

Jahr 1990	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 1
----------------------------	------------------------------------------------------------	-------------------------

Versuche mit Gentianaviolett

Dr. Felix Schumm

1. Einleitung:

Gentianaviolett besteht aus einem Gemisch von Kristallviolett (Hexamethylpararosanilin) und Methylviolett (penta- und Tetramethylpararosanilin). In der Technik werden diese Farben vor allem bei der Herstellung von Stempelkissen, Kopierstiften und Schreibmaschinenbändern gebraucht ¹. Zum Färben von Textilien werden diese Farben kaum mehr verwendet. In der Mikroskopie sind sie Bestandteil bekannter Mehrfachfärbungen (z.B.: Safranin-Gentianaviolett-Orange nach Flemming, Safranin-Gentianaviolett-Lichtgrün nach Geidis). Von Bedeutung ist Gentianaviolett bei der bakteriologischen Diagnostik und ist eine Farbkomponente der Gram'schen Doppelfärbung mit deren Hilfe man Bakterien (grampositive und gramnegative Bakterien.) unterscheiden kann.

Der folgende Artikel soll anregen, selber mit diesem interessanten Farbstoff zu experimentieren und in die verschiedenen Techniken des Beizens einführen.

2. Farblösung

Ich verwende das Gentianaviolett der Fa. Chroma (1B411) ² doch dürfte jede andere Marke dieselben Resultate ergeben.

50 ml Aqua dest.
50 mg Gentianaviolett
(= etwa eine Messerspitze, die genau Menge
ist nicht entscheidend.)

Meist werden Farblösungen mit dem zehnfachen Farbanteil angegeben. Für die folgenden Versuche ist diese schwächere Lösung aber besser geeignet.

¹ Schömmmer, Franz (1949) – Kryptogamen-Praktikum Stuttgart

² 10 g kosteten 1983 nach der Liste für Farbstoffe, Chemikalien und Reagenzien (M16) noch 6 DM

Jahr 1990	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 1
----------------------------	------------------------------------------------------------	-------------------------

3. Kernfärbungen am Beispiel des Zwiebelhäutchens.

Wir schneiden eine Küchenzwiebel auf und ziehen von der Innen- oder der Außenseite das Häutchen ab. Etwa 5 x 5 mm große Stücke werfen wir sofort nach dem Abziehen zum Fixieren in AFE (Brennspiritus 90 ml, Formalin 5 ml, Eisessig 5 ml) und belassen sie dort 5 Minuten oder länger. Das Fixiergemisch wird mit 70 % Spiritus ausgewaschen. Anschließend bringen wir die Häutchen in eine größere Glasschale mit Wasser. Dann färben wir in einem Uhrglasschälchen einige der Häutchen in der unverdünnten Gentianaviolettlösung etwa 2-4 Minuten und übertragen sie dann wieder in eine Schale mit Wasser. Diese so vorbereiteten Häutchen dienen als Ausgangsmaterial für die folgenden Versuche.

3.1 Färbungen ohne Beizen:

1. Versuch: Wir untersuchen ein in Wasser gelegtes Häutchen unter dem Mikroskop. Es zeigt sich, dass Gentianaviolett ein vorzüglicher Kernfarbstoff ist und je nach Färbezeit vor allem die Zellkerne aber auch die Zellwände stark anfärbt.

2. Versuch: Wir saugen unter dem Deckglas 70 % Spiritus (auf die genaue Konzentration kommt es nicht an) durch und beobachten durch's Mikroskop. Der Schnitt entfärbt sich langsam. Dies lässt nichts Gutes ahnen, wenn man daran denkt, dass für ein Dauerpräparat in Malinol, das gefärbte Häutchen vorher durch Alkoholstufen entwässert werden muss!

3. Versuch: Es soll ein gut gefärbtes Häutchen in Malinol eingeschlossen werden. Dazu übertragen wir es für jeweils 1 - 3 Minuten in vorbereitete Gläschen mit Spiritus 50%, 60%, 70%, 80%, 94%, Isopropanol 100%, Xylol. Bevor wir uns entschließen, das Häutchen in Malinol zu übertragen, beobachten wir das Resultat unserer Bemühungen lieber noch in Xylol unter dem Mikroskop. Das Ergebnis ist mäßig. Fast das ganze Gentianaviolett ist ausgezogen worden, und von der ursprünglichen Brillanz der Färbung ist nichts mehr zu erkennen

4. Versuch: Nachdem der Einschluss in Kunstharz ziemlich gescheitert ist, probieren wir, ein gefärbtes Häutchen in Glyceringelatine einzuschließen. Eine vorschriftsmäßige Entwässerung mit Glycerin können wir uns ersparen, da es zunächst nur darauf ankommt zu beobachten, ob sich die Färbung in Gelatine überhaupt hält. Es zeigt sich, dass nach relativ kurzer Zeit die Färbung ausblutet und verschwommen wird. Also kommt Glyceringelatine als Einbettungsmittel nicht in Frage.

Jahr 1990	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 1
----------------------------	------------------------------------------------------------	-------------------------

5. Versuch: Auf einen Objektträger geben wir drei getrennte Tropfen unserer Gentianaviolettlösung. Dem ersten Farbtropfen fügen wir einen kleinen Tropfen 2% Phosphormolybdänsäure zu und beobachten was passiert. Entsprechend geben wir zu den anderen Farbtropfen etwas 1% Pikrinsäure bzw. ein bisschen Jodtinktur. In allen drei Fällen bildet das Gentianaviolett einen flockigen Niederschlag und wird wasserunlöslich.

Das Überführen des Farbstoffes in eine unlösliche Verbindung nennt man Beizen. Wir wollen nun ausprobieren, ob die gefärbten Häutchen nach einer entsprechenden Beizung die Alkoholpassagen besser überstehen.

3.2 Färbung mit Phosphormolybdänsäure³ Beizung

6. Versuch: Wir übertragen ein gefärbtes Häutchen für ca. 2 Minuten in ein Uhrgläschen mit 2 % Phosphormolybdänsäure. Anschließend waschen wir das Häutchen in Wasser aus und schließen es nach den üblichen Alkoholreihen und einer Xyloppassage in Malinol ein. Während der Entwässerung beobachtet man, dass praktisch kein Gentianaviolett mehr durch den Alkohol dem Häutchen entzogen wird. Betrachtet man das Dauerpräparat, so sieht man, dass Zellwände und Kerne tiefviolett gefärbt sind. Meist werden sie sogar überfärbt sein, so dass feinere Kernstrukturen nicht mehr zu erkennen sind. Auf jedenfall können wir schließen, dass nach Phosphorwolframsäurebeizung Gentianaviolett nur noch sehr schwer oder überhaupt nicht mehr während der anschließenden Manipulationen aus dem Präparat entweicht.

7. Versuch: Wir schließen jeweils ein gefärbtes, gebeiztes und in Wasser ausgewaschenes Häutchen in Glyceringelatine und in Polyvinylalkohollösung ein. Man könnte vermuten, dass der Farbstoff nun auch in diesen wasserhaltigen Medien dauerhaft geworden ist. Zunächst zeigt sich, dass tatsächlich die Färbung nicht mehr ausblutet. Eine endgültige Beurteilung ist jedoch erst nach 1-2 Jahren möglich. Mein Präparate halten die Farbe jetzt schon 2 Monate recht gut!

8. Versuch: Die unmittelbar gebeizten Färbungen sind meist zu stark. Wir versuchen daher einen Teil des Gentianavioletts vor der Beizung wieder zu entfernen. Übertragen Sie dazu ein stark gefärbtes Häutchen in ein Uhrglas mit Essigwasser (10 Tropfen Wasser 1-2 Tropfen Eisessig). Es gehen langsam violette Farbwolken aus dem Häutchen. Unter dem Mikroskop kann man beobachten, dass sich die Kerne als letztes ent-

³ Statt Phosphormolybdänsäure kann man genauso gut Phosphorwolframsäure benutzen

Jahr 1990	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 1
----------------------------	------------------------------------------------------------	-------------------------

färben. Wenn der uns geeignet erscheinende Zeitpunkt erreicht ist, waschen wir in Wasser aus, beizen und schließen in der üblichen Weise wieder in Malinol ein.

9. Versuch: Statt die überfärbten Häutchen wie in Versuch 8 vor der Beizung mit Essigwasser zu differenzieren können wir versuchen ein Häutchen in angesäuertem Gentianaviolett anzufärben. In einem Uhrgläschen mischen wir 20 Tropfen Wasser, 2-3 Tropfen Eisessig und 2-3 Tropfen Gentianaviolettlösung. Wir färben darin ein Häutchen ca. 2-10 Minuten. Beobachtet man den Färbevorgang so stellt man fest, dass sich die Kerne sehr selektiv anfärben. Zu einer Überfärbung kommt es nicht mehr. Eine gute Erklärung für diesen Effekt, der auf dem amphoteren Verhalten der Eiweiße beruht, findet man bei Burck (1982). Allgemein gilt etwa folgende Faustregel: Ein basischer Farbstoff wie Gentianaviolett färbt in neutraler oder schwach alkalischer Lösung Plasma und Kern in schwach saurer Lösung (pH-Wert etwa 4.5) hingegen nur die Kerne an (Endpunktsfärbung!). Bei den bekannten Kernfärbungen mit Methylgrünessigsäure oder Karminessigsäure wird dasselbe Prinzip ausgenutzt.

3.3 Beizen mit Pikrinsäure

10. Versuch. Ein stark gefärbtes Häutchen wird für 1-3 Minuten in 1 % Pikrinsäure gelegt. Nach dem Auswaschen mit Wasser übertragen wir wieder über die Alkoholstufen und Xylol als Intermedium in Malinol. Man kann beobachten, dass vor allem in den höheren Alkoholstufen der Farbstoff wieder ausgezogen wird, und die Pikrinsäurebeizung das Gentianaviolett nicht so alkoholresistent macht, wie die Phosphormolybdänsäure. In jedem Fall aber geht die Entfärbung außerordentlich viel langsamer vor sich, als wenn man nicht gebeizt hätte. Mit Pikrinsäurebeizung läßt sich daher ein stark gefärbtes Objekt in hohen Alkoholkonzentrationen langsam und kontrolliert noch differenzieren, was auch seine Vorteile hat. Die z.B. von Zimmermann⁴ angegebene Färbung mit Fuchsin-Pikrinsäurebeizung und heute oft mit der Anilinblau Gegenfärbung als Röser-Färbung bezeichnete Doppelfärbung beruhen auf demselben Prinzip. Bei Phosphorwolframsäure ist dies nicht möglich.

3.4 Beizen mit Jod

11. Versuch: Wir wiederholen den 10 Versuch ersetzen aber Pikrinsäure durch eine Jodlösung (z.B. 5 Tropfen Wasser, 2 Tropfen Jodtinktur). Wir beobachten, dass diese Beizung noch weniger haltbar ist als die mit Pikrinsäure. Im Dauerpräparat zeigt sich

⁴ Schneider Zimmermann (1922) – Botanische Mikrotechnik, Jena, 2. Aufl. Seite 115

Jahr 1990	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 1
----------------------------	------------------------------------------------------------	-------------------------

aber noch ein weiterer Unterschied: Beim Differenzieren von Pikrinsäure bzw. Jod gebeizten Häutchen werden Kernstrukturen recht unterschiedlich dargestellt. Nach Jodbeizung bleiben vor allem die Kernkörperchen als letzte intensiv gefärbt. Es resultieren phantastisch klare Bilder! In der gesamten Versuchsreihe gab diese Methode die besten Resultata. Natürlich kann man dies nicht auf andere Objekte verallgemeinern.

3.5 Beizen mit Tannin-Brechweinstein

Brechweinstein (Tartarus stibiatus) ist eine Antimon-Kalium Weinsäure-Verbindung, die wie schon der Name verrät, früher in Apotheken als Brechmittel vorrätig gehalten wurde. Das giftige Mittel (0,1 g Einzeldosis, Tagesdosis nicht über 0,6g⁵), das lange Übelkeit erzeugt, wird jetzt nicht mehr verschrieben und nur alte Apotheken führen noch Restbestände in ihrem Labor. Meist wird man sich daher eine größere Menge⁶ bestellen müssen. Interessenten kann ich auch von meiner Lösung abgeben.

Um Baumwolle oder Baumwoll-Seide Gewebe mit basischen Farbstoffen einzufärben verwendete man in der Textilfärberei früher u.a. folgende Vorschrift: Das Färbegut wurde vor dem Färben in 1-3% Tanninlösung bei 60-70 OC für einige Stunden behandelt und nach dem Abquetschen für 20-30 Minuten in einem kalten Bad mit 1-3 % Brechweinsteinlösung gespült. Dadurch wird die Tanninbeize fixiert. Anschließend wurde mit basischen Farblösungen, denen 2-3 % Essigsäure oder 2-4 % Alaun zugesetzt war, ausgefärbt⁷.

Für unsere Versuche benötigen wir:

Tanninlösung wässrig	10%
Brechweinsteinlösung wässrig	3%

12. Versuch: Um die Wirkung dieser Beizung zu studieren geben wir in ein Uhrgläschen 3 Tropfen der Tanninlösung und setzen 2 Tropfen Brechweinsteinlösung hinzu. Es bildet sich ein weißer Niederschlag, der in Wasser unlöslich ist. Wir verdünnen mit ca. 5 Tropfen Wasser und setzen noch einen Tropfen Gentianaviolettlösung bei. Wir beobachten unter der Lupe, dass die weißen Flocken blau angefärbt werden, und das Gentianaviolett nicht mehr in Lösung bleibt. Auch nach Zusatz von ca. 20 Tropfen Spiritus bleiben die Flocken blau gefärbt. Daher können wir erwarten, dass auch durch

⁵ Römp, Hermann (1937) – Rezeptbuch des Alltags

⁶ Z. B. kosten bei Fa. Caelo, die auch Apotheken beliefert, 50 g ca. 15 – 16 DM

⁷ Entnommen aus: Tabellarische Übersicht über Eigenschaften und Anwendung der Farbstoffe, 1. Teil: Färberei (1921), Farbenfabriken vorm. Friedr. Bayer & Co.

Jahr 1990	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 1
----------------------------	------------------------------------------------------------	-------------------------

eine Tannin-Brechweinstein-Beize Gentianaviolett durch Alkoholpassagen kaum mehr ausgezogen werden kann.

In der Mikroskopie ist es sinnvoll, die Beizung erst nach der Färbung vorzunehmen. Man färbt und differenziert soweit, wie es geeignet erscheint, und beizt dann. Verfäht man umgekehrt, ist eine Differenzierung nur noch schwer oder gar nicht mehr durchführbar. Andererseits kann es auch durchaus einmal sinnvoll sein, um schlecht anfärbbare Membranen darzustellen, die Beizung, wie in der Technik, der Färbung voranzustellen.

13. Versuch: Wir behandeln ein Zwiebelhäutchen zur Kernfärbung in mit Eisessig angesäuerter Gentianaviolettlösung (z.B.: Eisessig 1 Tr., Gentianaviolett 4 Tr., Wasser 5 Tr.) und legen es nach Abspülen im Wasser für ca. 5 Minuten in die Tanninlösung. Nach gründlichem Auswaschen in Wasser wird es mit der Brechweinsteinlösung ebenfalls ca. 5 Minuten behandelt. Danach schließen wir über die üblichen Alkoholstufen über Xylol in Malinol ein.

4. Präparation von Torfmoosblättchen

Die Blättchen der Torfmoose bestehen aus zwei verschiedenen Zelltypen. Die schmalen, lebenden und chlorophyllhaltigen Zellen nennt man Chlorocyten. Die breiten, zellinhaltsfreien, oft mit faserförmigen Wandverdickungen versehenen Wasserspeicherzellen Hyalocyten. Die Hyalocyten besitzen meist charakteristische, am Rand ringförmige verstärkte Poren, die für die Bestimmung der Arten wichtige Merkmale ergeben. Um diese von einfachen ringförmigen Wandverdickungen unterscheiden zu können, müssen die Blättchen mit Gentianaviolett angefärbt werden. Die offenen Poren sind dann als helle ungefärbte Kreise erkennbar, während bei ringförmigen Membranverstärkungen, die geschlossen sind, die im Ring eingespannte Membran naturgemäß violett angefärbt wird. Es ist nur schwer möglich die gefärbten Blättchen in Kunstharz einzuschließen, da durch entwässern die zarten Objekte zu sehr schrumpfen und die ganzen Manipulationen abschreckend lang brauchen. Mit Phosphormolybdänsäure gebeizte Färbungen sind aber in Polyvinylalkohol mühelos dauerhaft konservierbar.

14. Versuch: Von einer trockenen Torfmoospflanze zupfen wir aus der oberen Hälfte 2-3 der horizontal abstehenden Äste ab und legen sie für etwa 1 Minute in die Gentianaviolettlösung. Anschließend muss gut mit Wasser ausgewaschen werden, so dass keine Farblösungsreste in den Hyalocyten zurück bleiben. Das Auswaschen kann beschleunigt werden, wenn man aus den Ästchen das Wasser mehrmals mit einem Tempotaschentuch abpreßt und dannach das Ästchen wieder in Wasser taucht. Dann

Jahr 1990	Mitteilungen der Mikro AG Stuttgart e. V.	Heft 1
----------------------------	------------------------------------------------------------	-------------------------

legen wir das Ästchen für 1 Minute in Phosphormolybdänsäure, waschen wieder in Wasser aus und zupfen die gefärbten Blättchen direkt in einen auf einem Objektträger vorbereiteten Tropfen mit Polyvinylalkohol (Gray-Weiß-Medium) hinein. Nach dem Auflegen des Deckglases ist das Dauerpräparat fertig.