

Jahr 1996	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 2-4
----------------------------	--	---------------------------

REZEPTUREN ZU MIKROSKOPIE

ZUSAMMENGESTELLT
VON

DR. *FELIX SCHUMM*

Jeder von uns, der sich nicht nur mit einem ganz bestimmten Gebiet aus dem weiten Feld der Mikroskopie befaßt, wird schon einmal auf der Suche nach einem Rezept, mit der er ein schnelles Ergebnis erzielen kann, gewesen sein. Dr. Schumm gibt nachstehend eine Zusammenstellung von Methoden, mit denen er diesem Problem zu Leibe rückt. Viele davon waren bereits das Thema von Arbeitsabenden in der Mikro AG.

Inhalt

1 Fixiermittel

- 1.1 Formessigsprit nach Diettrich
- 1.2 Pfeiffers Gemisch
- 1.3 Merkels Flüssigkeit

2 Färberezepte

- 2.1 Direktiefschwarz
- 2.2 Kallichrom
- 2.3 Etzolds Gemisch
- 2.4 Fuchsin-Pikrinsäure
- 2.5 Methylgrün-Fuchsin-Simultanfärbung
- 2.6 Methylgrün-Pyronin-Simultanfärbung
- 2.7 May-Grünwald-Giemsas-Färbung nach Pappenheim
- 2.8 Orseillin BB

Jahr 1996	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 2-4
----------------------------	--	---------------------------

- 2.10 PJS-Reaktion auf Kohlehydrate
- 2.11 Hämalan-Eosin-Färbung
- 2.12 Mallory's Säurefuchsin-Anilinblau-Orange-Färbung
- 2.13 Van Giesonfärbung
- 2.14 Anilinblau-Bismarckbraun

3 Beizen von Farbstoffen

- 3.1 Bariumchlorid
- 3.2 Bleinitrat
- 3.3 Kupferacetat oder Kupfersulfat
- 3.4 Phosphormolybdänsäure
- 3.5 Pikrinsäure

4 Nachweisreaktionen

- 4.1 Mäule'sch Reaktion auf Holzstoff
- 4.2 Ligninnachweise
- 4.3 Zellulosenachweis
- 4.4 Kutinnachweise
- 4.5 Gerbsäurenachweis
- 4.6 Eisennachweis
- 4.7 Calciumoxalatnachweis

Die folgende kleine Liste an Rezepturen habe ich mir für meinen eigenen Bedarf früher zusammengestellt. Vielleicht ist sie auch für andere Mikroskopiker nützlich. Es befinden sich ganz übliche und auch ausgefallene Dinge darunter, wie ich sie gerade ausprobiert habe.

Jahr 1996	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 2-4
----------------------------	--	---------------------------

1. Fixiermittel zur Mikroskopie

1.1 Formessigsprit nach Diettrich

Verwendung: Für Anatomie. Zellinhalt leidlich.
Verwendet Brennspritus!!

Brennspritus 100 ml
Formalin 10 ml
Eisessig 3 ml
Fixierdauer: 24 Stunden
Auswaschen in 60% Alkohol

1.2 Pfeiffers Gemisch

Verwendung: Für Algen, Pilze, Flechten, Farne etc.

Formalin 40% 100 ml
Methylalkohol 100 ml
Holzessig 100 ml

Fixierdauer 12-24 Stunden

Anmerkung: Algen können auch einige Wochen darin aufbewahrt werden.

Jahr 1996	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 2-4
----------------------------	--	---------------------------

1.3 Merkels Flüssigkeit

Verwendung: Fixierung von Oogonen und Antheridien bei Pilzen

100 Volumteile 1% Chromsäurelösung

100 Volumteile 1% PtCl₄

600 Volumteile Wasser

Anmerkung: Färbung der Kernstadien anschliessend mit Flemmings Dreifarbungemisch möglich.

Jahr 1996	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 2-4
---------------------	---	--------------------

2 Färberezepte zur Mikroskopie

2.1 Direkttiefschwarz

Verwendung: Botanische Schnitte

Ansatz: Gesättigte Lösung in 70% Alkohol (oder Isopropylalkohol)

Anwendung: 1. Schnitte in 50 - 70% Alkohol
2. Färben 5- 10 min
3. Auswaschen in 80 - 90 % Alkohol

Anmerkung: Nicht verholzte Zellwände rein schwarz.
Kombinationsfärbung mit Safranin od. Chrysoidin möglich.

2.2 Kallichrom

(vertrieben von Chroma 73257 Köngen, Küferstr. 2, Tel. 07024/83646)

Gemisch aus Auramin und Kresylviolett

Anwendung nach Bukatsch (Mikrokosmos):

1. Wasser
2. Färben 5 Min
3. Alkoholstufen,
4. Isopropanol
5. Xylol
6. Malinol

Jahr 1996	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 2-4
----------------------------	--	---------------------------

Anmerkung: dabei wird differenziert:
Violett: Kerne, Zellulose, Meristeme
Blau, blaugrün, grüngelb: verholzte Teile,
Xylem, Bastanteile

2.3 Etzolds-Gemisch

Verwendung: Färbung von Pflanzenquerschnitten.
Verholzt - unverholzt.

Ansatz:

Aqua dest	100 ml
Eisessig	2 ml
Fuchsinstammlösung	0.5 ml
Safraninstammlösung	2 ml
Astrablau	150 mg

Stammlösungen:

Fuchsin	1 g
Wasser	50 ml
kochen!	

Safranin	1 g
Wasser	50 ml
nicht kochen!	

Anwendung: Tropfen Farbe auf Objektträger,
Objekt hinein
Auswaschen in Wasser
dreimal 100% Alkohol
Euparal

Anmerkung: Ergebnisse wie bei Safranin Astrablaufärbung

2.4 Fuchsin - Pikrinsäure

Jahr 1996	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 2-4
---------------------	---	--------------------

Verwendung: Zur Färbung von Zellkernen und verholzten Zellwänden. Gut auch für Pilze in Pflanzenquerschnitten.

Anwendung:

1. Schnitte 10 bis 15 min in konz. wässr. Fuchsinlösung
2. Pikrinsäure (2 ml Wasser und 3 ml gesättigte alkoholische Pikrinsäurelösung)
3. Auswaschen in 96 % Alkohol
4. Xylol, Cädax

2.5 Methylgrün - Fuchsin - Simultanfärbung

Verwendung: Botanische Schnitte

Ansatz: 4 Teile 0.5% wässr. Methylgrünlösung
1 Teil 5% wässr. Fuchsinlösung

Anwendung:

1. Schnitte 10 min färben
2. mehrmals abwechselnd mit Wasser und 96 % Alkohol auswaschen
3. 100 % Alkohol
4. Neutralbalsam

Anmerkung: Kerne blaugrün
Plasma rot
verholzte Wände violett
nicht verholzte Wände blau bis blaugrün

2.6 Methylgrün - Pyronin - Simultanfärbung

Verwendung: Zoologische Schnitte

Jahr 1996	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 2-4
----------------------------	--	---------------------------

Ansatz:

- A) 2 % wässr. Methylgrünlösung
- B) 2 % wässr. Pyroninlösung

erst vor Gebrauch mischen

- 2.5 ml A
- 12 ml B
- 30 ml Wasser

Anwendung:

- 1. Färben 6 min
- 2. n-Butanol 2 mal 5 min
- 3. Xylol
- 4. Zedernöl
- 5. Balsam

Anmerkung: DNS Kerne grün
RNS des Nukleolus rot
Cytoplasma rot

2.7 May-Grünwald-Giemsa Färbung nach Pappenheim für Blutaussstriche

1. May-Grünwald-Lösung unverdünnt (Fixierung) 3 min
2. Zutropfen gleicher Menge Aqua dest (pH 7, Färbung) 1 min
3. Farblösung abkippen
4. Überschichten mit Giemsa-Lösung (3 Tropfen Giemsa-Farbstoff auf 2 ml Aqua dest. von pH 7) 10 min
5. Kräftiges Abspülen mit Aqua dest
6. Rasches Trocknen (Filtrierpapier!)

Anmerkung: Angaben nach Helga Kopp, MAG

Jahr 1996	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 2-4
----------------------------	--	---------------------------

2.8 Orseillin BB (Krauter)

Verwendung: Pilzhyphen in Wirtsgewebe

Ansatz: 0.25 % Lösung in 3% Essigsäure

Anwendung: 1. Färben 3 min
2. differenzieren in 3% Essigsäure
3. ganz rasch entwässern, Xylol, Cädax

2.9 Sudan III

Verwendung: Fettnachweis

Ansatz: 0.01 g Sudan III in 5 ml 96% Alkohol lösen
5 ml Glycerin dazufügen

Anwendung: 1. Färben in heisser oder kalter Farblösung
2. Auswaschen in Glycerin

Anmerkung: Fett, Kutin, Suberin: gelbrot;
Sudan III ist
leicht löslich in: Äther, Aceton, Chloroform
wenig löslich in: Alkohol
unlöslich in: Wasser

Jahr 1996	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 2-4
---------------------	--	--------------------

2.10 PJS - Reaktion auf Kohlehydrate

Verwendung: Pilzhyphen in Wirtsgewebe Stärke, Glycogen, Zellulose, Chitin, Glycoproteide

Ansätze:

- A) Schiffisches Reagenz
- B) 1% wässrige Lösung von Natriummetaperjodat
- C) SO₂ - haltige Spülflüssigkeit
 - 200 ml Wasser
 - 1 g Kaliummetabisulfit
 - 10 ml 1n Salzsäure

Anwendung:

1. Schnitt für 24 Stunden in 96% Alkohol (ohne diese Behandlung kann es auch zu Färbungen kommen, die nicht auf Kohlenhydraten beruhen)
2. Wasser
3. 30 min in B)
4. dest. Wasser gründlich abspülen
5. Färben in A)
6. Unterbrechen in mehrfach gewechselter Lösung C)
7. Gründlich in Wasser spülen
8. Gegenfärben mit Lichtgrün
9. Entwässern mit Isopropylalkohol (nicht Ätanol, das das Lichtgrün sofort wieder auszieht!)
10. Xylol, Cädax

Jahr 1996	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 2-4
---------------------	--	--------------------

2.11 Hämalaun - Eosin - Färbung

Verwendung: Zoologie und Botanik

- Anwendung:*
1. Hämatoxylin 5- 10 min
 2. Auswaschen in Wasser
 3. Bei Überfärbung kurz in Salzsäurealkohol differenzieren (70% Alkohol, 1% Salzsäure)
 4. Auswaschen in Wasser
 5. Eosin 1-5 min
 6. Kurzes Auswaschen in Wasser
 7. kurz differenzieren in 70 % Alkohol
 8. Spiritus (kurz!)
 9. Isopropanol (kurz!)
 - 10 Xylol
 - 11 Cädax

2.12 Mallory's Säurefuchsin-Anilinblau-Orange-Färbung

Verwendung: Zoologische Präparate. Statt Azanfärbung!

- Anwendung:*
1. Säurefuchsin (0.1%) 5 min
 2. Abspülen mit Wasser
 3. Phosphormolybdänsäure (1%) 5 -10 min
 3. Abspülen mit Wasser
 4. Anilinblau-Orange-Lösung 2 - 20 min
 5. Abspülen mit Wasser
 6. Rasches Entwässern in 96% Alkohol
(zu langes Einwirken des Alkohols macht die Schnitte zu blau)

Jahr 1996	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 2-4
---------------------	--	--------------------

- 7. Xylol
- 8. Cädax (Malinol)

Speziellösung bei 4:

Anilinblau wasserlöslich	0.5 g
Orange G	2.0 g
Oxalsäure	2.0 g
Wasser	100.0 ml

2.13 Van Giesonfärbung

Verwendung: Zoologische Schnitte

Sie ist eine Dreifachfärbung. Die Kerne werden mit Eisenhaematoxylin blauschwarz vorgefärbt. Die anschließende Säurefuchsin-Pikrinsäurelösung färbt kollagenes Bindegewebe rot und Muskeln, elastische Fasern, Neuroglia, Erythrozyten gelb.

- Anwendung:*
1. Eisenhaematoxylin nach Hansen ca 5 min. (notfalls kann auch eine andere Haematoxylinfarbe verwendet werden)
 2. Gründliches Abspülen in Leitungswasser und bläuen. Ggf. 1-2 Tropfen Ammoniak auf 100 ml Leitungswasser.
 3. Färben in Säurefuchsin-Pikrinsäurelösung. 1-3 min.
 4. Ganz kurzes Anspülen mit Wasser. Schnitt auf nicht fusselndem Filtrierpapier (Kaffeefilter!)

Jahr 1996	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 2-4
---------------------	---	--------------------

abtrocknen. Ganz schnelles Entwässern mit mehrfach gewechseltem 96% Alkohol (Spiritus). Isopropanol. Punkt 4 erfordert einige Geschicklichkeit!. Da Säurefuchsin und Pikrinsäure in Wasser und Alkohol wieder herausgelöst werden, muss Punkt 4 sehr rasch ausgeführt werden. In Wasser wird etwas mehr Säurefuchsin ausgezogen während im Alkohol die Pikrinsäure schneller aus dem Schnitt verdrängt wird. Bleibt der Schnitt zu lange Zeit im Alkohol wird er rotstichig oder ganz entfärbt! Manche Autoren empfehlen, den gefärbten Schnitt nicht mit Wasser abzuspülen, sondern sofort mit 96% Alkohol zu behandeln. Die Alkoholbehandlung soll allerdings so lange andauern, dass im kollagenen Bindegewebe nur noch Säurefuchsin und keine Pikrinsäure festgehalten wird. (Laut Literatur hängt davon auch die Haltbarkeit der Präparate ab.)

5. Xylol; Deckglasaufliegen und prüfen, ob die Färbung gelungen ist. Ist bei 4. zu langsam gearbeitet worden und die Färbung mißlungen, so übertrage man wieder in Isopropanol, Spiritus, Wasser und wiederhole bei Punkt 3. Es hat wenig Wert solange man keine Übung hat, den Schnitt ohne mikroskopische Kontrolle sofort in Kunstharz einzubetten. Machen Sie auch nicht den Fehler, die ganze Prozedur an einem neuen Paraffinschnitt genauso erfolglos zu wiederholen, sondern üben Sie an dem ausgeteilten Präparat solange, bis Sie mit dem Ergebnis zufrieden sind. Decken Sie dann erst in

Jahr 1996	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 2-4
---------------------	--	--------------------

Malinol (ob Euparal mit seinem merkwürdigen Lösungsmittel haltbare Präparate gibt möchte ich bezweifeln) ein.

6. Cädax oder Malinol etc

Zusammensetzung der Lösungen zur Van Gieson Färbung:

Eisenhaematoxylin nach Hansen:

- | | |
|------------------------|----------|
| a) Eisenalaunkristalle | 10,0 g |
| Ammoniumsulfat | 1,4 g |
| Aqua dest. | 150,0 ml |
| b) Haematoxylin | 1,6 g |
| Aqua dest | 75,0 ml |
- Lösung a) in b) rühren und kurz aufkochen

Säurefuchsin-Pikrinsäure-Lösung

- | | |
|--------------------------|----------|
| Pikrinsäure | 2,0 g |
| Wasser | 100,0 ml |
| Säurefuchsin waessrig 1% | 10,0 ml |

2.14 Anilinblau - Bismarckbraun (Schumm 11.03.84)

Verwendung: Flechtenfärbung!

Collema tenax in Pfeiffer fixiert, in Paraffin über Methylbenzoat eingeschlossen, Schnitte etwa 6 - 10 µm dick, mit Eiweissglycerin aufgeklebt und Kollodiumhäutchen abgesichert.

Kollodiumhäutchen:

1. 100 % Isopropanol
2. 0.2 % Kollodiumlösung

Jahr 1996	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 2-4
---------------------	---	--------------------

3. 70 % Spiritus 5 min zum Härten
4. Wasser

Färbung:

1. Anilinblau - Lactophenol
Die Farbe färbt sehr selektiv die Nostoczellen an, das Hyphenplasma wird schwächer angefärbt
2. Wasser
3. Bismarkbraunlösung (in ca. 50 % Spiritus)
Die Farbe färbt die Gonidien nicht, sondern färbt die sonst unsichtbare Gallerte zwischen Pilzhyphen und Algenzellen
4. Wasser
5. Spiritus 70%, 94%
6. Isopropanol, Xylol, Cädax

Anmerkung: Die Nostoczellen sind blaugefärbt unter der Öl-immersion hat ihr Plasma eine wabige Struktur, Volutinkörper sind nicht selektiv angefärbt. Das Pilzhyphenplasma ist ebenfalls schwach bläulich und granuliert angefärbt. Die Gallerte ist gelb bis orange und einzelne Abscheidungszone sind in bestimmten Fällen erkenntlich. Das Hymenium wird von beiden Farben angenommen. Bei dem Objekt bröckelte beim Schneiden das Hymenium zu sehr heraus, doch scheint man eine gute Darstellung der Ascuswände erwarten zu können.

3 Beizen von Farbstoffen

Verwendung: Färbungen für Alkoholbehandlung haltbarer machen

- 3.1 Bariumchlorid (0.5 - 1 % wässr. Lösung) für
Lichtgrün Orange G
- 3.2 Bleinitrat (0.5 - 1 % wässr. Lösung) für
Eosin Erythrosin
Jodeosin
- 3.3 Kupferacetat oder Kupfersulfat (0.5 % wässr. Lösung) für
Kongorot
- 3.4 Phosphormolybdänsäure: für
Anilinblau Bismarckbraun
Chrysoidin Fuchsin
Gentianaviolett Malachitgrün
Methylenblau Methylgrün
Safranin Säurefuchsin
- 3.5 Pikrinsäure: für
Fuchsin Malachitgrün
Methylenblau

Jahr 1996	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 2-4
---------------------	---	--------------------

4 Nachweis-Reaktionen

4.1 Mäule'sche Reaktion auf Holzstoff (Lignin)

- Anwendung:*
1. Kaliumpermanganatlösung, wässr. 1%, ca 5 min
 2. Auswaschen mit Wasser. Die Schnitte sollten eine gelbe bis braune Farbe angenommen haben.
 3. Verdünnte Salzsäure. 1-2 Minuten. Die Schnitte werden wieder hell
 4. Auswaschen in Wasser
 5. Salmiakgeist

Anmerkung: Bei Angiospermen Lignin rot. Bei Gymnospermen und Pteridophyten schwache oder keine Reaktion. Ersetzt man Kaliumpermanganat durch gesättigte Kaliumchloratlösung mit etwas Salzsäure (Vorsicht!), so zeigen auch Gymnospermen und Pteridophyten eine Reaktion

4.2 Ligninnachweise (Holzstoff):

1. *Phloroglucin*

Ein Tropfen einer wässrigen oder alkoholischen (1-5 %) Phloroglucinlösung unter das Deckglas saugen und anschliessend konzentrierte Salzsäure nachsaugen. Lignin färbt sich rot. (Vergleiche die Färbung mit den Ergebnissen einer Safraninfärbung!)

Jahr 1996	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 2-4
---------------------	---	--------------------

2. *Salzsaures Anilin*

Gesättigte wässrige Lösung von Anilin, der gleichzeitig etwas Salzsäure zugesetzt wird.

Lignin färbt sich gelb.

4.3 Zellulosenachweis

Unter dem Deckglas erst Jodjodkalilösung, dann konzentrierte Schwefelsäure durchsaugen. Zellulose quillt auf und färbt sich blau. Kutin, Chitin, Lignin färben sich dabei nicht blau!

Löslichkeit in Schweizer Reagenz.

4.4 Kutinnachweise:

1. Färbung mit Sudan-III-glycerin
Ist haltbar als Dauerpräparat in Glyceringelatine.
2. Resistenz gegenüber konzentrierter Schwefelsäure.
3. In 5,6 % Kalilauge färbt sich Kutin gelb.

4.5 Gerbsäurenachweis:

Eichengallen mit Eisenchloridlösung behandeln.

4.6 Eisennachweis:

Jahr 1996	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 2-4
----------------------------	--	---------------------------

Mit Gelbem Blutlaugensalz und Salzsäure in den Zellmembranen von Algen. Geignet nach Literaturangaben auch das aquatische Moos: *Fontinalis antipyretica*.

(Meine Herbarbelege aus der Runequelle/Harz und aus Bächen im Stubensandsteingebiet des Schönbuch/Wttbg. zeigen die von Molisch angegebene Eisenreaktion jedoch nicht!!)

4.7 Calciumoxalatnachweis:

Geeignete Objekte sind z. B. braune Zwiebelschuppen.

Unlöslich in Essigsäure. Löslich in Salzsäure. Gibt mit Schwefelsäure lange Gipsnadeln. Ggf. erwärmen und wieder abkühlen lassen. Längere Zeit warten bis die Gipsnadeln auskristallisieren