* ist einer der allerhäufigsten und gemeinsten Schimmelpilze. Er bildet grüne Kulturen. Am bequemsten erhält man ihn durch Kultur. Nachdem er in den Rohkulturen festgestellt worden ist, legen wir eine Reinkultur an.

Konidien: In den Kulturen entwickeln sich unter normalen Verhältnissen regelmäßig nur die Konidienträger und die Konidien.

Sporangien: Sporangien in der Form von Fruchtkörpern (Schlauchfrüchten) sind im Freien selten. Zuerst bilden sich gewundene Karpogone, die sich dann mit Hüllen umgeben, die später mehrschichtig werden. Die kugelförmigen Fruchtkörper, etwa 0,25 mm im Durchmesser, sind gelb. Sie bilden in ihrem Inneren die Asci aus.

Die Fruchtkörper können nach *Chamberlain* mit großer Sicherheit erhalten werden, wenn das Brot zur Kultur in eine 20 %ige Lösung von Traubenzucker in Traubensaft oder in eine 40 %ige Lösung von Rohrzucker in einer Aufkochung von getrockneten Zwetschgen eingetaucht wird.

Die Kulturen sollen bei ungefähr 28 ^{O}C gehalten werden. Nach 4-5 Tagen ist mit dem Auftreten der gelben Sporangien zu rechnen. Herauspräparierte Sporangien schließt man ungefärbt in Lävulosegelatine nach *Heringa* und *ten Berge* ein.

Fixierung mit heißem Sublimatalkohol (eine Minute), Chromessigsäure oder *Pfeiffer*.

Einbetten in Paraffin.

Färben in Eisenhämatoxylin-Säurefuchsin. Hier färben sich die Bestandteile verschieden. Ebenso in Pikrokarmin-Anilinblau und *Giemsa*. Einfach, aber sehr schön differenziert färben Orseillin BB und *Becher*-Farben.

5. *Aspergillus fumigatus* kommt auf moderigem Heu und Stroh vor. Zucht und Präparation wie bei 4. Dieser Pilz ist jedoch pathogen und verursacht beim Einatmen seiner Sporen eine Mykosis der Lungen, die unheilbar ist. Daher Vorsicht bei seiner Verarbeitung!

6. Penicillium ist ganz gemein. Überall kommt vor *P. crustaceum*, der Gießkannenschimmel.

Die Konidienform wächst auf Brot in der feuchten Kammer.

Karpogone und Schlauchfrüchte können nach *Brefeld* auf folgende Art erreicht werden: Kulturen von Penicillium auf großen Scheiben ungesäuerten Brotes werden zwischen Glasplatten eingeschlossen und unter möglichstem Abschluß der Luft sich selbst überlassen. Nach 6-8 Wochen entstehen weiße Asci. Untersuchungstechnik und Präparation wie bei 4.

7. Schimmelpilze auf Wursthäuten können samt der Haut zu Totalpräparaten oder Schnitten verarbeitet werden. Das Fett muß nur vorher mit Chloroform oder mit Ether entfernt werden.

Bei allen Schimmelpilzen vergesse man nie die Untersuchung in *Abelscher* Flüssigkeit und die Herstellung von Präparaten ohne Färbung!

5. Pyrenomycetes

§ 407.

1. Hier untersuchen wir *Erysiphe, Nectria, Xylaria* und *Claviceps purpurea*.

Die Erysipheae (Mehltaupilze) sind fast das ganze Jahr über in unserer Flora als Parasiten zu finden. Die befallenen Organe, meistens Blätter, sehen weiß bestäubt aus; bei genauerem Hinsehen findet man dann die kleinen kugeligen, gelben bis schwarzen Fruchtkörper, welche die Asci enthalten. Das Luftmycel hat bei den meisten Formen fast künstlerisch-schöne Formen. Bei den Arten von *Erysiphe* ist es weiß, bei *Capnodium salicinum*, der als Rußtau die Blätter der verschiedensten Bäume und Sträucher überzieht, ist es schwarz. Häufige Krankheiten an Kulturpflanzen verursachen die Arten von *Sphaerotheca*, so auf Hopfen, Rosen, Stachelbeeren.

Fixieren mit 3 %igem wässerigem Formalin, Wässern.

Färbung: Luftmycel mit Säurefuchsin.

Bemerkung: Die Asci sind an Totalpräparaten nur dann zu sehen, wenn man die Fruchtkörper durch Zerdrücken unter dem Deckglas zum Springen bringt. Sonst sind Schnitte (Paraffin) anzufertigen. Die Schnittdicke beträgt 5µ. Die Fruchtkörper betten sich schlecht ein und schneiden sich noch schlechter. Färbung mit Eisenhämatoxylin-Säurefuchsin oder Safranin-Gentianaviolett-Orange G (Lichtgrün).

2. Die Arten der Gattung *Nectria* fallen jedem Sammler auf. Als gelbliche, rote oder bräunliche, stecknadelkopfgroße Fruchtkörper auf Rinde von Bäumen und Sträuchern Sind sie leicht erkennbar.

Am bekanntesten ist *Nectria cinnabarina,* die gegen den Winter zu mit den eröffneten auffallend roten Fruchtkörpern auf der Rinde aller Arten unserer Laubhölzer zu finden ist.

Die Weißfäule der Kartoffel wird durch *Nectria solani* verursacht.

Weitere interessante Pyrenomyceten sind *Polystima rubrum*, welche Art auf den Blättern von *Prunus domestica* rotgelbe bis feuerrote Flecken bildet. Auf den Blattunterseiten sind die Öffnungen der eingesenkten Pyknidien. Der Pilz ist häufig.

3. *Epichloetyphrina* auf Gramineen gibt an Längs- und Querschnitten sehr interessante Bilder.

4. *Xylaria* und seine nahen Verwandten wie *Ustulina maxima, Daldinia concentrata,* sowie zahlreiche *Hypoxylon*-Arten sind häufige, an Baumrinden vorkommende interessante Objekte.

Xylaria ist in der Jugend noch weich und allein zu schneiden, die übrigen Arten sind mehr oder weniger schlecht zu verarbeiten. Junge Exemplare von *Xylaria* lassen sich gut in Paraffin einbetten und schneiden. Ältere Stadien bettet man in Zelloidin oder Glyceringummi ein oder schneidet uneingebettet. Bei den reifen Sporen ist eine Färbung nicht nötig, man kann aber das Stroma mit Säurefuchsin gegenfärben,

5. *C1aviceps purpurea* (Mutterkorn) ist ein allbekanntes Sklerotium an der Roggenähre. Bevor die befallenen Körner die typische schwarze Sklerotiumform annehmen, durchlaufen sie eine interessante Phase. Äußerlich ist dem Fruchtknoten oft nichts anzusehen, aber innerlich ist er ganz von einem Pilzmycel durchwuchert. Schließlich produziert der Pilz eine süßliche, fade schleimig schmeckende Flüssigkeit, die in Tropfen an der Basis der Blüte austritt (Honigtau).

Wir sammeln auch diese Formen. Von dem Auftreten des Honigtaues bis zur völligen Ausbildung des Mutterkornes vergehen 14 Tage bei trockenem und 8 Tage bei feuchtem Wetter.

Das Mutterkorn selbst überwintert auf dem Acker und treibt zur Zeit der Roggenblüte Stromata, welche die Perithezien enthalten. Das keimende und fruchtende Mutterkorn ist leicht zu erhalten, wenn man in einem Blumentopf etwa ein Dutzend Mutterkörner ungefähr 1 cm tief eingräbt. Der Blumentopf erhält seinen Standplatz vor dem Fenster im Freien, so daß Regen, Schnee und Frost ungehindert einwirken können. Bei frostfreiem Wetter ab und zu gießen, damit der Topf nicht allzusehr austrocknet.

6. Im Obstgarten finden wir ebenfalls in der Regel Kernpilze als Untersuchungsmaterial. *Gnomonia erytrostoma* befällt die Blätter der Kirsche. *Venturia pirina, V. cerasi* und *V. inaequalis* verursachen auf den Früchten der Birnen, Kirschen und Äpfel die bekannten meist schwarzen Flecken.

Wenn die Färbung Schwierigkeiten macht, wie beim Mutterkorn, kann nach *H.Gaecks* das alte Eisentanninverfahren angewendet werden.

6. Discomycetes

§ 408.

Aus der interessanten Gruppe der *Discomyceten* (Scheibenpilze) bearbeiten wir *Rhytisma, Lachnea, Peziza, Monila* und *Sclerotinia*.

1. *Rhytisma acerinum* (Ahornrunzelschorf) ist eine bekannte Erscheinung an den Blättern unserer Ahornbäume in den Wäldern und den Parkanlagen. Das Stroma in den Blättern ist außen schwarz, innen weiß. An den hängenden Blättern werden nur Konidien gebildet. Die scheibenförmigen gelben Fruchtkörper entwickeln sich erst das Jahr darauf, wenn die alten Blätter im Freien überwintert haben und faulen.

Die Kultur ist ähnlich wie beim Mutterkorn, nur daß die Blätter nicht eingegraben, sondern in dicker Schicht übereinander gelagert werden.

Fixieren in Formalinalkohol, *Pfeiffer*.

Färben mit *Becher*-Farben, Säurefuchsin, Magdalarot-Anilinblau und den anderen Kombinationen.

2. *Lachnea pulchnerina*. Gehen wir im Herbst über Stoppeläcker, so können wir rote, etwa erbsengroße *Lachnea*-Arten, meistens *L.pulchnerina* oder *L.stercorea* finden.

3. *Peziza* und verwandte Arten sind fleischige, hautartige, becherförmige Pilze von roter bis gelber Farbe. Sie entwickeln sich mit Vorliebe an und auf feuchten Waldwegen.

Fixierung in Formalinalkohol, Jodalkohol, Sublimatgemischen.

Stückfärbung erfolgt mit Alaun-Karmin, Hämalaun nach *Mayer* oder *Delafieldschem* Hämatoxylin.

Für zytologische Untersuchungen empfiehlt sich das

Fixieren in dem schwachen *Flemmingschen* oder im Mannheimer Gemisch.

Färbungen dann mit Eisenhämatoxylin-Säurefuchsin oder Safranin-Gentianaviolett-Orange G (Lichtgrün).

Wir untersuchen noch drei *Sklerotinia*-Arten, die sehr leicht zu beschaffen und ebenso leicht zu verarbeiten und dabei lohnende Objekte sind. Die eine oder andere Art wird der Leser sicher erreichen können.

4. *Sclerotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). Bei den *Sclerotinia*-Arten wachsen aus unregelmäßigen schwarzen Gebilden, den Sklerotien, die Fruchtkörper hervor. Fast alle *Sclerotinia*-Arten tragen zwei Namen. Das kommt daher, daß verschiedene Zustandsformen der Pilze schon längere Zeit bekannt und beschrieben sind, daß aber der Zusammenhang dieser verschiedenen Zustände in einer Art erst später entdeckt worden ist.

In feuchten Jahren sehen wir gegen den Herbst fleißig auf Feldern und in Gärten nach, ob an Kartoffeln, Rüben, Möhren, Lupinen, Mais oder Hanf nicht ein weißer Schimmelbelag zu finden ist. Unter dem Mikroskop zeigt er sich bäumchenartig verzweigt. Diese Schimmelpilzform ist unter dem Namen *Botrytis cinerea* bekannt. Sie bildet die konidienerzeugende Mycelform; sie wurde und wird heute noch zu den *Fungi imperfecti* gezählt. Weiterhin finden wir vielleicht die Sklerotien. Sie bilden längliche Krusten an den getöteten Pflanzenteilen. Nach Keimung treten aus ihnen die kaum zentimeterlangen Fruchtkörper aus.

5. *Sclerotinia trifoliorum* erzeugt den Kleekrebs. Er tritt vornehmlich an angebautem Rotklee auf, kommt aber auch an anderen angebauten Schmetterlingsblütlern vor.

Die beste Zeit zum Suchen ist das Frühjahr und der Herbst. Wenn in einem Kleeacker Stellen auffallen, auf denen keine oder doch nur tote Pflanzen stehen, dann ist das wahrscheinlich Kleekrebs. Die befallenen Pflanzen sind verwelkt oder schon abgestorben, am Wurzelhals finden sich die unregelmäßig gestalteten, lose haftenden Sklerotien. Im Frühjahr findet man die Sklerotien, im Herbst die blaßroten Scheibenfrüchtchen.

6. *Sclerotinia fructigena* (*Monilia fructigena*). Dieser Pilz verursacht die Kernobstfäule. Die befallenen Äpfel faulen und zeigen nach einiger Zeit pustelförmige Konidienpolster. Nach zweijähriger Ruhe wachsen aus den Apfelmumien Apothezien mit einem Durchmesser von 3-5 mm; sie stehen auf Stielen von 0,5-1 cm Länge. Ähnlich ist *Sclerotinia cinerea* auf Kirschen. Die Untersuchung und Präparation ist einfach.

Fixierung: Die befallenen Pflanzenteile oder die Pilze werden in *Pfeiffers* Gemisch, Chromessigsäure, Formalinalkohol fixiert.

Färbung: Die Schnitte (meistens Zelloidinschnitte) werden nach Entfernung des Zelloidins gefärbt mit Goldimprägnation-Lichtgrün, Alizarinviridin, Anthrazenblau und anderen *Becher*-Farben, *Delafields* Hämatoxylin oder Hämalaun, Alaun-Glycerin-Hämatein nach *Rawitz* mit Nachfärbungen von Eosin oder Säurefuchsin; Magdalarot-Anilinblau und die anderen Farbkombinationen nach *Eckert-Dohrer*.

Einschließen je nach Haltbarkeit in Caedax, Lävulosegelatine, Venetianer Terpentin.

V. Unterabteilung: UNVOLLSTÄNDIG BEKANNTE PILZE (FUNGI IMPERFECTI)

A. Allgemeines

§ 409. *Fungi imperfecti* heißen seit *Fuckel* alle die zahlreichen Pilze, von denen der Lebenszyklus noch unvollständig bekannt ist. Der Begriff ist alles andere als streng wissenschaftlich, aber für die praktische Arbeit sehr brauchbar. Bekanntlich haben die Pilze viele Fruchtformen. Als das individuelle Leben abschließend kommen der Ascus und die Basidie vor. In beiden Fruchtformen werden Sporen gebildet, aus welchen Mycelien keimen. Zeitlich vor Abschluß des individuellen Lebens kommen aber auch andere Fruchtformen vor wie Pyknidien, Konidien an Trägem, in Konidienlagern, Chlamydosporen, Oidien, hefeähnliche Fruchtformen, aber *keine Sporangien*.

Alle Pilze, von denen nur Nebenfruchtformen und keine der beiden Hauptfruchtformen bekannt sind, zählt man zu den *Fungi imperfecti*. Sie sind wohl zum großen Teil Ascomyceten, deren Konidienformen sie darstellen, weshalb sie herkömmlich im Anschluß an die Ascomyceten behandelt werden. Ihre gesonderte Darstellung in diesem Buche rechtfertigt sich aus verschiedenen Gründen. Zunächst zeigen die typischen Ascomyceten wohl Asci, aber keine Nebenfruchtformen. Diese Nebenfruchtformen der *Fungi imperfecti* sind nun äußerst kompliziert und abwechslungsreich gestaltet, also für den Naturfreund sehr interessante Untersuchungsobjekte. Zudem sind sie leicht zu präparieren.

Die *Fungi imperfecti* stellen die größte Zahl der Pflanzenparasiten. Dabei ist es so, daß der Pilz bei Befall der lebenden Pflanze nur Nebenfruchtformen erzeugt. Soweit Ascus-Formen bekannt sind, entstehen sie erst, wenn der Wirt abgestorben ist und zu faulen beginnt. Da faulende Pflanzen auch von anderen Pilzen befallen werden, ist es in der Tat sehr schwierig, mit völliger Sicherheit den Formenkreis einer Art zusammenzustellen.

Die *Fungi imperfecti* werden nach den auftretenden Nebenfruchtformen, den Konidien und Konidienträgern unterschieden. Die drei Hauptabteilungen sind folgende:

Sphaeropsidales: Sie weisen Konidienbehälter auf, sogenannte Pyknidien.

Melanconiales: Sie weisen flache Konidienlager auf, die keine besondere Randhülle tragen.

Hyphomycetes: Sie weisen nur einzelne Konidienträger auf.

Jede dieser drei Hauptabteilungen wird in eine Anzahl von Gattungen und Arten aufgeteilt. Am Schlusse der *Fungi imperfecti* behandelt man in der Regel noch die Formen, von denen nur Mycelien bekannt sind, die *Mycelia sterilia.*

Wir bearbeiten aus all diesen Gruppen interessante und leicht erreichbare Vertreter.

§ 410. Fixieren und Färben. Für das Fixieren und Färben sind die Methoden anzuwenden, wie sie für parasitische Pilze in Phanerogamen bereits geschildert wurden. Vergleiche § 366 und § 367.

B. Ausgewählte Beispiele zur Bearbeitung der Fungi imperfecti

1. Sphaeropsidales

§ 411.

Die Gattung *Phyllosticta* kommt in vielen Arten auf Blättern vor. Es treten verfärbte oder weiße kleine Flecken auf, in denen kleine schwarze Pünktchen, die Pyknidien, sitzen. *Phyllosticta prunicola* auf Kirschen- und Zwetschgenblättern, *Ph. fragariicola* auf Erdbeerblättern, *Ph. Humuli* auf Hopfenblättern, *Ph. dianthi* auf Nelken, *Ph. violae* auf Veilchenblättern.

Die Gattung *Phoma* entwickelt die Pyknidien nie auf Blättern, sondern an Ästen, Früchten, Stengeln und auch auf Koniferennadeln. *Phomapitya* kommt an verschiedenen in Parkanlagen gehaltenen Tannenarten (Douglastanne z.B.) vor, und zwar an den Rinden. *Phoma acicola* kommt auf Kiefernnadeln, *Ph. pini* auf Fichtennadeln vor.

Dothirella ribis finden wir auf Ästchen von *Ribes*-Arten in unseren Gärten.

Hendersonias armentorum ist weit verbreitet auf Ästen aller möglichen Bäume.

Dothiorina tulasnei steht gerne auf grünfaulen Eichenstümpfen.

Septoria apii suchen wir auf Sellerieblättern nicht umsonst. Weitere *Septoria*-Arten finden sich auf Gräsern, Kräutern und Sträuchern.

Polystigma rubra bildet rötliche Flecke auf Blättern von *Prunus domestica*.

Die Familie der *Excipulaceae* besitzt Pyknidien, die soweit aufreißen, daß schüsselförmige Apothezien entstehen, ähnlich den Apothezien bei den Flechten. *Dothichita platani*, an Platanenästen wachsend, und *Psilospora faginae* an Rinde von *Fagus silvatic*a sind weit verbreitet.

2. Melanoconiceae

§ 412. Die Gattung *Gloeosporium* stellt viele Parasiten und auch Saprophyten.

Gloeosporium musa kommt auf der Banane vor. Die bei uns eingeführten Bananen zeigen auf den Schalen manchmal matte schwarzgrüne Flecken. Das darunter liegende Fruchtfleisch ist hell bis dunkelbraun verfärbt und enthält das Mycel des Parasiten. *G. ampelophagum* tritt auf der Weinrebe auf und ist besonders auffällig durch den Befall von Blättern und Reben. *Gloeosporium*-Arten wachsen auf allen unseren Waldbäumen und werden nach der Wirtspflanze benannt. Ebenso finden sich Arten auf Leguminosen, Orchideen und anderen Pflanzen mehr.

G. fructigenum verursacht die Bitterfäule der Äpfel. Der Pilz bildet zahlreiche kleine braune Flecke im Fruchtfleisch.

G. lindemuthianum verursacht die Fleckenkrankheit unserer Gartenbohnen. Ferner kommen noch zahlreiche andere Gattungen und Arten in unserer Flora vor.

§ 413. Präparation der *Sphaeropsidales* und der *Melanoconiceae*. Die auf Blättern, Nadeln, Zweigen und Fruchtschalen vorkommenden parasitischen Pilze werden dargestellt:

1. In natürlichen Farben. Geeignete Stücke werden unfixiert zwischen Hollundermark geschnitten oder nach der chlorophyllerhaltenden Fixierung nach *Kisser* oder *Pollacceei* fixiert und in Gummi arabicum eingebettet. Die Schnitte werden dann in Glyceringelatine, in Lävulosegelatine nach *Heringa* und *ten Berge*, Kaliumcetatgelatine oder *Hoyer* eingeschlossen. Diese Präparationsweise ist sehr zu empfehlen.
2. Fixieren in *Pfeiffer*, Formalinalkohol oder Trichloressigsäure, Einbetten in Gummi arabicum oder Zelloidin. Färben der Schnitte mit Vierfachfärbung nach *Johannsen*, Pikro-Nigrosin, Pikrokarmin-Anilinblau, Jodeosin-Anilinblau oder Lichtgrün, *Becher*-Farben.

3. Hyphomycetes

§ 414. Die *Hyphomyceten* weisen keine Konidienfruchtkörper auf, sondern einzelne Konidienträger. Diese Gruppe ist die umfangreichste der *Fungi imperfecti* und verfügt über außerordentlich vielgestaltige Formen. Hierher gehören vor allem alle Pilze, die man Schimmel nennt, soweit sie nicht Hauptfruchtformen entwickeln. Die *Hyphomyceten* können in vier gut unterscheidbare Gruppen eingeteilt werden, aus denen wir Vertreter als Übungsbeispiele bearbeiten. Unter ihnen sind viele Parasiten und Krankheitserreger.

§ 415.

Gruppe der *Mucedinaceae*. Hyphen und Konidienträger sind hyalin oder leicht gelb gefärbt.

Oospora kommt in den verschiedensten Arten auf allen möglichen faulenden Substraten vor. Besondere Fundstellen sind faulende saure Milch, Kanalabwässer, Sauerkraut, Käserinde, faulende Fischreste, getrocknete Früchte und sonstige Nahrungsmittel, ferner auch abgefallenes Laub, faulendes Holz usw. Es bilden sich ausgebreitete oder kissenförmige Rasen, die weiß, gelblich oder auch rötlich sind.

O.lactis auf Milch (weiß), *O. crustacea* auf Käse (rot), auch auf sonstigen fauligen Nahrungsmitteln (rot), *O. fulva* auf Holz (gelb), *O. porriginis* kommt auf Milch, Käse, Weißbrot vor und erzeugt gelegentlich bei Mensch und Tier Hauterkrankungen (Favus, Herpes).

Andere Arten kommen auf lebenden Pflanzen vor wie *Oidium quercinum v.Thüm. var. gemmiparum*, das auf Eichen den im Sommer überall häufigen Mehltau erzeugt; *O.epilobii* sehr häufig auf Erdbeeren und *Epilobium*-Arten; *O.tuckeri* auf lebenden Blättern des Weines.

Krankheiten von Pflanzen, die häufig sind, erzeugen *Ramularia spinaciae* auf Spinat, *R. betae* auf der Zuckerrübe und *R. armoraciae* auf dem Meerrettich. Weit verbreitet sind auch *Botrytis, Verticillium* und noch manche anderen Arten, wie ein Durchblättern einer Pilzflora zeigt.

§ 416.

Gruppe der *Dematiaceae*. Hyphen und Konidienträger sind dunkel gefärbt. Hier untersuchen wir vor allem *Torula*.

Torula wurde schon bei den hefeähnlichen Pilzen erwähnt, weil deren Konidien als Gärungserreger bekannt sind. Die *Torula*-Arten leben auf faulenden Blättern, Stengeln, Holz, ja auf Steinen, Mauern, feuchten Tapeten und Papier. Auf diesen Substraten bilden sie rußartige Überzüge von dunkler bis schwarzer Farbe. *Torula* ist dadurch bekannt, daß ihre Hyphen durch gemmenartigen Verfall hefeähnliche Konidien bildet.

Leicht zu beschaffende Untersuchungsobjekte sind weiterhin *Scolicotrichum melanophtorum*, das auf Melonen und Gurken vorkommt. Stengel, Blätter und Früchte bekommen braune Flecken, auf denen die Konidienträger als grüner Schimmel entstehen.

Cladosporium herbarum ist überall gemein auf Pflanzenstoffen, auf Holz, Mist, Papier usw., auf denen er einen gelb- bis schwarzgrünen Überzug bildet. Dieser Pilz tritt als sogenannte Schwärze an den Blättern der Erbsen auf. *C. cucumerinum* kommt etwas seltener auf Gurken vor.

Die Artenfülle der *Dematiaceae* ist überaus groß. Im Sommer und Herbst ist auf sehr reichliche Ausbeute bei Exkursionen zu rechnen. Alle irgendwie veränderten Pflanzenteile sind zu beachten.

§ 417.

Gruppe der *Stilbaceae*. Hyphen und Konidienträger bilden ein Koremium, d.h. die parallelen Konidienträger sind miteinander verwachsen. Die vegetativen Hyphen sind in oder auf dem Substrat. Bei uns in Europa sind alle Arten Saprophyten. Zu suchen haben wir sie daher auf faulender Unterlage, Mist von allen Tieren, faulenden Baumstümpfen, Hutpilzen, Kartoffeln, Insektenleichen usw. Wir untersuchen:

Coremium glaucum, das sehr häufig auf eingemachten Früchten zum Ärger der Hausfrau auftritt. Diese Form ist wie ein Bäumchen gebaut und besonders schön.

Stysanus stemonitis bildet braunschwarze Koremien; es ist überall häufig auf Pflanzenteilen, Humus, an Mauern, die mit Kanalabwässern benetzt werden.

Isaria-Arten kommen auf Insektenleichen vor und bilden die Koremium-Form zu den *Cordyceps*-Arten.

§ 418.

Gruppe der *Tuberculariaceae*. Hyphen und Konidienträger bilden lagerartige Polster, besitzen aber niemals ein besonderes Hüllgewebe. Die *Tuberculariaceae* sind Parasiten und Saprophyten.

Wir untersuchen *Tubercularia vulgaris*, die auf Ästen und Stämmen von Laubbäumen gemein ist. Das Fruchtlager ist hellrot bis zinnoberrot und l-2 mm breit. Es ist die unfruchtbare Form von *Nectria cinnabarina*, einem Ascomyceten.

Illosporium carneum bildet kleine rote Lager auf der Flechte *Peltigera canina*. Andere *Illosporium*-Arten kommen auf anderen Flechten vor.

Volutella ciliata kommt häufig auf *Cucurbita, Pinus* und Kartoffeln vor. Das Lager ist scheibenförmig oder halbkugelig.

Fusarium bildet kissenförmige oder ausgebreitete Lager. Eigenartig sind die Konidien. Sie sind zylindrisch oder sichelförmig, meistens mit einigen Querwänden. *F.aurantiacum* ist häufig auf faulenden Kartoffeln. Am gleichen Fundort ist ebenfalls häufig *F.coeruleum* und auch *F.solaris*. Andere Arten kommen vor an faulenden Samen, Stengeln und Blättern, Mist und dem Schleimfluß der Bäume.

Exosporium tiliae suchen wir selten vergebens auf Stümpfen und Ästen von Linden.

4. Mycelia sterilia

§ 419. Als Anhang zu den *Fungi imperfecti* werden noch die *Mycelia sterilia* behandelt. Hierher rechnen alle die Formen, von denen nur Mycelien bekanntgeworden sind. Man findet sehr häufig Mycelien, bei denen die Zugehörigkeit zu den Pilzen noch nicht klargestellt ist. Sie sind mit eigenen Namen belegt worden. Man versäume nicht, einige von ihnen zu sammeln und zu präparieren. Wir untersuchen im einzelnen:

Sclerotium. Sklerotien gibt es in der verschiedensten Größe und Gestalt. Auch das Mutterkorn ist ein Sclerotium. Wir finden an den Lamellen der Blätterpilze *S.pubescens*, auf Lohe *S.vaporarium.* Es treten ungefähr 30 verschieden benannte Sklerotien in unserer Flora auf.

Rhizoctonia violacea bildet unterirdische Hyphenstränge an Baumstümpfen und Wurzeln zwischen Holz und Rinde. *Rhizoctonia* bildet auch Mykorrhiza.

Rhizomorpha subcorticalis bildet braune Stränge, die zuletzt berindet sind, zwischen Rinde und Holz bei modernden Baumstümpfen.

Pilzgallen. Pilzmycelien unbekannter Herkunft kleiden Gallen aus, z.B. die Fruchtgallen des gelben Besenginsters (*Sarothamnus scoparius*). Man nennt diese Pilze Ambrosiapilze. Wenn die Pilzauskleidung der Gallen bereits dunkel verfärbt ist, dann sind schon Hefen, *Dematien* und einige Schimmelpilze angesiedelt.

Pilzwurzeln (Mykorrhiza). An den Wurzeln mancher Phanerogamen finden sich Auswüchse und Anschwellungen, die von Pilzhyphen, Aktinomyceten oder Bakterien (siehe Bakterienknöllchen § 269) bewohnt und verursacht sind. Man unterscheidet eine ektotrophe und eine endotrophe Mykorrhiza, die Pilzgallen und die Bakterienknöllchen.

Die ektotrophe Mykorrhiza finden wir vor bei der Kiefer, der Fichte, der Buche, beim Ginster und den *Erika*-Arten.

Die endotrophe Mykorrhiza kommt vor bei den Bodenwurzeln unserer Orchideen, z.B. auf *Neottia nidus-avis.* Die befallenen Wurzeln sind gelb verfärbt. Die äußere Rindenlage der Wurzel ist von dem Pilz befallen.

Von unseren Waldbäumen suchen wir uns im Frühjahr oder Sommer Keimlinge oder einjährige Pflanzen und graben sie vorsichtig aus.

§ 420. Präparation der Hyphomyceten und der *Mycelia sterilia*.

l. Schimmelpilzähnliche Formen werden zunächst in der *Abelschen* Flüssigkeit lebend untersucht. Ist das Material der Verarbeitung wert, so kann es, soweit es keiner Färbung bedarf, sofort in Lävulosegelatine nach *Heringa* und *ten Berge*, in Hausenblasengallerte oder Glyceringelatine eingeschlossen werden.

2. Färbungen können an den Hyphen vorgenommen werden wie bei allen Schimmelpilzen. Siehe unter *Mucor*, auch unter Fäulnis- und Schimmelpilzen.

3. *Tubercularia, Illosporium* und sämtliche übrigen Formen, die eingebettet und geschnitten werden müssen, bettet man nach der Fixierung in *Pfeiffer*, Formalinalkohol oder Trichloressigsäure in Zelloidin mit nachfolgender Glycerinbehandlung des Blockes - auch Terpineolbehandlung ist vorteilhaft - oder in Gummi arabicum ein.

> Färbung: Zur Färbung verwendet man alle Färbungen für parasitische Pilze in Phanerogamen wie Alizarinviridin-Säurefuchsin, *Delafields* Hämatoxylin-Säurefuchsin, Hämalaun- Eosin, Indolblau-Eosin, *Becher*-Farben mit Nachfärbungen.
>
> Querschnitte durch Pilzgallen können außerdem noch gefärbt werden mit Magdalarot-Anilinblau oder Lichtgrün.

Die Objekte zum Studium der Mykorrhiza fixiert man in Chromessigsäure, *Juel*, Pikrinschwefelsäure, *Pfeiffer*.

Das Einbetten kann in Paraffin und in Zelloidin erfolgen.

Man färbt mit Methylenblau-Säurefuchsin oder nach der *Gramschen* Methode der Bakterienfärbung. Diese Methode wird hauptsächlich bei den Auftreibungen der Erle verwendet, die viele Aktinomyceten aufweisen. Ferner färbt man mit Safranin-Alizarincyanin, Safranin-Alizarinviridin, Hämatoxylin nach *Heidenhain* und *Häggqvist* mit Nachfärbung von Säurefuchsin, Kernschwarz-Eosin. Bei *Neottia nidus-avis* empfiehlt *H.Gäcks* (112) besonders das Eisentanninverfahren.

(112) H.Gäcks, Mikrokosmos XXXI, 1937/38, S.48

Kapitel XI: Flechten

A. Allgemeines

§ 421. Die Flechten (*Lichenes*) sind keine einheitlichen Lebewesen, sondern entstehen durch das Zusammenleben von Pilzen und Algen. Dieses Phänomen kommt in der Natur nur hier einmal vor. Die Umklammerung oder Verschmelzung von Alge und Pilz ist so innig, daß dem Auge eine Pflanzenform erscheint, die völlig verschieden von den bei Algen und Pilzen gewohnten ist. Die Algen vermehren sich im Flechtenthallus nur durch vegetative Teilung, also ohne Sexualakt. Der Pilz, er ist in der Regel ein Ascomycet, bildet Fruchtformen aus. Bei wenigen tropischen Flechten finden sich auch Basidomyceten als Flechtenpilze.

Früher hat man die Flechten für einheitliche Organismen gehalten und die Algen als Fortpflanzungsorgane angesprochen. Deshalb wurden sie Gonidien benannt. Die Bezeichnung Gonidien für die im Flechtenthallus vorkommenden Algen ist beibehalten worden. Die Algen rekrutieren sich aus den Cyanophyceen, und soweit sie grün sind meistens aus den Chlorophyceen. Doch beteiligen sich auch noch andere grüne Algen am Aufbau des Flechtenthallus.

Das eigenartige Zusammenleben von Alge und Pilz hat die Forscher immer wieder zu einer würdigenden Beurteilung gedrängt. Lange Zeit hielt man die Algen für Sklaven der Pilze, man sprach von einem Helotismus der Algen. Neuere Forscher betonen aber mehr die Auffassung, daß die Flechten biologisch als Einheit zu deuten sind und daß das Zusammenleben von Alge und Pilz mehr eine Genossenschaft bildet zur Eroberung von Wohnplätzen, die jedem einzelnen der Partner allein immer verschlossen blieben, von beiden gemeinsam aber erobert werden können.

Die Flechten gehören mit zu denjenigen Kryptogamen, die der Präparation erhebliche Schwierigkeiten entgegensetzen können. Sie verlangen besonders sorgfältiges Eingehen auf ihre chemischen Eigenarten und leider hat fast jede Flechte ihre eigenen chemischen Geheimnisse.

Flechten sind überall zahlreich zu finden, nur nicht mehr im Bereiche der Großstadt, deren Ruß und Rauch sie vertreiben. Sie kommen als Strauchflechten frei vor oder als Rindenflechten und Steinflechten mit ihrer Unterlage mehr oder weniger innig verbunden. Beim Sammeln ist dann diese Unterlage meistens mitzunehmen. Eine Kultur von Flechten für die Materialbeschaffung ist nicht möglich, man ist ganz und gar auf das Sammlerglück angewiesen.

Die Flechten sind nur an nassen Tagen weich und biegsam, an trockenen Tagen jedoch strohtrocken und leicht zerbrechlich. Es ist daher schon beim Sammeln darauf Rücksicht zu nehmen, daß die Objekte nicht beschädigt oder beschmutzt werden.

Wer sich mit Flechten beschäftigen will, muß schon zum einfachen systematischen Bestimmen Schnitte anfertigen und einfache mikrochemische Reaktionen ausführen. Diese Untersuchungen bedürfen jedoch nur einfacher, leicht herstellbarer Schnitte. Feuchte Thalli werden zwischen zwei Hollundermarkscheibchen eingeklemmt und mit dem Rasiermesser aus freier Hand oder mit dem Mikrotom geschnitten. *Lindau* gibt in seiner bekannten Flora an, daß Laubflechten von ihm am liebsten trocken geschnitten werden. Die trockenen Thallusstückchen werden zwischen den Hollundermarkscheibchen eingeklemmt und geschnitten, der Schnitt dann in Wasser aufgeweicht.

Diese beiden Methoden sind nur beschränkt anwendbar. Nur glatte laubartige Thalli lassen sich so schneiden. Wenn man bessere Schnitte von Flechten für anspruchsvollere Studien anfertigen will, muß man *lege artis* fixieren und einbetten sowie unter Umständen Dünnschliffe anfertigen.

§ 422. Fixiermittel für Flechten. Bei Flechten sind folgende Fixiermittel anzuwenden:

1. Die saure Kupferacetat-Formalinlösung nach *Kisser* zur Erhaltung der grünen Farbe der Gonidien.
2. Die Mischung nach *Carnoy*.
3. Chromessigsäure nach *Ulbrich*

Destilliertes Wasser	100 ccm
Eisessig	1,5 ccm
Chromsäure	0,5 g

4. Das *Pfeiffersche* Gemisch.
5. Das *Zenkersche* Gemisch.
6. Susa nach *Heidenhain*.
7. Formessigsprit nach *Dittrich*.

In die Fixiermittel dürfen die Flechten natürlich nur gelangen, nachdem sie in Wasser gelegen haben und total aufgeweicht und gequollen sind. Außerdem müssen sie vollständig frei sein von erkennbaren mineralischen Stoffen wie Sand oder Steinpartikelchen. Ganz trockene Flechten bedürfen einer vierundzwanzigstündigen Wässerung bis sie ganz durchweicht sind. Am besten nimmt man ausgekochtes, abgekühltes Wasser, das auch so viel Luft wie möglich aus den Flechten auszieht.

Laub- und Strauchflechten bereiten keine Schwierigkeiten. Rindenflechten werden mit der Unterlage fixiert. Dabei ist nur zu beachten, daß durch die Gerbstoffe bei Anwendung von Fixiermitteln mit Metallsalzen Niederschläge entstehen. Hier verwendet man am besten *Pfeiffer*, *Carnoy* oder den Formessigsprit nach *Dittrich*.

Flechten auf Holz werden mit dem Messer abgeschnitten und dann mit dem restlichen Holz verarbeitet. Bei Material aus verrotteten Zaunpfählen wendet man die Zelloidineinbettung an; ist das Holz aber noch sehr hart, so muß unter Umständen ein Dünnschliff angefertigt werden.

Steinflechten sind Sorgenkinder für den Mikroskopiker. In diesem Buche werden sie nach der verschiedenen technischen Bearbeitung in Kalk- und Kieselflechten unterschieden und getrennt besprochen.

§ 423. Einbetten und Schneiden.

Für das Einbetten stehen zur Verfügung:

1. Gummi-arabicum-Einbettung nach chlorophyllerhaltender Fixierung. Die Schnitte kommen sofort nach dem Schneiden zum Auflösen des Gummis in Wasser und dann in verdünntes Glycerin. Das langsame Eindunsten hat im Dunkeln zu erfolgen, damit das Chlorophyll nicht ausbleicht. Der Einschluß erfolgt dann in Glyceringelatine nach *Kaiser*, in Lävulosegelatine nach *Heringa* und *ten Berge* oder in Azetatgelatine.

2. Paraffin. Die Flechten müssen aus Zedernöl, sehr schlecht schneidbare Formen sogar aus eingedicktem Zedernöl, in Paraffin übertragen werden. Die Überführung aus dem Alkohol in Zedernöl hat langsam mit Zwischenstufen zu erfolgen. Man benützt

1.	Stufe:	Zedernöl abs. / Alkohol	1 : 1	2 Stunden
2.	Stufe:	Zedernöl abs. / Alkohol	3 : 1	2 Stunden
3.	Stufe:	Reines Zedernöl		2 x 24 Stunden

Einmal das Zedernöl wechseln! Dann kommen die Objekte für 48 Stunden in Paraffin.

Das eingedickte Zedernöl mischt sich nicht mit Alkohol. Als Zwischenstufen hat man Gemische von Zedernöl mit Xylol zu verwenden. Sonst ist das Verfahren das gleiche wie oben.

Das Aufkleben der Paraffinschnitte erfolgt nach Kolumbe (113) mit Gelatinelösung und nachträglicher Formolfixierung. Trotz des Aufklebens empfiehlt sich ein Kollodiumguß. Die Aufklebegelatine färbt sich leider in den meisten Fällen mit.

Die Einbettung in Paraffin ist leider nur für eine beschränkte Zahl von Flechten benützbar. Man versuche es jedoch immer dann, wenn man dünne Schnitte erreichen will.

(113) Kolumbe, Mikroskopie für Naturfreunde X, Heft 7, 1932

3. Das Einbetten in Zelloidin. Im Zelloidin schneiden sich die Flechten fast ideal leicht, wenn die Blöcke mit Glycerin durchtränkt werden. Das gilt auch uneingeschränkt für Rindenflechten. Bei längerem Verweilen in Wasser quellen die Schnitte auf und lösen sich meist unangenehm häufig vom Zelloidin teilweise ab; bei weiterer Alkoholbehandlung gehen die Quellungen allerdings wieder zurück. Aufkleben hilft dagegen nichts.

Manchmal ist es vorteilhaft, das Zelloidin mit Alkoholäther aufzulösen und den Schnitt als losen Schnitt zu verarbeiten. Beim Übertragen der Schnitte von einem Gefäß in das andere verdrehen sich aber längere Schnitte leicht um ihre Längsachse und lassen sich schwierig entwirren. Da ist es am zweckmäßigsten, die Schnitte in der Uhrschale zu belassen und nur die Flüssigkeiten zu wechseln. Liegen die Objekte wieder in stärkerem Alkohol, hört die Neigung zu Verdrehungen wieder auf.

Ideal ist keine der drei Einbettungsmethoden.

Flechtenschnitte sollen nicht allzu dünn sein, wenn sie als lose Schnitte zusammenhalten sollen. Sind sie zu dick, so lassen sie wieder keine Einzelheiten erkennen. Eine Dicke von 20-30µ dürfte das Richtige sein. Dünnere Schnitte sind für einige Spezialaufgaben nötig. Sie sind nur als aufgeklebte Paraffinschnitte herstellbar.

Schnitte von Flechten zeigen nicht immer alle Einzelheiten; erst kleine Partikel, die durch das Zerzupfen von ca. 20µ dicken Schnitten erzielt werden, lassen manchmal besondere Einzelheiten erkennen, z.B. die Arten der Umklammerung der Gonidien durch die Pilzhyphen.

§ 424. Das Anfertigen von Dünnschliffen. Objekte, die zu hart zum Schneiden sind, werden durch Feilen oder Schleifen in so dünne Scheibchen gebracht, daß sie im Mikroskop untersucht werden können. Man nennt sie Dünnschliffe. Sie werden hergestellt zunächst von Gesteinen und pflanzlichen Versteinerungen, ferner von anderen pflanzlichen und tierischen Hartgebilden wie Schalen von Obstkernen, Hölzern, Knochen, Molluskenschalen.

Die Dicke der Dünnschliffe ist in der Regel erheblich größer als die der Schnitte. Man schleift in der Regel nur so lange, bis das Objekt durchsichtig geworden ist. Ein sehr guter Dünnschliff ist aber immerhin 0,03-0,04 mm dünn. Für unsere Zwecke bei der Flechtenuntersuchung ist das gerade die erwünschte Dicke. Das Schleifen erfordert große Übung und einiges Bastelgeschick.

Petrographische Dünnschliffe stellt man kaum mehr selbst her, man bezieht sie von Firmen, welche die Herstellung fabrikmäßig betreiben wie die Firma *Voig*t und *Hochgesang* in Göttingen.

Dünnschliffe können auf verschiedene Art hergestellt werden. Die Methode richtet sich natürlich nach den Besonderheiten der Objekte. Diese können nach ihrer Härte homogen sein wie eine Nußschale oder ein Röhrchenknochen oder inhomogen wie Flechten auf Gestein oder Sandunterlage, ferner Stengel von Schachtelhalmen mit viel eingelagerter Kieselsäure.

Nichthomogene Objekte, wie Flechtenrasen auf Sand, werden zuvor regelrecht in Zelloidin eingebettet und nach der Härtung in 80 %igem Alkohol durch Karbol-Xylol und Xylol hindurchgeführt und mit in Xylol gelöstem Kanadabalsam durchtränkt. Das Härten des Kanadabalsams muß nun mit Geduld abgewartet werden. Nicht völlig erhärteter Balsam kann nicht geschliffen werden. Man bette daher nur kleine Stücke ein, die natürlich rascher erhärten als größere.

Das eigentliche Schleifen wird mit Erdnußöl (Salatöl) oder mit Rizinusöl unter Beimischung von zuerst gröberen, dann feineren Sorten von Schmirgel auf Glasplatten vorgenommen. Den Schliff drückt man mit dem Zeigefinger oder einem Holzklötzchen auf die Glasplatte und vollführt damit Kreisbewegungen. Geschliffen und zum Schlusse poliert werden müssen beide

Seiten. Das Polieren geschieht zunächst auf einem feinen sogenannten Ölstein (Abziehstein), dann auf einem Lederriemen, der mit Triepel eingerieben ist.

Das Schleifen solcher Objekte geht sehr rasch. Die zu schleifenden Objekte können vor der Zelloidineinbettung ordentlich fixiert, auch im Stück gefärbt werden, z.B. mit Karmin- oder Hämatoxylinfarben. Die fertigen Schliffe werden mit Xylol gereinigt und schließlich in Kanadabalsam eingeschlossen. Man kann auch den Kanadabalsam aus dem Schliff völlig entfernen, was ja schon meistens beim Reinigen mit Xylol geschieht, und in Glyceringelatine oder Caedax einschließen, wenn man Wert darauf legt. Caedax ist zum Schleifen nicht zu gebrauchen. Er erhärtet nicht genug.

Die Firma *Voigt* und *Hochgesang* in Göttingen bringt ein in Xylol lösliches Kunstharz (Kollolith) in den Handel, das sich besonders für die Anfertigung von Dünnschliffen eignet.

Kalkflechten, Flechten auf Lava oder anderem Gestein sind oft so fest auf ihrer Unterlage verankert, daß diese geschliffen werden kann, ohne daß man auf die Flechten Rücksicht zu nehmen braucht. Man schneidet mit einer Laubsäge, in die man eine Uhrfeder eingespannt hat, ein geeignetes Plättchen heraus und klebt es mit erwärmtem festem Kanadabalsam oder auch Siegellack auf eine dicke Glasplatte auf. Hierauf schleift man, wie oben bereits geschildert, und poliert anschließend diese eine Seite. Endlich löst man das Objekt mit einem Lösungsmittel (Xylol für Kanadabalsam und Brennspiritus für Siegellack) von seiner Unterlage, dreht um, kittet erneut auf, und schleift und poliert nun, bis der Schliff fertig ist. Danach erfolgt erneutes Lösen, Reinigen und Einschließen des Schliffes. Eventuell werden die Schliffe vor dem Einschließen noch mit Reagenzien behandelt.

Statt Schmirgel kann man auch sogenannte Kunstbimssteine verwenden, die in verschiedener Korngröße von Stukkateuren verwendet werden. Man erhält sie in Geschäften, welche Utensilien für Dekorationsmaler führen.

Straßburger gibt an, daß das Schleifen mit Schmirgel bei festen Objekten durch Feilen mit Feilen verschiedener Feinheit ersetzt werden kann. In den meisten Fällen stehen die notwendigen Feilen nicht zur Verfügung, während Schmirgel oder auch Schmirgelpapier in verschiedenen Korngrößen leicht zu beschaffen sind.

Man unterscheidet nun Flächenschliffe parallel zur Oberfläche oder Querschliffe bzw. Längsschliffe senkrecht zur Oberfläche der Objekte. Die eigentliche Schleiftechnik ist in allen Fällen natürlich gleich.

[Als Schleifpulver verwendet man heute zweckmäßig Siliciumcarbidpulver, das man sehr preiswert („schwarze Qualität“) in Handlungen für Steinmetzbedarf erhält. Man verwendet die Körnungen 80 (Vorschleifen), 400 und 800; man schleift naß auf dicken Glasplatten, wobei man beim Schleifen eine Acht ausführt.

Es ist peinlich darauf zu achten, daß für jede Körnung eine andere Glasplatte verwendet wird und daß man beim Übergang zu einer feineren Körnung sowohl das Objekt als auch die Hände sehr sorgfältig abspült, damit keine Reste der gröberen Körnung verschleppt werden, die sonst den Schliff verkratzen oder sogar zerstören.

Nach längerem Gebrauch wirft man die Glasplatte für die Körnung 80 weg, verwendet die Glasplatte der Körnung 400 nun für Körnung 80 und verwendet für Körnung 800 eine neue Glasplatte]

§ 425. Das Färben der Flechtenschnitte. Die Membranen der Gonidien bestehen aus Zellulose, die Membran der Pilzhyphen besteht vornehmlich aus Hemizellulosen sowie aus Stoffen, die sich in heißem Wasser lösen. In den Schnitten der Flechten finden sich vielfach Kristalle von oxalsaurem Kalk. Man entfernt ihn mit 5 %igem salzsauren Alkohol, worin sich das Kalziumoxalat langsam löst. Die Einwirkungszeit kann mehrere Stunden umfassen. Man vergesse auch nicht, sich davon zu überzeugen, daß alle störenden Chrom- und Sublimatniederschläge entfernt sind.

Zum Färben der Flechten können die üblichen Methoden nicht angewendet werden. Auch die Goldimprägnation versagt völlig.

An Färbemethoden bei Flechten stehen zur Verfügung:

§ 426. A. Einfache morphologische Färbungen.

1. Morphologische Färbungen lassen sich am besten mit roten sauren Farbstoffen wie Orseillin BB, Säurefuchsin und Azokarmin B durchführen. Diese drei Farbstoffe färben in essigsaurer Lösung. Der wässrigen Farbstofflösung wird auf je 100 ccm Lösung 1 ccm Essigsäure beigefügt. Man färbt bis zu einer Stunde, so daß der Schnitt mit Sicherheit durch und durch gefärbt ist. Die Methode ist auch für Zelloidinschnitte geeignet.

Das Differenzieren hat nun sorgsam zu geschehen. Meistens genügt dazu schon Brunnenwasser. Sonst ist 50 %iger Brennspiritus ohne Salzsäurezusatz ausreichend, nur ganz selten ist salzsaurer Alkohol anzuwenden. Das Unterbrechen der Differenzierung erfolgt durch Überführen in l %ige Essigsäure.

Am empfehlenswertesten ist die Färbung mit Säurefuchsin oder Rubin S, das alle Flechtenbestandteile in verschiedenen Nuancen von Rot bis Rotbraun färbt. Säurefuchsin färbt zuverlässig.

Die Gonidien färben sich stark, die Pilzhyphen etwas schwächer. Es färben sich jedoch alle Flechtenbestandteile. Orseillin BB und Azokarmin B färben ebenfalls die Gonidien und vom Pilz die Asci, das Hymenium und die lockeren Hyphen, nicht aber das Plektenchym.

2. Von den Beizenfarbstoffen färben nur einige wenige Hämatoxilinfärbungen und von den *Becher*-Farben nur das Alizarinviridin. Diese Farbstoffe färben Gonidien und Pilze. In erster Linie sind zu nennen:

a) Alaun-Glycerin-Hämatein nach *Rawitz*. Die Farbe wird sehr verdünnt angewendet. Auf 20 ccm destilliertes Wasser nimmt man einen einzigen Tropfen. Die Färbung dauert 24 bis 48 Stunden. Nach 24 Stunden sind nur die Gonidien, nach 48 Stunden auch die Pilzhyphen gefärbt. Zelloidin wird nicht angefärbt. Die Algen werden blauschwarz, die Hyphen hellblau. Überfärbungen können durch die Kontrolle der Färbung leicht vermieden werden. Zu korrigieren sind sie durch salzsauren Alkohol.

   Diese guten Färbeergebnisse setzen aber eine einwandfreie Stammlösung voraus. Selbsthergestellte Stammlösungen, die manchmal bei anderen Objekten noch leidlich färben, enttäuschen bei Flechten. Man beziehe das Alaun-Glycerin-Hämatein für die Flechtenfärbung am besten von *Hollborn*.

b) Hämatoxylin nach *Böhmer* färbt in den meisten Fällen Flechtenschnitte recht gut, auch das schwer färbbare Plektenchymgewebe. Das Zelloidin färbt sich stark an, läßt sich aber schnell mit salzsaurem Alkohol beim Differenzieren entfärben.

c) Hämalaun nach *Mayer* färbt entgegen anderslautenden Literaturangaben Flechtenschnitte gar nicht oder sehr schlecht.

d) Alizarinviridin nach *Becher* ist nicht für Zelloidinschnitte geeignet. Alizarinviridin färbt nach langer Einwirkung die Gonidien grün und die Pilzhyphen sehr schwach oder gar nicht.

§ 427. B. Kontrastfärbungen von Gonidien und Hyphen.

1. Eine Doppelfärbung von Gonidien und Pilzhyphen setzt Farbstoffe voraus, welche nur Gonidien und nur Pilze färben. Die Anzahl dieser Farben, die praktisch anwendbar sind, ist sehr klein.

Basische Anilinfarben, die überhaupt bei Flechten färben, sind das *Chinolinblau* (Zyanin), das *Methylenblau* und das *Malachitgrün*. Diese drei Farben färben die Gonidien. Die Pilze oder Teile davon färben von basischen Anilinfarben das Chrysoidin, das Fuchsin, das Pyronin und das Safranin, von sauren Farbstoffen das Säurefuchsin, ferner können das Alizarinviridin nach *Becher* und einige Rezepturen des Hämatoxylins so angewendet werden, daß nur die Gonidien gefärbt werden. Damit ist der ganze Farbvorrat erschöpft.

Von den Metallimprägnationen ist überhaupt nur eine Silberimprägnierung möglich, und diese Darstellung ergibt völlig unbefriedigende Resultate.

Nach meinen Erfahrungen empfehlen sich folgende Färbungen:

2. Hämatoxylin-Pyronin, Hämatoxylin-Chrysoidin. Man färbt mit Alaun-Glycerin-Hämatein nach *Rawitz* nur so lange, bis die Gonidien gefärbt sind und färbt dann mit Pyronin oder mit Chrysoidin nach; auch das Hämatoxylin nach *Böhmer* kann angewendet werden, wobei man so weit differenziert, bis nur noch die Gonidien gefärbt sind; auch das Kupferhämatoxylin nach *Benda*, das einen sehr schönen blauschwarzen Ton für die Gonidien ergibt, ist oft brauchbar; in beiden Fällen färbt man die Pilzhyphen mit Pyronin oder Chrysoidin.

3. Phenolhämatoxylin-Pyronin. Manche Flechten zeichnen sich durch ganz besonders schwierige Farbannahme aus, wie die Podetien verschiedener *Cladonia*-Arten. Hier sind die Gonidien nur durch Färbungen mit Eisenhämatoxylin nach *Heidenhain* und *Häggqvist* oder besser noch durch das ganz intensiv färbende Phenolhämatoxylin zu färben.

Zur Färbung mit Phenolhämatoxylin benötigen wir folgende zwei Lösungen:

I.	Konzentr. alkoholische Eisenchloridlösung	25 ccm
	Brennspiritus	25 ccm
II.	Phenolum liquefactum	50 ccm
	Hämatoxylin	0,5 g

Diese Hämatoxylinlösung ist zuerst farblos und wird nach einigen Tagen gelb; in diesem gelben Zustand ist die Farblösung brauchbar. Ihre Haltbarkeit beträgt ungefähr eine Woche.

Das Phenolum liquefactum ist ätzend und giftig. Beim Verarbeiten ist größte Vorsicht zu üben. Damit beschmutzte Finger sind *sofort* mit sehr viel Wasser gründlichst zu säubern.

Die Zelloidinschnitte werden 20 Minuten in die beschriebene Eisenchloridlösung gelegt und dann in Brennspiritus ausgewaschen bis das Zelloidin farblos geworden ist. Hierauf kommen die Schnitte in die Lösung II mit einer Färbedauer von 15 Minuten bis 24 Stunden; die Färbedauer muß ausprobiert werden. Ausgewaschen wird zunächst mit Brennspiritus und dann mit destilliertem Wasser. Differenziert wird eventuell mit Lösung I. Der Brennspiritus ist hier wegen seines Gehaltes an Pyridinbasen notwendig und durch reinen Alkohol nicht ersetzbar.

Die Gonidien sind tiefschwarz und die Hyphen farblos; sie werden deshalb mit Pyronin oder mit Chrysoidin nachgefärbt. Einschluß nur in Caedax.

Die Färbung ist nur haltbar, wenn alle löslichen Bestandteile aus den Schnitten sorgfältigst ausgewaschen wurden.

4. Chinolinblau-Erythrosin. Die Vorschrift für diese Doppelfärbung wurde zuerst von *Chamberlain* bekanntgegeben. Sie ist dann kommentarlos in die Literatur übernommen worden. *Chamberlain* hatte seine Färbungen vorgenommen mit einer amerikanischen Handelsmarke von Chinolinblau und dabei ausdrücklich betont, daß er mit deutschen Marken nicht färben konnte. Die einzelnen Marken von Chinolinblau sind anscheinend sehr verschieden.

Bei meinen Versuchen mit den deutschen Marken habe ich festgestellt, daß bei Flechten manchmal eine schwache Färbung der Gonidien erzielt wird, häufig jedoch wird die Farbe gar nicht angenommen. Die Färbung gelingt jedoch auch mit den deutschen Chinolinmarken recht gut, wenn die Flechtenschnitte vorgebeizt werden. Als Beize ist Silberjodid zu verwenden.

Die Arbeitsvorschrift ist folgende:

1. Die Schnitte kommen aus Wasser in *Lugolsche* Lösung, die mit gleichen Teilen destilliertem Wasser verdünnt ist. Am besten eignet sich Material, das mit sublimathaltigen Fixiermitteln fixiert worden ist. In dieser Lösung nimmt der Schnitt Jod auf und färbt sich gelb, und zwar am stärksten die Schicht mit den Asci. Die Menge des aufgenommenen Jodes ist maßgebend für die Stärke der Färbung. Zu schwach jodierte Stücke können nicht stark genug gefärbt werden. Zu stark jodierte und ge-

färbte Schnitte können nach der Färbung differenziert werden. Die Zeitdauer für das Jodieren ist im allgemeinen 2 Stunden.

2. Hernach wird in destilliertem Wasser abgeschwenkt. Zelloidinschnitte müssen so lange gewässert werden, bis das Zelloidin nicht mehr gelblich ist.
3. Der gewässerte Schnitt kommt nun für 1-2 Stunden im Dunkeln in eine l %ige wässrige Silbernitratlösung, wobei sich Silberjodid bildet.
4. Gründliches Auswaschen mit destilliertem Wasser! Diese Arbeiten müssen im Dunkeln, Halbdunkeln oder bei künstlichem Licht vorgenommen werden. [Lampenlicht, keine TL-Leuchten!].
5. Hierauf folgt das Färben mit Chinolinblau. Die Farblösung ist in § 99 angegeben. Die Zeitdauer muß für jede Flechte ausprobiert werden. Meistens ist die Färbung innerhalb 10-15 Minuten erfolgt. Rindenflechten können bis 24 Stunden und noch mehr benötigen. Die Differenzierung erfolgt mit 40 %igem Alkohol; dazu genügt Brennspiritus.

Diese Färbung kann leider nicht gebeizt werden. Anschließend erfolgt Gegenfärbung mit Pyronin oder Säurefuchsin. Das von *Chamberlain* angegebene Erythrosin färbt nach meinen Erfahrungen bei den allermeisten Flechten nicht.

Nach gründlichem Auswaschen wird rasch über 50 %igen Alkohol, Isopropanol, Karbol-Xylol, Xylol und Terpineol in Caedax eingeschlossen.

Nicht gelungene Färbungen lassen sich sofort entfernen, wenn man das Silberjodid mit l %iger wässriger Kaliumcyanidlösung auflöst.

Das Silberjodid ist der Träger der Färbung, wobei die Färbung aber selektiv nach dem histologischen und chemischen Aufbau der Schnitte erfolgt. Die fertigen Färbungen sind lichtecht. Das Silberjodid zersetzt sich zwar bei starker Beleuchtung, aber es regeneriert sich wieder im Dunkeln. Gefärbtes Silberjodid scheint sich am Licht nicht mehr zu verändern.

5. Methylenblau-Pyronin. Manche Flechten färben sich gut mit Methylenblau. Dabei kann die Färbung soweit differenziert werden, daß nur noch die Gonidien gefärbt sind. Die Färbung kann mit Pikrinsäure gebeizt werden, wobei die blaue Färbung in Grün umschlägt. Beim Beizen mit Tannin oder Phosphorwolframsäure bleibt der blaue Farbton erhalten. Die Gegenfärbung kann dann mit Pyronin oder mit Säurefuchsin erfolgen. Einschluß in Caedax.

§ 428. Färbung der Pilzsporen in den Asci der Apothezien. Vielfach sind die Pilzsporen von Natur aus dunkel gefärbt. Wenn es nicht so ist, so können die Sporen gefärbt werden. Dazu benützt man das Karbolfuchsin für Bakterienfärbung. Man färbt mit einer Mischung aus 20 Tropfen Aqua dest. und 5 Tropfen Karbolfuchsin. Die Färbezeit ist 10-25 Minuten; es soll sehr kräftig gefärbt werden. Ausgewaschen wird mit 50 %igem Alkohol, und zwar so lange, bis nur noch die Sporen gefärbt erscheinen. Diese Färbung kann mit Pikrinsäure oder Phosphorwolframsäure gebeizt werden. Anschließend kann noch eine Färbung der Gonidien mit Chinolinblau oder Methylenblau oder Malachitgrün versucht werden, die mit Pyroninfärbung der Pilzhyphen abgeschlossen werden kann. Karbolfuchsin färbt die Rinden teilweise sehr stark an.

§ 429. Mikrochemische Untersuchungen. Das merkwürdige Zusammenleben von Pilz und Alge zeitigt besondere Verhältnisse auch im chemischen Haushalt der Flechten. Die Algen bilden keine Reservestoffe, zeigen jedoch sonst das gleiche chemische Verhalten wie im freien Zustande; der Pilz zeigt nur im jugendlichen Zustand die Zellulosereaktion. Sehr bald bilden sich Lichenin und Isolichenin. Flechten enthalten sehr viel oxalsauren Kalk und zahlreiche Farbstoffe.

Seit den Untersuchungen von *Zopf* sind sehr viele Flechtensäuren bekanntgeworden. Es sind saure, farbige, kristallisierbare Stoffe. Ihre Zahl ist sehr groß. Vermutlich sind die Flechtensäuren die Ursache für das schwierige färberische Verhalten der Flechten. Meistens sind sie auf der Oberfläche der Thalli, wo sie körnige Inkrustationen bilden, in größerer Menge erkennbar; an histologischen Schnitten sind sie regelmäßig sichtbar.

Hier können nur einige kleine Hinweise für die Untersuchungen an Flechtensäuren gegeben werden. Diese Frage interessiert mehr den Chemiker als den Botaniker. Zur Vornahme histochemischer Reaktionen sind Schnitte aus nicht fixiertem frischem oder getrocknetem Material notwendig.

Das Lichenin färbt sich mit Rutheniumrot rot. Die Reaktion hält sich in Glyceringelatine und in Caedax.

Die Cetrarsäure läßt sich an Schnitten verschiedener *Cladonia*-Arten, besonders aber von *Cetraria islandica* nachweisen. Die Schnitte kommen 2-3 Minuten in 25 %iges Ammoniak und werden hierauf mit einigen Tropfen von Eisen-III-chloridlösung betupft. Die Cetrarsäure bildet eine braunrote Färbung in der mittleren Hyphenschicht. Die Präparate können in Glyceringelatine eingeschlossen werden.

Die Flechtensäuren, von denen ungefähr 150 verschiedene Säuren bekannt sind, können auch rein und in kristallisiertem Zustand dargestellt werden. Nach *H.Thallmayer* (114), dem ich hier folge, geht man folgendermaßen vor:

1. Die Flechten werden zerkleinert und dann mit wenig Benzol oder Alkohol (1 ccm) aufgekocht (Vorsicht!) oder mit 1-2 ccm Chloroform oder Schwefelkohlenstoff extrahiert. Die Lösung wird filtriert. Beim Verdunsten hinterläßt diese Lösung die Flechtensäuren.
2. Schöne Kristalle erhält man auf folgendem Weg. Der unter 1. gewonnene Rückstand wird auf einem Objektträger mit einem kleinen Tropfen Anilin bedeckt und mit einem Deckglas abgeschlossen. Dieses Präparat wird nun 10 Sekunden und nach kurzer Zeit nochmals 10 Sekunden über dem Mikrobrenner erwärmt. Das Anilin löst die Säuren auf. Nach Tagen kristallisieren die Flechtensäuren aus. Die Präparate werden zweckmäßig in dieser Zeit vor Staub geschützt. Dauerpräparate davon können in Glyceringelatine eingeschlossen werden. Die Kristalle sind doppelbrechend.

(114) H.Thallmayer, Mikrokosmos XXXIV, 1940/41, S 47

B. Ausgewählte Beispiele zur Bearbeitung der Flechten

1. Laub-, Strauch- und Rindenflechten

§ 430. Laub-, Strauch- und Rindenflechten. Flechten können das ganze Jahr über gesammelt werden, auch im Winter bei Schnee. Recht viele Flechten finden sich ja an Baumrinden, Zäunen und ähnlichen Unterlagen. Schließlich sind gerade bei den Flechten Herbarexemplare verwendbar. Alle Färbungen an Flechten sind in erster Linie Membranfärbungen, und diese können auch an Herbarexemplaren durchgeführt werden. Die getrockneten Flechten werden sorgsam aufgeweicht und zur Erhöhung der Färbbarkeit ebenfalls mit den Fixiermitteln behandelt.

§ 431. Der vegetative Aufbau der Flechten.

1. Einen homöomeren Thallus, d.h. einen gleichmäßigen Aufbau aus Gonidien und Pilzen, zeigen alle *Collema*-Arten und *Leptogium*.

Collema hat Blaualgen als Gonidien, und zwar *Nostoc*-Arten. *Collema* ist nicht allzu häufig, doch treten ihre Arten in jeder Lokalflora auf. Bei feuchtem Wetter sind sie leichter zu finden als bei trockenem, weil sie dann gallertig aufgequollen und am besten zu erkennen sind.

Die Färbung geschieht hier entweder mit Azokarmin oder mit Alizarinviridin-Chromalaun nach *Becher*. Auch Säurefuchsin kann empfohlen werden.

Die Blaualgen färben sich weder mit Chinolinblau noch mit den Hämatoxylinfärbungen gut, doch ist das Verhalten der einzelnen Gallertflechten etwas verschieden. Mit Eisenhämatoxylin oder Phenolhämatoxylin sind die Blaualgen aber in jedem Falle zu färben.

2. Beim heteromeren Thallus sind die Algen auf bestimmte Plätze im Thallus beschränkt. Man erkennt deutlich den Thallusstreifen mit den Gonidien, die Pilzschichten und die Rinden-

schichten der Flechten als Abgrenzung gegen die Außenwelt. Endlich sehen wir die Rhizinen, welche die Flechte am Substrat befestigen.

Wir untersuchen:

Xanthoria parietina oder *X. polycarpa*. Diese beiden Flechten sind überall an Bäumen und Steinen anzutreffen und fallen beide durch ihre gelbe Farbe auf. Besonders gerne besiedeln sie Pappeln.

Xanthoria färbt sich gut mit verdünntem Alaun-Glycerin-Hämatein nach *Rawitz*, ebenso gut mit Chinolinblau und mit Säurefuchsin. *Collema* und *Xanthoria* sind zugleich Beispiele für den dorsiventralen Bau der Flechten.

Radiären Bau zeigen *Usnea* und die meisten Strauchflechten. *Usnea* findet sich überall an Bäumen. In der Ebene bleibt die Flechte sehr unansehnlich und wird deswegen häufig übersehen. In den Alpen jedoch ist *Usnea* eine stattliche Flechte.

Man schneidet nicht die ältesten dicken Teile des Lagers, sondern die mitteldicken Partien desselben. Die ältesten Teile des Lagers enthalten oft keine Gonidien mehr. An Schnitten durch *Usnea barbata* sieht man den axialen Markstrang, der aus zwei Schichten besteht. Um das solide innere Mark schließt sich eine Schicht von lockeren Hyphen, das äußere Mark, an. Darauf folgt die Gonidienschicht und endlich die Rinde. Wir fertigen Querschnitte und Längsschnitte an.

Usnea färbt sich hervorragend mit Säurefuchsin. Die einzelnen Bestandteile, auch verschiedenartige Pilzhyphen färben sich in verschiedenen Tönen von Rot.

Ein krustenförmiger Thallus findet sich bei sehr vielen Flechten auf Rinden, Holz und Stein. Bei den Krustenflechten ist das Lager nur im Jugendstadium typisch ausgebildet. Bei älteren Exemplaren findet man häufig nur noch eine staubige Masse. Der eigentliche Thallus ist dann recht häufig innerhalb der Gesteinsunterlage oder der Rinden zu finden. Bei Rindenflechten orientiere man sich daher vor dem Einbetten durch Rasiermesserschnitte, ob das Material das zeitraubende Einbetten auch lohnt. Es gibt auch Rindenflechten, bei denen der Thallus von vornherein unterrindig wächst.

Oberrindig (epiphloeodisch) ist der Thallus bei Arten der Gattungen *Opegrapha*, häufig an glattrindigen Bäumen, bei *Graphis*, bei *Arthonia* und bei *Cyphelium*. Unterrindig (hypophloeodisch) ist der Thallus bei einigen Arten von *Graphis* und *Arthonia*. Die oberrindige und die unterrindige Form gehen manchmal ineinander über. Jugendzustände sind oft unterrindig und gehen im Alter in die oberrindige Form über.

Rinden, auch Eichenrinde und Buchenrinde, lassen sich bei Zelloidineinbettung sehr gut schneiden. Der Block muß nur einige Tage in Glycerin liegen. Diese leichte Schneidbarkeit weisen auch bröckelige Rinden und Flechten auf, sobald sie in Zelloidin eingebettet sind.

Manche Rindenflechten brauchen nicht gefärbt zu werden. Beim Färben muß man mit in Kauf nehmen, daß manche Farben die Rinde teilweise mitfärben. Ungeeignet zum Färben der Rindenflechten sind die Hämatoxylinfärbungen, da sie die Rinden überaus stark anfärben. Auch Chinolinblau färbt die Rinden stark an, aber die Färbung ist nicht so aufdringlich wie die der Hämatoxylinfärbungen. Vermorschtes und halbverfaultes Holz wird durch Chinolinblau grün, normales Holz wird blau gefärbt. Am empfehlenswertesten für die Färbung von Rindenflechten sind Säurefuchsin und Orseillin BB. Auch Alizarinviridin kann bei ganz verdünnter Lösung und langsamer Färbung angewendet werden.

Auf jeden Fall bette man Schnitte nach Entfernung des Zelloidins ungefärbt in Hausenblasengallerte nach *Behrens* ein. Man wird überrascht sein, wie prachtvoll oft die Einzelheiten auch ungefärbt zur Darstellung gebracht werden können. Ungefärbtes Material kann nicht in Harzen eingeschlossen werden.

3. Der fadenförmige Thallus. Eine besondere Form des Thallus finden wir bei einigen selteneren Flechten wie *Ephebe, Spilonema* und *Thermutis*. Der Thallus besteht aus einzelnen Fäden. Die Algen sind hier oft am äußeren Rand der Fäden zu sehen, während die Pilzhyphen den Mittelstrang bilden. Hier können Färbungen mit verdünntem Gentianaviolett den Verlauf der Pilzhyphen deutlich machen. Zweckmäßig ist auch hier eine Färbung mit Säurefuchsin.

4. Cephalodien sind warzenähnliche Auswüchse auf dem Thallus, die aus einem Pilz und einer anderen Alge bestehen. Sie bilden eine Flechte, im kleinen auf den Mutterflechten sitzend. *Migula* hält sie für Zufallsbildungen. Andere Forscher fassen sie als parasitäre Bildungen auf.

Cephalodien kommen nur bei einigen Flechten, bei diesen aber häufig vor. Wir finden sie bei *Peltigera aphtosa*, bei *Stereocaulon, Nephroma, Solorina, Lobaria* und endlich bei einigen Krustenflechten. In den Cephalodien treten *Nostoc*-Arten als Gonidien auf. Die Cephalodien gehören zu den interessantesten Bildungen der Flechten und geben auch sehr schöne Präparate.

Wer Gelegenheit hat, in den Alpen zu sammeln, wird sicher *Peltigera aphtosa* finden. Sie ist dort häufig.

Bei der Präparation der Cephalodien wähle man für die Dauerpräparate solche Schnitte aus, die den Zusammenhang durch die Pilzhyphen zwischen der Mutterflechte und dem Cephalodium zeigen. Gleich einer Warze sitzt das Cephalodium auf einem Stiel aber nicht alle Schnitte gehen durch diesen Stiel. Beim Färben ist es in der Regel nicht möglich, die Cephalodien und die eigentliche Flechte gleich stark zu färben. Zu empfehlen ist eine Färbung der Cephalodien mit Hämatoxylin nach *Böhmer* oder Alaun-Glycerin-Hämatein nach *Rawitz* und eine Gegenfärbung der übrigen Flechte mit Säurefuchsin, wenn man es nicht vorzieht, auf eine Gegenfärbung überhaupt zu verzichten. Die Cephalodien färben sich viel intensiver als die Mutterflechte.

§ 432. Die vegetative Vermehrung der Flechten ist für viele Arten die hauptsächlichste Vermehrungsart. Besonders gilt dies für die Bildung der Soredien.

Soredien sind staubartige Gebilde aus Gonidien und Hyphen. Sie werden recht häufig in Soralen gebildet, eng umschriebene Thallusbezirke, bei denen sich die obere Rinde auflockert und die staubigen Soredien entleeren läßt. Soredien bilden sich aber auch sonst auf der Thallus-Oberfläche in solcher Menge, daß der ganze Thallus wie mit Mehl bestäubt sein kann. Man spricht dann von einem sorediösen Thallus. Manche Flechtenarten wie *Lepra* oder *Lepraria* bestehen anscheinend überhaupt nur aus Soredien. Man findet diese Formen an feuchten Felsen oder auf der Erde als grüne, gelbe oder weiße mehlige Beläge. Manche Forscher halten diese *Lepraria*-Formen nur für die sorediösen Zustandsformen sonst thallöser Flechten, die durch Umweltseinflüsse so geformt worden sind.

Nicht alle Flechten bilden Soredien. Den Rindenflechten fehlen sie, bei Steinflechten sind sie häufig.

Bei *Cladonia pixidata*, und zwar an den becherförmigen Lagerstielen (Podetien), sind Soredien am besten zu studieren. *Lepraria* zeigt zwar die Soredien in größerer Menge, aber für die Präparation erhält man sie selten rein genug. Meistens sind unerwünscht viel Mineralstoffe untermischt. *C. pixidata* ist in allen trockenen Nadelholzwäldern, besonders Föhrenwäldern, recht häufig. Von den vielen anderen *Cladonia*-Arten unterscheidet sie sich durch überreichliche Soredienbildung, auch im Inneren der Becher-Einstülpung. Man kann natürlich auch eine andere *Cladonia*-Art benützen, wenn sie Soredien aufweist.

Cladonia fixieren wir in *Pfeiffer*. Wenn die Luft hartnäckig festgehalten wird, tauchen wir die *Cladonia*-Becher kurz in Aceton ein oder in Ätheralkohol und geben sie dann in die Fixierlösung. Zelloidinschnitte unterrichten über Sitz und Anzahl der Soredien. An den Schnitten durch die Podetien kann man nebenbei bemerkt sehr gut die Bildung des Plektenchymgewebes durch Hyphen studieren.

Einzelheiten an den Soredien, wie die Umklammerung der Gonidien durch die Pilzhyphen, studiert man am besten an Streupräparaten. Von den fixierten, gewässerten *Cladonia*-Podetien schabt man etwas Soredienmehl ab, verteilt es auf einem Objektträger und schließt in einem Kollodiumhäutchen ein. Hat man viel Material und kann man die Podetien reichlich abschaben, so ist vorteilhaft, die Soredien mit der Zentrifuge zu verarbeiten.

Die Färbung ist bei den Schnitten und bei Zentrifugenmaterial grundsätzlich die gleiche. Man wird aber am leichtesten mit der einfachen Färbung mit Säurefuchsin Erfolg haben, da das Differenzieren von Kleinmaterial vielfach Glückssache ist.

Schnitte durch Podetien färben sich sehr schön mit

1. Chinolinblau-Pyronin
2. Eisenhämatoxylin-Säurefuchsin oder Chrysoidin
3. Phenolhämatoxylin-Chrysoidin

Die in Kollodiumhäutchen eingeschlossenen Soredien färbt man wie einen Zelloidinschnitt. Wenn die Soredien im Kollodiumhäutchen etwas dicht liegen, so schadet das nichts. Wir lösen nach dem Färben das Kollodium mit Nelkenöl auf und verteilen die Soredien auf dem Objektträger. Dann kann man mit Alkohol das Nelkenöl entfernen und über Terpineol in Caedax einschließen. Hier bei den Soredien ganz besonders, aber auch bei losen Schnitten von Flechten, empfiehlt es sich nicht, aus Xylol in Caedax einzuschließen. Die Objekte sind sehr weitmaschig. Da das Xylol sehr rasch verdunstet, hat die Luft Gelegenheit, in den Schnitt hineinzugelangen. Diese Luft läßt sich später nicht mehr entfernen und stört sehr.

Die Soredien und Sorale können als Organe angesehen werden, welche die gemeinsame Lebensform Pilz-Alge ausgebildet hat, um mit Sicherheit die Art zu erhalten.

Insidienbildung nennt man die durch Trockenheit bedingte Felderung, vornehmlich der Krustenflechten. Solche Felder brechen aus und können vom Winde verweht werden. Sie keimen auf günstigen Substraten wieder aus und bilden dann neue Thalli. Zum Studium der Insidienbildung werden Thallus-Stücke teils trocken in absoluten Alkohol verbracht, teils feucht in *Pfeiffer* fixiert und dann beide in Zelloidin eingebettet und geschnitten. Färbung mit Säurefuchsin.

§ 433. Die Flechtenfrucht

1. Die Flechtenfrucht, die durch den Pilz allein gebildet wird, erzeugt Sporen. Da in Europa alle Flechtenpilze den Ascomyceten angehören, finden wir daher immer Asci vor. Die vom Winde verstreuten Sporen keimen auf günstigem Substrat aus und bilden eine neue Flechte, sofern sie auf die allerdings ebenfalls ubiquitären Algen treffen. Die Flechten scheinen auf die Vermehrung durch Früchte nicht angewiesen zu sein. Von manchen Flechtenfrüchten ist bekannt, daß sie sehr selten Sporen erzeugen oder die Sporen überhaupt fehlen.

Die Flechtenfrüchte lassen zwei Hauptformen erkennen, die Apothezien und die Perithezien, die allerdings durch Zwischenformen verbunden sind.

2. Die Apothezien stellen in ihrer typischen Form eine rundliche, häufig von einem Rande umgebene Scheibe dar.

3. Die Perithezien sind etwa kugelige oder eiförmige Behälter, die am Grunde die Asci und die Paraphysen aufweisen. Sie öffnen sich am Scheitel durch eine mehr oder weniger kleine Öffnung.

4. Neben diesen zwei Hauptformen gibt es noch eine dritte Form der Flechtenfrucht. Bei den *Coniocarpineen* steht auf einem Stiel eine vom Ursprung an offene Scheibe mit ganz schmalem Rande. Das Hymenium besteht aus den hinfälligen Asci und den ausdauernden Paraphysen. Die Paraphysen bilden durch völlige Verschmelzung ein Fasergeflecht, das auch die Sporen aufnimmt. Dieses Gebilde wird Mazädium genannt.

Die Frucht sieht aus wie ein Myxomycet. Flechtenfrüchte gibt es das ganze Jahr über. Zudem zeigen fast alle Früchte reife und unreife Sporenschläuche, da die Flechtenfrucht weit über ein Jahr zur Entwicklung benötigt. Diese Flechtenfrüchte geben nun die Objekte ab für die Anfertigung zahlreicher sehr interessanter und auch sehr schöner Präparate.

§ 434. Apothezien

1. Wir untersuchen zunächst eine *Xanthoria*, die fast nie ohne Früchte vorgefunden wird. Die Apothezien sind in der Regel in allen Entwicklungsstadien anzutreffen. *Xanthoria* ist daher

eines der geeignetsten Objekte für das Studium der Entwicklung der Apothezien. Die Früchte von *Xanthoria* sind rund. Sie entstehen im Winter und Frühjahr im Inneren des Thallus unmittelbar unterhalb oder in der unteren Gonidienschicht zunächst als dicke Fadenverknäuelung. Hieraus differenziert sich allmählich die Hyphenschicht heraus, welche die Asci und Paraphysen bildet. Vergleiche auch § 439 über die Trichogyne und das Carpogon der Flechten.

2. Ebenfalls runde Apothezien finden sich bei Arten der Gattungen *Parmelia, Lecanora* und vielen anderen. *Solorina* hat ein flächenständiges, eingesenktes Apothezium mit vertiefter Scheibe. Die grasgrüne *Solorina saccata* ist in den Alpen häufig auf kalkhaltigem Erdboden, sonst ist sie selten. Ein eigenartiges Bild bietet ein Schnitt durch das Apothezium von *Thelotrema lepadinum*, die in unserer ganzen Heimat an der Rinde von Bäumen, insbesondere von Nadelhölzern häufig ist. *Graphis* und seine Verwandten haben längliche Apothezien mit kohlig schwarzem Eigenrand.

3. Die Flechten aus der Familie der *Cladoniaceen* haben Fruchtstiele (die Podetien), die dem Thallus entspringen und am oberen Ende Apothezien tragen. Das Lager kann vollständig verschwinden, die Apothezien dazu noch fehlen, so daß die ganze Flechte nur aus Podetien besteht wie *Cladonia alpestris. C. pixidata* hat schön ausgebildete Podetien in Becherform. Sie ist meistens steril. *C. botrydis* hat schlauchförmige Podetien, deren Querschnitt wie der einer Röhre aussieht. *C. coccifera* hat schöne rote Apothezien. Diese Art kommt in ganz Deutschland vor, meistens in Nadelwäldern.

Baeomyces, zu den *Cladonien* gehörend, kommt ebenfalls in Nadelwäldern auf der Erde vor, auch an Baumstümpfen. Die Podetien sind pilzförmig mit aufsitzenden Apothezien.

Unter den verschiedenen Rindenflechten, die längst nicht alle angeführt werden können, gibt es viele Formen, die im mikroskopischen Bilde sehr interessant und abwechslungsreich sind.

§ 435. Perithezien kommen vor allem bei *Verrucaria* vor. Wir finden sie ferner an *Normandina pulchella*, die in ganz Deutschland an bemoosten Baumrinden, besonders auch auf dem Lebermoos *Frullania*, vorkommt. Perithezien kommen dann noch an zahlreichen Rindenflechten vor.

Ganz absonderliche Fruchtkörper, ähnlich den Schleimpilzen, haben einige Rindenflechten und Holzflechten. Ich nenne nur *Calizium, Stenocybe, Chaenotheca*, die z.T. sehr verbreitet und recht häufig sind, aber ihrer Kleinheit wegen leicht übersehen werden.

§ 436.

1. Die Färbung der Flechtenfrüchte erfolgt im allgemeinen genau so wie die Färbung der einfachen Thalli. Besonders Säurefuchsin allein für einfache Färbungen und Eisenhämatoxylin mit Chrysoidin oder die Färbung mit Chinolinblau-Pyronin ist hier am Platze. Sollen ungefärbte Sporen in den Asci hervorgehoben werden, so färbe man nach § 428 mit Karbolfuchsin.

Bei Apothezien und Perithezien rindenbewohnender Flechten werden zweckmäßig nur die Gonidien gefärbt, z.B. mit Chinolinblau oder mit Alizarinviridin nach *Becher*. Die Pilzhyphen heben sich dann von den natürlich oder künstlich gefärbten Rindenbestandteilen genügend ab.

2. Die Podetien färben sich am besten mit Hämatoxylinrezepturen. Alaun-Glycerin-Hämatein nach *Rawitz, Böhmer* oder Phenolhämatoxylin färben die Gonidien sehr deutlich. Eine Gegenfärbung mit Säurefuchsin oder Pyronin ist angebracht.

§ 437. Stylosporen. In den Flechtenapothezien bilden nicht nur die Sporenschläuche (Asci) Sporen. Es ist mehrfach beobachtet worden, daß von den Kopfenden der Paraphysen aus ebenfalls Sporen gebildet werden. Da diese Sporen, *außen*, nicht *in* den Asci gebildet, werden „Außensporen“ (Stylosporen) genannt worden. Solche Stylosporen kommen vor bei den Flechten *Xylographa parallela, Buellia rhinodinia, Lecideaalba, Lecidea lurida* und *Opegrapha ata*. Bei einigem Suchen findet man sicher die eine oder andere Art in seiner Lokalflora. *Xylographa* ist im Gebirge sehr häufig an Holzzäunen, Brettern, Dachschindeln usw. *Rhinodinia sophodes* ist auf glatten Rinden von Birke, Hasel, Eberesche, Esche, Kirsche sowie den in Gärten kultivier-

ten *Rhododendron*-Arten nicht selten. Das Material kann zu allen Jahreszeiten gesammelt werden.

Gefärbt werden Zelloidinschnitte nach *A.Schmidt* (115):

1. Mit Methylenblau allein, wobei mit ganz verdünnter Schwefelsäure differenziert wird. Zunächst wird der ganze Schnitt stark gefärbt. Unter dem Einfluß der Schwefelsäure aber geben alle Teile die Farbe ab bis auf die Sporen, die in Sporenumwandlung begriffenen Endzellen der Paraphysen und die aus der Sporenkeimung hervorgegangenen Zellen.
2. Mit einer Mischung von Neutralrot-Methylenblau. Differenziert man dann mit verdünnter Schwefelsäure, so bleiben nur die Sporenträger rot. Die Stylosporen und die ausgekeimten Stylosporen sind blauviolett.

   Erscheinen die mikroskopischen Bilder nicht deutlich genug, so entfernt man das Zelloidin aus den Schnitten und zerzupft sie. Bei sehr schlecht färbbarem Material empfiehlt es sich, die Schnitte 2 Stunden vor dem Färben mit verdünnter Kalilauge vorzubehandeln, mit einer Säure zu neutralisieren und dann wie oben zu färben.

   Dauerpräparate in Caedax nach Überführen über Isopropanol in Terpineol.

Die Stylosporen gehören zu den Seltenheiten!

(115) Schmidt, Mikrokosmos XXXI, 1937/38, S. 148

§ 438. Spermogonien, auch Pyknidien genannt, kommen im Flechtenthallus neben den Schlauchfrüchten vor. Sie sind ganz im Thallus eingesenkt und zeigen nach außen nur ihre Mündung. Am Thallus werden sie meistens erst bei Lupenbetrachtung als dunkle Punkte entdeckt. In ihrem Inneren sind fädige Sterigmen (einfach oder verzweigt) zu sehen, die an ihrer Spitze winzige Sporen abschnüren.

Die Pyknidien bilden für den Untersucher meistens Zufallsfunde in den Schnitten. Ihre nähere färberische Darstellung ist schwierig und stellt größere Anforderungen an das mikroskopische Können. Diese Pyknidien haben einen ähnlichen Bau wie die Perithezien. Die der Konidienbildung dienende Schicht heißt Fulcrum. Die konidienbildenden Zellen nennt man Basidien. Die Konidien, an denen man noch Mikrokonidien und Makrakonidien unterscheidet, sind meistens nur 0,5-2µ dick und 1-10µ lang. In der Flechtensystematik spielen die Pyknidien eine sehr große Rolle.

Färbung: An Pyknidien sieht man meistens schon alles an ungefärbten Schnitten, da sie selbst meistens eine starke Eigenfärbung aufweisen. Kernfärbungen müssen mit Eisenhämatoxylin nach *Häggqvist* vorgenommen werden.

§ 439. Trichogyne und Ascogon. Als sehr seltene Entdeckungen in den Flechtenschnitten finden sich Trichogynen und Ascogone. Da die Flechtenpilze Ascomyceten sind, müßten eigentlich die den Ascomyceten eigentümlichen Fortpflanzungsorgane reichlich vorkommen, werden ja die Apothezien und die Sporen reichlich gebildet. Wie schon weiter oben erwähnt, bildet sich ein Apothezium aus einer knäuelartigen Aufwicklung stark angeschwollener Hyphen. Das Ende solch eines Knäuels verläuft nun manchmal (oder immer ?) senkrecht in die Höhe zur Thallus-Oberfläche und durchbricht diese mit einer Zelle. Dies stellt im ganzen die Trichogyne dar.

Erst nach der Befruchtung dieser Trichogyne durch die hypothetischen Produkte der Pyknidien oder Spermogonien soll aus dem Hyphenknäuel (der ascogenen Hyphe) die Frucht entstehen. Macht man sich diese Auffassung zu eigen, so wäre hiermit ein Sexualakt des Flechtenpilzes gegeben, welcher der Bildung von Apothezien und Sporen vorausgeht. Die Deutung dieser Gebilde als Sexualzellen ist umstritten. Erschwert wird die Beurteilung der Frage noch dadurch, daß zwar Spermogonien relativ häufig, Trichogynen aber äußerst selten gefunden werden. Man wird die Trichogyne am besten an Schnitten entdecken, die mit Säurefuchsin gefärbt sind, da diese Färbung eine ganz präzise Darstellung aller Elemente des Flechtenthallus gibt.

2.Steinflechten

§ 440. Die Steinflechten kommen auf natürlichem Gestein wie Kalk, Dolomit, Silikatgesteinen, sandigem Boden, ferner auf Mauerwerken, Dachziegeln usw. vor. Man unterscheidet nun epilithische und endolithische Formen, je nachdem sich der Thallus auf oder im Gestein entwikkelt. Die Steinflechten erfordern eine spezielle Behandlung bei der mikroskopischen Präparation. Manche Formen, z.B. auf Silikatgesteinen, Erde, Sand usw., lassen sich bei Regenwetter mit dem Messer ablösen. Dabei gehen natürlich Teile der Flechte verloren. Dagegen kann der abgehobene Teil nach Entfernung etwa anhaftender Steinsplitter ordentlich fixiert, eingebettet, geschnitten und gefärbt werden.

Vielfach sind aber nur Soredien als staubartiger Belag auf dem Stein sichtbar, während das eigentliche Lager im alles schützenden Stein verborgen ist.

§ 441. Kalkflechten sind Flechten, die ausschließlich auf Kalkgesteinen vorkommen. Sie lassen sich in der Regel nicht ablösen und müssen dann mit den Steinen selbst gesammelt werden. Sammelt man im Jura, so ist die Schwierigkeit nicht groß, weil sich der Jurakalk leicht in Platten abspalten läßt. Hammer und Meißel sind aber unerläßlich beim Sammeln. Die Flechten wachsen im allgemeinen nicht sonderlich tief in die Gesteinsunterlage hinein.

Am Thallus aller endolithischen Kalkflechten lassen sich die sogenannte Rindenschicht, die Gonidienzone und die Rhizoidenzone leicht unterscheiden. Die Gonidienzone läßt sich schon bei Lupenbetrachtung an einem Querbruch eines mit Flechten bewachsenen Kalkstückchens erkennen, wenn er mit Wasser benetzt wird. Die Gonidienzone markiert sich als grüner Saum unter der Gesteinsoberfläche. Der Abstand der Gonidienzone von der Gesteinsoberfläche schwankt zwischen 20µ und 200µ, ihre Dicke zwischen 60µ und 300µ. Ausnahmsweise ist sie noch breiter.

Die Mächtigkeit der Rhizoidenschicht innerhalb des Steines schwankt zwischen 0,25 bis 8 mm. Der Flechtenkörper ist natürlich am Rande weniger mächtig als in der Mitte des Thallus.

Die Apothezien entstehen ebenfalls innerhalb des Kalkes. Zuerst sind sie kugelförmig. In demselben Maße wie sie wachsen wird der Kalk aufgelöst und resorbiert, bis die Apothezien endlich die Oberfläche des Steines erreichen.

Die Gonidien sind in Gruppen vereinigt. Jede Gruppe ist allseitig von Mycelfäden umsponnen.

Die Rinde der endolithischen Formen weist zweierlei Bauelemente auf. Zunächst fallen im Dünnschliff die Hyphenknäuel auf. Diese Hyphenknäuel sind durch einen lockeren Filz von Einzelhyphen miteinander verbunden.

Der rhizoidale Teil des Thallus besteht aus zahllosen, korallenartig verzweigten Hyphen. Ihr Geflecht wird um so dünner, je weiter es in den Stein hineinwächst. Teile der Rhizoiden sind tonnenförmig oder kugelig verbreiterte Gebilde, die mit Öl oder Fett gefüllt sind und Reservestoffbehälter darstellen. Die Hyphenknäuel sind entweder farblos oder braun, auch grünlich gefärbt. Die Knäuel haben eine Länge bis zu 100µ, meistens jedoch sind sie um die 20µ herum anzutreffen.

§ 442. Kieselflechten. Flechten auf kieselhaltigem Gestein haben einen Thallus, der im Verhältnis zu dem der Kalkflechten kräftig und üppig ausgebildet ist. Der rhizoidale Teil ist ganz gering entwickelt und hat hauptsächlich nur die Aufgabe der Befestigung der Flechte am Standort.

§ 443. Das Präparieren der Kalkflechten

1. Die Kalkflechten können in verschiedener Weise präpariert werden. Man kann entweder Schnitte oder Dünnschliffe von ihnen anfertigen.

2. Anfertigen von Schnitten durch Kalkflechten. Schnitte durch Kalkflechten nach Entfernung des Kalkes zeigen alle morphologischen Einzelheiten mit derselben Deutlichkeit wie an Laub-

flechten. Dagegen zeigen sie nicht die topographische Verteilung der einzelnen Flechtenbestandteile im Gestein, da sich die einzelnen Bestandteile zu sehr verschieben.

Die entsprechend zugeschnittenen (Uhrfeder in der Laubsäge!) Steinstücke werden zunächst einige Tage in öfters gewechseltem Brunnenwasser eingeweicht. Ältere ganz trockene Herbarstücke können bis eine Woche dazu brauchen, bis alle Flechtenbestandteile wieder gequollen sind. Hierauf erfolgt das Fixieren in der *Perenyischen* Flüssigkeit, die den Kalk und den Dolomit vollständig auflöst. Man verwende folgende Vorschrift:

20 %ige Salpetersäure	30 ccm
1 %ige Chromsäure	30 ccm
96 %iger Alkohol oder Brennspiritus	40 ccm

Diese Lösung ist nicht lange haltbar und muß wegen des Säureverbrauchs öfters gewechselt werden. Die Entkalkung dauert um so länger, je größer das Kalkstückchen ist.

Auflösen des Kalkes mit Salzsäure oder Essigsäure ist möglich, aber nicht zu empfehlen. Dolomit löst sich am besten in der *Perenyischen* Flüssigkeit. Das Wechseln der Flüssigkeiten hat sehr vorsichtig zu geschehen. Das Steinstück legt man mit der Rhizoidenschicht nach oben in die Flüssigkeit. Nach völliger Entkalkung erfolgt Auswaschen in mit Ammoniak alkalisch gemachtem Alkohol und vorsichtiges Einbetten in Zelloidin. Hierauf kann geschnitten und gefärbt werden wie bei den anderen Flechten.

Auf diese Weise untersuchen wir z.B. *Lecanora (Aspicilia) calcarea* oder eine ähnliche Form. *Lecanora*-Arten kommen auf Kalk und Dolomit sehr häufig vor. *L. calcarea* ist besonders interessant, da sie Gonidien im oberirdischen Teil und im unterirdischen Teil des Thallus aufweist. Ferner untersuchen wir Arten der Gattungen *Caloplaca, Heppia* und *Verrucaria.*

3. Anfertigen von Dünnschliffen durch Kalkflechten. Die schönsten Schliffe zeigt die Flechte *Lecidea caerulea*. Man soll deshalb keine Mühe scheuen, diese Flechte zu erreichen. *Lecidea caerulea* kommt auf Kalk und Dolomit in den Alpen ziemlich verbreitet vor. Bei dieser Flechte stechen die grünen Gonidien und die blauen Pilzhyphen stark von dem weißen Kalk ab. Weiterhin sind natürlich alle anderen Flechten mit unterirdischem Thallus sehr geeignete Untersuchungsobjekte, so die zahlreichen *Verrucaria*-Arten.

Wir fertigen die Schliffe ohne Fixierung der Flechten nach § 424 an, und zwar Flächenschliffe und Querschliffe. Ein einfacher Querschliff gibt Auskunft über den Verlauf der einzelnen Thallusteile oder besser gesagt Thallusschichten, nach denen wir dann die Flächenschliffe orientieren müssen. Diese Flächenschliffe legen wir

1. durch die Rindenschicht,
2. durch die Gonidienschicht und
3. durch die Rhizoidenschicht.

Die Querschliffe legen wir möglichst durch die Apothezien und die häufig vorhandenen Spermogonien. Man muß immer mehrere Schliffe machen.

Das Einbetten in erwärmten Kanadabalsam schadet den Flechten nichts, verhindert aber mit Sicherheit ein Zerbröckeln der Flechten. Statt Kanadabalsam kann auch Kollolith genommen werden, den es auch in flüssiger Form gibt, mit ihm kann die Oberfläche der Flechten durchtränkt werden, wenn nötig mit Hilfe der Wasserstrahlluftpumpe.

Selbstverständlich kann man auch den in Xylol gelösten Kanadabalsam zum Durchtränken benützen, nur braucht er viel länger zum Trocknen, das durch Einstellen in einen Einbettofen bei 60 ^{O}C wesentlich beschleunigt werden kann. Bei zu starkem Erhitzen bräunen sich die Flechtenteile. Der Schliff wird nun eingeschlossen, wozu nur Harze geeignet sind.

4. Färben der Dünnschliffe. Die Flechten sind in den Schliffen vom Kalkstein oft schwer zu unterscheiden. Man kann aber die Flechten im Schliff anfärben. *Bachmann* (116) gibt dafür folgende Vorschriften:

a) Nach dem vollständigen Auflösen etwa noch anhaftenden Kanadabalsams mit Xylol, überführt man die Schliffe durch Alkohol in Wasser und legt dann die Schliffe 3-6 Stunden lang in eine 1-2 %ige Lösung von Gerbsäure (Acidum tannicum). Hierauf werden sie abgespült und 30 Minuten in eine 2 %ige Lösung von Eisen-II-sulfat gebracht, worin sich die Flechten beim Umschütteln langsam schwärzen.

Bachmann schreibt ausdrücklich Ferrosulfat vor. Da nur Eisen-III-salze die schwarze Tannatverbindung geben, dürfte hier nur die immer vorhandene Menge Ferrisulfat die Reaktion geben. Im übrigen tritt im allgemeinen diese schwarze Tannatverbindung leicht auf. Wenn man gerbstoffreiche frische Fichtenzweige schneidet, genügt bekanntlich schon die Spur Eisen, die sich vom Mikrotommesser löst, zum Färben der Schnitte.

Der Schliff wird nun abgespült, getrocknet oder mit Alkohol entwässert und über Xylol in Caedax eingeschlossen.

b) *Bachmann* gibt weiterhin an, daß die Dünnschliffe entkalkt werden können. Zunächst ist der Kanadabalsam durch Xylol zu entfernen. Nun legt man den Schliff auf einen gereinigten Objektträger und betropft ihn mit *Perenyischer* Flüssigkeit oder verdünnter Salpetersäure vorsichtig so lange, bis das Gestein entfernt ist. *Bachmann* untersucht seine Schnitte ungefärbt.

c) Solche entkalkte Schliffe lassen sich nun mit einem Kollodiumhäutchen versehen, auswaschen und mit Säurefuchsin färben. Hernach wird in Caedax eingebettet. Diese Präparate vereinigen die Vorzüge eines Schliffes mit denen eines dicken Schnittes. Die einzelnen Elemente bleiben in ihrer Lage und sind gefärbt. An diesen Präparaten sind die eigenartigen morphologischen Verhältnisse der Kalkflechten gut zu studieren. Nur die Soredien, die den staubig-mehligen, weinsteinartigen Belag auf der Steinoberfläche erzeugen, gehen z.T. verloren. Die Kalkflechten haben einen viel lockeren, weitmaschigeren Bau wie Flechten, die oberirdisch wachsen.

(116) E.Bachmann, Der Thallus der Kalkflechten. Wissenschaftliche Beilage zu dem Programm der städtischen Realschule zu Plauen im Vogtland, Plauen 1892.

§ 444. Das Präparieren der Kieselflechten. Als Kieselflechten werden hier diejenigen Steinflechten bezeichnet, die nicht auf Kalk- oder Dolomitunterlage wachsen. Unter den Kieselflechten kommen praktisch nur oberirdisch (epilithisch) wachsende Formen vor. Der Thallus bleibt auf der Oberfläche des Gesteins und sendet nur Rhizoiden zur Befestigung in die Unterlage.

Formen auf Sandstein, auf Dachziegeln und Urgestein lassen sich bei Regenwetter fast immer in genügend großen Stücken mit dem Messer abheben. Mit der Lupe müssen dann alle Mineralsplitter abgesucht und entfernt werden; notfalls muß Flußsäure zu Hilfe genommen werden.

Diese Thallusstreifen sind in der Regel groß genug, um fixiert, eingebettet, geschnitten und nach den früher geschilderten Verfahren gefärbt zu werden. Schwierigkeiten kann das Schneiden kleinster Teile wie Fruchtkörper kleiner *Verrucaria*-Arten bereiten. Hier bette man behelfsmäßig in Ritzen auf Paraffinblöcken ein. Manchmal ist vor jedem einzelnen Schnitt ein Kollodiumguß nötig (117).

(117) F.Andersen, Mikrokosmos XXXIV, 1940/41, S.175.

§ 445. Anfertigen von Dünnschliffen durch Kieselflechten

1. Wenn sich die Flechten nicht von der Unterlage ablösen lassen, so ist die Anfertigung von Dünnschliffen nötig. Die Kieselflechten haben ihren Thallus immer außerhalb des Gesteins. Man fixiert sie deshalb auf der Unterlage und durchtränkt sie mit Kanadabalsam; nach dessen Erhärtung wird geschliffen. Das Schleifen solch harter Gesteine ist jedoch eine harte Geduldsprobe und leider oft auch undankbar.

2. Nach Entfernung des Kanadabalsams aus den Schliffen können die Flechten gefärbt werden (Säurefuchsin). Ein Auflösen des Gesteins mit Flußsäure ist immer unbefriedigend. Hierher gehören viele Flechten auf Urgestein, vor allem die Arten der Gattung *Verrucaria*.

[Dem Amateur sei vom Umgang mit Flußsäure dringend abgeraten! Flußsäure ist nicht nur akut sehr giftig (Dämpfe!), sie verursacht auch schwere Verätzungen, die anfangs unbemerkt bleiben und nur sehr langsam heilen. Außerdem ist ihre chronische Giftwirkung, insbesondere auf das Knochengewebe, ganz erheblich!]

Kapitel XII. Moose

A. Allgemeines

§ 446.

1. Die meisten Bryologen beschäftigen sich mit systematischen und pflanzengeographischen Arbeiten. Die Moosfunde werden als Exsikkate dem Herbarium einverleibt, sind aber bisher recht wenig histologisch studiert und auf Dauerpräparate verarbeitet worden.

Die nicht gerade zahlreichen anatomischen und histologischen Arbeiten lassen erkennen, daß ihre Ergebnisse größtenteils an Schnitten frischer Moose erarbeitet worden sind. Das hat seinen guten Grund darin, daß die mikroskopische Präparationstechnik, so wie wir sie von den Phanerogamen her gewohnt sind, bei Moosen versagt. Auch in den großen Nachschlagewerken über mikroskopische Technik wird man vergebens Hinweise auf die histologische Verarbeitung der Moose finden. Erst in neuerer Zeit sind einige Arbeiten in wissenschaftlichen Zeitschriften und in Dissertationen bekannt geworden, die auch die mikroskopische Untersuchungstechnik bei den Moosen gefördert haben. Der Verfasser hat nun alle erreichbaren Literaturangaben gesammelt und überprüft, ferner ist er wie bei den Flechten auch hier eigene Wege gegangen.

Das Resultat dieser Umschau ist in den folgenden Zeilen niedergelegt. Bei der Darstellung ist aus praktischen Gründen der Gametophyt, der nach dem allgemeinen Sprachgebrauch als Moos bekannt ist, dem kürzerlebigen Sporophyt vorangestellt worden.

2. Bei der Materialbeschaffung ist man größtenteils auf die eigene Sammeltätigkeit angewiesen; Herbarmaterial ist immer nur ein Notbehelf und genügt nur für morphologische Übersichtspräparate.

Das Protonema ist durch Kultur zu erhalten, wie es bei den Übungsbeispielen geschildert wurde. Ganze Moose durch Kulturen zu erhalten ist im allgemeinen ausgeschlossen, wohl aber ist es möglich, aufgefundene Lebermoose durch Halten im Kalthaus, im Garten oder auch unter großen Glasglocken im Arbeitszimmer so weit zu bringen, daß vorhandene unentwickelte Sporogone sich völlig entwickeln oder Antheridien und Archegonien ausreifen. Man verpflanzt ganze Rasen in unten mit Lehm oder mit Sand ausgeschlagene Glasschalen, auf die man im Zimmer eine große Glasscheibe deckt.

Gut geeignet für diese Zwecke sind kleine Ganzglasaquarien oder auch die Schutzglocken für die Mikroskope. Die Moose halte man feucht, aber nicht naß.

3. Auch Torfmoose lassen sich so recht gut halten. Von Zeit zu Zeit gebe man etwas Nährlösung zu, täglich einmal lüftet man eine halbe Stunde. Die Kultur der Moose bietet keine Schwierigkeit. Ihr größter Feind ist die immer drohende Verpilzung mit Schimmel- oder Faulpilzen. Manchmal gehen noch vor Torschluß hoffnungsvolle Kulturen an Fäulnis ein. Ich habe Lebermoose bis 3/4 Jahre bis zur Sporogonreife im Zimmer gehalten.

Fixiermethoden für Moose

§ 447.

1. Erhaltung der natürlichen Farbe. Von kleineren Laubmoosen und von Lebermoosen lassen sich recht hübsche farbtreue Totalpräparate herstellen. Zur Fixierung der gut gereinigten Moose verwendet man:

a) Die Fixierung nach *Kisser* oder nach *Pollaccei*.
b) Das Erhitzen auf 65 ^{O}C für 10 Minuten in 10 %iger wässriger Kaliumacetatlösung.

Das Einschließen erfolgt dann in Glyceringelatine, in Lävulosegelatine nach *Heringa und ten Berge* oder in Kaliumacetatgelatine. Man vergleiche § 66 Ziff.3 und Ziff.4.

Das Reinigen der Moose gelingt am leichtesten unter dem Strahl der Wasserleitung. Man schlägt sie in Verbandmull ein und legt sie auf die Hand; so können die Moose einen ziemlich

starken Wasserstrahl aushalten, ohne beschädigt zu werden. Die gereinigten Moose kommen in destilliertes Wasser und dann in die Fixierungsflüssigkeiten. Das Fixiermittel ist zuletzt sehr gut mit destilliertem Wasser auszuwaschen, dabei gehen dann auch alle löslichen Stoffe der Moose in Lösung.

Empfindliche kleine Objekte müssen durch Glycerinstufen auf das Einbetten vorbereitet werden. Hier empfiehlt sich aber das freiwillige langsame Eindunsten nicht; man führt dagegen die Moose vorsichtig in Glastuben alle paar Stunden durch die Stufen. Gemmen und Brutkörper können ebenfalls so behandelt werden. Wenn die Brutkörper groß genug sind oder an der Mutterpflanze genügend haften, verarbeitet man sie wie größere Objekte; wo dies nicht geht, verbringt man sie in eine kleine Tasche von Filtrierpapier und führt sie darin durch alle Reagenzien.

Kupferhaltige Gelatine kann für den Einschluß der Moose nicht verwendet werden. Aus den Moosen diffundieren Stoffe, welche die kupferhaltige Gelatine bräunen und härten. Die Gelatine ist dann unlöslich und die Objekte können nicht mehr umgebettet werden.

2. Für histologische Untersuchungen: Man verwendet Chromessigsäure in folgender Zusammensetzung:

Destilliertes Wasser	100 ccm
Eisessig	3 ccm
Chromsäure	1 g

Diese starke Lösung fixiert Moosstämmchen, ferner Sporogone im Stadium vor Entwicklung des großen Kapselinterzellularraumes (118). Diese Lösung ist auch für Protonemata geeignet.

3. Chromessigsäure in folgender Zusammensetzung:

Destilliertes Wasser	100 ccm
Eisessig	1,5 ccm
Chromsäure	0,5 g

Diese etwas schwächere Lösungsvorschrift ist geeignet für Gametophytenspitzen, für jüngere Sporogone und für ganz zarte Protonemata.

4. *Chamberlain* führt folgende Lösung an:

Destilliertes Wasser	100 ccm
Eisessig	1 ccm
Chromsäure	0,5 g

Diese Vorschrift lehnt sich eng an die vorige an. Die Fixierdauer ist in allen Vorschriften der Chromessigsäure 24 Stunden.

Für cytologische Untersuchungen werden folgende Vorschriften empfohlen:

5. Carnoy, heiß angewendet, Dauer 3-6 Stunden.
6. Das Gemisch Nr.1 nach *Juel (Wenderoth).*
7. Das Gemisch nach *Bouin* für Antheridien.
8. Die beiden *Flemmingschen* Gemische. Nach Chamberlain ist aber gerade bei Moosen die Färbbarkeit nach osmiumhaltigen Fixiermitteln sehr schlecht.
9. *Straßburger* empfiehlt zur Fixierung der Geschlechtszellen besonders folgende Mischung:

Sublimatlösung nach *Kaiser*	90 ccm
Formalin 40 %ig	10 ccm.

Die Fixierdauer ist mehrere Stunden, Auswaschen in 70 %igem Alkohol, anschließend Jodbehandlung und sofortiges Einbetten zum Schneiden.

10. Nach *Heidenhain* sind ganz besonders zu empfehlen Susa nach *Heidenhain* und Trichloressigsäure.

(118) H.Wenderoth, Planta, Archiv für wissenschaftliche Botanik, Band XXIV, 1931, 2.Heft, S.344.

Einbetten und Schneiden

§ 448. Uneingebettet schneiden. Für viele Objekte ist das Schneiden ohne Einbettung das beste; es sollte bei Moosen durchgeführt werden, wo es nur irgend geht.

Unfixierte Stämmchen von Laub- und Lebermoosen, Thalli der Lebermoose, Blätter von *Sphagnum* und *Polytrichum* lassen sich zwischen Hollundermark, Seifestückchen oder behelfsmäßig zwischen Paraffinbacken eingeklemmt schneiden. Erst die Schnitte werden dann fixiert. Man arbeitet unter dem Binokularmikroskop oder klebt die Schnitte auf. Schließlich kann man bei Massenware, wie Stengelquerschnitten, mit der Zentrifuge oder dem Minimumfilter arbeiten. Natürlich lassen sich auch fixierte Objekte von Moosen uneingebettet schneiden. Aufweichen in Glycerin ist nötig.

§ 449. Einbetten in Gummi arabicum. Gummi arabicum ist zum behelfsmäßigen Einbetten sehr geeignet. Die Objekte müssen aber vor dem Einbetten fixiert und gehärtet werden. Mooskapseln schneidet man am besten vor dem Fixieren und Einbetten an, und zwar an einer Stelle, die beim späteren Verarbeiten sowieso wegfällt.

§ 450. Einbetten in Zelloidin. Die Zelloidineinbettung ist sehr gut geeignet für histologische Übersichtsbilder. Die Zelloidinblöcke kommen, wenn sie die richtige Härte zum Schneiden erreicht haben, in eine Lösung von 10 ccm Isopropanol und 90 ccm Glycerin. In dieser Lösung verbleiben die Blöcke mindestens drei Tage. Sie können aber darin auch jahrelang liegen.

Meistens schneiden sich die Blöcke und die Objekte jetzt sehr gut. Sollten die Moose noch Neigung zum Splittern zeigen, so lege man den Block für einige Tage in reines Glycerin. Die Moose, Stämmchen, Antheridienstände, Sporogone schneiden sich dann leicht.

Die Dicke der Schnitte hängt sehr vom Zustand der Messer ab. Schnitte von 15-20µ sind erreichbar. Sie werden am besten in 60 %igem Isopropanol aufbewahrt, wenn sie nicht sofort gefärbt und verarbeitet werden können; in Wasser quellen die Moose zu sehr und brechen leicht aus.

§ 451. Einbetten in Paraffin. Für cytologische Studien ist das Einbetten *kleiner* Stücke in Paraffin notwendig. Die Durchdringung mit Paraffin geht bei ganzen Sporogonen äußerst langsam vonstatten. *Wenderoth* gibt an, daß nach monatelangem Aufenthalt der Objekte im Wärmeschrank die Sporogone nie völlig mit Paraffin durchtränkt waren. Bei dieser langen Erhitzungsdauer sind leider auch Schrumpfungen mit in Kauf zu nehmen. Man schneidet daher am besten die Sporogone an.

Mittels der Paraffinmethode lassen sich bei Moosen auch sehr schwer dünne Schnitte erreichen. Bei einem älteren Thallus werden ebenfalls nur 15-20µ erzielt. Zum Studium der Scheitelzellen sollen die Schnitte nicht über 10µ dick sein. Das Behandeln der Objekte mit Chlordioxidessigsäure oder Chlordioxidsalpetersäure vor dem Einbetten verbessert die Schneidbarkeit nicht.

Das Material wird zweckmäßig aus dickem Zedernöl in Paraffin übergeführt, wodurch die Objekte schneidbarer bleiben. Am leichtesten schneiden sich unreife Sporogone. Bei diesen wie bei Archegonien und Antheridien lassen sich Schnitte von 5µ Dicke erzielen.

Färbemethoden für Laubmoose und Torfmoose

§ 452. Das Protonema. Das Protonema färbt sich

a) mit Alizarinviridin nach *Becher*.
b) mit der Goldimprägnation und der Imprägnation mit Schwefelblei.

§ 453. Histologische Färbungen.

a) mit *Delafields* Hämatoxylin, besonders für Scheitelzellen, Sproßachsen und junges Gewebe, auch für Stengelquerschnitte. Diese Färbung gelingt bei chromfixiertem Material.
b) Nach sublimathaltigen Fixiermitteln färben Alaunkarmin, Alauncochenille. Beide Färbungen gelingen auch als Stückfärbungen gut, wenn die Objekte nicht zu groß sind und angeschnitten werden.
   Weitere Schnittfärbungen mit einem Gemisch von Säurefuchsin-Jodgrün zu gleichen Teilen. Die Färbedauer beträgt 2-15 Minuten.
c) Nach Formolalkohol (Formessigsprit) gelingen Färbungen mit Alizarinviridin, auch Hämatoxylinfärbungen nach *Rawitz, Ehrlich, Böhmer*.

§ 454. Färbung der Antheridien.

Entwicklung der Antheridien:
Safranin -Gentianaviolett-Orange G (Lichtgrün), Paraffinschnitte, 5-10µ dick.

Spermatogenesis:
Eisenhämatoxylin, Paraffinschnitte, 3-5µ dick.

Histologische Übersicht:
Delafields Hämatoxylin Alaun-Glycerin-Hämatein nach *Rawitz*, Alaunkarmin, Goldimprägnation. Für Schnitte in Gummi arabicum und Zelloidinschnitte.

§ 455. Färbung der Archegonien.

Übersicht:

1. *Delafields* Hämatoxylin.
2. Alaun-Glycerin-Hämatein nach *Rawitz*.
3. Alaunkarmin.
4. Goldimprägnation.

Zelloidinschnitte 20-30µ. Bei Alaunkarmin Stückfärbung.

Zytologische Studien:

1. Eisenhämatoxylin.
2. Safranin-Gentianaviolett-Orange G (Lichtgrün).

§ 456. Färbung der Sporophyten. Junge Sporogone lassen sich leicht schneiden und auch leicht färben. Ältere Stadien bereiten um so größere Schwierigkeiten, je älter sie sind.

Stadium der Sporenmutterzellen:

1. *Delafields* Hämatoxylin (nach *Chamberlain*).
   Zelloidinschnitte 30µ.

Stadium der Sporenbildung (Mitosen):

1. Safranin-Gentianaviolett-Orange G (Lichtgrün).
   Paraffinschnitte 10µ.

2. Eisen-Hämatoxylin, Nachfärbung mit Eosin, Erythrosin, Säurefuchsin.
3. *Wenderoth* empfiehlt besonders folgende Eisenhämatoxylinfärbung:

I.	Kalkhaltiges Leitungswasser	100 ccm
	Hämatoxylin	0,5 g
II.	Destilliertes Wasser	100 ccm
	Eisenalaun	3,0 g

   Als Gegenfärbung nimmt *Wenderoth* Nelkenöl-Eosin.

4. Ferner kann das Safranin verwendet werden in Verbindung mit Lichtgrün oder mit *Delafields* Hämatoxylin.

Färbemethoden für Lebermoose

§ 457. Histologische Färbungen.

1. *Delafields* Hämatoxylin.
2. Alaunkarmin und Alauncochenille.
3. Säurefuchsin-Jodgrün.

Näheres über geeignete Fixierungen vergleiche die histologischen Färbungen bei den Laub- und Torfmoosen. Die Lebermoose färben sich williger als die Laubmoose, besonders gilt dies für die Schnitte durch die thallosen Formen.

§ 458. Färbungen an Antheridien.

1. Paraffinschnitte 10µ
   Safranin-Gentianaviolett-Orange G (Lichtgrün).

2. Ausstriche von Spermatozoiden
   Fixieren des Ausstriches mit Osmiumsäuredämpfen, Härten durch Formalin oder kurzes Ziehen durch die Flamme eines Mikrobrenners. Färben mit Säurefuchsin.

3. Schnitte und Ausstriche
   Goldimprägnation.

§ 459. Färbungen von Archegonien.

1. Frühstadien
   Safranin-Lichtgrün oder Safranin-Anilinblau (Schnittdicke 10µ).

2. Ältere Stadien
   a) *Delafields* Hämatoxylin
   b) Safranin- Gentianaviolett- Orange G

3. Goldimprägnation
   Die Zellmembranen werden bei Goldimprägnation nicht dargestellt.

§ 460. Färbungen der Sporophyten. Es werden dieselben Färbungen angewandt wie bei den Laub- und Torfmoosen (§ 456).

§ 461. Bemerkung zu den Färbevorschriften. Es ist bei den Moosen in der Regel unmöglich, alle Teile eines Schnittes gleich stark gefärbt zu erhalten. Einzelne Teile sind bereits überfärbt, wenn andere Teile des Schnittes gerade richtig gefärbt sind. Man muß immer dasjenige richtig färben, was gerade dargestellt werden soll, ohne auf andere Stellen des Präparates Rücksicht zu nehmen. Die Schönheiten der Schnitte lassen sich dadurch bedeutend heben, daß man die Objekte möglichst klein nimmt. Bei einem Schnitt durch den Antheridienstand von *Polytrichum* z.B. entfernt man vor dem Einbetten bereits die vegetativen Hüllblätter. Dann umfaßt der Schnitt im wesentlichen nur die Antheridien, die sich gleichmäßig färben.

Der Versuch, durch verschiedene Differenzierungsmanöver doch noch den goldenen Mittelweg zu finden und alles färberisch leidlich aufeinander abzustimmen, ist meist nicht von Erfolg gekrönt. Am leichtesten färben sich dünne Paraffinschnitte gleichmäßig. Die verschiedene Färbbarkeit der einzelnen Teile steigert sich mit wachsender Schnittdicke. Am besten sind noch Doppelfärbungen, die so auszuwählen sind, daß die einzelnen Farbkomponenten nur die einzelnen Teile des Schnittes färben. Mit dieser unangenehmen Eigenart der Moose muß man sich leider abfinden.

B. Ausgewählte Beispiele zur Bearbeitung der Moose

1. Laubmoose (Musci)

§ 462. Laubmoose können das ganze Jahr über gesammelt werden, sobald nur Schnee und Frost verschwunden sind. Antheridien, Archegonien und Sporophyten sind allerdings an gewisse Jahreszeiten gebunden, die aber nicht bei allen Moosen die gleichen sind. Nähere Angaben darüber sind im Sammelkalender am Schlusse des Buches zu finden.

Bei der Materialgewinnung ist man ganz auf das Sammeln angewiesen, nur der Vorkeim (das Protonema) kann durch Kulturen gewonnen werden.

A. Der vegetative Aufbau des Gametophyten

§ 463. Der Vorkeim (Protonema).

1. Der Vorkeim der Laubmoose ist einfach, meistens fadenförmig, algenförmig. Das Protonema der *Andrealen* ist bandförmig, das des Leuchtmooses ist mit zahlreichen kugelförmigen Leuchtorganen ausgestattet.

Das Protonema ist bei den meisten Laubmoosen hinfällig. Es stirbt ab, wenn sich der eigentliche Thallus bildet. Bei einigen wenigen Moosen bleibt der Vorkeim das ganze Leben über erhalten wie bei *Ephemera*. Man kann sehr schöne Totalpräparate von Vorkeim und Moos zusammen anfertigen. Die Vorkeime sind bei sorgfältigem Suchen als grüne algenartige Anflüge in feuchten Teilen der Wälder zu finden. Bevorzugte Standorte sind Schluchten, Grabenwände, Wegränder. Von Algen unterscheiden sie sich durch die schiefen Querwände, mit denen die einzelnen Zellen abgegrenzt werden. Die besonders gestalteten Vorkeime des Leuchtrnooses *Schistostega* sind selten und stehen, wie das Leuchtmoos überhaupt, unter Schutz. Es kommt in feuchten Höhlen des Urgebirges an verschiedenen Orten Deutschlands vor, so auch auf der Louisenburg bei Wunsidel (Bayern).

2. Moosvorkeime können durch Kulturen gewonnen werden. Am leichtesten erhält man das sogenannte sekundäre Protonema, wenn man Moosrasen (z.B. einen *Mnium*-Rasen) verkehrt, d.h. mit den Rhizoiden nach oben, unter einer Glasglocke feucht hält.

Das primäre Protonema bildet sich aus den Sporen. Allgemeiner bekannt geworden sind die Kulturversuche von *Janzen* (119).

Nach *P.Janzen* lassen sich Moossporen auf Agar-Agar in Petrischalen zur Keimung bringen. Auf einen Liter destilliertes Wasser nimmt *Janzen* 15 g Agar und 2,5 g von folgendem Salzgemisch:

Kaliumnitrat	1 g
Magnesiumsulfat	0,5 g
Kalziumsulfat	0,5 g
Kalziumphosphat	0,25 g
Eisen-II-sulfat	0,25 g

Außerdem kann die Nährlösung nach *Knop* gebraucht werden. Auf einen Liter Agar nimmt *Janzen* 1,75-7 g des Salzgemisches nach *Knop*.

Kalkliebende Moose bedürfen einer alkalischen Reaktion, solche humusreicher Standorte saurer Reaktion des Agars. In neutralem Agar kommen die meisten der Arten fort, die kalkfreie Böden besiedeln.

In letzter Zeit hat sich *Elisabeth Gause* (120) mit der Zucht von Laubmoosvorkeimen befaßt. Sie benützt einen Agar, der 20 g Agar auf ein Liter destilliertes Wasser enthält. Als Nährsalz verwendet sie folgende Vorschrift:

KH_2PO_4	5 g
NH_4NO_3	5 g
$MgSO_4.7H_2O$	1,5 g
$CaCl_2.6H_2O$	0,5 g
NaCl	0,5 g
$FeCl_3.12H_2O$	0,05 g

Von diesem Nährsalz werden auf das Liter Agar-Agar 2,5 g genommen.

Um die Diatomeen zu entfernen, muß der Agar filtriert werden, falls Schnitte angefertigt werden sollen.

Die gegossenen Platten müssen natürlich sterilisiert werden. Vor dem Aussäen desinfiziert man auch die Mooskapseln äußerlich durch Abtupfen mit Sublimatalkohol. Dann schneidet man die Kapseln an und sät die Sporen, und zwar viele, auf einer Platte aus. *Gause* hat beobachtet, daß dichte Kulturen viel besser gegen Verpilzung geschützt sind als dünne. Die Protonema-Kulturen lassen sich vielfach bis zu den ersten Sproßknospen führen.

Die Sporen keimen, wenn sie bald nach der Reife ausgesät werden, nach 2-3 Tagen aus. Die früheste Knospenbildung tritt nach 20 Tagen bis 4 Monaten auf, je nach Moosart. Für Versuche empfehlen sich *Polytrichum*-Arten, auch *Catharinea undulata* und vor allem *Funaria hygrometrica.*

(119) P.Janzen, Schriften der westpreußischen naturforschenden Gesellschaft zu Danzig. Neue Folge, Band XII, Danzig 1909

(120) E.Gause, Die Entwicklung einiger Laubmoos-Vorkeime. Dissertation, Marburg 1931.

3. Die Moosvorkeime werden mit Chromessigsäure fixiert, auch das *Pfeiffersche* Gemisch ist zu verwenden. Sie können mit Alizarinviridin nach *Becher* gefärbt werden. Im Gegensatz zu den Moosen färben sich die Vorkeime auch mit basischen und sauren Anilinfarben und mit einigen Hämatoxylinfärbungen wie Hämalaun nach *Mayer*, Alaun-Glycerin-Hämatein nach *Rawitz*.

Für die farbtreue Fixierung eignen sich die Vorkeime weniger, da sie sehr wenig Chlorophyll enthalten, aber die Vorkeime des Leuchtmooses und die ausdauernden Vorkeime von *Ephemera serratum* und *Diocelium nudum* geben zusammen mit den eigentlichen Moosen dieser Arten sehr schöne Präparate. Wenn das Material ausreicht, fertigen wir auch farbtreue Präparate von Moosvorkeimen mit den anhängenden Moosknospen oder kleinen Moospflänzchen an.

Die männliche Pflanze von *Buxbaumia aphylla* ist eigentlich nur ein kurzer Protonema-Ast, der ein einziges, langgestieltes Antheridium trägt. Wer Standorte von *Buxbaumia* in seiner Lokalflora hat, sticht am besten kleinere Teile der Unterlage ab und versucht sie zu Hause zu kultivieren. Die günstigste Zeit dazu dürfte Spätsommer oder Herbst sein.

§ 464. Brutkörper kommen zahlreich vor. Von 915 Arten der deutschen Flora weisen 110 Arten Brutorgane auf. Diese können vom Protonema, von Blättern und Sprossen des Gametophyten ausgehen, auch aus dem Rhizoidenfilz können Brutkörper gebildet werden.

Zum Studium der Brutkörper verschaffen wir uns *Georgia (Tetraphis) pellucida,* das sehr häufig an schattigen, feuchten Waldplätzen, Baumstümpfen und in Schluchten zu finden ist; es weist in einer kleinen becherförmigen Hülle an der Spitze des Sprosses die Brutkörper auf. Die Hülle sieht wie ein blütenförmiges Gebilde aus.

Wir fertigen farbtreue Präparate von den einzelnen Brutkörperchen an. Durch die ganzen becherförmigen Hüllen mit den Brutkörperchen machen wir nach Zelloidineinbettung Längsschnitte. Zum Färben benützen wir Hämatoxylin nach *Delafield* oder Alaun-Glycerin-Hämatein nach *Rawitz* oder auch die Goldimprägnation.

Brutkörper können leicht zum Keimen gebracht werden. Man hält sie auf feuchtem, nicht sterilisiertem Torf, der in eine Nährlösung halb eingetaucht ist. Glasglocke! Die Keimung tritt alsbald auf.

§ 465. Das Moosstämmchen ist in der Regel mit Rhizoiden an der Unterlage befestigt und manchmal von einem dichten Filz von Rhizoiden umgeben. Manche Arten haben ein direktes Rhizom.

Wir fertigen von den Stämmchen einiger Moose Quer- und Längsschnitte an, und zwar, wenn es vorhanden ist, auch vom Rhizom, dann je einen Schnitt vom unteren Drittel, der Mitte und vom Teil gegen die Sproßachse. Die Schnitte werden entweder vom lebenden Moosstämmchen oder auch nach Einbettung in Zelloidin oder Gummi arabicum angefertigt. Die Schnitte werden am besten aufgeklebt; wenn sie aus lebendem Material sind, muß man sie vor der Verarbeitung töten und härten.

Zum Färben verwenden wir vor allem *Delafields* Hämatoxylin, Safranin und Säurefuchsin.

Das Stämmchen ist bei den verschiedenen Moosen nicht gleichartig aufgebaut. Den kompliziertesten Bau hat *Polytrichum*. Bei diesen Arten sehen wir am Rhizom:

Rindenzellen, die lebenden Inhalt besitzen; Zentralstrang oder Hadrom, der rund oder gelappt ist. Die Zellen des Zentralstranges sind teils lebend, teils tot und dienen dann der Wasserleitung. Zwischen Rindenzellen und Zentralstrang befinden sich lockere Zellen der Endodermis. In den Ausbuchtungen des Hadroms sehen wir die Radialstränge, die langsam in Hypodermalstränge übergehen.

Am Stämmchen selbst sehen wir zunächst, daß der Querschnitt vielfach dreieckig ist. Der untere Stamm ist ein Übergangsteil zwischen Rhizom und dem beblätterten Sproß. Der Querschnitt durch den beblätterten Sproß zeigt fünf deutlich abgegrenzte Teile, nämlich die Epidermis, die subepidermale Zone, das parenchymatische Rindengewebe, den Zentralstrang, die Blattspuren.

Die anderen Moosarten haben alle einfacher gebaute Stämmchen. Interessante Objekte zur Untersuchung sind *Mnium undulatum, M. punctatum, Funaria hygrometrica* und *Rhodobryum roseum.*

Moose ohne Zentralstrang sind unter anderen *Cinclidotus fontinaloides, Hypnum commutatum, falcatum und sulcatum*. Bei manchen Moosen ist das Stämmchen sehr kurz oder fehlt ganz.

§ 466. Die Sproßachse der Stämmchenspitze untersuchen wir auf Längsschnitten. Bei den meisten Moosen ist die tetraedrische Scheitelzelle zu sehen. Nur bei wenigen Moosen ist die Scheitelzelle zweischneidig-keilförmig wie bei den häufigen *Fissidens*-Arten.

An Querschnitten durch Sproßachsen und Blattknospen *von Mnium undulatum, Georgia pellucida* und *Meesea longiseta* beobachtet man zwischen den Blättern kreisrunde, von Schleimmassen umhüllte Zellen. Man färbt diese Schnitte zweckmäßig mit *Delafields* Hämatoxylin, Hämalaun-Eosin, Alizarinviridin nach *Becher* und mit Safranin.

§ 467. Das Blatt

1. Das Blatt der Laubmoose zeigt allergrößte Mannigfaltigkeit. Jeder Bryologe kennt die verschiedenen Formen der Blätter schon vom Bestimmen der Moose her. Ich kann mich hier daher ziemlich kurz fassen.

Man unterscheidet bekanntlich parenchymatische und prosenchymatische Zellen beim Aufbau der Blätter. Die Blätter selbst bestehen meistens nur aus einer einzigen Zellschicht. Sie besitzen daher nur eine Kutikula und keine Epidermis. Bei Sonnenblättern (Blätter, die der Sonne ausgesetzt waren), sind die Chloroplasten alle an den Rand der Blattzellen gedrängt, bei Schattenblättern sind sie über die ganze Blattbreite verteilt.

Den Zellkern untersuchen wir daher an Sonnenblättern. Die lebenden Blätter kommen in verdünnte *Lugolsche Lösung*, die alle zytologischen Einzelheiten sichtbar macht.

Bei vielen pleurokarpen *Bryneen* sind am Blattgrund besonders gebaute Blattflügelzellen zu sehen. Sie sind parenchymatisch weitlumig, gelb oder braun gefärbt, vielfach sind sie aufgeblasen. Manche Blätter tragen Papillen, die an Querschnitten gut zu sehen sind, z.B. bei *Hedwigia ciliata*.

2.Von Blättern der *Polytrichum*-Arten sind Querschnitte anzufertigen. Man sieht an den Querschnitten viele chlorophyllhaltige Längslamellen. Ähnliche Lamellen haben ferner die Blätter von *Aloina rigida, Pterigoneurum cavifolium, Oligotrichum hercynium, Catharinea undulata* und *Pogonatum urnigerum*.

Zur Anfertigung der Querschnitte klebe man viele Blätter mit Gummi arabicum aufeinander. Man kann diese aufgeklebten Blätter *lege artis* in Zelloidin einbetten oder auch nur zwischen Holundermarkscheiben einklemmen und schneiden.

Die Moose zeigen Niederblätter, Laubblätter und Hochblätter, die meistens voneinander verschieden sind. Hierher gehören auch die Paraphyllien, z.B. bei *Thuidium* und *Holocomium*. Die Blattrippe bedingt die Form des Blattes. Zweckdienlich ist es, sich für systematische Zwekke eine Reihe von Präparaten mit den einzelnen Blattformen herzustellen und als Typenpräparate zu benützen.

Die Blätter mancher Laubmoose weisen einige charakteristische Zellgruppen auf, die seit *Lorenz* die Namen Deuter und Begleiter erhalten haben. Die Deuter durchziehen die Blattrippen in einer oder zwei Reihen. Sie sind weitlumig und parenchymatisch. Die Begleiter sind größere vielgestaltige Zellen neben den Deutern. Zum Studium der Deuter und Begleiter sind Blattquerschnitte herzustellen. Bei den kleinen Blättern ist Zelloidineinbettung anzuraten. Diese Schnitte färbt man wie die Schnitte durch die Stämmchen. Durch Vergolden stellt man besonders den Zellinhalt dar, die Zellgrenzen können eventuell durch eine Färbung mit Bismarckbraun hervorgehoben werden.

§ 468. Totalpräparate ganzer Blätter. Ganze Moosblätter lassen sich gut durch das Vergolden nach *Nabias* präparieren. Man benützt sogenannte Sonnenblätter, so daß die Chromatophoren an die Zellgrenzen gerückt sind. Nur so kann man den Zellkern sichtbar machen. Durch die Vergoldung wird in erster Linie alles dargestellt, was Jod aufnimmt, also hier besonders die Chloroplasten. Der Zellkern ist jedoch gut erkennbar. Manchmal ist es sehr von Vorteil, die Stärke durch Chloralhydrat vor dem Vergolden zu entfernen. Die Kerne sind dann besser sichtbar.

Eine Färbung der Totalpräparate von ganz kleinen Moosen oder auch nur von einzelnen Blättern mit organischen Farbstoffen ist nicht möglich. Ganze, d.h. unverletzte Moose lassen sich nicht färben - wenigstens nicht so, daß ein brauchbares Resultat erscheint. Das ist um so auffälliger, als Moosblätter ja nur aus einer einzigen Zellschicht bestehen und im Leben ein ideales Untersuchungsobjekt abgeben.

In dieser Hinsicht verhalten sich Laubmoose, Lebermoose und Torfmoose völlig gleich. Alle Farbstoffe, die man auch versuchen mag, werden von den Moosen abgestoßen wie Wasser von Fett. Etwas besser sind die Färbeergebnisse, wenn mit alkoholischen statt mit wässrigen Farblösungen operiert wird. Jedenfalls dringen alkoholische Farblösungen, zumal wenn sie stark mit Eisessig angesäuert sind, als Farbfixierlösung bei lebenden Moosblättern etwas ein.

So färbt Bismarckbraun alles braun, Zellinhalt und Kutikula. Der Zellkern wird nicht sichtbar, auch nicht nach Versuchen, irgendwie eine Differenzierung zu erreichen. Gentianaviolett färbt an Blättern von *Mnium* und von *Funaria* einzelne Zellen diffus. Lichtgrün färbt Blätter von *Mnium* etwas differenziert. Die Zellgrenzen sind stark, die Chloroplasten aber schwächer im sonst diffus gefärbten Blatt hervorgehoben. Dabei bemerkt man, daß jüngere Blätter oder verletzte Stellen sich eher als andere färben. Malachitgrün färbt die Moosblätter grün. Durch

Differenzieren mit Alkohol lassen sich die Chloroplasten stärker hervorheben. Kerne werden nicht sichtbar.

Jedenfalls sind alle diese Färbungen nur völlig unbrauchbare Vorversuche. Nach *Straßburger* ändert auch die Behandlung der Moose mit Flußsäure nichts an ihrem Verhalten. Nur die Chloroplasten lassen sich mit Lichtgrün färben, die Kerne jedoch nicht.

B. Die Sexualorgane des Gametophyten

§ 469.

1. Die Moose weisen Antheridien und Archegonien auf. Die Antheridien sind bei den Laubmoosen alle übereinstimmend keulenförmig gebaut und in Antheridienständen vereinigt. Diese Antheridienstände enthalten die Antheridien mit Paraphysen und bilden manchmal blütenähnliche Köpfchen. Am schönsten ausgebildet sind die Antheridienstände bei den *Polytrichum*- und den *Mnium*-Arten. Sie sind im April und Mai leicht in den Wäldern zu finden; *Polytrichum* ist in Nadelwäldern in vielen Arten häufig, *Mnium* bevorzugt feuchte Stellen der Laubwälder.

An den Antheridien unterscheiden wir leicht eine Wandschicht und die Antheridienmutterzellen. Die reifen Spermatozoiden verlassen das Antheridium als schleimig wurstförmige Masse, die Öffnungen zum Austritt der einzelnen Spermien besitzt.

An Querschnitten durch Antheridienstände sieht man sehr gut die Paraphysen und die noch gefüllten und die bereits entleerten Antheridienschläuche. Längsschnitte zeigen außerdem die Beteiligung der Hüllblätter am Aufbau der männlichen Blüte.

Die besonderen Verhältnisse, welche die Antheridien von *Buxbaumia* zeigen, wurden bereits bei Besprechung der Protonemata erwähnt.

Für Übersichtsbilder wird in Zelloidin eingebettet, für zythologische Studien ist das Einbetten in Paraffin notwendig. Sehr schöne Resultate erzielt man auch an Zupfpräparaten, wobei ganze Antheridien dargestellt werden. Jüngere Stadien von Antheridien sind glashell durchsichtig und lassen sich gut durch die Goldimprägnation präparieren.

Färbungen an Schnitten nimmt man vor mit *Delafields* Hämatoxylin-Säurefuchsin oder Alizarinviridin nach *Becher*.

2. Laubmoos-Spermatozoide erhält man am leichtesten von *Polytrichum*-Arten. Die Antheridienstände sind recht auffällig rot gefärbt und leicht zu finden. Drückt man einen Antheridienstand von *Polytrichum* in geeignetem Reifezustand bei feuchtem Wetter etwas zwischen den Fingern, so tritt der Inhalt des Antheridiums deutlich als milchiger Schleim hervor. Für die Beobachtung lebender Spermatozoiden ist eine Dunkelfeldeinrichtung erwünscht.

Für die Fixierung von Spermatozoiden im Ausstrich werden nach *Straßburger* Osmiumsäuredämpfe oder Formoldämpfe verwendet. Nachfixierung des Ausstriches mit Formalin und Färben der Ausstriche mit Fuchsin-Methylgrün, Safranin-Gentianaviolett-Orange G (Lichtgrün) oder Eisenhämatoxylin-Kongorot (Säurefuchsin).

A.Mühldorf färbt lufttrockene Ausstriche mit l %iger wässriger Gentianaviolettlösung. Man erwärmt den Ausstrich mit der Farblösung vorsichtig 5 Minuten lang auf einem Sandbad, bis Dämpfe aufsteigen.

3. Die Archegonien sind ebenso wie die Antheridien gestielt und in eigenen Blütenständen zusammengefaßt, doch sind die weiblichen Gametangien nicht so in die Augen fallend wie die männlichen, man hat in der Regel Mühe, sie zu finden. Beim Aufsuchen hat man sich daran zu erinnern, ob die Moose zweihäusig oder einhäusig sind.

Die Archegonien sind flaschenförmig; im Bauchteil liegt die Eizelle, darüber die Bauchkanalzellen, über dem allen befinden sich einige Halskanalzellen. Am sichersten findet man Archegonien im Oktober an Seitenästen von *Funaria hygrometrica*. Ihre Gametangien sind allerdings nicht sehr groß; besser zur Untersuchung sind solche von *Mnium, Polytrichum* und ähnlich großen Moosen.

Präparation wie bei den Antheridien. Sollen ganze Archegonien in den Zelloidinschnitten erscheinen, so sollen diese 20-30µ dick sein. Diese dicken Schnitte färbt man mit *Delafieldschem* Hämatoxylin, Alaun-Glycerin-Hämatein nach *Rawitz* oder Goldimprägnation. Dünnere

Schnitte, vor allem Paraffinschnitte, färbt man dann mit Eisenhämatoxylin nach *Heidenhain* oder *Häggqvist* oder Safranin-Gentianaviolett-Orange G (Lichtgrün). Auch dünne Paraffinschnitte durch Antheridien können so gefärbt werden.

C. Der Sporophyt

§ 470.

1. Aus dem befruchteten Archegon entwickelt sich der Sporophyt. Das jüngste Stadium des Sporophyten ist der Embryo, ein spindelförmiges Gebilde.

2. Der Embryo bleibt längere Zeit in einer Hülle, dem Epigon, eingeschlossen. Das Epigon reißt ein und der Embryo bildet dann die Seta und das Sporogon aus. Das Sporogon hebt Reste des Epigons als Haube mit in die Höhe. Den Fuß der Seta umgibt die Kalyptra oder Haube.

Alle Stadien des Embryos sind *in toto* schwierig frei von Schrumpfungen zu präparieren. Heißes Gemisch nach *Carnoy* fixiert nach *Wenderoth* noch am besten. Zur Färbung verwendet man Eosin oder Säurefuchsin.

Zum genaueren Studium empfehlen sich Längs- und Querschnitte von lebenden Objekten und Fixieren der einzelnen Schnitte mit sublimathaltigen Fixiermitteln. Man verwendet dann zum Färben Karminfärbungen, *Becher*-Farben, Magdalarot-Anilinblau, Safranin-Lichtgrün oder *Delafields* Hämatoxylin-Säurefuchsin.

3. Der ausgewachsene Sporophyt. Die Sporogone weisen in ihrem Aufbau die allergrößte Mannigfaltigkeit auf. Allen gemeinsam ist, daß sie sich auf einer Seta erheben, die ein einfaches Zentralbündel aufweist.

Sporogone als Ganzes können weder fixiert noch eingebettet werden, da sie von den Medien nicht durchdrungen werden. Sie können aber mit sehr scharfen Mikrotommessern leicht in unfixiertem Zustand nach behelfsmäßiger Einbettung geschnitten werden. Zum Fixieren müssen sie irgendwie angeschnitten werden; entweder schneidet man sie quer durch oder man macht mit dem Mikrotom einen Längsschnitt von der Oberfläche. Die Einbettung kann in Paraffin oder Zelloidin oder am besten in Gummi arabicum erfolgen.

Zu untersuchen sind an Quer- und Längsschnitten die einzelnen Partien der Sporogone an verschiedenen Moosen und bei ein und demselben Moos in verschiedenen Altersstufen.

> Zu sehen sind vor allem an medianen Längsschnitten: bei jungen unreifen Sporogonen von *Mnium, Funaria, Buxbaumia* und *Polytrichum* die Apophyse, die Columella, die Sporenmutterzellen nebst Sporenbildung, der sich bildende Sporensack, ringförmige Hohlräume, der Ring, der sich bildende Deckel.
>
> An Querschnitten sind besonders die Sporenmutterzellen und die Sporenbildung, die Einzelheiten des Sporensackes und die des Sporogons in der Höhe des Ringes interessant.

Hat man Gelegenheit, *Splachnum* zu untersuchen, so fertigen wir Längsschnitte durch die Apophyse, die hier besonders groß ist. Bei nordischen Arten ist die Apophyse größer als das Sporogon.

An fast reifen und an ganz reifen Sporogonen untersuchen wir vor allem die anatomischen Verhältnisse des Deckels, der Haube und des Peristoms.

Wir untersuchen ein Sporogon von *Polytrichum*. An dem unteren Teil des Sporogons sind Spaltöffnungen aufzufinden. Wir können sie an Querschnitten oder an Totalpräparaten sehen. Man höhlt zur Herstellung eines Totalpräparates das Sporogon aus und schabt die Wand von innen her vorsichtig ab. Ausgeschnittene Wandteile werden dann *in toto* in Glyceringelatine eingebettet. Besonders interessant sind nach *Janzen* (121) die Spaltöffnungen von *Funaria hygrometica*. Man schneidet die nicht fixierte Apophyse in zwei Teile und schabt, wie oben geschildert wurde, das Parenchym sorgfältig ab. Hierauf legt man die Wandteile in wässrige Me-

thylenblaulösung. Die Spaltöffnungen heben sich als goldgelbe Sterne vom dunkelblauen umgebenden Maschenwerk ab.

4. Die Sporen der Laubmoose sind sehr kleine kugelige Gebilde. Doch gleicht keine Spore einer Art den Sporen anderer Arten. Man könnte beinahe die systematische Unterscheidung der Arten auf die Sporen begründen. Zu ihrer Präparation können sie nach chlorophyllerhaltender Fixierung in Glyceringelatine eingeschlossen werden.

5. Die Färbung von Schnitten des Sporophyten kann wie folgt vorgenommen werden:

Junge Stadien:

Übersichtsbilder:

1. *Delafields* Hämatoxylin
2. Alaun-Glycerin-Hämatein nach *Rawitz*
3. Alizarinviridin nach *Becher*
4. Alaun-Karmin

Zytologische Einzelheiten:

1. Eisenhämatoxylin-Säurefuchsin
2. Safranin-Gentianaviolett-Orange G (Lichtgrün).

Ältere Sporophyten:

1. Hämalaun-Eosin
2. Eisenkarmin nach *de Grot*
3. Säurefuchsin
4. Alizarinviridin und andere *Becher*-Farben.

Alte geleerte Sporogone:

Anfertigung von ungefärbten Totalpräparaten des Peristoms. Man schneidet Stückchen des Peristoms heraus und bettet ohne weiteres in Glyceringelatine oder Hausenblasengallerte nach *Behrens* ein. Die Innen- und Außenseite wird gesondert eingeschlossen

Sporen:

Aufgeklebte Sporen werden mit Eisenhämatoxylin nach *Häggqvist* oder mit *Delafields* Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

(121) P.Janzen, Schriften der westpreußischen naturforschenden Gesellschaft zu Danzig. Neue Folge, Band XII, Heft 3, S.36, Danzig 1909

2. Torfmoose (Sphagna)

§ 471. Die Torfmoose stellen eine scharf von den Laubmoosen und von den Lebermoosen abgegrenzte eigene Gruppe der Moose dar. Sie kommen in größter Ausdehnung und Ausbreitung in Mooren vor; am weitesten sind sie im Süden von Südamerika verbreitet. Sie finden sich auch in jeder Lokalflora in Wäldern und Wassergräben, wenn nur die genügende Feuchtigkeit vorhanden ist. Gerade solche kleinere Vorkommen sind dadurch ausgezeichnet, daß Sporogone viel eher auftreten als in den Massenvegetationen der großen Moore. Die Sporogone reifen im Hochsommer, Antheridien und Archegonien findet man bereits im September und Oktober oder ganz in den ersten Vegetationsmonaten des Jahres; unreife Sporogone kann man schon im April und Mai finden. Die einzelnen Arten haben verschiedene Zeiten des Reifens.

Zur Materialgewinnung ist man wie bei den Laubmoosen und Lebermoosen auf das Sammeln angewiesen. Der Vorkeim kann durch Kultur gewonnen werden.

A. Der vegetative Aufbau des Gametophyten

§ 472.

1. Der Vorkeim. Die Hauptvermehrung finden die Torfmoose durch Seitenäste, die sich vom Stämmchen ablösen und selbständig machen. Vorkeime sind im Freien beim Sammeln kaum zu finden und müssen durch Kultur gewonnen werden.

Die tetraedrischen Sporen werden sofort nach dem Reifen des Sporogons ausgesät. Man benützt am besten Agar oder Torf, die mit der Nährlösung nach *Knop* befeuchtet werden. In reiner Nährlösung keimen die Sporen zu algenartigen Fäden aus; auf festem Substrat bilden sie jedoch einen gelappten Thallus, der ein dem Lebermoos *Anthoceros laevis* ähnliches flächenförmiges Gebilde darstellt. Der Vorkeim hat Rhizoide und bildet an seinem Rande die Moosknospen. Er ist im Durchmesser 0,5-1 mm groß. *Gause* hat von *Spagnum squarrosum* Sporen auf Agar-Agar ausgesät, der auf einen Liter Agar 3,5 g der Nährsalzmischung nach *Knop* enthielt. Die Sporen keimten bereits nach 8 Tagen. Die früheste Knospenbildung trat nach 48 Tagen auf. Angaben, wonach die Sporen erst nach 2-3 Monaten keimen, beruhen auf einem Irrtum.

Der Vorkeim kann unter Erhaltung des Chlorophylls fixiert und in Glyceringelatine eingeschlossen werden wie die Vorkeime der Laubmoose.

Für gefärbte Dauerpräparate fixiert man ihn in Chromessigsäure und färbt entweder mit Alizarinviridin oder mit der Goldimprägnation nach *Nabias*.

2. Das Torfrnoosstämmchen. Das Torfmoos besteht im ausgewachsenen Zustand aus einem Stämmchen, Seitenästen und Blättern; Rhizoide fehlen den ausgewachsenen Torfmoosen völlig. Querschnitte durch den Stamm zeigen einen einfachen Aufbau. Wir finden keinen Zentralstrang, sondern nur eine aus Parenchymzellen gebildete farblose Markschicht, die im Alter schwindet, so daß die Stämmchen dann hohl werden. Diese Markschicht geht langsam in den sogenannten Holzkörper oder die Holzschicht über, die aus engen, verschiedenartig gefärbten Prosenchymzellen zusammengesetzt ist. Die Längswände der Zellen der Markschicht und der Holzschicht sind häufig getüpfelt.

Nach außen wird das Stämmchen in der Regel von einer lockerzelligen Rindenschicht umhüllt, deren Zellen ohne plasmatischen Inhalt sind. Bei vielen Arten zeigen die Rindenzellen bei der Einfügung der Seitenäste oder bei den Insertionsstellen der Blätter eine eigenartige Gestalt; sie werden als Retortenzellen bezeichnet. Man fertigt Totalpräparate von Stengelstückchen mit diesen Zellen an und schließt nach Fixierung in Formalin einfach in Glyceringelatine ein. *Sphagnum acutifolium* hat große Retortenzellen, *S. cymbifolium* hat große Stengelblätter.

An Präparaten wären anzufertigen Querschnitte und Längsschnitte durch die Stengel verschiedener *Sphagnum*-Arten, auch Längsschnitte durch die Sproßspitze.

Fixierung: Am günstigsten Chromessigsäure.

Färbung:

1. *Delafields* Hämatoxylin-Säurefuchsin,
2. Safranin- Lichtgrün,
3. Alizarinviridin-Safranin,
4. Safranin-*Delafields* Hämatoxylin

Man fertigt am besten entweder Schnitte aus frischem Material an oder bettet in Zelloidin ein. Die Zelloidinblöcke werden wie bei den Laubmoosen beschrieben in Glycerin gelegt, in dem die Torfmoose sehr schön weich werden. Alkoholgehärtete Torfmoose können nicht ohne Einbettung geschnitten werden, da sie splittern und beim Aufweichen in Glycerin zu weich werden.

3. Die Blätter der Torfmoose sind von den Blättern der Laubmoose und denen der Lebermoose völlig verschieden. Bei den Torfmoosen sind Laubblätter, Hüllblätter, Stengelblätter und Astblätter untereinander äußerlich und in ihrem inneren Bau voneinander verschieden.

Allen gemeinsam ist der Aufbau aus schmalen, assimilierenden, chlorophyllhaltigen Zellen und größeren, chlorophyllosen Zellen. Diese hyalinen Zellen zeigen außerdem im Innern oft Papillen, Kammfasern, Ringe und Spiralfasern. Von den Blättern sind Totalpräparate und Querschnitte anzufertigen.

Fixierung: Chromessigsäure.
Einbettung: Zelloidin.
Färbung: Wie oben bei den Querschnitten durch die Moosstämmchen.

B. Die Sexualorgane des Gametophyten

§ 473.

1. Die Antheridien sind kugelförmig und gestielt. Sie sitzen einzeln in den Achseln je eines Deckblattes der keulenförmigen, lebhaft rot oder gelb gefärbten männlichen Zweige. Zur Reifezeit öffnen sie sich durch unregelmäßiges Aufreißen. Die Blütezeit ist Herbst und Winter. Sie sind bereits etwas früher zu finden als die Archegonien, weil sie dem Sammler schon in ihren frühesten Stadien auffallen. Die Antheridien sind von Paraphysen, die hier Filamente genannt werden, umgeben.

Empfehlenswerte Präparation:

1. Totalpräparate in farbtreuer Fixierung von ganzen männlichen Ästen.
2. Totalpräparate von ganzen männlichen Ästen, von denen die Hüllblätter ganz abpräpariert worden sind. Dieses Abpräparieren muß unter einem Binokularmikroskop geschehen.
3. Zupfpräparate aus den männlichen Ästen.
4. Schnitte, und zwar Längsschnitte, durch die männlichen Äste nach Fixierung in Chromessigsäure und Einbetten in Paraffin oder Zelloidin.

Färbung:

1. Safranin-*Delafields* Hämatoxylin.
2. Safranin-Lichtgrün.
3. Bismarckbraun-Lichtgrün.

2. Die Archegonien. Der weibliche Perichätialast ist ein grünes, meistens kurz kegelförmiges Ästchen, das an seiner Spitze 1-5 Archegonien trägt. Die Torfmoose kommen einhäusig oder zweihäusig vor. Einhäusig ist *Sphagnum acutifolium*, das ein sehr günstiges Untersuchungsobjekt darstellt. Pflanzen mit den auffallenden roten Antheridienästchen besitzen auch fast immer Archegonienstände unterhalb am Stengel. Nur wenige Arten weisen die Archegonien am Sproßende auf.

Fixierung: Chromessigsäure
Einbettung: Zelloidin
Färbung:

1. Safranin-*Delafields* Hämatoxylin.
2. Safranin- Lichtgrün.
3. Bismarckbraun-Lichtgrün.
4. *Delafields* Hämatoxylin.
5. Alaun-Glycerin-Hämatein nach *Rawitz*.

C. Der Sporophyt

§ 474. Nach der Befruchtung des Archegoniums entwickeln sich erst die eigentlichen Perichätialblätter. Die kugelige Kapsel, die das befruchtete Archegonium darstellt, wird auf einem Pseudopodium emporgehoben und öffnet sich bei der Reife (Juli bis August) durch einen ringförmigen Riß wie durch einen Deckel. Ein Peristom fehlt. Die Kapselwand weist zahlreiche Spaltöffnungen auf.

Untersuchungs- und Präparationstechnik wie bei den Laubmoos-Sporogonen.

Junge Torfmoos-Sporogone sind leicht in Paraffin einzubetten und zu schneiden, alte Stadien bieten große Schwierigkeiten. Sie müssen angestochen oder angeschnitten und in Zelloidin eingebettet werden. Der Block kommt dann einige Zeit in Glycerin zu liegen, bevor er geschnitten werden kann.

Färbung: Wie bei den Laubmoosen angeführt.

3. Lebermoose (Hepaticae)

§ 475. Die Lebermoose können das ganze Jahr über gesammelt werden. Im Gegensatz zu den Laubmoosen verschwinden sie im Bild der Pflanzengesellschaften und müssen in der Regel aufmerksam gesucht werden. Die meisten Lebermoose bewohnen feuchte Standorte unserer Wälder. Einige von ihnen bewohnen die Rinden unserer Laubbäume, aber auch nur in Gebieten, die viel Regen aufweisen, wie in den Alpen und Alpenvorländern; ganz wenige sind Wasserpflanzen.

Beim Sammeln hat man darauf Rücksicht zu nehmen, daß sie ein sehr großes Wasserbedürfnis haben und durch Eintrocknen leicht Schaden nehmen können. Die Lebermoose werden botanischen Anfängern schon beim Sammeln große Schwierigkeiten bereiten. Es dauert sehr lange, bis das Auge so geübt ist und sie nicht mehr übersieht.

Die Lebermoose zerfallen in thallose Formen und in Formen, die ähnlich den Laubmoosen beblätterte Stengel haben. Fast alle Formen weisen einen dorsiventralen Bau auf; er ist viel abwechslungsreicher als der Laubmoose. Auch der Aufbau der Sexualorgane und der Sporogone ist viel komplizierter als bei den Laub- und Torfmoosen.

Die Lebermoose werden in drei Ordnungen eingeteilt, in die *Anthocerotales*, die *Marchantiales* und die *Jungermanniales*.

Ihren Namen haben sie daher, daß früher *Marchantia* und *Fegatella* gegen Leberkrankheiten medizinische Anwendung gefunden haben.

A. Der vegetative Aufbau des Gametophyten

§ 476.

1. DerVorkeim. Die keimende Spore erzeugt einen Vorkeim, ein Protonema, das viel kleiner und unansehnlicher ist als das der Laub- und Torfmoose. Der Vorkeim wird auf Exkursionen wohl niemals erkannt oder gefunden werden. Die Sporen keimen alsbald nach der Aussaat, wenn sie sofort nach dem Platzen der Sporogone in Kultur genommen werden. Man kann die Kulturen auf Objektträgern anlegen und darauf auch die ersten Stadien fixieren und färben.

Fixierung:	Dämpfe von Jod oder von Osmiumsäure.
Färbung:	Goldimprägnation oder Alizarinviridin.

2. Brutkörper oder Gemmen finden sich bei Lebermoosen in großer Zahl und Mannigfaltigkeit. Bei einigen Formen wie *Marchantia, Lunularia* und *Blasia* entstehen die Gemmen in eigenen Behältern. Man untersucht Schnitte durch die Behälter und erhält dabei auch die jüngsten Stadien der Brutkörper.

Einbettung:

Zelloidin, eventuell nach Vornahme einer Blockfärbung, die aber nur das angeschnittene Gewebe färbt.

Färbung:

1. *Delafields* Hämatoxylin.
2. Hämatoxylin nach *Ehrlich, Böhmer, Rawitz.*

Bei *Aneura* bilden sich Brutkörper in der Weise wie die Schwärmsporen mancher Algen. Bei den *Jungermanniaceen* entstehen die Gemmen an den obersten Blattspitzen als grüne oder braunrote, traubige Gebilde. Bei *Radula, Lejeunia* und *Madotheca* stehen am Blattrande scheibenförmige Zellbildungen mit einer Scheitelzelle; diese Gebilde fallen leicht ab und wachsen weiter.

Einzelne Gemmen können nach chlorophyllerhaltender Fixierung nach *Kisser* oder auch nach kurzer Fixierung mit den Dämpfen der Osmiumsäure in Glyceringelatine eingeschlossen werden.

Brutkörper sind leicht auf Torf, Sand oder Agar im Verein mit Nährlösungen zu kultivieren. Die daraus entstehenden Thalli geben schöne Totalpräparate ab, wenn sie nach *Kisser* unter Erhaltung des Chlorophylls fixiert werden.

3. DerThallus. Eine große Gruppe von Lebermoosen bildet einen flächenförmigen Vegetationskörper ohne Differenzierung in Stengel und Blätter. Hierher gehören *Aneura, Pellia, Riccia, Ricciocarpus,* die *Marchantiaceen,* ferner *Metzgeria, Mörckia* und *Anthoceros*. Die kleineren Formen geben schöne Totalpräparate bei farbtreuer Präparation ab. Präparation wie bei den Brutkörpern. Bei *Metzgeria* kann ganz besonders schön der Vegetationspunkt studiert werden.

Wir fertigen auch Schnitte durch die Thalli an. Größere Thalli lassen sich gut ohne Einbettung schneiden. Zur Einbettung empfiehlt sich die Zelloidinmethode. Schnitte durch die Thalli zeigen einen sehr großen Reichtum an histologischen Einzelheiten. Im einzelnen bemerken wir besonders Verdickungsleisten bei *Pellia epiphyllia,* bei *Riccia* stark entwickeltes parenchymatisches Grundgewebe, nach unten durch die Rindenschicht abgegrenzt. Bei den *Marchantiaceen* finden wir ein Grundgewebe aus länglich sechseckigen Zellen, Luftkammern, Atemöffnungen.

Schnittfärbung:

1. *Delafields* Hämatoxylin.
2. Alizarinviridin.
3. Safranin-Lichtgrün.
4. Anilinblau.

4. Das Moosstämmchen. Den Übergang zu Formen, wie sie uns von Laubmoosen vertraut sind, bildet *B1asiapusilla.* Dieses Lebermoos hat einen dünnen und zarten Thallus, der am Rande öfters eingeschnitten ist, wodurch blattartige Lappen entstehen. Die meisten Lebermoose haben Stengel und Blätter, wenn auch der Stengel oft am Boden kriechend und weniger aufrecht zu finden ist. Die Stengelunterseiten weisen vielfach Rhizoide auf, mit denen die kriechenden Stengel am Boden befestigt sind. Die Rhizoide sind ungegliederte Zellschläuche.

An Querschnitten sieht man nur Parenchymzellen verschiedener Länge und Weite. Eine Differenzierung in verschiedene Schichten ist nicht vorhanden.

Spaltöffnungen fehlen allen Teilen der beblätterten Lebermoose.

5. Die Blätter der Lebermoose sind viel einfacher gebaut als die der Laubmoose. Eine Mittelrippe fehlt vollständig, sie bestehen alle nur aus einer einzigen Zellschicht. Fadenförmige Blätter kommen vor bei *Trichocolea tomentella.* Bei *Frullania* finden wir Blattanhänge, die sogenannten Blattohren.

Einzelne Blätter können nach Sublimatfixierung durch die Goldimprägnation gefärbt werden. Dargestellt wird in der Regel nur das Chlorophyll bzw. die Chloroplasten. Der Zellkern ist sehr häufig verdeckt.

Die Blätter enthalten vielfach Olkörper. An frischen Schnitten durch *Marchantiaceen* färbt Chinolinblau die Ölkörper blau. Nilblau färbt die Ölkörper rot, das übrige blau.

Zweige der beblätterten Lebermoose werden zweckmäßig zur Erhaltung des Chlorophylls nach *Kisser* fixiert und in Glyceringelatine nach *Kaiser* oder Lävulosegelatine nach *Heringa* und *ten Berge* eingeschlossen.

B. Die Sexualorgane der Lebermoose

§ 477.

1. Die Antheridien und die Archegonien stimmen im inneren Bau sehr mit den Laubmoosen überein, doch ist die Mannigfaltigkeit der äußeren Form größer.

2. Die Antheridien sind bei manchen Formen im Thallus eingeschlossen, so bei *Riccia* und *Anthoceros*. Die Antheridien haben eine kugelige bis länglich-runde Gestalt und sind meistens grün, nur bei wenigen Gattungen, so bei *Blasia, Fossombronia* und dem seltenen *Haplomitrium* rot. Die männlichen Geschlechtsorgane stehen entweder einzeln oder, was weit häufiger ist, zu Ständen vereinigt, die ihrerseits noch auf einem besonderen Stiel sitzen können.

Diese Antheridienstände sind bei den thallosen Formen *Fegatella, Lunularia, Preissia* und *Marchantia* große wohlausgebildete Organe. Bei den beblätterten Lebermoosen trifft man die Antheridien in den Blattachseln an. Bei *Plagiochilla aspleniodes* befinden sich die Antheridienstände an eigenen Zweigen und haben die Form von Getreideähren. Ebenso bei *Lophocolea*.

Bei manchen Formen stehen die Antheridien in den Achseln der Blätter unter den weiblichen Infloreszenzen. Diese Formen eignen sich mehr für Totalpräparate als für das Anfertigen von Schnitten.

Die Antheridien sind vielfach von Paraphysen begleitet. Wenn man Antheridienstände von *Marchantia* und besonders von *Fegatella conica* im richtigen Reifezustand mit einem Wassertropfen befeuchtet, treten die Spermatozoiden in das Wasser aus. *Fegatella conica* ejakuliert richtig das Sperma auf 4 cm in die Höhe. Man kann es mit einem Objektträger auffangen. Das Wasser sieht dann wie ein Milchtropfen aus. Zunächst treten die Spermatozoidenmutterzellen aus, die bald die Spermatozoiden freilassen.

Die Spermatozoiden können leicht lebend im Mikroskop untersucht werden. Man kann sie auch färben. Der Aussstrich wird mit Joddämpfen oder mit Osmiumsäuredämpfen fixiert. Man kann die Fixierung auch vornehmen, bevor der Ausstrich hergestellt worden ist. In diesem Falle gibt man dann dem Tropfen einen Tropfen eines Gemisches von Fuchsin und Methylgrün bei, worin sich die Spermatozoiden schön färben. Die Färbung kann mit einem Tropfen Tanninlösung gebeizt werden. Hernach kann man entweder ausstreichen und trocknen lassen, Caedax daraufgeben oder nach dem Kollodiumhäutchenverfahren die gefärbten Spermatozoiden in einem dünnen Kollodiumhäutchen verarbeiten.

Hierbei wird der gefärbte Tropfen mit einer Mischung von Glycerin und Wasser zu gleichen Teilen versetzt. Das Wasser läßt man staubfrei abtrocknen, streicht dünn aus und gibt das Kollodium darauf. Selbstverständlich kann der Kollodiumguß auch vor dem Färben nach dem Fixieren angebracht werden. Es folgen dann gründliches Auswaschen, Alkoholstufen oder besser Stufen aus Isopropanol, dann Terpineol und Caedax.

Man kann auch mit Gentianaviolett oder Kresylechtviolett färben, eventuell unter Erwärmen, oder die Goldimprägnation nach *Nabias* zur Anwendung bringen. Wer sehr geübt im Färben ist, kann auch die Eisenhämatoxylin-Färbung nach *Häggqvist* mit einer Nachfärbung von Säurefuchsin anwenden.

3. Die Archegonien sind bei allen Lebermoosen sowohl in der Form wie im inneren Bau mit ganz wenigen Ausnahmen alle gleich. Sie haben immer eine Form wie eine Flasche. Im breiten unteren Teile liegt die Eizelle. Die Zahl der Archegonien in einer weiblichen Infloreszenz ist

verschieden. Sie kann bei *Lophocolea* bis 100 betragen, bis zu 10 Archegonien trifft man häufig an. Befruchtet wird in der Regel nur immer ein Archegonium eines Archegoniumstandes.

Im Thallus eingesenkte Archegonien trifft man bei den *Riccien* und bei *Anthoceros* an. *Marchantia* besitzt einen längeren Träger für einen kompliziert gebauten Archegonienstand.

Wir fertigen Querschnitte an durch die Archegonienstände und durch die Träger der Archegonienstände.

Bei *Marchantia* ist an Querschnitten durch den Träger der weiblichen Infloreszenz zu sehen: Atemhöhlen, Bauchrinne mit Zäpfchenrhizoiden. Die einzelnen Strahlen der weiblichen Inflorenszenz zeigen: Epidermiszellen, Kammern mit chlorophyllhaltigen Zellsprossungen, Schleimzellen und Rhizoide.

Bei *Calipogeia trichomanes*, die an sumpfigen Waldstellen häufig ist, bei *Geocalix* und *Gongylanthus* sind die Antheridien und Archegonien auf der Bauchseite des kriechenden Stengels. Nach der Befruchtung wächst eine Tasche in den Erdboden hinein, auf deren Grund erst der Sporophyt steht.

Untersuchungstechnik: Die Schnitte werden genau so angefertigt und gefärbt, wie es bei den Laubmoosen angegeben ist.

Färbung:

1. *Delafields* Hämatoxylin.
2. Alaun-Glycerin-Hämatein nach *Rawitz*.
3. Safranin-*Delafields* Hämatoxylin.
4. Safranin-Lichtgrün.
5. Alizarinviridin nach *Becher* und andere *Becher*-Farben.

C. Der Sporophyt

§ 478.

1. Der Sporophyt der Lebermoose hat einen anderen Aufbau als der Sporophyt der Laubmoose. Aus der befruchteten Eizelle im Bauche des Archegoniums geht der Embryo hervor, der zum Sporophyten auswächst.

Bei den *Riccien* ist der Vorgang am einfachsten. Die befruchtete Eizelle umgibt sich mit einer dünnen Zellulosewand und teilt sich in 4, später in 8 Zellen. Den inneren Teil des Embryos bilden die Sporenmutterzellen. Später zerfällt die Kapselwand und die Sporen liegen im Archegonienbauch frei.

Bei den übrigen Lebermoosen ist der Vorgang der Sporogonentwicklung viel komplizierter. Die Eizelle teilt sich nach der Befruchtung in 2 Zellen. Die untere Zelle liefert nun in der Folge den Stiel und Fuß, die obere Zelle das eigentliche Sporogon. Die Vorgänge sind bei manchen Arten sehr verwickelt, am kompliziertesten bei den *Marchantiaceen*. Aus den Sporenmutterzellen des unreifen Sporogons gehen die Sporen hervor. Jede Sporenmutterzelle teilt sich in 4 Sporen.

Das beste Objekt zum Studium der Bildung der Sporenmutterzellen und der Sporenbildung sind die Sporogone der *Anthoceros*-Arten. Längsschnitte durch das lange Sporogon zeigen alle Altersstufen, da die Sporen zu ungleicher Zeit reifen.

Fixierung:

1. *Flemmings* Gemisch.
2. Chromessigsäure mit einigen Tropfen Osmiumsäure.
3. Jodalkohol

Färbung:

1. Eisenhämatoxylin nach *Häggqvist*-Säurefuchsin.
2. Safranin-Gentianaviolett-Orange G (Lichtgrün).

3. Nach Sublimatfixierung für Übersichtsbilder erfolgt Stückfärbung angeschnittener Objekte mit Alaunkarmin.

2. Bei den *Riccien* ist der Sporophyt im Thallus völlig versenkt. Die ganz reifen und ausgewachsenen Sporogone sind am Thallus durch dunkle Auftreibungen zu sehen. Beim Absterben des Thallus platzen die Sporogone und die Sporen treten zutage. Ein Kapselstiel fehlt.

Die *Riccien* eignen sich sehr zur Anfertigung von Querschnitten, wobei man in Zelloidin einbettet oder uneingebettet schneidet.

3. Junge Sporophytenstadien.

Färbung:

1. Safranin-Gentianaviolett-Lichtgrün (in diesem Falle eine sehr dankbare Färbung).
2. *Delafields* Hämatoxylin.
3. *Rawitz*-Färbung in Verbindung mit Lichtgrün oder Säurefuchsin.

4. Ältere Sporogone färbt man nur mit Säurefuchsin allein. Die Sporen sind schwarz gefärbt.

Bei den meisten Lebermoosen treten gestielte Sporogone auf, wenn auch der Stiel manchmal sehr kurz ist; er ist bei seinem Ursprung von der Kalyptra umgeben. Die Sporogonkapsel ist kugelrund bis oval. Nur bei *Anthoceros* ist, wie schon oben erwähnt wurde, die Sporogonkapsel lang. Der Stiel setzt unmittelbar an der Kapsel an. Die Kapsel reißt entweder formlos auf mit eintretender Fäulnis oder sie öffnet sich mit vier Zipfeln. Sie hat einen sehr einfachen Bau; eine Kolumella finden wir nur bei *Anthoceros*. Die Kapselwand weist Ringfasern auf.
Geeignete Untersuchungsobjekte sind *Metzgeria, Lophocolea, Plagiochilla, Lophozia, Haplozia, Cephalocia* und *Madotheca*. Untersuchungstechnik wie oben bei *Riccia*.

Einen Fruchtsack finden wir bei *Geocalix, Calypogeia, Gongylanthus* und anderen. Häufig davon ist in der deutschen Flora nur *Calypogeia trichomanes*. Von den Fruchtsäcken (Perigynium) fertigen wir am besten Längsschnitte an. Hier ist Zelloidineinbettung am Platze. Untersuchungstechnik wie oben bei *Riccia*.

5. Sporen und Elateren. Die Sporen der Lebermoose zeigen in Größe und Form große Verschiedenheiten. Unter den Sporen befinden sich bei allen Lebermoosen mit Ausnahmen der *Riccien* auch spiralige Sporenschleudern, die Elateren. Nicht freie, sondern in Zipfeln vereinte und angewachsene Elaterenbündel weisen auf: *Frullania, Pellia und Aneura.*

Die Untersuchung der Sporen kann erfolgen nach kurzer Fixierung mit Osmiumsäuredämpfen und Einschluß in Glyceringelatine nach *Kaiser* oder Hausenblasengallerte nach *Behrens*. Fixieren wir sie mit trichloressigsäurehaltigen Fixiermitteln, so können sie hernach sehr gut mit der Goldimprägnation dargestellt und in Glyceringelatine eingeschlossen werden.

Lose Elateren finden sich in allen Sporenpräparaten.

Kapitel XIII: Farnpflanzen

A. Allgemeines

§ 479. Zu den Farnpflanzen gehört eine große Gruppe von Kryptogamen, die gleich den Phanerogamen im Stamm und in den Stengeln Gefäße aufweisen und teilweise auch im Bau der Blätter Ähnlichkeiten mit den Blättern der Phanerogamen zeigen. Daher schließt sich auch die Technik der Untersuchung und der Präparation teilweise an die der Phanerogamen an. Der Leser dieses Buches findet daher Anhaltspunkte und Vergleichsmöglichkeiten bei der Bearbeitung der Farnpflanzen, sofern er sich bereits mit Phanerogamen beschäftigt hat. Ist das nicht der Fall, so bilden die eigentlichen Farne das geeignetste Objekt unter den Kryptogamen, sich in die mikroskopische Technik einzuarbeiten.

Die Farnpflanzen zeigen in geradezu klassischer Weise den Generationswechsel, die sich ewig abwechselnde Folge von einer Generation mit Geschlechtsorganen und einer anderen Generation derselben Pflanze, die nur Sporen erzeugt. Nicht bei allen Kryptogamen ist ein Generationswechsel bekannt, so bei den Armleuchteralgen. Bei den eigentlichen Farnen sind zudem diese beiden Generationen leicht zu beschaffen, so daß es nicht an Untersuchungsmaterial fehlt.

Was landläufig als Farn bezeichnet wird, und dies gilt auch für die Farne im weiteren Sinne, das ist der Sporophyt, die sporentragende Generation, die bei tropischen Baumfarnen einige Meter hoch sein kann, während der Gametophyt, das Prothallium, ein kleines Thallusblättchen von höchstens Pfenniggröße ist und manchmal auch nur wenige Zellen in den Sporen ausmacht. Bei der Besprechung der Übungsbeispiele beginnen wir bei den Farnen aus praktischen Gründen jedesmal mit dem Sporophyten.

B. Ausgewählte Beispiele zur Bearbeitung der Farne

I. Eigentliche Farne (Filicales)

§ 480. Fixiermittel für Farne. Von den Fixiermitteln kommen folgende für Farne in Betracht:

I. <u>Für den Sporophyten</u>

1. Fixiergemisch nach *Lavdowski* besonders bei Blättern, Stengeln und Rhizomen für das Schneiden ohne Einbettung. Zum Fixieren nehme man keine größeren Stücke als 1 cm lang bei den Stengeln und 1 qcm Größe bei den Blättern. Die Fixierdauer ist 15 Minuten bis eine Stunde.

2. Chromessigsäure nach *Ulbrich* in folgender Zusammensetzung:

Destilliertes Wasser	100 ccm
Eisessig	1,5 g
Chromsäure	0,5 g

Die Chromessigsäure ist besonders geeignet für Wurzelspitzen, Sproßachsen, geringelte Blattknospen und *junge* Sporangien. Dauer der Fixierung 24 Stunden.

3. *Juelsches* Gemisch in folgender Angabe nach *Ulbrich*:

Alkohol, 50 %ig	100 ccm
Zinkchlorid	2 g
Eisessig	5 ccm

Dieses Fixiermittel wird von *Ulbrich* besonders empfohlen für starke Teile von Farnen, Rhizomen, untere Stengelstücken, *ältere* Sporangien. Die Dauer des Fixierens ist 24 Stunden.

4. Trichloressigsäure nach *Heidenhain*

II. Für den Gametophyten

1. Chromessigsäure in folgender Zusammensetzung nach *Ulbrich*:

Destilliertes Wasser	100 ccm
Chromsäure	0,6 g
Eisessig	0,4 ccm

2. Das schwache *Flemmingsche* Gemisch.

Beide eignen sich für das Studium der Zellteilungen an den Sproßachsen. Für Kernteilungsstadien ist das *Flemmingsche* Gemisch zu verwenden.

3. Auch das Mannheimer Gemisch kann angewendet werden.

§ 481. Einbetten und Schneiden

Uneingebettet schneiden. Von den Farnen lassen sich Stengel, Teile des Rhizoms und Wurzelspitzen vielfach uneingebettet schneiden. Die Schnitte kommen von dem Mikrotommesser weg in die Fixierflüssigkeit.

Einbetten in Zelloidin. Alle Objekte lassen sich in Zelloidin einbetten. Die Zelloidinblöcke werden einige Tage in Glycerin gelegt, bevor geschnitten wird.

Einbetten in Paraffin. Die Paraffineinbettung ist ohne Schwierigkeit durchzuführen. Für dünne Schnitte durch Prothallien und Sporangien (Sporenentwicklung) ist sie der einzige Weg.

§ 482. Färbemethoden für Farne

Histologische Färbungen. Für die Färbung der bei Farnen bereits sehr gut ausgebildeten Gefäßbündelsysteme eignen sich:

1. Kresylechtviolett
2. Safranin
3. Auraviol nach *Geidies* (dieser Farbstoff färbt ganz besonders klar, jedoch nur in rot allein)
4. Alizarinviridin nach *Becher*,
5. Alizarinzyanin RR.

Doppelfärbungen:

1. *Delafields* Hämatoxylin-Safranin
2. Safranin-Anilinblau
3. Safranin-Lichtgrün
4. Magdalarot-Anilinblau
5. Benzoazurin-Benzopurpurin im Gemisch zu gleichen Teilen.

An Stengellängsschnitten können die Siebplatten mit Anilinblau deutlich gemacht werden. Die Färbung gelingt jedoch nicht bei allen Objekten. Über Färbungen von Stärke vergleiche die Ausführungen bei den Armleuchteralgen. (§ 320 Ziffer 6 und 7).

Cytologische Färbungen.

Für die an sich ziemlich schwierigen Färbungen an den Geschlechtszellen stehen zur Verfügung:

1. Eisenhämatoxylin nach *Häggqvist* und *Heidenhain*
2. Alaun-Hämatoxylin nach *Rawitz*
3. *Flemmings* Dreifarbenvorschrift
4. Goldimprägnation nach *Nabias* in der abgeänderten Form nach *Eckert* für Algen
5. Alauncochenille
6. Alaunkarmin.

Übungsbeispiele

§ 483. Der Aufbau des Sporophyten. Was als Farn allgemein bekannt ist, ist der Sporophyt. Farne kommen in großer Zahl in allen Teilen Deutschlands vor. Dazu sind tropische und subtropische Formen in Handelsgärtnereien oder den Warmhäusern der botanischen Gärten und Institute unschwer erhältlich. Das Untersuchungsmaterial ist also in der Regel leicht zu beschaffen.

Erreichbare und geeignete Objekte:

Ophioglossum vulgare	Stengel, Blatt, Sporangien
Botrychium lunulare	Stengel, Blatt

diese beiden Formen muß man aus Gärtnereien beziehen, sie werden kaum im Freien aufgefunden.

Struthiopteris germanica	Stengel, Sporangien
Asplenium ruta muraria	Rhizom
Scolopendrium vulgare	Stengel, Blatt, Sporangien
Polypodium vulgare	Stengel, Rhizom, Sporangien
Asplenium trichomanes	Stengel
Blechnum spicant	Stengel, Sporangium

Diese Arten werden im Freien aufgefunden; seltenere Formen bekommt man auch in Gärtnereien.

Typische Warmhausfarne sind:

Angiopteris evecta	Stengel
Diplacium proliferum	Brutknospen, Stengel
Aneinema phylititis	Sporangien, Stengel, Blatt
Aspidium sieboldi	Sporangien, Stengel, Blatt
Polypodium glaucum	Stengel, Blatt-Hydathoden
Davallia ballata.	

Als Zimmerpflanzen trifft man an:

Pteris cretica und andere Arten der Gattung *Pteris*.
Nephrolepsis in vielen Arten.
Platycerium mit geweihähnlichen Blättern.

In der Regel wird man aber an Zimmerfarnen die Sporangien vermissen.

Wenn man Glück hat, ist manchmal aus großen Gewächshäusern Material von Baumfarnen erhältlich, meist Luftwurzeln, Zweige und Blätter; Stammstücke erhält man nur, wenn der Baumfarn abstirbt. Nach *Chamberlain* schneiden sich Stammteile nahe dem Gipfel sehr leicht. Teile aus der Mitte oder vom Wurzelende schneiden sich so schwer wie Hartholz. Wurzelspitzen sind sehr geeignet zur Darstellung der Scheitelzellen. Zur Fixierung empfiehlt *Chamberlain* Formalinalkohol.

§ 484. Die Wurzeln der Farne sind Adventivwurzeln, die aus dem Stamm entspringen. Wurzeln erhalten wir am einfachsten durch Umstülpen der Blumentöpfe unserer Zimmerfarne. Ein sehr geeignetes Objekt ist *Pteris cretica*, aber auch andere sind natürlich zu gebrauchen. Wurzeln erhalten wir auch von Freilandfarnen in unseren Wäldern.

Fixierung:

1. Chromessigsäure
2. Formalinalkohol

Schneiden: Ohne Einbettung.

Einfache Färbungen:

1. Auraviol nach *Geidies*
2. Kresylechtviolett
3. *Becher*-Farben.

Doppelfärbungen:

1. Safranin-Lichtgrün
2. Safranin-Anilinblau
3. Safranin-*Delafields* Hämatoxylin
4. Safranin-Alizarinviridin

§ 485. Das Rhizom. Für das Studium des Rhizoms nehmen wir ein Rhizomstück vom Adler- und vom Wurmfarn und zum Vergleich ein ganz kleines Rhizom etwa von der Mauerraute.

§ 486. Der Stengel oder Stamm. Stengelquerschnitte sind am unteren Ende des Blattstieles schwer herzustellen. Adlerfarn und *Struthiopteris* schneiden sich besonders schlecht im uneingebetteten Zustand. Besser bettet man in Zelloidin ein und behandelt dann den gehärteten Zelloidinblock mit Glycerin. Untersuchungstechnik wie bei der Wurzel.

Zu sehen ist an Querschnitten durch Stengel, Stamm und Rhizom folgendes:

1. Außen ist die Epidermis, eine einschichtige Zellschicht, die Oberfläche bildet. Der Epidermis entspringen die Spreuschuppen, die manchmal nur einfache Haare darstellen.

2. Auf die Epidermis folgt die Rinde. Sie ist mannigfaltig gebaut. Ihr fehlt chlorophyllführendes Gewebe. Die Rinde ist ziemlich dick und weist viel stützendes mechanisches Gewebe auf (Parenchym, Kollenchym oder Sklerenchym). Manchmal ist das mechanische Gewebe aus gleichmäßig gebauten Zellen gefügt. Ferner kommen noch Speichergewebe und Zellen, die Schleim, Gummi oder Gerbstoffe enthalten, vor.

3. Die Endodermis ist die innerste Rindenschicht und umgrenzt die Stele. In ihr ist der *Casparische* Streifen zu sehen. Die Endodermiszellen zeigen an den *radialen* Zellwänden einen charakteristischen Schatten bei der mikroskopischen Untersuchung nicht gefärbter Schnitte. Dieser Schatten wird nach *Straßburger* durch wellige Verbiegungen der mittleren Membranstreifen, eben den *Casparischen* Streifen, erzeugt. Besonders schön ist er bei den Schachtelhalmen zu sehen (§ 512. Siehe dort auch über die Färbung des *Casparischen* Streifens.).

4. Die Stele ist der Teil des Stammes, der von der Endodermis umschlossen ist. Sie umfaßt das oder die Gefäßbündel und den die Gefäßbündel umgebenden Teil, das Perizykel. Das Gefäßbündel besteht aus dem Holzteil (Xylem) und dem Bastteil (Phloem).

Das Xylem läßt Tracheen und in ganz geringem Maße manchmal Xylemparenchym erkennen. Am Adlerfarn (*Pteridium aquilinum*) sind die bekannten Treppengefäße die Tracheen, was man am schönsten bei Längsschnitten durch das Rhizom beobachten kann. Die Treppen selbst entstehen durch die Tüpfel.

Das Phloem besteht hauptsächlich aus den Siebröhren und aus dem in ganz jungen Zweigen auftretenden Phloemparenchym.

5. Das Mark stellt den zentralen Teil des Stammes dar; es ist vom Stelenring umgeben. Stelen, die in Vielzahl auftreten, werden Meristelen genannt. Im Aufbau der Stelen und der Meristelen, in ihrer geometrischen Anordnung, herrscht bei den Farnen eine große Mannigfaltigkeit; man hat ungefähr 30 verschiedene Typen von Stelen unterschieden. Die Protostele ist einfach, auf dem Querschnitt entweder kreisförmig, ringförmig, sternförmig oder oval. Dann gibt es ringförmige Stelen, x-förmige Stelen und eine Reihe anderer geometrischer Figuren.

Längsschnitte zeigen besonders die Treppengefäße des Xylems in den Rhizomen. Die Sklerenchymfasern sind recht häufig durch Phlobaphen, einen Stoff, der nur bei Farnen und Moosen vorkommt, rotbraun gefärbt.

Die Wurzel entsteht bei den Farnen immer als Adventivwurzel. Ihr anatomischer Bau ist ähnlich dem des Stammes und Rhizomes, nur einfacher. In den Rindenzellen der Wurzeln der *Ophioglossaceen* und der *Marattiaceen* besteht eine endophytische Mykorrhiza.

§ 487. Die Blätter der Farne werden als Wedel bezeichnet. Sie bestehen aus Blattstiel und aus der Blattspreite. Der Blattstiel hat einen ganz ähnlichen Bau wie der Stamm. Die Fortsetzung des Blattstieles im Blatt wird als Rachis bezeichnet. Der innere Aufbau gliedert sich in Epidermis, Rinde und Stele. Die Gefäßbündeltypen sind einfacher als die des Stammes. Die Blätter der Farne werden an Querschnitten untersucht, die so geführt werden, daß eine Rachis getroffen wird.

Färbung: Wie bei der Wurzel und Stamm (§ 482).

§ 488. Spaltöffnungen und Epidermispräparate. Die Blätter zeigen zahlreiche Spaltöffnungen, die an den Querschnitten gut zu beobachten sind. Flächenansichten erhält man am besten nach dem Verfahren von *H.Gaecks* (122). Die nicht fixierten Blätter werden mit Ether-Alkohol und Watte von Wachs und Schmutz gereinigt, dann in *Lavdowskischer* Flüssigkeit fixiert und anschließend ausgewaschen. Mit einem Skalpell zieht man dann die Oberhaut ab. Eventuell kann die Oberhaut auch ohne Fixieren abgezogen, muß aber dann sofort fixiert werden.

Die Färbung erfolgt am besten mit einer *Becher*-Farben, z.B. Anthracenblau WR. Der Zellkern erscheint tiefblau, das Plasma schwachblau, die Schließzellen treten stark hervor. Natürlich kann auch Alizarinviridin genommen werden, wodurch grüne Färbungen erzielt werden. Einschluß in Caedax nach Alkohol-Terpineol-Passage.

Eine weitere Methode, die Epidermis isoliert darzustellen, hat *Straßburger* angegeben. Kleine, etwa 1 qcm große Blattstückchen werden gut fixiert und kommen dann auf 1-2 Tage in das *Schultzesche* Gemisch. In einem weiten Reagensglas werden einige Kristalle von Kaliumchlorat mit Salpetersäure überdeckt und im Wasserbade gelöst (Vorsicht, Säuredämpfe!). Nach 2 Tagen Auswaschen der Objekte unter Schütteln; Aussüßen mit Salmiakgeist. Die Epidermis löst sich beim Schütteln des Glases, beim Umrühren mit einem Glasstab, oder sie läßt sich sehr leicht abziehen. Sie läßt sich mit Sudan, Safranin oder auch Hämatoxylin-Farben färben.

Wegen weiterer Methoden zur. Darstellung der isolierten Epidermis sei auf die Literatur verwiesen (123).

(122) H.Gaecks, Mikrokosmos XXVI, 1932/33, S.152

(123) H.Thaler, Mikrokosmos XXXII, 1938/39, S.60
Kisser, Mikrokosmos, XXIV, 1930/31, S.109
Leunig, Mikrokosmos, XXIX, 1936/37, S.39

§ 489. Hydathoden. Manche Farne, wie *Polypodium glaucum* (häufig gehalten als Gewächshausfarn) weisen Hydathoden auf. Hydathoden sind Vorrichtungen zur Wasserausscheidung. Man untersucht sie an Querschnitten und an ausgebleichten Totalpräparaten, die mit Karbolsäure durchsichtig gemacht wurden. Einschluß in Karbolsäure oder besser Lactophenol, auch in Lactophenolgelatine.

§ 490. Spreuschuppen oder Palae hüllen die jungen Blätter oder Stammteile ein. Sie haben die Gestalt kleiner Blätter und sind braun bis purpurrot gefärbt. Am einfachsten zupft man sie von jungen Wedeln ab, fixiert in Formalin und schließt in Gelatine oder Caedax ein. Die Spreuschuppen entspringen einer Epidermiszelle. Die verdickten Seitenwände der Zellen sind an ausgewachsenen Spreuschuppen tief braun gefärbt, junge Schuppen weisen in den Zellen Zellkerne auf, an älteren Schuppen sind alle Zellen abgestorben und mit Luft gefüllt. Manche Formen weisen an den Endzellen Drüsenzellen auf wie *Asplenium bulbiferum*.

§ 491. Brutknospen und eingerollte Blattknospen. Alle echten Farne haben eingerollte Blattknospen, einige von ihnen wie *Diplacium proliferum* haben Brutknospen. Die Schnitte daraus werden so geführt, daß die gerollten Sproßachsen wie Schnecken erscheinen.

Färbung: Wie die Wurzeln und Stengel (§ 482).

§ 492. Sporangien. Bei einer kleinen Gruppe der Farne (den *Eusporangiatae*) sind die Sporangien auf eigenen Sporangienträgern vereinigt, die ganz anders gestaltet sind als die sterilen Blätter. In der heimischen Flora sind sie vertreten durch *Botrychium lunaria* und *Ophioglossum vulgatum*. *Angiopteris* wird in Gewächshäusern vielfach gehalten und ist deshalb leicht erreichbar.

Die Sporangien der meisten Farne (*Leptosporangiatae*) sind auf der Unterseite der fertilen Blätter zu suchen, die sich im übrigen nicht von den sterilen Blättern unterscheiden. Die Sporangien bilden Gruppen, die man als Sori bezeichnet. Ein solcher Sorus wird häufig von einer Wucherung des Blattes überdeckt, dem Indusium. Nur bei *Blechnum spicant* und bei *Struthiopteris germanica* sind die fertilen Blätter stark verschieden von den sterilen gestaltet.

Wir untersuchen Sori und Sporangien. Es emfiehlt sich, die verschiedensten Arten zu berücksichtigen wie *Scolopendrium vulgare, Aspidium filix mas, Asplenium sieboldi* und andere mehr.

An den Schnitten ist das Receptaculum zu sehen, das Häufchen, das die Sori trägt; bei *Asplenium sieboldi* ein sehr großes, gut ausgebildetes Receptaculum und vor der Reife der Sporangien das Indusium.

Die Sporangien zeigen große Verschiedenheiten in ihrem Bau. Bei den *Polypodiaceen* weisen die Sporangien einen Ring auf (Anulus), der über Rücken und Scheitel des Sporangiums läuft. An Zupfpräparaten lebender Sori kann das Aufspringen der Sporangien unter dem Mikroskop beobachtet werden.

Zum Studium morphologischer Verhältnisse reichen Schnitte mit 20µ Dicke aus. Man fixiert mit Formalinalkohol, bettet in Zelloidin ein und färbt mit Safranin-Lichtgrün. Das Hämatoxylin nach *Delafield* tut auch hier gute Dienste.

Die Untersuchung der Entwicklung der Sporangien, der Sporenmutterzellen und die Bildung der Sporen selbst verlangt eine sorgsamere Technik. Man fixiert in der schwachen Lösung nach *Flemming*. Das Einbetten erfolgt in Paraffin. Die Schnittdicke beträgt hier 5-10µ, für die Darstellung der Reduktionsteilungen der Chromosomen sogar nur 3-5µ. Zum Färben verwendet man Eisenhämatoxylin-Eosin. Ein sehr geeignetes Objekt für diese Studien ist *Osmunda*, da hier die Chromosomenzahl gering ist, ebenso die verschiedenen *Aspidium*-Arten.

§ 493. Die Sporen der Farne werden nach Fixierung mit Formalin und gehörigem Auswaschen in Glyceringelatine eingeschlossen. Sie sind der Form nach sehr verschieden und so charakteristisch, daß man nach den Sporen die Spezies bestimmen kann.

§ 494. Der Aufbau des Gametophyten. Aus der keimenden Spore entwickelt sich das Prothallium - der Gametophyt -, der Antheridien und Archegonien hervorbringt. Das befruchtete Archegonium wächst nun wieder zum Sporophyten, der gewöhnlichen Farnpflanze aus. Das Prothallium hat bei den Farnen eine verschiedenartige Gestalt. Bei den *Hymenophyllaceen* (z.B. Trichomanes) ist das Prothallium fädig verzweigt wie eine Grünalge und trägt Antheridien und Archegonien an besonderen Seitenästen. Sporen von Trichomanes sind aus Gewächshäusern zu erhalten. Bei den *Ophioglossum*- und *Botrychium*-Arten sind die Prothallien mehrjährige Knöllchen, die im Erdboden vegetieren. Sie sind frei von Chlorophyll und von einer Mykorrhiza durchzogen. Bei *Botrychium* ist das Knöllchen oval oder herzförmig, bei *Ophioglossum* länglich einfach zylindrisch, manchmal auch verzweigt. Die Antheridien und die Archegonien sind im Gewebe eingesenkt.

Der Embryo dieser Arten lebt jahrelang in die Erde und wird nur selten aufgefunden; ihre Prothallien sind nur durch einen besonderen Glücksfall erhältlich. Material bekommt man durch vorsichtiges Umgraben und Sieben der Erde um die Standorte der Farne herum (botanische Gärten!).

Die Prothallien der übrigen Farne sind dagegen leicht zu bekommen. Sie haben daher die Objekte zu zahlreichen wissenschaftlichen Arbeiten abgegeben. Im Freien findet man sie bei beharrlichem Suchen nicht allzu selten. Das ganze Jahr über kann man Prothallien reichlich in Gewächshäusern unter Farnen vorfinden. Da die Farne hier jedoch in der Regel sehr gedrängt stehen, wachsen die Prothallien gemischt und es ist oft schwierig, ihre Zugehörigkeit zu bestimmten Farnarten einwandfrei festzustellen. Am besten gewinnt man sie durch Aufzucht.

§ 495. Die Aufzucht der Vorkeime. Die Zucht der Vorkeime (Prothallien) gelingt am besten auf Stücken aus gepreßtem Torf, den sogenannten Torfziegeln. Diese Torfstücke legt man in eine 1,5 %ige Lösung von *Knopschem* Nährsalz. Man nimmt die Zucht in mit Glasscheiben oder Glasglocken zugedeckten Glasschalen vor. Die Deckel versieht man oben mit einem Stück Fließpapier, damit das Kondenswasser nicht auf die Kulturen tropfen kann. Handliche Torfziegel in Plattenform liefern die Aquarienhandlungen. *Knops* Nährlösung gibt es auch in Tablettenform.

Die Sporen keimen in reiner Nährlösung rascher als auf Torf. Nach *Straßburger* läßt man daher zweckmäßig die Torfziegel zuerst von der Nährlösung überfluten und nach der Keimung der Sporen die Flüssigkeit etwas verdunsten, bis die Pflänzchen Wurzel fassen können. Nach dem gleichen Autor werden die Kulturen auch auf feuchter Erde in Blumentöpfen angelegt. Dieses Verfahren empfiehlt sich vielleicht, wenn man Sporen von Farnen aus natürlichen Standorten unserer Wälder aussäen will; dazu nimmt man Erdreich vom Standort mit nach Hause.

§ 496. Keimung. Die Keimzeit - der Zeitraum zwischen Aussaat und Keimung - ist verschieden. Sie beträgt im Mittel zwischen 5 und 14 Tagen. Extreme Keimzeiten von einem Tag und von 50 Tagen sind in der Literatur verzeichnet. Die Keimzeit hängt ab von der Temperatur, der Art und dem Alter der Sporen. Mit dem Alter der Sporen verlängert sich die Keimzeit. Die günstigste Zeit für den Ansatz von Kulturen –falls nicht unmittelbar nach der Sporenreife ausgesät wird - ist der Januar und der Februar. Ein Jahr alte Sporen haben meistens ihre Keimfähigkeit eingebüßt.

§ 497. Form der Prothallien. Bei der Keimung tritt zuerst ein Faden von 3-10 Zellen auf, der sich dann in ein flächenförmiges, herzförmiges Gebilde verwandelt, das einige Ähnlichkeit mit dem Thallus eines Lebermooses hat. Die Größe eines ausgewachsenen Prothalliums schwankt zwischen 4-15 mm in Breite und Länge. Das Stadium des Fadens tritt bereits nach 4-14 Tagen auf. Die Entstehung des flächenförmigen Vorkeimes wird durch eine Periklineal- oder auch Schrägteilung der Spitzenzelle eingeleitet. Zunächst entsteht dann ein spatenförmiges Gebilde, das dann allmählich Herzform annimmt. Es bilden sich dann das Meristem, eine Einbuchtung, und das sogenannte Zentralpolster. Die Lebensdauer des Prothalliums beträgt 6-9 Monate.

Während der Keimung entstehen auch die Rhizoiden. Diese sind bei *Polypodium vulgare* und *Blechnum spicant* gelb, sonst bei allen anderen Arten farblos. Ausgewachsene Thalli haben fast immer zahlreiche Rhizoiden.

§ 498. Antheridien. Von den Sexualorganen entwickeln sich zeitlich zuerst die Antheridien. Schon am Faden können sie entstehen. Die Antheridien treten nach 1-8 Monaten auf, im Mittel 2-3 Monate nach der Aussaat. Die Anzahl der Antheridien beträgt 2-50 und kann bis 100 hinaufgehen. Manche Prothallien bleiben nur männlich, die Mehrzahl von ihnen wird jedoch zwitterig. Die Antheridien treten als kleine kugelförmige oder längliche Knöpfchen inmitten einer Prothalliumzelle auf. Die Entleerung eines Antheridiums erfolgt durch Abspringen der Deckelzelle.

§ 499. Archegonien bilden sich etwas später als die Antheridien aus dem mehrschichtigen mittleren Teil des Prothalliums, dem sogenannten Polster. Wenn man aus einem botanischen Garten Sporen von *Angiopteris* erhalten kann, versuche man auch damit sein Glück. Die Prothallien dieser Arten sind ebenfalls grün, herzförmig und sehr langlebig. Die Antheridien und die Archegonien treten aber auf der Unterseite des Prothalliums auf und sind im Gewebe eingesenkt.

Die Prothallien von *Angiopteris* beherbergen endophytische Fadenpilze. Die Kultur gelingt also nur, wenn der geeignete Pilz zur Verfügung steht. Beim Bezug der Sporen erbittet man sich immer etwas Erde aus dem Topf des Farns, weil so die größte Aussicht auf den Mitbezug der Fadenpilze gegeben ist.

§ 500. Die Befruchtung. Das Auftreten der Spermatozoiden und die Befruchtung sind 4-6 Monate nach der Aussaat zu erwarten. 14 Tage bis 6 Wochen nach der Befruchtung entwikkeln sich die ersten Blätter des Sporophyten. Die Untersuchung der Spermatozoiden nehmen wir folgendermaßen vor:

Einige jüngere Prothallien läßt man 10 Minuten lang in einem Wassertropfen liegen. Es entleeren sich dann in der Regel die Spermatozoiden. Lebendbeobachtung! Dauerpräparate von den Spermatozoiden können nach verschiedenen Methoden erhalten werden.

1. Der Tropfen mit den Spermatozoiden wird eine halbe Minute in Osmiumsäuredämpfe gehalten. Anschließend bringt man einen Tropfen von einem Gemisch aus wässrigem Fuchsin und wässeriger Methylgrünlösung dazu. Der vordere Abschnitt der Spermatozoiden färbt sich rot, der hintere blaugrün. Anschließend Beizen mit einem Tropfen Tanninlösung oder Phosphorwolframsäure. Auswaschen, Zusatz von etwas Glycerin, Abdunsten des Wassers unter Staubschutz, Kollodiumschutzhäutchen, gründliches Auswaschen der Reagenzien, Alkohol bis 90%, Terpineol und Einschluß in Caedax.

2. Man kann auch die Spermatozoiden mit Jodjodkalilösung fixieren, nach Glycerinzusatz in das Kollodiumhäutchen einschließen und anschließend vergolden nach der Methode von *Nabias*. Diese Präparate sind bedeutend dauerhafter als die, welche man nach Ziffer 1 erhält.

Die Prothallien mit Antheridien und Archegonien können auch eingebettet werden. Fixierung durch *Flemmingsch*e schwache Lösung, Chromessigsäure mit einigen Tropfen von Osmiumsäure. Einbettung in Paraffin. Schnittdicke 3-5µ.

Zweckmäßig ist es nach *Chamberlain*, die Prothallien mit den Rhizoiden einzubetten. Man zieht sie daher für diese Zwecke nicht auf Sand oder Torf, sondern auf *Sphagnum* oder mulmigem Holz von faulenden Baumstrünken. Färbung mit Eisenhämatoxylin-Eosin, Safranin-Gentianaviolett-Orange G (Lichtgrün), Vergoldung, Safranin-Anilinblau.

2. Wasserfarne (Hydropteridineae)

§ 501. Von den Wasserfarnen, die eine nur kleine Pflanzengruppe bilden, kommen wenige Vertreter in der deutschen Flora vor, die durch Naturschutz behütete Seltenheiten sind. Selbst wenn man in seiner Lokalflora einen Standort kennt, wird man sich das Material für Untersuchungen anderswo beschaffen. Die Wasserfarne sind beliebte Aquarienpflanzen und deshalb jederzeit in beliebiger Menge von Aquarianern oder aus Aquarienhandlungen zu erhalten.

Erhältlich sind:

Marsilia drummondi	Australien
Marsilia quadrifolia	einheimisch
Marsilia salvatrix	Australien
Pilularia globulifera	einheimisch
Azolla pinnata	Amerika
Azolla filucoloides	Amerika
Azolla carolinianum	Amerika
Salvinia auriculata	Amerika
Salvilnia natans	einheimisch
Salvinia elegans	Amerika

Die Pflanzen halten wir im Garten in sumpfigen Becken (den Paludarien) oder im Zimmer in Aquarien und Glasschalen.

In manchen Blumengeschäften werden *Marsilia*-Arten als sogenannter Glücksklee in kleinen Blumentöpfen verkauft (124). Die Sporokarpien bilden sich bei einheimischen Arten im Juli und im August.

(124) Als Glücksklee wird aber auch *Oxalis tetraphylla* aus Mexiko angeboten, der mit hellvioletter Farbe blüht und zu den Phanerogamen gehört.

§ 502. Fixierung der Wasserfarne. Als Fixiermittel kommen in Betracht:

I. <u>Für den Sporophyten</u>:

1. Gemisch nach *Juel*,
2. Das starke *Flemmingsche* Gemisch
3. Trichloressigsäure nach *Heidenhain*,
4. Chromessigsäure in der Vorschrift für Farne
5. Formessigsprit nach *Diettrich*
6. *Pfeiffersches* Gemisch

II. Für Sporokarpien und Gametophyten:

1. Trichloressigsäure
2. Pikrinschwefelsäure.

Sehr junge Sporokarpien lassen sich noch einbetten und schneiden, müssen aber bereits zum Fixieren angeschnitten werden.

§ 503. Einbetten und Schneiden. Die Objekte können uneingebettet geschnitten werden. Zum Einbetten kann das Verfahren mit Gummi arabicum, die Paraffin- und die Zelloidinmethode angewendet werden. Das Überführen erfolgt in das Paraffin mittels Zedernholzöl. Zelloidinblöcke müssen für einige Tage in Glycerin kommen.

§ 504. Färbemethoden für Wasserfarne.

I. Histologische Färbungen:

1. Auraviol nach *Geidies*
2. Hämatoxylin nach *Held*
3. Safranin
4. *Becher*-Farben

II. Differenzierte Gefäßbündelfärbungen:

1. Safranin-*Delaflelds* Hämatoxylin
2. Safranin-Anilinblau
3. Safranin-Lichtgrün
4. Magdalarot-Anilinblau
5. Doppelfärbungen nach *Eckert*.

III. Zytologische Färbungen:

1. Eisenhämatoxylin nach *Häggqvist* mit Nachfärbungen von Eosin oder Säurerubin
2. Safranin-Gentianaviolett-Orange G (Lichtgrün)

Übungsbeispiele

§ 505. Der Aufbau des Sporophyten.

1. Wir verschaffen uns Exemplare von *Marsilia, Pilularia, Salvinia* und *Azolla*. Von sämtlichen Arten fertigen wir Quer- und Längsschnitte durch Rhizom und Blattstiele.

Fixierung: Formessigsprit, *Pfeiffer*, Trichloressigsäure.

Färbung:

Delafields Hämatoxylin, Safranin-Lichtgrün, Hämatoxylin nach *Held* und *Becher*-Farben.

2. Querschnitte durch das Rhizom und die Blattstiele

Bei *Pilularia* ergibt sich folgendes Bild: Die Epidermis besteht aus kleinen regelmäßigen Zellen. Die Rinde ist dick und weist zwei verschiedene Schichten auf. Die äußere Schicht zeigt große Luftkammern, die innere Schicht braun gefärbtes Sklerenchym. Die Luftkammern sind

durch Trabeculae voneinander getrennt. Die Stele ist verhältnismäßig sehr klein. Die Wurzel ist wie das Rhizom und der Blattstiel gebaut.

Bei *Pilularia globulifera* zeigen die Trabeculae eine interessante Gestaltung: abwechselnde Luftkammern sind vollkommen leer, während die dazwischen liegenden Zellen der Trabeculae sich in die Kammer hinein verlängern und schneckenförmig aufrollen.

3. Bei *Salvinia* kann man Knoten und Internodien unterscheiden. *Salvinia* hat keine Wurzeln, der Stamm ist einfach gebaut und reich mit Luftkammern versehen, die Stele ist klein. *Salvinia* trägt an jedem Knoten drei Blätter, zwei davon sind Schwimmblätter mit großen Luftkammern, eines ist ein langgestrecktes Wasserblatt.

4. *Azolla* hat lange dünne Wurzeln mit großen Luftkammern und einer sehr kleinen Stele.

5. Die Blätter zeigen wie die Stengel ebenfalls primitive Leitbündel. Besonders interessant sind die Querschnitte durch die Blätter von *Pilularia*. Bei *Marsilia* sind die Blätter kleeblattähnlich. Durch die Blätter von *Pilularia, Marsilia* und *Salvinia* fertigen wir Querschnitte an. Die Schwimmblätter von *Salvinia* können auf ungefärbte farbtreue Totalpräparate verarbeitet werden.

Manche ausländische *Salvinia*-Arten haben auf den Schwimmblättern auffallende Haarbildungen gegen Wasserbenetzung.

Azolla schneiden wir als ganzes Pflänzchen nach Einbettung in Zelloidin quer und längs. Färbungen wie oben bei den Stengeln aufgeführt.

§ 506. Die Sporokarpien.

1. Die Sporokarpien entspringen bei allen Wasserfarnen direkt am Stengel. Sie zeigen in ihrem Bau große Verschiedenheiten gegenüber den Sporangien der Farne.

2. Bei *Pilularia* beherbergt ein Sporokarp Mikrosporen und Makrosporen. Wir fertigen Quer- und Längsschnitte durch ein junges Sporokarp. Auf den medianen Längsschnitten sind vier Fächer zu sehen. Die beiden oberen Fächer beherbergen Mikrosporangien, die beiden unteren die Makrosporangien. Auf Querschnitten durch den oberen Teil allein sehen wir die Mikrosporangien, bei Schnitten durch den unteren Teil die Makrosporangien für sich.

Fixierung: Trichloressigsäure oder Susa nach *Heidenhain*.

Einbettung: Zelloidin.

Stückfärbung:

Alaunkarmin,
Methylkarmin nach *Schwarz*,
Eisenkarmin nach *de Grot*.

Schnittfärbung:

Eisenhämatoxylin nach *Häggqvist*,
Delafields Hämatoxylin-Säurefuchsin
Safranin-Eosin (Säurefuchsin)

3. Bei *Marsilia* sind 14-18 Fächer im Sporokarp mit je einem Sorus im Sporokarp. Die Fächer sind in zwei Reihen nebeneinander angeordnet. Bei *Marsilia* sind Mikrosporangien und Makrosporangien in ein und demselben Sporokarp vereinigt.

Eingebettet und geschnitten werden können nur junge Sporokarpien, solange sie noch in der Entwicklung sind. Im Stadium der Sporenmutterzellen und noch im Frühstadium der Sporenbildung kann die Einbettung in Paraffin vorgenommen werden. In diesem Stadium fangen die

Sporokarpien gerade an, bräunlich zu werden. Die älteren und reiferen, an der dunkelbraunen Färbung kenntlichen Stadien lassen sich nicht mehr schneiden. Man macht dann ein Loch in die harte Schale und legt die Sporokarpien in Brunnenwasser. Der Inhalt quillt auf und dringt heraus oder läßt sich leicht ausquetschen. Die Sexualorgane bilden sich dann rasch.

Bei *Marsilia* bringen die Mikrosporen schon nach 24 Stunden die Prothallien mit den Antheridien, die Makrosporen in 2-3 Tagen Prothallien mit reifen Archegonien hervor.

Die Sporen werden dann mit Trichloressigsäure fixiert.

Schnittfärbung:

Delafields Hämatoxylin
Methylkarmin nach *Schwarz*,
Safranin-Lichtgrün,
Becher-Farben,

bei gut fixiertem Material auch Eisenhämatoxylin-Säurefuchsin.

4. Bei *Salvinia* treten gesonderte Mikro- und Makrosporokarpien auf. Die Sporangien selbst sind gestielt und haben im Reifezustand eine einschichtige dünne Wandung. Sie ähneln den Sporangien der leptosporangiaten Farnkräuter, haben aber keinen Ring. Die Makrosporangien sind größer als die Mikrosporangien. Das reife Makrosporangium löst sich von der Mutterpflanze und überwintert auf dem Grunde der Teiche. Bei der Keimung platzt die Sporenhaut in 3 Klappen auf und das grüne weibliche, sattelförmige Prothallium kommt etwas zum Vorschein. Es weist 3-5 Archegonien auf, entwickelt jedoch nur eines zum Embryo.

Die Mikrosporangien umschließen etwa 60 Mikrosporen, die in einer zarten, schaumigen Grundsubstanz in Vierergruppen eingebettet sind. Sie platzen nicht auf. Das männliche, kleine, schlauchförmige Prothallium tritt durch die Sporangienwand hervor. Jedes Prothallium entwickelt nur ein einziges Antheridium, jedes Antheridium 4 Spermatozoidzellen, die durch Aufbrechen der Zellwände nach außen gelangen.

5. *Azolla*. Bei Azolla werden ebenfalls Makro- und Mikrosporokarpien gebildet.

Im Mikrosporangium sind 64 Sporen, die in Häufchen von 5-8 Sporen in rundlichen Agglomeraten, den Massulae, zusammengehalten durch eine schleimige Bindesubstanz, auftreten. Jede Massula hat hakenförmige Auswüchse, die sogenannten Glochiden. Nach dem Platzen der Sporangienwand gelangen die Massulae in das Wasser.

Im Makrosporangium werden 32 Makrosporen angelegt, von denen aber nur eine einzige zur Reife gelangt. Auch sie sind von einer schaumigen Substanz, dem Perispor, umgeben. Die Massulae haken sich am Perispor fest. Die Prothallienumbildung ist ähnlich wie bei *Salvinia*. Mikro- und Makrosporangien sind leicht zu erhalten, schwieriger ist es, die Gametophyten zu finden. Die Sporen keimen erst nach dem Absterben und Verfaulen der Pflanzen.

Untersuchungen:

1. Totalpräparate allenfalls unter Erhaltung des Chlorophylls von Prothallien.
2. Sporangien und Sporen.
3. Schnitte durch junge Sporokarpien, wenn nötig durch einzelne Sori.

Fixierung:

Trichloressigsäure

Färbung:

Eisenhämatoxylin-Eosin
oder nach dem bei Pilularia angegebenen Verfahren.

Das Einbetten, Schneiden und Färben der Prothallien, Embryonen und Sporokarpien verlangt bereits größere Geschicklichkeit und Gewandtheit in mikroskopischen Arbeiten.

Die Prothallien und die Sexualzellen sind, sowie man erst einmal Sporokarpien hat, leicht zu züchten. Die Keimung der Sporen von *Salvinia* tritt im Zimmer bereits im Februar ein, also ungefähr 6-8 Monate nach der Reifung. Sporokarpien und die Pflanzen sind in botanischen Gärten oder Handlungen zu bekommen.

3. Schachtelhalme (Equisetaceae)

§ 507. Schachtelhalme kommen in der deutschen Flora überall zahlreich vor. Besonders die häufigen Arten geben ein ausgezeichnetes Material für die Bearbeitung aller Themen ab. Zu den Übungsbeispielen ist zu beschaffen: .

1. *Equisetum arvense* (Ackerschachtelhalm, Zinnkraut). Er bildet ein allgemein verbreitetes, lästiges Unkraut. Zu sammeln sind fertile braune Stengel mit Sporangien, sterile Stengel mit Seitenästen, Sproßspitze, Rhizom mit Rhizomknollen.

Das Rhizom reicht bis zu 60 cm tief in die Erde. Am leichtesten ist es in losem Sand oder Ackerboden auszugraben, doch muß man darauf achten, daß es nicht durch Reißen beschädigt wird.

2. *Equisetum silvaticum* (Waldschachtelhalm). Man sammle Stengel mit Internodien und Scheiden, Sporangien (Sammelzeit: Mai bis Juni).

3. *Equisetum limosum* (Sumpfschachtelhalm). Untersuchungsmaterial sind Stengel mit Internodien und Scheiden, Sporangien (Sammelzeit: Juni).

§ 508. Fixierung der Schachtelhalme.

1. Chromessigsäure nach *Ulbrich* in folgender Zusammensetzung:

Destilliertes Wasser	100 ccm
Eisessig	l,5 g
Chromsäure	0,5 g

Diese Vorschrift ist geeignet für Prothallien, Wurzelspitzen und *junge* Sporangienähren. Für die Untersuchung der Sporenentstehung in jungen Sporangien gibt man der Chromessigsäure etwas Osmiumsäure bei (nach *Chamberlain*).

2. Formalin-Trichloressigsäure nach *Heidenhain*. Besonders für stärkereiche Teile, wenn die Stärke entfernt werden soll.
3. *Juel* Nr.1 für sterile und fertile Halme, für Stamm, Wurzeln, Rhizom und Rhizomknollen, Sproßachsen und alte Sporenähren.
4. Fixiergemisch nach *Lavdowski*.
5. Ferner werden 70 %iger Alkohol allein und 1 %ige wässrige Sublimatlösung empfohlen.

§ 509. Schneiden und Einbetten. Die derberen Teile der Sporophyten können uneingebettet geschnitten werden. Die umfangreichen Verkieselungen machen aber die Anfertigung guter Schnitte zu einer qualvollen Beschäftigung. Ganz besonders hart sind die Rhizomknollen. Jedenfalls ist jedes Mikrotommesser nach einigen Schnitten vollkommen stumpf und muß neu geschliffen werden. Es empfiehlt sich daher ein Entkieseln der Objekte vor dem Einbetten und Schneiden. Nicht entkieselt zu werden brauchen alle chlorophyllfreien braunen Triebe und die Prothallien.

Soll auf die Entkieselung verzichtet werden, bettet man in Paraffin oder Zelloidin ein und schneidet mit Rasierklingen am Mikrotom. Manche Firmen liefern besondere Halter zum Befe-

stigen von Rasierklingen - am besten eine dickere Sorte -, die anstatt der Mikrotommesser eingespannt werden können.

Zum Einbetten eignen sich Paraffin, Zelloidin und Gummi arabicum.

§ 510. Färben der Schachtelhalme

A. Histologische Färbungen. Den Schachtelhalmen fehlt eigentliches Holz, doch gibt der *Casparische* Streifen in den radialen Streifen der Endodermis an Stengelquerschnitten Holzreaktionen mit Phloroglucin-Salzsäure oder mit Chlorzinkjod. Der *Casparische* Streifen läßt sich gesondert färben.

Leitbündelfärbungen:

1. Safranin-Anilinblau
2. Safranin-Hämatoxylin nach *Held*
3. *Delafields* Hämatoxylin-Eosin (Rubin S).

Blätter:

4. *Becher*-Farben
5. mit den oben angeführten Leitbündelfärbungen

Totalfärbungen von Prothallien

6. Alizarinviridin nach *Becher*.

B. Zytologische Färbungen.

Stärke in Rhizom und Rhizomknollen:

1. Silbernitrat, Fuchsin. Vergleiche § 320 Ziffer 6 und 7.

Prothallien:

2. Vergoldung nach *Nabias*
3. Eisenhämatoxylin nach *Heidenhain* und *Häggqvist* mit Nachfärbung von Eosin, Kongorot oder Säurefuchsin
4. Anilinblau-Eosin nach *Sieben*

Sporophylle:

5. Eisenhämatoxylin-Säurefuchsin.

Übungsbeispiele

1. Der Aufbau des Sporophyten

§ 511. Wurzeln, Rhizom, Rhizomknollen. Das gesammelte Material wird zunächst fixiert und in die Aufbewahrungsflüssigkeit verbracht. Wenn entkieselt werden soll, geschieht dies unmittelbar vor der weiteren Verarbeitung. Die braunen, dünnen Wurzeln entspringen den Knoten des Rhizoms. Rhizom, Rhizomknoten und Rhizomknollen sind die härtesten Teile der Schachtelhalme, die am besten entkieselt werden.

Art	Knolle
Equisetum telmateja	birnenförmig
E. arvense	zitronenförmig bis zwiebelförmig, 1-2 cm lang
E. palustre	eiförmig, mehrere Knollen in der Längsachse miteinander verwachsen
E. pratense	unregelmäßig geformt

Die sehr reichlich vorhandene Stärke ist vor dem Färben zu entfernen (Kochen der Schnitte, Behandeln mit Chloralhydrat; vergleiche § 72). Die Stärkekörner können durch Abschaben angeschnittener Knollen leicht gewonnen werden.

Querschnitte an Wurzeln lassen folgendes erkennen: Außen ist die Epidermis, dann folgt die Rinde, anschließend die Endodermis, innen die Stele. Die Epidermis bildet die Oberfläche des Stammes. Die Rinde ist relativ breit. Sie enthält die Valekularhöhlen. Die Endodermis umhüllt die Stele; sie ist kenntlich an den *Casparischen* Streifen. Die Stele führt das vom Perizykel umgebene Gefäßbündel, das wie bei den Phanerogamen aus einem Xylem und einem Phloem besteht.

Querschnitte am Rhizom und den Rhizomknoten lassen erkennen, daß die Aufbauelemente grundsätzlich die gleichen sind, nur ist die Architektur bereits komplizierter. Im Zentrum des unterirdischen Rhizoms ist die Markhöhle. Die Gefäßbündel sind mehrfach vorhanden und heißen jetzt also nicht mehr Stele, sondern Meristele; sie sind von einer Endodermis umschlossen, die als Schutzscheide funktioniert.

Die Endodermis ist bei verschiedenen *Equisetum*-Arten unterschiedlich. Am Querschnitt zeigt sich das folgende Bild: Die Außenendodermis umschließt als sternförmige Linie alle Meristelen. Die Doppelendodermis besteht aus der Außenendodermis und einer abschließenden Innenendodermis. Die Einzelendodermis umschließt jedes Meristel als geschlossener Ring. So haben wir drei Typen in der Ausbildung der Endodermis.

Die Knollen sind einfach gebaute Speicherorgane für Reservestoffe. Wir fertigen Quer- und Längsschnitte von allen Teilen des Rhizoms an.

Fixierung: Trichloressigsäure oder *Pfeiffer*.

Schneiden: Uneingebettet oder nach Entkieselung in Paraffin oder Zelloidin.
Auch die Einbettung in Gummi arabicum ist hier am Platze.

Färben: Safranin-Anilinblau
Hämatoxylin nach *Held*, nach *Delafield*
Becher-Farben
evtl. Safranin.

§ 512. Der Stengel. Der oberirdische Stamm entspringt an den Rhizomknoten. Die braunen fertilen Stengel von *Equisetum arvense* und von *E. telmateja* sind nicht verkieselt und leicht zu schneiden; ihnen fehlen auch die Spaltöffnungen. Die grünen Stengel sind alle stark verkieselt; sie weisen Spaltöffnungen auf. An den Knoten der oberirdischen Sprosse entspringen ein Quirl von schuppenförmigen Blättern und - wenn vorhanden - auch die Seitenzweige.

Wir fertigen Querschnitte an durch die Internodien, die Stammabschnitte zwischen zwei Knoten, durch die Sproßachsen und Längs- und Querschnitte durch die Knoten. Ebenso bei den dünneren Seitenästen. Die Untersuchungstechnik ist die gleiche wie oben beim Rhizom angegeben wurde.

Die gesonderte Färbung des Casparischen Streifens erfolgt nach *Straßburger*:

1. Färben der Querschnitte mit Rutheniumrot
2. Nachfärben mit Methylenblau-Glycerin von folgender Zusammensetzung:

Methylenblau	10 g
Alkohol absolutus	10 ccm
Glycerin	40 ccm

Hierin färben sich die Casparischen Streifen blau, alles übrige Gewebe bleibt rot.

An den Schnitten ist viel Interessantes zu studieren. Die Riefelung des Stammes und des Rhizoms bedingt einen besonderen anatomischen Aufbau. Der oberirdische Stamm weist eine große Markhöhle auf, z.B. bei *Equisetum hiemale.* Der Stamm ist eine Röhre, die von den Knoten unterbrochen ist. Die Epidermis und die Rinde sind anders gebaut als am Rhizom. Die Epidermis ist sehr dickwandig; im Rhizom verholzen die Epidermiswände, dagegen nicht im Stamm; in der Außenwand der Epidermis sind zahlreiche kleine kugelige, stab- oder plattenförmige Kieselkristalle zu finden. Die Spaltöffnungen liegen in den Riefen und bilden Reihen parallel zur Stammachse. Die Meristelen sind im oberirdischen Stamm viel zahlreicher als im Rhizom, ebenso die Valekularhöhlen.

§ 513. Der Knoten ist im Gegensatz zum Internodium sehr kompliziert gebaut. Will man einigermaßen eine Übersicht gewinnen, so sind Serienschnitte (Querschnitte) durch den ganzen Knoten und radiäre Längsschnitte anzufertigen.

Am Knoten treten auf: der Wechsel der Riefen, das Knotenxylem und die Pektinzapfen, die Abzweigung der Blätter und der Seitenzweige. Zudem verschwinden die Markhöhle und Valekularhöhlen. Das Diaphragma trennt beide Markhöhlen der benachbarten Internodien. Vor allem bildet sich aber das Knotenxylem. Es bildet sich durch Verschmelzung aller Tracheiden der einzelnen Meristele zu einem Ring. In Serienschnitten von unten nach oben ist dies deutlich zu studieren.

Am Knoten innerhalb der Rinde, von der Außenfläche der Zellen ausgehend, sehen wir Stäbchen (Pektinzapfen) in die Interzellularen hineinragen (stärkere Vergrößerung!). Diese Stäbchen enthalten Pektin und färben sich mit den Pektinfärbungen, z.B. mit Safranin, orange, während sich der übrige Schnitt hochrot färbt. Zum eingehenden Studium muß auf die Literatur verwiesen werden (125).

§ 514. Die Blätter sind klein und miteinander verwachsen. Besonders interessant ist ihre Verwachsungsstelle (Ankerzelle). Die Verhältnisse studiert man an Querschnitten durch die Knoten, an denen die Blätter belassen worden sind. Die Spaltöffnungen sieht man an Querschnitten durch Internodium und durch die Blätter. Außerdem kann man folgende Methode anwenden (126):

Stammschnitte zwischen den Internodien werden der Länge nach aufgeschnitten, mit Kalilauge vorsichtig aufgekocht und mit Wasser gut ausgespült. Die innere Schicht kratzt man dann mit einem scharfen Löffel, einem Schleifenmesser oder ähnlichem Instrument aus. Wem ärztliche Instrumente nicht zur Verfügung stehen, der kann einen Teelöffel aus Eisenblech vorne an der Spitze scharf schleifen lassen. Die Blätter werden in ähnlicher Weise ausgekratzt, das abgekratzte Stück wird mit Safranin oder Bismarckbraun gefärbt. Zu sehen sind an solchen Präparaten Spaltöffnungen, Tüpfelung in den dicken Trennungszellen, Verwachsungsnaht mit den Klammerzellen (Ankerzellen). Einschluß in Caedax.

(125) Y.Ogura, Anatomie der Vegetationsorgane der Pteritophyten. Band VII, Teil 1-2 des Handbuches der Pflanzenanatomie, Berlin, Gebrüder Bornträger, 1938

(126) W.Seyser, Praktische Mikroskopie 14, 1936, Heft 5, S.141

§ 515. Darstellung der Verkieselung.

1. Die Verkieselung kann an Blättern, die durch Alkohol entfärbt und in Gelatine eingeschlossen wurden, direkt im Polarisationsmikroskop bei kleiner Vergrößerung (etwa 25-30fach) studiert werden; diese Untersuchung im Polarisationsmikroskop gibt prachtvolle Bilder. Über den Gebrauch des Polarisationsmikroskops und die Deutung der beobachteten Bilder wird auf die Literatur verwiesen.

2. Gebleichte dünne Schnitte können auch in Phenol eingeschlossen werden (Gelatinering!). Die verkieselten Teile erscheinen rötlich (127).

3. Wenn genügend große Teile organischer Substanz zerstört werden, etwa durch Verbrennen oder Ausglühen, so lassen sich die Schnitte in Styrax einbetten. Zu sehen ist dann das vollständige Kieselskelett der Epidermis mit Spaltöffnungen, Riefen usw. Solche Präparate nennt man Aschebilder. Nach *Kisser* (128) gewinnt man sie auf folgendem Weg:

Die Schnitte oder auch abgezogene Epidermisstückchen werden auf einem Platinblech, Glimmerblättchen oder auf einem Objektträger aus Quarz verbrannt. Die Verbrennung kann dabei unvollständig sein, so daß die Asche schwarz oder braun bleibt, oder vollständig, so daß die Schnitte eine rein weiße Asche zurücklassen. Die Verbrennung geschieht am einfachsten dadurch, daß man die Flamme des Bunsenbrenners oder die Spiritusflamme mit Hilfe des Lötrohres auf die Schnitte richtet.

Präparate von zusammenhängenden Aschenskeletten erhält man natürlich am einfachsten bei Benützung eines Objektträgers aus Quarz. Da er ja in der Flamme nicht springt und erhalten bleibt, kann auf ihn ohne weiteres nach dem Abkühlen ein Tropfen Styrax aufgebracht und mit einem Deckglas zugedeckt werden.

Ist der veraschte Schnitt auf einem Platinblech, so ist das Verfahren etwas umständlicher. Man gibt auf einen Objektträger einen Tropfen Styrax, kehrt um und drückt ihn auf das Platinblech. Beim vorsichtigen Abheben haftet dann der Schnitt am Objektträger. Der Objektträger darf jedoch keinen Hängetropfen aufweisen! Vor dem Aufdrücken ist der Styrax etwas auszustreichen. Benützt man jedoch statt Styrax Zelloidin, so kann vor dem Aufgeben des Deckglases das Zelloidinhäutchen in Alkohol gehärtet werden; dadurch ist ein Auflösen der Kalksalze im Schnitt mit verdünnter Salzsäure möglich; was übrig bleibt, ist dann die reine Kieselsäure. Der Einschluß erfolgt dann auch mit Styrax.

4. Die Verkieselung kann man auch an Streupräparaten studieren. Kleine Blätter oder Stengelstücke werden völlig von der organischen Substanz befreit. Die einzelnen Teile der Kieselkörper behandelt man dann wie Diatomeen. Am bequemsten ist Natriumperoxyd, das man den in Wasser liegenden Objekten beifügt.

Nach *Miliarakis* verbringt man die Objekte in konzentrierte Schwefelsäure, bis sie ganz schwarz sind und gießt 20 %ige wässrige Chromsäure zu, wobei starkes Aufbrausen eintritt. Nach Aufhören des Aufbrausens füllt man mit destilliertem Wasser auf. Nach Umschütteln und Abgießen können die Kieselkörper untersucht werden. Einschluß in Styrax.

(127) H.Pfeiffer, Zeitschrift f. wissensch. Mikroskopie 46, 1930, S.491

(128) Kisser, Mikrokosmos XXVII, 1933/34, S.105

§ 516. Das Sporangium. Die Sporangien werden in den Sporophyllen erzeugt. Diese haben die Form eines gestielten Schildes, an dessen Unterseite die sackartigen Sporangien zu 8-10 Stück herabhängen. Die Sporophylle selbst sind in mehreren Etagen in Quirlen zu einem besonderen Sporophyllständer vereinigt, den *Straßburger* als eigentlichen Blütenstand bezeichnet. Wir fertigen Längs- und Querschnitte durch ganze junge Sporophyllstände und auch durch einzelne Sporangien an.

Sporangien von *Equisetum limosum, E. hiemale* und *E. silvaticum* sammelt man im Mai und Juni. Sie sind stark verkieselt; da sie von unten nach oben reifen, zeigen sie gleichzeitig die verschiedenen Reifezustände. Anders sind die Sporangien bei *E. arvense* zu sammeln. Die er-

sten Anlagen der Sporangien für das kommende Jahr sind bereits im Juli zu suchen, sporenbildendes Gewebe tritt bereits im August auf, die Teilung in den Sporenmutterzellen findet im September statt.

Die Sporangienanlagen finden sich an den tief im Boden liegenden horizontalen Stämmen oder Wurzeln. Die Julistadien sind schwierig erkennbar, leicht die August- und die Septemberstadien. Im Dezember oder Januar ausgegrabene Sporangien bringen, im Zimmer in Wasser gestellt, bereits nach einer Woche reife Sporen! (*Chamberlain*). In der Natur finden sich die reifen Sporangien im März. Sie können in Paraffin eingebettet werden. Die Durchtränkung mit Paraffin und die mit Zelloidin ist schlecht.

Fixierung: Trichloressigsäure nach *Heidenhain*.

Färbung: Eisenhämatoxylin-Säurefuchsin
Safranin-Anilinblau
Safranin-Lichtgrün
Delafields Hämatoxylin
Goldimprägnation
Imprägnation mit Schwefelblei

Zu sehen sind an jungen Sporangien die Sporangienwand, die Sporenmutterzellen und zwischen beiden die Tapetenschicht. An älteren Sporangien mit losen Sporen sind die Tapetenzellen verschwunden. Ihr Inhalt ist zur Sporenbildung mitverwendet worden.

§ 517. Die Sporen der Schachtelhalme besitzen zwei Elateren, die an der Spore festgewachsen sind und je nach dem Grad der Feuchtigkeit ihr Verhalten ändern. Bei Zutritt von Feuchtigkeit schlingen sie sich um die Spore. Werden die Sporen in Glyceringelatine eingebettet, so erscheinen die Elateren aufgewickelt. Bei vorsichtiger Trocknung auf einem Objektträger nach einem Vorschlag von *Geidies* - man kann dazu eine ganz kleine Flamme benützen - und Einschluß in Caedax sind die Elateren ausgestreckt; die Sporen sind dabei aber sehr durchsichtig.

Man kann die Sporen zuerst auch mit Fuchsin oder Bismarckbraun anfärben und dann trocknen und wie oben angegeben verarbeiten.

2. Der Aufbau des Gametophyten

§ 518. Der Gametophyt. Die Sporen der Schachtelhalme keimen nur, wenn sie unmittelbar nach der Reife ausgesät werden, dann allerdings bereits nach Verlauf von einigen Stunden. Man verwendet Nährlösungen, Nähragar oder Erde, Lehm und ähnliche Substrate.

Die Kulturen in Nährlösungen und die auf Objektträgern in dünnem Agar oder dünner Gelatineschicht liefern die jüngsten Stadien der Prothallien ohne Verunreinigungen von Sand, Lehm usw. Die Kultur auf Lehm gibt aber mit größerer Sicherheit ältere Prothallien. Als Nährlösung kann man eine 0,1 %ige Lösung des Nährgemisches von *Knop* anwenden.

Buchtien (129) züchtete Prothallien in flachen Saatschalen, die mit Lehm gefüllt wurden. *Buchtien* legt größten Wert auf vollkommene Sterilisation der Nährböden. Wenn man mehrere Kulturen anlegt, besonders wenn man die Schalen im Garten ins Freie stellt, kann man auf die Sterilisation verzichten, muß aber dann natürlich in Kauf nehmen, daß sich Algen und Pilze einstellen. In den Lehm sticht man mit dem Finger einige Löcher, in die man die Nährlösung nachgießt. Austrocknen dürfen die Kulturen auf gar keinen Fall, sonst gehen sie zugrunde. Wer Gelegenheit zu sterilem Arbeiten hat, kann natürlich auch Agar mit Nährlösung nach *Knop* oder *Mayer* benutzen.

Die Keimfähigkeit der Sporen dauert kaum 14 Tage. Man verwendet also die Sporen sofort von den gesammelten Sporophyllständen weg. Nach 24 Stunden zeigen sich schon die ersten Haarwurzeln. Das junge Prothallium ist ein fädiges, später lappiges Gebilde, das am ehesten einem *Anthoceros*-Lebermoos ähnelt.

Die meisten Schachtelhalme haben zweihäusige Prothallien. An 3 bis 4 Tage alten Prothallien läßt sich die Teilung der Chloroplasten studieren (130). Die Prothallien kommen mit 0,5 %igem Traubenzucker oder einem Tropfen der Nährlösung in den hängenden Tropfen und

werden dort beobachtet. Geeignete Stadien für Dauerpräparate fixiert man mit Osmiumsäuredämpfen oder Jodalkohol, Nachfixierung mit Formalin und Darstellung mit Goldimprägnation.

(129) Buchtien, Entwicklungsgeschichte des Prothallium von Equisetum.
In Bibliotheca botanica Nr.8, 1887

(130) H.Reinhardt, Praktische Mikroskopie 13, 1935, Heft 5

§ 519. Antheridien. Die Antheridien entwickeln sich zeitlich vor den Archegonien. Die Entstehung der Antheridien erfolgt bei einigermaßen guten und kräftigen Kulturen nach etwa 4 Wochen. Sie entstehen leichter in Kulturen, deren Prothallien dicht gedrängt gesät sind. Sie zeigen sich den unbewaffneten Augen als winzige grüne Anschwellungen der Prothallienspitzen. Die männlichen Prothallien sind gelbgrün und nicht so groß wie die weiblichen.

Die Antheridien entleeren sich nach Benetzung mit einem Wassertropfen, der ganze Inhalt quillt als schleimige Kugel heraus. Antheridien, die nicht mit Wasser benetzt wurden und deren Inhalt also nicht austreten kann, werden überreif und färben sich braun; die ganze Prothalliumspitze kann sich so braun verfärben. Bei zu später Benetzung mit Wasser entleeren sich die Antheridien nicht mehr.

Die Antheridien haben einen einfachen Bau. Sie entstehen aus einer tetraedrischen Zelle, die sich mit den Spermatozoidenmutterzellen anfüllt.

Die Untersuchung der Spermatozoiden kann in derselben Weise erfolgen wie bei den eigentlichen Farnen.

§ 520. Archegonien. Die Archegonien entstehen ungefähr 6 Wochen nach der Aussaat. Kommen die Antheridien an den Spitzen der Lappen, so sehen wir die Archegonien in der Mitte der Lappen sich bilden, wo schon eine dicke Lage von Zellen aufgetreten ist. Diese Zellen wölben sich etwas vor, teilen sich nach allen Seiten und bilden ein Archegonium, das dem der Farne ähnlich ist. Das reife Archegonium springt nach Wasserbenetzung auf, die Wände des Halskanals und der Bauchkanalzelle verquellen und bilden eine Schleimmasse, durch die das Spermatozoid eindringen kann. Nicht benetzte Archegonien, die nicht aufspringen, färben sich wie die vom gleichen Schicksal betroffenen Antheridien ebenfalls braun. Die Kulturen zeigen leider große Neigung zur Schimmelbildung.

Wir fertigen Totalpräparate von männlichen und von weiblichen Prothallien an. Die Fixierung erfolgt nach *Kisser* mit formalinhaltiger Kupferlösung. Benützt man nur wässrige Lösungen, so verquellen alle reifen Stadien der Sexualorgane. Einschluß in Glyceringelatine oder Lävulosegelatine nach *Heringa* und *ten Berge*. Ferner fixieren wir die Objekte mit *Pfeifferschem* Gemisch und fertigen nach Einbetten in Gummi arabicum oder Paraffin Schnitte durch die Antheridien und Archegonien führende Thalli an. Es gehört etwas Glück dazu, richtige Schnitte zu erhalten.

Färbung:	Safranin-Anilinblau
	Safranin-Lichtgrün
	Becher-Farben
	Delafields Hämatoxylin.

Für anspruchsvollere zytologische Präparate fixieren wir mit Osmiumsäuredämpfen oder mit Chromessigsäure, der einige Tropfen Osmiumsäure zugesetzt worden sind. Die Paraffinschnitte färben wir dann mit Eisenhämatoxylin- Säurefuchsin, Anilinblau-Eosin nach *Sieben* oder Goldimprägnation, Totalpräparate der Prothallien mit Magdalarot-Anilinblau.

4. Bärlappgewächse (Lycopodiales)

§ 521. Die Bärlappgewächse weisen nur krautartige und bei uns in Deutschland erdbewohnende Arten auf; in den Tropen finden sich auch epiphytische Bärlappe. Für unsere Untersuchungen verschaffen wir uns von den Bärlappgewächsen: *Lycopodium innudatum, L. clavatum* und *L. selago*.

L. clavatum findet sich überall in unseren Wäldern, auch an feuchten Stellen an sich trockener, sandiger Kiefernwälder. Aus botanischen Gärten sind *Lycopodium*-Arten nur zufällig zu erhalten, denn die *Lycopodien* sind Schmerzenskinder der Gärtner. Am ehesten findet man die eine oder andere tropische Form in einem Gewächshaus; Material ist aber nur zu bekommen, wenn die Pflanzen eingehen.

Von *Selaginella* besorgen wir uns aus einer größeren Kunstgärtnerei irgendeine tropische Art, die meist reichlich Sporangien tragen.

Isoetes ist kaum auf Exkursionen zu sammeln, wir können aber in Aquarienhandlungen sehr schöne *Isoetes malinvernianum* kaufen.

§ 522. Fixiermittel für Bärlappgewächse.

1. Chromessigsäure in folgender Zusammensetzung nach *Ulbrich*:

Destilliertes Wasser	100 ccm
Eisessig	3 ccm
Chromsäure	1 g

Diese Vorschrift ist geeignet für Scheitelzellen, Wurzeln und junge Sporangien von *Lycopodium* und *Selaginella*.

2.

Destilliertes Wasser	100 ccm
Eisessig	1,5 ccm
Chromsäure	0,5 g

Diese Vorschrift ist geeignet für größere Stücke und alle Teile von Isoetes.

3. Formalinalkohol ist nach *Chamberlain* vorzüglich geeignet für alle Teile von *Lycopodium*. Die Färbbarkeit nimmt nach *Chamberlain* zu, wenn die Objekte mehrere Monate in der Fixierflüssigkeit aufbewahrt werden.

4. Formalin-Trichloressigsäure nach *Heidenhain* für Isoetes.

5. *Juel* Nr.1 für *Isoetes*

Fixiermittel 4 und für ältere Sporangien oder härtere Stengel. Sollte ein besonderer Glücksumstand dem Leser Prothallien von *Lycopodium* in die Hände spielen, so wäre als Fixiermittel vor allem Formalinalkohol nach *Chamberlain* zu versuchen.

§ 523. Schneiden und Einbetten. Die derberen Teile von *Lycopodium* können frisch oder fixiert ohne Einbettung sehr gut geschnitten oder auch in Paraffin oder Zelloidin eingebettet werden. Junge Sporangien von Lycopodium schneidet man unzerlegt in Längs- und Querschnitte. Ältere Sporangien müssen herauspräpariert oder wenigstens in kleine Stücke zerlegt werden. Das Einbetten in Zelloidin braucht sehr viel Zeit. Die Zelloidinblöcke werden mit Glycerin behandelt.

§ 524. Färben

A. Histologische Färbungen:

1. Auraviol nach *Geidies* (einfache Färbung in Rot)
2. Safranin-Anilinblau
3. Safranin- Lichtgrün
4. Safranin-*Delafields* Hämatoxylin
5. Alizarinviridin nach *Becher*,
6. Alizarinzyanin und Anthrazenblau nach *Becher*.

Schleim wird mit Anilinblau gefärbt.

B. Zytologische Färbungen:

1. Eisenhämatoxylin nach *Häggqvist* und *Heidenhain*
2. Alaun-Glycerin-Hämatein nach *Rawitz*-Säurefuchsin
3. Goldimprägnation-Lichtgrün
4. Imprägnation mit Schwefelblei und Nachfärbung von Lichtgrün

Übungsbeispiele

I. Lycopodium

§ 525.

1.Der Aufbau des Sporophyten.

Der Stamm ist teils kriechend, teils aufrecht, bei tropischen epiphytischen Arten auch hängend. Die Blättchen laufen lang am Stamm herab. Der Querschnitt des Stammes zeigt daher an der Peripherie Vorsprünge.

An Querschnitten sehen wir folgendes Bild: Die Epidermis hat eine dicke Außenwand mit gut ausgeprägter Kutikula. Die Rinde ist meistens dreischichtig. Die Stele liegt im Zentrum des Stammes. Das Gefäßbündel weist eine eigenartige Gestalt auf. Ursprünglich radial angelegt, ändert es sich sehr; es ist häufig sogar ein Unterschied zwischen den einzelnen Teilen des langen Stammes zu erkennen. Einen regelmäßigen, handförmigen Typus der Stele zeigt unser einheimisches *Lycopodium clavatum*. *L. annotium* zeigt mehrere hufeisenförmige oder V-förmige, nach außen offene Gefäßbündel. Je zwei benachbarte Stränge des Metaxylems verbinden sich. *L. selago* und *L. inundatum* zeigen auch häufig diesen Typus. Es treten aber auch sehr schwer beschreibbare, im Bild sehr schöne Anordnungen auf. Wer Gelegenheit hat, tropische Arten zu präparieren, unterlasse dies nicht.

Material von *Lycopodium* schneidet sich leicht, sowohl frisch wie eingebettet.

Fixierung: Formalinalkohol.
Färbung: Safranin-*Delafields* Hämatoxylin.

Natürlich sind auch die anderen früher angegebenen Färbungen ausführbar.

Die Blätter sind bei Lycopodium klein und schuppenförmig. Wir untersuchen Querschnitte von ihnen. Technik wie oben.

Die Sporangien sind bei *Lycopodium clavatum* ährenförmig auf eigenen Sporangienträgern, welche die Sporophylle mit einem zweiklappig aufspringenden Sporangium am Grunde ihrer Oberseite tragen. Bei *Lycopodium selago* (Tannenbärlapp) stehen abwechselnd fertile und sterile Blätter am Stengel. Ein eigener Sporangienstand fehlt.

Die einzelnen Sporophylle sind leicht mit der Pinzette abzuzupfen und *in toto* in Glyceringelatine einzubetten. Ferner fertigen wir Längs- und Querschnitte durch die ährentörmigen Sporangienträger an.

Fixierung: Formalinalkohol
Chromessigsäure mit einigen Tropfen von Osmiumsäure

Färbung: Auraviol nach *Geidies*
Alaun-Glycerin-Hämatein nach *Rawitz*
Hämalaun-Eosin nach *Mayer*
Alizarinviridin nach *Becher*.

Für zytologische Untersuchungen:

Eisenhämatoxylin nach *Häggqvist* oder *Heidenhain*, Nachfärbung mit Eosin oder Säurefuchsin.

Die Sporen. Die Bärlappgewächse sind isospor, d.h. die Sporen sind alle gleich groß. Bis zur Reife bleiben die Sporen in Tetraedern beisammen, daher besitzen sie eine kugeltetraedrische Form.

Präparation der Sporen: Aufkochen und Einschluß in Glyceringelatine.

2. Der Aufbau des Gametophyten

Die Gametophyten der Bärlappgewächse gehören zu den größten Seltenheiten in den botanischen Laboratorien. Durch die Veröffentlichungen von *Bruchmann* sind sie besonders bekannt geworden.

Die Prothallien finden sich bei den deutschen Arten ganz im Erdboden versteckt und nur bei *Lycopodium inundatum* entsenden sie grüne Thalluslappen vom oberen Ende an die Erdoberfläche. Die Prothallien tropischer parasitischer Arten sind in den Zweigen der befallenen Wirtspflanzen zu suchen. Eine Kultur der Prothallien ist völlig aussichtslos.

Bruchmann hat festgestellt, daß die Sporen erst nach 6-7 Jahren keimen und erst nach 12-15 Jahren Antheridien und Archegonien entwickeln; der Sporophyt endlich bildet sich 18-20 Jahre nach der Aussaat. Die Prothallien können daher nur durch unermüdliches systematisches Suchen im Walde gefunden werden. *Bruchmann*, der mehrere hundert Prothallien gefunden hat, schreibt, daß man nicht da nachzugraben hat, wo ausgewachsene Bärlappe stehen und anscheinend die Hauptwurzel zu suchen sei, sondern weiter ab. Die Erde muß systematisch ausgegraben und durchtastet werden. Die Prothallien sind rübenartige, kreiselförmige, z.T. gelappte Gebilde von 1-2 cm Länge.

Wer das Glück hat, ganz kleine, nur zentimetergroße Sporophyten zu finden, grabe an dieser Stelle vorsichtig nach. Vielfach sind diese jungen Formen noch mit Resten des Prothalliums verbunden; auch in nächster Nähe können sich Prothallien vorfinden. Bei der Suche nach Prothallien denke man aber an den Naturschutz und verwüste nichts!

Sämtliche Prothallien der Bärlappe enthalten endophytische Pilzfäden nach Art der Mykorrhiza. Die Archegonien sind nach *Bruchmann* ähnlich den Farnarchegonien. Die Antheridien sind eingesenkt, ähnlich den Antheridien bei *Marchantia*. Der Embryo bleibt bei seiner Entwicklung im Prothallium eingeschlossen

Fixierung und Färbung: Wie beim Stamm zu versuchen. *Chamberlain* bestätigt, daß sich die Prothallien leicht schneiden und einbetten lassen, ebenso färben.

II. Selaginella

§ 526. Die Gattung *Selaginella* (Moosfarne) umfaßt einige krautähnliche Arten. Sie ist in den Tropen reich vertreten; in Deutschland kommen nur zwei Arten vor: *Selaginella spinulosa*, hauptsächlich in den Alpen und Voralpen, ebenso *S. helvetica*.

Selaginella ist sehr selten. Trotzdem stößt die Beschaffung von Untersuchungsmaterial auf keinerlei Schwierigkeiten, da irgendeine tropische Art fast in jeder Kunstgärtnerei als immergrüne Zimmerpflanze verkauft wird und jeder botanische Garten Dutzende von exotischen Arten in den Gewächshäusern hat. Am leichtesten erhält man *Selaginella martensii*.

1. Der Aufbau des Sporophyten. Der deutsche Name Moosfarn charakterisiert *Selaginella* treffend. Die Pflanze könnte gut für ein Lebermoos gelten, wie z.B. *Plagiochilla*, ist tatsächlich aber ein Farn.

Der Stamm von *Selaginella* ist sehr dünn. Am besten verarbeiten sich tropische Formen, deren Stämme manchmal bleistiftdick sind. Die Epidermis weist weder Trichome noch Spaltöffnun-

gen auf, die Rinde ist dick und besitzt große Interzellularen, die innere Rinde wird durch einen Luftraum, die Lakune, vertreten, die von mehreren Trabeculae durchzogen wird; durch diese Trabeculae wird die Rinde mit der Stele verbunden. Die Stele kann verschiedene Formen aufweisen, sogar an ein und demselben Stamm. Die Wurzeln entspringen als Luftwurzeln an den Verzweigungsstellen der Sprosse und dringen später in den Boden ein. Aus diesen Luftwurzeln oder Wurzelträgern kommen dann die eigentlichen Wurzeln. Der Aufbau ist ähnlich dem Aufbau des Stammes, nur einfacher in der Anlage. Der Stamm trägt vier Reihen von den sich überspreizenden Blättern. Am Grunde der Blattoberseiten entspringt die Ligula, ein kleines Häutchen, das leicht Wasser aufnehmen und abscheiden kann.

Von kleinen Arten präpariert man ganze Sproßteile nach chlorophyllerhaltender Fixierung in Glyceringelatine oder Lävulosgelatine nach *Heringa* und *ten Berge*. Querschnitte fertigen wir von Sproßen mit Blättern und von Wurzeln an.

Färbung: Safranin-Lichtgrün
Hämalaun-Eosin
Delafields Hämatoxylin
Alizarinviridin-Säurefuchsin.

Sporangien. Die endständigen Sporangienstände sind entweder einfach oder verzweigt. Das einzelne Sporangium ist kugelig oder eiförmig und steht in der Achsel eines Blattes. Die *Selaginellen* sind heterospor, d.h. sie haben Makrosporen und Mikrosporen.

Die Makrosporangien enthalten nur vier Makrosporen. Die Mikrosporen sind zahlreicher und wie bei den echten *Lycopodineen* tetraedrisch, da sie meistens in Tetraden zusammenhängen. Diese Verhältnisse werden am besten unter dem Präpariermikroskop beim Zerzupfen der Objekte studiert. Die Sporangien springen quer an einer vorbereiteten Linie, der sogenannten Dehiszenzlinie, auf.

Junge Sporangien schneiden sich leicht in Paraffin. Ältere Stadien, d.h. in denen die Makrosporen bereits hart werden, gehören zu den am schlechtesten schneidbaren botanischen Objekten. Man kann die Einbettung in Gummi arabicum versuchen, auch die Zelloidineinbettung, und die Blöcke einige Zeit mit Glycerin behandeln.

Färbungen:

Zellstudien: Eisenhämatoxylin

Junge Makrosporangien: Safranin-Gentianaviolett-Orange G (Lichtgrün)

Ältere Sporangien: Safranin-Lichtgrün.

2. Der Aufbau des Gametophyten. Die Sporen, Mikrosporen und Makrosporen, keimen in der Regel bereits innerhalb des Sporangiums. Die Archegonien bilden sich jedoch erst, nachdem die Makrosporen aus den Sporangien entlassen sind. Eine Mikrospore stellt ein einziges Antheridium dar. Nach Ausbildung der Spermatozoidzellen platzt die Mikrospore auf, die Spermatozoidzellen werden frei und entlassen die Spermatozoiden. Der Embryo bleibt innerhalb der Makrosporen, denen dann schließlich wieder der Sporophyt entwächst.

Von den Makro- und Mikrosporen werden ungefärbte Totalpräparate angefertigt. Befruchtete Makrosporen können nach Einbetten in Paraffin oder Zelloidin geschnitten werden.

Färbungen: Eisenhämatoxylin-Säurefuchsin
Goldimprägnation.

Diese Untersuchungen gehören zu den schwierigen Themen.

III. Isoetes

§ 527. Die Gattung *Isoetes* (Brachsenkraut) ist in der deutschen Flora nur durch zwei Arten vertreten. Relativ häufig ist noch *Isoetes lacustris.*

Sie kommt nur in einigen Seen vor, z.B. im kleinen Krebssee beim Ostseebad Bansin (Pommern), im Garnsee bei Ratzeburg in Lauenburg, im Titisee (Schwarzwald) und im Steinsee bei Grafing in Oberbayern. Die ausdauernde Pflanze hat im Juli und im August reife Sporen. *Isoetes lacustris* wird häufig in botanischen Gärten gehalten, aus denen man sie beziehen kann.

Sehr leicht zu beschaffen ist die beliebte Aquarienpflanze *Isoetes malinvernianum*. Sie ist eine asiatische Art, die mit Reis nach Italien eingeschleppt worden ist. Von da hat sie dann den Weg in die Aquarien gefunden.

Isoetes ist besonders deswegen interessant, weil es mit sekundärem Dickenwachstum ausgestattet ist und über ein Kambium verfügt. Tracheiden kommen ebenfalls vor. Holzreaktionen gelingen jedoch an Isoetes nicht.

1. Der Aufbau des Sporophyten.

Der Stamm ist bei *Isoetes* eine gestauchte, annähernd kugelförmige Knolle, an deren oberem Teil sich eine zentrale Vertiefung mit einer Scheitelzellenfläche befindet. In dieser Vertiefung entspringen auch die jungen Blätter. Der untere Teil der Knolle weist eine ähnliche Vertiefung auf, der die Wurzeln entspringen.

Von der unteren Seite der Knolle gehen 2-3 Rinnen aus, die sogenannten Riefen, die in radialer Richtung die Knolle in 2-3 Teilknollen aufteilen. Die obere und die untere zentrale Grube sind die Vegetationsmittelpunkte von *Isoetes*, die immer neue Blätter oder Wurzeln bilden.

Die Oberfläche der Knolle wird von einem Korkgewebe gebildet. An den Zellen der Rinde sind zahlreiche Tüpfel zu sehen. Der zentrale Teil der Knolle wird von einem konzentrischen Gefäßbündel eingenommen, das ankerförmige Gestalt besitzt; die Knolle besteht zum größten Teil aus sehr stärkereichem Parenchym.

Das Gefäßbündel ist kompliziert gebaut. Das Xylem weist Tracheiden und Parenchym auf. Die Tracheiden sind kreisrund oder elliptisch und haben spiralige ringförmig verdickte Wände. Sie sind der Zahl nach gering gegen die Parenchymzellen. Im Xylem treten viele Hohlräume auf. Das Phloem ist undeutlich. Eine Endodermis fehlt völlig. Das Xylem wird von einem Kambium umschlossen, das nach außen und nach innen neues, und zwar parenchymatisches Gewebe bildet. Nach innen treten aber auch Xylem- und Phloemelemente von etwas anderer Bauart auf.

Von ganzen Knollen fertigen wir nach Zelloidineinbettung Querschnitte und Längsschnitte an, um uns über den allgemeinen Bau zu orientieren. Von einzelnen Teilen der Knolle fertigen wir Paraffinschnitte an, um die Einzelheiten zu untersuchen. Die Dicke der Schnitte kann dabei 10-15-20µ betragen.

Fixierung: Formalinalkohol

Färbung: Auraviol nach *Geidies*
Ehrlichs Hämatoxylin
Delafields Hämatoxylin
Safranin-Lichtgrün
Safranin-Anilinblau
Alizarinviridin-Säurefuchsin.

Ferner kann auch die Korkfärbung versucht werden (vergleiche § 159 III, Membranfärbungen).

Schleim wird am besten mit Anilinblau gefärbt, dem einige Tropfen Essigsäure zugesetzt sind. Die Schnitte werden in Glycerin differenziert (131). Rutheniumrot gibt eine intensive Rotfär-

bung des Schleimes. Der Schleim enthält neben Kalloseschleim auch Pektin, Zelluloseschleim und Eiweiß.

Für anatomische Studien werden die Schnitte zweckmäßig mit Eau Javelle von dem plasmatischen Inhalt befreit.

(131) Ulrich Weber, Zur Anatomie und Systematik von Isoetes, Hedwigia Band LXIII, S.219-262

2. Die Blätter. Das Blatt ist lang und pfriemförmig. An der Basis trägt es die Ligula und das Sporangium, wenn es fertil ist; fertile und sterile Blätter sind bis auf das Auftreten des Sporangiums gleichartig gebaut. Das Blatt ist am Grunde zu beiden Seiten flügelartig verbreitert. Fertile Blätter werden auch als Sporophylle bezeichnet.

Auf dem Querschnitt des Blattes sieht man außen die Epidermis mit einfachen Spaltöffnungen. Das Mesophyll besteht aus großen, Chloroplasten führenden Zellen. Lokalisiert treten Luftkanäle und Festigungsgewebe auf. Das Gefäßbündel liegt zentral.

3. Die Wurzeln sind einfach gebaut. Die Epidermis umschließt die Rinde, zentral liegt ein Hohlraum, exzentrisch die Stele, die von einer Endodermis umschlossen ist.

Untersuchungstechnik bei Blättern und Wurzel wie beim Stamm.

4. Sporophyll und Sporangium. Die randständigen Sporophylle sind wie die sterilen Blätter gebaut. Nur tragen sie am Grunde je ein Sporangium. Die Sporen (Makrosporen und Mikrosporen) werden erst durch Fäulnis der Mutterpflanze frei. Die Sporangien sind durch Querwände unvollständig gekammert. Am Grunde der Fovea tragen die Sporophylle ein dreieckiges häutiges Organ, die Ligula. Die Ligula bildet Schleim.

Untersuchungstechnik wie bei *Selaginella*.

5. Der Gametophyt. Sowohl das männliche als auch das weibliche Prothallium bleiben in der Spore eingeschlossen. Die Verhältnisse sind ähnlich wie bei *Selaginella*.

Einbetten in Paraffin.

Färben: Eisenhämatoxylin-Eosin oder Säurefuchsin
Goldimprägnation
Imprägnation mit Schwefelblei.

Kapitel XIV

Verschiedene Tabellen

§ 528. Kalendarium für das Sammeln oder Anlegen von Kulturen einiger wichtiger oder leicht erreichbarer Untersuchungsobjekte.

Tabelle I	enthält Objekte, die das ganze Jahr über erhältlich sind.
Tabelle II	enthält die an einzelne Jahreszeiten gebundenen Untersuchungsobjekte.
Tabelle III	bringt die Blütenzeiten und die Daten über Sporogonreife einiger Laubmoose.

Tabelle I

Verzeichnis der das ganze Jahr über zu sammelnden, zu kultivierenden oder käuflichen Objekte

Bakterien des Zahnschleimes, der Faulstoffe von Kot, Mist und Jauche, Milch und Käse, Essig
Thermophile Bakterien
Sporenbildende Bakterien
Anaerobe Bakterien
Fadenbakterien
Eisenbakterien

Blaualgen, besonders auch in Gewächshäusern
Zoosporen und Gametangien von Vaucheria durch Kulturen

Braunalgen: *Laminaria, Ascophyllum, Sphacelaria*
Rotalgen: *Bangia, Polysiphonia, Rhodomelia, Ceramia*

Cystokarpien der Rotalgen in Form des in Apotheken erhältlichen "Carragen"

Abwasserpilze, *Saprolegnia, Achlya*
Mucor mucedo mit Konidien, *Pilolobus* und Schimmelpilze
Hefepilze. *Oospora, Oidium porriginis*, Coremien

Psalliota campestris (Champignon) und Trüffel aus Delikatessengeschäften
Alle Flechten
Die meisten Moose in steriler Form. Brutkörper der Moose
Protonemata aus Kultur und als Sammelgut im Freien
Vegetative, sterile Formen vieler Farne
Farnprothallien aus Gewächshäusern

Tabelle II

Verzeichnis der in den einzelnen Jahreszeiten zu sammelnden Objekte

Bemerkung: Das Vegetationsjahr ist in Frühjahr, Sommer und Herbst eingeteilt worden. Zeitlich genauere Angaben können in der Regel nicht mit Verläßlichkeit geboten werden, da der Einzug des Frühlings und damit dann das Auftreten der einzelnen Pflanzen in Deutschland nicht überall zu gleicher Zeit erfolgt. Immerhin dürften diese kurzen Zusammenstellungen Anhaltspunkte geben, wann die einzelnen Objekte in den verschiedenen Lokalfloren etwa zu erwarten sein dürften.

FRÜHJAHR	SOMMER	HERBST
Actinomyceten	Schwefelbakterien	Actinomyceten auf Stoppeläckern
	Purpurbakterien	Schwefelbakterien
Ringbakteriose der Kartoffel	Bakterienknöllchen typische Bakterien	Bakterienknöllchen Involutionsformen
		Knollenbakteriose der Kartoffel
		Braunbakteriose der Rüben
		Myxobakterien
Blaualgen	Blaualgen	Blaualgen
Diatomeen Auxosporen, Kopulationen		Diatomeen Dauersporen im Winter
Flagellaten *Euglena* *Crysomonaden* *Dinoflagellaten*	Flagellaten	Flagellaten
Armleuchteralgen Keimlinge zeitig im Frühjahr	Armleuchteralgen Archegonien Antheridien	Armleuchteralgen Archegonien Antheridien
Konjugaten Kopulation bis zum August	Konjugaten	Konjugaten Zygoten
	Grünalgen *Cladophora glomerata*	Grünalgen
	Parasitische Grünalgen	parasitische Grünalgen
	Protosyphon botryoides	*Protosyphon botryoides*
	Botrydium granulatum Bildet zu Hause Schwärmsporen	*Botrydium granulatum* bildet zu Hause Schwärmsporen

FRÜHJAHR	SOMMER	HERBST
	Braunalgen *Chorda, Pilayella, Ectocarpus*	Braunalgen *Chorda, Pilayella, Ectocarpus*
	Batrachospermum Geschlechtsorgane im Spätsommer	*Batrachospermum* Cystocarpien
Meeresflorideen Keimlinge vegetative Pflanzen	Meeresflorideen Cystocarpien	Meeresflorideen Cystocarpien
---	---	---
Höhere Ascomyceten, Morchel, Lorchel	Höhere Basidiomyceten	Höhere Basidiomyceten
	Xylaria	Niedere Ascomyceten
Myxomyceten mit Sporangien	Myxomyceten mit Sporangien	Myxomyceten mit Sporangien
Kultur von Plasmodien	Kultur von Plasmodien	Kultur von Plasmodien
Olpidium brassicae		
	Synchytrium endobioticum Sommerform	*Synchytrium endobioticum* Herbstform
Pseudoperonospora humili		
	Albugo	*Albugo*
		Empusa musci
		Sporodinia
Mucorineen Zygosporen in Kulturen		
Brandpilze Kultur der Promycelien nach Überwinterung	Brandpilze Kultur der Promycelien sofort nach Sporenreife	Brandpilze Kultur der Promycelien sofort nach Sporenreife
Rostpilze Keimung der Teleutosporen nach Überwinterung	Rostpilze Uredosporen	Rostpilze Keimung der Teleutosporen sofort nach Reife
	Exobasidium vaccinii	*Exobasidium vaccinii*
Claviceps purpurea Stromata nach Überwinterung	*Claviceps purpurea* Beginn der Kultur der Stromata	
		Faulpilze des Obstes
	Taphrina	*Taphrina*

FRÜHJAHR	SOMMER	HERBST
Sclerotina trifoliorum Sclerotien an Klee		*Sclerotina trifoliorum* blaßrote Scheibenfrüchte An abgestorbenen Klee- Wurzeln
Rhytisma acerina Kultur nach Überwinterung		*Rhytisma acerina*
	Phoma	
	Polystigma rubra	
		Nectria cinnabarina Ende Herbst, Anfang Winter
	Phyllosticta	*Phyllosticta*
	Lachnea	*Lachnea*
	Gloesporium	*Gloesporium*
	Oidium auf Gartengewächsen	*Oidium* auf Gartengewächsen
	Torula	*Torula*
	Cladosporium	*Cladodporium*
	Tubercularia	*Tubercularia*
	Fusarium	*Fusarium*
Mykorhiza an Sämlingen der Waldbäume	Mykorhiza an Sämlingen der Waldbäume, an Wurzeln von Ginster und Erika	Mykorhiza an Erlenwurzeln
Ephemera mit Vorkeim und Sporogon		

Laubmoose s. Tabelle III

Torfmoose unreife Sporogone	Torfmoose reife Sporogone Juli – September	Torfmoose Antheridien Archegonien
	Torfmoose Kultur der Vorkeime Nach Sporenreife	

FRÜHJAHR	SOMMER	HERBST
Fegatella Antheridien, Archegonien		
	Sporogone der meisten Lebermoose *Fegatella* *Marchantia* *Metzgeria* *Lophocolea* *Lophoriza* *Haplozia* *Jungermanniales* Ende Frühjahr Anfang Sommer	Sporogone der meisten Lebermoose *Riccia* *Anthoceros* *Marchantia* *Pellia* mit Gametangien *Frullania* bis in den Winter
Landfarne eingerollte Blattknospen	Farne unreife und reife Sporangien bei *Ophioglossum* *Botrychium* *Osmunda* *Struthiopteris* *Dryopteris* *Scolopendrium*	Farne reife Sporangien
Farnprothallien beste Zeit der Kultur Januar – Februar		
	Antheridien und Archegonien an Prothallien der Januarkulturen	
	Farnprothallienkulturen sofort nach Sporenreife	Farnprothallienkulturen sofort nach Sporenreife
		Antheridien und Archegonien im Spätherbst
Pilularia	*Pilularia* Sporokarpien im Juli	*Pilularia*
	Marsilia	*Marsilia* Sporokarpien Aug.- Okt. Prothallien sofort nach Reife
	Azolla Sporokarpien Aug.- Sept.	*Azolla* Sporokarpien Aug.- Sept.
Salvinia Gametophyten erst nach Verfaulen der überwinterten Sporokarpien im Frühjahr	*Salvinia*	*Salvinia* Sporokarpien Aug.- Okt.

FRÜHJAHR	SOMMER	HERBST
Equisetum arvense reife Sporangien März - April	*Equisetum arvense* erste unterirdische Sporangienanlage Juli - Nov.	*Equisetum arvense* erste unterirdische Sporangienanlage Juli - Nov.
E. telmateja Sporangien April - Mai	*E. palustre* Sporangien Juni – Sept.	
E. limosum *E. hiemale* *E. silvaticum* Sporangien Mai – Juni		
Prothallien von *Equisetum*-Kulturen sofort nach Sporen-Reife *E. hiemale* streut Sporen erst im Folgejahr aus		
	Lycopodium clavatum Sporangien Juli – August	
	Lycopodium selago Sporangien Juli – Oktober	
	Selaginella martensii Sporangien	*Selaginella martensii* Sporangien
	Isoetes Sporangien Juli - Oktober	

Tabelle III

Blütezeiten einiger häufiger Laubmoose

Art	Reifezeit der Sporogone	Blütezeit	Sporangien-entwicklung In Monaten
Buxbaumia aphylla	VI	VII	11
Catharinea undulata	II - III	V - VI	9 - 10
Cinclidotus fontinaloides	VI - VIII	VII	11 - 13
Funaria hygrometrica	VII - X	X	9 - 12
Fontinalis antipyretica	VIII	VI	bis 14
Hypnum commutatum	VI	IX - X	8 - 9
Mnium punctatum	IV - VI	IV - V	11 - 14
Mnium undulatum	V	VI	11
Phascum cuspidatum	IV - V	VII - X	7 - 10
Plagiothecum denticulatum	VII	VII - VIII	11 - 12
Polytrichum commune	VII - VIII	V - VI	13 - 15
Polytrichum juniperinum	VI - VII	IV - V	13 - 15
Physcomytrum pyriforme	VI	VIII	10
Pottia truncatula	I - II	VI - VII	6 - 8
Pylaisia polyantha	II - III	VIII – IX	15 - 19
Splachnum ampulacium	V - VI	VII	10 - 11
Tetraphis pellucida	V - VI	V	12 - 13
Thuidum recognitum	IX - X	VII – VIII	13 - 15

Diese Angaben sind entnommen aus: *Kryptogamenflora für Anfänger V*, Dr.W.Lorch, Die Laubmoose.

§ 529

Indikatoren zur Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration

Name des Farbstoffes	sauer	alkalisch	pH
ortho-Kresolrot	rot	gelb	0,2 - 1,8
Thymolblau	rot	gelb	1,2 - 2,8
Metanilgelb	rot	gelb	1,2 - 2,3
Tropäolin 00	rot	gelb	1,3 - 3,2
beta-Dinitrophenol	farblos	gelb	2,2 - 4,0
alpha-Dinitrophenol	farblos	gelb	2,8 - 4,4
Methylorange	rotorange	gelb	3,0 - 4,4
Bromphenolblau	gelb	blau	3,0 - 4,6
Naphthylrot	rot	gelb	3,7 - 7,5
Bromkresolgrün	gelb	blau	3,8 - 5,4
gamma-Dinitrophenol	farblos	gelb	4,0 - 5,4
Methylrot	rot	gelb	4,4 - 6,2
Lacmoid	rot	blau	4,4 - 6,4
Chlorphenolrot	gelb	rot	4,8 - 6,4
Alizarin-Natrium	gelb	rot	5,0 - 6,8
para-Nitrophenol	farblos	gelb	5,0 - 7,0
Bromkresolpurpur	gelb	purpur	5,2 - 6,8
Pinachrom	farblos	rot	5,8 - 7,8
Bromthymolblau	gelb	blau	6,0 - 7,6
Rosolsäure	gelb	rot	6,0 - 7,6
Neutralrot	rot	gelb	6,8 - 8,0
Phenolrot	gelb	rot	6,8 - 8,2
meta-Nitrophenol	farblos	gelb	6,8 - 8,4
Kresolrot	gelb	purpurrot	7,0 - 8,8
Brillantgelb	gelb	rotbraun	7,4 - 8,6
Thymolblau	gelb	blau	8,0 - 9,5
Phenolphthalein	farblos	rotviolett	8,0 - 9,8
Thymolphthalein	farblos	rot	9,3 - 10,0
alpha-Naphtolbenzein	braun	grünblau	9,8 - 11,6
Alizaringelb R	gelb	lila	10,0 - 12,0
Nitramin	farblos	orange	10,8 - 12,8
Poirriers Blau	blau	violettrosa	11,0 - 13,0
Trinitrobenzol	farblos	orange	12,0 - 14,0

[Für Wasseruntersuchungen sehr zu empfehlen sind tragbare batteriebetriebene pH-Meter, die bei Lehrmittelhandlungen schon für ca. DM 80 einschließlich Meßelektrode zu bekommen sind. Diese Geräte sind recht genau, wenn man sie regelmäßig mit zwei Pufferlösungen nacheicht - gewöhnlich verwendet man Puffer von pH 7 (Nullpunktjustierung) und pH 4 (Steilheitsjustierung). Man überdeckt dann den gesamten interessierenden pH-Bereich von pH 9 bis pH 3. Die Glaselektrode muß allerdings sorgfältig gelagert werden; am besten hält man sie ständig eingetaucht in eine 3m KCl-Lösung. Mit einer Platin-Kalomel-Meßelektrode ausgerüstet kann man zusätzlich auch Redoxpotentiale messen].

§ 530

Verzeichnis der Brechungsexponenten einiger Einschluß- und Beobachtungsmittel

I. Brechungsexponenten einiger interessanter Stoffe

zum Vergleich mit den Beobachtungs- und Einschlußmitteln

Luft	1,000		
Diatomeen	1,43		
Kalkspat	1,4868		außerordentlicher Strahl
Kronglas	1,5153	-	1,6125
Zellulose	1,5		
Flintglas	1,6085	-	1,7575
Kalkspat	1,6580		
Diamant	2,4		

II. Brechungsexponenten der Beobachtungs- und Einschlußmittel für allgemeine Zwecke

Aqua dest.	1,3332		
Meerwasser	1,343		
Rohzucker			
5 %	1,341		
10 %	1,347		
30 %	1,376		
Alkohol abs.	1,3646		
Kaliumacetat, ges.	1,370		
Glycerin – Wasser 1:1	1,397		
Kalziumchlorid, 90 %	1,401		
Hausenblasengallerte nach *Behrens*	1,405	-	1,410
Glyceringelatine nach *Kaiser*	1,420	-	1,410
Glycerin pur.	1,456	-	1,473
Methylbenzoat	1,481		
Terpineol	1,481	-	1,484
Rizinusöl	1,482		
Paraffinum liquidum	1,482		
Lävulosesyrup	1,500		
Terpentin	1,504		
Zedernöl verdickt	1,510	-	1,520
Gummisyrup n. *Apathy*	1,524		
Hoyer I und II	1,524		
Canadabalsam	1,524	-	1,547
Durobalsam	1,535		
Euparal	1,535		
Glycerin, mit Chloralhydrat gesättigt	1,540		
Glycerin, mit Cadmium-chlorid gesättigt	1,540		

Dammarharz	1,540		
Phenolum liquefactum	1,530	-	1,550
Terpentin n. *Voßler*	1,53		
Safrol	1,540		
Caedax	1,55		

III. Brechungsexponenten von Beobachtungs- und Einschlußmitteln für Diatomeen

Tolufix I	1,5437		
Medium H I	1,5603		
Styresin	1,58	-	1,63
Anilin	1,588		
Tolufix II	1,5900		
Medium H II	1,5986		
Schwefelkohlenstoff	1,6291		
Diatopan	1,6238		
Kolbemittel	1,65		
Monobromnaphthalin	1,658	-	1,661
Tetrabromethan	1,6353		
Alcarin *(Grübler)*	1,677		
Methoxinaphthalin	1,6940		
Dijodethan	1,7425		
Gelbes Medium	1,8	-	2,0
1,2-Dijodethan	1,871		
Hyrax	2,2	-	2,4

[Voraussetzung für einen sehr hohen Brechungsindex ist eine hohe Anzahl leicht beweglicher π-Elektronenpaare pro Volumen. Diese Voraussetzung erfüllen nur wenige Substanzgruppen: Polymere mit zahlreichen Doppelbindungen (Styrax), Polybrom- und Polyjodalkane (Tetrabromethan, Dijodmethan), Arsenbromid (gelbes Medium) und Triphenylarsin, konzentrierte Lösungen von Schwermetallsalzen oder Schwermetallkomplexen (K2[HgJ4]). Es ist somit kein Zufall, daß außer Styrax hochbrechende Substanzen alle recht giftig sind. Wegen der geringen Polarität der Moleküle sind die Substanzen, abgesehen von Styrax und den Schwermetallsalzlösungen, auch noch flüchtig (Giftwirkung durch Einatmen!).

Von den Beobachtungsflüssigkeiten kann nur Methoxinaphthalin empfohlen werden, Bromnaphthalin verwendet man wegen seines penetranten und lang anhaftenden Geruches in Wohnräumen besser nicht. Alle Brom- und Jodalkane sind ziemlich giftig und zugleich flüchtig, wobei die Langzeitwirkung besonders bedenklich ist.

Ein Übelstand aller hochbrechenden Flüssigkeiten ist ihre hohe Dichte - Diatomeen schwimmen auf und liegen dann unmittelbar unter dem Deckglas - in Verbindung mit ihrer hohen Beweglichkeit (Verwacklungsgefahr bei Mikrophotographien). Es empfiehlt sich daher, transparente Kunststoffe (Plexiglas, Acrylglas, Polystyrol) in den betreffenden Flüssigkeiten zu lösen, so daß man syrupdicke Medien erhält, mit denen man wesentlich besser arbeiten kann; die Abnahme des Brechungsexponenten ist hierbei in Kauf zu nehmen. Als Dauereinschlußmittel eignen sich derartige Lösungen allerdings nicht, da die hochbrechende Komponente mit der Zeit verdunstet und dann nur noch der niedrigbrechende Kunststoff zurückbleibt.]

§ 530 a

Messung der Brechungsindizes mit einfachen Mitteln

[Die üblichen Geräte zur Messung von Brechungsindizes sind für den Amateur unerschwinglich teuer. Eine hinreichend genaue Einrichtung kann man sich jedoch mit ganz einfachen Mitteln selber zusammenbasteln:

Eine Holzplatte von ca. 25 x 25 cm wird mit Millimeterpapier beklebt. Auf diese Platte montiert man eine senkrechte Leiste von ca. 30 cm Höhe, in die man einen Hohlschliff-Objektträger waagerecht einspannt. In den Hohlschliff gibt man die zu untersuchende Flüssigkeit und bedeckt mit einem Deckglas.

Man blickt jetzt entlang der Grenze des Hohlschliffes auf das Millimeterpapier, dessen Teilung man zweckmäßigerweise mit Ausziehtusche deutlich markiert hat, und notiert sich den Meßwert, den man, durch den Rand der Flüssigkeit blickend, gerade noch ablesen kann; eine Eichkurve ergibt dann den Brechungsindex.

Die Eichkurve erstellt man sich mit Flüssigkeiten bekannter Brechungsindizes; gewöhnlich ist diese Eichkurve, die natürlich nur für den speziellen Objektträger gilt, eine Gerade.

Das geschilderte Verfahren ist für die Zwecke des Mikroskopikers hinlänglich genau; es gibt rasch Auskunft über die Brauchbarkeit eines Mediums, insbesondere für die Untersuchung von Diatomeen].

§ 531

Ergänzungen

I. Bezugsquellen für Chemikalien

Preisgünstige Chemikalien ausreichender Qualität bezieht man über die Firma CHROMA:

Chroma GmbH & Co KG
Havixbecker Str. 62
48161 MÜNSTER

Tel (49) (0) 180-2-247622

Fax (49) (0) 180-1-247662

www.chroma.de email: info@chroma.de

Gängige Chemikalien und Farbstoffe erhält man auch über Lehrmittelhandlungen, desgleichen die in der Mikrotechnik üblichen Glasgeräte. Apotheken sind ungeeignet und viel zu teuer. Als weitere Bezugsquelle kommt die Firma MERCK in Frage - Katalog anfordern und über die jeweilige Generalvertretung bestellen.

II. Qualität der Chemikalien

Die Firma CHROMA liefert automatisch die für die Mikrotechnik sinnvollen Qualitäten; MERCK bietet, abgesehen von ultrareinen Chemikalien für spezielle Zwecke, die folgenden Qualitäten an:

crudum	roh	stark verunreinigtes Rohprodukt (nicht im Angebot)
tech.	technisch	unrein, für technische Anwendungen geeignet
pro synth.	für Synthesen	etwa 99 %ig; Verunreinigungen sind für die üblichen Anwendungen unerheblich
purum	rein	etwa 99 %ig
puriss.	reinst	hochrein, für Analysen geeignet
p.a.	pro analysi	wie puriss, aber mit Garantie, daß explizit angegebene Grenzwerte eingehalten werden.
DAB	Deutsches Arzneibuch	Entspricht den Anforderungen des DAB

Für mikrotechnische Zwecke ausreichend sind die Qualitäten *tech*, *pro synth* und *purum*; leider ist man oft gezwungen, teure *p.a.*-Ware zu kaufen, da man sonst zu große Gebinde bestellen muß.

III. Alkohol (Ethylalkohol, Ethanol)

Teilvergällter Alkohol. Am besten verwendet man in der Mikrotechnik „teilvergällten Alkohol“ (wasserfreier Ethanol, mit Leichtbenzin vergällt). Leider wird dieser preisgünstige Alkohol von der Branntweinmonopolanstalt nicht an Privatpersonen abgegeben.

Absoluter Alkohol. Ebenfalls gut geeignet; wegen des hohen Steueranteiles aber unerschwinglich teuer.

Brennspiritus (96%ig). *Schömmer* warnt vor der Verwendung wegen des Gehaltes an störenden Pyridinbasen. Heute ist Brennspiritus gewöhnlich mit Methylethylketon vergällt, ein Vergällungsmittel, das nicht störend wirkt. Der Amateur wird gewöhnlich gezwungen sein, mit Brennspiritus zu arbeiten.

Für das Entwässern von Objekten ist dies kein Nachteil, man ersetzt lediglich die letzte Alkoholstufe (absoluter Alkohol) durch Isopropanol, der einmal gewechselt wird; dann überführt man über Xylol, Terpineol oder Methylbenzoat in warmes Paraffin, das man ebenfalls einmal wechselt.

Auch für Fixier- und Aufbewahrungsflüssigkeiten für *botanisches* Material kann Brennspiritus verwendet werden, insbesondere dann, wenn es sich um saure Lösungen handelt.

Für färberische Zwecke ist zumindest Vorsicht geboten; auf keinen Fall darf man Brennspiritus durch Methylalkohol oder Isopropanol ersetzen! Gewöhnlich werden aber Färbungen auch mit Farbstoffen gelingen, die in Brennspiritus gelöst wurden.

Zur Sicherheit kann man Brennspiritus mit destilliertem Wasser verdünnen (etwa 1 zu 5) und dann den pH-Wert messen; die Mischung darf nicht alkalisch reagieren!

IV. Glycerin

Aus den *Schömmerschen* Rezepturen geht nicht eindeutig hervor, welche Art Glycerin verwendet werden soll. In der Regel dürfte es genügen, DAB-Glycerin zu verwenden; das völlig wasserfreie Glycerin ist wesentlich teurer, es wird gewöhnlich nur für bestimmte chemische Synthesen verwendet.

V. Salze

Viele Salze kristallisieren sowohl ohne als auch mit Kristallwasser, wobei der Kristallwassergehalt durchaus schwanken kann. *Schömmer* macht hier oft keine eindeutigen Aussagen; da aber in der von *Schömmer* angewendeten pharmazeutischen Nomenklatur das kristallwasserfreie Salz mit dem Adjektiv „siccum“ bezeichnet wird, dürfte i.d.R. das handelsübliche bzw. im DAB beschriebene kristallwasserhaltige Salz gemeint sein.

VI. Umgang mit Chemikalien

Die heute übliche Hysterie beim Umgang mit Chemikalien ist gänzlich unangebracht. Als Amateur betrachte man alle Chemikalien als Gifte und verhalte sich entsprechend: Beim Arbeiten mit Chemikalien nicht essen und rauchen; Zimmer gut lüften; nach dem Arbeiten die Hände gründlich waschen. Diese Vorkehrungen genügen vollkommen. Auf besonders gefährliche Chemikalien (Benzol, Chlorate und Chlordioxid, Cyanide,

Dioxan, Flußsäure und Fluoride, Osmiumsäure, Quecksilbersalze) wird im Text gesondert hingewiesen.

VII. Entsorgen gebrauchter Chemikalien

Wasserlösliche oder mit Wasser mischbare Chemikalien werden stark verdünnt und über die Toilette entsorgt. Dieses Verfahren belastet die Umwelt mit Sicherheit nicht mehr als die heute handelsüblichen WC- und Abflußreiniger! Vor dem Mischen gebrauchter Lösungen zwecks späterer Entsorgung kann nur nachdrücklich gewarnt werden! Beispielsweise reagiert das ungiftige Kaliumpermanganat mit dem ebenfalls ungiftigen Kaliumrhodanid zu Blausäure, die zudem noch flüchtig ist!

Quecksilberhaltige Lösungen werden gesammelt und später geordnet entsorgt, da Quecksilber, gleich in welcher Form, schon in kleinsten Mengen bei Bleirohren Lochfraß verursacht.

Mit Wasser nicht mischbare Lösungsmittel (Benzol, Toluol, Xylol, Terpineol, Methylbenzoat) werden gemischt und ordnungsgemäß entsorgt; von der Mischung geht keine Gefahr aus.

Ether, insbesondere gebrauchter Ether, bildet mit der Zeit extrem gefährliche Peroxide. Kleine Mengen schüttet man im Freien aus und läßt verdunsten, wobei man darauf achtet, daß die schweren Dämpfe nicht in Kellerkasematten gelangen können; größere Mengen werden getrennt gesammelt und nach wenigen Tagen (!) geordnet entsorgt. Gebrauchten Ether niemals längere Zeit aufheben!

VIII. Wägen von Chemikalien

Wohl kaum ein Amateur verfügt über eine Analysenwaage, aber ein solches Gerät ist auch gar nicht erforderlich. Man erhält für wenig Geld einfache kleine Balkenwaagen mit Gewichtssatz in Lehrmittelhandlungen, deren Empfindlichkeit (ca. 50 mg) völlig ausreicht. Sollen mg-Mengen abgewogen werden (Nährlösungen), setzt man 1 %ige Lösungen an (1 g auf 100 ml) und pipettiert mit einer Meßpipette ab - 1 ml Lösung enthält 10 mg Substanz. Dieses Verfahren ist hinlänglich genau.

IX. Bezeichnungen der Chemikalien

Schömmer verwendet gewöhnlich die in der Pharmazie üblichen lateinischen Bezeichnungen der Chemikalien. Um dem Leser das Arbeiten mit dem vorliegenden Buch zu erleichtern, aber auch, um Verwechslungen vorzubeugen, wurden im laufenden Text die von *Schömmer* verwendeten Bezeichnungen durch die heute gebräuchlichen ersetzt. Nicht ersetzt wurden eingebürgerte Trivialnamen (z.B. Alaun, Sublimat) und Bezeichnungen, die eine bestimmte Rezeptur der Chemikalie angeben (z.B. Phenolum liquefactum).

Die unter XI angeführte Tabelle der im Text erwähnten Chemikalien ist die *Schömmersche* Originaltabelle mit ihrer heute obsoleten lateinischen Nomenklatur; diese Tabelle ist trotzdem aus zwei Gründen wertvoll: Einmal kann man in Zweifelsfällen feststellen, welche Chemikalienqualität oder -rezeptur *Schömmer* wirklich meinte, zum anderen erleichtert diese Tabelle das Lesen zeitgenössischer

Originalliteratur, denn zu *Schömmers* Zeiten waren gerade bei Mikroskopikern die alten Bezeichnungen durchaus noch in Gebrauch.

Ergänzend sind den Chemikalien Referenznummern vorangestellt, ferner wird, wo immer möglich, die heute gebräuchliche rationelle Bezeichnung, unterstrichen, beigefügt.

X. Säuren und Salze, nach rationellen Bezeichnungen geordnet

Diese Tabelle soll den Umgang mit Tabelle XI erleichtern.

Man findet unter dem heute gebräuchlichen Namen eine Referenznummer, die auf Tabelle XI verweist; Chemikalien, die in Tabelle X nicht enthalten sind, suche man direkt in Tabelle XI.

Alaun	A 49	Calciumsulfat	C 7
Aluminiumchlorid	A 54	Chloroform	C 23
Aluminiumsulfat	A 55	Chromalaun	A 51
Ameisensäure	A 14	Chrom-VI-oxid	A 12
Ammoniak	A 59	Chromtrioxid	A 12
Ammoniumalaun	A 50	Cobaltchlorid	C 31
Ammoniumaluminiumsulfat	A 50		
Ammoniumeisenalaun	F 2	**Diethylether**	A 37
Ammoniumeisensulfat	F 2		
Ammoniumeisencitrat	F 1	**Eisen-III-chlorid**	F 4
		Eisen-III-citrat	F 3
Ammoniumcarbaminat	A 60	Eisen-II-sulfat	F 5
Ammoniumcarbonat	A 60	Eisen-III-sulfat	F 6
Ammoniumchlorid	A 61		
Ammoniummolybdat	A 62	Essigsäure	A 4
Ammoniumnitrat	A 63	Ether	A 37
Arsen-III-bromid	A 73	Ethanol	A 44
Arsen-III-oxid	A 7	Ethylalkohol	A 44
Arsentribromid	A 73		
Arsentrisulfid	R 1	**Fluorwasserstoffsäure**	A 18
Bariumchlorid	B 1	**Gallussäure**	A 17
Benzoesäure	A 8	Gerbsäure	A 34
Benzoesäuremethylester	M 11	Gold-III-chlorid	A 78
Berylliumchlorid	B 6	Goldchlorwasserstoffsäure	A 78
Bleiacetat	P 16		
Bleiformiat	P 17	**Isobutanol**	A 48
Bleinitrat	P 18	Isopropanol	I 2
Blei-II,IV-oxid	M 9		
Borsäure	A 9	**Kaliumacetat**	K 3
Butanol	B 13, B 14	Kaliumalaun	A 49
		Kaliumaluminiumsulfat	A 49
Cadmiumchlorid	C 1	Kaliumcarbonat	K 6
Calciumchlorid	B 4	Kaliumchlorat	K 8
Calciumhypochlorit	C 3	Kaliumchromsulfat	A 51
Calciumnitrat	C 5	Kaliumdichromat	K 4
Calciumphosphat	C 6	Kaliumcyanid	K 9

Kaliumdihydrogenphosphat K 5
Kaliumhexacyanoferrat-III K 10
Kaliumhexacyanoferrat-II K 11
Kaliumhydrogentartrat K 7
Kaliumhydroxid K 12
Kaliumjodid K 13
Kaliummonohydrogen-
phosphat K 15
Kaliumpermanganat K14
Kupferacetat C 36
Kupfer-II-chlorid C 37
Kupfersulfat C 38

Lithiumcarbonat L 7

Magnesiumchlorid M 3
Magnesiumdihydrogen-
phosphat M 2
Magnesiumoxid M4
Magnesiumsulfat M 5
Mennige M 9
Methanol M 10
Methylbenzoat M 11
Milchsäure A 19
Molybdän-V-oxid A 20
Molybdänsäure A 20

Natriumacetat N 1
Natriumalaun A 53
Natriumaluminiumsulfat A 53
Natriumcarbonat N 6
Natriumchlorid N 7
Natriumdithionit H 8
Natriumfluorid N 8
Natriumhexachloro-
stannat-IV S 27
Natriumhydrogencarbonat N 4
Natriumhydrogensulfit N 5
Natriumhydroxid N 9
Natriumjodat N 10
Natriummonohydrogen-
phosphat N 12
Natriumnitrit N 11
Natriumperoxid N 13
Natriumsulfat N 15
Natriumsulfid N 14
Natriumsulfit N 16
Natriumtetraborat N 3
Natriumtetrachloroaurat-III A 78
Natriumthiosulfat N 18
Nickelsulfat N 20

Osmium-VIII-oxid A 24
Osmiumtetroxid A 24
Oxalsäure A 29

Phenol A 10
Phosphormolybdänsäure A 25
Phosphorwolframsäure A 26
Pikrinsäure A 27
Propanol-2 I 2
Pyrogallol A 28

Quecksilber-I-chlorid H 5
Quecksilber-II-chlorid H 3
Quecksilber-II-jodid H 4

Ruthenium-III-chlorid R 5

Salicylsäure A 30
Salicylsäurephenylester S 6
Salmiaksalz A 61
Salpetersäure A 21
Salzsäure A 15
Schwefelkohlenstoff C 12
Schwefelsäure A 32
Silberjodid A 70
Silbernitrat A 71
Silberoxid A 72
Stearinsäure A 31
Soda N 6
Sublimat H 3

Tannin A 34
Trichloressigsäure A 36
Trichlormethan C 23

Wasserstoffperoxid H 7
Weinsäure A 35

Zinkchlorid Z 3
Zinkjodid Z 4
Zinn-II-chlorid S 28
Zinn-IV-chlorid S 27
Zitronensäure A 1

XI. Verzeichnis der im Text erwähnten Chemikalien, Reagenzien und sonstigen Hilfsmittel

nebst kurzen Angaben über Handelsformen, Löslichkeit, Mischbarkeit,

Schmelz- und Siedetemperaturen

(Was man unter C vermißt, suche man unter Z und K).

A

1. **Aceton**, (Essiggeist). Farblose Flüssigkeit, mischbar mit Wasser, Alkohol, Ether, Chloroform und fetten Ölen. D = 0,797, Siedepunkt 57 ^{O}C. Löst Harze, Fette, Kautschuk, Schießbaumwolle, Zelloidin.
2. **Acetum pyrolignosum crudum** (roher Holzessig). Gehalt 8,4% Essigsäure. Braune Flüssigkeit, nach Essigsäure und Teer riechend.
3. **Acetum pyrolignosum rectificatum.** Gehalt 5,4% Essigsäure. Gereinigter Holzessig. Gelbliche Flüssigkeit, nach Teer und Essig riechend.
4. **Acidum aceticum glaciale**, (Eisessig, konzentrierte Essigsäure). Enthält 96% - 100% reine Essigsäure. Klare, wasserhelle Flüssigkeit von stechendem Geruch. Bei +10 ^{O}C. erstarrt sie zu einer eisähnlichen Masse. D = 1,058, Siedepunkt 118^{O}C. Eisessig löst viele organische Verbindungen, ferner Schwefel und Phosphor.
5. **Acidum aceticum purum** enthält 80 oder 50% Essigsäure.
6. **Acidum aceticum dilutum** enthält 30% Essigsäure. D = 1,037. Speiseessig enthält 3% Essigsäure.
7. **Acidum arsenicosum**, As2O3 (arsenige Säure, Aresenik, Arsen-III-oxid). Weißes Pulver mit 99% Gehalt an arseniger Säure. Ein Teil löst sich in 55 Teilen Wasser von 20 ^{O}C.
8. **Acidum benzoicum**, (Benzoesäure, Phenylameisensäure). Weiße Kristalle, leicht löslich in Alkohol, Ether und kochendem Wasser. Schwer löslich in kaltem Wasser. Schmelzpunkt 120 ^{O}C.
9. **Acidum boricum**, H3BO3 (Borsäure). Farblose glänzende Kristalle oder weißes Pulver. Borsäure löst sich in 22 Teilen Wasser von 20 ^{O}C, in 3 Teilen kochendem Wasser, in 25 Teilen Alkohol und in 5 Teilen Glycerin.
10. **Acidum carbolicum**, Acidum phenylicum (Phenol, Karbolsäure, Hydroxibenzol). Farblose Kristalle, die sich an der Luft rosa färben. Löslich in 15 Teilen Wasser. Leicht löslich in Alkohol, Ether, Glycerin, fetten Ölen und in Natronlauge. Sehr ätzend! [Giftig].
11. **Acidum carbolicum liquefactum**, Phenolum liquefactum (verflüssigte Karbolsäure). Enthält 10 Teile Phenol und 1 Teil Wasser. Klare, farblose bis schwach rötliche Flüssigkeit. D = 1,063-1,066. Sehr ätzend!
12. **Acidum chromicum**, CrO3 (Chromsäure, Chrom-VI-oxid). Dunkelrote, hygroskopische Kristalle, sehr leicht löslich in Wasser. Ätzend! [Giftig].
13. **Acidum citricum**, (Zitronensäure). Farblose Kristalle, löslich in 0,6 Teilen Wasser, in 1,5 Teilen Alkohol und in 50 Teilen Ether.
14. **Acidum formicum**, (Ameisensäure). Gehalt 25% wasserfreie Ameisensäure. D = 1,057-1,060. Klare farblose Flüssigkeit, mischt sich in jedem Verhältnis mit Wasser und Alkohol. Ätzend! [Bei Bestellung und Anwendung auf Konzentration achten!]
15. **Acidum hydrochloricum**, HCl (Salzsäure, Chlorwasserstoffsäure). Gehalt ca. 25% Chlorwasserstoff. Klare, stechend riechende, farblose Flüssigkeit. D = 1,122 - 1,123. [Bei Bestellung und Anwendung auf Konzentration achten!]
16. **Acidum hydrochloricum dilutum** (verdünnte Salzsäure). Gehalt 12,5% Chlorwasserstoff. D = 1.059 - 1,061. Zur Herstellung verdünnt man Acidum hydrochloricum mit dem gleichen Volumen Wasser.
17. **Acidum gallicum**, (Gallussäure). Farblose bis leicht gelbliche Kristallnadeln oder Pulver. Ein Teil löst sich in 85 Teilen Wasser von 20 ^{O}C, in 6 Teilen Alkohol und in 12 Teilen Glycerin. Löst sich schwer in Ether.

18. **Acidum hydrofluoricum**, HF (Flußsäure, Fluorwasserstoffsäure). Sehr ätzende Flüssigkeit. Vorsicht vor den Dämpfen! Kann nur in Gefäßen aus Blei, Platin, Gummi oder Paraffin aufbewahrt werden. Enthält 35-40% HF. Bei einem Gehalt von 35% HF D = 1,15. [Wegen der großen Giftigkeit und möglicher Langzeitschäden nur in einem entsprechend eingerichteten Labor anwenden! Verätzungen sind zunächst symptomlos, heilen aber außerordentlich schwer!]
19. **Acidum lacticum**, (Milchsäure). Farblose, sirupartige Flüssigkeit, hygroskopisch, ätzend! Mischt sich mit Wasser, Alkohol, Ether und Phenol. Milchsäure ist brennbar. Es gibt folgende Handelsformen: Acidum lacticum purissimum D =1,21, enthält 75% reine Milchsäure. Acidum lacticum technicum D = 1,16, enthält 60% der reinen Säure. [Bei Bestellung und Anwendung auf Konzentration achten!]
20. **Acidum molybdaenicum**, H2MoO4 oder auch Mo2O5+xH2O (Molybdänsäure, Molybdän-V-oxid). Weißes bis schwach gelbliches Pulver. Unlöslich in Wasser, löslich in Säuren und Alkalien.
21. **Acidum nitricum**, HNO3 (Salpetersäure). Gehalt 25% reine HNO3. Klare farblose Flüssigkeit. D = 1,145 - 1,148. [Bei Bestellung und Anwendung auf Konzentration achten! Heute ist „konzentrierte Salpetersäure“ stets ca. 65 %ig, während „rauchende Salpetersäure“ etwa 100 %ig ist. Man darf niemals „konzentrierte“ durch „rauchende Salpetersäure“ ersetzen - Explosionsgefahr! Außerdem sei vor dem beim Arbeiten mit Salpetersäure entstehenden braunen Gas (NO2) gewarnt. Dieses Gas riecht erfrischend nach Chlor, ohne unangenehm im Halse zu kratzen, es verursacht auch keine Warnsymptome, kann jedoch nach einigen Stunden zur Zerstörung des Hämoglobins führen (Methämoglobinbildung, Tod durch Cyanose)].
22. **Acidum nitricum crudum,** enthält 61- 65% Salpetersäure. D = 1,372- 1,392.
23. **Acidum nitricum fumans** enthält 86% Salpetersäure. D = 1,476, konzentrierte Salpetersäure, in der Stickstoffoxide enthalten sind. Klare, gelbrote Flüssigkeit, die giftige braune Dämpfe entwickelt.
24. **Acidum osmium**, OsO4 (Osmiumsäure, Osmiumtetroxid, Osmium-VIII-oxid). Gelbliche, hygroskopische, lichtempfindliche Stücke, Geruch chlorähnlich, gesundheitsschädlich, löslich in Wasser, Alkohol und Ether. [Die Dämpfe können zu Hornhauttrübungen und zur Erblindung führen! Abzug! Nur in Absaugschränken lagern!].
25. **Acidum phospho-molybdaenicum**, (Phosphormolybdänsäure). Gelbe Kristalle oder gelbes Pulver. Leicht löslich in Wasser, löslich in Alkohol und Ether. Greift in wässriger Lösung Metallinstrumente stark an.
26. **Acidum phospho-wolframicum** (Phosphorwolframsäure). Weiße bis gelblichgrüne Kristalle. Leicht löslich in Wasser. Greift in wässrigen Lösungen Metallinstrumente stark an.
27. **Acidum picrinicum**, (Acidum picronitricum, Trinitrophenol, Pikrinsäure). Gelbe Blättchen oder Kristalle. Trocken explosibel! Nicht verreiben! Löst sich in 100 Teilen Wasser, in 15 Teilen Alkohol, in 75 Teilen Ether, in 50 Teilen Chloroform und in 20 Teilen Benzol. Schmelzunkt 122 ^{O}C. [Wird in Form angefeuchteter Kristalle gehandelt. Bei Lagerung ggf. etwas Wasser nachfüllen].
28. **Acidum pyrogallicum**, (Pyrogallussäure, Pyrogallol). Weiße Kristalle. Löslich bei 15 ^{O}C in 1,7 Teilen Wasser, in 1 Teil Alkohol und in 1,2 Teilen Ether, schwer löslich in Chloroform. D = 1,106 - 1,111.
29. **Acidum oxalicum**, (Oxalsäure, Kleesäure). Farblose Kristalle, löslich in Wasser und in Alkohol.
30. **Acidum salicylicum**, (Salicylsäure). Weiße Kristallnadeln. Löslich in 500 Teilen Wasser, leichtlöslich in Alkohol und in Ether. Schmelzpunkt 157 ^{O}C.
31. **Acidum stearinicum** (Stearinsäure). Weißes Kristallpulver. Unlöslich in Wasser, löslich in Benzol, Chloroform, Alkohol und Ether. Schmelzpunkt 65 ^{O}C.
32. **Acidum sulfuricum**, H2SO4 (Schwefelsäure). Farblose Flüssigkeit. Es sind folgende Handelsmarken erhältlich: Acidum sulfuricum puriss. D = 1,83 - 1,84, diese Säure ist ca. 96 %ig. Acidum sulfuricum crudum, D = 1,829, 94 %ig und Acidum sulfuricum dilutum, verdünnte Schwefelsäure, D = 1,106 - 1,111, Gehalt 15-16%. Die verdünnte Schwefelsäure

wird aus Acidum sulf. puriss. hergestellt, indem man unter Umrühren 1 Teil Schwefelsäure in 5 Teilen Wasser gießt.

33. **Acidum sulfurosum solutum**, H2SO3 (schweflige Säure). Wasser mit ca. 6 % SO2 gelöst.
34. **Acidum tannicum** (Gerbsäure, Tannin). Weißes bis weißgelbliches Pulver. Löst sich in 1 Teil Wasser und in 2 Teilen Alkohol. Ferner leicht löslich in Glycerin. Unlöslich in Ether.
35. **Acidum tartaricum**, (Weinsäure). Farblose Kristalle oder weißes kristallinisches Pulver. Löst sich in 1 Teil Wasser und in 4 Teilen Alkohol.
36. **Acidum trichloraceticum**, (Trichloressigsäure). Zerfließliche, farblose Kristalle. Sehr ätzend! Löslich in Wasser, Weingeist und Ether. Schmelzpunkt 55 ^{O}C.
37. **Äther**, (Diethylether, Schwefelether). Farblose Flüssigkeit, mischbar mit Alkohol und mit Ölen. Siedepunkt 35 ^{O}C. D = 0,725 - 0,728. Ether wird wasserfrei gehalten mit metallischem Natrium. [Alter Ether kann Peroxide enthalten, die beim Verdunsten des Ethers zu extrem gefährlichen Explosionen führen können!]
38. **Äthylenglykolmonomethylether** (Ethylenglykolmonomethylether, Glykolmonomethylether). Klare, farblose, leicht bewegliche Flüssigkeit von ähnlichen Eigenschaften wie das Dioxan.
39. **Ätzkali** siehe Kalium hydricum
40. **Ätznatron** siehe Natrium hydricum
41. **Agar-Agar**, Thallus von *Gelidium corneum Lamour* und anderen Rotalgen aus ostindischen Gewässern. Enthält bis 60 % Gelose. Löst sich in kochendem Wasser zu einer gelblichen Gallerte. Handelsformen: Federkiel-Agar weiß *Merck*. Fäden und Pulver.
42. **Albumen ex ovis** (Albumin aus Eiern). Gelbliche Blättchen. In 8 Teilen Wasser leicht löslich.
43. **Alcarin**. Diatomeeneinschlußmittel nicht bekanntgegebener Zusammensetzung.
44. **Alcoholus absolutus** (absoluter Alkohol, Ethylalkohol). D = 0,796-0,800, Siedepunkt 78,5 ^{O}C.
45. **Alcoholus isopropylicus** siehe Isopropylalkohol.
46. **Alcoholus methylicus** siehe Methylalkohol.
47. **Alcoholus butylicus (tertiär)** siehe Butylalkohol.
48. **Alcoholus isobutylicus** siehe Butylalkohol.
49. **Alaun** siehe Alumen kalicum.
50. **Alumen ammoniacale**, Al.(NH3).(SO4)2+12H2O (Ammoniumalaun, Ammoniumaluminiumsulfat). Weiße Kristalle. In 100 Teilen Wasser lösen sich 10-12 Teile.
51. **Alumen chromicum**, Cr.K.(SO4)2+12H2O (Chromalaun, Chromkaliumsulfat, Kaliumchromsulfat). Violettrote, reguläre Kristalle, leicht löslich in Wasser.
52. **Alumen kalicum**, Al.K.(SO4)2+12H2O (Alaun, Kalialaun, Kaliumaluminiumsulfat). Farblose reguläre Kristalle oder weißes Pulver. Löslich in 9 Teilen Wasser, unlöslich in absolutem Alkohol.
53. **Alumen natricum**, Al.Na.(SO4)2+12H2O (Natriumalaun, Natronalaun, Natriumaluminiumsulfat). Farblose Kristalle, leicht löslich in Wasser.
54. **Aluminium chloratum**, AlCl3+6H2O (Aluminiumchlorid). Weiße zerfließliche Kristalle. Sehr leichtlöslich in Wasser. [Nicht mit wasserfreiem AlCl3 verwechseln, das mit Wasser explosionsartig reagiert!].
55. **Aluminium sulfuricum**, A12(SO4)3+18H2O (Aluminiumsulfat, schwefelsaure Tonerde). Weiße Kristalle oder weißes Pulver. Leichtlöslich in Wasser.
56. **Ameisensäure** siehe Acidum formicum.
57. **Ameisensaures Blei** siehe Plumbum formicum.
58. **Ammoniumalaun, Ammoniakalaun** siehe Alumen ammoniacale.
59. **Ammoniakflüssigkeit, Ammoniakgeist** siehe Liquor ammonii caustici.
60. **Ammonium carbonicum**, NH4.HCO3 - NH4.NH2.CO2 (Kohlensaures Ammonium, Hirschhornsalz, Ammoniumcarbonat bzw. Ammoniumcarbaminat) Besteht aus Ammoniumhydrogencarbonat und karbaminsaurem Ammonium. Weiße Stücke, leicht löslich in Wasser.

61. **Ammonium chloratum**, NH4.Cl (Salmiak, Chlorammonium, Ammoniumchlorid). Weißes Kristallpulver, sehr leicht löslich in Wasser.
62. **Ammonium molybdaenicum**, (NH4)6.Mo7O21+4H2O (Ammoniummolybdat, Molybdänsaures Ammonium). Farbloses bis grünlichweißes Pulver oder Kristalle von gleicher Farbe. Löslich in Wasser.
63. **Ammonium nitricum**, NH4.NO3 (Ammoniumnitrat, Ammonsalpeter). Farblose, hygroskopische Kristalle. Sehr leichtlöslich in Wasser.
64. **Anilin**, (Anilinöl, Aminobenzol, Phenylamin). Farblose, sich bräunende Flüssigkeit. Leichtlöslich in Alkohol und im Ether. Löslich in 40 Teilen Wasser. Erstarrungspunkt – 8 ^{O}C. Siedepunkt 183 ^{O}C. D = 1,026. [Bei alten Vorschriften ist nicht immer klar, ob mit „Anilinöl“ fast reines Anilin gemeint ist oder das damals aus Steinkohleteer gewonnene Destillat, das neben Anilin erhebliche Mengen an verschiedenen Methylanilinen und anderen aromatischen Stickstoffbasen enthielt!].
65. **Arsenige Säure** siehe Acidum arsenicosum.
66. **Aqua chlorata** (Chlorwasser, Solutio chlori). Gelb gefärbte Flüssigkeit, enthält ca. 0,5% Chlorgas. [Nicht lagerungsfähig! Geht allmählich in HCl und HClO über, schließlich in HCl].
67. **Aqua destillata**, H2O (destilliertes Wasser). Durch Destillation von Salzen befreites Wasser.
68. **Aqua redestillata**. Das gewöhnliche destillierte Wasser enthält Spuren von Kupfer und Zinn, da es aus Metallgefäßen abdestilliert wird. Diese Schwermetallsalze sind für manche Algen giftig. Ihre Entfernung ist nur durch ein nochmaliges Destillieren aus Glasgefäßen möglich. Zum Ansetzen von Nährlösungen bereitet man es immer frisch. [Destilliertes Wasser erhält man heute in Tankstellen, Supermärkten und Drogerien; es handelt sich dabei um demineralisiertes Wasser, das mit Hilfe von Ionenaustauschern hergestellt wird. Brauchbar ist ebenfalls das Kondenswasser elektrischer Wäschetrockner („Tümmler“). Zum Ansetzen von Nährlösungen sollte man es in jedem Falle über einer Glasapparatur redestillieren!].
69. **Aqua regis** (Königswasser). Gemenge von 3 Raumteilen konzentrierter Salzsäure (ca. 30 %ig) und einem Raumteil konzentrierter Salpetersäure (65 %ig).
70. **Argentum jodatum**, AgJ (Silberjodid, Jodsilber). Hellgelbes Pulver, löslich in Kaliumjodat und in Zyankaliumlösung. Lichtempfindlich.
71. **Argentum nitricum**, AgNO3 (Silbernitrat, salpetersaures Silber, Höllenstein). Farblose Kristalle oder gegossene Stäbchen. Löst sich in 0,5 Teilen Wasser und in 14 Teilen Alkohol. Ätzend!
72. **Argentum oxydatum**, Ag2O (Silberoxid). Braunschwarzes, lichtempfindliches Pulver. Fast unlöslich in Wasser, löslich in Salpetersäure.
73. **Arsenicum bromatum**, AsBr3 (Bromarsen, Arsenbromür, Arsentribromid, Arsen-III-bromid). Gelbliche bis weiße hygroskopische Kristalle. Schmelzpunkt 30 ^{O}C. Siedepunkt 220 ^{O}C. Wird durch Wasser zersetzt.
74. **Asparagin**. Große weiße Kristalle oder weißes Pulver. Löslich in Wasser, fast unlöslich in Alkohol und Ether.
75. **Asphalt** (Erdpech) a) Schwarzes bis braunes, stark glänzendes fossiles mineralisches Harz. Wahrscheinlich ein Polymerisationsprodukt des Erdöls. b) Kunstprodukt mit ähnlichen Eigenschaften wie der Naturasphalt. c) Teerasphalt ist der Rückstand der Destillation des Steinkohlenteeres.
76. **Asphaltlack**. Auflösung des natürlichen Asphaltes in Leinöl und Terpentin.
77. **ATA**. Putzmittel der Henkel-Persilwerke. Bestandteile sollen nach Literaturangaben sein: 92% Quarzsand oder Bimssteinpulver, 5% kalzinierte Soda oder Trinatriumphosphat und 3% Salmiak oder Ammoniumsulfat.
78. **Aurum chloratum**, AuCl3+4H2O (Gold-III-chlorid). Gelbe nadelförmige Kristalle. Löslich in Wasser, Alkohol und in Ether. Im Handel erhält man unter Goldchlorid meistens Chlorwasserstoffgoldchlorid (Goldchlorwassersoffsäure, H[AuCl4]+xH2O). Gelbe hygroskopische Kristalle, löslich in Wasser, Ether und Alkohol. [Ebenfalls brauchbar ist Natriumtetrachloroaurat-III, Na[AuCl4]].

B

1. **Baryum chloratum**, BaCl2+2H2O (Chlorbarium, Bariumchlorid). Weiße Kristalle oder weißes Pulver. Sehr leicht löslich in Wasser.
2. **Benzoesäure** siehe Acidum benzoicum.
3. **Benzin**. Farblose Flüssigkeit. Kohlenwasserstoffe vom Pentan bis Oktan. Löslich in Ether, in Ölen und in Schwefelkohlenstoff.
4. **Benzol**. Farblose Flüssigkeit, D = 0,883, Schmelzpunkt + 4 ^{O}C, Siedepunkt 80 ^{O}C. Löslich in Alkohol, Ether, Aceton, Eisessig. [Benzol ist akut nicht sonderlich giftig, wirkt jedoch schon in Konzentrationen leukämieauslösend, die mit dem Geruchssinn nicht mehr wahrgenommen werden können! Als Amateur sollte man Benzol grundsätzlich durch das harmlose reine Toluol ersetzen!].
5. **Bergamottöl** siehe Oleum bergamottae.
6. **Beryllium chloratum**, BeCl2 (Berylliumchlorid) Sirupdicke, farblose bis leicht gelbliche Flüssigkeit, welche bei niederer Temperatur Kristalle der Formel BeCl2+4H2O ausscheidet. Leicht löslich in Wasser und Alkohol. [Vorsicht! Alle löslichen Berylliumverbindungen sind sehr giftig! Metallisches Beryllium, als Staub in die Lunge gebracht, löst Lungenkrebs aus!].
7. **Bierwürze**. Der wässrige Auszug des im Verlaufe der Bierbrauerei hergestellten Gerstenmalzes. Sie enthält Zucker, stickstoffhaltige Körper, Eiweißabbauprodukte (Albumosen, Peptone, Amide), eine Reihe von Enzymen, Pentosane, Pektinstoffe und pflanzliches Gummi.
8. **Blutlaugensalz, gelbes**, siehe Kalium ferrocyanatum, **rotes**, siehe Kalium ferricyanatum.
9. **Borax** siehe Natrium biboricum.
10. **Borsäure** siehe Acidum boricum.
11. **Brechweinstein** siehe Tartarus stibiatus.
12. **Bromarsen** siehe Arsenicum bromatum.
13. **Butylalkohol**, (CH3)2CH.CH2OH (Alcoholus isobutylicus, primärer Isobutyalkohol, Gärungsbutanol, 2-Methylpropanol-1). Farblose Flüssigkeit, löslich in Wasser und in Ethylalkohol. D = 0,806.
14. **Butylalkohol**, (CH3)3.C.OH (Alcoholus butylicus (tertiär), tertiärer Butylakohol, tertiärer Butanol). Weiße Kristalle. Schmelzpunkt 25 ^{O}C, Kochpunkt 82 ^{O}C. Löslich in Alkohol 1:1.

C

1. **Cadmium chloratum** CdCl2+2H20 (Cadmiumchlorid). Weiße Kristalle, leicht löslich in Wasser, löslich in Alkohol und in Glycerin.
2. **Caedax**. Kunstharz der Firma Bayer. Zusammensetzung nicht bekanntgegeben. Zu verwenden an Stelle von Kanadabalsam. [Dieses hervorragende Einschlußmittel wird leider heute wegen seines hohen Gehaltes an PCB nicht mehr hergestellt].
3. **Calcaria chlorata**. Zusammensetzung variabel (Chlorkalk, Kalziumhypochlorit). Weißes Pulver, teilweise in Wasser löslich. Reines Kalziumhypochlorit ist *Caporit*.
4. **Calcium chloratum**, CaCl2+6H2O (Kalziumchlorid, Chlorkalzium). Farblose hygroskopische Kristalle. Leicht löslich in Wasser unter Kälteentwicklung, löslich in Alkohol. Stark erhitzt (720 ^{O}C) verliert es sein Kristallwasser und dient dann als Trockenmittel in Exsikkatoren. Es absorbiert dann Wasser, Alkohol, Ether und Ammoniak.
5. **Calcium nitricum**, Ca(NO3)2 (Kalziumnitrat, Kalziumsalpeter, Kalksalpeter). Weiße zerfließliche Masse. Leicht löslich in Wasser und Alkohol.
6. **Calcium phosphoricum tribasicum**, Ca3(PO4)2 (Neutrales Calciumphosphat, tertiäres Kalziumphosphat, Kalziumphosphat). Weißes Pulver, löslich in Säuren, in Wasser nur bei Gegenwart von CO2 oder gewissen gelösten Salzen.
7. **Calcium sulfuricum**, CaSO4+2H2O (Kalziumsulfat, schwefelsaures Kalzium, Gips). Weißes kristallinisches Pulver, löslich in 400 Teilen Wasser. Gebrannter Gips ist Gips, der

einen Teil seines Kristallwassergehaltes durch Erhitzen auf 110° C verloren hat. Mit Wasser zu Brei verrührt, erhärtet er wieder.

8. **Calomel** siehe Hydrargyrum chloratum mite.
9. **Camphora** (Kampfer). Farblose mürbe kristallinische Stücke oder weißes Pulver. Kaum in Wasser löslich, gut löslich in Ether, Chloroform und Ölen.
10. **Camsal** siehe Salol camphoratum.
11. **Caporit** Ca(OCl)2 siehe Chlorkalk, reines Kalziumhypochlorit. Leicht und fast vollkommen in Wasser löslich.
12. **Carboneum sulfuratum**, CS2 (Schwefelkohlenstoff, Alcohol sulfuris). Farblose, leicht bewegliche, sehr flüchtige, stark lichtbrechende Flüssigkeit. D = 1,270 - 1,272. Leichtlöslich in absolutem Alkohol, Ether, Chloroform und Ölen, Siedepunkt 47 ^{O}C. [Sehr feuergefährlich und giftig!].
13. **Cedukol**. Ersatzpräparat der Firma Bayer für das Zelloidin. Vermutlich aus Zellstoff hergestellt. Löslich in Ether-Alkohol und auch in absolutem Methylalkohol.
14. **Cellosol**. Ein dem Zelloidin ähnliches Einbettungsmittel, dessen Zusammensetzung nicht näher bekanntgegeben wurde. (Hollborn- Leipzig)
15. **Celluloid**. Amorphe farblose Masse aus Collodium und Kampfer. Löslich in Azeton.
16. **Cera alba** (Bienenwachs), **Cera flava** (gelbes Wachs). Gelbe bis graugelbe, körnige, brechende Stücke, D = 0,948 - 0,958, Schmelzpunkt 62 ^{O}C. Cera alba: weißes Wachs, gebleichtes Wachs, D = 0,956 - 0,961, Schmelzpunkt 62-66 ^{O}C. Hauptbestandteil des Wachses ist Myricylpalmitat, außerdem kommen noch Cerotinsäure und Melissensäure darin vor.
17. **Chinolin** (Benzopyridin). Schwach gelbliche, eigentümlich riechende Flüssigkeit. Siedepunkt 230-240 ^{O}C, D = 1,098, schwer löslich in Wasser, löslich in Alkohol.
18. **Chloralhydrat**. Farblose Kristalle, leicht löslich in Wasser, Alkohol, Ether und Glycerin, schwer löslich in Chloroform, Schwefelkohlenstoff und fetten Ölen. [Nicht mit Chloral verwechseln!]
19. **Chlorammonium** siehe Ammonium chloratum.
20. **Chlorbaryum** siehe Baryum chloratum.
21. **Chlordioxidessigsäure, Chlordioxidsalpetersäure**. Auflösung von gasförmigem Chlordioxid in Essigsäure oder Salpetersäure.
22. **Chlorkalk** siehe Calcaria chlorata
23. **Chloroformium**, (Chloroform, Trichlormethan). Klare, farblose, flüchtige Flüssigkeit. Mischt sich mit Alkohol abs., fetten und etherischen Ölen. Mischt sich nicht mit Ether. Chloroform ist nicht brennbar, seine Dämpfe entwickeln aber bei Zutritt zu Flammen giftige Gase (Phosgen). Daher nicht rauchen! Keine offene Flamme! D = 1,474 - 1,478, Siedepunkt 60 bis 62 ^{O}C.
24. **Chlorsaures Kalium** siehe Kalium chloricum.
25. **Chlorwasser** siehe Aqua chlorata.
26. **Chlorzinn** siehe Stannum bichloratum.
27. **Chlorzink** siehe Zincum chloratum.
28. **Chlorzinkjod**. Zusammensetzung nach *Behrens* Tabellen: Destilliertes Wasser 10,5 ccm, Chlorzink 20 g, Jodkalium 6,5 g, Jod 1,3 g.
29. **Chromalaun** siehe Alumen chromicum.
30. **Chromsäure** siehe Acidum chromicum.
31. **Cobaltum chloratum**, CoCl2+6H2O (Kobaltchlorür, Kobaltchlorid). Rote zerfließliche Kristalle. Leicht löslich in Wasser. Löslich in Alkohol.
32. **Colla piscium** (Hausenblase, Fischleim). Die innere Auskleidung der Schwimmblase verschiedener Störarten, besonders von *Accipenser huso L.* Gelbbräunliche längliche Stücke. Löst sich schwer in kochendem Wasser zu einer farblosen wasserklaren Gallerte.
33. **Collodium**. Collodium-Wolle ist Nitrozellulose, Pyroxylin. Gereinigte und nitrierte Baumwolle, löslich in Alkohol-Ether. Collodium-Lösung ist eine 2-4-6 %ige Lösung von Collodium in Alkohol-Ether. Farblose, sirupartige Flüssigkeit. Collodium elasticum ist Collodiumlösung mit einem Zusatz von Rizinusöl, Terpentin oder Kanadabalsam.
34. **Collolith**. Kunstharz nicht näher bekanntgegebener Zusammensetzung zur Anfertigung von Dünnschliffen.

35. **Colophonium** (Geigenharz). Das von Terpentinöl befreite Harz verschiedener Kiefernarten. Durchsichtige, gelbliche, hellbraune Stücke. Löst sich in der gleichen Menge Alkohol oder Essigsäure. Ist löslich ferner in Ether, Chloroform, Schwefelkohlenstoff.
36. **Cuprum aceticum**, Cu(C2H3O2)2+H2O (essigsaures Kupfer, Kupferacetat). Blaugrüne Kristalle, löslich in Wasser und Alkohol.
37. **Cuprum chloratum**, CuCl2+H2O (Kupferchlorid, Kupfer-II-chlorid). Grüne zerfließliche Masse. Leicht löslich in Wasser und Alkohol.
38. **Cuprum sulfuricum**, CuSO4+5H2O (Kupfersulfat, schwefelsaures Kupfer, Kupfervitriol). Blaue Kristalle, löslich in 3 Teilen Wasser von 20 ^{O}C, in 0,8 Teilen kochenden Wassers. Ausgeglühtes Kupfersulfat wird zum Entwässern des absoluten Alkohols benützt.

D

1. **Dammarharz** (Resina Dammar). Harz von *Shorea wiesneri Stapf*. Gelbliche, tropfenförmige Stücke oder Klumpen. Ist spröde und leicht zerreiblich. Löst sich in Terpentinöl, Chloroform oder Xylol. Wird auch in dünnem oder dickem Zedernholzöl aufgelöst angewandt. Die Auflösung in Terpentinöl wird auch als Dammarlack bezeichnet.
2. **Dextrin**. Weißes amorphes Pulver. Abbauprodukt der Stärke. Leicht löslich in Wasser, unlöslich in Alkohol und Ether.
3. **Destilliertes Wasser** siehe Aqua destillata.
4. **Diaphanol** siehe Chlordioxidessigsäure.
5. **Diastase** (Ferment aus Gerstenmalz). Gelbliches bis weißes, amorphes Pulver. Trübe löslich in Wasser.
6. **Diatopan**. Diatomeeneinschlußmittel nicht bekanntgegebener Zusammensetzung.
7. **Dikaliumphosphat** siehe Kalium phosphoricum.
8. **Dinatriumphosphat** siehe Natrium phosphoricum.
9. **Dioxan** (Dioxyethylen, Diether des Glykols). Klare farblose Flüssigkeit. Vergleiche den ausführlichen Abschnitt über Dioxan im Textteil des Buches (§ 248).
10. **Doppelt kohlensaures Natron** siehe Natrium bicarbonicum.
11. **Durobalsam**. Besondere Handelsmarke des Kanadabalsams (*Dr.Grübler, Leipzig*).

E

1. **Eau de Javelle**, Javellesche Lauge. Wässrige Lösung von Kaliumhypochlorit KC1O.
2. **Eisenalaun, Eisenammoniumalaun** siehe Ferri-ammonium-sulfuricum.
3. **Eisenchloridlösung**, officinelle siehe Liquor ferri sesquichloratum.
4. **Eisenchlorid** siehe Ferrum sesquichloratum.
5. **Eisensulfat, Eisenvitriol** siehe Ferrum sulfuricum.
6. **Eisessig** siehe Acidum aceticum glaciale.
7. **Essigsäure** siehe Acidum aceticum glaciale.
8. **Essigsaures Blei** siehe Plumbum aceticum.
9. **Essigsaures Kalium** siehe Kalium aceticum.
10. **Essigsaures Kupfe**r siehe Cuprum aceticum.
11. **Essigsaures Natrium** siehe Natrium aceticum.
12. **Eucalyptusöl** siehe Oleum eucalypti.

F

1. **Ferri ammonium citricum** (Eisen-III-ammoniumzitrat). Rotbraune hygroskopische Blättchen, lichtempfindlich, sehr leicht löslich in Wasser. Unlöslich in Alkohol.
2. **Ferri ammonium sulfuricum**, Fe.NH4.(SO4)2+12H2O (Ferriammoniumsulfat, Eisenammoniumalaun, Ammonium-eisen-III-sulfat). Amethystfarbige Kristalle. Leicht löslich in Wasser.

3. **Ferrum citricum** (Zitronensaures Eisen, Ferricitrat, Eisen-III-citrat). Rotbraune Lamellen, leicht löslich in Wasser.
4. **Ferrum sesquichloratum**, $FeCl_3+6H_2O$ (Ferrichlorid, Eisen-III-chlorid). Gelbe hygroskopische kristalline Stücke. Sehr leicht löslich in Wasser, leicht löslich in Alkohol und in Ether-Alkohol-Gemischen.
5. **Ferrum sulfuricum**, $FeSO_4+7H_2O$ (Schwefelsaures Eisen, Eisenvitriol, Ferrosulfat, Eisen-II-sulfat). Große blaßgrüne, leicht verwitternde Kristalle oder grünes Pulver. Löst sich in 1,8 Teilen Wasser.
6. **Ferrum sulfuricum oxydatum**, $Fe_2(SO_4)_3$ (Ferrisulfat, Eisen-III-sulfat). Grauweißes Pulver, langsam in Wasser löslich. [Nur in angesäuertem Wasser klar löslich; in neutralem Milieu flockt Eisenhydroxid aus].
7. **Fluornatrium** siehe Natrium fluoratum.
8. **Flußsäure** siehe Acidum hydrofluoricum.
9. **Formaldehyd solutus** (Formalin, Formaldehydlösung). Klare, farblose, wässrige Flüssigkeit mit stechendem Geruch. Gehalt mindestens 35% gasförmiges Formaldehyd. Enthält immer etwas Methylalkohol [und Ameisensäure! Wirkt daher mit der Zeit entkalkend!]. Mischt sich mit Wasser oder Alkohol in jedem Verhältnis. D = 1,075-1,086.
10. **Fruchtzucker** siehe Lävulose.

G

1. **Gallussäure** siehe Acidum gallicum.
2. **Gelatine**. Reiner Leim aus Kalbsfüßen. Durchsichtige Blätter oder grobes Pulver. Gelatine enthält immer etwas schweflige Säure als Reste des Bleichens. Handelsformen: Gelatine in Blättern für Küchenzwecke. Gelatinepulver Delft der holländischen Leimfabrik zu Delft für bakteriologische Zwecke, für Einschluß und für die Einbettung. Löst sich in heißem Wasser leicht zu einer Gallerte.
3. **Gerbsäure** siehe Acidum tannicum.
4. **Gips** siehe Calcium sulfuricum.
5. **Glaubersalz** siehe Natrium sulfuricum.
6. **Glycerin**. Klare farblose sirupartige Flüssigkeit. Sehr leicht löslich in Wasser und Alkohol. Unlöslich in Ether und in Chloroform. Es existieren folgende Handelsformen: Glycerinum purissimum D = 1,26 und Glycerinum bidestillatum D = 1,23.
7. **Glykose** (Traubenzucker, Stärkezucker, d-Glukose, Glukose, Dextrose). Weißes kristallinisches Pulver. Leichtlöslich in Wasser, löslich in Alkohol.
8. **Goldchlorid** siehe Aurum chloratum.
9. **Goldsize**. Verschlußlack aus gekochtem Leinöl, Mennige und Umber. Umber oder Umbra ist eine durch Verwitterung von manganhaltigen Eisenerzen entstandene Erdfarbe.
10. **Glykolmonomethylether** siehe Äthylenglykolmonomethylether.
11. **Gummi arabicum** (Arabisches Gummi). Hauptbestandteil ist Arabin. Erhärteter Milchsaft von *Acacia verek* und anderen Akazien. Helle bis gelbliche, leicht zerbrechliche Stücke von glasartigem Aussehen. Handelsformen: Kordofangummi oder Sudangummi, die beste Sorte. Senegalgummi ist hygroskopisch. Weniger für mikroskopische Zwecke eignen sich folgende Arten: Wattle-Gummi von *Acacia dealbata* (Neusüdwales), Kapgummi aus Südafrika, die beide gelbe bis braune, dunkle Stücke bilden. Löst sich schwer in Wasser zu einer sauer reagierenden sirupartigen Flüssigkeit. [Die Selbstherstellung von Einschlußmitteln wie *Berlese*-Mischung lohnt sich nicht; wenn man sie versucht, muß Gummi arabicum in Stücken verwendet werden nicht dagegen gepulverte Ware, da diese oft trübe Lösungen ergibt].

H

1. **Hausenblase** siehe Colla piscium.
2. **Holzessig**, gereinigter, roher, siehe Acetum pyrolignosum.

3. **Hydrargyrum bichloratum**, HgCl2 (Sublimat, Mercurichlorid, Quecksilber-II-chlorid). Weißes Pulver, Löslich in 3 Teilen Alkohol und 16 Teilen kaltem Wasser. Löslich auch in Ether.
4. **Hydragyrum bijodatum rubrum**, HgJ2 (Quecksilber-II-jodid, Mercurijodid). Rotes Pulver. Löslich in heißem Alkohol, löslich in Jodkaliumlösung.
5. **Hydrargyrum chloratum mite** Hg2C22 (Kalomel, Mercurochlorid, Quecksilber-I-chlorid). Weißes Kristallpulver. Unlöslich in Wasser, Alkohol und Ether. Lichtempfindlich.
6. **Hydrochinon** (Paradihydroxibenzol). Farblose Nadeln, löslich in Wasser, leicht löslich in Alkohol und Ether.
7. **Hydrogenium peroxydatum solutum**, H202 (Wasserstoffsuperoxid, Wasserstoffperoxid). Klare farblose Flüssigkeit, enthält ungefähr 3% H202. Im Handel ist unter dem Namen Perhydrol eine 30 %ige Lösung erhältlich. [Vorsicht! Perhydrol ist sehr stark ätzen!].
8. **Hydrosulfit-Küpe** ist eine Auflösung von Natrium hydrosulfurosum (Natriumhydrosulfit, Na2S2O4, Natriumdithionit) in Wasser mit Zusatz von Natronlauge. Dieser Küpe werden die sogenannten Küpenfarbstoffe zugesetzt, die darin in lösliche Leukoverbindungen übergeführt werden.

I

1. **IMI**. Putzmittel der Henkel-Persilwerke. Enthält Trinatriumphosphat (Na3PO4), Soda und Wasserglas.
2. **Isopropylalkohol** (Isopropanol, Propanol-2, Hartosol). Farblose Flüssigkeit, mischbar mit Wasser, Alkohol und Ether.

J

1. **Japanlack**. Milchsaft des japanischen Lackbaumes *Rhus vernicifera*. Löslich in Alkohol, Benzol, Xylol.
2. **Jodalkohol**. Alkohol von 45% wird mit Jodtinktur weingelb gefärbt.
3. **Jodkalium** siehe Kalium jodatum.
4. **Jodsaures Natrium** siehe Natrium jodatum.
5. **Jodum resublimatum** (Jod). Schwarzgraue, metallisch glänzende Kristalle. Löslich in 5000 Teilen Wasser. Leicht löslich in KJ-Lösungen, leicht löslich in Alkohol, Ether, Chloroform, Benzol, Benzin und Schwefelkohlenstoff. D = 4,95. Schmelzpunkt 114 ^{O}C, Kochpunkt 185 ^{O}C.
6. **Jodsilber** siehe Argentum jodatum.
7. **Jodwasser**. Destilliertes Wasser wird tropfenweise mit *Lugolscher* Lösung versetzt, bis es hellgelb gefärbt ist.
8. **Jodtinktur** siehe Tinctura jodi.
9. **Jodzink** siehe Zinkum jodatum.

K

1. **Kadmiumchlorid** siehe Cadmium chloratum.
2. **Kalialaun** siehe Alumen kalicum.
3. **Kalium aceticum** (essigsaures Kalium, Kaliumacetat). Weißes hygroskopisches Kristallpulver. 1 Teil löst sich in 0,5 Teilen Wasser. Liquor kalii acetici ist eine Lösung in 2 Teilen Wasser (33,3 %ig).
4. **Kalium bichromicum**, K2Cr2O7 (Kaliumbichromat, Kaliumdichromat). Gelbrote Kristalle oder Pulver, 1 Teil löst sich in 8-10 Teilen Wasser. [giftig!]

5. **Kalium biphosphoricum**, KH2PO4 (einbasisches Kaliumorthophosphat, Kaliumbiphosphat, Monokaliumphosphat, Kaliumdihydrogenphosphat) Farblose Kristalle, leichtlöslich in Wasser, unlöslich in Alkohol.
6. **Kalium carbonicum**, K2CO3 (Kaliumkarbonat, Pottasche). Weißes hygroskopisches Pulver. Löslich in der gleichen Menge Wasser.
7. **Kalium bitartaricum** (Gereinigter Weinstein, Kaliumhydrogentartrat). Weißes kristallines Pulver. In kaltem Wasser schwer löslich (1 Teil in 200 Teilen Wasser). In Alkohol unlöslich.
8. **Kalium chloricum**, KClO3 (Kaliumchlorat, chlorsaures Kalium). Farblose glänzende Kristalle. Ein Teil löst sich in 16 Teilen kaltem Wasser. Bei 334 ^{O}C schmelzbar, gibt bei weiterem Erhitzen Sauerstoff ab. [Mischungen aus Chloraten und brennbaren Stoffe, wie Zucker, Kohle, Schwefel u.s.w. detonieren schon beim Verreiben extrem heftig! Es genügt schon weniger als ein Gramm, um eine Hand abzureißen! Außerdem entwickeln Chlorate, mit konzentrierten Säuren zusammengebracht, das sehr giftige und explosible ClO2-Gas. Mit konzentrierte Schwefelsäure erfolgt momentan eine sehr heftige Detonation. Die von *Schömmer* angegebenen Darstellungsweisen von Chlordioxidlösungen sind lebensgefährlich!].
9. **Kalium cyanatum**, KCN (Zyankali, Cyankali, blausaures Kalium, Kaliumcyanid). Weiße, sehr giftige, hygroskopische Stücke. Gut in Wasser mit alkalischer Reaktion, schwer in Alkohol löslich. Die wässrige Lösung ist unbeständig, es bildet sich Ammoniak und Kaliumformiat. [Alle löslichen Cyanide sind nicht nur giftig, sondern auch tückisch; zum einen gehen der Vergiftung keine Warnsymptome voraus, zum anderen gibt es keine praktikablen Gegenmittel. Außerdem setzen Cynidlösungen, aus Unachtsamkeit mit irgend einer Säure zusammengebracht, momentan gasförmige Blausäure frei, die ebenfalls tödlich wirkt. Als Amateur sollte man auf den Umgang mit Cyaniden verzichten, zumal die von *Schömmer* angegebene Anwendung - Auflösen von AgJ-Niederschlägen - nicht sonderlich wichtig ist. Man zerstört Cyanide durch Zugabe von alkalischer Hypochloritlösung (Eau de Javelle)].
10. **Kalium ferricyanatum**, K3[Fe(CN)6] (Kaliumferricyanid, Ferrizyankalium, rotes Blutlaugensalz, Kaliumhexacyanoferrat-III). Rote Prismen oder rotes Pulver, leicht löslich in Wasser [Giftig].
11. **Kalium ferrocyanatum**, K4[Fe(CN)6]+3H2O (Kaliumferrocyanid, Ferrozyankalium, gelbes Blutlaugensalz, Kaliumhexacyanoferrat-II). Gelbe Kristalle oder Pulver. Leichtlöslich in Wasser. [Vorsicht! Obwohl Blutlaugensalze nicht sonderlich giftig sind, spalten beide Salze in Gegenwart konzentrierter Säuren Blausäure ab; bei dem weniger stabilen rotem Blutlaugensalz genügt hierzu schon Magensäure].
12. **Kalium hydricum**, KOH (Ätzkali, Kalihydrat, Kaliumhydroxid). Weiße zerfließliche Stücke, leicht löslich in Wasser, löslich in Alkohol. Die Lösung in Wasser heißt Kalilauge, Liquor kalii caustici. Die offizinelle Kalilauge enthält 14,8-15 % Kaliumhydroxid. D = 1,35 - 1,37.
13. **Kalium jodatum**, KJ (Jodkalium, Kaliumjodid). Weiße Kristalle, löslich in 0,75 Teilen Wasser und 12 Teilen Alkohol.
14. **Kalium permanganicum**, KMnO4 (Kaliumpermanganat, übermangansaures Kalium) Dunkelviolette, stahlblau glänzende Prismen. 1 Teil löst sich in 16 Teilen kaltem Wasser und in 3 Teilen kochendem Wasser.
15. **Kalium phosphoricum**, K2HPO4 (Dikaliumphosphat, zweibasisches phosphorsaures Kali, Kaliummonohydrogenphosphat) Zerfließliche amorphe Stücke. Leicht löslich in Wasser.
16. **Kalium silicicum** (Gemenge von Kaliumpolysilikaten). Amorphe glasartige Masse. Die konzentrierte etwa 35%ige wässrige Lösung heißt Kaliwasserglas Liquor kalii silicii. Klare farblose bis gelbliche sirupartige, klebrige Flüssigkeit von alkalischer Reaktion.
17. **Kalziumchlorid** siehe Calcium chloratum.
18. **Kalziumnitrat** siehe Calcium nitricum.
19. **Kalziumphosphat** siehe Calcium phosphoricum tribasicum.
20. **Kanadabalsam** (Balsamum canadense depuratum). Harz von *Abies balsama*. Bestandteile sind Pinen, Bornylacetat, Harz, etherische Öle. Handelsformen: Kanadabalsam, zur Glas-

härte getrocknete Stücke. Kanadabalsam, gelöst in Benzol, Chloroform oder Xylol in Zinntuben. Kanadabalsam neutral (*Hollborn*). Durobalsam (*Grübler*). Die beiden letzten sind frei von etherischen Ölen und freien Säuren.

21. **Karbolsäure** siehe Acidum carbolicum.
22. **Karbol-Xylol**. 1 Teil Phenol ist in 3 Teilen Xylol aufzulösen.
23. **Katanol**. Künstliches Phenolkondensationsprodukt, das als Ersatz für die Tannin-Brechweinstein-Beize in der Textilfärberei angewandt wird. Katanol hat den Vorteil nur eines einzigen Arbeitsganges.
24. **Kobaltchlorür** siehe Cobaltum chloratum.
25. **Königswasser** siehe Aqua regis.
26. **Kohlensaures Lithium** siehe Lithium carbonicum.
27. **Kohlensaures Ammonium** siehe Ammonium carbonicum.
28. **Kopal**. Verschiedene Naturharze, z.T. fossiler Art. Hellgelbe bis braunrötliche Stücke. Meistens werden die Kopale als mehr oder weniger große Klumpen aus dem Boden der bestehenden oder früheren Wäldern oder aus Anschwemmungen ausgegraben (Tropen). Schmelzpunkt zwischen 110 und 360 ^{O}C. Kopal löst sich je nach Sorte und Herkunft in Gemischen von Alkohol, Ether, Benzol und Schwefelkohlenstoff oder in Terpentin und Leinöl. Verwendung zu Lacken.
29. **Kreosotum, Kreosot**. Gelbliche, nach Rauch riechende Flüssigkeit. Bestandteil des Buchenholzteeres. Löslich in Alkohol, Ether und Schwefelkohlenstoff. D = 1,075.
30. ***Krönigs* Kitt**. Deckglaskitt, besteht aus 2 Teilen Wachs und 7 Teilen Kolophonium. Wird mit dem Spatel aufgetragen.
31. **Kumaron** (Benzofuran, Cumaron). Indifferente dicke Flüssigkeit. Siedepunkt 170 ^{O}C.
32. **Kunst-Bimsstein**. Handliche Stücke zum Schleifen von Holz und weichen Steinen, auch von Gipsstuckarbeiten. Wird hergestellt durch scharfes Brennen eines Gemisches von feinem Quarzsand mit feuerfestem Ton. Ist in verschiedenen Korngrößen erhältlich.
33. **Kupferacetat** siehe Cuprum aceticum.
34. **Kupferchlorid** siehe Cuprum chloratum.
35. **Kupferoxid-Ammoniak** (*Schweizers* Reagens, Cuoxam). Lösung von Kupferhydroxid in Ammoniak. Einziges Lösungsmittel für Zellstoff.
36. **Kupfervitriol** siehe Cuprum sulfuricum.

L

1. **Lävulose** (Fruchtzucker). Weißes Kristallpulver. Sehr leicht löslich in Wasser, leicht in Alkohol löslich.
2. **Lävulose sirupförmig**. Gelblicher Sirup. Nicht kristallisierende Fruchtzuckerlösung.
3. **Leinöl** siehe Oleum lini.
4. ***Liebigs* Fleischextrakt**. Aus frischem Fleisch hergestellte Kochbrühe, die nach dem Verfahren von *Liebig* eingedickt wird. Der Fleischextrakt enthält außer den Extraktivstoffen des Fleisches noch Salze und Eiweißabbauprodukte wie Polypeptide, Albumosen und Peptone.
5. **Liquor ammonii caustici** (Salmiakgeist, Ammoniakgeist, Ammoniakflüssigkeit, Ammoniaklösung). Enthält 10% Ammoniak (NH3). Klare farblose Flüssigkeit. D = 0,957 - 0,958.
6. **Liquor ferri sesquichlorati** (offizinelle Eisenchloridlösung). Enthält 48% Ferrum sesquichloratum crystallisatum oder 29% wasserfreies FeC13 entsprechend 10% Eisen. Rotbraune Flüssigkeit, leicht löslich in Wasser und Alkohol. D = 1,275-1,285.
7. **Lithium carbonicum**, Li2CO3 (Lithiumcarbonat, kohlensaures Lithium). Weißes kristallines Pulver, schwer löslich in Wasser, leichter löslich in kohlensäurehaltigem Wasser. Schwer löslich in Alkohol.

M

1. **Magnesia usta** siehe Magnesium oxydatum.
2. **Magnesium biphosphoricum** Mg(H2PO4)2 (Magnesiumphosphat, Mgnesiumdihydrogenphosphat). Weißes Pulver löslich in Wasser.
3. **Magnesium chloratum** MgCl2+6 H2O (Chlormagnesium, Magnesiumchlorid). Farblose Kristalle, sehr leicht löslich in Wasser, löslich in Alkohol.
4. **Magnesium oxydatum**, MgO (Gebrannte Magnesia, Magnesia usta, Magnesiumoxid) Leichtes weißes Pulver, leicht löslich in verdünnten Säuren. Unlöslich in Wasser.
5. **Magnesium sulfuricum**, MgSO4+7H2O (Magnesiumsulfat, Bittersalz). Farblose Kristalle, löslich in 1,5 Teilen Wasser.
6. **Manganum peptonatum**, Manganpepton. Braunes Pulver, das 4% Manganoxid enthält, löslich in Wasser.
7. **Manganum phospho-lacticum**. Enthält 62% Manganolactat. Rötlich weißes Pulver. Schwer löslich in Wasser.
8. **Mannit** (Mannazucker). Weiße Nadeln, leicht löslich in Wasser, schwer in Alkohol.
9. **Mennige**, Pb3O4 (Minium, Plumbum hyperoxydatum rubrum, Blei-II,IV-oxid). Scharlachrotes kristallinisches Pulver.
10. **Methylalkohol** (Alcoholus methylicus, Methanol). Farblose Flüssigkeit. D = 0,796, Siedepunkt 65 ^{O}C. Mischbar mit Wasser, Alkohol, Ether. [giftig, unterscheidet sich in Geruch und Geschmack nicht von Trinkalkohol!].
11. **Methylbenzoat** (Methylium benzoicum, Bezoesäuremethylester). Farblose oder gelbliche Flüssigkeit, löslich in Alkohol und in Ether. D = 1,094, Siedepunkt 199 ^{O}C.
12. **Milchsäure** siehe Acidum lacticum.
13. **Molybdänsäure** siehe Acidum molybdaenicum.
14. **Monobromnaphtalin** (Naphthalin alpha monobromatum, 1-Bromnaphthalin, alpha-Bromnaphthalin). Gelbe Flüssigkeit. Leicht löslich in heißem Alkohol, Ether und Benzol. D = 1,50, Siedepunkt 277 ^{O}C.

N

1. **Natrium aceticum** (Natriumacetat, essigsaures Natrium). Farblose monokline Kristalle. Löslich in 1 Teil Wasser, in 25 Teilen kaltem Alkohol und in 1 Teil siedendem Alkohol. Schmilzt leicht im eigenen Kristallwasser.
2. **Natriumalaun** siehe Alumen natricum.
3. **Natrium biboricum**, Na2B4O710H2O (Borax, Natriumtetraborat). Harte, farblose Kristalle, löslich in 16 Teilen kaltem Wasser und in 0,7 Teilen kochendem Wasser. Reichlich löslich in Glycerin, in Alkohol nahezu unlöslich.
4. **Natrium bicarbonicum**, NaHCO3 (Natriumbicarbonat, doppelkohlensaures Natron, Natriumhydrogencarbonat). Weißes Pulver, löslich in 11 Teilen Wasser, unlöslich in Alkohol.
5. **Natrium bisulfurosum**, NaHSO3 (Natriumbisulfit, Natriumhydrogensulfit). Weißes Kristallpulver, löslich in 4 Teilen Wasser, schwer löslich in Alkohol.
6. **Natrium carbonicum**, Na2CO3+10H2O (Natriumcarbonat, Soda, kohlensaures Natron). Farblose, monokline Kristalle, Löslich in 1,6 Teilen kaltem Wasser und in 0,2 Teilen kochendem Wasser. Weitere Handelsformen: Natrium carbonicum siccum Na2CO3+2H2O. Weißes Kristallpulver, löslich in Wasser. [Natriumcarbonat wird mit unterschiedlichem Kristallwassergehalt angeboten; bei Bestellung beachten!].
7. **Natrium chloratum**, NaCl (Kochsalz, Chlornatrium, Natriumchlorid). Weiße würfelförmige Kristalle oder weißes Pulver. Löslich in 2,8-3 Teilen Wasser. [Nicht mit Natriumchlorat, NaClO3, verwechseln!].
8. **Natrium fluoratum**, NaF (Fluornatrium, Natriumfluorid). Weißes Pulver, löslich in etwa 25 Teilen Wasser. [Giftig!].
9. **Natrium hydricum**, NaOH (Ätzatron, Natriumhydroxid). Zerfließliche Stäbchen oder Kugeln von weißer Farbe. Sehr ätzend. Sehr leicht löslich in Wasser und Alkohol. Die

Lösung in Wasser heißt Natronlauge, Liquor natrii caustici. Die offizinelle Natronlauge enthält 15 % NaOH, D = 1,168- 1,172.

10. **Natrium jodicum**, NaJO3 (Natriumjodat, jodsaures Natrium). Weißes Pulver, löslich in Wasser.
11. **Natrium nitrosum**, NaNO2 (Natriumnitrit, salpetrigsaures Natrium). Weißes bis schwach gelbliches Pulver. Löslich in 1,5 Teilen Wasser.
12. **Natrium phosphoricum**, Na2HPO4+12H2O (Dinatriumphosphat, Natriumphosphat, Natriummonohydrogenphosphat). Farblose monokline Prismen. Leicht löslich in kaltem Wasser. Sehr leicht löslich in heißem Wasser.
13. **Natrium peroxydatum**, Na2O2 (Natriumsuperoxid, Natriumperoxid). Gelblichweißes Pulver. Löslich in Wasser unter Bildung von Natriumhydroxid, Sauerstoff oder Wasserstoffsuperoxid.
14. **Natrium sulfuratum**, Na2S+9H2O (Natriumsulfid, Schwefelnatrium). Weiße bis schwach gelbliche zerfließliche Kristalle. Sehr leicht löslich in Wasser. Riecht nach Schwefelwasserstoff. [Vorsicht beim Arbeiten mit Sulfiden! In saurer Lösung entweicht Schwefelwasserstoff, der genau so giftig wie Blausäure ist. H2S besitzt zwar, im Gegensatz zur Blausäure, einen intensiven Warngeruch, dieser verschwindet jedoch bei gefährlich hohen Konzentrationen!].
15. **Natrium sulfuricum**, Na2SO4+10H2O (Natriumsulfat, schwefelsaures Natron, Glaubersalz). Farblose monokline Prismen, die an der Luft teilweise verwittern und undurchsichtig werden. 100 Teile Wasser lösen bei 18 ^{O}C 48 Teile Salz auf.
16. **Natrium sulfurosum**, Na2SO3+7H2O (Natriumsulfit, schwefligsaures Natrium). Farblose Kristalle, leicht verwitternd. Sehr leicht löslich in Wasser, schwer löslich in Alkohol.
17. **Natriumsuperoxid** siehe Natrium peroxydatum.
18. **Natrium thiosulfuricum**, Na2S2O4+5H2O (Natriumthiosulfat, unterschwefligsaures Natron, Fixiernatron, Fixiersalz). Weiße, durchsichtige, monokline Prismen. Löslich in 0,65 Teilen Wasser. Bei 50 ^{O}C im eigenen Kristallwasser schmelzend.
19. **Nelkenöl** siehe Oleum caryophyllum.
20. **Niccolum sulfuricum**, NiSO4+7H2O (Nickelsulfat). Smaragdgrüne Kristalle, löslich in 3 Teilen Wasser.

O

1. **Oleum caryophyllum** (Nelkenöl). Etherisches Öl aus den Blütenknospen von *Caryophyllum aromaticum*. Gelbliche bis braune Flüssigkeit. Besteht hauptsächlich aus Eugenol. Leicht löslich in Alkohol und Ether. Löst Zelloidin auf. D = 1,06-1,07. Siedepunkt 250 ^{O}C.
2. **Oleum bergamottae** (Bergamottöl). Gelblichgrünes, leicht bewegliches Öl aus den frischen Fruchtschalen von *Citrus bergamia*. Sehr leicht löslich in Alkohol und Ether. D = 0,883-0,886.
3. **Oleum cedri ligni** (Cedernholzöl, Zedernöl). Gelbliche dickliche Flüssigkeit, löslich in Alkohol. D = 0,906 - 0,985. Das eingedickte Zedernöl - Immersionsöl - ist nicht in Alkohol, nur in Xylol und Chloroform löslich.
4. **Oleum eucalypti** (Eukalyptusöl). Öl aus den Blättern von *Eucalyptus globosus*. Leicht bewegliche Flüssigkeit von gelber Färbung. D = 0,91- 0,93. Sehr leicht löslich in Alkohol und Ether.
5. **Oleum lini** (Leinöl). Gelbes, fettes, trocknendes Öl aus den Samen von Linum *usitatissimum*. Löslich in Alkohol und Ether. Gekochtes Leinöl trocknet rascher als ungekochtes Öl.
6. **Oleum origani** (Origanumöl, Dostenöl). Dünnflüssiges, helles, gelbliches etherisches Öl. Sehr leicht löslich in Alkohol.
7. **Oleum ricini** (Rizinusöl, Oleum palmae christi). Fettes Öl aus den Samen von *Ricinus communis*. Schwach gelbliches Öl von dicklicher Beschaffenheit. Leicht löslich in Alkohol, löslich in Essigsäure, unlöslich in Benzin und Benzol. D = 0,95 - 0,97.

8. **Oleum terebinthinae** (Terpentinöl). Besteht fast ausschließlich aus Pinen. Farblose Flüssigkeit. D = 0,860 - 0,870. Siedepunkt 162 ^{O}C. Löslich in Alkohol, Ether.
9. **Origanumöl** siehe Oleum origani.
10. **Osmiumsäure** siehe Acidum osmicum.
11. **Oxalsäure** siehe Acidum oxalicum.

P

1. **Paraffin** besteht aus verschiedenen Kohlenwasserstoffen.
2. **Paraffinum liquidum**. Klare, farblose Flüssigkeit, D = 0,880, unlöslich in Wasser und in Alkohol, löslich in Ether, Amylalkohol, Benzin, Benzol und Chloroform.
3. **Paraffinum solidum**. Weiße wachsartige Masse, löslich in Xylol, Toluol, Ether, Chloroform, Benzol und Dioxan. Schmelzpunkt je nach Sorte von 30-60 ^{O}C.
4. **Paraldehyd**. Klare, farblose Flüssigkeit, in 10 Teilen Wasser löslich, mit Alkohol und Ether in jedem Verhältnis mischbar. D = 0,992 - 0,994, Erstarrungspunkt 10-11^{O}C, Siedepunkt 125 ^{O}C.
5. **Paraformaldehyd** (Polymerer Formaldehyd). Weißes Pulver, unlöslich in kaltem Wasser, in Alkohol und Ether. Spaltet bereits bei Zimmertemperatur Formaldehyd ab.
6. **Paraphenylendiamin**. Rötliche Kristallblättchen. Löslich in Wasser, Alkohol und Ether. Schmelzpunkt 140 ^{O}C. Giftig! [para-Phenylendiamin färbt sich an der Luft bald schwarz; man verwendet besser das entsprechende Chlorid oder Sulfat, sofern in wässriger Lösung gearbeitet werden kann].
7. **Pepton siccum**. Durch Pankreasverdauung aus Fleisch gebildeter Eiweißkörper. Hellgelbes Pulver. Leicht löslich in Wasser. Bekannte Handelsmarke ist Pepton *Witte*.
8. **Phenol** siehe Acidum carbolicum.
9. **Phloroglucin**. Weiße oder gelbliche Kristalle. Löslich in 100 Teilen Wasser, ferner löslich in Ether und in Alkohol.
10. **Phosphorsaures Kalium** siehe Kalium biphosphoricum und Kalium phosphoricum.
11. **Pikrinsäure** siehe Acidum picrinicum
12. **Piperin**. Alkaloid aus den Früchten von *Piper nigrum* (Pfeffer). Gelbliche monokline Kristalle. Schmelzpunkt 130 ^{O}C. Löslich in Alkohol, Ether, Benzol und Chloroform.
13. **Phosphormolybdänsäure** siehe Acidum phospho-molybdaenicum.
14. **Phosphorwolframsäure** siehe Acidum phospho-wolframicum
15. **Plastilin**. Knetmasse, bestehend entweder aus feinst geschlämmtem Ton mit Dextrin oder Gummi arabicum, Wasser und Glycerin oder aus Wachs, Zinkoxid, Schwefel und Olivenöl. Beide Massen trocknen nicht, sondern bleiben weich und knetbar.
16. **Plumbum aceticum** (essigsaures Blei, Bleizucker, Bleiacetat). Farblose Kristalle, schwach nach Essig riechend. Löst sich in 2,3 Teilen Wasser.
17. **Plumbum formicum** (Ameisensaures Blei, Bleiformiat). Glänzende rhombische Prismen, löslich in Wasser.
18. **Plumbum nitricum**, Pb(NO3)2 (Bleinitrat, salpetersaures Blei). Weiße, durchscheinende Kristalle. Leicht löslich in Wasser, schwer löslich in Alkohol.
19. **Pyridin**. Farblose, giftige Flüssigkeit. Mischbar mit Wasser, Alkohol, Ether, Benzin, fetten Ölen und vielen anderen Stoffen. Siedepunkt 118 ^{O}C. Pyridin wird wasserfrei gehalten durch Ätznatron in Kugeln oder Stangen.
20. **Pyridinbasen**. Gemisch basischer Stoffe aus der trockenen Destillation stickstoffhaltiger organischer Stoffe. Farblose Flüssigkeit von üblem Geruch. Löslich in Alkohol.
21. **Pyrogallussäure** (Pyrogallol) siehe Acidum pyrogallicum.

Q

1. **Quecksilberchlorid** siehe Hydrargyrum bichloratum.

R

1. **Realgar**, As2S3 (Arsensulfür, Arsensulfid, Arsen-III-sulfid). In der Natur vorkommendes Arsenerz. Reines Realgar kristallisiert in rubinroten monoklinen Prismen.
2. **Resorcin** (meta-Dihydroxibenzol). Leichte weiße Kristallblättchen. Löslich in 0,6 Teilen Wasser und in 0,5 Teilen Alkohol. Ferner leicht löslich in Ether und in Glycerin.
3. **Ricinusöl** siehe Oleum ricini.
4. **Rohrzucker** siehe Saccharose.
5. **Ruthenium chloratum**, Ru2Cl6 (Rutheniumsesquichlorid, Ruthenium-III-chlorid). Zerfließliche braunrote Kristalle, löslich in Wasser.
6. **Ruthenium oxychloratum ammoniakale** Ru2(OH)2Cl4.7NH3+H2O (Rutheniumoxichloridammoniak). Braunrotes Pulver, löslich in Wasser.

S

1. **Saccharose** (Rohrzucker, Rübenzucker). Große farblose monokline Prismen, leicht löslich in Wasser, schwerlöslich in Alkohol, unlöslich in Ether.
2. **Safrol**. Hauptbestandteile des Sassafrasöles. Farblose bis gelbliche Flüssigkeit, leicht löslich in Alkohol oder Ether. D = 1,108.
3. **Salizylsäure** siehe Acidum salicylicum.
4. **Salmiak** siehe Ammonium chloratum
5. **Salmiakgeist** siehe Liquor ammonii caustici.
6. **Salol** (Phenylsalicylat, Salicylsäurephenylester). Weißes kristallines Pulver. Löslich in 0,3 Teilen Ether, in 10 Teilen Alkohol. Löslich in Chloroform. Schmelzpunkt 42 ^{O}C.
7. **Salol camphoratum** (Camsal). Gemenge aus 3 Teilen Salol mit 2 Teilen Kampfer. Gelbliche ölige Flüssigkeit, löslich in Alkohol, Ether, Chloroform und Ölen.
8. **Salpetersäure** siehe Acidum nitricum.
9. **Salpetersaures Blei** siehe Plumbum nitricum.
10. **Salpetersaures Silber** siehe Argentum nitricum.
11. **Salzsäure** siehe Acidum hydrochloricum.
12. **Salzsaurer Alkohol** (Salzsäurealkohol, HC1-Alkohol). 100 Teile 50-60 %iger Weingeist werden mit 3-5 Teilen Salzsäure gemischt. Es sind jedoch eine Reihe anderer Prozentgehalte in Gebrauch, diese sind diese an geeigneter Stelle im Text angeführt.
13. **Sandarac** (Resina sandaraca). Gelbliches Harz in kleinen Stücken mit schwachem gewürzhaftem Geruch. Löslich in Alkohol absolutus und in Dioxan. Siehe auch § 236.
14. **Schellack**. Erstarrtes Harz ostindischer Bäume. Hauptlieferant ist der gewöhnliche Gummilackbaum *Croton lacciferum*, der auf Stiche der Lackschildlaus hin den Schellack absondert. Es gibt verschiedene Handelssorten. Die verbreitetste Sorte ist der Blätterlack, dünne, spröde, scharfkantige rotbraune Blättchen. Weißer Schellack ist mit Chlor gebleicht. Löslich in Spiritus. Anwendung zu Lacken, auch zu Siegellack.
15. **Schwefelkohlenstoff** siehe Carboneum sulfuratum.
16. **Schwefelnatrium** siehe Natrium sulfuratum.
17. **Schwefelsäure** siehe Acidum sulfuricum.
18. **Schwefelsaures Kupfer** siehe Cuprum sulfuricum.
19. **Schweflige Säure** siehe Acidum sulfurosum solutum.
20. **Schwefligsaures Natron** siehe Natrium sulfurosum.
21. **Siegellack**. Meistens Gemische von Kolophonium mit Schellack, die mit anorganischen Stoffen versetzt sind. Wird beim Erhitzen zuerst weich und schmilzt dann.
22. **Silbernitrat** siehe Argentum nitricum.

23. **Silberoxid** siehe Argentum oxydatum.
24. **Stearin** siehe Acidum stearinicum.
25. **Styrax liquidus depuratus** (Styrax, Storax). Flüssiger Balsam aus der Rinde von *Liquidambur orientalis Miller*. Bestandteile sind: Styrol, Zimtsäure, Styracin, Storesin und Ethylvanilin. Harzartige gelbe Flüssigkeit, mit Xylol mischbar.
26. Sublimat siehe Hydrargyrum bichloratum.
27. **Stannum bichloratum** Na2[SnCl6]+H2O (Natrium-stannichlorid, Zinnchlorid, Chlorzinn, Natriumhexachlorostannat-IV) [Die Bezeichnungen Zinnchlorid und Chlorzinn sind irreführend bzw. falsch]. Weiße Kristallmasse, löslich in Wasser.
28. **Stannum chloratum** SnCl2+2H.O (Zinnchlorür, Zinn-II-chlorid). Weiße Kristalle, löslich in HCl-haltigem Wasser. Nimmt Sauerstoff aus der Luft auf.
29. **Syndetikon**. Eine durch Zusatz von Essigsäure haltbar gemachte Gelatinelösung, die als Klebstoff oder Kitt benützt wird. Früher auch aus Fischleim (Hausenblase) hergestellt.

T

1. **Tannin** siehe Acidum tannicum.
2. **Tartarus stibiatus** (Brechweinstein). Weiße verwitternde Kristalle oder weißes Pulver. Löst sich in 17 Teilen Wasser bei 20 ^{O}C. Unlöslich in Alkohol.
3. **Terpentinöl** siehe Oleum terebinthinae.
4. **Terpineol**. Farblose Flüssigkeit, D = 0,936 - 0,938, löslich in Alkohol, Xylol und in Carbol-Xylol.
5. **Thymol** (Thymiankampfer). Farblose Kristalle, sehr schwer löslich in Wasser. Leicht löslich in Alkohol, Ether, Chloroform und Schwefelkohlenstoff, löslich in etherischen Ölen. Schmelzpunkt 50 ^{O}C, Siedepunkt 230 ^{O}C.
6. **Tinctura jodi** (Jodtinktur). Dunkelbraune Flüssigkeit, D = 0,89 8 -0,902. Gehalt 7% freies Jod und 3% Kaliumjodid.
7. **Tolufix I und II**. Diatomeeneinschlußmittel nicht bekanntgegebener Zusammensetzung.
8. **Toluol** (Methylbenzol). Farblose Flüssigkeit, löslich in Alkohol, Essigsäure, Aceton, Chloroform und Ether. Kaum löslich in Wasser. D = 0,870, Siedepunkt 110-112 ^{O}C.
9. **Tragagantha** (Traganth). An der Luft erhärtete Schleime kleinasiatischer *Astragalus*-Arten. Verschieden geformte Stücke oder Pulver von weißer oder gelblicher Farbe. In Wasser zu Gallerte löslich.
10. **Traubenzucker** siehe Glykose.
11. **Trichloressigsäure** siehe Acidum trichloraceticum.
12. **Tripel** (Kieselgur, Diatomeenerde). Mehlige, zerreibliche, kreideweiße Masse, die fast ganz aus fossilen Diatomeen besteht. Poliermittel. Der Name stammt von Tripolis (Nordafrika).

U

1. **Übermangansaures Kali** siehe Kalium permanganicum.
2. **Unterschwefligsaures Natron** siehe Natrium thiosulfuricum.

V

1. **Vanillin** (Vanillekampfer). Weiße Kristallnadeln, schwer löslich in kaltem Wasser, leichter löslich in heißem Wasser, leicht löslich in Alkohol, Ether und Chloroform. Schmelzpunkt 80 ^{O}C.
2. **Vaselin, Vaseline**. Weiße oder gelbe Weichparaffine aus Petroleumdestillationsrückständen. Schmelzpunkt 42-47 ^{O}C. Unlöslich in Wasser und Glycerin, schwer löslich in Alkohol, leicht löslich in Benzin, Benzol, Chloroform und Ether.
3. **Venetianer Seife**. Aus Olivenöl bereitete Natronseife, löslich in Wasser und in Alkohol.

W

1. **Wachs** siehe Cera alba und Cera flava.
2. **Wasserglas** siehe Kalium silicicum.
3. **Wasserstoffsuperoxid** siehe Hydrogenium peroxydatum.
4. **Weinsäure** siehe Acidum tartaricum.
5. **Weinstein** siehe Kalium tartaricum.
6. ***Wittscher* Zement**. Bernsteinlackartiger, sehr dünner Verschlußlack nicht näher bekanntgewordener Zusammensetzung.

X

1. **Xylol** (Dimethylbenzol). Farblose Flüssigkeit, leicht löslich in Alkohol, Ether. Siedepunkt 140 ^{O}C. [In der Mikrotechnik wird das Isomerengemisch verwendet].

Z

1. **Zedernholzöl** siehe Oleum cedri ligni.
2. **Zelloidin**. Höchst konzentriertes Collodium. Handelsformen: Tafeln in Blechdosen, ferner Lösungen mit einem Gehalt von 2%, 4% oder 8% in Ether-Alkohol. Trocken explosibel.
3. **Zincum chloratum**, ZnCl2 (Chlorzink, Zinkchlorid). Weiße, ätzende, zerfließliche Masse. Sehr leicht löslich in Wasser und in Alkohol. [Es ist nicht ganz klar, ob im Text immer kristallwasserfreies Zinkchlorid gemeint ist; zum Ansetzen von „Chlorzinkjod-Lösung“ muß das kristallwasserfreie Salz verwendet werden].
4. **Zincum jodatum** ZnJ2 (Jodzink, Zinkjodid). Weißes hygroskopisches Pulver, leicht löslich in Wasser.
5. **Zincum sulfo-carbolicum** (Zincum sulfo-phenolicum, Zinkphenolsulfonat). Wasserhelle Kristalle oder weißes Pulver. Sehr leicht löslich in Wasser und Alkohol.
6. **Zinnchlorid** siehe Stannum bichloratum.
7. **Zinnchlorür** siehe Stannum chloratum.
8. **Zitronensäure** siehe Acidum citricum.
9. **Zitronensaures Eisen** siehe Ferrum citricum.
10. **Zitronensaures Eisen-Ammonium** siehe Ferri ammonium citricum.
11. **Zyankali** siehe Kalium cyanatum.

§ 532.

Zusammenstellung der Eigenschaften einiger häufiger in der Literatur genannten organischer und anorganischer Farbstoffe

Was man unter C vermißt, suche man unter Z und K

Die den Farbstoffen nachgestellten Nummern sind die Nummern in den Farbstofftabellen von *Schulz-Julius*.

T: Technische Anwendung

M: Mikrotechnische Anwendung

[Die in der Mikroskopie verwendeten Farbstoffe sind nur selten chemisch reine Substanzen. Gelegentlich kann es vorkommen, daß die heute bei der Herstellung nicht mehr auftretenden Verunreinigungen für die Färbekraft wesentlich waren, wie dies für Orange G bekannt ist; man muß daher bei der Anwendung der von *Schömmer* gegebenen Färbevorschriften gelegentlich mit Mißerfolgen rechnen. Wenn eine Färbung nicht gelingt, ist aber auch zu bedenken, daß der Amateur seine Lösungen gewöhnlich mit Brennspiritus ansetzen muß - man sollte dann probeweise auf den teuren absoluten Alkohol ausweichen; Methanol und Isopropanol sind dagegen mit Sicherheit ungeeignet. Auch die Zugabe einer kleinen Menge Essigsäure zur Farblösung kann versucht werden].

Akridingelb (901). Basischer Akridinfarbstoff. Löslich in Wasser und Alkohol. Mäßig lichtecht, alkaliecht.
T: Nach Tanninbeize für Baumwolle und Seide. Auch für Leinen und Jute. Findet wie andere Akridinfarbstoffe auch medizinische Verwendung als Desinfektionsmittel.
M: Plasmafarbstoff. Kernfärbung zu schwach.

Akridinorange (902). Basischer Akridinfarbstoff (Diphenylmethan-Abkömmling). Löslich in Wasser und Alkohol. Mäßig lichtecht, alkaliecht.
T: Nach Tannin-Brechweinsteinbeize für Seide und Baumwolle.
M: Kernfärbung.

Akridinrot (854). Basischer Akridinfarbstoff (Diphenylmethanfarbstoff). Löslich in Wasser und Alkohol. Mäßig lichtecht.
T: Färbt Wolle in saurem Bade direkt. Baumwolle erst nach Tanninbeize.
M: In der Histologie zur Kern- und Bindegewebsfärbung nach *Traina*.

Alizarinbordeaux (1168). Saurer Anthrachinonfarbstoff (Tetraoxi-anthrachinon), löslich in Alkohol, unlöslich in Wasser. Sehr licht- und waschecht.
T: Beizenfarbstoff. Färbt mit Aluminiumbeize rotblau, mit Chrombeize schieferblau und mit Berylliumbeize tiefblau (Berylliumchlorid).
M: Beizenfarbstoff nach *Becher*.

Alizarincyanin RR (1172). Saurer Anthrazenfarbstoff (Pentaoxi-anthrochinon). Unlöslich in Wasser, löslich in Alkohol, Ammoniak, Eisessig. Sehr lichtecht.
T: Nach Beize mit Tannin-Brechweinstein oder anderen Metallsalzen in der Färberei zur Färbung von Wolle und Baumwolle.
M: Als Beizenfarbstoff nach *Becher* zur Kernechtfärbung.

Alizarincyanin G (1164). Saurer Anthrachinonfarbstoff (Di- oder Trioxi-anthrachinon). Löslich in Alkohol, Ammoniak und Eisessig. Unlöslich in Wasser. Sehr lichtecht.
T: Färbt nach Chrombeize Wolle und Baumwolle.
M: Als Beizenfarbstoff nach *Becher* zur Kernechtfärbung und zur Algenfärbung.

Alizarindunkelgrün W (1133). Saurer Naphthalinfarbstoff. Löslich in Wasser und in Alkohol. Echtheit gut.

T: Beizenfarbstoff.

M: Farbstoff nach *Becher*.

Alizaringelb (1140). Ellagsäure (Teig.). Dilakton einer Hexaoxi-diphenylcarbonsäure. Unlöslich in Wasser, kaum löslich in Alkohol. Sehr lichtecht und waschecht.

T: Als Beizenfarbstoff (Chrom) für Wolle. Die schwachgelbe Färbung kann mit Eisenchlorid ($FeCl_3$) blauschwarz gedunkelt werden.

M: Mit Chromalaun als Beizenfarbe nach *Becher*.

Alizarinorange. Saurer Anthrazenfarbstoff (Nitro-alizarin). In wässriger Sodalösung löslich. Licht- und waschecht.

T: Saurer Beizenfarbstoff auf Wolle aus saurem Bade mit Alaunnachbehandlung.

M: Plasmafärbung nach blauen und grünen *Becher*-Farben. Vitalfärbung: Plastosomenfärbung nach *Benda*.

Alizarinsaphirol B, auch **BA**. Saurer Antrachinonfarbstoff (Natriumsalz der 1,5-Dioxi-4,8-diamino-anthrachinon-2,6-disulfosäure). Löslich in Wasser. Sehr lichtecht.

T: Färbt Wolle in saurem Bade und auch nach Chrombeize.

M: Beizenfarbstoff nach *Becher*.

Alizarinviridin (1193). Saurer Anthrachinonfarbstoff (Oxi-amino-anthrachinon). Löslich in Wasser und teilweise in Alkohol. Sehr lichtecht.

T: Färbt Wolle und Seide mit Chrombeize oder aus einem Bade von Glaubersalz mit Schwefelsäurezusatz.

M: Als einfache wässrige Lösung guter Plasmafarbstoff. Als Beizenfärbung zur Kernechtfärbung nach *Becher*. Zur Totalfärbung von Süßwasseralgen, von Pilzen und ähnlichen botanischen Objekten. Als mikroskopische Färbung, besonders als Beizenfärbung von ausgezeichneter Haltbarkeit.

Anilinblau, wasserlöslich (816). Andere Namen: **Baumwollblau R**, **Wasserblau R**, China-blau. Natriumsalz des Triphenyl-rosanilins. Saurer Anilinfarbstoff. Löslich in Wasser und Alkohol. Ziemlich lichtecht.

T: Färbt Wolle und Seide direkt, Baumwolle nach Beizung.

M: Als schwache Sulfosäure färbt das Anilinblau sowohl Plasma wie Kerne. Plasmafärbung, Pilzmycelien, Algen. In der Histologie zur Azanfärbung nach *Heidenhain*.

Anthrazenblau (1173). Saurer Anthrachinonfarbstoff (Hexaoxi-anthrachinon). Löslich in kochendem Wasser. Sehr lichtecht.

T: Färbt alaungebeizte Wolle blau, chromgebeizte Wolle grünblau.

M: Als Beizenfarbstoff nach *Becher*.

Anthrazengelb (330). Saurer Azofarbstoff. Schwer löslich in Wasser. Sehr echt.

T: Zum Färben von Wolle und Baumwolle nach Chrombeize.

M: Plasmafarbstoff.

Aurantia (15). Saurer Nitrofarbstoff (Hexanitro-diphenylamin). Trocken sehr explosibel. Löslich in Wasser. Lichtechtheit schlecht, ebenso Waschechtheit.

T: Als sehr brisanter Sprengstoff in Torpedos. Färbt Wolle und Seide in saurem Bade.

M: Plasmafärbung, besonders nach Hämatoxylinfärbungen.

Bemerkung: Als Aurantia werden in der Literatur manchmal andere gelbe, nicht explosible Farben bezeichnet wie Methylorange, Chrysoidin usw.

Azokarmin B (948). Disulfosäure des Phenyl-rosindulins. Saurer Farbstoff. In Wasser leicht löslich. Sehr lichtecht.

T: Färbt Wolle in saurem Bade rot. Baumwolle überhaupt nicht.

M: In der Histologie mannigfache Verwendung als Kern- und Plasmafärbung. Vom Kern wird das Oxychromatin und das Basichromatin gefärbt. Anwendung bei der Azanfärbung.

Marke **G** (Teigform, 949). Trisulfosäure des Phenyl-rosindulins. Saurer Azinfarbstoff wie Azokarmin B. In Wasser schwer löslich. Sehr lichtecht.

T: Wie oben.

M: Wie oben. Meistens wird jedoch die leicht lösliche Marke B verwendet.

Azorubin S (208). Andere Namen: **Echtrot C**. Saurer Monazofarbstoff. In Wasser leicht löslich. Lichtecht.

T: Zur Färbung von Wolle und Seide in saurem Bade.

M: In der Histologie und Zoologie als Alaunbeizenfarbstoff, der Kerne, Muskeln und Fibrin rot färbt.

Bengalrosa A (889). Saure, dem Eosin ähnliche Farbenstoffe (Tetrachlor-phthalein, Tetrajod-phthalein). Löslich in Wasser. Wenig lichtecht.

T: Färbt Wolle in saurem Bade, Baumwolle im Kochsalzbade.

M: Plasmanachfärbung nach Hämatoxylinfärbungen.

Benzoazurin G (497). Saurer Azofarbstoff (Benzidinfarbstoff). Löslich in Wasser mit Zusatz von etwas Soda oder 20% Glaubersalz. Die Färbung ist lichtecht, aber nicht waschecht, wenn nicht mit einem Kupfersalz nachbehandelt wird.

T: Färbt Baumwolle substantivisch.

M: Für Gewebsfärbungen an Phanerogamen und Kryptogamen. (unverholzte Gewebe blau).

Benzopurpurin B, **4B** und **10B** (448 und 449). Saurer Azofarbstoff (Benzidinfarbstoff). Echtheit wie bei Benzoazurin, ebenso die Löslichkeit.

T: Färbt substantivisch auf Baumwolle.

M: Wie Benzoazurin, jedoch ist die Färbung rot.

Bismarckbraun G (311). Weitere Namen: Manchesterbraun. Basischer Disazofarbstoff nicht völlig konstanter Zusammensetzung. Löslich in Wasser und Alkohol. Lichtecht bei Nachbeizung mit Aluminiumsulfat oder Gerbstoffen.

T: Zur Färbung von Leder, Jute und Kokos. Färbt Holz und dient zur Lackherstellung. In der Färberei färbt es Wolle und Seide im neutralen Bade, Baumwolle usw. nach Tannierung.

M: Färbung lebender Gewebe, Bakterienfärbung, in der Histologie zur Kern- und Schleimfärbung. Wird wegen der wenig schönen braunen Farbe nur noch zur Kontrastfärbung und bei schwierig sich färbenden Objekten angewandt.

Bemerkung: Mit Bismarckbraun wird vielfach das chemisch etwas verschiedene **Vesuvin** (318) bezeichnet, das sich färbetechnisch genau wie Bismarckbraun verhält.

Bleu de Lyon (792). Unter der Bezeichnung Bleu de Lyon, Lyonerblau, Rosanilinblau**, Spritblau** usw. sind eine Reihe von Farbstoffen im Handel, die sich alle vom Fuchsin ableiten, chemisch etwas voneinander verschieden sind, sich färberisch aber alle gleich verhalten. Alle diese Farbstoffe sind phenyliertes Rosanilin. Basische Farbstoffe. Löslich in Alkohol, unlöslich in Wasser. Lichtecht.

T: Zur Herstellung von Spritlacken, zum Färben von Pappe und zum Bedrucken von Baumwolle.

M: Plasmafärbungen nach roten, gelben und braunen Kernfärbungen.

Bordeaux R (123). Andere Namen: **Echtrot B**. Saurer Benzidinfarbstoff, ähnlich dem Benzopurpurin. Löslich in Wasser und Alkohol. Mäßig lichtecht, wenig waschecht.

T: Färbt Wolle und Seide in saurem Bade.

M: Plasmafarbstoff, vor allem nach der Hämatoxylin-Eisenalaunfärbung nach *Heidenhain* und anderen.

Brasilin (1375) oder Rotholzextrakt ist der Extrakt aus verschiedenen amerikanischen Hölzern wie Limaholz, Pernambukholz, Bahiaholz, Brasilholz. Das Brasilin ist die Leukoverbindung des Brasileins, das aus dem Brasilin durch Aufnahme von Luftsauerstoff entsteht. Saurer Farbstoff (Chromonabkömmling). Löslich in Wasser und Alkohol. Wenig lichtecht.

T: Die Verwendung zur Wollfärbung und zum Baumwolldruck ist kaum noch nennenswert.

M: Kann in der Mikroskopie nach den gleichen Arbeitsvorschriften wie Hämatoxylin verwendet werden. Die Färbungen sind wenig echt. Wird kaum mehr verwendet.

Brillantgrün (760). Basischer Diphenylmethanfarbstoff. Löslich in Wasser und Alkohol. Wenig lichtecht.

T: Färbt vorgeschwefelte Wolle, ferner Baumwolle nach Vorbeizung mit Tannin und Brechweinstein.

M: Kernfarbstoff. Zusatz für Bakteriennährböden.

Brillantkresylblau (992). Andere Namen: Cresylblau 2 BS. Basischer Oxazinfarbstoff. Löslich in Wasser. Lichtechtheit gut.

T: Zum Färben von Baumwolle nach Beizung von Tannin und Brechweinstein.

M: Hauptsächlich zur Färbung von Blutausstrichen.

Chinolinblau (921). Andere Namen: Cyanin, Zyanin. Basischer Chinolinfarbstoff. Löslich in Alkohol, unlöslich in Wasser. Lichtechtheit mäßig.

T: Als Sensibilisator der Trockenplatten für Rot in der Photographie.

M: Früher häufig verwendet als Kernfarbstoff und zur Darstellung verholzter Membranen. Spezialfarbstoff zur Darstellung der Gonidien im Flechtenthallus.

Chromotrop 2R (44). Saurer roter Azofarbstoff. Leicht löslich in Wasser, schwer in Alkohol. Lichtecht.

T: Zur Wollfärbung. Die ursprünglich fuchsinrote Färbung kann durch Nachchromierung violett getont werden.

M: Plasmanachfärbung, besonders nach *Delafieldschem* Hämatoxylin.

Chrysoidin (27). Basischer Azofarbstoff (salzsaurer Diamido-azobenzol). Löslich in Wasser. Mäßig lichtecht.

T: Desensibilisator für Photoemulsionen. Zum Färben tannierter Baumwolle, ferner für Jute und Leder. Färbt Wolle und Seide direkt.

M: Gute Membranfärbung für Holz. Plasmafärbung. Chrysoidin fixiert Fette und Öle und macht sie bei Gegenwart eines Oxydationsmittels (z.B. 10 %ige Chromsäure in Alkohol) unlöslich und färbt sie dabei braun.

Cochenille. Kein einheitlicher Farbstoff, sondern gepulverte getrocknete Weibchen der Cochenilleblattlaus. (*Coccus cacti coccinelifera L*). Diese wird in Mittelamerika gezüchtet in eigenen Cactusplantagen und enthält verschiedene Alkalisalze der Karminsäure. Für 1 kg gemahlene Cochenille werden 140000 Blattläuse benötigt. Cochenille enthält 10-15 % des Gewichtes an Farbstoffen. Als beste Sorte gilt die schwarze Zaccatilla.

T: Früher viel in der Färberei verwendet. Darin neuzeitlich durch die roten Azofarbstoffe verdrängt.

M: Cochenille wird auch noch jetzt angewendet, da es eine wunderbar reine Färbung ergibt. Leider ist eine gute Qualität schwer erhältlich.

Cölestinblau B. Saurer Farbstoff (Gallamin-Abkömmling). Löslich in Wasser und Alkohol. Lichtecht.

T: Färbt Wolle und Baumwolle nach Chrombeizen.

M: *Becher*-Farbstoff. In Lösung jedoch nur ganz kurz haltbar.

Corallin (844). Andere Namen: Korallin, **Päonin**. Saurer Triarylmethanfarbtsoff. Natriumsalz des Aurins. Löslich in heißem Wasser und in Alkohol. Wenig echt.

T: Als Indikator und in der Photographie.

M: Färbung von Schleimen. Corallinsoda nach *Straßburger* zum Färben von Kallose.

D

Diaminblau 3R (521). Saurer Azofarbstoff (Benzidinfarbstoff). Löslich in Wasser, unlöslich in Alkohol. Echtheit mäßig.

T: Färbt im Glaubersalzbad direkt Baumwolle, Wolle und Seide.

M: Verwendung in der Histologie. In der Botanik schwarze metachromatische Zellwandfärbung.

E

Echtgrün (1). Andere Namen: Solidgrün O, M. **Fastgreen O**. Saurer Farbstoff (Dinitro-resorcin). Löslich in Alkohol, unlöslich in Wasser. Sehr echt.

T: Lackfarbstoff für eisengebeizte Baumwolle.

M: Zur Algenfärbung nach *Pfeiffer*. Färbt mit Eisenbeize grün, mit Kobaltbeize orange.

Entwicklungsfarben. Unter Entwicklungsfarbstoffen versteht man insbesondere die sogenannten Eisfarben, welche die Firma Bayer als Naphthol-AS-Farbstoffe bezeichnet. Sie sind sämtlich Azofarbstoffe.

T: Baumwolle wird zuerst mit der Naphtholkomponente aus alkalischer Lösung behandelt. Die eigentliche Färbung entsteht durch das Entwickeln mit einer Diazoniumsalzlösung. Die Färbungen sind sehr licht- und waschecht. Zugleich steht ein großer Farbenreichtum zur Verfügung.

Zu den Entwicklungsfarben müssen auch die Naturfarbstoffe Krapp und Indigo gerechnet werden.

M: In der Mikroskopie sind Versuche mit den Entwicklungsfarbstoffen nicht bekannt geworden. Zu beachten ist, daß sie nur Zellulose färben dürften.

Eosin (881). Darunter versteht man verschiedene stickstofffreie Farben der Xanthenreihe. Sie sind sämtlich Abkömmlinge des Fluoresceins. Löslich in Wasser und Alkohol. Mäßig lichtecht. Saure Farben, meistens Natriumsalze.

T: Zur Herstellung von roter Tinte. Zum Färben von Wolle und Seide. Für orthochromatische Platten in der Photographie.

M: Plasmafarbstoff nach Hämatoxylinfärbungen, nach Methylenblau sowie nach blauen oder grünen Kernfärbungen überhaupt. Bestandteil der Giemsafärbung.

Bemerkung: Außer dem eigentlichen Eosin sind in der Mikroskopie noch folgende weitere Eosine in Gebrauch:

Eosinscharlach (Dibrom-dinitro-fluorescein)
Erythrosin (Jodeosin, Eosin extra gelblich, Dijod-fluorescein)
Erythrosin extra bläulich (Tetrajod-fluorescein)
Rose bengale (Tetrajod-dichlor-fluorescein oder Tetrajod-tetrachlor-fluorescein).

Diese Eosine werden bei der Färbung von Algen verwendet.

F

Fuchsin (780). Andere Namen: **Diamantfuchsin**, Rubin. Basischer Farbstoff (Triarylmethanfarbstoff). Der Farbstoff enthält meistens etwas Parafuchsin (Rosanilin). Löslich in Wasser. Mäßig lichtecht.

T: Färbt Wolle und Seide direkt, Baumwolle erst nach Tannin-Brechweinsteinbeize.

M: Beliebter Bakterienfarbstoff. In Verbindung mit Methylgrün zur Simultanfärbung in der Botanik.

Fuchsin S (800). Andere Namen: **Säurefuchsin, Säurerubin**. Saurer Farbstoff, der sich vom Fuchsin ableitet. Löslich in Wasser, in Alkohol schwer löslich. Mäßig lichtecht.

T: Färbt Wolle direkt, Baumwolle nicht.

M: Plasmafarbstoff nach blauen und grünen Kernfärbungen. Zur Flechtenfärbung und Färbung ähnlich schwierig färbbarer Objekte.

G

Gallaminblau G (Teigform). (1009). Saurer Oxazinfarbstoff. Abkömmling der Gallussäure. Löslich in Wasser. Echtheit gut.

T: Färbt chromgebeizte Wolle blau.

M: Beizenfarbstoff nach *Becher*.

Gallein (897). Saurer Farbstoff (freie Säure). Xanthenfarbstoff. Als Natronsalz in Wasser löslich mit violetter Farbe. Lichtecht.

T: Nach Chrombeizen zum Färben von Wolle und Seide.

M: Kern- und Plasmafarbstoff für Übersichtsbilder in der Histologie (Zentralnervensystem). Algenfarbstoff nach *Pfeiffer v. Wellheim*. Beizenfarbstoff nach *Becher*.

Gallocyanin (998). Saurer Oxazinfarbstoff. Löslich in Wasser. Sehr echt.

T: Marineblaue Färbung auf Baumwolle nach Chrombeizen.

M: Kernfarbstoff nach *Becher*. Verholzte Gewebe werden blau gefärbt.

Galloflavin W (1128). Saurer Oxilaktonfarbstoff. Gallussäure-Abkömmling. In Wasser unlöslich, in Alkohol wenig löslich. Gute Echtheit.

T: Zum Färben von Wolle und Baumwolle nach Chrombeize.

M: Farbstoff nach *Becher*.

Gentianaviolett. Besondere Handelsmarke des Methylvioletts. Enthält neben Methylviolett auch Kristallviolett und manchmal noch andere Farbstoffe.

T: In der Technik nicht verwendet.

M: Bekannter Bakterienfarbstoff für die Färbung nach *Gram*. Kernfarbstoff. Algenfarbstoff. Bestandteil der Dreifachfärbung nach *Fleming*.

H

Hämatoxylin (1376). Hämatoxylin oder Blauholzextrakt aus dem amerikanischen Blutholz oder Campecheholz (*Haematoxylon campechianum*). Das Hämatein entsteht aus dem Hämatoxylin durch Sauerstoffaufnahme aus der Luft. Saurer Farbstoff (Chromonabkömmling). Löslich in Wasser und Alkohol. Als Beizenfarbstoff sehr lichtechte Färbung.

T: Das Hämatoxylin ist in der Technik immer noch ein beliebter Farbstoff für Wollfärbung. Auf Chrombeize ist die Farbe blauschwarz bis reinschwarz, auf Eisenbeize schwarz, auf Zinnbeize rotviolett und auf Aluminiumbeize grauviolett.

M: Nur als Beizenfarbstoff verwendbar. Als solcher hat das Hämatoxylin eine souveräne Bedeutung in Histologie, Pathologie, Zoologie und in der Botanik erlangt. Es ist hier wohl einer

der meist angewandten Farbstoffe. Die Anwendung erfolgt nach zahlreichen Färbevorschriften, je nach dem besonders beabsichtigten Zweck. Kern- und Plasmafarbstoff.

I

Indanthrenfarben. Große Gruppe von künstlichem Küpenfarbstoffen sehr komplizierten Aufbaues. Sie sind sämtlich in Wasser und Alkohol unlöslich, häufig löslich in Xylol, Tetralin und ähnlichen organischen Flüssigkeiten. Diese Lösungen färben jedoch nicht. Sehr lichtecht.

Die Indanthrenfarben, die es in großer Zahl in allen Tönungen gibt, werden in einer Hydrosulfitküpe (Natriumdithionit) unter Zusatz von Natronlauge gelöst und zum Färben ähnlich dem Indigo benutzt. In der Mikroskopie haben sie bisher eine Verwendung nicht gefunden.

Indigo (1301). Amphoterer Naturfarbstoff. Kommt in Europa im Waid, in Ostasien in verschiedenen *Indigofera*-Arten vor. Der reine Indigo wird auch Indigotin genannt. Wird jetzt synthetisch dargestellt. Unlöslich in Wasser, löslich in Xylol und Tetralin, fast unlöslich in Alkohol. Echtheit gut.

T: Als Küpenfarbstoff zum Färben von Wolle und Baumwolle.

M: Keine Anwendung.

Indigosol O (1303). Leuko-indigodischwefelsäureester. Saurer Farbstoff. Löslich in Wasser.

T: Baumwolle wird mit der wässrigen Lösung behandelt, hernach mit Kaliumdichromat der Indigo entwickelt. Wolle wird in essigsaurem Bade kochend gefärbt und dann mit Natriumnitrit und Schwefelsäure gefärbt.

M: Bisher keine Verwendung.

Bemerkung: **Anthrasol O** ist eine dem Indigosol sehr ähnliche oder gleiche Farbe. Es gibt auch gelbe, orange und rote Anthrasole. Sie sind sämtlich Indigoabkömmlinge.

Indigokarmin (1309). Saurer Farbstoff. Natriumsalz der Indigoschwefelsäure. Löslich in Alkohol und Wasser. Lichtunecht. Färbt Wolle und Seide in saurem Bade.

T: Zum Färben von Wolle und Seide.

M: Bestandteil der Färbung nach *Calleya*. Kernfarbstoff in saurer Lösung (Oxalsäure).

Indigoblau. Basischer Farbstoff (Safranin-azo-ß-naphtol-chlorid). Löslich in Wasser und in Alkohol, Gute Echtheit.

T: Färbt Seide direkt, Baumwolle erst nach Tanninbeize.

M: Zum Färben von Phanerogamenschnitten, wobei parasitische Pilze ungefärbt bleiben.

Indulin NN (984). Andere Namen: **Spritblau, Echtblau B, auch Baumwollblau**. Saurer Azinfarbstoff. Löslich in Alkohol und Wasser. Lichtecht.

T: Färbt Wolle in saurem Bade, Baumwolle nach Tanninbeize. Wachsfarbe.

M: Lichtechte Plasmafärbung in der Botanik. Bindegewebsfärbung in der Histologie.

Isaminblau B, R (817). Andere Namen: Baumwollreinblau. Saurer Triphenylmethanfarbstoff. Löslich in Wasser, unlöslich in Alkohol. Mäßig lichtecht.

T: Färbt Baumwolle direkt im Bade mit Essigsäure und Glaubersalz. In der Medizin ist der Farbstoff gegen das Carcinom versucht worden.

M: Lebendfärbung (Zoologie und Histologie).

J

Janusgrün (282). Andere Namen: **Diazingrün S**. Basischer Azofarbstoff. Löslich in Wasser. Mäßig lichtecht.

T: Zur Baumwollfärbung nach Beizung mit Tanninbrechweinstein.

M: Vitalfärbung der Plastosomen.

Jodgrün (790). Basischer Rosanilinabkömmling. Blaustichige Handelsmarke des Methylgrüns. Vielfach wird nur gewöhnliches Methylgrün geliefert. Löslich in Wasser und etwas in Alkohol. Lichtunecht.

T: Zum Färben von Seide im Seifenbade.

M: Färbung von Chloroplasten in Schnitten.

K

Karmin (Carmin) ist eine Verbindung der Karminsäure mit Aluminium, Calcium und Eiweißstoffen. Karmin wird gewonnen, indem heißer wässeriger Cochenilleauszug mit Alaun gefällt wird. Die beste Sorte ist Karmin nacarate. Karmin ist unlöslich in Wasser, Alkohol und Ether. Karmin ist löslich in Wasser bei Zusatz von Borax, kohlensauren und kaustischen Alkalien. Karminfärbungen sind gut haltbar. Siehe auch Cochenille.

T: Wie Karminsäure

M: Wie Karminsäure

Karminsäure (1381). Andere Namen: Carminsäure, Acidum carminicum. Saurer Naturfarbstoff (eine Polyoxyanthrachinoncarbonsäure). Siehe auch: Cochenille. Leicht löslich in Wasser, schwer löslich in Alkohol. Substantivische Färbungen wenig lichtecht. Lichtecht nach Eisenbeizen.

T: In der Kosmetik zu Puder und Lippenstiften. In der Färberei nach Tonerde oder Zinnbeize zum Färben von Wolle und Seide.

M: Bestandteil mancher Karminfärbungen. Gibt mit Metallsalzen Lackfarben, die gleich dem Karmin altbewährte Farben für Kern- und Plasmafärbungen abgeben.

Kernschwarz. Keine organische Farbe im engeren Sinne. Kernschwarz ist eine Eisentinte nicht näher bekanntgegebener Zusammensetzung.

T: Keine Verwendung.

M: Kernfärbung in der Botanik. Ferner Färbung von Zellulosemembranen, von Algen, Pilzen und ähnlichen Objekten.

Kernechtrot (168). Helioechtrubin 2 BL. Saurer Anthrachinonfarbstoff. Unlöslich in Wasser, löslich unter Lackbildung in kochender Aluminiumsulfatlösung. Lichtecht.

T: Zur Lackherstellung.

M: Färbt Kerne, Chromatophoren und Holz.

Kongorot (360). Andere Namen: Dianilrot, Baumwollrot. Saurer Azofarbstoff (Benzidinfarbstoff). Löslich in Wasser. Lichtunecht, säureempfindlich.

T: Zum direkten Färben von Baumwolle im Glaubersalzbade.

M: Plasmafarbe. Im speziellen färbt es in der Zoologie Becher-Zellen, Nervenzellen, Keratin, Zahnschmelz, Blutzellen. In der Botanik verwendet man es zur Färbung von Pilzmycelien, Membranen, Algen. Schließlich ist es Zusatz für bakteriologische Nährböden.

Kresylechtviolett. Basischer Oxazinfarbstoff. Steht in zwei Marken **RR** und besonders metachromatisch zur Verfügung. Löslich in Wasser und Alkohol. Bei Behandlung mit Alkohol verschwindet die Metachromasie. Lichtecht, säureempfindlich.

T: Zur direkten Färbung von Wolle, indirekte Baumwollfärbung nach Beize.

M: Ein ganz vorzüglicher violetter Kernfarbstoff. Zelloidin entfärbt sich beim Differenzieren. Paraffinschnitte färben sich schlechter an. Lebendfärbung in der Zoologie, ferner Schleim- und Kalkfärbung. In der Botanik zum Färben von höheren Pilzen.

Kristallviolett (785). Basischer Farbstoff (Hexamethyl-pararosanilin). Verschiedene Handelsmarken, **O**, auch **10B**. Farbton fast kornblumenblau. Löslich in Wasser und Alkohol. Mäßig lichtecht.

T: Zu Stempelkissen, Tintenstiften und Tinten. Ferner in der Färberei zum Färben und Drucken tannierter Baumwolle, auch von Kunstseide, Leder, Papier usw.

M: Kernfarbstoff. Gliafärbung, Plastosomenfärbung. Bakterienfärbung nach *Gram*. Zum Anfärben von Bakteriennährböden.

L

Lichtgrün SF. Zwei Marken. Bläulich (763), gelblich (765). Saurer Farbstoff (Sulfosäure des Malachitgrüns) Leicht löslich in Wasser, noch löslich in Alkohol, unlöslich in Isopropylalkohol. Wenig lichtecht, alkaliunecht.

T: Färbt Wolle in saurem Bade, Baumwolle gar nicht, auch nicht nach Beizung.

M: Plasmafarbstoff, besonders nach Färbungen mit Safranin und Karmin. In Verbindung mit Safranin besonders zum Färben von Leitbündeln und Gefäßen.

M

Magdalarot (976). Andere Namen: Naphthalinrosa. Basischer Azinfarbstoff. Eigentlich ein unkonstantes Gemisch mehrerer eng verwandter Farbstoffe. Löslich in Wasser und Alkohol. Sehr lichtunecht.

T: Zum Sensibilisieren photographischer Trockenplatten.

M: Bestandteil der von *Pfeiffer* und *Chamberlain* empfohlenen Magdalarot-Anilinblau-Färbung.

Malachitgrün (754). Andere Namen: Solidgrün, Bittermandelölgrün, Benzalgrün, Neuviktoriagrün. Basischer Diamino-triarylmethanfarbstoff. Löslich in Wasser. Wenig lichtecht, säure- und alkaliunecht. [Giftig]

T: Tintenherstellung und Farblacke. Färbt geschwefelte Wolle, Seide und tannierte Baumwolle. Als Medikament gegen die Pünktchenkrankheit der Zierfische.

M: Kernfarbstoff. In der Zoologie zur Lebendfärbung der Infusorien. Färbt die Fibrillen in der Kutikula der Fadenwürmer. Algenfarbstoff. Zusatz für Bakteriennährböden.

Martiusgelb (18). Saurer Farbstoff. Salze des Dinitro-α-naphthols. Löslich in Wasser und Alkohol. Echt.

T: Zum Färben von Teigwaren und von Makkaroni. Färbt Wolle in saurem Bade.

M: Plasmafarbstoff. Bestandteil der Färbung nach *Pianese*.

Methylblau A (815). Auch Baumwollblau genannt. Saurer Triamino-triphenylmethanfarbstoff. Löslich in Wasser. Wenig lichtecht.

T: Zum Färben von Seide und von Baumwolle nach Beizung.

M: Nervenfärbung, Färbung von *Negrischen* Körperchen.

Methylgrün (788). Gemisch verschiedener vom Fuchsin abgeleiteter Farbstoffe basischer Natur. Der Hauptbestandteil ist nach E.Merck ein Zinkdoppelsalz des Chlormethyl-hexamethyl-pararosanilin-chlorhydrats. Löslich in Wasser, wenig lichtecht.

T: Keine Verwendung.

M: Kernfarbstoff. Bekannt in der Form der Methylgrün-Essigsäure nach *Straßburger*. Zu Vitalfärbungen.

Methylviolett (783). Marken **1B** bis **5B**: Pentamethylpararosanilin. **6B**: Gemisch von obigem mit Tetramethyl-pararosanilin. Triamino-triphenylmethanfarbstoffe basischer Natur. Löslich in Wasser, Alkohol und in Amylalkohol. Mäßig lichtecht.

T: Kopierbleistifte, Kopiertinte, Schreibmaschinenbänder. Färbt Wolle und Seide in essigsaurem Bade, Baumwolle nach Beizung.

M: Vital- und Kernfärbung. Bakterienfärbung nach *Gram*.

Methylen-Azur I (1039). Wesentlicher, sich selbst bildender Bestandteil alkalisch gemachter alter Methylenblaulösungen. Ein Gemisch von Di, Tri, und Tetramethyldiaminodiphenazthioniumchloriden. Der Farbstoff wird hergestellt durch Kochen von Methylenblaulösung mit Kaliumdichromat.

M: Zur Herstellung von Methylenazur II nach *Giemsa*.

Methylen-Azur II nach *Giemsa*. Die Farblösung nach *Giemsa* besteht aus gleichen Teilen Methylen-Azur I und Methylenblau (Selbstherstellung unmöglich!).

M: Zum Färben von Blutausstrichen, von Protozooen und von Bakterien.

Methylenblau (1038). Basischer Thiazinfarbstoff. Es sind verschiedene Marken im Handel. **BB**, **BC extra** sind Zinkdoppelsalze, **D** sind Chloride, **medicinale** für medizinische Anwendung. Löslich in Wasser, schwerer in Alkohol. Unlöslich in tertiärem Butylalkohol. Lichtecht.

T: Zum Färben tannierter Baumwolle, zum Kattundruck, zur Herstellung von Tinten, zur Analyse und Untersuchung. In der Medizin: Vielfach innerlich und äußerlich verwendet.

M: Bakterienfarbstoff, ferner zur Darstellung von Nerven, Pilzmycelien. Färbung von Protozoen und von Blutausstrichen. Bestandteil der *Giemsa*-Färbung.

N

Naphthazarin (1130). Andere Namen: **Alizarinschwarz**. Marke **R** ist reinschwarz, Marke **WR** ist rötlich. Saurer Naphthochinonfarbstoff. Löslich in Wasser und Alkohol. Sehr lichtecht.

T: Zur Wollfärbung nach Chrombeize.

M: Kernfarbstoff nach *Becher*.

Naphtholgelb (19). Saurer Nitrofarbstoff. Löslich in Wasser. Sehr lichtecht.

T: Färbt Wolle und Seide in saurem Bade.

M: Gelber Plasmafarbstoff.

Naphtholgrün (5). Saurer Nitrofarbstoff. Löslich in Wasser. Sehr lichtecht.

T: Zum Färben von Kammzeug, Wollgarn und Stückware, auch für Hüte und Seide, letztere im Seifenbade unter Weinsäurezusatz.

M: Grüner Plasmafarbstoff.

Naphtholschwarz 6B (600). Andere Namen: Wollschwarz, Brillantschwarz BD. Löslich in Wasser, unlöslich in Alkohol. Saurer Amidoazofarbstoff. Lichtecht.

T: Färbt Wolle in saurem Bade, Seide und Baumwolle bleiben ungefärbt.

M: Violette bis schwarzer Plasmafarbstoff.

Naphthopurpurin. Saurer Naphthachinonfarbstoff. Löslich in Wasser. Sehr lichtecht.

T: Nach Chrombeizen zum Färben von Baumwolle.

M: Als Kernfarbstoff nach *Becher*.

Neutralrot (946). Anderer Namen: Toluylenrot. Basischer Azinfarbstoff. Löslich in Wasser. Lichtecht, aber alkaliunecht.

T: Zur Färbung von Baumwolle nach Beizung mit Tannin-Brechweinstein. Wolle und Seide werden nicht gefärbt.

M: Färbung der Nervenzellen, Zusatz zu Bakteriennährböden. Lebendfärbung des Zellsaftes der Diatomeen und verschiedener anderer botanischer Objekte.

Nigrosin (980). Saurer Azinfarbstoff. Löslich in Wasser und Alkohol. Lichtecht.

T: Verwendung zu Tinten und Schreibmaschinenbändern. Zur Färbung von Seide und Wolle in saurem Bade. Manche fettlösliche Sorten zu Schuhcreme.

M: Färbung von Spirochäten. Färbung von Totalpräparaten von fadenförmigen Pilzen und Algen. Zur Schnittfärbung weniger geeignet.

Bemerkung: Ähnliche Farbstoffe sind ferner: **Nigrosin schwarz S rein**, **Nigrosin** in verschiedenen Sorten wie **AD, AR, AZ, AT, B, N, GA**. Sie können in der Regel statt Nigrosin verwendet werden.

Nilblau A (1029). Saurer Oxazinfarbstoff. Löslich in Wasser und Alkohol. Echter Farbstoff.

T: Wolle wird nicht gefärbt. Baumwolle nach Beizung mit Tannin-Brechweinstein.

M: Nilblau A färbt an Gefrierschnitten das Neutralfett rot, ebenso die Ökörper der Lebermoose.

O

Opalblau (792). Besondere Handelsform des **Bleu de Lyon**. Siehe daselbst.

M: Infusorienfärbung nach *Breslau*.

Orange G (39). Saurer Azofarbstoff. Löslich in Wasser und Alkohol. Mäßig lichtecht.

T: Färbt Wolle und Seide in saurem Bade.

M: Gelbroter Plasmafarbstoff.

Orseillin BB. Saurer roter Disazofarbstoff. Löslich in Wasser. Mäßig lichtecht.

T: Färbt Wolle in saurem Bade.

M: Plasma und Membranfarbstoff. Zum Färben von Schnitten von Flechten.

P

Parafuchsin (779). Andere Namen: Fuchsin NJ, Pararosanilinbase. Basischer Rosanilinfarbstoff. Löslich in Wasser und Alkohol. Mäßig lichtecht.

T: Hauptsächlich zur Herstellung von Anilinblau. Färbt Wolle und Seide direkt, Baumwolle erst nach Tanninbeize.

M: Wie Fuchsin, hauptsächlich zur Nuklealreaktion nach *Feulgen*.

Phloxin (888). Saurer Farbstoff (Dichlorphthalein-tetrabromfluorescin). Löslich in Wasser und Alkohol. Mäßig lichtecht.

T: Färbt Wolle in saurem Bade.

M: Rote Plasmanachfärbung in der Histologie nach Hämatoxylin.

Pikrinsäure (9). Anderer Namen: Acidum picrinicum. Saurer Farbstoff (Trinitrophenol). Löslich in Wasser, Alkohol, Äther und Benzol. Mäßig lichtecht.

T: Trocken als Explosivstoff. In wässriger Lösung als Farbstoff für Seide und Wolle. Baumwolle färbt es überhaupt nicht, auch nicht nach Beizung.

M: Fixiermittel. Gelber, lichtechter Plasmafarbstoff, gelbe Holzfärbung. Verträgt sich nicht mit allen Farbstoffen. Kann als Beize bei vielen basischen Farbstoffen verwendet werden, deren Farbton sich aber vielfach wesentlich ändert.

Purpurin (1157). Farbstoff der Krappwurzel (Trioxi-anthrachinon). Saurer roter Farbstoff. Löslich in Alkohol, schwer löslich in Wasser. Mäßig lichtecht.

T: Als Alaun- oder Chromlack in der Baumwolldruckerei.

M: Als Farbstoff nach *Becher* zur Kernechtfärbung. Zum Kalknachweis in der Histologie.

Pyronin G (853). Basischer roter Farbstoff (Diphenylmethanfarbstoff). Löslich in Wasser. Wenig lichtecht, waschecht.

T: Färbt Seide substantiv in neutralem Bade, Baumwolle nach Beizung mit Tannin und Brechweinstein.

M: Plasmafarbstoff. Farbstoff zur Färbung von Pilzmycelien in Flechtenschnitten.

R

Rosa-Azurin (456, 457). Saurer Benzidinfarbstoff. Löslich in Wasser. Lichtunecht.

T: Zur substantivischen Färbung von Baumwolle im Glaubersalzbade.

M: Färbt Pilzhyphen in Lösungen, die 20% Kaliumcarbonat enthalten. Beizung mit Kupferacetat.

Resoflavin W (1139). Saurer Abkömmling der Dioxibenzoesäure. In Wasser unlöslich, in Alkohol löslich. Gute Echtheit.

T: Zum Färben chromgebeizter Wolle.

M: Beizenfarbstoff nach *Becher*.

Rhodamin B extra (864). Basischer roter Xanthenfarbstoff aus der Gruppe der Phthaleine. Löslich in Wasser und Alkohol. Sehr wenig echt.

T: Färbt Wolle und Seide in neutralem Bade, Baumwolle nach Tannierung.

M: In der Histologie für Hautfärbungen.

Rubin S. Besondere Handelsmarke des Säurefuchsins. Gemisch der Natrium- oder Ammoniumsalze der Pararosanilin- und der Rosanilin-trisulfosäuren. Löslich in Wasser und Alkohol. Mäßig lichtecht.

T: Zum Färben von Zuckerwaren und Likören. Zum Färben von Wolle und Seide.

M: Wie Säurefuchsin, besonders aber zum Färben einiger Pilze.

Rutheniumrot. Anorganische Verbindung (Rutheniumsesquichlorid). Löslich in Wasser.

T: Keine Verwendung.

M: Ammoniakalische Lösungen färben pektoseartige Gummi und Schleime bei Samen, die Gallertscheiden einiger Algen, die Glykogene vieler Pilze und andere botanische Objekte mehr, ferner Isolichenin bei Flechten.

Bemerkung: Als Rutheniumrot wird ferner bezeichnet das Rutheniumoxichlorid-ammoniak. Die frisch hergestellte Lösung färbt ebenso wie das Rutheniumsequichlorid Glycose, Pektine, Schleime, ferner die Schließhäute der Tüpfel und verholzte Membranen bei Schnitten durch Kiefernholz.

S

Safranin O (967). Basischer Azinfarbstoff, meistens Gemische chemisch sehr verwandter Farbstoffe. Safranin ist giftig! Löslich in Wasser und Alkohol. Lichtecht, wenn gebeizt. Säureunecht.

T: Färbt Wolle und Seide in neutralem oder saurem Bade direkt. Baumwolle nach Tanninbeizung.

M: Bekannter Kernfarbstoff. Holzdarstellung in Schnitten.

Säurealizarinblau. Saurer Anthrachinonfarbstoff. Beizenfarbstoff. Löslich in Alaunlösungen.
T: Beizenfarbstoff.
M: Beizenfarbstoff nach *Becher*.

Schwefelfarben entstehen, wenn organische Produkte (Zucker, Sägemehl, Horn, Gummi) mit Schwefel und Natriumsulfid bei 100-350 ^{O}C zusammengeschmolzen werden. Die Schwefelfarbstoffe lösen sich in der Wärme in einer Natriumsulfidlösung, der Soda zugesetzt wurde.
T: Färbung von Baumwolle mit nachträglicher Oxydation des Färbegutes an der Luft oder mit Metallsalzlösungen.
M: Die Schwefelfarben haben eine Verwendung bislang nicht gefunden. Nach meinen Erfahrungen färben sich Flechten, Stengelquerschnitte bei Farnen und verschiedene andere botanische Objekte. Die Objekte werden aber durch die ziemlich alkalische Lösung stark angegriffen und meistens so verändert, daß sie unbrauchbar sind. Differenzieren mit Salzsäurealkohol gelang mir nicht. Zelloidin wird stark angefärbt.

Smaragdgrün (760) ist identisch mit **Brillantgrün**. Siehe daselbst. Mit Smaragdgrün wird auch manchmal das in Wasser unlösliche Malachitgrün-pikrat bezeichnet, das beim Beizen von Malachitgrünfärbungen mit Pikrinsäure entsteht.

Sudan III (541). Sekundärer Disazofarbstoff. Hat schwach sauren Charakter. Unlöslich in Wasser, löslich in Alkohol und Ölen. Lichtechtheit mäßig.
T: Zum Färben von Fetten, Ölen und Wachs.
M: Fettfärbung an Gefrierschnitten. Kutikulafärbung.

T

Thiazinrot (278). Saurer Azofarbstoff. Löslich in Wasser. Mäßig echt.
T: Färbt Wolle substantivisch, Baumwolle im Glaubersalzbad.
M: In der Histologie zur Färbung von Muskeln und Bindegewebe. In der Botanik Plasmafärbung nach Hämatoxylinfärbungen. Gewinnt an Echtheit durch Beizen mit Kupfersulfat.

Thionin (1036). Andere Namen: *Lauths* Violett. Basischer Thiazinfarbstoff. Löslich in Wasser. Lichtunecht.
T: Zum Färben tanningebeizter Baumwolle.
M: Kernfärbung, Bakterienfärbung.

Toluidinblau (1041). Basischer Azofarbstoff. Löslich in Wasser und Alkohol. Lichtunecht.
T: Färbt tanningebeizte Baumwolle.
M: In der Histologie zum Färben von Schleim, Blut und Kernen. Bestandteil der Färbung nach *Dominici-Romeis*.

V

Vesuvin siehe Bismarckbraun.

Viktoriablau 4R, **B** (821). Basischer Triphenylmethanfarbstoff. Löslich in Wasser und Alkohol. Lichtecht und alkaliecht.

T: Färbt Wolle und Seide direkt. Färbt Baumwolle nach Tannin oder Alaunbeize.

M: Kern- und Plasmafarbstoff. Färbt Glia und elastische Fasern. Marke **4R** für Darstellung der Spirochäten. Marke **B** für *Gramsche* Bakterienfärbung.

Z

Zyanin siehe Chinolinblau.

§ 533. LITERATUR-NACHWEIS

Aufgeführt sind hier nur größere Arbeiten und Handbücher. Benutzte Aufsätze in Zeitschriften, Dissertationen und sonstige kleinere Schriften sind im Text als Fußnoten erwähnt,

Abel, Rudolf
Bakteriologisches Taschenbuch
Würzburg, Curt Kabitsch, 1913

Bavendamm, Werner
Die farblosen und roten Schwefelbakterien
Jena, Gustav Fischer, 1924

Braß, Kurt
Praktikum der Färberei und Druckerei
Berlin, Julius Springer, 1929

Becher, Dr. S.
Untersuchungen über Echtfärbung der Zellkerne mit künstlichen Beizenfarbstoffen
Berlin, Gebrüder Bornträger, 1921

Chamberlain, Ch.J.
Methods in Plant Histology
Chicago, The University of Chicago Preß, 1915

Clung, C.H.Mc
Handbook of mikroskopical technique. For workers in animal and plant tissues
New York, 1937, P.B.Hoeber.

Cholodny, N.
Die Eisenbakterien
Jena, Gustav Fischer, 1926

Deutsches Arzneibuch
6.A, Berlin, R.V. Deckers Verlag (G. Schenk), 1926

Eckert, Franz
Das Präparieren der Algen
Stuttgart, Franckhsche Verlagshandlung, 1939

Erikson, Jakob
Die Pilzerkrankungen der landwirtschaftlichen Kulturpflanzen
Leipzig, Reichenbach, 1913

Fierz-David, H.E.
Künstliche organische Farbstoffe
Berlin, Julius Springer, 1926, Ergänzungsband 1935

Graupner, Heinz
Mikroskopische Technik
Leipzig, Akademische Verlagsanstalt, 1934

Grimme, A.
Über die Blütezeit der deutschen Laubmoose
Hedwigia Bd. 42, 1903, S. 1-75

Grübler, Dr.&Co.
Firmenpreisliste M 17 (ohne Jahreszahl)
Leipzig C 1, Liebigstraße 1 – 1 b

Handbuch der Pflanzenanatomie
Herausgegeben von K.Linsbauer, Tischler und Pascher
10 Bände. Berlin, Gebr. Bornträger, 1921-1938

Reim, Ludwig
Lehrbuch der Bakteriologie
Stuttgart, Ferdinand Enke, 1911

Hollborn, Dr.K.&Söhne
Firmenpreisliste H 10
Leipzig S 3, Hardenbergstr. 3, 1932

Karrer, Paul
Lehrbuch der organischen Chemie
Leipzig, Georg Thieme, 1942

Kisser, Joseph
Leitfaden der botanischen Mikrotechnik
Jena, Gustav Fischer, 1926

Kohl, F.G.
Die Hefepilze
Leipzig, Quelle & Mayer, 1908

Kuckuck, Paul
Der Strandwanderer
München, F.E.Lehmann, 1933

Kostka, G.
Praktische Anleitung zur Kultur der Mikroorganismen
Stuttgart, Franckhsche Verlagshandlung, 1924

Krause, R.
Enzyklopädie der mikroskopischen Technik
Berlin, Wien, Urban & Schwarzenberg, 1926

Küster, E.
Kultur der Mikroorganismen
Leipzig, G.B.Teubner, 1921

Lehrbuch der Botanik für Hochschulen
Herausgegeben von Fitting, Harder, Schuhmacher und Firbas
Jena, Gustav Fischer, 1944

Lindau, G.
Kryptogamenflora für Anfänger
6 Bände in 9 Abteilungen. Berlin, Julius Springer, 1922-1928

Merck-Index
Verzeichnis der von der chemischen Fabrik Merck lieferbaren Chemikalien
Darmstadt, 1910, 3. A.

Merck, E.
Medizinisch-chemische Untersuchungsmethoden
Darmstadt, E.Merck, 1939

Meyers, Fritz
Chemie der organischen Farbstoffe
2 Bände. Berlin, Julius Springer, 1934-1935

Molisch, H.
Die Purpurbakterien
Jena, Gustav Fischer, 1907

Molisch, H.
Die Eisenbakterien
Jena, Gustav Fischer, 1930

Neger, F.W.
Die Krankheiten unserer Waldbäume und wichtigsten Gartengehölze
Stuttgart, Ferdinand Enke, 1919

Oltmanns, F.
Morphologie und Biologie der Algen
3 Bände. Jena, Gustav Fischer, 1922-1923

Pappenheim, Arthur
Grundriß der Farbchemie zum Gebrauche bei mikroskopischen Arbeiten
Berlin, August Hirschwald, 1901

Rabenhorst
Kryptogamenflora
15 Bände. Leipzig, Becker und Erler, 1944

Romeis, B.
Taschenbuch der mikroskopischen Technik
14. A. München-Berlin, R.Oldenburg, 1943

Schiemann, Günther
Die Chemie der natürlichen und künstlichen organischen Farbstoffe
Leipzig, Leopold Voß, 1936

Schneider, Hans
Die botanische Mikrotechnik
Jena, Gustav Fischer, 1922

Schu1z, G.Ju1ius
Farbstofftabellen. 2 Bände, 1 Ergänzungsband
Leipzig, Akademische Verlagsanstalt, 1931-1934

Seifried, O, Heidegger, E.
Pathologische Mikroskopie
Stuttgart, Ferdinand Enke, 1933

Stehli, Georg
Mikroskopie für Jedermann
Stuttgart, Franckhsche Verlagshandlung, 1948

Stempel, W.
Leitfaden für das mikroskopisch-zoologische Praktikum
Jena, Gustav Fischer, 1925

Stempel, W.
Zoologie im Grundriß
Berlin, Gebrüder Bornträger, 1935

Straßburger, Koernicke
Das botanische Praktikum
Jena, Gustav Fischer, 1923

Tobler, F.
Die Flechten. Eine Einführung in ihre allgemeine Kenntnis
Jena, Gustav Fischer, 1934

Thomé-Migula
Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz
Abteilung I. Phanerogamen und Farne
Abteilung II. Kryptogamen: Moose, Algen, Pilze und Flechten
Berlin, Hugo Bermühler, 1903-1931

Ulbrich, E.
Präparations-, Konservierungs-, Frischerhaltungsmethoden
(Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden)
Berlin, Wien, Urban und Schwarzenberg 1924

Valenta, Eduard
Photographische Chemie
2 Bände. Halle, Saale, Wilhelm Knapp 1921-1922

§ 534

SACHWORTVERZEICHNIS

Was man unter C vermißt, suche man unter Z und K.

Der Inhalt der Tabellen I - V des Kapitels IV ist im Sachwortverzeichnis nicht aufgenommen worden.

A

Abelsche Flüssigkeit § 360 Ziffer 2
Abnormer Zellinhalt der Blaualgen § 288 Ziffer 9
Abtöten und Fixieren § 23
Abwasserpilze § 390 Ziffer 5
Acetabularia § 339 Ziffer 3
Acetobacter, Kultur § 273
Adhäsionskultur nach Lindner § 16 Ziffer 3
adjektivische Färbung § 93 Ziffer 5
Aecidiensporen § 396 Ziffer 3
Agar-Agar-Nährboden § 8 Ziffer 2
Agar-Agar nach Gause, zur Kultur der Protonemata der Laubmoose § 463 Ziffer 2
Agar-Agar nach P. Janzen § 463 Ziffer 2
Aglaozonia § 348 Ziffer 4
Akridinfarben § 88 Ziffer 5
Aktinomyceten Kultur § 275,
  Färbung § 276
Albugo § 390 Ziffer 7
Algen
  Allgemeines § 285 Ziffer 1
  Rohkulturen nach Strugger § 285 Ziffer 3
  Übersicht der Fixiermethoden § 286
  Übersicht der Färbemethoden § 287
Algenpilze
  Sammeln § 388
  Fixieren und Färben § 389
Alaun-Cochenille § 123
Alaun-Hämatoxylin § 138
Alaunkarmin, wässrig nach Grennacher § 124
Alizarindunkelgrün nach Becher § 148
Alizarinrot S, Arbeitsvorschrift § 109
Alizarinviridin nach Becher § 148, § 149
Alizarinzyanin G nach Becher § 152
Alizarinzyanin RR nach Becher §§ 148,152
alkoholische Farblösungen §§ 171 bis 178
Alkohol, Fixiermittel § 24 Ziffer 1
Amanita § 368
Amaurochaete § 383 Ziffer 1
Ambrosiapilze, siehe Pilzgallen § 419
Amöbenzustand
  der Schleimpilze §§ 385-387
  Färbung § 385
  Kultur der Amöben §§ 384, 385
  Präparation § 386
  parasitische Formen § 387
Anabaena azollae § 292 Ziffer 2
Anäbinkörper nach Fischer § 288 Ziffer 5
Anärobe Bakterien, Kultur §§ 256, 274
Aneura §§ 476 Ziffer 3, 478 Ziffer 5
Aneinema § 483
Angiopteris § 483
Anilinblau, Arbeitsvorschrift § 108
Anilinblau-Erythrosin nach Eckert § 174
Antheridien
  der Ascomyceten § 370
  der Farne § 498
  der Laubmoose und Lebermoose §§ 454, 458, 469
  der Rotalgen § 358 a
  der Torfmoose § 473 Ziffer 1
Anthozeros § 476 Ziffer 3
Anthrazenblau nach Becher § 151
Aphanotece § 292 Ziffer 2
Apophyse § 470 Ziffer 3
Apothezien § 433 Ziffer 2, § 434
Archegonien
  Farne § 499
  Laubmoose, Lebermoose §§ 455, 469 Ziffer 3, §§ 459, 473 Ziffer 2
Armleuchteralgen
  Antheridien § 321 Ziffer 2
  Einbetten und Schneiden § 317
  Färbungen § 319
  Erhaltung der natürl. Farbe § 316 Ziffer 1, § 320 Ziffer 1
  Keimlinge § 315 Ziffer 2
  Oogonien § 321 Ziffer 4
  Sammeln, Kulturen § 315 Ziffer 1
  Zygoten § 321 Ziffer 5
  zytologische Arbeiten § 316 Ziffer 2
Arthonia § 431 Ziffer 2
Aschebilder bei Verkieselung § 515
Ascogon der Ascomyceten § 370
Ascogon der Flechten § 439
Ascomyceten
  höhere § 370
  niedere § 398
Ascophyllum nodosum § 348 Ziffer 8
Aspergillus
  fumigatus § 406 Ziffer 5
  glaucus § 406 Ziffer 4
Aspicilia calcaria § 443 Ziffer 2
Aspidium sieboldi § 483
Asplenium ruta muraria § 483
Aufbewahrungsflüssigkeit
  für Algen nach Eckert § 286 Ziffer II
  nach Straßburger § 61

Aufkleben der Gelatineschnitte
mit Glycerin-Eiweiß § 84 Ziffer 2
mit Kollodium-Nelkenöl § 84 Ziffer 3
Aufkleben
der Paraffinschnitte § 77 Ziffer 4
der Zelloidinschnitte § 82 Ziffer 4
Aufklebeflüssigkeit, synthetische nach Elger für Diatomeen § 307 B
Aufklebeverfahren
nach Adams § 64 Ziffer 2
nach Straßburger § 64 Ziffer 2
Auraviolett nach Geidies § 182
Ausstriche, lufttrockene von Bakterien zur Geißeldarstellung § 260 Ziffer 5
Ausstrichverfahren für kleinste Objekte § 64 Ziffer 5
Auswaschen der fixierten Objekte § 59
Auxosporen bei Diatomeen § 304
Azinfarbstoffe § 88 Ziffer 5
Azofarbstoffe § 88 Ziffer 5
Azokarmin B § 110
Azolla §§ 501, 505 Ziffer 4, 506 Ziffer 5

B

Bachmannsche Färbung für Flechten-Dünnschliffe § 443 Ziffer 4
Baeomyces § 434 Ziffer 3
Bänderschneiden bei Paraffinschnitten § 77 Ziffer 3
Bärlappgewächse
Allgemeines § 521
Färben § 524
Fixieren § 522
Gametophyt § 525 Ziffer 2
Prothallien § 525 Ziffer 2
Schneiden und Einbetten § 523
Stamm, Sporangien, Sporen § 525 Ziffer 1
Bakterien
Allgemeines § 252 Ziffer 1
Cytologie § 253
Einteilung § 252 Ziffer 2
Färbungsmethoden § 260 Ziffer 1
Fixierung § 257, Ziffer 1 und 2
Fortpflanzung § 254
Kulturmethoden § 255
Bakterien in Ausstrichen § 257 Ziffer 1 und 2, § 260 Ziffer 1
Bakterien in Schnitten
Färbung §§ 269, 270
Fixierung § 258
Bakterienkapseln
Darstellung nach Burri § 260 Ziffer 6
Färbung nach Räbiger § 260 Ziffer 6
Bakterienknöllchen der Leguminosen § 269
Bakteriennährböden
feste siehe Agar, Gelatine
flüssige § 7 Ziffer 4
Bakterienrasen, Fixierung § 259
Bakteriosen § 270
Bangia fuscopurpurea § 356 Ziffer 1
Basidomyceten
höhere § 369
niedere § 392
Basische Farben § 89 Ziffer 1, § 91
Basische Farben, Erhöhung der Färbbarkeit mit § 188 Ziffer 9
Batrachospermum § 355, I
Bauchpilze § 369
Becherfarben §§ 147-156
Beggiotoa §§ 279, 280
Benecke, Nährlösung nach § 7 Ziffer 2
Benzoazurin § 111
Benzopurpurin § 111
Beizen der Färbungen § 95
Beizen,Grundregel § 188 Ziffer 10
Beize nach Peppler § 260 Ziffer 5
Beizenfarbstoffe § 89 Ziffer 4, § 91
Berliner Blau
Färbung und Imprägnation mit § 201
Imprägnieren der Stachelkugeln mit, § 320 Ziffer 9
Beschriftung der fertigen Präparate § 245
Binokulares Präparierstativ § 2
Bismarckbraun § 98
Blasia pusilla § 476 Ziffer 4, Ziffer 2
Blattgrün siehe Chlorophyll
Blattflügelzellen der Laubmoose § 467 Ziffer 1
Blatt der Torfmoose § 472 Ziffer 3
Blaualgen
Allgemeines, Nomenklatur § 288
Dauerzellen § 292 Ziffer 2
Einschluß der gefärbten Objekte in Harze und Gelatine § 295
Erhaltung der natürl. Farbe § 290, § 292
Sammeln, Kulturen § 291 Ziffer 1, 2 und 3
Fixiermittel § 289
Färbemethoden § 290
Gallerthüllen § 292 Ziffer 2
Heterocysten § 292 Ziffer 2
Hormocysten § 292 Ziffer 2
Morphologische Totalfärbungen § 292 Ziffer 2
Zellstudien, Zellteilung §§ 293, 294 Ziffer 2
Blechnum § 483
Bleichen
mit Chlor § 70 Ziffer 2 und 3
mit Chlordioxydessigsäure § 70 Ziffer 4
mit Chlordioxydsalpetersäure § 70 Ziffer 4
mit Sauerstoff § 70 Ziffer 2
mit Schwefeldioxid § 70 Ziffer 1
Bleisalze zum Beizen von Eosinfärbungen § 95
Bolzacksche saure Ölmischung § 41
Bonner Mischung
schwächere § 54 Ziffer 1
stärkere § 54 Ziffer 2
Boraxkarmin, alkoholisch nach Grennacher § 125
Borreis Blau § 385 Fußnote
Botrychium § 483
Botrydium § 341
Botrytis cinerea § 408
Bouins Gemisch § 41

Brachsenkraut § 527
Braunalgen
Einbetten und Schneiden § 345
Färbungen § 346
Fixierung § 344
Morphologische Präparate § 347
Brefeldia § 383 Ziffer 1
Brennspiritus als Fixiermittel §§ 24 Ziffer 3, 38
Brennspiritus zum Differenzieren von Karminfärbungen §133
Brunnenwasser, Brauchbarkeit § 18
Brutkörper
der Farne § 491
der Moose § 464
Bryopsis § 340 Ziffer 1
Buellia § 437
Burri's Verfahren § 260 Ziffer 6
Bütschlische Kugeln § 301
Buxbaumia aphylla § 463 Ziffer 3

C

Caedax § 231
Calipogeia trichomanes § 477 Ziffer 3
Calizium § 435
Caloplaca § 443 Ziffer 2
Capilitiumfasern der Schleimpilze § 383 Ziffer 4
Caporit zum Bleichen §70 Ziffer 3
Carnoysches Fixiergemisch § 33
Carragen § 358 b
Casparische Streifen § 486 Ziffer 3, §§ 511 und 512
Cedukol § 78
Cellosol-Einbettung nach Eckert für Meeresalgen § 345
Cephalodien § 431 Ziffer 4
Ceramium § 356 Ziffer 4
Ceratomyxa mucida §383 Ziffer1
Chaenotheca § 435
Chaetophorales § 338
Chantransia § 356 Ziffer 5
Characeae § 315 (siehe Armleuchteralgen)
Chemische Reaktionen an höheren Pilzen §§ 372, 373, 374
Chinone § 88 Ziffer 5
Chinolinblau, Arbeitsvorschrift § 99
Chinolinblau-Erythrosin nach Chamberlain zur Flechtenfärbung § 427 Ziffer 4
Chitin § 21
Chitinfärbung, siehe säurefeste Bakterien § 260 Ziffer 7
Chlamydobakteriaceae § 278
Chloralhydrat zur Stärkeentfernung § 72 Ziffer 1
Chlordioxydsalpetersäure, Herstellung § 70 Ziffer 4
Chlorella § 337 Ziffer 7
Chlorococcum humilicum § 337 Ziffer 2
Chloromonaden § 313
Chlorophyceae, siehe Grünalgen § 333
Chlorophyll
Fixierung § 66 Ziffer 1 bis 5
Zusammensetzung § 65
Chlorophyllfixierung
nach Kisser § 66 Ziffer 3
nach Pollaccei § 66 Ziffer 4
nach Straßburger § 66 Ziffer 5
Chlorophyllkörner § 19
Chlorotrichum § 337 Ziffer 3
Chondriosomen § 19, Fixierung der, § 56 und § 57
Chondrus crispus § 356 Ziffer 7 und § 358 b
Chorda filum § 348 Ziffer 6
Chroococcus § 292 Ziffer 2
Chromalaunkarmin nach Fyg § 127
Chromat-Gelatine zum Umranden der Glycerin-Gelatinepräparate § 241 Ziffer 2
Chromatoplasma bei Blaualgen § 288 Ziffer 3 und § 293 Ziffer 2
Chromatophoren § 19
Chromessigsäure
für Farn-Sporophyten § 480Ziffer I Nr. 2
für Farn-Gametophyten § 480 Ziffer II Nr.1
für Flechten § 422 Ziffer 3
für höhere Pilze § 361 Ziffer I
für niedere Pilze § 362
für Schachtelhalme § 508 Ziffer1
nach Chamberlain mit Meerwasser § 351 Ziffer 2 und 5
nach Eckert § 344 Ziffer 2
nach Eckert-Dohrer § 351 Ziffer 3
nach Flemming § 39
nach Migula § 344 Ziffer 1
nach Straßburger §344 Ziffer 3 b
nach Straßburger für Schleimpilze § 379
nach Ulbrich für Bärlappgewächse § 522 Ziffer 1 Nr.2
nach Ulbrich § 344 Ziffer 3 a
nach Wenderoth, stark für Moos-Stämmchen, Sporogone, § 447 Ziffer 2
nach Wenderoth, schwach für Gametophytenspitzen, junge Sporogone § 447 Ziffer 3
Chromessigsäure-Formalin nach Nemec § 40
Chromsäure als Fixiermittel § 27
Chromidialapparat § 288 Ziffer 6, § 293 Ziffer 5
Chromoplasten § 19
Chrysoidin § 100
Chrysomonaden § 313
Cibraria § 383 Ziffer 1
Cinclidotus § 465
Cladophora § 339 Ziffer 1
Cladonia
alpestris § 434 Ziffer 3
coccifera § 434 Ziffer 3
pixidata § 432
Cladosporium herbarum § 416
Cladothrix dichotona § 278
Claviceps purpurea § 407 Ziffer 5
Codium § 340 Ziffer 2
Coleosporium tussilaginis § 396 Ziffer 5
Collema § 431 Ziffer 1

Conferven § 338
Coniocarpineen § 433 Ziffer 4
Coprinus § 371 Ziffer 4
Coremium glaucum § 417
Corallina rubens § 356 Ziffer 12
Craterium § 383 Ziffer 1
Crenothrix § 283 Ziffer 2
Cruoria § 356 Ziffer 12
Cutleria multifida § 348 Ziffer 4
Cyanophyceae § 288
Cyanophycinkörner § 288 Ziffer 3, § 293 Ziffer 4
Cyphelium § 431 Ziffer 2
Cystocarpien § 349, § 358 b und 355 I

D

Dasycladus claviformis § 339 Ziffer 2
  Nuklealreaktion § 329 Ziffer 2
Davallia ballata § 483
Dauerzellen § 292 Ziffer 2
Debessche Fixationsflüssigkeit für Diatomeen § 307 B
Deformation bei Übertragungen zarter Objekte aus einem Medium in ein anderes § 247 Ziffer 2
Delafields Hämatoxylin § 139
Delafields Hämatoxylin-Safranin § 163
Delesseria sinuosa § 356 Ziffer 10
Denaturierter Alkohol als Fixiermittel § 24 Ziffer 2
Denaturierter Alkohol: siehe Brennspiritus §§ 24 Ziffer 3 und 38
Desmidiazeen
  Fixieren § 323
  Fortpflanzung § 330
  Färben §§ 324, 328, 329 Ziffer 1
  Nuklealreaktion § 329 Ziffer 2
  Präparate in natürlichen Farben § 327 Ziffer 2 und 3
Diaphanol § 70 Ziffer 4
Diastase zur Stärkeentfernung § 72 Ziffer 1
Diatomeen
  Allgemeines § 296 Ziffer 1
  Auxosporen § 304
  Cytologische Färbungen § 303
  Fortpflanzung § 304
  Fixieren § 298
  Färben § 299
  Kulturen § 296 Ziffer 3, § 297
  Lebendfärbung § 301
  Mikrosporen § 304
  Sammeln § 296 Ziffer 2, § 300 Ziffer 1 und 2
  Schalenpräparate § 305-307
Diatomeen-Schalen
  Aufschließen von fossilem Material § 306 II
  Aufbewahren gereinigter Diatomeen § 306 III
  Einschluß in Dauerpräparaten § 307 B
  Einschlußmittel § 307 A
  Entfernung der organischen Teile § 306 Ziffer II
  Präparation der Vorreinigung § 305
  Querschnitte § 308
  Reihen und Kreispräparate § 307 B
  Sieben und Schlämmen des Materiales § 306 I-III
  Typenplatten § 307 B
Diatopan § 307 A 6
Dictydinkörner § 383 Ziffer 3
Diderma § 383 Ziffer 1
Differenzieren durch Sonnenlicht § 94 Ziffer 1
Dinoflagellaten
  Einschließen § 314 Ziffer 3
  Färbung § 314 Ziffer 1
  Fixierung § 314 Ziffer 1
  Fortpflanzung § 314 Ziffer 1
  Kultur § 314 Ziffer 1 und 2
Diocelium nudum § 463 Ziffer 3
Dioxan
  beim Färben § 249
  Giftigkeit § 248
  in der Mikroskopie § 248
  in der Paraffineinbettung § 249
Diphenylmethanfarben § 88 Ziffer 5
Diplazium § 483
Discomyceten § 408
Doppelfixierung nach Eckert für Algen § 286 I Nr. 6
Dothichita § 411
Dothirella § 411
Dünnschliffe § 424
Dünnschliffe durch Flechten, Färben derselben § 443 Ziffer 4

E

Echtgrün-Eisenbeizenfärbung nach Pfeiffer § 177 Ziffer 1
Ectocarpus § 348 Ziffer 1
Ehrlichs Hämatoxylin § 140
Einbetten, Allgemeines § 75
Einbettofen für Paraffineinbettung §2
Eindicken der Zelloidinlösung § 79
Einfache Fixiermittel § 24 bis § 31
Einführung in dieses Buch § 1
Einschließen der Objekte § 204
Einschlußmittel für Diatomeen nach Kolbe-Wislouch § 307 A 3
Einschlüsse
  im Plasma § 20
  im Zellsaft, feste § 20 Ziffer 2
  in den Chromatophoren § 20 Ziffer 3
Eisenalaun-Karmin nach de Grot § 130
Eisenbakterien
  Allgemeines § 281
  Kulturen § 282
  Untersuchung § 283
Eisenbeizenfärbungen nach Pfeiffer § 177
Eisenhämatoxylin
  nach Häggqvist § 136
  nach Heidenhain § 135
  nach Weigert § 144

nach Wenderoth § 456 Ziffer 3
Eiweißglycerin zum Aufkleben der Paraffinschnitte § 77 Ziffer 4
Embryo
der Laubmoose § 470 Ziffer 2
der Lebermoose § 478 Ziffer 1
Empusa muscae § 391 Ziffer 5
Elateren der Lebermoose § 478 Ziffer 5
endolithische Flechten § 441
Endomyces Magnusii § 402
Endoplasten § 288 Ziffer 5
Enteromorpha § 338 Ziffer 3
Enthärten von Formalinmaterial § 60
Entwicklungsfarbtoffe § 89 Ziffer 5, § 91
Eosin, Arbeitsvorschriften § 112 Ziffer I
Eosin-Anilinblau nach H.Sieben § 180
Ephebe § 431 Ziffer 3
Ephemera § 463 Ziffer 1
Epichloe typhrina § 407 Ziffer 3
epilithische Flechten § 444
Equisetaceae, siehe Schachtelhalme § 507
Equisetum
arvense § 507 Ziffer 1, § 511
limosum § 507 Ziffer 3
pallustre § 511
silvaticum § 507 Ziffer 2
telmateja § 511
Erdalkalisalze zum Beizen saurer Farben § 95
Erhaltung der natürlichen Farben §§ 65 - 68
Erstarrende Einschlußmittel § 208
Erysiphe § 407 Ziffer 1
Essigsäurebakterien § 266
Euglena
Cytologische Präparate § 312 Ziffer 4
Erhaltung der natürlichen Farben § 312 Ziffer 1
Färbung § 312 Ziffer 2
Fixierung § 312 Ziffer 2
Geißeldarstellung § 312 Ziffer 3
Kulturen § 309 Ziffer 2
Euparal § 235
Exoascaceae § 405
Exobasidien § 397
Exosporium § 418

F

Fairchildsche Siebeimerchen § 59
Farbstoffe
Begriff § 88 Ziffer 1
Benennung § 90
chemische Einteilung § 88 Ziffer 5
Färbbarkeit, schlechte
nach Formalineinwirkung § 93 Ziffer 6
nach Pyridineinwirkung § 93 Ziffer 6
Färben
in der Mikroskopie § 92
in der Technik § 88 Ziffer 3
von Dünnschliffen § 443 Ziffer 4
Färbevorgang § 88 Ziffer 4
Färbungen in einer Farbe § 158
Färbungen, verschiedene Arten von § 93 Ziffer 1
Farnpflanzen, Allgemeines § 479
Farne
Blätter § 487
Einbetten und Schneiden § 481
Färbemethoden § 482
Fixiermittel§ 480
Rhizom § 485,
Sporangium §492
Sporen § 493
Stamm § 486
Wurzel § 484,
Fäulnisbakterien § 263
Fäulnispilze des Obstes § 406
Fegatella conica § 477 Ziffer 2
Fertigmachen der Präparate § 238
Feste Nährböden § 8
Feuchte Kammer § 15
nach Ranvier § 16 Ziffer 2
Filicales, siehe Farne §§ 480 bis 510
Fixieren, Allgemeines § 22, § 23
Fixiergemische
für cytologische Untersuchungen §§ 52-57
für morphologische und anatomische Zwecke § 32
mit Quecksilbersalzen § 44
Fixierung des Chlorophylls § 66 Ziffer 1-5
Fixierungsflüssigkeit nach Debes § 307 B
Fixiertes Material, weitere Verarbeitung § 69
Flagellaten
Allgemeines § 309 Ziffer 1
Färbemethoden § 311
Fixierung § 310
Materialbeschaffung § 309 Ziffer 2
Flechten
Dünnschliffe § 424
Materialbeschaffung § 421
Einbetten und Schneiden § 423
Färben der Sporen in den Asci der Apothecien § 428
Färben der Schnitte § 425 (vergleiche auch § 183)
Flechtensäuren, Reaktionen auf § 429
Fixiermittel § 422
Kontrastfärbung von Gonidien und Hyphen § 427
Mikrochemische Untersuchungen an Schnitten § 429
Morphologische Färbungen § 427
Flemmings Dreifachfärbung § 168
Flemmings Fixiergemische § 54
Florideen, siehe Rotalgen §§ 349 bis 358
Flüssige Nährmedien § 7
Formalin als Fixiermittel § 26
Formalin zur Materialkonservierung § 60
Formalinalkohol nach Chamberlain § 37
Formessigsprit nach Diettrich § 38
Formol-Gentiana nach Räbiger zur Geißeldarstellung § 260 Ziffer 6
Formolmaterial, Enthärten von § 60
Frosteinwirkung auf Gummipräparate § 220

Ziffer 2
Früchte als Nährböden § 8 Ziffer 2
Fruchtsack § 477 Ziffer 3, § 478 Ziffer 4
Frullania § 478 Ziffer 5
Fucus § 348 Ziffer 7
Fungi imperfecti
Allgemeines § 409
Fixieren und Färben § 410
Furellaria fastigiata § 356 Ziffer 9
Fusarium § 418
Fuchsin
basisch § 101 Ziffer 1
sauer § 121
Fuchsinfärbung, violette nach Zimmermann § 101 Ziffer III
Fuchsinschweflige Säure § 203
Fulcrum § 438
Funaria hygrometrica § 465

G

Gallein nach Becher § 153
Galein-Eisenbeize nach Pfeiffer § 177 Ziffer 3
Gallionella § 283 Ziffer 3
Gallozyanin nach Becher § 154
Gallussäure-Eisenbeize nach Pfeiffer § 177 Ziffer 2
Gasteromyceten § 369
Gefriermikrotom § 73
Geißelfärbung bei Bakterien § 260 Ziffer 5
GeißeIdarsteIlung bei Bakterien durch Antrocknen § 260 Ziffer 5
Gelatine-Einbettung § 83
nach Apathy § 84 Ziffer 2
nach Behrens § 84 Ziffer 1
nach Migula § 84 Ziffer 3
Gelatine, Entfernung aus den Schnitten § 84 Ziffer 1-3
Gelatineblöcke, Härtung derselben § 83
Gelatine-Nährböden § 8 Ziffer 1
Gelatinereste
Entfernung von, Anbringung des Lackrandes § 238 Ziffer 4
Entfernung bei Lävulosegelatine § 238 Ziffer 5
Lactophenolgelatine §238 Ziffer 5
Verfahren mit Chromsalzen § 241 Ziffer 1
Gelatinering, bei Glycerinpräparaten § 205 Ziffer 2
Gelbes Medium § 307 A 4
Gemmen
bei Laubmoosen § 464
bei Lebermoosen § 476 Ziffer 2
Gen tiana violett Arbeitsvorschrift § 102 Ziffer I-III
Gentianaviolett nach Peppler zur GeißeldarsteIlung § 260 Ziffer 5
Georgia pellucida § 464
Gerbstoffe
Darstellung § 202
Entfernung § 72 Ziffer 4
Geschlechtsorgane bei Vaucheria, Bildung in Kultur § 340 Ziffer 3
Giemsafärbung
für Ausstriche § 186 Ziffer 1
für Schimmelpilze und andere niedere Pilze § 366 Ziffer 8
für Schnittfärbung § 186 Ziffer 2
Gigartina mammillosa § 358 b
Gilbertsches Reagens § 374
Gilsonsche Mischung § 49
Gleba § 369
Gloeosporium § 412, 413
Glukose-Gelatine § 216
Glycerin zum Einschließen § 205 Ziffer 1
Glycerinreste, Entfernung vor dem Lackrand § 238 Ziffer 3
Glycerin-Alaun-Hamateinlösung nach Rawitz § 143
Glyceringelatine
Einschließen damit § 218 Ziffer 1
Einschließen großer Objekte § 218 Ziffer 2
Einschließen zarter Objekte ohne Schrumpfungen § 247 Ziffer 3
Lackrahmen § 219
nach Kaiser § 209
nach Kisser § 211
Glycerin -Hausenblasengallerte nach Behrens § 210
Glycerinpräparate, Anfertigung, Umranden § 205 Ziffer 2 und 3
Glycerin-Zelloidin-Einbettungsmethode nach Wolf § 78 Ziff. 2
Glykogen, färberischer Nachweis § 293 Ziffer 6
Gnomonia § 407 Ziffer 6
Gonidien der Flechten § 421
Goldimprägnation
für Algen nach Eckert § 191
nach Nabias § 190
Goldsize § 241
Gramsche Färbung
für Ausstriche § 166
für Schnitte § 167
praktische Durchführung § 260 Ziffer 3
Simultanfärbung § 187
Gram-negative Bakterien § 260 Ziffer 3
Gram-positive Bakterien § 260 Ziffer 3
Gram-Simultanfärbung nach Holborn § 187
Graphiola Phönicis § 395 Ziffer 3
Grünalgen
Erhaltung der grünen Farbe § 334 Ziffer 1
Färbungen § 335
Fixierung § 334 Ziffer 3 bis 5
Fixierung des Hämatochroms § 334 Ziffer 2
Materialbeschaffung § 333
Überführen in Glycerin und in Harze § 342
Gummi arabicum
als Einbettungsmittel § 85
als Einschlußmittel § 220
Eigenschaften und Herkunft § 220 Ziffer 3
Herstellung der Einschlußmitel § 220 Ziffer 4
nach Dippel § 85 Ziffer 2
nach Fol § 85 Ziffer 1

Verderben der Präparate durch Frost § 220 Ziffer 2
Gummi-Glycerin
nach Apathy § 222
nach Farrant § 226
Gummy-Syrup
nach Apathy § 221
nach Becher und Demoll § 225
Gutbrodsches Fixiergemisch § 55
Gymnosporangium Sabinae §396 Ziffer 5

H

Haarschlingen nach Speemann § 3
Halimeda § 340 Ziffer 2
Halydris § 348 Ziffer 10
Haltbarkeit der Präparate § 251
Hämatochrom-Fixierung § 67
bei Grünalgen § 334 Ziffer 2
Haematococcus § 336
Kultur § 336 Ziffer 3
Handzentrifuge § 2
Hängender Tropfen § 16 Ziffer 1
Hansenia apiculata § 401 Ziffer 3
Hantsche Flüssigkeit § 383 Ziffer 2
Hämalaun nach P. Mayer § 142
Hämalaun-Erythrosin-Orange G nach Mathis § 162
Hämalaun-Safranin § 161
Hämatoxylin-Färbungen § 134
Hämatoxylin
nach Böhmer § 138
nach Delafield § 139
nach Ehrlich § 140
nach Hansen § 141
nach Rawitz § 143
Hämatoxylin-Eosin § 160
Härten der Zelloidinblöcke § 79
Hartosol als Fixiermittel § 25
Harze als Einschlußmittel § 230
Harzeinschluß zarter Objekte § 247 Ziffer 4
Hefe
Fixierung und Färbung § 404
gefärbte Hefen § 401 Ziffer 5
Kultur der Hefen § 403
Metachromatische Granula § 404
Spalthefen § 401 Ziffer 4
Sporenkeimung § 403 Ziffer III, 4
Sporulation § 403 Ziffer III
Sproßhefen § 401 Ziffer 1
wilde Hefen § 401 Ziffer 5
Herniascinae § 400
Hendersonia § 411
Hepaticae, siehe Lebermoose § 475
Heppia § 443 Ziffer 2
Herbarmaterial
Fixierung § 51
Hetericontae § 340
Heterocysten § 292
heteromerer Thallus der Flechten § 430
Hildenbrandia prototypus § 356 Ziffer 11
Himanthalia § 348 Ziffer 9
Hollundermark zum Uneingebettet-Schneiden § 74
Holz § 21
Holzfärbungen, Übersicht § 159 Ziffer III
Holz-Zellulose-Doppelfärbung, Übersicht § 159 Ziffer III
Hornfelds Präparation der Desmidiazeen § 327 Ziffer 2
homöornerer Thallus der Flechten § 431
Hormogonien § 294 Ziffer 3
Hormocysten § 292 Ziffer 2
Hoyer-Einschlußmittel Nr.I für Karmin, Hämatoxylin § 228
Hoyer-Einschlußmittel Nr. II für Anilinfarben § 229
Hydathoden bei Farnen § 489
Hydrodictyon § 337 Ziffer 6
Hydropteridineae, siehe Wasserfarne § 511
Hydrurus foetidus § 313
Hyphenknäuel der Kalkflechten § 441
Hyphomyceten §§ 414 bis 420
Präparation § 420
Hypnum § 465
Hyrax § 307 A 6

I

Illosporium § 418
Imprägnation
mit Berliner Blau § 201 Ziffer 2
mit Gold § 190, § 191
mit Metallen § 189
mit Schwefelblei § 200
mit Silber § 192
mit Osmium § 195
Indicatoren für Bestimmung des pH § 17
indirekte Färbung § 93 Ziffer 5
Inhalt der Zellen, totale Entfernung § 71 Ziffer 1 bis 3
Insidienbildung § 432
Instrumente
größere § 2
kleinere § 3
Intermedien zur Paraffineinbettung § 76 Ziffer 2 bis 4
Internodien
der Armleuchteralgen § 320 Ziffer 3
der Schachtelhalme § 512
inverse Färbung § 93 Ziffer 5
Isaria § 417
Isoetes malinvernianum § 527
Isoetes, Präparation § 527
Isolierung eines Mikroorganismus § 13
Ithophallus impudicus § 369

J

Japanlack zum Umranden § 240
Jauchebakterien § 265
Javelsche Lauge § 71 Ziffer 2

Jochalgen
Erhalten der Naturfarbe § 331, § 327
  Färben § 325
  Fixieren § 323
  Fortpflanzung § 332 Ziffer 4 bis 7
  Künstliche Herbeiführung der Kopulation § 332 Ziffer 8
  Präparationstechnik § 332 Ziffer 9
Jod als Fixiermittel § 31
Jod-Jodkalilösung
  nach Eckert § 191
  nach Gram § 190
Jod-Eosin-Anilinblau nach Eckert § 175
Jod-Eosin-Lichtgrün nach Eckert § 175
Jodsilberverfahren nach Straßburger § 193
Jodsilber-Beizung zur Flechtenfärbung § 427 Ziffer 4
Jodwasser-Eosin nach Palla § 112 Ziffer II
Jod-Meerwasser zur Algenfixierung § 334 Ziffer 4
Juelsches Gemisch Nr. I, § 36

K

Käsebakterien § 268
Kaliumazetat als Einschlußmittel § 206
Kaliumazetatgelatine § 212
Kalilauge zur Entfernung des Zellinhaltes § 71 Ziffer 3
Kalkflechten § 441
  Dünnschliffe § 443 Ziffer 3
  Schnitte § 443 Ziffer 2
Kalkkörper bei Schleimpilzen § 383 Ziffer 4
Kalksalze, Entfernung der, § 72 Ziffer 3
Kallosefärbung mit Anilinblau § 108
Kaltsterilisierungsmethoden
  Agar-Agar § 11 Ziffer 2
  Gelatinenährböden § 11 Ziffer 1
  Mistnährböden § 11 Ziffer 3
  nach Schweizer § 10
  Torf, Lehm, Erde, Sand § 11 Ziffer 4
Kanadabalsam § 232, neutraler § 233
Karbol-Fuchsin nach Ziehl-Neelsen § 101 Ziffer 2
Karbol-Gentiana § 102 Ziffer 2
Karmalaun nach P.Mayer § 129
Karminsäure-Eisenbeize nach Pfeiffer § 177 Ziffer 4
Karmin-Essigsäure nach Schneider § 132
Karpogonien der Rotalgen § 358 b
Kartoffeln als Nährböden § 8 Ziffer 3
Kernechtrot § 157
Kernfärbungen, Übersicht § 159 Ziffer I
Kernschwarz § 197
Kieselalgen
  Allgemeines § 296 Ziffer 1
  Präparation siehe unter Diatomeen
Kieselflechten § 442
  Dünnschliffe § 445
Kieselgur § 306, II
Kieselsäure, Entfernung aus den Schnitten § 72 Ziffer 2
Kieselschalen der Kieselalgen, siehe Diatomeenschalen
Kleine Objekte, Verarbeitung § 62 bis 64 Ziffer 1 bis 5
Kleinpilze, Lebenduntersuchung § 360 Ziffer 1
Knollen
  bei Isoetes § 527 Ziffer 2
  am Rhizom der Schachtelhalme § 511
Knopsche Nährlösung § 7 Ziffer 1
Knoten bei Schachtelhalmen § 513
Kobaltchlorid zum Verstärken von Becherfärbungen § 147
Kockegeysche Färbung der Brandpilze § 395 Ziffer 3
Kollodiumhäutchen, Verfahren nach Schmelzer § 64 Ziffer 3
Kollodiumguß auf Paraffinschnitte § 77 Ziffer 5
Kollodiumverfahren nach Klerker § 64 Ziffer 4
Kollodium-Nelkenöl §84 Ziffer 3
Konjugaten § 322
  Färben §§ 324, 325
  Fixieren § 323
  Fixieren der grünen Farbe § 323, § 327
Kongorot, Arbeitsvorschrift § 113
Kopal-Emaillack § 242
Kopulation bei Jochalgen, künstliche Herbeiführung § 332 Ziffer 8
Kork § 21
Korkfärbung mit ammoniakalischem Gentianaviolett § 102 Ziffer III
Korkfärbungen, Übersicht über § 159 Ziffer III
Kotbakterien § 264
Kousalsche Umrandungspaste § 239
Kreispräparate bei Diatomeen § 307 b
Kresylechtviolett, Arbeitsvorschrift § 103
Kristallviolett § 102 Ziffer 1 bis 3
Krönigs Deckglaskitt § 243
Künstliche Beizenfarbstoffe (Becherfarben) § 146
Kulturen
  Allgemeines § 5
  verschiedene Formen § 12
Küpenfarbstoffe § 88 Ziffer 10, § 89 Ziffer 6, § 91
Kupfer-Hämatoxylin nach Benda § 137
Kupfer-Lactophenol nach Amman § 66 Ziffer 2
Kupfer-Lactophenol-Gelatine nach Amman § 214
Kupfersalze zum Beizen substantivischer Farbstoffe § 95
Kutin § 21

L

Lachnea pulchnerina § 408 Ziffer 2
Lackrand bei Dauerpräparaten
  bei Glycerineinschlüssen § 238 Ziffer 3
  bei Glycerin-Gelatine §§ 219, 241 Ziffer 2

bei Harzeinschlüssen §238 Ziffer 2, § 244 Ziffer 2
schlechte Haftbarkeit § 251 Ziffer 2
Lactophenol nach Amman § 66 Ziffer 2
Lactophenol-Glyceringelatine nach Amman § 213
Lactophenol-Gummi nach Amman § 227
Lactuaria § 368
Laminaria § 348 Ziffer 5
Lamproderma § 383 Ziffer 1
Längslamellen bei Moosblättern § 467 Ziffer 2
Laubflechten § 430
Laubmoose § 462. Siehe unter Moose § 446
Laverans Färbung für Amöbenzustand der Schleimpilze § 385
Lavdowskisches Gemisch § 34
Lävulosegelatine nach Heringa und ten Berge § 215
Lebendfärbungen § 21
bei Diatomeen § 301
bei Pilzhyphen mit Methylenblau § 105
Lebenduntersuchung von Kleinpilzen § 360 Ziffer 1
Lebermoose § 475
Allgemeines § 475
Antheridien § 477 Ziffer 2
Archegonien § 477 Ziffer 3
Blätter § 476 Ziffer 5
Brutkörper (Gemmen) § 476 Ziffer 2
Moosstämmchen § 476 Ziffer 4
Spermatozoiden § 477 Ziffer 2
Sporophyt § 478
Sporen und Elateren § 478 Ziffer 5
Thallusformen § 476 Ziffer 3
Vorkeime § 476
Lecanora § 434 Ziffer 2
calcarea § 443 Ziffer 2
Lecidea
alba § 437
caerulea § 443 Ziffer 3
Leitungswasser, Brauchbarkeit § 18
Lepra § 432
Lepraria § 432
Leptothrix § 283 Ziffer 1
Leukoplasten § 19
Lichenes, siehe Flechten § 421
Lichenes imperfecti siehe Lepra und Lepraria § 432
Lichenin, Färbung mit Rutheniumrot § 429
Lichtgrün SF
Arbeitsvorschrift § 114
Verdrängung des Safranins aus unverholzten Stellen der Schnitte § 107
Ligula bei Selaginella § 526 Ziffer I
Lindbladia § 383 Ziffer 1
Liphan-Indikatorpapiere § 18
Liquido Berlesei § 224
Liquido Faure § 223
Lithionkarmin nach Orth, Zusammensetzung § 320 Ziffer 9
Lithothamnion § 356 Ziffer 12
Lobaria § 431 Ziffer 4
Löfflers alkalisches Methylenblau § 105 Ziffer II
Löfflers Methylenblau zur Färbung der Metachromatinnkörper § 293 Ziffer 3
Lophocolea § 477 Ziffer 2
Lösungsvorschriften für basische und für saure Farben § 97
Lugolsche Lösung, siehe Jod-Jodkalilösung nach Gram § 190
Lunularia § 477 Ziffer 2
Lycopodiales, siehe Bärlappgewächse § 521
Lycopodium
clavatum § 521
innudatum § 521
selago § 521

M

Magdalarot-Anilinblau nach Pfeiffer-Chamberlain § 173
Malachitgrün, Arbeitsvorschrift § 104
Malachitgrün-Kongorot § 164
Mannheimer Fixiergemisch nach Gutbrod § 55
Marchantia § 477 Ziffer 2
Marine Dinoflagellaten (Peridineen) Kultur § 314 Ziffer 2
Marsilia § 501, § 505 Ziffer 4, § 506 Ziffer 3
Massenware § 63
Massulae bei Azolla § 506 Ziffer 5
Materialsammlung § 60
Mayer, Nährlösung nach § 7 Ziffer 3
Mazädium § 433 Ziffer 4
Mazeration § 86 Ziffer 2
Medium H I und H II § 307 A 6
Meeres-Algen, Kultur § 285 Ziffer 4
Meeres-Diatomeen, Kultur § 297
Meerwasser-Formalin
für Rotalgen nach Chamberlain § 351 Ziffer 1
nach Migula § 344 Ziffer 1
Melanoconiceae § 412
Präparation § 413
Melzers Reagens § 374
Membranen der Zelle § 21
Membranfärbungen bei Kryptogamen, Übersicht § 159 Ziffer III
Metachromatinkörper § 288 Zif-er 7, § 293 Ziffer 3
Methylalkohol als Fixiermittel § 25
Mthylbenzoat zur Paraffineinbettung § 76 Ziffer 3
Methylenblau, Lebenfärbung von Pilzhyphen § 105
Methylenblau, Arbeitsvorschrift § 105 Ziffer 1
Methylenblau-Eosin nach Straßburger zur Blaualgenfärbung § 293 Ziffer 2
Methylenblau-Eosin nach Mallory § 165
Methylgrün § 106
Methylkarmin, alkoholisch nach Schwarz § 126
Methylviolett, Arbeitsvorschrift § 102 Ziffer 1 bis 3
Metzgeria § 476 Ziffer 3

Microstoma juglandis § 397 Ziffer 3
Mikrochemische Untersuchungen an
Flechtenschnitten § 429
Mikro-Kulturen § 6, § 16
Mikrosporen bei Diatomeen § 304
Mikroskope § 2
Mikroskopierlack, japanischer § 240
Mikrotome § 2, § 73
Milchsäurebakterien § 267
Milchsaftschläuche bei Pilzen § 361 Ziffer 5,
§ 364 Ziffer 7
Minimum-Filter nach Schmelzer § 64 Ziffer 1
Mistbakterien § 264
mittelbare Färbung § 93 Ziffer 5
Mitochondrien § 19
Mnium § 465
Molischs Nährlösung für Eisenbakterien § 282
Ziffer 3
Molybdän-Hämatoxylin nach Held § 145
Moose
Allgemeines § 446
Blätter § 467
Brutkörper § 464
Einbetten in Gummi arabicum § 449
Einbetten in Zelloidin § 450
Erhaltung der grünen Farbe § 447 Ziffer 1
Färbungen § 452 bis 461
Fixierung § 447 Ziffer 2 bis 10
Laubmoose §§ 462 470
Lebermoose §§ 475 - 478
Moos-Stämmchen § 465
Sproßachsen §466
Torfmoose §§ 471 - 474
Totalpräparate § 468
Uneingebettet Schneiden § 448
Moosfarne § 526
Morchella § 370 Ziffer 2
Mörckia § 476 Ziffer 3
Mordant § 188 Ziffer 1
Mucedinaceae § 415
Mucilago spongiosa § 383 Ziffer 1
Mucor mucedo § 391 Ziffer 2
Muzikarmin § 128
Mycelia sterilia § 419, § 420
Mycoderma § 402
Mykorrhiza § 419
Myxobakterien § 277
Myxomyceten, siehe Schleimpilze § 378

N

Nachfärbungen nach Becher-Farben § 170
Naphtholschwarz, Arbeitsvorschrift § 115
Naphtholschwarz-Orange-G zur
Simultanfärbung § 115
Naphthopurpurin nach Becher §§ 147, 156
Nährbouillon für Bakterien § 7 Ziffer 4
Naphthazarin nach Becher §§ 147, 155
Nectria § 407 Ziffer 2
Nemalion multifidum § 356 Ziffer 6
Nephrolepsis § 483
Nephroma § 431 Ziffer 4
Niedere Ascomyceten §§ 398, 399
Niedere Basidomyceten §§ 392, 393,394
Niederschläge
in Sublimatmaterial § 30
nach Formalinfixierung, Entfernung § 26
Niglitin nach Eckert § 217
Nigrosin § 116
Nitrose und Nitrofarbstoffe § 88 Ziffer 5
Normandina pulchella § 435
Nostoc § 293 Ziffer 2
Nuklealreaktion
bei Blaualgen § 290, § 293 Ziffer 5
bei Zieralgen § 329 Ziffer 2
nach Feulgen § 203

O

Objektträger aus Quarz für Aschebilder § 515
Oedogonium § 338 Ziffer 5
Öl in Pilzhyphen, Nachweis und Färben
§ 364 A Ziffer 7
Öle als Einschlußmittel § 230
Ölmischung, saure nach Bolcack zur Entfernung
von Kaliumpikrat § 41
Oidium § 402
Olpidium brassicae § 390 Ziffer 3
Oomyceten § 390
Oospora § 415
Orange G, Arbeitsvorschrift § 117
Opegrapha § 431 Ziffer 2
ata § 437
Ophioglossum § 483
Ordnung der Präparatensammlung § 246
Orseillin BB, Arbeitsvorschrift § 118
Osmium-Imprägnation § 195
Osmiumsäure als Fixiermittel § 29
Osmiumsäuredämpfe zum Fixieren §§ 29, 53
Oszillatorien § 292 Ziffer 2
Oxazinfarben § 88 Ziffer 5
Oxalsaurer Kalk, Entfernung aus
Flechtenschnitten § 425

P

Paraffin zum Uneingebettet-Schneiden § 74
Paraffin-Einbettung § 76 Ziffer 1 bis 5
Paraffinblöcke
Fehler § 77 Ziffer 2
Gießen § 76 Ziffer 5
Schneiden § 77 Ziffer 1
Paraffinum liquidum als Einschlußmittel § 207
Parakarmin nach P.Mayer § 131
Paraphyllien § 467 Ziffer 2
Parasitische Grünalgen § 337 Ziffer 3
Parasitische Plasmodien § 387
Parmelia § 434 Ziffer 2
Pediastrum § 337 Ziffer 5
Pektinstoffe § 21
Pektinzapfen bei Schachtelhalmen § 513
Pellia § 476 Ziffer 3, § 478 Ziffer 5

Peltigera aphtosa § 431 Ziffer 4
Penicillium § 406 Ziffer 6
Pepplersche Geißelfärbung § 260 Ziffer 5
Perenyische Lösungen § 286 Ziffer I
Peridineen, siehe Flagellaten § 314
Peristom § 470 Ziffer 3 und 5
Perithezien der Flechten § 433 Ziffer 3
Peronospora § 390 Ziffer 7
Peziza § 408 Ziffer 3
Pfeiffersche Algenfärbung §§ 177, 178
Pfeiffers Gemisch § 35
pH § 17
Phaeophyceae, siehe Braunalgen § 343
Phenol-Hämatoxylin-pyronin z. Flechtenfärbung § 427 Ziffer 3
Phoma § 411
Phosphormolybdänsäure zum Beizen bas. Farben § 95
Phosphorwolframsäure zum Beizen bas. Farben § 95
Phykozyan, Nachweis nach Kohl § 293 Ziffer 6
Phycomyceten, siehe Algenpilze § 388
Phyllobium dimorphum § 337
Phyllozyansäure, Inaktivierung der § 66 Ziffer 1
Phyllosticta § 411
Phytophtora § 390
Pianese, Farbgemisch § 183
Pikrinsäure
  Beize für basische Farben § 95
  Fixiermittel § 28
  saure Farbe § 119
Pikrinsäuregemisch nach Bouin § 41
Pikrin-Schwefelsäure § 42
Pikrokarmin-Anilinblau, Simultanfärbung § 184
Pikro-Nigrosin, Simultanfärbung § 185
Pilayella § 348 Ziffer 2
Pilolobus cristallinus § 391 Ziffer 4
Pilularia § 501, § 506 Ziffer 2
Pilze
  Allgemeines § 359
  Cytologische Färbungen § 365
  Einbetten und Schneiden § 363
  Färbemethoden bei höheren Pilzen §§ 364, 365
  Färbemethoden bei niederen Pilzen § 366
  Fixierung der höheren Pilze § 361
  Fixierung der niederen Pilze § 362
Pilzhyphen im Gewebe höherer Pflanzen § 367
Pilzfarbstoffe § 376
Pilzgallen § 419
Pilzgifte § 375
Pilzhyphen
  Fixierte Hyphen §364 A Ziffer 2
  im Gewebe höherer Pflanzen § 367
  Lebendfärbung § 364 A Ziffer 1
Pilzwurzel § 419
Pinnularia viridis § 302 Ziffer 1
Plagiochilla § 477 Ziffer 2
Planktonformen bei Diatomeen § 303
Plasmafärbung
  mit Methylgrün § 106
  Übersicht § 159 Ziffer II
Plasmaströmung bei Armleuchteralgen (Nitella) § 319
Plasmodesmen von Blaualgen § 292 Ziffer 2
Plasmodiophora brassica § 387 Ziffer 2
Plasmodium §§ 384 bis 387
  Kultur nach Constantineanu § 384 Ziffer 2
Platycerium § 483
Plectascineae § 406
Pleurococcus § 337 Ziffer 4
Plocamium § 356 Ziffer 3
Podetien § 432, § 434 Ziffer 3
  Färbung § 436 Ziffer 2
Polarisationsmikroskop § 515
Porenkanäle §. 302 Ziffer 2
Polydes rotundus § 356 Ziffer 8
Polypodium vulgare § 483
Polysiphonia § 356 Ziffer 2
Polystigma § 411
Polytrichum § 465
Präparatensammlung, Ordnen derselben, § 246
Präparierlupe § 2
Preissia § 477 Ziffer 2
Progressive Färbung § 93 Ziffer 2
Promycel
  der Brandpilze (Kultur) § 395 Ziffer 2
  der Rostpilze (Kultur) § 396 Ziffer 3
Propylalkohol als Fixiermittel § 25
Prothallus
  Farne § 495
  Isoetes § 527 Ziffer 6
  Lycopodium § 525 Ziffer 2
  Schachtelhalmen § 518
  Selaginella § 526 Ziffer 2
  Wasserfarne § 506, Ziffer 3,4 und 5
Protoplasma, chemische Zusammensetzung § 19
Protoplast § 288 Ziffer 2
Protococcales § 337
Protomyces macrosporus § 400
Protonema
  Färbungen § 452, § 463 Ziffer 3
  Kultur § 446 Ziffer 2, § 463
  Laubmoose, primäres § 463 Ziffer 2
  Laubmoose, sekundäres § 463 Ziffer 2
Protosiphon botryoides § 337 Ziffer 8
Protostele § 486 Ziffer 5
Psalliota § 368
Psilospora § 411
Pteris cretica § 483
Puccinia
  graminis § 396 Ziffer 5
  traillii § 396 Ziffer 3
Purpurbakterien
  Allgemeines § 284 Ziffer 1
  Färbung § 284 Ziffer 3
  Kultur § 284 Ziffer 2
Pykniden § 438
Pyrenoide § 19
Pyrenomyceten § 407
Pyridin-Zelloidineinbettung nach Bauer § 78 Ziffer 3
Pyronin G, Arbeitsvorschrift § 120

Pyronin-Anilinblau nach Eckert §175
Pyronin-Lichtgrün nach Eckert § 175
Pyronema confluens § 370 Ziffer1
Physarium § 383 Ziffer 1

Q

Quellbare Objekte, Fixiermittel dafür § 50

R

Rawitzsches Glycerin-Alaun-Hämatein § 143
Reagenz
  nach Gilbert § 374
  nach Melzer § 374
Regaudsches Gemisch § 56
Regressive Färbung § 93 Ziffer 3
Reihenpräparate der Diatomeen § 307 B
Reinigen von Glaswaren § 3
Reinkulturen §§ 6 und 14
Retortenzellen § 472 Ziffer 2
Rhizoctonia § 419
Rhizom-Knollen bei Schachtelhalmen § 511
Rhizomorpha § 419
Rhodobacteriaceae § 284
Rhodobryum roseum § 465
Rhodomalia § 356 Ziffer 3
Rhodophyceae, s. Rotalgen § 349
Rhytisma acerinum § 408 Ziffer 1
Riccia § 476 Ziffer 2, § 478 Ziffer 2
Rindenflechten § 430
Rinodinia § 437
Rohkulturen § 5, § 13
  von Algen nach Strugger § 285 Ziffer 2
Rostpilze § 396
  Allgemeines § 396 Ziffer 1
  Histologische Untersuchungen § 396 Ziffer 4
  Kulturversuche an Sporen §396 Ziffer 3
  Sporen § 396 Ziffer 2
Rotalgen § 349
  Einbetten und Schneiden § 354
  Erhalten der roten Farbe § 356 Ziffer 5
  Färben der Meeresformen § 353
  Färben der Süßwasserformen § 352
  Fixierung der Süßwasserformen § 350
  Fixierung der Meeresformen § 351
  Fortpflanzung §§ 357, 358
Rote Farbstoffe, Erhaltung § 68
Rüben als Nährböden § 8 Ziffer 3
Ruijters Verfahren zum Umranden von Glyceringelatinepräparaten § 241 Ziffer 2
Russula, chemische Untersuchungen an § 373, § 374
Rutheniumrot § 196

S

Saccharomyceten § 401-404
Saccharomyces cerevisiae § 401 Ziffer 3
Safranin
  Arbeitsvorschrift § 107
  Färbung mit der freien Base § 188 Ziffer 8
  Verdrängung durch Lichtgrün aus unverholzten Stellen der Membranen § 107
Safranin-Anilinblau (Doppelfärbung) § 172
Safranin-Gentianaviolett-Lichtgrün nach Geidies § 169
Safranin-Gentianaviolett-Orange G nach Flemming § 168
Safranin-Lichtgrün
  Doppelfärbung § 171
  Simultanfärbung § 181
Salvinia § 501, § 505, Ziffer 3, § 506 Ziffer 4
Salzsaurer Alkohol zum Differenzieren § 94 Ziffer 2
Sammeln, Allgemeines über § 4
Sandarac-Einschlußmittel nach Mc.Clung § 236
Sapehinsches Gemisch § 57
Saprolegnia § 390 Ziffer 6
Sartorysche Flüssigkeit § 367 Ziffer 2
Saure Farbstoffe § 89 Ziffer 2, § 91
  Erhöhung der Färbbarkeit § 188 Ziffer 9
Saures Hämalaun nach P.Mayer § 142
Saure Ölmischung nach Bolzack zur Entfernung von Kaliumpikrat § 41
Säurefeste Bakterien, Färbevorschrift § 260 Ziffer 7
Säurealizarinblau nach Becher § 150
Säurefuchsin, Arbeitsvorschriften § 121
Schachtelhalme § 507
  Antheridien § 519
  Archegonien § 520
  Blätter § 514
  Casparischer Streifen § 512
  Färben § 510
  Fixierung § 508
  Internodien § 512
  Knoten § 513
  Materialbeschaffung § 507
  Pektinzapfen § 513
  Prothallien § 518
  Schneiden, Einbetten § 509
  Sporen § 517
  Sporangien § 516
  Wurzeln, Rhizom, Rhizomknollen § 511
Scheidenbakterien § 278
Schiffs Reagens § 203
Schimmelpilze (Zygomyceten) § 391
  auf Obst § 406 Ziffer 2
  auf Wursthäuten § 406 Ziffer 7
  Kultur auf dem Objektträger § 406 Ziffer 3
  ohne Hauptfruchtformen § 414
Schistostega § 463 Ziffer 1
Schizosaccharomyces octopus § 401
Schleimbakterien § 277 Ziffer 1
  Färbung § 277 Ziffer 3
  Rohkulturen § 277 Ziffer 2
Schleimpilze
  Allgemeines § 378
  Einbetten, Schneiden § 380
  Einschließen § 382
  Färbungsvorschriften § 381

Sammeln § 378
Sporangien und Sporen § 383
Schneiden
Allgemeines § 73
von schwer schneidbaren Zelloidinblöcken § 81
Schwefelbakterien § 279
Färbung § 280
Kultur farbloser Schwefelbakterien § 279 a
Kultur roter Schwefelbakterien § 279 b
Nachweis der Schwefeltröpfchen § 280
Schwefeltröpfchen § 280
Schwefelblei-Inprägnation § 200
Schwefelfarben § 89 Ziffer 7, § 91
Schwefeleisenimprägnation nach Kisser § 199
Schweinsborsten zum Präparieren von Diatomeen § 3, § 307 B
schwierig färbbare Bakterien § 260 Ziffer 2
schwierige Färbbarkeit § 188
nach Brennspiritus § 188 Ziffer 6
nach Formalienbehandlung § 188 Ziffer 3
nach Osmiumfixierung § 188 Ziffer 4
nach Pikrinsäure § 188 Ziffer 4
nach Salicylsäure, Benzoesäure, Thymol § 188 Ziffer 5
von Tropenmaterial § 188 Zif- fer 7
Scleroderma vulgare § 369
Sclerotinia § 408 Ziffer 4-6
Sclerotium § 419
Scoliotrichum melanophtorum § 416
Scolopendrium § 483
Seife zum uneingebettet-Schneiden § 74
Selaginella § 526
Sporangien § 526 Ziffer 1
Sporen § 536 Ziffer 2
Stamm und Sproß § 526 Ziffer 1
Septoria § 411
Sideromonas § 283 Ziffer 4
Silbernitratverfahren nach Straßburger § 194
Silberimprägnation § 192
Simultan-Mehrfachfärbungen § 179
Siphonocladiales § 339
Siphonales § 340
Solorina § 431 Ziffer 4
saccata § 434 Ziffer 2
Soredien § 432
Sorosphaera veronica § 387 Ziffer 3
Spaltöffnungen
bei Farnblättern § 488
bei Moossporogonen § 470 Ziffer 3
bei Schachtelhalmen § 512
Sparmaterial § 64
Spermatozoiden
bei Armleuchteralgen § 321 Ziffer 3
bei Laubmoosen § 469 Ziffer 2
bei Farnen § 500
bei Lebermoosen § 477 Ziffer 2
Spermogonien der Flechten § 438
Sphacelaria § 348 Ziffer 3
Sphaeroplea § 339 Ziffer 4
Sphaeropsidales § 411
Präparation § 413
Sphaerotilus natans § 278
Sphagnum, s. Torfmoose § 471
Spirogyra § 332 Ziffer 2
Splachnum § 470 Ziffer 3
Sporangien
Arten § 383 Ziffer 1
bei Farnen § 492
bei Schachtelhalmen § 517
bei Schleimpilzen § 383
reife Sporangien § 383 Ziff. 2
unreife Sporangien § 383 Ziff.5
Sporenkeimung § 383 Ziffer 6, § 383 Ziffer 8
Sporenfärbung § 383 Ziffer 7
Sporen
der Blaualgen § 294 Ziffer 5
der Farne §§ 493, 496
der Laubmoose § 470 Ziffer 4 und Ziffer 5
der Schachtelhalme § 517 und § 518
Sporen der Brandpilzen § 395
Histologische Untersuchung § 395 Ziffer 3
Keimversuche § 395 Ziffer 2
Untersuchung § 395 Ziffer 1
Sporen höherer Pilze § 371
Färbung § 371 Ziffer 2
Gewinnung § 371 Ziffer 1
Keimversuche § 371 Ziffer 3
Sporenbildende Bakterien § 271
Sporenbildung
bei Ascomyceten § 370
bei Bärlappgewächsen § 525 Ziffer 1
bei Basidomyceten § 369
bei Farnen § 492
bei Isoetes § 527 Ziffer 5
bei Moosen § 470 Ziffer 3
bei Schachtelhalmen § 516
bei Selaginella § 526 Ziffer I
Sporenfärbung bei Bakterien nach Möller § 260 Ziffer 4
Sporenuntersuchung bei Russula mit Jod § 374
Sporogone der Moose, Untersuchungsmethoden § 456
Sporophylle § 517, § 527 Ziffer 1 und Ziffer 4
Sporophyt der Ascomyceten § 370 Ziffer 2
Sporokarpien der Wasserfarne § 506
Sporodinia § 391 Ziffer 3
Spreuschuppen bei Farnen § 490
Sproßachsen bei Armleuchteralgen § 320 Ziffer 2
Sproßknöllchen der Armleuchteralgen § 320 Ziffer 5
Stachelkugeln,
Färbung für Dauerpräparate § 320 Ziffer 9
Imprägnation mit Berliner Blau § 320 Ziffer 9
Lebendfärbung § 319
Standardisierte Farbstoffe Bayer § 87
Stärke § 20 Ziffer 3
Darstellung isolierter Körner § 320 Ziffer 7
Entfernung § 72 Ziffer 1
Imprägnation mit Silber, Darstellung in Schnitten § 320 Ziffer 6
Stearin zum uneingebettet-Schneiden § 74
Steinflechten § 440

Stele § 486 Ziffer 4
Stereocaulon § 431 Ziffer 4
Sterilisation durch Erhitzen § 9
Stenocybe § 435
Stickstoffbindende Bakterien § 273
Stilbaceae § 417
Strahlenpilze § 276
Strauchflechten § 430
Streupräparate
  von Diatomeen § 307 B
  von Verkieselungen § 515 Ziffer 4
Strichkultur nach Lindner § 16 Ziffer 3
Struthiopteris § 483
Stückfärbung
  mit Boraxkarmin § 125
  Vorschrift II mit Methylkarmin nach Schwarz § 126
Stylosporen bei Flechten § 437
Styrax § 307 A 2
Styresin § 307 A 2
Stysanus § 417
Sublimat als Fixiermittel § 30
Sublimatalkohol nach Schaudinn § 48
Sublimat-Eisessig nach Kaiser § 46
Sukzedane Mehrfachfärbungen § 160
Sulfoformol § 374
Sulfovanilin § 373 Ziffer 4
Susa nach Heidenhain § 47
Substantivische Farben § 89 Ziffer 3, § 91
Substantivisches Färben § 93 Ziffer 4
Sumpfbrachsenkraut § 527
Synchytrium endobioticum § 390 Ziffer 2

T

Tannin-Brechweinstein zum Beizen basischer Färbungen § 95
Tannin -Eisenchloridfärbung § 198
Taphrina § 405
Terpentin
  nach Suchaneck § 234 Ziffer 1
  nach Voßler § 234 Ziffer 1
Teleutosporen § 396 Ziffer 3
Tetraphis pellucida § 464
Tetraspora § 337 Ziffer 1
Thelotrema lepadinum § 434 Ziffer2
Thermophile Bakterien § 272
Thiazinfarbstoffe § 88 Ziffer 5
Thiobacteriaceae § 279, s. Schwefelbakterien
Thiotrix §§ 279, 280
Thorea ramosissima § 355, II
Tolufix I und II § 307 A 6
Torf als Nährboden § 8 Ziffer 4
Torfmoose §§ 471 bis 474
  Antheridien § 473 Ziffer 1
  Archegonien § 473 Ziffer 2
  Halten in Kulturen § 446 Ziffer 2
  Sporophyt § 474
  Stämmchen § 472 Ziffer 2
  Vorkeim § 472 Ziffer 1
Torula § 402 und § 416
Trentepohlia § 338 Ziffer 4
Trichloressigsäure nach Heidenhain § 43
Trichogyne
  bei Flechten § 439
  bei Rotalgen § 358 b
Triphenylmethanfarbstoffe § 88 Ziffer 4
Tropenmaterial, schwierige Färbbarkeit von § 188 Ziffer 7
Tropfen, hängender § 16 Ziffer 1
Tuber rufum § 370 Ziffer 2
Tuberculariaceae § 418
Tuscheverfahren nach Burri § 260 Ziffer 6
Typenplatten von Diatomeen § 307 B

U

Übertragen von Algen aus Wasser in Alkohol § 247 Ziffer 3
Ulothrix § 338 Ziffer 1
Ulva § 338 Ziffer 2
Uneingebettet Schneiden § 74
Ungefärbte Präparate niederer Pilze § 377
Unmittelbare Färbung § 93 Ziff. 4
Unvollständig bekannte
  Flechten § 432
  Pilze § 409
Uredineen, siehe Rostpilze § 396
Uredosporen § 396 Ziffer 3
Umrandungspaste nach Kousal § 239
Urocystis
  anemonis § 395 Ziff. 3
  occulta § 395 Ziffer 3
Uromycis Pisi § 396 Ziffer 5
Usnea barbata § 431 Ziffer 2
Ustilagineen siehe Brandpilze § 395
Ustilago Maydis § 395

V

Vaucheria § 340 Ziffer 3
Veränderung der Objekte durch das Fixieren § 58
Verblassen der gefärbten Präparate § 251 Ziffer 1
Verkieselung bei Schachtelhalmen § 515
Verstärken von Becher-Färbungen mit Kobaltchlorid § 147
Verrucaria § 435, § 443 Ziffer 2
Venetianer Terpentin § 234
  Einschluß von Algen § 234 Ziffer 3
  Einschluß gewöhnlicher Objekte § 234 Ziffer 2
Venturia § 407 Ziffer 6
Vierfachfärbung nach Johannsen § 176
Viktoriablau-Pyronin zur Gram-Simultanfärbung § 187
Volutella § 418
Volutin, Nachweis § 293 Ziffer 6
Volvox § 336
  Färbung § 336 Ziffer 2
  Kultur § 336 Ziffer 2

Vorkeim
der Farne § 495
der Laubmoose § 463 und § 464
der Lebermoose § 476 Ziffer 1
der Schachtelhalme § 518-520
der Torfmoose § 472 Ziffer 1
der Wasserfarne § 506 Ziffer 3 bis 5

W

Wabenräume § 288 Ziffer 5
Wasserfarne § 501
Bezugsquellen § 501
Blätter § 505
Blattstiele § 505
Einbetten und Schneiden § 503
Färbemethoden § 504
Fixieren § 502
Sporokarpien § 506
Prothallien § 506
Wurzeln § 505
Wasserpilze § 390 Ziffer 4
Wasserstoffexponent § 17
Wasserstoffionenkonzentration § 17
Bestimmung derselben § 18
Weißes Medium § 307 A 5
Wilde liefen § 401 Ziffer 5
Wurzelknöllchen der Armleuchteralgen § 320 Ziffer 5

X

Xanthenfarbstoffe § 88 Ziffer 5
Xanthoria § 431 Ziffer 2, § 434 Ziffer 1
Xylaria § 370 Ziffer 2, § 407 Ziffer 4
Xylographa § 437

Z

Zahnschleimbakterien § 262
Zedernholzöl
als Einschlußmittel § 237
zur Paraffineinbettung § 76 Ziffer 4
Zellbestandteile, organisierte § 19
Zellkern, chemische Zusammensetzung § 19
Zellmembranen § 21
Zellplasma, chemische Zusammensetzung § 19
Zellsaft § 20 Ziffer 1
Zelloidineinbettung
doppelte nach Schmelzer § 80
nach Pikrinsäurefixierung § 41
klassische Methode § 78 Ziffer 1
Zelloidin-Entfernung aus den Schnitten § 82 Ziffer 3
Zelloidinblöcke
Behandeln mit Glycerin, Terpineol § 81
Schneiden von, § 81
Zelloidinschnitte
Aufkleben derselben § 82 Ziffer 4
Aufquellen in Wasser § 82 Ziffer 2
Übertragen aus Alkohol in Wasser § 82 Ziffer 1
Zellulose, Struktur, Eigenschaften, Löslichkeit § 21
Zellulosefärbungen, Übersicht § 159 Ziffer III
Zellulose-Holz-Doppelfärbung, Übersicht § 159 Ziffer III
Zentralkörper bei Blaualgen § 288 Ziffer 5
Zenkers Gemisch § 45
Zentroplasma § 288 Ziffer 4, § 293 Ziffer 2
Zetrarsäure § 429
Zieralgen
Färben § 324, § 328, § 329 Ziffer I
Fixieren § 323
Fortpflanzung § 330
Nuklealreaktion § 329 Ziffer 2
Präparate in natürlichen Farben § 327, Ziffer 2 und 3
Zoosporenbildung bei Vaucheria § 340 Ziffer 3
Zuckeragar für anärobe Bakterien § 256
Zupfpräparate § 86
Zyanin, siehe Chinolinblau § 99
Zygnematazeen
Färben § 325
Fixieren § 323
Fortpflanzung § 332 Ziffer 4 bis 7
Künstliche Herbeiführung der Kopulation § 332 Ziffer 8
Präparationstechnik § 332 Ziffer 9
Präparate in natürlichen Farben § 331, § 327
Zygomyceten § 391
Rohkultur § 391 Ziffer 1
Zygosporen bei Jochalgen § 332 Ziffer 6
Zygote der Desmidiazeen § 330 Ziffer 2