

Jahr 1992	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 2
----------------------------	--	-------------------------

Mikroskopische Nachweise und Färbungen

(Teil 1)

von Felix Schumm

Am 27.03.92 habe ich in der Mikroskopischen Arbeitsgemeinschaft über chemische Nachweise und Färbungen berichtet. Auf Wunsch der Teilnehmer folgt eine Zusammenfassung der wesentlichen Versuche und Rezepturen, die ich an diesem Abend vorgestellt habe.

1. Wozu färbt man überhaupt?

Chemisch verschiedene mikroskopische Strukturen, die Licht nur schwach absorbieren und zudem gleichen optischen Brechungsindex besitzen, können im Lichtmikroskop nicht getrennt werden. In vielen Fällen lassen sich solche Strukturen auf Grund ihres Chemismus jedoch unterschiedlich anfärben, so dass dadurch die verschiedene chemische Natur bestimmter Zellteile qualitativ optisch nachweisbar wird. Auch dann, wenn Strukturen ohne Färbung trennbar sind, verwendet man Färbemethoden, um chemisch differente Bestandteile sichtbar zu machen.

Bei botanischen Schnitten ist es z.B. üblich, verholzte, verkorkte, wachs- oder fetthaltige Bestandteile farblich gegeneinander abgegrenzt darzustellen. Leider sind jedoch die meisten Färbemethoden keine spezifischen Reagenzien auf bestimmte Substanzen, so dass auch bei farblich stark differenzierten Präparaten oft nicht sicher ist, welche Bestandteile eigentlich jeweils unterschiedlich dargestellt worden sind.

Ziel des Abends war es, einige spezifischere mikrochemische Nachweise vorzustellen und zu testen, wie eindeutig Färbungen auf bestimmte chemische Bestandteile ansprechen.

Jahr 1992	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 2
----------------------------	--	-------------------------

2. Zellulose

Zellulose ist ein Polysaccharid ähnlich der Stärke. Sie besteht aus linearen Ketten von Glucoseresten, die durch Ó-1:4-Bindungen miteinander verbunden sind. Die Summenformel lautet $(C_6H_{10}O_5)_n$ worin n ca. 14000 ist. Die Ketten sind etwa 7 µm lang und bilden Faltungsmiscellen. Zellulose ist das wichtigste Stützpolysaccharid höherer Pflanzen, kommt aber auch in Algen, Bakterienmembranen und als Tunicin in einigen niederen Tieren vor. Für den Menschen ist sie unverdaulich.

Nachweisreaktionen:

Es gibt leider keine einfache und sichere Reaktion, die unter dem Mikroskop sofort und eindeutig Zellulose nachweist. Die Gesamtheit der folgenden Reaktionen gibt jedoch einige Sicherheit:

- Zellulose ist unlöslich in kochendem Wasser, verdünnten Säuren, Alkohol und konzentrierter Kalilauge.
- Zellulose ist unter schwacher Hydrolyse löslich in Kupferoxidammoniak (Schweizer'sches Reagenz).
- In konzentrierter Schwefelsäure löst sich Zellulose unter Umwandlung in Glucose auf. Auch durch spezielle Enzyme kann eine Umwandlung in Glucose erfolgen.
- Mit Lugolscher Lösung wird Zellulose lediglich braun angefärbt. Behandelt man jedoch Zellulose vor der Anwendung von Lugolscher Lösung mit Schwefelsäure, Phosphorsäure oder Zinksalzen, so erhält man eine Blaufärbung ähnlich wie bei der bekannten Stärkereaktion. Die Reaktion ist jedoch recht launisch!
- Auf Grund der Mizellarstruktur weisen Zellulosewände nach Tinktion mit Kongorot oder Chlorzink-Jod-Lösung starken Pleochroismus auf.

Jahr 1992	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 2
----------------------------	--	-------------------------

Versuch 1: (Löslichkeit in Schweizer's Reagenz)

Wir legen einige Wattefäden, die fast ausschließlich aus Zellulose bestehen, in Schweizers Reagenz, bedecken mit dem Deckglas und beobachten sofort unter dem Mikroskop. Einige Fäden beginnen zu quellen und lösen sich schließlich mehr oder weniger schnell ganz auf. Andere reagieren langsam oder gar nicht. Beim Verdünnen mit Wasser fällt die Zellulose wieder aus (Historisch -> Herstellung von "Kupferseide")

Versuch 2: (Pleochroismus)

Einige mit Kongorot oder Chlorzink-Jod-Lösung angefärbte Wattefäden in Wasser unter dem Mikroskop betrachten, während man ein Polarisationsfilter unter dem Kondensator dreht. (Wichtig: Kein Analysatorfilter im Okular verwenden!). Die Wattefäden werden abwechselnd je nach Stellung des Polarisatorfilters rot oder farblos bzw. hellbraun und schwarz. Dieses Experiment ist auch geeignet, um bei Flechten die unterschiedliche Membranstruktur der Phycobionten (Zellulose) und Mycobionten (Chitin) nachzuweisen.

Versuch 3: (Jodreaktion)

Wir legen einige Wattefäden in Wasser, bedecken mit dem Deckglas und saugen Schwefelsäure vom Rand her durch. (Ist die Säure sehr konzentriert quellen die Fäden stark auf). Anschließend saugt man Lugolsche Lösung unter dem Deckglas nach. Je nach Quellungszustand färben sich die Baumwollfäden stark blau an.

Die in der Mikroskopie verwendeten Farben sind allesamt hinsichtlich der Zellulose unspezifisch und zum Nachweis nicht brauchbar. Bei Doppelfärbungen (z.B. Fuchsin-Safranin-Anilinblau nach Etzold) ist die Zellulosefärbung nur eine optisch und ästhetisch reizvolle Gegenfärbung, die den Kontrast zur relativ spezifischen Holzstofffärbung durch die roten Farbstoffe Safranin und Fuchsin erhöht.

Jahr 1992	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 2
----------------------------	--	-------------------------

3. Hemizellulose

Dies ist eine Sammelbezeichnung für der Zellulose nahestehende Polyssaccharide, die vor allem in Pflanzenschleimen ("Reservezellulose") und Zellwänden von Samen vorkommt. Letztere erhalten dadurch oft ihre knorpelige Beschaffenheit.

In Schweizer's Reagenz zeigen sie unterschiedliches Verhalten, da sie entweder in Lösung gehen oder aber nur quellen.

Die meisten Hemizellulosen werden schon durch 0,3% Kalilauge oder 0,5% Sodalösung stark angegriffen und lösen sich in 20% heißer Natronlauge auf, während Zellulose unter diesen Bedingungen kaum reagiert.

Schon durch schwache Säuren (z.B.: 5% warme Salzsäure, 1-2% kochende Salzsäure oder 3-5% kalte Schwefelsäure) werden Hemizellulosen in lösliche von der Glucose verschiedene Hexose-Zucker umgewandelt (z.B.: Mannose, Galaktose..).

4. Lignin (Holzstoff)

Es besteht aus Mischpolymerisaten verschiedener Abkömmlinge des Phenylpropans z.B. Coniferylalkohol. Im Gegensatz zur Zellulose bildet Lignin ein reich verästelt Molekül. Lignin lagert sich bei verholzten Membranen in das Zellulosegrüst der Zellwände, wobei die Wandschichten oft erheblich aufquellen. Dadurch entsteht eine Verbundbauweise, bei der durch Zellulose vornehmlich die Zugfestigkeit und durch Lignin die Druckfestigkeit erhöht wird.

Lignin ist löslich in kochender Calciumbisulfit-Lösung (Industrielle Verfahren!), in heißer Natronlauge und in Eau de Javelle. In Schweizer's Reagenz ist Lignin unlöslich.

Mit Jodlösungen färbt sich Lignin auch nach Säurevorbehandlung nur braun. Da jedoch Zellulose und Lignin in den Zellwänden gemeinsam vorkommen, erhält man nach Säurevorbehandlung, sofern man die Zellulose zuvor nicht sorgfältigst aus der Probe entfernt hat, meist ebenfalls eine Blaufärbung.

Für Lignin existieren einige einfache und recht spezifische Nachweisreaktionen. Mit diesen kann kontrolliert werden, ob z.B. bei einer Fuchsin-Anilinblau-Färbung wirklich nur verholzte Teile rot dargestellt worden sind.

Jahr 1992	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 2
----------------------------	--	-------------------------

Mikroskopische Merkmale:

Verholzte Membranen zeichnen sich durch stärkere Lichtbrechung aus und leuchten im polarisierten Licht stark auf. Übliche Reagenzien sind: Salzsäures Anilin (gelbe Farbreaktion), schwefelsäures Phloroglucin (rote Farbreaktion) und die Mäule'sche Reaktion.

Versuch 4 (Herstellung von Salzsäurem Anilin):

Ein Reagenzglas etwa 0,5 cm hoch mit Anilin und 7 cm hoch mit Wasser füllen. Beim Schütteln entsteht eine Emulsion. Etwa 1 cm hoch technische Salzsäure dazugeben. Das Anilin geht beim Schütteln in Lösung. Die genauen Mischungsverhältnisse sind unwichtig. Wir testen die Lösung an einem Stück Papier einer Tageszeitung (Gelbfärbung wegen Holzstoff). Ein gutes weißes und holzfreies Papier oder Filtrierpapier darf sich hingegen nicht gelb verfärben.

Versuch 5 (Anwendung von Salzsäurem Anilin):

Wir legen Handschnitte durch Alkoholmaterial von Pflanzenstengeln in salzsäures Anilin und stellen genau fest, welche Teile sich gelb färben. Am Vortragsabend stand Alkoholmaterial von Mistelstengel, Fichtenzweigen, Ligusterzweigen und Ligusterbeeren und Huflattichstängeln zu Verfügung. Man beobachtet, dass nicht nur die Leitungstracheen, sondern auch Sklerenchymfasern in der Rinde und andere Teile verholzt sein können. Junge Huflattichtriebe haben kaum verholzte Leitungsbündel.

Versuch 6 (Anwendung von Phloroglucin):

Ein Tropfen einer wässrigen oder alkoholischen (1-5%) Phloroglucinlösung wird auf den Schnitt gebracht und mit Salzsäure nachbehandelt. Verholzte Zellwände verfärben sich nach einiger Zeit intensiv rot. (Beste Kontrolle für Etzoldfärbung!)

Versuch 7 (Mäule'sche Reaktion)

Liguster-Handschnitte oder zur Demonstration ein Holzstückchen (Streichholz!) folgendermaßen behandeln.

Jahr 1992	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 2
----------------------------	--	-------------------------

- Kaliumpermanganat (wässr., 1%) bis 5 min
- Auswaschen mit Wasser. Die Schnitte sollten eine gelbe bis braune Farbe angenommen haben
- Verdünnte Salzsäure. 1-2 Minuten. Die Schnitte werden wieder hell
- Auswaschen in Wasser
- Salmiakgeist.

Ergebnis: Lignin ist rotgefärbt. Bei Nadelhölzern und Farnen versagt die Reaktion in der Regel. Dadurch ist es auf einfache Weise möglich, Nadel und Laubholz chemisch zu unterscheiden. Ersetzt man die Kaliumpermanganatbehandlung durch ein stärkeres Oxydationsmittel (z.B. gesättigte Kaliumchloratlösung mit etwas Salzsäure, Vorsicht!), so zeigen auch Farne und Nadelhölzer eine rote Reaktion.

Darstellung von verholzten Membranen durch Anilinfarben:

Bei den beiden folgenden Rezepten handelt es sich um sogenannte "Progressive Farben". Bei diesen wird die darzustellen Struktur unmittelbar stärker als der Rest angefärbt. Sie erfordern nicht die Technik des Differenzierens.

Versuch 8 (Essigsäure Malachitgrünlösung):

Wir lösen ein kleines Körnchen Malachitgün in einem halb mit Wasser gefüllten Reagenzglas auf und geben etwas Eisessig hinzu. Unter mikroskopischer Kontrolle verfolgen wir, wie sich Pflanzenschnitte (gut geeignet ist Mistel) in dieser Farblösung anfärben. Die Schnitte können beliebig lange in der Farblösung liegen, da keine Überfärbung eintritt. Ergebnis: Es werden ziemlich selektiv all diejenigen Bestandteile, die zuvor als verholzt erkannt worden sind, intensiv grün angefärbt. Andere Teile werden nicht oder deutlich schwächer angefärbt. Will man Dauerpräparate herstellen, so muss die Färbung gegenüber den folgenden Alkoholpassagen haltbar gemacht werden (Phosphorwolfram- oder Phosphormolybdänsäurebeizung). Vor dem Einschluß in Kunstharz ist eine unspezifische Kontrastfärbung z.B. mit Kongorot oder Eosin möglich. Am Vortragsabend wurden keine Dauerpräparate hergestellt.

Jahr 1992	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 2
----------------------------	--	-------------------------

Versuch 9 (Essigsäure Gentianaviolettlösung):

Durchführung und Ergebnis ähnlich wie beim vorhergehenden Versuch. Neben verholzten Elementen werden auch verkorkte Zellwände stark angefärbt.

Anhang:

Herstellung von Schweizers Reagenz:

Wenn es nicht möglich, ist das Reagenz fertig zu beziehen, so kann man es sich leicht selber herstellen. Ein bis zwei Teelöffel Kupfersulfat löst man in ca. 400 ml Wasser in einem Standzylinder (z.B. 500 ml Kunststoffmesszylinder, wie er im Fotohandel zu kaufen ist) auf und gibt solange Natronlauge hinzu, bis sich kein weiterer hellgrüner Niederschlag aus Kupferhydroxyd mehr bildet. Mit durch Aufkochen von Luft befreitem Leitungswasser füllt man den Zylinder auf, rührt gut um und wartet, bis sich der blau-grüne Niederschlag möglichst weitgehend abgesetzt hat. Dann schüttet man die überstehende klare Lösung ab und wäscht den Niederschlag nochmals in gleicher Weise mehrfach mit Wasser aus. Schließlich filtriert man in ein Kaffeefilter. Vom Filter kratzt man das Kupferhydroxyd mit einem Löffel vorsichtig ab und gibt es in ein Becherglas zum Trocknen. Das Trocknen braucht bei Zimmertemperatur meist 1-3 Tage. Das trockene Kupferhydroxyd löst man schließlich in konzentriertem Salmiakgeist auf. Es entsteht eine tiefblaue Flüssigkeit.