

Aus dem Botanischen Institut der Philipps-Universität Marburg

Pleurax, seine Synthese und seine Verwendung zur Einbettung und Darstellung der Zellwände von Diatomeen, Peridineen und anderen Algen, sowie für eine neue Methode zur Elektivfärbung von Dinoflagellaten-Panzern

Pleurax: its Synthesis and Applikation to the Mounting and Clearing for Cell Walls of Diatoms, Dinoflagellates and Other Algae, and its Use in a New Method of Electively Staining Dinoflagellate Armours

VON HANS-ADOLF VON STOSCH

Mit 5 Abbildungen

Summary

An improved and simplified method for the preparation of Pleurax, a medium of high refractive index, has been worked out. Examples are given for making slides of cleaned diatom frustules, of whole plankton samples without or with nuclear staining, and of meristems of higher algae. In all these cases the cell walls are made to stand out by embedding the material in the resin. Finally, a simultaneous mounting-staining method on the basis of pleurax and trypan blue is described which exhibits good specificity for the thecal sutures of whole fixed thecate dinoflagellates.

Das von HANNA hergestellte und 1949 in die Mikroskopie eingeführte Kunstharz Pleurax ist wegen seiner Löslichkeitseigenschaften und wegen seines hohen Brechungsindex (n_D 1,75) ein sehr wertvolles, vor allem für Diatomeen und für gepanzerte Dinoflagellaten, aber auch zur Sichtbarmachung der Zellwände anderer Algen mit oder ohne Zellinhalt geeignetes Einschlußmittel. Wir beachten zunächst über ein verbessertes Herstellungsverfahren.

Die Herstellung von Pleurax

Nach der Vorschrift HANNAS werden Schwefel (40 g) und Phenol (100 g) mit wasserfreiem Natriumsulfid (2 g) als Katalysator kondensiert, danach vom Phenolüberschuß befreit und das Harz schließlich in Alkohol, Aceton oder Isopropanol zur Balsamkonsistenz gelöst. Einige Nachteile dieses Vorgehens suchten wir im Laufe der Zeit zu eliminieren.

Zunächst erschien ungünstig, daß die 3 genannten Lösungsmittel niedrige Brechungsindizes besitzen (n_D = 1,362 bzw. 1,359 bzw. 1,378). Daher liegt auch der Brechungsindex des mit ihnen hergestellten Balsams unnötig tief; als 2. Nachteil kommt hinzu, daß alle 3 Lösungsmittel leicht flüchtig sind, was zur Bildung von bei der Präparation hinderlichen Trockenschichten an der Oberfläche von der Vorratsflasche entnommenen Harztropfen führen kann. Beides läßt sich vermeiden, wenn man nach der Synthese das Phenol (n_D 1,542) nicht abdampft, sondern als Lösungsmittel für das Harz im Balsam beläßt; falls zu zähflüssig, wird letzterer durch Hinzuschmelzen von kristallisiertem Phenol auf die gewünschte Konsistenz gebracht, falls zu dünnflüssig ein Teil des Phenols durch Abdampfen entfernt. Mit der Verwendung von Phenol als Lösungsmittel ist außerdem der Anschluß an unsere Phenoltechnik hergestellt (v. Stosch 1952).

Da wir seinerzeit wasserfreies Natriumsulfid nicht bekommen konnten, ersetzten wir es durch metallisches Natrium in der bezogen auf Na ersterem etwa äquivalenten Menge (1,1 g für obigen Ansatz). Die mit Pleurax solcher Herstellung angefertigten Dauerpräparate waren zunächst einwandfrei. Nach einiger Zeit erschienen in einem Teil von ihnen aber starke Trübungen durch Tröpfchen oder Kristallausscheidungen, die sie unbrauchbar machten. Der Verdacht fiel auf das als Katalysator zugesetzte Natrium in seiner im fertigen Produkt vorliegenden Salzform als Ursache für die Entmischungen. Versuche zeigten dann, daß einerseits ohne Na-Zusatz zum Synthesegemisch keine Kondensation, erkennbar an einer H_2S -Entwicklung, erfolgt, andererseits aber die Na-Menge stark herabgesetzt werden kann. Wir arbeiteten zunächst mit der Hälfte, danach einem Drittel und einem Viertel der Alkaligabe, konnten aber noch weiter heruntergehen, ohne daß die Synthesedauer sich sehr wesentlich erhöhte.

Schließlich wurde noch festgestellt, daß Natriummetall auch durch trockenes Natriumkarbonat ersetzt werden kann, und weiter, daß im Einklang mit dem eben Gesagten $\frac{1}{27}$ der von HANNA angegebenen Alkaliäquivalente in dieser Form die Synthese von Pleurax ohne übermäßige Verlangsamung ermöglicht.

Voraussetzung für ein gutes, d. h. helles Präparat ist Reinheit des Schwefels (kristallisierte von Beimengungen freie Substanz) und des Phenols, das höchstens schwach rosa Farbe besitzen darf. Nötigenfalls muß der Schwefel aus Schwefelkohlenstoff umkristallisiert werden.

Wir verfahren dann wie folgt: Kristallisierter Schwefel, kristallisiertes Phenol und wasserfreies Natriumkarbonat werden im Verhältnis (w/w/w) 40 : 110 : 0,1 in einen Dreihals-Rundkolben eingebracht. Dieser soll nach dem Schmelzen der Substanzen etwa zur Hälfte oder etwas weiter gefüllt sein, d. h. das Doppelte oder etwas weniger an nominellem Volumen in Millilitern besitzen, wie das Reaktionsgemisch in Gramm wiegt. Der mittlere Hals erhält ein Steigrohr als Kühler, der eine seitliche Hals nimmt das Thermometer auf, der andere wird verschlossen. Darauf wird das Reaktionsgemisch auf 180 °C gebracht; die Temperatur darf aber bis 190 °C ansteigen. Zweckmäßig zur Heizung ist ein mit vorgeschaltetem Regeltransformator betriebener Elektrobrenner (BÜHLER, Tübingen) von 350 W Leistung. Wegen der H_2S -Entwicklung muß die Reaktion unter dem Abzug durchgeführt werden: sie ist nach etwa 5–9 Stunden beendet, wenn kein freier Schwefel mehr in der Schmelze nachweisbar bleibt. Zur Prüfung auf Schwefel entnimmt man durch den freien Seitenhals eine Probe des Gemisches mit einem Glasstab und löst diese in 5 ml 75 % Methanol. Da Pleurax in Alkohol löslich ist, erscheint eine Trübung nur, wenn noch ungebundener Schwefel vorhanden. Zweckmäßig beginnt man 5 oder 6 Stunden nach Beginn der Synthese zu prüfen und erhitzt nach Verschwinden der Schwefeltrübung noch eine Stunde weiter. Das nun gebrauchsfähige Produkt hat starken Geruch nach Schwefelwasserstoff. Dieser geht aber im Laufe einiger Monate mehr oder weniger verloren, so daß es nicht lohnt, Anstrengungen zu seiner Entfernung zu machen. Der Balsam ist in 20 mm Schichtdicke von honiggelber Farbe; mäßig dickflüssiger Phenol-Pleurax hat ein n_D von etwa 1,66. Nichts steht jedoch im Wege, das Phenol abzutreiben und eines der von HANNA (s. S. 132) angegebenen Lösungsmittel zu verwenden. Wahrscheinlich wäre dies sogar das bessere Verfahren, wenn Legepräparate von Diatomeen angefertigt werden sollen.

Einmal waren wir genötigt, fertigen Phenol-Pleurax zu filtrieren, da offenbar die Ausgangsmaterialien nicht hinreichend frei von Staub gewesen waren. Dies geschah mit einer Nutsche der Porosität 4 von SCHOTT (Mainz) unter Saugen. Der Balsam wurde durch Bestrahlung mit einer 300-W-Infrarotlampe von oben warm und flüssig gehalten, und die Filtration verlief dann verhältnismäßig rasch (ca. $1\frac{1}{2}$ h für 200 ml).

Reagenzien und Kunstgriffe

Im folgenden werden noch einige notwendige Reagenzien und Hilfsmittel angegeben und begründet.

Phenol-Methylglycol: 4 Teile geschmolzenes Phenol wird mit einem Teil Methylglycol (v/v) gemischt und das Phenol dadurch in wasserfreier Form flüssig gehalten.

„t.-Butanol“ ist tert.-Butanol ($F = 24,3^{\circ}\text{C}$) durch Zugabe von 6 % Dioxan flüssig gehalten. Als Aufbewahrungsmittel für fixiertes Material in erster Linie dann zu benutzen, wenn weitere „Härtung“, d. h. cross-linking des Cytoplasma durch $\text{C}=\text{O}$ -Gruppen (die aus primären und sekundären Alkoholen durch Oxidation entstehen) verhindert werden soll. Ist also vor allem für karyologische und andere Quetschmethoden wichtig. Hier nur als Routine-Reagenz verwendet.

EKE = Eisenkarmin-Essigsäure; KE = Karmin-Essigsäure wird durch behutsames Kochen von 1 g Karmin in 50 % Essigsäure am Rückflußkühler hergestellt; gegenüber den uns zugänglichen Angaben der Literatur kochen wir 5–6 Stunden und erhalten eine an Farbstoff reichere Lösung als nach kürzerer Kochdauer. Nach 24 Stunden bei Zimmertemperatur wird wie üblich filtriert. Für die Herstellung von EKE wird zu 10 ml KE 0,06 ml einer 4 % Lösung von Eisenaalaun in 50 % Essigsäure gegeben. Von dieser Mischung nur so viel herstellen wie in einigen Wochen verbraucht wird, da der Eisen-Karmin-Lack allmählich ausfällt.

Phenol-Essigsäure 3 : 1, 1 : 1, 1 : 3: Es handelt sich um eine Reihe von Mischungen aus Phenol, das durch Zugabe von Wasser verflüssigt wurde und 50 % Essigsäure.

Glasringe von etwa 16 mm Querschnitt, 6 mm Höhe und 2 mm Wandstärke, zum Filtrieren von Plankton oder sonstigem größerem Zellmaterial auf einen Objektträger.

Glasfilter-Nutschen: Wir verwenden gewöhnlich Mikro-Filternutschen 12 D der Porosität 3 oder 4 von SCHOTT, Mainz, die mit einer kleinen (100 ml) Saugflasche und der Wasserstrahlpumpe betrieben werden. Das Filter kann als Reaktionsgefäß dienen, wenn es am Stiel durch ein mit einer Glasperle verstopftes Stück Gummischlauch und oben durch ein mit Hilfe von Gummischlauch eingesetztes kapillar ausgezogenes Glasrohr verschlossen wird, etwa eine Pasteur-Pipette, die in ihrem weiten Teil auf 10 mm und in ihrem ausgezogenen auf 30 mm gekürzt wurde. Die Kapillare verhindert das Entstehen eines Überdrucks bei Erhitzungsoperationen.

Sedimentierröhrchen: Man kürzt den kapillaren Teil einer Pasteur-Pipette auf 40–45 mm und schmilzt ihn so zu, daß am Ende eine kleine Perle entsteht. Der weite Teil wird auf 30–40 mm Länge gebracht.

Wolframnadeln: Siehe Dossel 1966. Wir ziehen die Anfertigung durch Eintauchen in geschmolzenes Natrium-Nitrit vor und verwenden meist Wolframdraht (Osram) von 0,2 mm Stärke. Bei der Verwendung im jetzigen Zusammenhang sollte die Nadel leicht gebogen sein; ihre Spitze spielt an dieser Stelle keine Rolle. Wenn in Hartglas eingeschmolzen, kann sie rasch durch Glühen und danach Abwischen gereinigt werden.

Anwendungen von Pleurax

Will man gereinigte Diatomeenschalen in der üblichen Weise einschließen, so läßt man etwas vom Material auf einen Objektträger antrocknen, gibt einen Tropfen „Pleurax“ passender Größe darauf, erwärmt über der Sparflamme bis die Hauptmenge des Phenols abgedunstet ist, legt das Deckglas auf und erhitzt unter diesem noch einmal vorsichtig zum Sieden. In diesem Falle liegt der einzige Vorteil gegenüber Hyrax in dem etwas höheren Brechungsindex unseres Harzes.

Wichtiger aber ist die Möglichkeit, Planktonproben schonend einzubetten, ohne den Zellinhalt vorher entfernt zu haben und ohne den Zusammenhalt der Schalen und der Zellverbände zu zerstören. Auf diese Weise hat man die Proben beliebig zur Nachkontrolle zur Verfügung. Generell empfiehlt es sich in Formol fixiertes Plankton nach 1–2 Monaten in Methanol, Äthanol oder auch „t.-Butanol“ zu überführen, um das Zerfallen insbesondere von Diatomeen-Kolonien zu verhindern. Wir gehen davon aus, daß dieses geschehen sei und arbeiten folgendermaßen: Auf einen Objektträger wird ein Glasring (siehe S. oben) aufgesetzt, die für ein Dauerpräparat bemessene Planktonmenge in Alkohol eingebracht und letzterer durch an die Fuge zwischen Objektträger

und Ring außen angelegte Filtrierpapierstückchen abgesaugt, 2—3 Tropfen Phenol-Methylglycol zugegeben, weiter abgesaugt und schließlich noch einmal Phenol zugesetzt. Darauf werden die Papierstückchen entfernt, der Ring mit 2 mm Exzentrizität kreisend bewegt und darauf abgehoben. Neben den Phenoltropfen mit dem Material wird dann die für das Präparat notwendige Menge Phenol-Pleurax gegeben, die Tropfen zum Zusammenfließen gebracht und staubfrei 1—2 Stunden ruhen gelassen. Das Mischen beider Flüssigkeiten erfolgt dann langsam, was osmotisches Kollabieren zartwandiger Zellen verhindert. Der Objektträger wird danach auf eine nivellierte Heizplatte von ca. 100 °C gebracht, das Material mit einer Wolframnadel durchmischt und auf eine der Größe des zu verwendenden Deckglases entsprechende Fläche verteilt. Nach Abdampfen der Hauptmenge des Phenols (ca. 5 min) wird das Deckglas aufgelegt und danach noch eine Stunde weiter erhitzt, um das Präparat entlang der Deckgläseränder trocken zu bekommen. Es empfiehlt sich, die Mengen so einzurichten, daß ein großes Deckglas (bis 24 × 48 mm) verwendet werden kann, um einen repräsentativen Ausschnitt aus der Probe im Präparat festzuhalten. Sind große Diatomeen vorhanden, so muß die Harzmenge genügend reichlich bemessen sein und das Deckglas eventuell durch Streifen aus Aluminium-Folie entsprechender Dicke gestützt werden.

Auch zarte Plankton-Diatomeen treten in solchen Präparaten wegen des gegenüber der Kieselsäure viel höheren Brechungsindex des Harzes deutlich in unveränderter Gestalt und im natürlichen Koloniezusammenhalt hervor. Da aber auch Zellulose (mit $n_D = 1,555$) einen geringeren Brechungsindex besitzt als das Harz, werden die Schalen gepanzerter Dinoflagellaten ebenfalls gut erkennbar dargestellt, während der plasmatische Inhalt bis auf etwa vorhandene Stärke weitgehend optisch unterdrückt ist (Abb. 1). Am schlechtesten kommen Coccolithophoriden heraus, deren Kalkelemente im Brechungsindex (Calcit $n_D = 1,60$, Aragonit $n_D = 1,732$) nahe am Pleurax liegen (FREY-WYSSLING 1959).

Häufig wird es von Interesse sein zu wissen, welche Zellen aus einer fixierten Plankton- oder Bodenprobe zur Zeit der Fixierung gelebt haben. Die zuverlässigste Methode

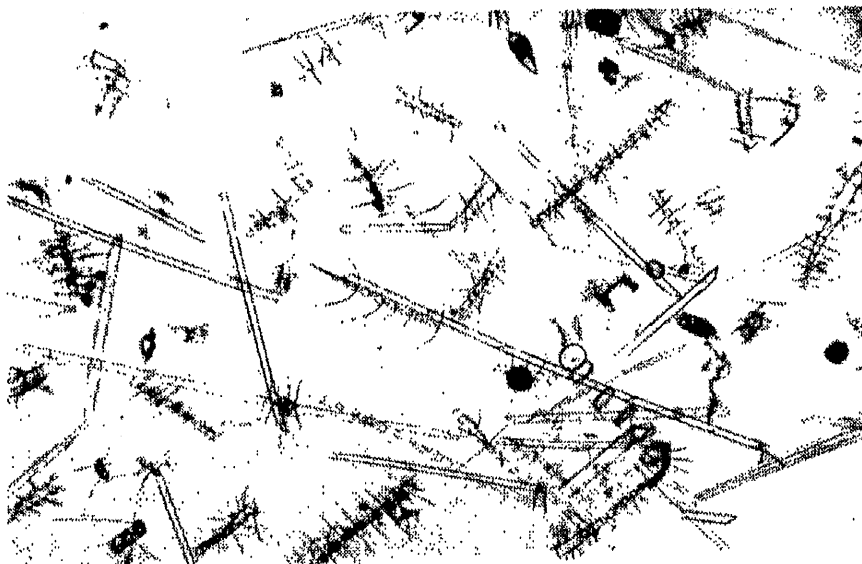


Abb. 1. Plankton vom 6. 10. 1970, Station 962, Port Phillip Bay, Viktoria, Australien, nach Formolfixierung in Methanol aufbewahrt. Phenol-Pleurax, Vergr. 75 %.

dieses festzustellen ist es, eine Kernfärbung durchzuführen, wie wir dies in der Arbeit die „Zentrischen Grunddiatomeen“ (1952) taten, um den Anteil der lebenden autochthonen Zellen neben dem toten allochthonen und autochthonen Material bestimmen zu können. Für eine gute Erhaltung der Kernstrukturen ist es am günstigsten, nichtwäßrige Mittel, wie Alkohol-Eisessig, besser Methanol-Ameisensäure (s. v. STOSCH und DREBES 1964) zur Fixierung zu verwenden, was mit Hilfe von Nutschen der oben angegebenen oder auch höherer Größe durchgeführt werden kann. Man gibt dazu so viel lebendes Planktonmaterial in das Filter, daß das Sediment bis höchstens etwa 8 mm über der Platte steht, saugt ab bis der Filterkuchen gerade die Wasseroberfläche berührt, gießt das Filter mit Fixierungsgemisch voll und saugt rasch weiter. Dadurch kann auch bei Fixierung von Seewasserorganismen verhindert werden, daß sich Kristallniederschläge in störender Menge bilden. Nach einigen Tagen wird das Fixiergemisch durch „t.-Butanol“ ersetzt, in welchem das Material beliebig lange haltbar ist. In Fixierungsgemisch oder bereits in „t.-Butanol“ befindliches Material wird zur Färbung in einer Mikronutsche in 50% Essigsäure überführt. Das gleiche kann mit Formolmaterial geschehen, das in Alkohol aufbewahrt wurde, und auch bei diesem brauchbare Kernfärbung erhalten werden.

Man saugt nun die Essigsäure vorsichtig ab, ohne dabei den Filterkuchen zu sehr zusammenzudrücken und dadurch das zerbrechliche Phytoplankton zu beschädigen. Darauf gibt man filtrierte EKE zu, mit der man die Essigsäure im Filterkuchen und in der Filterplatte verdrängt, schließt das Filter am Stiel, rührt das Sediment durch und verschließt auch am oberen Ende. Die Nutsche bleibt 30 min bei Zimmertemperatur stehen, um das Eindringen des Farbstoffes auch durch dickere Schalen und Panzer zu ermöglichen und wird danach für 2—5 min in ein siedendes Wasserbad gebracht. Nach dem Abkühlen wird die Nutsche beiderseits geöffnet und das Farbgemisch durch 50%-Essigsäure und Mischungen von dieser mit Phenol entfernt, schließlich in Phenol-Methylglycol überführt. Die Differenzierung in den Essigsäuregemischen muß rasch erfolgen, und bei kleinzelligem Material wird es meist genügen, die Farbe direkt mit Phenol-Essigsäure 1 : 1 auszuwaschen und letzteres danach sofort durch Phenol-Methylglycol zu ersetzen. Alle diese Operationen geschehen unter Saugen auf der Nutsche. Darauf mischt man das gefärbte Material in passender Menge auf dem Objektträger mit Phenol-Pleurax und fährt fort wie oben. Färbte man nicht Plankton, sondern dickschalige Diatomeen, so kann es zweckmäßig sein in ein weniger stark lichtbrechendes Harz einzuschließen (siehe v. STOSCH 1952). Bei großen Formen aber ist es unter Umständen günstig, die RNS ganz oder teilweise durch eine der Färbung vorausgeschickte Hydrolyse (2—5 Minuten n HCl/60 °C) zu entfernen, um reine Kernfärbungen zu bekommen.

Solche Kernfärbungen am Plankton können nicht nur zur Feststellung des Lebenszustandes von Interesse sein, sondern auch gelegentlich Parasiten erkennen lassen, die direkt im Leben nur schwer gesehen werden, was Abb. 2 demonstriert.

Die Hervorhebung der Zellwände in den Präparaten der bisher behandelten Art beruht auf dem Unterschied (quantitativ dem Quotienten) zwischen dem höheren Brechungsindex des Mediums und dem niedrigen der Wandsubstanz, während das relativ

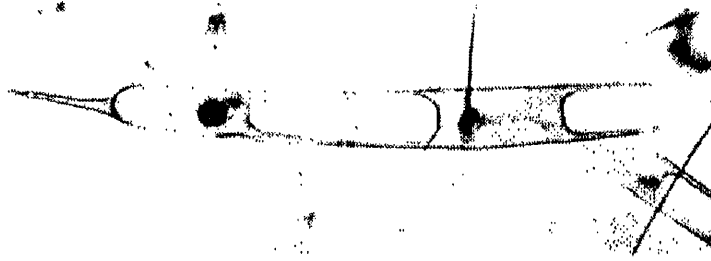


Abb. 2. *Hemiaulus sinensis*, Plankton vom 5. 3. 1970, Station 964, Port Phillip Bay, in Formol fixiert, dann direkt in Eisen-Karmin-Essigsäure gefärbt und in Pleurax eingeschlossen. Beide Zellen von einem Parasiten befallen, dessen Protoplast in der linken Zelle 3 Kerne erkennen läßt, daneben Wirtskern. Dreizehn Tage später war *Hemiaulus* nahezu aus dem Plankton verschwunden.

Vergr. 320 ×.

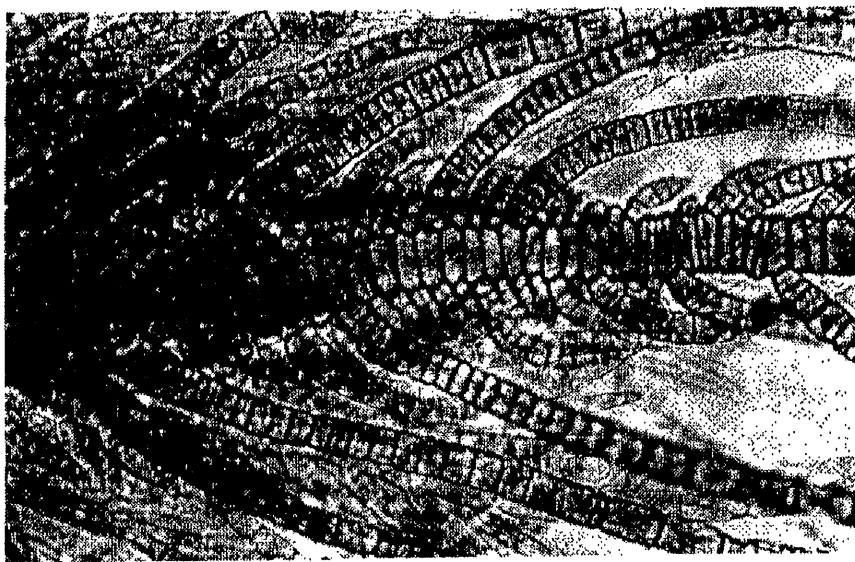


Abb. 3. Sproßvegetationspunkt von *Desmarestia aculeata*, das trichothallische Meristem tritt deutlich hervor. Nach Formolfixierung wurde schonend in Pleurax überführt. Vergr. 200 ×.

hoch lichtbrechende Cytoplasma, soweit noch vorhanden, optisch fast ausgelöscht wird. Demgemäß kann Pleurax auch verwendet werden, um Zellwände von vielzelligen Pflanzen darzustellen, und wir geben noch das Beispiel einer Braunalge, bei der Aufbau des Spitzenmeristems unter Belassung des Zellinhaltes durch Einschluß in Pleurax sichtbar gemacht wurde (Abb. 3). Phaeophyceen sind allerdings besonders geeignet für derartige Präparate, da sie keine Stärke führen, das Laminarin aber nach dem Fixieren in wäßrigen Mitteln in kurzer Zeit ausdifundiert. Stärkebildende Pflanzen müßten entweder schattig vorkultiviert oder die Stärke nachträglich entfernt werden.

Eine Färbemethode für Peridineen-Panzer

Während der Bau der Diatomeen-Schalen in Pleurax genügend deutlich wird, ist das Plattenmuster von Dinoflagellaten in Präparaten, wie dem oben gefertigten nur in günstigen Fällen zu erkennen. Sollen solche Formen aber genauer untersucht werden, so kann man das Material in einigermaßen dünnflüssigen Phenol-Pleurax eindecken und läßt das Präparat danach nur am Rande trocknen. Man hat dann den Vorteil, daß die Zellen durch Deckglasdruck gedreht und von allen Seiten betrachtet werden können.

Für Formen mit schwer erkennbaren Plattengrenzen war es bisher üblich (s. GRAHAM 1942), isolierte Panzer mit Trypanblau anzufärben. Das gelingt oft recht gut, doch muß vorher das Cytoplasma mit Hypochlorit entfernt werden. Dabei sind die Verluste durch Totalzerfall groß; das Verfahren wirkt außerdem anscheinend auch selektiv, so daß Gefahr besteht, bestimmte Arten ganz zu unterdrücken. Daher wäre es ideal, die Panzer elektiv färben zu können, ohne das Plasma entfernen zu müssen. Es sei bemerkt, daß eine Perjodat-Fuchsin-Schweflige-Säure-(PAS-) Behandlung nur in seltenen Fällen zu genügend distinkten Anfärbungen der Panzer führt und daß auch die von uns früher angegebene Chloralhydrat-Jod-Wasserstoff-Methode nicht vorteilhaft für fixiertes Plankton verwendet werden kann und vor allem keine Dauerpräparate liefert (v. Stosch 1969).

Eine brauchbare Methode wurde 1970 in Australien entwickelt, als der Verfasser an einer Untersuchung des Planktonzyklus von Port Phillip Bay, Victoria beteiligt war und es wünschenswert erschien, in Präparaten des Gesamtplanktons die Peridineen individuell ansprechbar, d. h. in ihrem Panzerbau darzustellen. Der Farbstoff (Trypanblau) wird dabei dem Pleurax beigemischt.

Es muß vorausgeschickt werden, daß die Methode zur optimalen Differenzierung zwischen Plasma und den Suturen der Zellwand einen relativ alkalireichen Pleurax erfordert. Man stellt diesen entweder durch Zugabe von 900 mg statt 100 mg Natriumkarbonat pro 40 g Schwefel bei der Synthese direkt her oder durch nachträglichen Zusatz der entsprechenden Menge von trockenem Natriumäthylat zu einem Pleurax, der eingangs beschriebenen Zusammensetzung. 2 (bis 3) Teile solchen Balsams werden dann mit einem Teil einer 0,1%igen Lösung von Trypanblau „vital“ GURR¹⁾ in Methylglycol vermischt, womit das Einschlußmedium hergestellt ist. Das Planktonmaterial, das vorher mindestens einige Wochen in Formol gelegen haben sollte, wird in t.-Butanol oder Methylglycol überführt. Will man Diatomeenschalen entfernen, so kann man vorher in Methylalkohol mit Zusatz von 5% Flußsäure (38—40%ig), z. B. in einem Plastik-Zentrifugenglas entkieseln. Da Peridineen mit zarten Panzern zum Kollabieren neigen, wird das Material in das Harzgemisch einsedimentiert. Das kapillare Ende eines Sedi-mentier-Röhrchens wird mit Hilfe einer Zentrifuge mit Trypanblau Pleurax-Gemisch so gefüllt, daß der Meniskus 2—3 mm über dem Beginn der Verjüngung steht und darauf senkrecht in einen großen Korkstopfen gespießt. Dann überschichtet man den Meniskus etwa 10 mm hoch mit dem gleichen Medium, in dem sich das Plankton befindet, also t.-Butanol oder Methylglycol, gibt das suspendierte Material der Planktonprobe darauf und läßt einige Stunden stehen, bis das Zellenmaterial in das Harzgemisch eingesunken ist. Die farblose Flüssigkeit darüber wird dann abgesaugt, das Röhrchen mit einem Polyäthylenstopfen verschlossen, und das Plankton durch Zentrifugierung (z. B. 5 min bei 2000 U) in die Spitze des kapillaren Teiles befördert. Danach saugt man auch noch das mit Butanol bzw. Methylglycol verdünnte Harzgemisch im nicht-kapillaren Teil des Sedimentier-Röhrchens ab. Die Kapillare wird nun etwas über der Ab schm elzung eingeritzt und aufgebrochen. Ihren Inhalt bläst man auf einen Objekt-

1) 2 nicht als „vital“ bezeichnete Trypanblau- Pulver erwiesen sich als mit wasserlöslichen farblosen Substanzen „verdünnt“.

träger aus und befördert etwa noch im zugeschmolzenen Endstück befindliches Material mit einer Wolframnadel heraus. Den Tropfen auf dem Objektträger bringt man, nötigenfalls durch Zugabe weiteren Trypanblau-Harzgemisches, auf die der Materialmenge entsprechende Größe, mischt gut durch und breitet mit der Wolframnadel aus. Danach wird ein Deckglas passenden Formats (24×24 mm bis 24×48 mm) aufgelegt und nun auf der Wärmeplatte bei 100°C erhitzt. Erst diese Wärmebehandlung bewirkt innerhalb von 20—60 min die Differenzierung der Färbung und gleichzeitig ein Erhärten des Präparats an den Rändern. Im Inneren bleibt das Präparat flüssig. Um ein Zerdrücken der Zellen zu vermeiden, kann man Aluminiumstreifen von passender z. B. 80 bis $120\ \mu\text{m}$ Dicke als Abstandhalter mit unter das Deckglas bringen. Die Streifen werden mit einer Schere von der Aluminiumfolie abgeschnitten und zwischen 2 Spiegelglasplatten flach gepreßt. Während des Erhitzens neigt das Zytoplasma der Zellen zum Quellen und sprengt dann oft die Panzer; da dieses im allgemeinen unerwünscht ist, wurde weiter oben bereits empfohlen, genügend lange in Formol zu fixieren; dies geschieht, um ein höheres cross-linking im Protoplasten zu erreichen.

Im fertigen Präparat (Abb. 4 und 5) sind im wesentlichen die Suturen der Peridineen-Panzer angefärbt, nicht aber oder nur schwach die Flächen der Platten. Nur wenige Arten, wie z. B. das marine *Peridinium trochoideum* und die limnischen Arten *P. lomnickii* und *Peridiniopsis berolinense* zeigen stärkere Anfärbung auch dieser Panzerteile. Die Protoplasten nehmen gewöhnlich kaum Farbe auf; Stärkekörner und Pyrenoiden mit Stärkehülle, wie auch die Oberflächenstruktur der Panzer treten durch den Unterschied der Brechungsindices hervor. Da das Präparat flüssig bleibt, kann man die Zellen durch Druck auf das Deckglas drehen und so von allen Seiten studieren. Das hat allerdings den Nachteil, daß für ein Zeichnen mit dem Zeichenapparat meist nicht genügend Ruhe herrscht, und man entweder freihändig zeichnen oder Blitzlicht-Mikrofotografien machen muß. Wegen der spektralen Eigenschaften von Trypanblau benötigt man einen panchromatischen Film. Will man den Kontrast erhöhen, so sind dazu entweder die Farbfilter BG 12/2 mm + OG 5/2 mm von SCHOTT, Mainz oder ein Breitband-Interferenzfilter mit Absorptionsmaximum bei etwa $585\ \mu\text{m}$ (etwa SCHOTT AL 585) geeignet.

Die Voraussetzungen der Färbung betreffend kann hinzugefügt werden, daß auch der alkaliarme Phenol-Pleurax durchaus brauchbare Präparate liefert. In solchen ist dann allerdings das Plasma stärker mitgefärbt, dafür kann die Tinktion der Panzer sehr kräftig sein. Weiter ist zu bemerken, daß Phenol-Pleurax allein das Trypanblau praktisch nicht löst und daß Methylglycol daher notwendig ist, um Farbstoff in gelöster Form in das Harz einbringen zu können. Die Menge kann in einigen Grenzen variiert werden. So kann seine Zugabe zum Phenol-Pleurax auch im Verhältnis 1 : 4 erfolgen, ohne daß mehr als vielleicht ein geringer Intensitätsverlust der Färbung eintritt, vorausgesetzt allerdings, daß der anteilige Trypanblau-Gehalt der endgültigen Mischung dabei gleich blieb, also eine 0,2%-Lösung in Methylglycol beigemischt wurde. Der Mechanismus der Elektivität ist unbekannt.

An den Rändern der Präparate verdampft das Methylglycol mit seinem relativ niedrigen Siedepunkt (124°C) zuerst, und hier fällt dann der Farbstoff aus. Das braucht

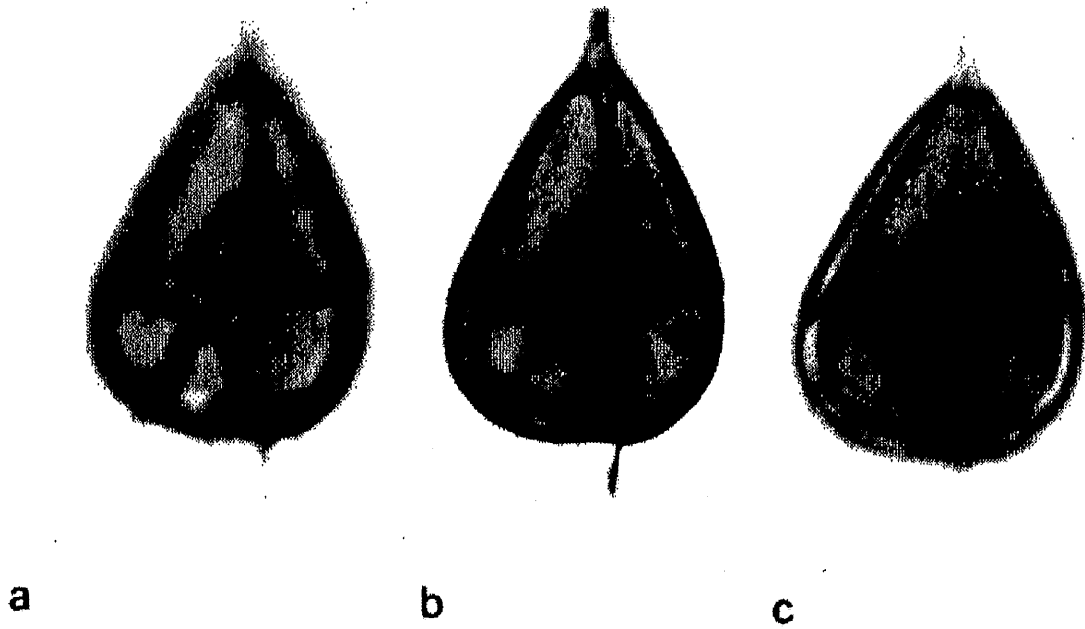


Abb. 4. Panzerfärbung der marinen Peridinee *Podolampas bipes* (Plankton Ischia, Italien vom 4. 9. 1967 fix. Formol, aufbewahrt in Methanol) mit der Pleurax Trypanblau-Methode: 3 Einstellungen. a) Suturen durch Färbung, Poren als Phasenobjekte hervorgehoben. b) Antapikale Flügel als Phasenobjekte, Suturen und Inhaltskörper unbekannter Art als Amplituden-Objekte erscheinend. c) Chromosomen-Kern als Phasenobjekt, demonstriert deutlich, daß der Protoplast erhalten geblieben ist. Vergr. 500 \times .

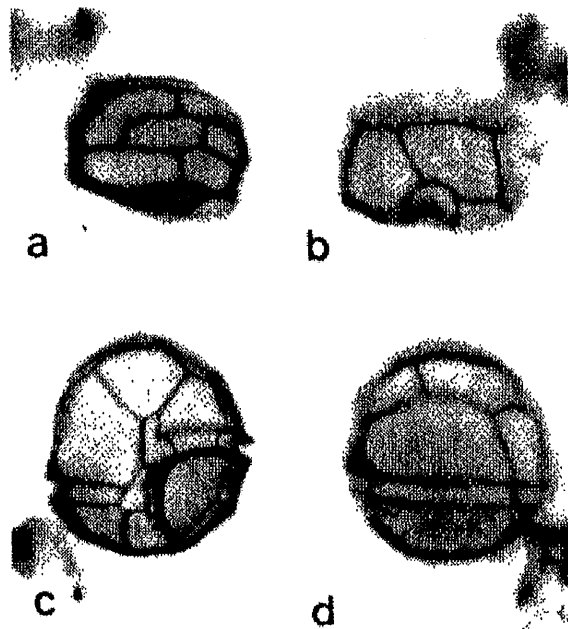


Abb. 5. Panzerfärbung der Süßwasser-Peridinee *Peridinium cinctum*. Plankton Lindenfeld-Teich bei Rüddingshausen, Hessen, Westdeutschland vom 19. 5. 1973 fixiert Formol mit der Pleurax-Trypanblau-Methode. a) und b) apikale bzw. antapikale, c) und d) ventrale bzw. dorsale Ansicht. Beide Paare jeweils von einer Zelle in zwei Einstellungen, b) und d) jedoch invertiert kopiert. Vergr. 500 \times .

nicht sehr zu stören, da der Farbstoffüberschuß niedrig gehalten war. Im Laufe sehr langer Zeiträume wird aus den Präparaten vermutlich alles Methylglycol verdunsten und dann überall Farbstoffniederschlag erscheinen, nach $2\frac{1}{2}$ Jahren jedoch können die Präparate noch gut und brauchbar sein. Will man die Ränder etwas besser gegen Austrocknen schützen, so kann man die Präparate mit „APATHYS Gummisyrup“ umranden.

Die Arbeiten in Australien wurden mir durch eine Senior Research Fellowship der University of Melbourne, Parkville, Vic. während des Jahres 1970 ermöglicht. Sie sind größtenteils im Rahmen des Port Phillip Bay Survey vom Fisheries & Wildlife Department Melbourne durchgeführt worden.

Literatur

- DOSSEL, W. E.: Preparation of tungsten microneedles with a propane torch. *Stain Technology* **41** (1966): 61—63.
- FREY-WYSSLING, A.: Die pflanzliche Zellwand. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1959.
- GRAHAM, H. W.: Studies in the morphology, taxonomy and ecology of the Peridinales. *Sci. Res. Cruise VII Carnegie 1928—1929, Biology III, Carnegie Inst. Wash. Publ.* **542** (1942): 1—129.
- HANNA, G. D.: A synthetic resin which has unusual properties. *Jl. R. microsc. Soc. Ser.* **3**, **69** (1949): 25—28.
- V. STOSCH, H. A.: Die Verwendung von Chloralhydrat oder Phenol zur Aufhellung und von Phenol-Balsam als Einschlußmittel für Essigkarminpräparate. *Züchter* **22** (1952): 265—272.
- Die zentrischen Grunddiatomeen. *Beiträge zur Floristik und Ökologie einer Pflanzengesellschaft der Nordsee. Helgol. Wiss. Meeresunters.* **5** (1956): 273—291.
- Dinoflagellaten aus der Nordsee I. Über *Cachonina niei* LOEBLICH (1968), *Gonyaulax grindleyi* REINECKE (1967) und eine Methode zur Darstellung von Peridineenpanzern. *Helgol. Wiss. Meeresunters.* **19** (1969): 558—568.
- und DREBES, G.: Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen an zentrischen Diatomeen IV. Die Planktondiatomee *Stephanopyxis turris* — ihre Behandlung und Entwicklungsgeschichte. *Helgol. Wiss. Meeresunters.* **11** (1964): 209—257.