

Jahr 1989	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 8
----------------------------	--	-------------------------

Histologische Schnitte - Präparation und Färbung

von Heinz Kringler

1. Was wollen wir untersuchen - und wie?

Wollen wir z. B. Meiosestadien in den Pollenmutterzellen der Lilie im Quetschpräparat oder im Schnittpräparat sehen? Machen wir einen Quer- oder einen Längsschnitt? Schneiden wir die ganze Knospe oder nur die noch geschlossenen Antheren?

Diese Überlegungen stehen ganz am Anfang unseres Vorhabens! Wir wählen auch die Objekte nicht zu groß (was der Anfänger sehr gern tut), denn dann sparen wir Chemikalien und erleichtern uns das spätere Schneiden. Bei manchen Fixiermitteln sollten die Objekte so klein wie möglich sein, weil sie in große Objekte schlecht eindringen und dann nicht durch fixieren.

2. Fixierung der Objekte

Damit sind wir schon bei der Fixierung:

Alle Objekte müssen vor der Weiterbehandlung fixiert werden.

Sie werden grundsätzlich angeschnitten, weil nur so das Fixiermittel ungehindert eindringen kann.

Bei der Auswahl des Fixierungsmittels denken wir bereits an die spätere Färbung. Wollen wir ein Übersichtspräparat oder eine Spezialfärbung oder eine histochemische Reaktion? Ob eine Färbung gut oder schlecht ausfällt, hängt in den meisten Fällen vom Fixiermittel ab (nach einer reinen Formolfärbung gelingt in der Regel eine AZAN-Färbung nach Heidenhain nicht). Wir verwenden am besten Fixiergemische.

Ich verwende die in Tabelle 1 aufgeführten Gemische. Damit färbe ich die verschiedenen Objekte gemäß der Tabelle 2. Die Dauer der Fixierung ist abhängig von der Art des Fixiermittels. Sie wird in der Regel bei den ersten drei Fixiermitteln der Tabelle 1 und bei einer Objektgröße von 10 mm Kantenlänge 24 bis 48 Stunden betragen.

Tabelle 1: Fixiergemische

Gemisch	Bestandteile	Anteil
"Bouin"	Pikrinsäure, ges. Formalin, konz. Eisessig	15 5 1
AFE 90.5.5	Spiritus (70-94%) Formalin Eisessig	90 5 5
Lugol/A/E	Lugol'sche Lösung Äthanol 96% Eisessig	6 ml 3 ml 0.25 ml

Bei "Bouin" kann das Objekt nach einer gewissen Zeit durchgeschnitten werden; die Fixierung ist dann befriedigend, wenn das Objekt durchgehend gelb gefärbt ist. Die Menge des Fixiermittels sollte mindestens das 50fache des Objektvolumens betragen.

Tabelle 2: Fixierung der Objekte

Objekte	Gemische
tierische	Bouin
pflanzliche	AFE 90.5.5 Bouin
Algen	Formalin 1:9 Chromessigsäure
Plankton	Formalin 1:9 Chromessigsäure
Handschnitte durch pflanzl. Material	Lugol/A/E

3. Auswaschung des Fixiermittels

Nach der Fixierung muss das Fixiermittel ausgewaschen werden. Dazu verwende ich die in Tabelle 3 aufgeführten Methoden.

Tabelle 3: Auswaschen des Fixiermittels

Gemisch	Auswasch-Methode
"Bouin"	70%iger Spiritus bis die Gelbfärbung verschwunden ist
AFE 90.5.5	90%iger Spiritus
Formalin	Leitungswasser
Chromessigsäure	Leitungswasser

4. Entwässerung der Objekte

Ist das Fixiermittel ausgewaschen, muss das Objekt zur Einbettung in Paraffin total entwässert werden. Das muss umso schonender erfolgen, je zarter die Struktur des Objektes ist.

Die Entwässerung mit den Äthanolstufen (Spiritus!)

30% - 50% - 70% - 80% - 90% - 94%

ist in der Regel ausreichend. Wird mit 70%igem Spiritus ausgewaschen (z. B. nach "Bouin"), dann beginnt die Entwässerung mit der Stufe "80%". Wird mit 90%igem Spiritus ausgewaschen (z. B. bei AFE 90.5.5 u. ä.), dann fahren wir mit 94%igem Spiritus fort. Nach dem Auswaschen mit Wasser beginnen wir mit Spiritus "30%".

Eine sehr schonende, zeitsparende (wenn auch teurere) Methode ist die Entwässerung mit Äthylglykol (Cellosolve). Wir kommen nach dem Auswaschen in Wasser mit

Jahr 1989	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 8
----------------------------	--	-------------------------

einer 50%igen und drei 100%igen Stufen aus; nach dem Auswaschen in 70%igem Spiritus kommen wir mit dreimal 100% aus.

Nun kommen die Objekte für zweimal 24 Stunden in 100%igen Isopropylalkohol (am besten "Merk Nr. 9634 pro analysi" - teuer!). Ein längerer Aufenthalt schadet nicht, da Isopropylalkohol nicht härtet. Diese Entwässerungsstufen sollten nur einmal benutzt werden; sie werden dann unter Beachtung des Umweltschutzes ausrangiert!

Von nun an scheiden sich die Geister - je nachdem, ob es sich um ein tierisches oder ein botanisches Objekt handelt. Wir müssen nun einen Übergang vom Alkohol zum verflüssigten Paraffin finden, denn Paraffin löst sich nicht in Alkohol - und umgekehrt. Der Alkohol muss aber aus dem Gewebe heraus und das Paraffin hinein, und zwar in jede einzelne Zelle.

Wir benötigen also ein sogenanntes Intermedium, das Paraffin löst. Xylol und Toluol sind schlecht, weil sie durch Härtung schlecht schneidbare Paraffinblöcke ergeben. Benzol (gut nach Vorbehandlung mit Methylbenzoat), Chloroform, Dioxan, Tetrahydrofuran u. ä. scheiden wegen ihrer starken Giftigkeit aus, es sei denn, wir besitzen ein Labor mit Abzug! Im übrigen gibt es auch hier eine stattliche Reihe von Verfahren, von denen ich zwei, die zur Not auch in der Wohnung durchgeführt werden können, herausgreife.

Tierische Objekte:

Wir legen die Objekte in Methylbenzoat (erhältlich z. B. bei der Fa. Chroma). Dort schwimmen sie längere Zeit an der Oberfläche und sinken dann langsam auf den Boden des Gefäßes. Dabei werden sie durchscheinend. Ist letzteres nicht so, dann ist nicht genügend entwässert worden und die Objekte müssen nochmals zurück in eine frische Portion Isopropylalkohol. Nach der ersten Methylbenzoatpassage folgt eine zweite, insgesamt etwa 24 Stunden. Darauf folgen drei Portionen reines Terpentinoel (TP), in denen die Objekte je ca. 12 Stunden verbleiben. Das Terpentinoel kann in der Weise mehrmals verwendet werden, dass TP-Stufe 1 nach Gebrauch weggeschüttet wird, TP-Stufe 2 als TP-Stufe 1 und TP-Stufe 3 als TP-Stufe 2 verwendet wird. Die TP-Stufe 3 ist dann zu erneuern. Aus der letzten TP-Stufe wird direkt in geschmolzenes Paraffin (54° - 56°; z. B. Fa. KOSMOS) übertragen.

Das Paraffin darf während der Durchtränkungszeit nie hart werden!

Jahr 1989	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 8
----------------------------	--	-------------------------

Botanische Objekte

Nach den zwei bis drei 24stündigen Aufenthalten in Isopropylalkohol pro analysi werden die Objekte in zwei Portionen 1. Butanol (normal Butanol; Merk Nr. 1990; unbedingt pro analysi, sonst klappt es u. U. nicht) gelegt.

Da Butanol pro analysi ziemlich teuer ist, kann wie beim Terpentinoel verfahren werden. Also: Butanol-Stufe 1 wegschütten, Butanol-Stufe 2 als Stufe 1 verwenden und die Butanol-Stufe 2 neu ansetzen. In jeder Butanol-Stufe sollte die Objekte mindestens 24 Stunden (oder länger) belassen werden.

Dann wird das Objekt direkt in flüssiges Paraffin - wie oben - übertragen. Es werden also keine Zwischenstufen wie beim tertiären Butanol eingeschoben (s. Gerlach, 1969).

Im übrigen kann durchaus auch für botanische Objekte das Verfahren wie für tierische Objekte angewandt werden (s. o.).

5. Paraffindurchtränkung

Das Schneiden von Paraffinblöcken ist sehr von der Raumtemperatur abhängig! Kühle Temperatur ergibt hartes Paraffin und dünne, schlecht bändernde Schnitte. Bei hoher Raumtemperatur können keine dünnen (5 ... 10 µm) Schnitte erzielt werden. In der Literatur wird deshalb empfohlen, Paraffin mit niedrigerem Schmelzpunkt im Winter, mit höherem im Sommer zur Einbettung zu verwenden.

Da wir keine Profis sind, läßt sich diese Methode nur schlecht ausführen. Wenn es im Winter zu kalt oder im Sommer zu heiß ist, müssen wir eben mit dem Schneiden warten, bis die Temperatur stimmt. Im Sommer schneiden wir sonst im Keller und im Winter im Wohnzimmer bei Raumtemperatur. In dieser Sache muss jeder seine eigenen Erfahrungen machen, um gute Schnitte zu erzielen. Ich verwende grundsätzlich Paraffin mit einem Schmelzpunkt von 54° bis 56° (z. B. Fa. KOSMOS). Diesem Paraffin wird 5% (nicht mehr!) weißes oder gelbes Bienenwachs beigegeben, wodurch es geschmeidiger wird.

Zumeist wird zur Durchtränkung mit Paraffin ein Wärmeschrank (Thermostat) benutzt, dessen Temperatur 5° C über dem Schmelzpunkt des Paraffins eingestellt wird. Da insbesondere bei Wärmeschränken mit großer Temperaturbreite (0° bis 250° C) die außen abzulesende Temperatur oft nicht mit der tatsächlichen Innentemperatur über-

Jahr 1989	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 8
----------------------	--	-------------------

einstimmt, empfehle ich, anfangs die Innentemperatur mit einem eingelegten Thermometer zu überprüfen.

Die Anschaffung eines Wärmeschrankes - wenigstens eines kleinen (z. B. bei Fa. KOSMOS) - kann eigentlich nur empfohlen werden, da er vielseitig verwendbar ist und wenig Strom verbraucht. Ein Wärmeschrank und eine Wärmebank gehören eigentlich in jedes kleine Mikrolabor (z. B. für Bakterien- und Pilzkulturen, zum Trocknen aufgeklebter Schnitte, zum Färben, wenn Wärme erforderlich ist, zum Sterilisieren von Geräten u. v. a. m.).

Wem aber die Anschaffung zu teuer ist (und bei unserem Hobby ist ja bekanntlich nichts billig), der kann sich auch preiswerter behelfen. Ich habe mit diesem Behelf zwei Jahre lang mit demselben Erfolg oder Misserfolg gearbeitet wie mit dem Wärmeschrank. In Stehli, 1973 wird die Verflüssigung des Paraffins mit Hilfe einer Kohlefladenlampe empfohlen. Ich habe damit nur die Erfahrung gemacht, dass die relativ teure Lampe, die ich eigens dazu gekauft habe, nach ca. zehn Stunden Brenndauer ihren Geist aufgegeben hat und ich den mühsam vorbereiteten Block wegwerfen durfte.

Ich habe danach an ein Bunsenstativ mit Hilfe von zwei Mikroklammern zwei Infrarotlampen befestigt. Diese Lampen sind als ELSTEIN-Infrarotstrahler*) 60 Watt oder 100 Watt im Fachhandel zu beziehen. Durch zwei Lampenstangen aus Messing mit Gewinde werden Kabel mit einem Anschlussstecker gezogen. Das andere Ende des Kabels wird mit den Anschlüssen an einer Lampenfassung aus Messing verbunden. Die Lampenstange wird dann in die Fassung eingeschraubt und am Bunsenstativ mittels einer Mikroklammer befestigt. Wir benötigen mindestens zwei solcher Lampen, da wir zum Wechseln des Paraffins einen zweiten Behälter mit flüssigem Paraffin brauchen. Wir können natürlich auch das ganze Bunsenstativ wie einen Weihnachtsbaum mit solchen Lampen behängen, aber dann erhebt sich wirklich die Frage, ob nicht doch ein Wärmeschrank letztlich preiswerter ist. Die ELSTEIN-Strahler sind allerdings nicht sehr teuer und haben nach meiner Erfahrung eine lange Lebensdauer.

Im Abstand zur Lampe von ca. zwei cm (ausprobieren!) wird darunter ein Becherglas 30 ml gestellt. Dieses Becherglas wird zuvor bis ca. ein cm unter den Rand mit flüssigem Paraffin gefüllt. Erst, wenn es erkaltet ist, wird es unter die Lampe gebracht. Das Paraffin schmilzt dann etwa bis zur Hälfte. Die aus Terpentinoel oder Butanol kommenden Objekte werden eingelegt. Sie liegen an der Grenze zwischen festem und geschmolzenem Paraffin und können somit nicht überhitzt werden.

Wichtig ist, dass die Objekte gut mit dem Intermedium durchtränkt sind und keine Luftblasen enthalten, denn sie schwimmen sonst unweigerlich an der Oberfläche des flüssigen Paraffins und verbrennen. Durch die Tatsache, dass das Paraffin an der Oberfläche sehr heiß wird, und dass das Intermedium abdampft, ergibt sich eine gewisse

Jahr 1989	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 8
----------------------------	--	-------------------------

Geruchsbelästigung. (Es ist daher u. U. zu empfehlen, den Ehepartner während der Dauer der "Einbettung" in Urlaub zu schicken, um nicht selbst Hausverbot zu erhalten.)

Über die Zeit, wie lange ein Objekt im Paraffin bleiben muss, sind Bände geschrieben worden. Die einzig richtige Antwort ist: "Bis das Objekt voll durchtränkt ist!" Mit dieser Antwort können wir natürlich nicht viel anfangen. Man orientiert sich am besten bei Romeis, 1968, Gerlach, 1969 oder Burck, 1981.

Wir sollten die Objekte lieber etwas länger im Paraffin lassen, denn die Hauptschrumpfung entsteht neben der Entwässerung bereits durch Wärme in der ersten Paraffinstufe. Die Intermedien Terpentinoel und Butanol sind nicht sehr flüchtig, weshalb das Paraffin mehrmals gewechselt werden muss. Wir kommen in der Regel mit drei Paraffinstufen aus. Auch hier gilt: Stufe 1 nach dem Wechsel zum Umweltmobil, Stufe 2 wird Stufe 1, Stufe 3 wird Stufe 2 und Stufe 3 wird aus frischem Paraffin rekrutiert.

Bei der Paraffineinbettung geht es uns wie bei vielen Mikrotechniken ... es muss ausprobiert werden, es müssen Erfahrungen gesammelt werden! Bei den Erfahrungen sind auch die Misserfolge wertvoll!

6. Ausgießen zum Block

Ist das Paraffin vollständig in das Objekt eingedrungen, dann müssen wir dieses in frisches Paraffin mit demselben Schmelzpunkt zu einem Block einbetten. Dazu gibt es alle möglichen Behälter, von den käuflichen (und damit teuren) Einbetträhmchen bis zu den Eiswürfelbehältern im Kühlschrank. Leere Deckglasschachteln tun es auch. Der bastlerischen Phantasie sind dabei nur ganz bestimmte Grenzen gesetzt. Wir sollten aber darauf achten, dass die Einbettgefäße die erforderliche Höhe besitzen, denn erstarrendes Paraffin hinterlässt in der Mitte einen Trichter, und es kann durchaus geschehen, dass das Objekt plötzlich im Freien liegt.

Wir müssen nun frisches, verflüssigtes Paraffin bereithalten. Dazu kaufen wir uns am besten im Kaufhaus ein Emailletöpfchen von ca. ½ Liter Inhalt mit Schnauze zum Ausgießen. In dieses wird das Paraffin (54° - 56° C) nebst 5% Bienenwachs auf einem Campingkocher oder (weil stilechter) auf einem Dreifuß mit Bunsenbrenner geschmolzen. Das Paraffin ist aber jetzt zum Ausgießen zu heiß! Wir gießen es daher in das Einbettgefäß und warten, bis sich am Boden desselben ein weißer Belag, d. h., eine ganz dünne Schicht erhärtendes Paraffin gebildet hat.

Dann legen wir das Objekt mit einer angewärmten Pinzette ein und orientieren es so, wie wir es später schneiden wollen. Die spätere Anschnittfläche sollte zum Boden zei-

Jahr 1989	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 8
----------------------	--	-------------------

gen. Wir lassen das Paraffin dann erkalten, bis sich eine dünne Haut auf der Oberfläche des Blockes zeigt. Ist die Haut stabil geworden, dann legen wir das Einbettgefäß in kaltes Wasser bis zur völligen Erhärtung. Das Paraffin muss dann völlig transparent sein. Das Einbettgefäß wird dann mechanisch entfernt und der Block abgetrocknet.

Nun müssen wir den Paraffinblock mit einem scharfen Küchenmesser trapezförmig zurecht schneiden, wobei wir um das Objekt herum einen Paraffinrand von ca. 3 mm stehen lassen.

Die spätere Schnittfläche schneiden wir mit dem Küchenmesser möglichst plan an, so dass wir später mit dem Mikrotommesser nicht mehr so viel wegschneiden müssen, damit vollständige Schnitte kommen. Das bewirkt nur einen unnötigen Verlust der Messerschärfe. Außerdem können wir dabei gleich feststellen, ob der Block gut oder schlecht oder aber überhaupt nicht schneidbar ist. Bis man genügend Erfahrung gesammelt hat, wird das des Öfteren vorkommen. Wir können aber auch von schlecht schneidbaren, splitternden Blöcken noch einige gute Schnitte retten, wenn wir sie un-aufgeblockt einige Tage in Glycerinwasser 1:10, dem wir einen kleinen Thymolkristall (wegen der Verpilzung) beigegeben haben, legen. Das Gewebe nimmt dann Feuchtigkeit auf und lässt sich leichter schneiden.

Wenn der Block zurechtgeschnitten ist, wird er auf ein Hartholzklötzchen, das in die Halterung des Mikrotoms passt, aufgeklebt. Wir kaufen uns im Handel eine Leiste und sägen uns die Blöckchen zurecht. Mit einem heißen Messer oder einem anderen flachen Metallgegenstand (z. B. Schnittfänger) fahren wir an der Unterseite des Paraffinblocks einige Male entlang, bis sich genügend Paraffin verflüssigt hat und drücken dann den Block auf das Holzklötzchen. Bei dieser Gelegenheit haben wir mit dem heißen Messer die Unterseite des Paraffinblockes geebnet.

Damit haben wir alle Vorbereitungen getroffen, um mit dem Mikrotom schneiden zu können.

Es gibt noch eine Reihe von Einbettungsmitteln, wie z. B. Celloidin, Paraplast, Kunststoffe, Polyäthylenglykol usw. Am einfachsten, sichersten und billigsten ist jedoch immer noch die Paraffineinbettung. Dem Paraffin am nächsten kommen die Paraffin-Kunststoff-Gemische, die genau so wie Paraffin gehandhabt werden (Paraplast, Histowax [Jung]). Diese Gemische dringen schneller in das Objekt ein und sollen noch dünnere Schnitte ermöglichen.

Machen Sie sich aber bitte keine Illusionen! Ich werde immer wieder gefragt: wie dünn kann man mit dem Mikrotom schneiden? Mit einem gut geschliffenen und frisch abgezogenen Messer, einem einwandfrei schneidbaren Block und der richtigen Raumtemperatur sind Schnitte bis zu 5 µm möglich. Wir machen zumeist Übersichtspräparate,

Jahr 1989	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 8
----------------------------	--	-------------------------

für die 7 µm bei tierischen und 10 µm bei pflanzlichen Objekten völlig ausreichend sind. Je dünner die Schnitte sind, desto schlechter sind sie zu färben. Es gibt bei Ultradünnschnitten nur wenige Färbungen, die befriedigen, und man weicht dann auf Versilberungen aus.

Wenn Sie einen 5 µm dünnen Schnitt durch ein Drüsengewebe oder durch ein Nierengewebe unzerrissen zustande gebracht und ihn auch noch mit einer AZAN-Färbung nach Heidenhain schön gefärbt haben - dann haben Sie eine Meisterleistung vollbracht!

7. Schneiden mit dem Mikrotom

Es gibt zwei Typen von Mikrotomen, nämlich das

Rotationsmikrotom: typisches Paraffinmikrotom zum Bänderschneiden für das Routinelabor und das

Schlittenmikrotom: damit kann universeller und individueller gearbeitet werden, weil eine Schrägstellung des Messers möglich ist (Celloidin)

Jede Art hat Vorteile und Nachteile - man sollte beide ausprobieren. Ich rate dem Hobbymikroskopiker, der keine lückenlosen Schnittbänder braucht, zu einem Schlittenmikrotom.

Grundsätzlich wird bei Paraffin mit querstehendem C-Messer geschnitten. C-Messer sind beiderseits gleich plan geschliffen, so dass die Richtung des Einspannens ohne Bedeutung ist.

Einwegmesser oder Abbrechklingen im separaten Messerhalter erreichen nie die Schnittqualität eines Mikrotommessers (Rupp, 1984). Einwegmesser haben aber dort ihre Berechtigung, wo man sein Mikrotommesser schonen will, also bei verholzten Geweben, Geweben mit harten Bestandteilen (z. B. Kristalleinschlüssen) u. a. m.

Man sollte keine größeren Gewebelöcke als 5 mm² schneiden. Ob man mit dem Messer ruckartig oder zartfühlend schneidet, ist von Objekt zu Objekt verschieden und muss ausprobiert werden. Entscheidend ist der richtige Anstellwinkel des Messers (ca. 10°)! Nach einem industriellen Nachschleifen des Messers kann sich der Winkel ändern, weil das Messer als Ganzes geschliffen wird und nicht nur die Facette; das Messer wird bei jedem Schleifen schmaler und dünner. Bei einem zu flachen Anstellwinkel gleitet das Messer über den Block hinweg und liefert allenfalls zusammengeschobene

Jahr 1989	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 8
----------------------------	--	-------------------------

Schnitte. Dieselbe Erscheinung tritt auf, wenn das Messer reif zum Schleifen oder zumindest zum Abziehen ist. Wählt man den Anstellwinkel zu steil, dann erhält man leichter dünnere Schnitte. Es besteht aber die Gefahr, dass das Messer in Schwingungen gerät, die man sogar hört, und über den Block hoppelt. Man erkennt die wellblechartigen Querwellen zumeist erst beim Färben, denn dort wirken sie sich als sog. "Chatter" verheerend aus. Deshalb sehen Sie sich beim Schneiden zwischendurch die Oberfläche des Blocks an, dort erkennt man die "Chatter" sehr deutlich.

Die Schnitte werden nun mit zwei Aquarellpinseln vom Messer genommen und auf eine schwarze Pappe gelegt. Man hüte sich davor, bei dieser Beschäftigung zu husten oder zu niesen, denn dann machen die Schnitte eine Luftreise.

8. Aufkleben der Schnitte

Bei der geringen Dicke der Schnitte können diese nicht mehr im Blockschälchen gefärbt, sondern müssen auf Objektträger aufgeklebt werden. Man kann Einzelschnitte oder Schnittserien (schwieriger!) aufkleben. Ich empfehle, für Einzelschnitte den Paraffinblock an den vier Ecken abzuschrägen, so dass die Trennstelle für die Schnitte deutlich sichtbar ist. Oft genügt dann das unter leichtem Druck ausgeführte Auseinanderstreifen mit zwei feinen Aquarellpinseln, um die Schnitte zu trennen.

Es gibt verschiedene Rezepte für das Aufkleben der Schnitte, wobei ich mit *Eiweißglyzerin* die schlechtesten Erfahrungen gemacht habe. Wenn überhaupt, dann sollte es nur ganz frisch und selbst hergestellt verwendet werden. In Flaschen verkauftes, monatelang oder länger herumstehendes Eiweißglyzerin ist wertlos!

Wir stellen es wie folgt her:

Hühnereiweiß mit dem Schneebesen oder Quirl schaumig schlagen und stehen lassen. Die am Grund des Gefäßes entstandene klare Flüssigkeit im Verhältnis 1:1 mit Glycerin mischen und einen kleinen Thymolkristall zugeben.

Das Ergebnis mit der Fingerkuppe dünn auf dem Objektträger verstreichen. Dann gibt man einen ausreichend großen Tropfen frisch abgekochten dest. Wassers auf den Objektträger und streckt den auf den Tropfen aufgelegten Schnitt auf der Wärmebank (Herstellung einer Wärmebank bei Stehli, 1973, S. 36).

Haupts Klebemittel hält die Schnitte besser fest als Eiweißglyzerin, mir sind jedoch auch bei diesem Mittel immer wieder Schnitte abgeschwommen.

Jahr 1989	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 8
----------------------------	--	-------------------------

Herstellung von Haupts "Adhäsivum":

1 gr. Gelatine (pulv.) bei 30° Celsius in 100 ml Aqua dest. lösen, dann 15 ml Glycerin und 2 gr. Phenol zugeben.

Mit der Fingerkuppe dünn auf dem Objektträger verstreichen. Dieses Mittel ist eine dünnflüssige Ausgabe der Glyzeringelatine nach Kaiser.

In der Literatur wird empfohlen, die gestreckten Schnitte nach Ablauf des Streckwassers in einer Schale Formalindämpfen auszusetzen, um die Gelatine des Aufklebmittels zu härten. Dass diese Methode sehr umständlich und zeitraubend ist, wenn man eine größere Anzahl von Schnitten zu verarbeiten hat, liegt auf der Hand. Dr. Krauter (Mikrokosmos) empfiehlt, dem zum Strecken verwendeten Wasser eine kleine Menge Formalin zuzusetzen. Wir kochen also eine kleine Menge Aqua dest. ab und geben nach dem Abkühlen einige ml Formalin zu. Es sollte nicht soviel sein, dass es beim Strecken der Schnitte in der Nase beißt! Auch sollten wir darauf achten, dass uns das Streckwasser nicht über die Finger läuft, wenn wir es von den Objektträgern ablaufen lassen, denn Formalin fixiert nicht nur unsere Untersuchungsobjekte, sondern auch unsere Haut.

Ich klebe seit einiger Zeit mit Glyzeringelatine nach Kaiser auf. Ein kleines Stück von etwa 1 mm³ wird in die Mitte des gereinigten Objektträgers gebracht, der dann auf die Wärmebank kommt. Ist die Glyzeringelatine geschmolzen, wird sie mit der Fingerkuppe auf dem Objektträger verrieben. Wir verreiben weit über den Platz des späteren Deckglases hinaus, weil am Rand die Dicke immer am stärksten ist. Dort färbt sich die Gelatine mit den meisten Farbstoffen etwas an. Außerhalb des Deckglases können wir den Objektträger später sauber machen oder aber den Farbrand unter dem Etikett verschwinden lassen.

Auf die solchermaßen vorbereiteten Objektträger wird jetzt ein genügend großer Tropfen Formalinwasser aufgetropft und die Schnitte mit der matten Seite nach oben, mit der glänzenden nach unten auf den Tropfen gebracht. Bei Eiweißglycerin kein Formalin zusetzen!.

Die Schnitte müssen frei schwimmen.

Die Objektträger kommen nun auf die Wärmebank, deren Temperatur nicht so hoch sein darf, dass das Paraffin schmilzt. Die Schnitte strecken sich, sobald sich das Wasser erwärmt hat, sehr schnell aus. Ist dies geschehen, dann nehmen wir die Objektträger von der Bank und lassen sie etwas abkühlen. Danach werden sie, wobei man den Schnitt mit dem Pinsel festhält, etwas schräg gehalten, damit das Streckwasser ablaufen kann. Ist der Großteil abgelaufen, orientiert man den Schnitt vorsichtig mit dem

Jahr 1989	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 8
----------------------------	--	-------------------------

Pinsel auf dem Objektträger so, wie man ihn in dem späteren Präparat sehen will. Als dann werden die Objektträger auf ein Trockengestell gebracht (der bastlerischen Phantasie sind bei seiner Herstellung keine Grenzen gesetzt) und mindestens 24 Stunden getrocknet.

Sie können nun gefärbt und weiter verarbeitet werden. Haben wir dazu keine Zeit, dann können wir die Objektträger in den bekannten Präparatekästen jahrelang aufbewahren. Wir sollten nur auf trockene Aufbewahrungsorte achten, da wir sonst mit Pilzbefall rechnen müssen.

9. Entparaffinieren

Wir nehmen jetzt den Glas- (Diamant-)Schreiber und versehen den Objektträger in der rechten oberen Ecke mit einem "X", wo bei das Objekt, d. h. der Schnitt durch das noch nicht herausgelöste Paraffin gut sichtbar ist. Dieser Schnitt muss oben liegen, d. h. er muss zu uns zeigen. Ist der Objektträger xylogetränkt oder teilweise mit Farblösung bedeckt, können wir nur noch schwer feststellen, auf welcher Seite sich der Schnitt befindet. Wenn wir es unterlassen, auf dieses "X" zu achten, laufen wir Gefahr, den Schnitt abzuwischen, wenn wir die Unterseite des Objektträgers von Lösungen säubern wollen.

Zum Entparaffinieren nimmt man in der Regel Färbegläser oder Küvetten mit eingeschliffenen Nuten für den Halt der Objektträger. Diese sind teuer und wir wollen auch keine zwanzig und mehr Objektträger auf einmal verarbeiten.

Ich verwende deshalb KOSMOS-Präparategläser 90 mm, die billig sind und von einem Lupolenstopfen dicht verschlossen werden. In diesen können die Reagenzien belassen werden, während die Glasdeckel der Färbegläser die Lösungen nicht am Verdunsten hindern, so dass sie immer wieder in ein Vorratsgefäß zurückgeschüttet werden müssen. Man kann diese Präparategläser in ein selbstgefertigtes Holzgestell stecken, damit sie nicht umfallen. Aus verschiedenen Holzleisten lassen sich solche Gestelle in allen Größenordnungen leicht zurecht sägen und verleimen.

In ein Präparateglas gehen - Rücken an Rücken oder Unterseite an Unterseite - zwei Objektträger hinein. Die aufgeklebten Schnitte zeigen dann nach außen. Die Objektträger müssen sich mit einer stumpfen Pinzette leicht hineinbefördern und wieder herausholen lassen. Der Hersteller der Gläser hat in der Vergangenheit den Durchmesser der Gläser geringfügig verändert, so dass die Objektträger klemmten. Bevor wir also eine Anzahl Gläser kaufen, probieren wir mit unseren Objektträgern aus, ob sie passen und sich mit genügend Spielraum bewegen lassen (mit Objektträgern von KOSMOS ist das in der Regel der Fall).

Wir stellen uns am besten folgenden Entparaffinierungssatz zusammen:

Tabelle 4: Entparaffinierungssatz

Anzahl Gläser	Lösung	Objektträger
4	Xylol ¹	4 * 2
4	Isopropylalkohol ² 100%	4 * 2
1	Spiritus ³	
1	94%	2
1	90%	2
1	80%	2
1	70%	2
1	50%	2

Wir stellen - Rücken an Rücken - je zwei Objektträger in die Xylolgläser. Nach ca. 10 Minuten (bei Kälte etwas länger) ist das Paraffin aus den Schnitten herausgelöst und wir sehen diese nicht mehr. Das Xylol kann natürlich nur eine gewisse Menge an Paraffin aufnehmen, so dass wir es gelegentlich wechseln müssen. Wir sehen sehr schnell, wann wir wechseln müssen, denn das um die Schnitte herumliegende Paraffin löst sich zu langsam oder nicht mehr vollständig.

Wir nehmen mit unserer Pinzette die jeweiligen zwei Objektträger aus dem Glas, lassen sie kurz ablaufen und stellen sie in die Gläser mit dem Isopropylalkohol. Die Rücken der beiden Objektträger drückt man mit der Pinzette etwas auseinander, damit durch den Alkohol auch das Xylol auf der Rückseite entfernt wird. Der Alkohol muss nach einer Anzahl von Objektträgern ebenfalls gewechselt werden, weil er sonst zuviel Xylol und eine ganze Anzahl von Stäubchen und Fusseln enthält. Nach etwa fünf Minuten Aufenthalt werden die beiden Objektträger für je drei Minuten durch die Spiritusstufen geschleust und zum Schluss in Aqua dest. gestellt. Sie bleiben solange im

¹ Nicht unbedingt „reinst“

² Nicht „pro analysi“

³ = vergällter Äthylalkohol

Jahr 1989	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 8
----------------------------	--	-------------------------

Wasser, bis die Alkoholschlieren verschwunden sind. Wir können die Objektträger ruhig längere Zeit in einer Stufe stehen lassen, wenn wir z. B. weggerufen werden.

Die Schnitte sind jetzt zur Färbung bereit. Wenn wir in einer 70%igen alkoholischen Lösung färben, dann können wir bereits nach der 80%igen Spiritusstufe in die Farblösung einstellen. Der Schnitt enthält jedoch noch Spuren vom Xylol und vom Vergällungsmittel, so dass es sich doch empfiehlt, die Schnitte bis zum Aqua dest. durchzuziehen und erst dann in die 70%ige Farblösung einzustellen. Der relativ große Sprung vom Wasser zur alkoholischen Farblösung schadet nicht!

10. Färben

In der Literatur gibt es eine Unzahl von Färbemethoden, von denen sicher eine große Zahl ihre Berechtigung hat. Wenn ein Anfänger die 'Bibel des Mikroskopikers', den "Romeis" zur Hand nimmt, dann lässt er sicher rasch die Flügel hängen! Wir kaufen also eine Menge von Farbstoffen und Farblösungen, die wir später - bis auf wenige - nicht mehr brauchen. Farblösungen sind zudem nicht ewig haltbar. Trotzdem reizt es uns, alles auszuprobieren, und dabei ist in der Vergangenheit sicher schon manches gute Verfahren herausgekommen.

Wir müssen färben, weil unsere Schnitte keinerlei Kontrast zeigen und wir sie allenfalls im Phasenkontrast anschauen könnten; und der gibt nicht immer gute Resultate.

Vor der Färbung sollten wir uns die Frage stellen, was wir sehen wollen.

Wir machen zumeist Übersichtspräparate, die uns das Gewebe bis in die feinsten Details zeigen sollen. Wir brauchen also eine Übersichtsfärbung, die das Gewebe farblich differenziert. Viele dieser Mehrfachfärbungen sind so kompliziert oder erfordern einen solchen Arbeits- und Materialaufwand, dass sie nur von wenigen ausgeführt werden. Außerdem muss dann in Färbegläsern oder Präparategläsern gefärbt werden.

Für unsere Schnitte werden wir Färbungen wählen, bei denen Färbung, Differenzierung und Entwässerung durch Auftropfen der Lösungen auf den Objektträger auf der "Färbebank" erfolgen. Diese besteht aus einer Hälfte einer entsprechend großen Petrischale, in die wir Filterpapier legen. Wir sehen durch den weißen Untergrund den Schnitt besser. Das Papier fängt auch herunter tropfende Farbe und andere Reagenzien auf. Über die Schale werden zwei flache Holzleisten gelegt, auf die die Objektträger mit den Schnitte nach oben ("X" in der rechten oberen Ecke!) gelegt werden.

Wir nehmen die Objektträger aus dem Aqua dest. und trocknen sie auf der Rückseite und um den Schnitt herum gut ab. Der Schnitt darf aber dabei nicht austrocknen.

Jahr 1989	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 8
----------------------	--	-------------------

Wenn sie dann auf der Färbepank liegen, tropfen wir die Farblösung auf, lassen sie eine bestimmte Zeit einwirken und leeren sie durch Kippen des Objektträgers wieder ab. Genauso machen wir es mit den Lösungen zur Differenzierung, Entwässerung usw.

Nach diesen Vorbemerkungen wollen wir unsere Schnitte färben:

Tierisches Material (z. B. einen Querschnitt durch einen Mäusehoden) färben wir mit einer sog. "HE-Färbung" (Hämatoxylin-Eosin), wie sie in der Histologie seit langem üblich ist und die nach fast allen Fixierungen (Ausnahme: chromsäurehaltige Fixiermittel) gelingt.

Auf den Schnitt tropfen wir Hämatoxylin nach Delafield so auf, dass der ganze Schnitt gut bedeckt ist. Wenn wir den Objektträger gut abgetrocknet haben, dann läuft die Farbe nicht auf dem ganzen Objektträger herum. Hämatoxylin nach Delafield färbt unverdünnt sehr schnell, so dass wir die Farblösung nach 6 bis 10 Minuten wieder ablaufen lassen können. Wenn wir genügend Zeit haben, dann ist es besser, mit einer verdünnten Farblösung länger zu färben. Wir spülen kurz mit destilliertem Wasser nach und stellen dann den Objektträger in ein Gefäß mit Leitungswasser, dem wir einen Tropfen konz. Ammoniak begeben können.

Der rötlich gefärbte Schnitt "bläut" dann sehr rasch, wodurch die Hämatoxylinfärbung haltbar wird. Das Leitungswasser wird in den nächsten zehn Minuten mehrmals gewechselt, aber immer ohne Ammoniakzusatz.

Der Objektträger wird dann wieder abgetrocknet und auf die Färbepank gelegt. Die Eosin- oder besser Erythrosin-Lösung wird jetzt in der gewohnten Weise aufgetropft. Wenn wir den Objektträger oder die ganze Färbepank etwas neigen, können wir feststellen, ob die Färbung ausreichend ist. Ist das der Fall, wird die Lösung durch Kippen entfernt. Der Schnitt ist jetzt überfärbt und muss differenziert werden.

Dazu verwenden wir am besten Äthylglykol, das nicht nur die überschüssige Farbe differenziert, sondern auch gleichzeitig entwässert. Wir geben eine ordentliche Portion auf den Schnitt und schaukeln den Objektträger hin und her, dass die Lösung über den Schnitt hin und her läuft. Nach einer gewissen Zeit erneuern wir das Äthylglykol. Wir machen das so lange, bis es keine Farbspuren mehr enthält. Der Schnitt ist dann auch ausreichend für die Eindeckung in Euparal entwässert. Bleiben noch Farblösungsreste im Schnitt, dann blutet er in Euparal später aus.

Die botanischen Schnitte färben wir mit der "FSA-Färbung" (Fuchsin-Safranin-Astrablau) nach Dr. Etzold, ebenfalls durch Auftropfen und Differenzieren der Farbe wie bei den tierischen Objekten.

Die Farblösung können wir uns leicht selbst herstellen, Tab. 5 zeigt die Bestandteile.

Tabelle 5: FSA-Färbung nach Etzold

Bestandteil	Menge
Basisches Fuchsin (Diamantfuchsin)	10 mg
Safranin	40 mg
Astrablau	150 mg
Aqua dest.	100 ml
Eisessig	2 ml

Zuerst lösen wir das Fuchsin durch Kochen in einem Teil des Wassers und füllen dann auf 100 ml auf. Die anderen Farbstoffe setzen wir der umstehenden Reihenfolge nach zu und lösen sie durch Rühren mit einem Glasstab auf. Zuletzt fügen wir den Eisessig zu. Die geringen Farbstoffmengen sind natürlich schwer abzuwiegen, weshalb es sich empfiehlt, dass sich mehrere Interessenten zusammen tun und 1000 ml Färbelösung herstellen, die jahrelang haltbar sein soll (Etzold, 1983, Krauter, 1985).

Unser Mikrotomschnitt ist nach ca. 15 Minuten ausreichend gefärbt. Bei Handschnitten, die weit dicker sind, genügen einige Minuten Färbezeit.

Den Schnitt differenzieren wir ebenfalls in Äthylglykol, bis er keine Farbe mehr abgibt. Wir können auch mit 94%igem Spiritus oder (besser) mit 90%igem Isopropylalkohol differenzieren, müssen aber dann zur Entwässerung mehrmals 100%igen Isopropylalkohol auftropfen und wieder ablaufen lassen.

Bessere Ergebnisse bei Paraffinschnitten bringt die Roeser-Färbung; sie wird in Präparategläsern durchgeführt und ist leichter zu differenzieren.

Jahr 1989	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 8
----------------------------	--	-------------------------

11. Eindecken der Präparate

Wenn die Schnitte ausreichend entwässert sind, wird das letzte Entwässerungsmittel (Äthylglykol oder 100%iger Isopropylalkohol) abgeleert und der Objektträger um den Schnitt herum mit einem Papiertaschentuch abgetrocknet. Wenn der Schnitt gerade noch feucht ist, geben wir einen ausreichend großen Tropfen Euparal darauf und legen von der Seite her (um Luftblasen zu vermeiden) mit einer Pinzette das Deckglas auf. Wir stützen dieses mit der Lanzettnadel gegen Verrutschen und lassen es langsam auf das Euparal sinken, das sich dann gleichmäßig unter dem Deckglas verteilt. Befindet sich beim Auftropfen von Euparal noch Entwässerungsmittel auf dem Schnitt, dann verläuft es zu einer Pfütze, die weit über das Deckglas hinaus reicht und später mühsam mit Rasierklingen entfernt werden muss.

Die "vorgereinigten" Deckgläser sollten wir zuvor sauber machen. Zu diesem Zweck halten wir das Deckglas mit einer spitzen Pinzette, tauchen es in Spiritus und reiben es mit einem zwischen Daumen und Zeigefinger gehaltenen Tuch sauber. Ich verwende mit gutem Erfolg alte, mehrfach gewaschene Battistaschentücher, die weich sind und kaum fusseln.

Bis das Euparal einigermaßen hart geworden ist, was ein bis zwei Tage dauern kann, werden die fertigen Präparate flach aufbewahrt. Wir können aus Sperrholz und Leisten (10 mm x 10 mm) solche Trockengestelle bauen, die man beliebig aufeinander stapeln kann. Das hat gegenüber der Aufbewahrung in Präparatemappen den Vorteil, dass genügend Luft an die Präparate kommt. Außerdem besteht bei Mappen die Gefahr, dass über das Deckglas hinaus getretenes Eindeckmittel mit dem Deckel der Mappe verklebt.

Natürlich können wir die Schnitte auch mit einem xylollöslichen Harz (z. B. Malinol) eindecken. Wir müssen dann mehrmals 100%igen Isopropylalkohol und mehrmals Xylol "reinst" auftropfen. Ich rate davon ab, Mittel für den Schnelleinschluß, wie z. B. Eukitt, Mikrokitt oder Entellan-neu, zu verwenden. Die Präparate mit diesen Mitteln trocknen zwar sehr rasch, halten aber in der Regel nicht länger als zwei bis drei Jahre, dann löst sich das Deckglas ab. Ich habe durch diese Mittel mehrere hundert Präparate verloren! Wenn die Schnitte sehr gut aufgeklebt wurden, kann man solche Präparate noch retten. Man stellt die Objektträger in Xylol, wartet, bis das Deckglas abfällt und deckt die Präparate nach einer weiteren Xylolpassage mit Malinol neu ein.

Sind die Präparate gut getrocknet, sollten wir mit einer Rasierklinge das über das Deckglas hinausgetretene Eindeckmittel entfernen (nicht mit Lösungsmitteln, denn damit verschmiert man das Deckglas erneut) und das Präparat mit Etiketten versehen.

Jahr 1989	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 8
----------------------	--	-------------------

Ein Präparat, das kein Etikett trägt und bei dem selbst der Besitzer oft nicht mehr weiß, was es darstellen soll, ist schlecht.

12. Allgemeines zur Färbung

Es gibt noch eine Vielzahl von Übersichtsfärbungen, die aber nur in Färbegläsern oder Präparategläsern ausgeführt werden können. Sie sind oft farbenprächtiger (oder auch nicht) und differenzieren die einzelnen Gewebe durch Farbunterschiede besser als eine HE-Färbung (Hämatoxylin-Eosin). Die HE-Färbung wird von den Histologen deshalb gern benutzt, weil sie sehr schnell geht und weil die Objekte mit Formalin fixiert wurden. Danach fallen verschiedene andere Mehrfachfärbungen nicht in der Weise aus, wie wir uns das wünschen.

Histologische Schnitte (also Schnitte durch tierisches Gewebe) können wir z. B. auch folgendermaßen färben:

- AZAN-Färbung nach Heidenhain
(mit Azokarmin G zur Kernfärbung)
- AZAN-novum-Färbung nach Geidis
(mit Kernechtrot zur Kernfärbung)
- Trichrom-Färbung nach Gomori
(zuvor Weigert'sches Eisenhämatoxylin).

Diese drei Färbungen sind in Krauter, 1978 eingehend dargestellt worden. Sie können nur empfohlen werden, denn es sind sehr schöne Färbungen. Die Heidenhain'sche AZAN-Färbung (eigentlich eine Bindegewebsfärbung) ist wohl die schönste und farbenprächtigste Färbung in der Histologie, wenn sie auch viel Zeit erfordert. Man muss bei dieser Färbung darauf achten, dass man das richtige Azokarmin G (z. B. Fa. SERVA, Heidelberg) verwendet; es ist nicht billig und muss in der Regel in einer Mindestmenge abgenommen werden. Man benötigt jedoch nur kleine Mengen (0,1 gr. auf 100 ml Wasser) und kann die Lösung dann monatelang immer wieder verwenden. Es empfiehlt sich daher eine Sammelbestellung mehrerer Interessenten.

Die AZAN-Färbung hat m. E. deshalb lange Zeit keine guten Ergebnisse mehr geliefert, weil man nicht das richtige Azokarmin hatte und - das ist wohl der entscheidende Punkt - es nicht richtig gehandhabt wurde. Nach Romeis, 1968, 1530 wird das Azokarmin durch Kochen gelöst und nach Abkühlen auf Zimmertemperatur filtriert. Das ist genau der entscheidende Punkt! Bei Zimmertemperatur hat sich ein großer Teil des Farbstoffs auskristallisiert und wird nun im Filter zurückgehalten. Wir erhitzen die trübe

Azokarminlösung auf 80° Celsius, worauf sie klar wird. Dann filtrieren wir die heiße Lösung sofort. Die hat danach etwa die gewünschte Temperatur von 54° bis 60°, auf der sie während der ca. 45 Minuten Färbezeit gehalten werden sollte. Ich färbe auf diese Weise seit einigen Jahren mit ausgezeichnetem Erfolg auf der Wärmebank (Spirituslampe darunter) im 100 ml Becherglas.

Botanische Schnitte können wir färben mit

- Roeser-Färbung
(ähnlich der FSA/Etzold-Färbung)
- AZAN-novum nach Geidis:

Kernechtrot	30 Minuten
Phosphor-Wolframsäure	10 Minuten
Azanlösung (= Anilinblau-Orange-Eisessig)	10 Minuten
- Safranin-Anilinblau
- Safranin-Lichtgrün

u. v. a. m.

Wir sollten diese Färbungen ruhig einmal ausprobieren und bei den wenigen, die uns die besten Ergebnisse bringen, bleiben.

Viel Erfolg!

Bei diesem Beitrag handelt es sich um das leicht überarbeitete Skript zu einer Reihe von Übungsabenden zu dem Thema "Schnitte durch Tier- und Pflanzenmaterial", die der Verfasser im Jahre 1986 mit der Mikroskopischen Arbeitsgemeinschaft Stuttgart abgehalten hat.

(Dieser Beitrag wurde in den „Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart“ in den Nummern 1989/8, 1990/1 und 1990/2 veröffentlicht)

Jahr 1989	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 8
----------------------------	--	-------------------------

Literaturnachweis:

Burck, H. Chr. (1981) - "Histologische Technik", 4. Auflage Stuttgart

Gerlach, D. (1969) - "Botanische Mikrotechnik", 1. Auflage, Stuttgart

Krauter, D. (1971) - "Mikroskopie im Alltag", 8. Auflage, Stuttgart

- (1978) - "AZAN und Pseudo-AZAN Die bunten Färbungen in der Histologie". Mikrokosmos, Heft 5, (S. 146ff)

- (1985) - "Erfahrungen mit Etzolds FSA-Färbung für Pflanzenschnitte". Mikrokosmos, Heft 8 (S. 231-233)

Romeis, B. (1968) - "Mikroskopische Technik", 16. Auflage München

Stehli, G. (1973) - "Mikroskopie für Jedermann", 22. Auflage, Stuttgart

Rupp, Peter (1984) - "Die Verwendung von Einmal-Messern in der Mikrotom-Schneidetechnik". Mikrokosmos, Heft 11, (S. 342-345)

Etzold, H. (1983) - "Ein kontrastreiche, simultane Mehrfachfärbung für pflanzenanatomische Präparate". Mikrokosmos, Heft 7 (S. 213-219)

Bezugsquellen für den ELSTEIN-Strahler:

Fa. Elektro-Berg GmbH
Olgastr. 51
7000 Stuttgart 1

Fa. Bürkle & Schöck
7000 Stuttgart 80 (Vaihingen)

Fa. Kraft KG
7000 Stuttgart 80 (Vaihingen)

Diese Firma verkauft nicht in Private;
u. U. wäre das aber eine Bezugsquelle
für Ihren Elektro-Händler!