

Jahr 1991	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 3
----------------------------	--	-------------------------

Verschiedene Färbemethoden für Protisten

Die nachstehenden "Färbemethoden für Protisten" wurden im Rahmen der Praktika über Ciliaten während der Arbeitswoche in Heiligkreuztal (18. – 23. 08. 1991) bekannt gegeben.

Kernfärbung mit Methylgrün

1. Fixieren verschiedener Ciliaten in einem Tropfen Kulturmedium auf einem Objektträger mit einem Tropfen 2,5% Glutaraldehyd in 50 mM Phosphat-Puffer.
2. Zugabe von angesäuerter Methylgrünlösung, abdecken und mikroskopieren. Es können keine Dauerpräparate angefertigt werden.

Lösung: 100 ml 0,1% Methylgrün in 1% Essigsäure

Darstellung der Pellikulastruktur

a) Opalblaumethode nach Bresslau (1922)

Prinzip: Diese Methode dient zur Darstellung von Oberflächenstrukturen. Opalblau ist ein kolloidaler "Farbstoff", der nicht eindringt, sondern Vertiefungen ausfüllt. Erhöhte Strukturen erscheinen im Präparat daher hell in dunkler Umgebung.

Ausführung:

1. Saubere, fettfreie (mit Alkohol geputzte) Objektträger vorbereiten
2. Einen kleinen Tropfen Opalblau mit einem kleinen Tropfen dichter Einzeller-Kultur (verschiedene Ciliaten) auf einem Objektträger mit einer Nadel gut vermischen. Wenn nötig, die Organismen vorher durch Zentrifugieren anreichern.

Jahr 1991	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 3
----------------------------	--	-------------------------

3. Gemisch mit der Nadel so dick ausstreichen, dass die Schichtdicke etwa die Hälfte des zu untersuchenden Objekts besitzt, also sehr dünn. Bei zu großer Schichtdicke entstehen Risse während der Trocknung.
4. Lufttrocknen lassen, eventuell mit einem Fön (ohne Heizung) beschleunigen. Die Trocknung soll schnell gehen, da der "Farbstoff" für manche Protozoen leicht giftig ist und die Tiere darin langsam absterben.
5. Einschluss in dickes Kunstharz. Luftblasen durch leichten Fingerdruck entfernen. Zu dünnes Harz kann später zu Luftblasen im Präparat führen, wenn das Lösungsmittel verdunstet ist.

Lösung: Gesättigte Opalblaulösung (5 g in 20 ml aqua dest. mehrere Tage stehen lassen, öfter schütteln)

b) Trockene Versilberungsmethode nach Klein
(modifiziert von Foissner 1967, 1976)

Anwendung: Gut geeignet für Einzelpräparationen, um einen ersten Überblick über die Anordnung der Cilien zu bekommen. Beste Methode zur Darstellung des Silberliniensystems = Argyrom = Stria: System von kortikalen silberfreundlichen (argyrophilen) Strukturen des Ektoplasmas, das sich nach der Imprägnation mit Silbernitrat zeigt. Wenig geeignet für Ciliaten, die sich schlecht eintrocknen lassen bzw. dabei zerplatzen, z.B. viele Hypotriche. Da die Methode sehr schnell arbeitet, lohnt es sich, alle Ciliaten-Typen zu versuchen; zur Analyse des Silberliniensystems genügt ja oft, wenn nur Teile eines Tieres gut imprägniert sind. Es werden nur pellikuläre Strukturen imprägniert, daher keine gleichzeitige Kernfärbung.

Ausführung

1. Mehrere Objektträger mit alkoholfuchtem Lappen abwischen und sehr dünn (mit Fingerkuppe) mit mindestens 24 Stunden altem Hühnereiweiß bestreichen.
2. Untersuchungsmaterial aufbringen ("dünne" Kulturen ev. vorher durch Abzentrifugation anreichern) und bei Zimmertemperatur eintrocknen lassen.

Jahr 1991	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 3
----------------------------	--	-------------------------

3. 1 min mit ca. 1% Silbernitratlösung (AgNO₃) überschichten (dabei direktes Sonnenlicht vermeiden).
4. Kurz (ca. 3 Sek.) mit aqua dest. abspülen und die Präparate abermals bei Zimmertemperatur trocknen.
5. Präparate in einem Abstand von 3-10 cm für 5-60 sec an eine 40-60 Watt Glühbirne halten (Vorreduktion).
6. Präparate für ca. 30 Sek. mit dem Reduktionsgemisch überschichten.
7. Reduktionsgemisch sehr kurz (ca. 10 Sek.) mit Leitungswasser (mit aqua dest. quellen die Tiere und lösen sich ab) abspülen und Objektträger 2 mal 5 min in 98% Isopropylalkohol oder Äthanol stellen.
8. Abermals lufttrocknen und in mitteldickes neutrales Kunstharz (Eukitt) einschließen.

Hinweise:

1. Das Hühnereiweiß muss vor Gebrauch mindestens 24 Stunden in einer Weithalsflasche offen an der Luft gestanden haben. Es ist dann 2-3 Tage brauchbar, wenn es verschlossen wird. Vor Gebrauch nicht umrühren, sondern mit der Fingerkuppe von der Oberfläche nehmen.
2. Um das Eiweiß gut verteilen zu können, soll man die Objektträger unmittelbar vorher anhauchen (Wasserfilm).
3. Die Menge des Probenmaterials, mit dem man die Tiere eintrocknen lässt, beeinflusst das Resultat entscheidend. Daher verschiedene Mengen probieren, d.h. Tropfen unterschiedlich dick ausstreichen.
4. Die Stärke der Imprägnation ist von der Vorbelichtung und der Konzentration des Entwicklergemischs abhängig. Wenn sie zu schwach ist, mehr Komponente B und/oder C zugeben, wenn sie zu stark ist, dann mehr Komponente A nehmen.
5. Das Reduktionsgemisch muss gründlich abgespült werden, sonst bilden sich im Alkohol Kristalle auf den Präparaten.

Jahr 1991	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 3
----------------------------	--	-------------------------

6. Präparate, die in der Sonne oder unter der UV-Lampe reduziert wurden, sind nicht beständig; sie blassen innerhalb weniger Wochen aus.

Lösungen:

- 1% Silbernitratlösung (in brauner Flasche ansetzen und aufbewahren, dann lange haltbar) 1 g Silbernitrat (AgNO_3) auf 100 ml aqua dest.
- Reduktionsgemisch (am besten unmittelbar vor dem Gebrauch aus den Komponenten A, B und C mischen. Das Gemisch ist etwa 24 Stunden haltbar, wenn es stark braun ist, verwerfen. In der angegebenen Reihenfolge mischen)

20 ml Komponente A
1 ml Komponente B
1 ml Komponente C

Komponente A:

Feinkornentwickler für Negative. Eine Flasche Neofin Blau auf 500 ml Leitungswasser (mit dem Rest kann am gleichen Tag ein Negativ-Film entwickelt werden)

Komponente B:

Unverdünnter, käuflicher fotografischer Positiv-Entwickler (z.B. Eukobrom) oder selbst ansetzen (Substanzen in der angegebenen Reihenfolge in 50 ml aqua dest. lösen)

0,2 g Metol
2,6 g Natriumsulfit (Na_2SO_3)
0,6 g Hydrochinon
5,2 g Natriumcarbonat (Na_2CO_3)
5,2 g Kaliumcarbonat (K_2CO_3)
0,2 g Kaliumbromid (KBr)

Komponente C:

5 g Natriumhydroxid (NaOH) auf 50 ml aqua dest.