

Rudolf Lindauer

Dauerpräparate von Süßwasseralgen

aus „Mikrokosmos“ Jg. 1975/1976

I. Fixierung	1
II. Färbung – Teil 1	9
III. Färbung – Teil 2	15
IV. Mehrfachfärbung	19
V. Entwässerung	24
VI. Wasserlösliche Einschlussmittel, Lackabschluss	27
VII. Einschluss in Harze	32
VIII. Methodenübersicht – geordnet nach Algenklassen	37

Dauerpräparate von Süßwasseralgen

I. Die Fixierung

Für viele Mikroskopiker sind Algen heute noch Lieblingsobjekte. Man findet sie leicht und kann sie das ganze Jahr hindurch sammeln. Ohne viel Vorbereitung lassen sie sich gut beobachten; viele von ihnen kann man in einer Nährlösung oder einer einfachen Erdbabkochung gut halten und züchten. Sie erfreuen uns immer wieder durch ihren großen Formenreichtum sowie durch ihre interessanten Entwicklungsstadien. Und haben wir den Wunsch, gute Dauerpräparate von Algen herzustellen, so ist das nicht schwer und ohne technischen Aufwand möglich.

Von den vielen für Algen beschriebenen Präparationsmethoden habe ich solche ausgewählt, die unschwer durchzuführen sind, sicher gelingen und auch gut haltbare Präparate ergeben. Fixiergemische mit stark giftigen Substanzen (Sublimat, Pikrinsäure) sind absichtlich weggelassen, auch Spezialfärbungen zur Darstellung bestimmter Zellelemente bleiben unerwähnt. Besonderen Wert habe ich auf den Harzeinschluß von Algen gelegt, da er für die meisten Algen einwandfrei möglich, aber anscheinend wenig bekannt ist.

Fundorte von Algen

Wir finden Algen überall, wo es Wasseransammlungen gibt: In Wiesen, Gräben, Bächen, Flüssen, Teichen und Seen. Wir finden sie an feuchten Steinen und überrieselten Felsen ebenso wie in Quellen, Brunnen und Torfmoosrasen. Algen treiben als grüne Watten und Polster an der Oberfläche von Teichen und Seen, sie leben im Bodenschlamm auf dem Grunde von Gewässern und schweben im Plankton. In Bächen und Flüssen leben sie in der Uferzone und hängen flutend an Steinen und Wasserpflanzen oder überziehen diese als grüner, brauner oder schwarzer Belag. Bei übermäßig günstigem Nährstoffangebot

kann es zu einer plötzlichen Massenentwicklung kommen, auch von einer Algenart, die vorher nie dort gefunden wurde und auch später dort nie mehr auftauchte. Algen können in Reinkultur als Wasserblüte große Teile der Oberfläche eines Teiches bedecken und nach kurzer Zeit ebenso schnell wieder verschwinden, wie sie gekommen sind. Algen hängen an hölzernen Pfählen, unter Brückenpfeilern oder bilden daran feine, schleimige Überzüge von grüner, brauner oder schwärzlicher Farbe. In kleinsten Wasseransammlungen wie Vogeltränken, Pfützen in ausgefahrenen Waldwegen, Seerosenbecken usw. gedeihen oft ganz seltene Arten. Fundgruben sind auch Wasseransammlungen in aufgelassenen Steinbrüchen, in Kies- und Lehmgruben. Hölzerne Mühlräder sind immer mit einem dichten Algenrasen überzogen.

Im Freien ist die Hochentwicklung von Algen meist an bestimmte Jahreszeiten gebunden, vor allem an Frühjahr (März bis Mai) und Herbst.

Kieselalgen finden wir als hellbraune, schleimige Überzüge überall im Wasser: An Wasserpflanzen, an Steinen, festsitzend auf Fadenalgen, an Pfählen und auch an im Wasser modernden alten Laubblättern. Andere Arten leben im Bodenschlamm oder schwimmen im Plankton.

Einer kleinen Gruppe von Algen genügt die Feuchtigkeit der Luft zu ihrem Gedeihen. Diese Algen bilden filzige Überzüge von meist auffallender Farbe (gelb, rot, grau-grün, rotbraun) auf der Rinde von Laub- und Nadelbäumen, auf Steinen und Felsen im Gebirge. Sind im Winter die Gewässer zugefroren, dann finden wir Algen an Glaswänden von Gewächshäusern (Gärtnereien), an Blumentöpfen und deren Untersetzern. An der Innenwand von Blumengießkannen (aus Kunststoff oder Glas) finden wir häufig einen dunkelgrünen oder schwarzgrünen Belag von verschiedenen Algenarten, der besonders üppig wächst, wenn im Gieß-



Bild 1: Die Blaualge *Nostoc linckia*, 670fach vergrößert. Fixiert mit Chromessigsäure nach Flemming, gefärbt mit Azokarmin B, eingebettet in Euparal. Das Präparat entstand 1936.

wasser öfter Blumendünger angesetzt wurde und die Kanne nie lange ohne Wasser stehenbleibt. Der Wandbelag läßt sich leicht als feines Häutchen abziehen. An hölzernen Brunnentrögen lebt ganzjährig ein dichter Algenfilz. Aber auch an Baumrinden können wir das ganze Jahr über Algen als grüne, pulvrig-abfärbende Überzüge und Lager finden.

Beim Algensuchen müssen wir nur eins beachten: Wir dürfen nicht hasten, wir müssen uns Zeit lassen und genau hinsehen. Sonst übersieht man Viele.

Zum Schluß noch eine Bitte und Mahnung: Algen sind lebende Wesen und ein wertvoller Bestandteil der heute noch sauberen Gewässer. Aber diese werden immer weniger. Entnehmen wir niemals mehr Algen, als wir zur Beobachtung, Kultur und eventuell Präparation unbedingt brauchen. Und dazu genügt ganz wenig Material, auch wenn diese Algenart gerade massenhaft auftritt.

Nach den folgenden Angaben können Mitglieder aller Algenklassen behandelt werden mit Ausnahme der beweglichen metabolischen Formen des Süßwassers und der höher organisierten Meeres-Rot- und Braunalgen.

Fixiermittel

Unsere Süßwasseralgen können wir lebend ohne jede Vorbehandlung unter dem Mikroskop betrachten, sie sind klein und ge-

nügend durchsichtig. Wollen wir aber den feineren Aufbau — zum Beispiel die Lage des Kernes — kennenlernen, dann müssen wir sie durch Fixierung in einen haltbaren Zustand überführen, um sie färben und in ein aufhellendes Mittel einschließen zu können.

Algen sind sehr zart gebaut, deshalb müssen wir schonend wirkende Fixiermittel wählen, um Formveränderungen möglichst zu vermeiden.

Formalin

Formalin ist als 40%ige wäßrige Lösung von Formaldehyd im Handel. Die sich häufig in der braunen Vorratsflasche bildenden Niederschläge müssen vor Anwendung abfiltriert werden (im Freien, keine Dämpfe einatmen!).

Gebrauchsverdünnung: Zum Fixieren verwenden wir eine 2%ige Formaldehydlösung, also 1 ml Formalin und 20 ml destilliertes Wasser. Hat das Formalin einen von 40% abweichenden Prozent-Anteil, so rechnen wir entsprechend um.

Anwendung: Wir bringen die Algen entweder in die Gebrauchslösung oder setzen dem Wasser mit den Algen die entsprechende Menge Formalin zu und mischen durch Kippen.

Fixierdauer: 6—12 Stunden.

Auswaschen: Nach dem Fixieren waschen wir die Algen in destilliertem Wasser oder 20%igem Äthylalkohol gründlich aus (12 bis 24 Stunden, öfters wechseln). In fließendem Leitungswasser reichen 3—6 Stunden.

Aufbewahrung: Thymol-Glyzerin (siehe unter Aufbewahrung), 30%iger Äthylalkohol oder Isopropylalkohol.

Einschluß: Ungefärbt in Glyzerin, Kupferlaktophenol, gefärbt in Harze oder Glyzerin.

Geeignet: Für Blaualgen und starre Flagellaten.

Bemerkungen: Man verlängere die Fixierdauer in Formalin nicht wesentlich (Zerstörung des grünen Farbstoffes und verminderte Färbbarkeit). Ist es uns nicht möglich, Algen sofort nach der Entnahme aus dem Wasser zu fixieren, so können wir dem Wasser mit den Algen (Klebelebewesen vorher entfernen) wenige Tropfen Formalin zusetzen, um sie — besonders in der warmen Jahreszeit — vor schneller Zersetzung zu bewahren. Zu Hause erfolgt dann erst die eigentliche Fixierung.

Pfeiffers Gemisch

Dieses Fixiergemisch — von Pfeiffer von Wellheim eingeführt — hat sich bei Algen

(und vielen anderen botanischen Objekten) ausgezeichnet bewährt. Die Algen werden in ihrer Form sehr gut erhalten, ebenso das Grün des Chlorophylls, das erst nach längerer Einwirkung (über 6 Stunden) in bräunliche Farbtöne umschlägt.

Zusammensetzung: Gleiche Raumteile von Formalin (40%ig), Methyalkohol und gereinigtem Holzessig (alle Bestandteile sind giftig). Holzessig ist wasserklar, wird aber älter gelblich bis rot. Die Verfärbung beeinträchtigt seine Verwendbarkeit nicht.

Anwendung: Wir bringen die Algen möglichst ohne viel Wasser in das Gemisch oder übergießen sie damit.

Dauer: 2—4—6 Stunden, wenn die grüne Farbe erhalten werden soll, oder 12—24 Stunden, wenn eine Nachfärbung erfolgt.

Auswaschen: Die Algen werden in fließendem oder oft gewechseltem Wasser so lange gewaschen, bis der typische Geruch verschwunden ist.

Aufbewahrung: 10%iges Thymol-Glycerin oder 30%iger Alkohol.

Einschluß: Ohne Färbung in Glyceringemischen, mit nachträglicher Färbung in Harzen.

Ergebnis: Gute Erhaltung von Form und Zellinhalt, ohne Schrumpfung. Gallerten werden nicht verändert.

Geeignet: Für alle Algenklassen außer Flagellaten.

Kupfer-Laktophenol (nach Eckert)

Laktophenol nach Amman eignet sich mit Zusatz von Kupfersalz sehr gut zur Fixierung und zum Einschluß von Algen, wenn eine Färbung nicht beabsichtigt wird. Form und Zellinhalt werden sehr gut fixiert und der grüne Algenfarbstoff wird fast naturgetreu erhalten.

Zusammensetzung: Man löst 0,2 g Kupferchlorid in 50 ml destilliertem Wasser und 0,2 g Kupferazetat in 45 ml destilliertem Wasser. Nach Lösung mischt man beide Flüssigkeiten, filtriert und fügt 5 ml Laktophenol hinzu. Nach nochmaligem Filtrieren muß die Lösung jetzt hellblau sein und bleiben. Wenn die Mischung in einen grünen Farbton umschlägt, ist sie unbrauchbar. Nur chemisch reinste Chemikalien sind geeignet.

Laktophenol (kann auch fertig bezogen werden): 20 g kristallines Phenol + 20 g Milchsäure + 40 g Glycerin + 20 g destilliertes Wasser.

Anwendung: Die Algen werden in Kupfer-Laktophenol 6—24 Stunden fixiert. Blaualgen (besonders Oscillatorien) nur 30—60 Minuten (besonders bei Oscillatorien kann es zur Bräunung und körnigen Trübung kommen).

Aufbewahrung: Algen halten sich in dieser Fixierlösung einige Monate, wenn sie nach

der Fixierzeit in destilliertem Wasser kurz gewaschen und in neue Lösung übertragen werden. Blaualgen werden in reinem Laktophenol aufbewahrt. Auch Thymol-Glycerin ist für alle geeignet.

Geeignet: Für alle Algen, auch grüne Flagellaten (z. B. *Phacus*, *Euglena* u. a.).

Einschluß: In Glycerin oder Kupfer-Laktophenol, für Blaualgen (Oscillatorien) ohne Kupfersalz-Zusatz.

Kupfer-Laktophenol kann mit Formalin oder Pfeiffers Gemisch kombiniert werden (Eckert). Mit einem Gemisch von 20 ml 4%igen Formalin und 2—5 ml Kupfer-Laktophenol können wir alle Algen fixieren und erreichen damit auch eine Erhaltung der grünen Algenfarbe. Oder wir fixieren die Algen zuerst 3—6 Stunden in Pfeiffers Gemisch, waschen dann kurz in destilliertem Wasser aus und fixieren dann noch 24 Stunden in Kupfer-Laktophenol nach (Blaualgen 30—60 Minuten). Einschluß wie bei Kupfer-Laktophenol angegeben.

Chromessigsäure (nach Flemming)

Chromessigsäure ist eines der ältesten und besten Fixiermittel für Algen, wenn zur besseren Differenzierung von Kern, Chromatophoren, Pyrenoiden und Zellwand gefärbt werden soll. Chromessigsäure fixiert alle Algen — außer Flagellaten — sehr gut. Das Chlorophyll wird gebleicht, Schleimhüllen, Gallerten und Kalkeinlagerungen werden aufgelöst.

Zusammensetzung: 70 ml 1%ige Chromsäure + 5 ml Eisessig + 90 ml destilliertes Wasser. Das Gemisch ist lange haltbar. Die

Bild 2: Die Zieralge *Zygnema*, 415fach vergrößert. Fixiert mit Chromessigsäure, gefärbt mit Hämalaun-Echtgrün-Eisentinktion, eingedeckt in Venetianisches Terpentin. Hergestellt 1931.

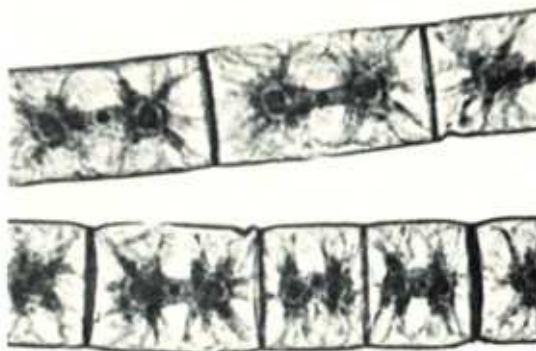




Bild 3: Die Grünalge *Enteromorpha intestinalis*, 285fach vergrößert. Fundort Plöner See. Fixierung mit Chromessigsäure, Färbung Goldimprägnation-Viridin, eingedeckt in Euparal.

Chromsäure halten wir in 5%iger Lösung in braunen Flaschen vorrätig, da sie stark hygroskopisch ist.

Anwendung: Wir wenden Chromessigsäure in ungefähr 100facher Menge des konzentrierten Algenmaterials an. Fixierdauer 6–24 Stunden. Eine optimale Fixierung ist erreicht, wenn die Algen entfärbt sind und weiß oder gelblich aussehen. Nach der Fixierung müssen wir sie gründlich in fließendem oder oft gewechseltem Wasser auswaschen, bis das Wasser vollkommen farblos bleibt.

Aufbewahrung: Je nach Widerstandsfähigkeit der Algen in 20–30%igem Äthylalkohol (oder Isopropylalkohol) oder in 10%igem Glycerin mit Karbolsäure-Zusatz (5 ml 10%iges Glycerin + 1–2 Tropfen Karbolsäure = 1%ige wäßrige Lösung von Phenol).

Färbungen: Für alle später beschriebenen Färbungen gut geeignet.

Geeignet: Für alle Algenklassen ohne Flagellaten.

Bleibt bei einigen Algenarten die Bleichung der Chromatophoren aus oder tritt dafür eine Bräunung ein, so fixieren wir diese in 0,5–1%iger Chromsäure (ohne Essigsäure-Zusatz) 6–12 Stunden, für Blaualgen genügen meist 1–2–3 Stunden. Weitere Behandlung wie bei Chromessigsäure-Fixierung.

Geeignet: Für alle Blaualgen, Jochalgen, Rotalgen. Nach Chromsäure-Fixierung färbt Azokarmin besonders kräftig.

Zinkchlorid-Eisessig nach Juel

Dieses Fixiergemisch ist nach Juel für plasmareiche, junge botanische Gewebe bestimmt. In abgeänderter Zusammensetzung können wir es auch für Algen verwenden. Es erhält die grüne Algenfarbe naturgetreu, bei vielen Blaualgen schlägt der Farbton in reines Grün um, der orangefarbene Protoplast von *Haematococcus pluvialis* bleibt unverändert. Dieses Fixiermittel kann aber nicht allgemein verwendet werden, da außer bei Blaualgen Formveränderungen eintreten können. Es ist aber vorzüglich zum Nachfixieren von mit Chromessigsäure vorfixierten Algen geeignet. So bekommt man bei Algen, die bei alleiniger Chromsäurefixierung oft schlecht auf Hämatoxylinfärbungen ansprechen, einen kräftigen Farbton. Auch bei Viridin und Kernechtrot ist so oft ein tieferer Farbton zu erreichen. Eckert empfiehlt die sehr gute Doppelfixierung mit Chrom-Sublimat-Eisessig, die aber durch die notwendige Jodierung und Jodentfernung mehr Arbeitsgänge erfordert; Sublimat ist außerdem ein sehr starkes Gift.

Anwendung:

a. Fixierung zur Erhaltung der natürlichen Farben.

Wir fixieren Blaualgen in dem Gemisch 1–6 Stunden (meist genügen 1–2 Stunden), waschen gründlich in Wasser aus und überführen aus dem destillierten Wasser in Glycerin.

Geeignet: Für Blaualgen und widerstandsfähige einzellige Grünalgen.

Einschluß: Glycerin, Kupfer-Laktophenol.

b. Nachfixieren der Algen.

Die mit Chromessigsäure oder Chromsäure bis zur vollständigen Bleichung vorfixierten und gut ausgewaschenen Algen fixieren wir anschließend 12–24 Stunden in Juel, darauf wird wieder gründlich in Wasser ausgewaschen und anschließend gefärbt.

Diese Chromsäure-Zinkchlorid-Eisessig-Fixierung bezeichne ich in den folgenden Ausführungen stets als Doppelfixierung.

Algen, die längere Zeit nach der Chromsäure-Fixierung aufbewahrt wurden und dadurch die Färbbarkeit zum Teil eingebüßt haben, erlangen sie weitgehend wieder, wenn wir sie in Zinkchlorid-Eisessig 3–6 Stunden vorbehandeln und nach dem Auswaschen sofort die Färbung anschließen.

Zusammensetzung (modifiziert): 100 ml destilliertes Wasser + 2 g Zinkchlorid + 1 bis

2 ml Eisessig (möglichst vor Gebrauch zusetzen). Zinkchlorid ist stark wasseranziehend. Wir halten es am besten als Lösung vorrätig (250 ml destilliertes Wasser und 100 g Zinkchlorid, 1 g Zinkchlorid entspricht dann 2,5 ml Lösung). Zinkchlorid wirkt auf der Haut ätzend, läßt sich aber leicht abwaschen. Vorsicht ist bei Mund und Augen geboten!

Formalin- und jodhaltige Fixiermittel

Wir können für Algen, die mit Erhaltung der natürlichen Farben präpariert werden sollen, die ganze Behandlung auf einen Arbeitsgang verkürzen, wenn wir leicht verdunstende Fixiermittel anwenden. Dieses Verfahren kann auch dann empfohlen werden, wenn Algen nur in einem oder nur in wenigen Exemplaren zur Verfügung stehen und so bei mehreren Arbeitsgängen vermutlich verloren gingen. Wir können in diesem Fall die ganze Präparation auf einem Deckglas vornehmen. Zu solchen Fixiermitteln gehören Formalin und Jod. Wir setzen sie einer 10%igen Glycerinlösung zu, legen die Algen hinein und lassen einige Stunden einwirken. Dann dickt man die Glycerinlösung in gelinder Wärme staubgeschützt ein und zuletzt liegen die Algen fixiert in reinem Glycerin. Formalin oder Jod verflüchtigen sich beim Eindicken.

Fixierlösungen:

- I. 90 ml 10%ige Glycerinlösung + 5–10 ml 40%iges Formalin;
- II. 90 ml 10%ige Glycerinlösung + 5 ml 40%iges Formalin + 1 ml Kupfer-Laktophenol;
- III. 10%ige Glycerinlösung + Lugolsche Lösung (oder Jodtinktur) bis zur hellen Gelbfärbung (frisch bereiten);
- IV. 40%iger Äthylalkohol und Lugolsche Lösung (oder Jodtinktur) bis zur hellen Gelbfärbung (frisch bereiten).

Anwendung: I, II, III: Man bringt die Algen in die Fixierlösung, läßt ungefähr 3–6 Stunden einwirken und dickt dann in mäßiger Wärme (lauwarm) das Glycerin ein, bis die Algen in reinem oder 80%igem Glycerin liegen.

Geeignet: I und II für Blaualgen und einzellige, widerstandsfähige Grünalgen (z. B. *Pleurococcus*, *Scenedesmus*, *Coelastrum*). III besonders für Blaualgen.

IV. Diese Zusammensetzung ist für Kieselalgen bestimmt, die man darin 1–2 Stunden fixiert und dann mit destilliertem Wasser auswäscht. Nach den Alkoholstufen bis zur völligen Entfärbung können die Diatomeen mit Hämatoxylin (Delafield, Mayer) gefärbt werden.

Bemerkung: Die natürliche Algenfarbe wird durch die Jodfixierung sehr gut erhalten. Das Blaugrün der Blaualgen schlägt oft in reines Grün um. Wir können dem Jod-Glyceringemisch III eine Spur Viridinlösung (nur bis zum angedeuteten Grün) begeben, die im fertigen Präparat eine langsame Färbung bewirkt (nach Justus Müller). Für diese Fixiergemische dürfen wir nur chemisch reinstes und säurefreies Glycerin verwenden.

Fixiertechnik

Algen sollen möglichst im Anschluß an die Entnahme aus ihrem Standort Wasser — also lebendfrisch — fixiert werden. Ist das nicht möglich, so können wir dem Wasser mit den Algen wenige Tropfen Formalin zugeben (mitentnommene Tiere nach Möglichkeit vorher zurückgießen), um sie in der warmen Jahreszeit vor Zersetzung zu bewahren.

Das Fixiermittel soll das 50- bis 100fache der Algenmenge betragen oder entsprechend öfters durch frisches ersetzt werden. Die Algen sollen ohne viel Wasser in die Fixierflüssigkeit kommen. Algenwatten oder leicht faßbare Algen übertragen wir mit Glasstab oder Pinzette, Planktonalgen oder Wasserblüten geben wir in ein schmales, hohes Gefäß und töten sie mit wenigen Tropfen Formalin ab. Sind sie zu Boden gesunken, gießen wir das überstehende Wasser ab, ohne den Bodensatz aufzuwirbeln und füllen das Glas mit Fixiermittel auf. Auch mit der Pipette können wir den Algenrest absaugen und ins Fixiermittel einbringen. Schneller lassen sich solche Algen mit der Zentrifuge konzentrieren.

Bild 4: Die Jochalge *Spirogyra setiformis*, 360fach vergrößert. Bei der Aufnahme wurde auf den Zellkern eingestellt. Fixiert mit Chromessigsäure, gefärbt mit Hämalun-Viridin, eingedeckt in Caedax. Das Präparat entstand 1934.



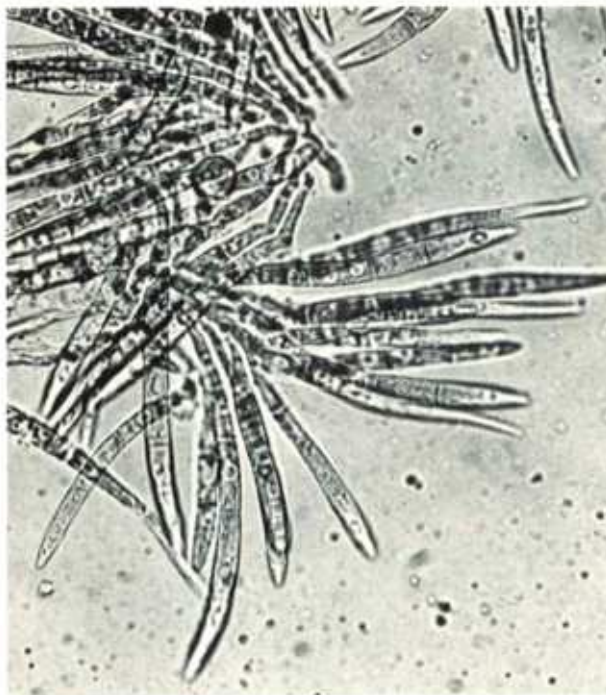


Bild 5: *Ankistrodesmus (Raphidium) fulcatus*, 545fach vergrößert. Fixiert mit Pfeiffers Gemisch, gefärbt mit Viridin, eingedeckt in Glycerin. Hergestellt 1934.

Waschen

Das Waschen nach dem Fixieren bezweckt die vollständige Entfernung des Fixiermittels aus den Algen. Das ist die Vorbedingung für die nachfolgende Färbung und für einen haltbaren Einschluss und muß deshalb gründlich vorgenommen werden. Ausgewaschen wird mit oft gewechseltem oder weit besser mit fließendem Wasser.

Waschen von einzelligen Algen und Planktonalgen

Von den fixierten und zu Boden gesunkenen Algen gießen wir die überstehende Fixierflüssigkeit vorsichtig bis auf die Algen ab, füllen das Glas mit abgekochtem, kaltem, luftfreiem Wasser auf. Das geschlossene Gefäß kippen wir einige Male und lassen es dann ruhig stehen, bis sich alle Algen wieder abgesetzt haben. Ein Tropfen eines Entspanners (z. B. Pril) beschleunigt das. Der ganze Waschvorgang wird 8–10mal wiederholt. Wir verwenden dazu ein Glas von 15–20 mm Weite und 10–15 cm Länge. Durch kurzes, ruckartiges Hin- und Herdrehen des Glases lösen sich die eventuell an der Wand haftenden Algen ab und sinken zu Boden. Schneller geht es mit der Zentrifuge.

Waschen von fadenförmigen Algen

Leicht faßbare Algen können wir mit dem Glasstab in öfter (10mal) gewechseltes Wasser übertragen. Weit besser ist jedoch für solche Arten die Wässerung mit fließendem Wasser, wozu wir uns einer einfachen Vorrichtung nach dem Siebeimerprinzip bedienen, die gründlich, zeitsparend und verlustfrei wässert.

Siebröhrchen: Wir überspannen die Öffnung eines beiderseits offenen Glas- oder durchsichtigen Kunststoffrohres (etwa 20 mm breit und 10 cm lang) ganz straff mit einem Stück feinmaschiger Seidengaze. Die Stoffscheibe soll so groß sein, daß sie etwa 3 cm über den umspannten Rand hochreicht. Die oberen 2 cm umwickeln wir fest mit weißem, starken Nähzwirn. Den Abschluß bilden zwei Lagen Tesaband, das zur Hälfte auch am Glas anliegt. Perlongewebe ist für unsere Zwecke weniger günstig, da sich die Algen oft in den Maschen verfilzen und festgehalten werden. Von diesen Siebröhrchen stellen wir uns mehrere her, auch einige kleinere (8–10 mm Weite und 5–6 cm Länge), die zum Färben der Algen gute Dienste leisten.

Zum Wässern stellen wir die Siebröhrchen in ein um 3 cm kürzeres Glasgefäß mit weiter Öffnung ein und gießen die Algen mit der Fixierflüssigkeit in das Siebrohr. Die durchgelaufene Flüssigkeit wird weggegossen. Dann füllen wir das größere Glasgefäß mit Wasser, heben und senken die Siebröhrchen darin einige Male und gießen auch dieses erste Waschwasser wieder weg. Unter dem Wasserhahn lassen wir Wasser in feinem Strahl oder rascher Tropfenfolge in das Rohr einfließen. Das Wasser spült nun die Algen durch und läuft dann über den Rand des niedrigen Gefäßes ab. Die Algen werden durch das eintropfende Frischwasser dauernd bewegt und gründlich gewässert. Je nach Tropfenfolge genügen 3–6 Stunden zur Wässerung. Gereinigt wird das Siebrohr nach jeder Benutzung, indem wir von außen einen starken Wasserstrahl auf das Sieb laufen lassen. Färbungen werden am kräftigsten, wenn sie anschließend an die Wässerung vorgenommen werden.

Aufbewahrung von Algen

Die Aufbewahrung von fixierten Algen ist möglich, sollte aber auf möglichst kurze Zeit beschränkt bleiben, da die Färbbarkeit bei längerer Aufbewahrung leidet. Durch Zinkchlorid-Nachfixierung kann sie wieder verbessert werden.

Aufbewahrung ungefärbter Algen

Müssen wir die weitere Verarbeitung der Algen nach der Fixierung und Wässerung

auf einen späteren Zeitpunkt verschieben, dann sollten wir die Algen in einem Mittel aufbewahren, das Form und Färbbarkeit möglichst schonend erhält. Für kürzere Zeit (1–2 Monate) hat sich Glycerin mit schimmelpilzverhindernden Zusätzen bewährt. *Thymol-Glycerin* (5 ml 10%iges Glycerin + 1 Tropfen einer alkoholisch-gesättigten Thymollösung). Wir verwenden diese Lösung für Algen, die ungefärbt eingeschlossen werden sollen.

Karbol-Glycerin (10 ml 10%iges Glycerin + 1 Tropfen Karbolsäure). Dieses Mittel ist für Algen geeignet, die später gefärbt werden sollen. Die Karbolsäure muß vor der Färbung ausgewaschen werden.

Äthylalkohol. Für eine Aufbewahrung über längere Zeit können wir reinen, 10–30%igen Äthylalkohol verwenden, für widerstandsfähige Algen wird auch eine Konzentration von 40–60% angegeben.

Kupfer-Laktophenol. Für einen nachfolgenden, ungefärbten Einschuß kann zur Aufbewahrung auch Kupfer-Laktophenol verwendet werden, wenn es alle drei bis vier Wochen erneuert wird.

Pfeiffers Gemisch. Algen halten sich in diesem Gemisch längere Zeit, wenn es ebenfalls öfter gewechselt wird und ein späterer Einschuß in Naturfarben beabsichtigt ist. Mit der Zeit kann aber eine Bräunung eintreten. Bestimmte Färbungen (Eisentinktionen) sind dann noch möglich.

Verfasser: Dr. Rudolf Lindauer, 8430 Neumarkt, Schindlerstraße 6.

Aufbewahrung gefärbter Algen

Bereits gefärbte Algen, die für einen späteren Harzeinschuß geeignet sind oder solche, die gefärbt übriggeblieben sind, lassen sich einwandfrei praktisch unbegrenzt lange aufheben, wenn wir sie nach Überführen in das 10- bis 20%ige Euparal-Isopropylalkohol-Gemisch in ein ganz kleines Fläschchen mit weitem Hals und 1–2 ml Inhalt geben und im Exsikkator das Lösungsmittel vollständig verdunsten lassen. Die Algen liegen dann am Boden, in Harz eingeschlossen. Wollen wir wieder Präparate anfertigen, dann gießen wir ungefähr die 3- bis 4fache Menge Isopropylalkohol zu und warten bei verschlossenem Gefäß, bis die Lösung eine dünne Einbettungskonsistenz erreicht hat. In mäßiger Wärme dauert es nicht allzulange. Umrühren dürfen wir nicht, denn dadurch werden Fadenalgen zerstört.

Bemerkungen: Man vermeide längeres Liegen der Algen in Formalin, sowie auch eine Überschreitung der angegebenen Fixierzeiten.

Zur Bestimmung von Algen sind genaue Kenntnisse der Größenverhältnisse (Länge, Breite, Durchmesser, Stärke der Scheiden) notwendig. Auch nach schonender Fixierung, aber besonders nach der Überführung in Alkohol und Harze sind mehr oder weniger Veränderungen dieser Größen bedingt. Daher müssen wir Größenbestimmungen immer noch an der lebenden Alge vornehmen.

Kleine Mitteilung

Van Gieson-Methode mit Eisen-Gallein

Weigerts Eisenhämatoxylin war zusammen mit Van Giesons Pikrofuchsin seit langem die Methode der Wahl zur Darstellung kollagener Fasern. Als Ersatz für das zumindest in den USA knapp werdende Hämatoxylin bietet sich Gallein an.

Stammlösung: A. 1 g Gallein wird in 20 ccm Glykol gelöst, 80 ccm absoluten Alkohols werden hinzugefügt und die Lösung wird gut durchgeschüttelt. B. 4 g Eisenalaun ($\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$) werden in 1,6 bis 2,0 ccm konzentrierter Salzsäure gelöst und mit destilliertem Wasser auf 100 ccm aufgefüllt (pH-Wert 1,4–1,6). A und B werden gemischt, die Lösung färbt sich blauschwarz.

Zur Färbung werden Paraffinschnitte wie üblich über Xylol und die absteigende Alkoholreihe in Wasser gestellt. 1. 20 Minuten in Eisengallein färben und anschließend in Wasser waschen. 2. 4–5 Minuten in Säurefuchsin (0,1 g), gesättigter wäßriger Pikrinsäure (100 ccm), konzentrierter Salzsäure (0,25 ccm) färben. 3. Über die aufstei-

gende Alkoholreihe entwässern und in 2mal gewechseltem 96%igem Alkohol differenzieren. 4. Weiterführen über absoluten Alkohol und Xylol und mit einem der üblichen Kunstharze eindecken.

Verminderter Salzsäuregehalt der Eisengalleinlösung führt zu einer intensiveren Anfärbung des ganzen Schnittes und verminderter Detailschärfe im Bereich der Zellkerne. Verringert man den Salzsäuregehalt auf den einen Kubikzentimeter des Weigertschen Rezepts, so färben sich Muskelgewebe und Cytoplasma stark genug an.

Eisengallein ist dagegen kein befriedigender Ersatz für Hämatoxylin bei der üblichen Hämalaun-Eosin-Methode, weil dann die zusätzliche Cytoplasmafärbung durch das Eosin stört, ebenso ungeeignet ist es bei der Papanicolaou-Ausstrichfärbung.

Lillie, E. D., Pizzolato, P., Donaldson, P. T.: Iron gallein in Van Gieson technics, replacing iron hematoxylin. *Stain Techn.* 48, 348–349 (1973).

Alexander Pareto

Dauerpräparate von Süßwasseralgen

II. Färbungen

Übersichtsfärbungen zeigen uns den allgemeinen Bau der Algen. Bei einigen Arten (*Spirogyra*, *Zygnema*) läßt sich damit auch gleichzeitig der Zellkern gut sichtbar machen. Für eine Sammlung von Algen-Dauerpräparaten kommen wir mit einfachen Färbungen aus, wenn es uns nur auf die morphologischen Merkmale der betreffenden Art ankommt.

Zur Sichtbarmachung des Feinbaus im Kern wenden wir eigene Kernfärbungen an. — Die Eisentinktionen nach Pfeiffer von Wellheim färben besonders die Zellwände an, aber auch Chromatophoren und Zellkern. Viele Algen besitzen Schleimhüllen und Gallerten, die im Hellfeld kaum sichtbar oder im fertigen Präparat nicht mehr vorhanden sind. Zur Sichtbarmachung dieser Außenhüllen werden spezielle Färbungen angewendet. Sehr lehrreich sind Gallertdarstellungen in Präparationsmethoden mit Dunkelfeldeffekt.

Bemerkungen zur Färbetechnik

Vor der Färbung müssen wir die Algen durch gründliches Waschen, zuletzt mit destilliertem Wasser, von dem Fixiermittel befreien, denn Reste davon beeinträchtigen jede Färbung. Auch zum Waschen nach der Färbung müssen wir immer zunächst destilliertes Wasser nehmen, bei Hämatoxylinen und Azokarmin ist das unbedingt notwendig. Algen können wir in kleinen, weithalsigen Glas- oder Kunststoff-Fläschchen (5–10 ml Inhalt) färben, geringe Mengen auch im Blockschälchen. Praktisch zum Färben und besonders zum nachfolgenden Auswaschen sind unsere Kunststoff-Siebeimer, die kleinen für Färbungen (5–10 mm Weite und 50–60 mm Länge), größere zum Wässern. Verwenden wir keine Siebelmerchen, so können wir beim Flüssigkeitswechsel Fadenalgen mit einem dünnen Glasstab von einer Flüssigkeit in die andere über-

tragen, oder den Wechsel durch Abgießen und Zugießen der Flüssigkeiten vornehmen. Kleine, einzellige Algen lassen wir absetzen oder zentrifugieren sie ab.

Da jedes Einschlußmittel gefärbte Algen mehr oder weniger stark aufhellt, färben wir sie sehr kräftig. Leicht überfärbt wirken sie im fertigen Präparat sehr kontrastreich.

Nach beendeter Färbung sollten wir die Algen nicht länger auswaschen, als zur Entfernung der restlichen Farbblösung notwendig erscheint. Auch längeres Liegen in destilliertem Wasser kann zum Verblässen der Farben führen. Nur die Goldimprägnierung ist in dieser Beziehung wenig empfindlich.

Die Tiefe des Farbtones können wir erst nach der Aufhellung im gewählten Einschlußmittel richtig beurteilen. Eine kleine Algenmenge — ein einziger Faden z.B. genügt — führen wir möglichst schnell bis ins Einschlußmittel durch, ohne Rücksicht auf eventuelle Schrumpfungen, denn wir wollen ja nur wissen, ob weiter gefärbt werden muß. Nicht nötig ist dieses Verfahren bei den Eisentinktionen und bei der Goldimprägnierung, da wir diese Färbungen nach Durchlaufen der einzelnen Arbeitsgänge nicht mehr verändern können. Nicht bei jeder Algenart gelingt jede Färbung gleich gut; manche sprechen oft auf eine Färbung überhaupt nicht an. Dann müssen wir eben eine andere wählen. Ein Vorversuch mit wenig Material schützt vor Enttäuschung.

Zur Selbsterstellung von Farbblösungen sind reinste Farbstoffe und Chemikalien und zur Lösung nur destilliertes Wasser bzw. reiner Äthylalkohol Grundbedingung zum Gelingen jeder Färbung.

Zwischen Fixierung und Färbung sollten wir die Algen nicht zu lange aufbewahren.

Der 1. Teil dieser Arbeit „Die Fixierung“ erschien in *Mikrokosmos* 64, S. 79–85, H. 3, 1975.

Bild 1: Die Blaualge *Microcystis aeruginosa* (Wasserblüte). Chromsäurefixierung, gefärbt mit Alizarinviridin, eingebettet in Euparal, 395fach vergrößert. Das Präparat entstand 1937.

Mit Zinkchlorid-Eisessig kann die Fixierung meist etwas aufgefrischt werden. Obwohl wir auch gefärbte Algen längere Zeit vor der Weiterverarbeitung (Einschluß) aufheben können, ist es doch ratsam, sie nach Anschluß an die Färbung einzuschließen, um ein stärkeres Ausblassen zu vermeiden. Eine Ausnahme ist die Aufbewahrung gefärbter Algen in Euparal, in dem sie praktisch unbegrenzt haltbar sind und jederzeit wieder zu Dauerpräparaten verarbeitet werden können.

Eine Überwachung des Färbefortschrittes ist bei allen Färbungen angezeigt, besonders aber bei solchen, die leicht zu Überfärbungen neigen (Hämatoxyline), die nicht oder nur umständlich wieder rückgängig gemacht werden können. Nach jeder Färbung müssen wir so lange auswaschen, bis keine Farbwolken mehr abgehen.

Viele Farblösungen (Becherfarben, Hämatoxyline u. a.) setzen im Laufe der Zeit feste Bestandteile ab, die zwar die Färbekraft der Lösung kaum beeinträchtigen, aber bei Mitnahme im fertigen Präparat ungemein stören. Deshalb sollten wir solche Lösungen vor Anwendung filtrieren. Wir falten dazu kleine Rundfilter ganz eng zusammen (spitze Tüte) und halten sie für diese wenigen Minuten des Filterns mit einer großen Büroklammer. Mit dieser kleinen Mehrarbeit sparen wir uns später manchen Ärger. — Selbstverständlich sollte es sein, immer nur mit gut gereinigten Gläsern und Geräten zu arbeiten. Die angegebenen Färbezeiten sind Anhaltspunkte, die von der optimalen Färbedauer abweichen können. Mit einer Probefärbung ermitteln wir daher die richtige Einwirkungszeit.

In Algenrasen oder Algenwandbelägen sind meist verschiedene Algenarten stark ineinandergewachsen und verfilzt. Vor der Fixierung müssen wir sie daher etwas zerteilen, noch mehr aber vor dem Färben, denn sonst können die Algen am Rand überfärbt und in der Mitte noch ungefärbt sein, weil der Farbstoff besonders bei gallertigen Lagern nicht bis dorthin vordringen konnte.

Färbungen für Übersichtspräparate

Alizarinviridin

Alizarinviridin gehört zu den einfachsten und verlässlichsten Färbungen für Algen. Wir erzielen mit diesem Farbstoff sehr gute Ergebnisse und in wässrigen und harzigen Einschlußmitteln eine ausgezeichnete Haltbarkeit.

Günstige Fixierung: Pfeiffer-Gemisch (3 bis 6 Stunden, Blaualgen 2—3 Stunden),



Chromsäure, Chromessigsäure, Doppelfixierung.

Anwendung: In der 1 : 1 bis 1 : 5 verdünnten Farblösung färben wir die Algen 2—6—24 Stunden. Überfärbungen sind auch nach tagelanger Einwirkung selten. Nach der Färbung wird in destilliertem Wasser ausgewaschen, solange Farbwolken abgehen. Nach Doppelfixierung wird die Färbung besonders kräftig.

Aufbewahrung: 10%iges Thymol- oder Karbolglyzerin, 20%iger Äthyl- oder Isopropylalkohol.

Ergebnis: Chloroplasten, Zellwand, Pyrenoiden, Kern mit Ausläufern (*Spirogyra*) abgestuft kräftig grün, der Kern ist am dunkelsten, Kernkörperchen fast schwarz. Gallerten bleiben ungefärbt.

Entwässerung: Über Glycerin, Isopropylalkohol, Äthylglykol.

Einschluß: In alle Harze, Glycerin, Glyzerin-gelatine. In Polyvinyl-laktophenol (PL) erfolgt in kurzer Zeit fortschreitende Entfärbung.

Geeignet: Für alle Algenklassen.

Farblösung: In 100 ml einer 5%igen Chromalaunlösung werden durch Kochen (5—10 Minuten) 1—2 g Alizarinviridin gelöst. Wir filtrieren nach Erkalten, nach 24 Stunden und nach 8 Tagen. Da sich auch später noch Farbstoff dauernd absetzen kann, sollten wir alle zwei Monate oder besser noch vor jeder Anwendung filtrieren (gilt für alle Becherfarben). **Anmerkung:** Wird Viridin zur Nachfärbung einer vorangegangenen Kernfärbung angewendet, so müssen wir



Bild 2: Die Jochalge *Spirogyra varians*. Fixiert in Pfeifferschem Gemisch, gefärbt mit Hämalaun-Viridin, eingebettet in Venetianisches Terpentin. Einstellung auf den Zellkern. 325fach vergrößert. Hergestellt 1933.

die Färbung mit sehr verdünnter Lösung überwachen.

Azokarmin

Azokarmin färbt kräftig rot und ist in Harzen ausgezeichnet haltbar. Es eignet sich gut für Übersichtsfärbungen.

Fixierung: Chromsäure (Blualgen 2–3 Stunden), Chromessigsäure, Doppelfixierung.

Anwendung: Die Algen kommen aus destilliertem Wasser in die Farblösung und werden 3–12 Stunden gefärbt. Überfärbungen sind auch nach Tagen selten. Die gefärbten Algen werden in zweimal gewechseltem destilliertem (!) Wasser kurz, aber gründlich abgespült und dann in destilliertes Wasser mit 1% Essigsäurezusatz übertragen. Der Farbton wird darin meist noch kräftiger.

Entwässerung: Azokarmin wird in wässrig verdünnten Zwischenmedien (Glycerin, Alkohol, Isopropylalkohol, Äthylglykol) ausgezogen, wenn ein Säurezusatz fehlt. Dagegen wird keine Farbe entzogen, wenn diese Medien wasserfrei sind. Wir wenden zur Entwässerung entweder das Glycerinverfahren an und setzen dem Glycerin 0,5–1% Essigsäure zu. Das konzentrierte Glycerin (ohne Essigsäure) wechseln wir dreimal, bevor wir die Algen einschließen oder weiterbehandeln. Oder aber wir übertragen die Algen in der steigenden Alkoholreihe und geben zu jeder Stufe ebenfalls 0,5–1% Essigsäure zu. Der konzentrierte Alkohol kann ohne Säurezusatz bleiben.

Dasselbe gilt für die Zwischenmedien Isopropylalkohol und Äthylglykol.

Einschluß: In alle Harze, konzentriertes Glycerin oder verdünntes Glycerin mit Essigsäurezusatz.

Ergebnis: Kerne dunkelrot, übriger Zellinhalt abgestuft heller rot. Blualgenzellen kräftig rot, Gallerten ungefärbt.

Geeignet: Für Blualgen, Rotalgen, einzellige Grünalgen.

Farblösung: 1 g Azokarmin B wird unter Erwärmen in 100 ml destilliertem Wasser gelöst. Nach Zugabe von 1 ml Eisessig nach Erkalten filtrieren. Haltbar.

Bei Blualgen geben die später beschriebenen Färbungen mit Hämatoxylinen und die Goldimprägnierung ebenfalls schöne und haltbare Übersichtsbilder.

Zytologische Färbungen

Bei den vorher beschriebenen Färbemethoden wird der allgemeine Aufbau der Algen dargestellt. Die folgenden Färbungen heben Teile der Algenzelle — Zellkern, Zellwand, Chloroplasten, Gallerthüllen — differenziert hervor. In kombinierten Methoden können verschieden gefärbte Organe in einem Präparat gezeigt werden.

Kernfärbungen

Karmin

Karminlösungen sind als Kernfarbstoffe auch für die Algenzelle geeignet, sie färben den Kern diffus.

Parakarmin und Karmalaun nach P. Mayer

Nach Chromessigsäure-Fixierung beträgt die Färbedauer einige Stunden (Vorversuch), der Kern färbt sich hell- bis dunkelrot, Zellwand und Chloroplasten werden rosa getönt. Kräftiger und differenzierter werden die Ergebnisse oft, wenn wir die Algen vor der Färbung 24 Stunden in einer 1%igen Eisenalaun-Lösung vorbehandeln und nachher wieder gut auswässern. Auch Pikrinsäuregemische (Gießener oder Bouin 24 Stunden) eignen sich für Karminfärbungen. Einschluß in alle Harze oder Glycerin.

Chromalaun-Karmin

Chromalaun-Karmin ergibt bei manchen Algen eine Mehrfachfärbung. Nach Chromessigsäure-Fixierung färben wir die Algen zwei bis mehrere Tage (keine Überfärbung), waschen in destilliertem Wasser kurz zweimal aus und schließen über Glycerin- oder Äthylglykol-Entwässerung in Euparal oder andere Harze ein.

Ergebnis: Zellkern dunkelblau, Chloroplasten blaßgrün, Zellwand graugrün. Blaualgen färben sich diffus leuchtend sattgrün. (Nicht jede Algenart färbt sich damit.)
Herstellung der Farblösung: 6 g Chromalaun werden in 100 ml destilliertem Wasser heiß gelöst und mit 1 g pulverisiertem Karmin 15 Minuten gekocht. Nach Erkalten filtrieren. Haltbar.

Kernschwarz

Mit Kernschwarz erzielen wir eine reine Kernfärbung ohne Mitfärbung anderer Zellelemente. Haltbar.

Fixierung: Chromessigsäure.

Anwendung: Die Algen kommen aus destilliertem Wasser in die Farblösung und werden unter mikroskopischer Kontrolle 1–48 Stunden gefärbt. Überfärbungen bleiben bestehen. Nach dem Färben wird mit destilliertem Wasser ausgewaschen.

Aufbewahrung: 10%iges Thymolglyzerin, 10%iger Isopropylalkohol.

Ergebnis: Bei vielen Algenarten gut differenzierte, schwarzblaue Kernbilder. Die Haltbarkeit ist gut. Die übrigen Zellorganellen und Gallerten bleiben ungefärbt.

Einschluß: In alle Harze, Glycerin, Glyzeringelatine.

Farblösung: Gebrauchsfertig zu beziehen (Chroma-Gesellschaft).

Kernechtrot

Kernechtrot färbt die Kerne stark und die Chromatophoren schwächer an. Die Anwendung ist einfach, die Färbung verläßlich und die Haltbarkeit gut.

Fixierung: Chromessigsäure, Doppelfixierung.

Anwendung: Die Algen kommen aus dem destillierten Wasser in die Farblösung und werden 1–3 Tage und länger gefärbt, bis der gewünschte Farbton erreicht ist. Überfärbungen kommen nicht vor. Auswaschen mit destilliertem Wasser.

Ergebnis: Kerne dunkelrot, Chloroplasten und Pyrenoide rosa, Zellwand schwach getönt. Blaualgenzellen kräftig rot, Gallerten ungefärbt.

Einschluß: Über Glycerin oder Isopropylalkohol oder Äthylglykol in alle Harze und Glycerin (nicht in PL).

Herstellung der Farblösung: 0,1 g Kernechtrot wird in 100 ml 5%iger Aluminiumsulfatlösung unter kurzem Aufkochen gelöst. Nach Erkalten filtrieren (siehe Bemerkung zu Becherfarben bei Alizarinviridin).

Hämatoxylin-Lösungen

Hämatoxylin gehört zu den ältesten und besten Kernfarbstoffen in der mikroskopischen Technik und liefert auch bei Algen gute Ergebnisse. Nach Chromsäurefixierung allein sprechen Hämatoxyline bei manchen Algen schlecht an; sie färben aber Algenkerne gut, wenn wir mit Sublimatgemischen (nach Eckert) nachfixieren. Wegen der Giftigkeit von Sublimat wurde die Nachfixierung mit Zinkchlorid-Eisessig nach Juel geprüft und brauchbar gefunden.

Hämatoxylin-Lösungen haben einiges gemeinsam: Die Färbedauer ist ganz unterschiedlich und hängt ab von der Zusammensetzung der Lösung, dem Reifungszustand und Alter, dem Verdünnungsgrad sowie vom Objekt selbst und der vorangegangenen Fixierung. Die angegebenen Färbezeiten sind Anhaltspunkte, die richtige Färbedauer ist durch Probefärbung festzustellen. Sie kann mehrere Minuten bis mehrere Stunden betragen. Klarere Bilder erhält man durch verdünnte Lösungen und längere Färbezeiten eher als mit konzentrierten Lösungen und kurzer Färbezeit. Die Algen bringen wir aus destilliertem Wasser in die Lösungen; nach der Färbung müssen sie immer zuerst mit destilliertem Wasser wieder gründlich gespült werden. In viel und öfter gewechseltem Leitungswasser werden sie so lange belassen, bis der rote Farbton in sattes Blau umschlägt (Bläuen). In Harzen wird die Farbe stark aufgehellt. Es ist daher angebracht, etwas



Bild 3: Die Grünalge *Prasiola cripa*, 500fach vergrößert. Fixierung Pfeiffersches Gemisch, gefärbt mit Alizarinviridin, eingebettet in Glycerin. Hergestellt 1932.



Bild 4: Die Blaualge *Cylindrospermum majus*, 475fach vergrößert. Fixiert nach Pfeiffer, ungefärbt eingedeckt in Glycerin. Das Präparat entstand 1937.

kräftig zu färben. Die Beurteilung kann immer erst im Harz erfolgen. Vorteilhaft ist, die Algen nach der Färbung sofort weiterzubehandeln, da sie leicht entfärbt werden, wenn die Aufbewahrungsflüssigkeit nicht vollkommen neutral ist. Hämatoxylinslösungen können wir bei allen kernhaltigen Algen verwenden, aber auch bei Blaualgen erreichen wir damit sehr klare Zellfärbungen. Wollen wir bei Algen, deren Kerne gefärbt wurden, die Chloroplasten gesondert färben, so darf diese Färbung nur sehr zart sein, besonders wenn die Kerne durch Chloroplasten überdeckt sind.

Hämalaun nach Paul Mayer

Fixierung: Doppelfixierung (Chrom-Zink), Chromessigsäure.

Anwendung: Die Algen werden in der nicht oder nur wenig verdünnten Farblösung 15 Minuten bis mehrere Stunden gefärbt, bis ein kräftiger Farbton erreicht ist. Bei notwendiger längerer Färbedauer ist halbstündige Überwachung, besonders anfangs, angezeigt. Überfärbung kann in 2%iger Kalialaunlösung differenziert werden. Nach der Färbung wird mehrmals kurz in destilliertem Wasser abgespült und dann in Leitungswasser gebläut (1–3 Stunden).

Aufbewahrung: 10%iges Thymoglycerin (möglichst vermeiden).

Ergebnis: Kernstrukturen dunkelblau bis blauschwarz, Chloroplasten und Zellwände hellblau bis schwach graublau. (Erst nach Aufhellung im Harz endgültige Beurteilung möglich.) Bei Blaualgen färben sich die vegetativen Zellen kräftig blau, Gallerten bleiben ungefärbt oder sind leicht getönt.

Einschluß: Euparal, alle neutralen Kunstharze, Caedax, säurefreies Glycerin. In PL Entfärbung, in Glyzeringelatine nur kurz haltbar.

Entwässerung: Über Glycerin oder Isopropylalkohol oder Äthylalkohol.

Geeignet: Kernhaltige Algen, Blaualgen.

Farblösung: Bezug der gebrauchsfertigen Lösung oder besser Selbstherstellung: Man löst 1 g Hämatoxilin in 1000 ml destilliertem Wasser, gibt dann genau 0,2 g Natriumjodat (NaJO_3) und 50 g chemisch reines Kalialaun zu und läßt beide Salze sich unter mehrmaligem Umschütteln lösen, wobei die Lösung eine blauviolette Farbe annimmt. Dann fügt man 50 g Chloralhydrat und 1 g kristallisierte Zitronensäure zu; der Farbton schlägt nun in Rotviolett um. Vor Gebrauch filtrieren (nach Romeis).

Hämatoxilin nach Delafield

Hämatoxilin nach Delafield färbt rasch und kräftig und ist, verdünnt mit destilliertem Wasser (weinrot), anzuwenden. Die Färbung muß überwacht werden, Überfärbungen sind zu vermeiden. (Differenzierung mit 0,1%iger HCl-Lösung oder 1%iger Alaunlösung.) Wir können auch mit stark verdünnten Lösungen (1 : 50 bis 1 : 100) einige Stunden färben.

Anwendung, Weiterbehandlung, Ergebnisse wie bei Hämalaun; nach der Färbung oder Differenzierung ist mit destilliertem Wasser abzuspuhlen und anschließend zu bläuen.

Farblösung nach Delafield: Bezug der gebrauchsfertigen Lösung, besser Selbstherstellung. Man löst 4 g Hämatoxilin in 25 ml absoluten Alkohol und setzt diese Lösung zu 400 ml einer gesättigten wäßrigen Lösung von Ammoniakalaun (40 g Ammoniakalaun auf 400 ml destilliertes Wasser). Nach drei bis vier Tagen, während derer man die Flüssigkeit offen und dem Licht ausgesetzt stehen läßt, filtriert man und gießt je 100 ml Glycerin und Methylalkohol zu. Nach einigen Tagen wird abermals filtriert (nach Romeis). Die Lösung ist gut haltbar und färbt mit fortschreitender Reifung immer stärker. Gebrauchte Lösungen können rückfiltriert werden.

Eisenhämatoxilin nach Hansen

Mit diesem Eisenhämatoxilin (Eisentrioxihämatein) färben sich die Kerne rein

schwarz, Chromatophoren und Zellwände werden schwach grau mitgefärbt. Wollen wir eine reine Kernfärbung, so geben wir zu zwei Teilen der Farblösung noch ein Teil einer 1%igen Schwefelsäure (nach Buxbaum).

Fixierung: Doppelfixierung, Pfeiffer.

Anwendung: Die Färbedauer beträgt nur 3–10 Minuten. Auch hier können wir mit verdünnten Lösungen länger färben. Überfärbungen treten oft sehr rasch ein, deshalb ist vorherige Probefärbung angezeigt (Differenzierung mit 0,5%iger Essigsäure). Weiterbehandlung wie bei Hämalan.

Ergebnis: Kerne rein schwarz, Chromatophoren und Zellwände je nach Farbmischung schwach getönt oder ungefärbt.

Farblösung: Bezug der gebrauchsfertigen Lösung. Die Lösung ist dunkelbraun, ein grüner Ton zeigt verminderte Färbekraft an.

Bemerkung: Besonders geeignet ist diese Kernfärbung zur zahlenmäßigen Feststellung der Kerne bei Vielkernigkeit in Verbindung mit Chrysoidin-Nachfärbung.

Nach jeder Differenzierung von Hämatoxylinfärbungen müssen wir gründlich mit destilliertem Wasser waschen und besonders gründlich bläuen, eventuell mit Zugabe von wenigen Tropfen Ammoniaklösung (Salmiakgeist), denn schon geringe Säurespuren zerstören die Färbung.

Wir können bei Algen auch Hämatoxylinfärbungen anderer Zusammensetzung versuchen. Hier wurden drei beschrieben, die selten einmal versagen und in ihrer Anwendung unkompliziert sind.

Verfasser: Dr. Rudolf Lindauer, 843 Neumarkt, Schindlerstraße 6.

Claus Meier-Brook

Mikropräparation kleiner Schnecken

Wer sich ernsthaft um die Identifizierung von wirbellosen Tieren bemüht, gelangt bald an eine Grenze, wo äußere Merkmale allein nicht mehr ausreichen, um zu unzweifelhaften Ergebnissen zu kommen. Das gilt besonders auch für Schnecken, die zu meist ihre Benennung zu Zeiten erfahren haben, da man sich mit der Beschreibung von Gehäusemerkmalen und allenfalls noch der Radula begnügte. Das Studium der meist viel weniger variablen Organe des Weichkörpers hat in vielen Fällen zu beträchtlich veränderter Abgrenzung von Taxa geführt, und die Zweifel, die oft beim Bestimmen anhand von Gehäusen bestehen bleiben, lassen sich meist durch anatomische Untersuchungen ausräumen. Soweit es sich um Schnecken im Größenbereich von Zentimetern handelt, bietet das Präparieren zum Studium anatomischer Merkmale keine großen Schwierigkeiten, wenn auch der Erfolg sich nicht ganz ohne Übung einstellt. Die Zahl der Arten im Millimeter-Bereich jedoch ist erheblich größer, und gerade die Problemkinder der Taxonomen sind hier versammelt, wie die kleinen Tellerschnecken (Familie der Planorbiden) und die kiemenatmenden Hydrobiiden.

Die Scheu, sich an die Präparation solcher

Schnecken zu machen, hat nun manchen bewogen, einfach die ganzen Tiere — ohne Gehäuse natürlich — in Paraffin einzubetten und in Schnitte zu zerlegen, um daraus die Form und Lage der Organe zueinander zu rekonstruieren. Fast jeder solcher Versuch scheitert kläglich: erstens braucht man schon sehr gute Kenntnisse der Histologie in den betreffenden Gruppen, um im Präparat die gesuchten Organe zu erkennen, und zweitens ändert sich bei Weichtieren die relative Lage einzelner Organe stark mit dem Grad der Streckung oder Kontraktion. Selbst gute räumliche Vorstellungskraft bewahrt nicht davor, daß man seine Hoffnungen bald zu Grabe trägt. Also lieber gleich mit eigenen Augen die anatomischen Merkmale studieren, zumal die Kleinheit einen unschätzbaren Vorteil mit sich bringt: die Möglichkeit, die Organe am intakten Tier nach Transparentmachen zu studieren. Hierzu und zum Sezieren werden im folgenden Wege beschrieben, die sich in langjähriger Beschäftigung bewährt haben. Beginnen sollte man, wie überall, mit einer Art, von der man genügend Material hat.

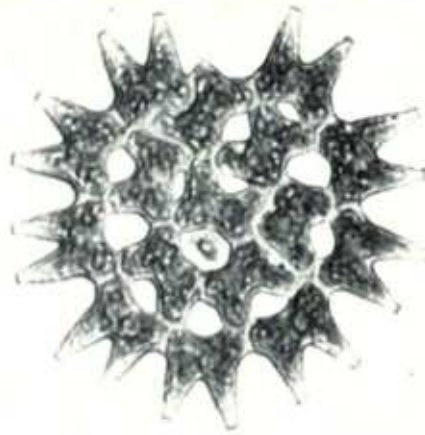
Dem Fixieren der Schnecken sollte tunlichst ein Betäuben vorangehen, da direkt in

Tafel 2: Die Grünalge *Pediastrum*

1. *Pediastrum tetras* (Ehrenberg).
2. *Pediastrum rotula* (Kützting).
3. *Pediastrum granulatum* (Kützting).
4. *Pediastrum octonum* (Haeckel).
5. *Pediastrum cruciatum* (Haeckel).
6. *Pediastrum selenaeae* (Kützting).
7. *Pediastrum pertusum* (Kützting).
8. *Pediastrum elegans* (Haeckel).
9. *Pediastrum lunatum* (Haeckel).
10. *Pediastrum furcatum* (Haeckel).
11. *Pediastrum Braunii* (Haeckel).
12. *Pediastrum ellipticum* (Ehrenberg).
13. *Pediastrum Darwinii* (Haeckel).
14. *Pediastrum trochiscus* (Haeckel).
15. *Pediastrum solare* (Haeckel).

Bild 2: Lebendaufnahme der Grünalge *Pediastrum duplex*, 300 : 1.

Verfasser: Dr. R. Zingg-Schuler, Lehenmattstraße 242, CH-4052 Basel.



Winke fürs Labor

Rudolf Lindauer

Dauerpräparate von Süßwasseralgen

III. Färbungen

Chloroplasten- und Zellwand-Färbung

Chrysoidin (Buxbaum 1951)

Chrysoidin färbt Chloroplasten und Zellwand schön goldgelb. Sie bleiben dadurch bei vielen Algen nach der Aufhellung im Einschlussmittel durchscheinend, und die darunter liegenden Kerne sind sichtbar. Die Anwendung ist einfach, die Haltbarkeit gut.

Fixierung: Chromessigsäure, Pfeiffers Gemisch. Geht eine Kernfärbung voran, richtet sich die Fixierung nach dieser.

Anwendung: Wir färben die Algen in der Gebrauchslösung, bis die Chromatophoren dunkelgelb bis rötlich sind (oft nur wenige Minuten) und spülen dann in Wasser ab. In 20%igem Äthylalkohol können wir bis Goldgelb differenzieren und in Wasser oder Isopropylalkohol unterbrechen.

Entwässerung: Über Glycerin oder Isopro-

pylalkohol oder Äthylglykol (nicht in Äthylalkohol, entfärbt).

Einschluss: Euparal, Kunstharze, Glycerin, auch Polyvinylalkohol.

Geeignet: Für alle Algen.

Ergebnis: Chloroplasten und Zellwand leuchtend goldgelb. Blaualgenzellen färben sich klar und kräftig gelb.

Farblösung: *Chrysoidin* wird ca. 1%ig in warmem, destilliertem Wasser gelöst. Filtrieren. Gebrauchslösung: Verdünnen mit destilliertem Wasser, bis die Farblösung hellgelb ist.

Färbung von Gallerten (und Zellwand)

Viele Algen scheiden Gallerthüllen ab, die bei Hellfeldbeobachtung nur undeutlich oder gar nicht sichtbar sind. Wir erkennen sie oft bei starker Ablendung, bei bestimmten Beleuchtungsarten; sie können aber auch durch Färbung sichtbar gemacht werden.

Zum Fixieren von Algen, bei denen Gallert-hüllen dargestellt werden sollen, eignet

Der erste Teil dieser Arbeit „Die Fixierung“ erschien in *Mikrokosmos* 64, S. 79–85, H. 3, 1975; der zweite Teil „Färbung I“ in *Mikrokosmos* 64, S. 118 bis 123, H. 4, 1975.



Bild 1: Blaualge *Cylindrocapsa spec.* Belag von der Innenseite einer Gießkanne. Fixiert mit Chromsäure-Zinkchlorid. Färbung Azokarmin B, eingedeckt in Euparal. Vergr. 530fach.

Farblösung: Muzikarmin (in Substanz) 1%ig in 50%igem Äthylalkohol lösen; filtrieren. **Gebrauchslösung:** Verdünnen 1:5–10 mit destilliertem Wasser.

Bemerkung: Schöner sind die Präparate, wenn auch die Chloroplasten gefärbt werden (siehe Mehrfachfärbung).

Eisentinktionen nach Pfeiffer von Wellheim

Die Eisentinktionen wurden vom Altmeister für Algenfärbungen, Pfeiffer von Wellheim, beschrieben und sollten nicht in Vergessenheit geraten. Die Einlagerung von Eisenverbindungen in die Algenzelle hebt die Zellwand besonders hervor. Die Tinktionen gelingen unschwer und verlangen wenig Überwachung. Von Pfeiffer wird ein absichtliche Überfärbung und Differenzierung empfohlen.

Die Vorbehandlung ist bei allen Tinktionen die gleiche, die Überführung in gefärbte Verbindungen kann verschieden erfolgen.

Vorbehandlung:

Fixierung: Chromessigsäure, Pfeiffers Gemisch.

Ausführung: Man bringt die Algen zunächst bis in 95%igen Äthylalkohol und gibt dazu tropfenweise so viel von der Eisenchloridlösung, bis nach vorsichtigem Durchmischen eine hellgelbe Färbung eintritt. Nach 24 Stunden wäscht man die Algen mit 95%igem Äthylalkohol so lange und so oft — aber auch nicht länger —, bis der Alkohol kein Eisenchlorid mehr abgibt (zum evtl. Übertragen der Algen nur Glasstäbe benutzen, keine Metallgeräte).

Eisenstammlösung: Kaltgesättigte Lösung von chemisch reinstem Eisen-II-Chlorid in 96%igem Äthylalkohol.

Überführung in gefärbte Verbindungen:

1. Echtgrün-Tinktion

Aus dem 95%igen Äthylalkohol bringen wir die Algen in die Farblösung und setzen nach kurzer Zeit noch etwas Echtgrün-Lösung zu. Ist die gewünschte Farbtiefe erreicht (meist nach 3–6 Stunden), wird in reinem Äthylalkohol ausgewaschen.

Ergebnis: Zellwand, Chloroplast, Kerne abgestuft grün. Besonders deutlich sind die Konturen der Zellwand. Zellen der Blaualgen kräftig hellgrün.

Einschluß: Alle Harze, Glycerin, (kein Polyvinylalkohol).

Geeignet: Für alle Algen.

Echtgrün-Stammlösung: Echtgrün (Dinitro-

sich am besten das Pfeiffersche Gemisch, da es die Gallerthüllen nicht verändert. Auch 0,5%ige Chromsäurelösung mit einer kurzen Einwirkungszeit von 1–2 Stunden erhält Gallerthüllen meist gut. Festere Gallerten werden auch in Chromessigsäure nicht aufgelöst, wenn man sie nur kurz einwirken läßt.

Präparate von oft märchenhafter Schönheit erhalten wir durch Einschluß von gefärbten Algen in ein Gemisch von Glyzeringelatine und Nigrosin (Dunkelfeldeffekt).

Muzikarmin

Muzikarmin färbt Gallerten und Scheiden zart rot, Zellwände rot-violett.

Fixierung: Pfeiffers Gemisch 2 bis höchstens 5 Stunden. Bedingte Anwendung von Chromsäure und Chromessigsäure.

Anwendung: Wir übertragen die Algen aus destilliertem Wasser in die Farblösung und lassen 1–12 Stunden einwirken. Die Färbung muß überwacht werden, da auch Überfärbungen möglich sind. Nach dem Auswaschen in destilliertem Wasser kommen die Algen in 10%iges Glycerin.

Entwässerung: Über Glycerin, Isopropylalkohol, Äthylglykol.

Einschluß: Glycerin, Glyzeringelatine und über Glycerin-Isopropylalkohol in Harze. Im Harzeinschluß werden die Gallerten zart rosa.

Ergebnis: Gallerten und Schleime rosa bis karminrot, Zellwände rot-violett. Chloroplasten, Blaualgenzellen bei Fixierung mit Pfeifferschem Gemisch in ihrer natürlichen Farbe.

resorzin) in 90%igem Äthylalkohol bis zur Sättigung lösen. Es löst sich langsam, die Lösung wird braun (3 Tage). Gebrauchslösung: Ein Teil Stammlösung und 1–2 Teile 95%iger Äthylalkohol.

Bemerkungen: 1. Eine Spur Salzsäure zur Farblösung bewirkt einen rein grünen Farbton.

2. Entfärbt sich die Farblösung nach Einbringen der Algen, so muß etwas Stammlösung zugegeben werden.

3. Überfärbung mit 1%igem Salzsäure-Äthylalkohol differenzieren.

4. Verfilzte Algenrasen zerteilen und während der ganzen Behandlung öfter gut durchmischen, sonst unregelmäßige Färbung.

2. Gallein-Tinktion

Färbung wie bei Echtgrün.

Gallein-Stammlösung: Kalt gesättigt in 90%igem Äthylalkohol. Gebrauchslösung: 1 ml Gallein und 5–10 ml 90%igen Äthylalkohol. Färbedauer 10–24 Stunden. Gallein färbt leicht über und färbt sehr stark.

Ergebnis: Farbton graublau bis stahlblau.

Einschluß: Alle Harze.

3. Karminsäure-Tinktion

Die Färbung wird wie bei Echtgrün durchgeführt, nur verwenden wir hier überall 50%igen Äthylalkohol.

Eisenbeize: 10 ml 50%iger Äthylalkohol und 5 Tropfen Eisenchloridlösung.

Karminsäure: Gesättigt in 50%igem Äthylalkohol.

Zu den in 50%igen Äthylalkohol liegenden Algen gibt man einige Tropfen der Karminsäurelösung und färbt einige Stunden. Auswaschen in 50%igem Äthylalkohol.

Ergebnis: Abgestuft Grau bis Schwarz.

Echtgrün-Indulin-Tinktion

Wir färben die Algen zuerst mit Echtgrün und anschließend einige Minuten mit Indulin unter Umschwenken. Nach der Echtgrün-Färbung wird mit 80%igem Äthylalkohol ausgewaschen, ebenfalls nach der Indulin-Tinktion.

Ergebnis: Farbton blaugrün, Zellgrenzen werden kräftig (blau) hervorgehoben.

Einschluß: In alle Harze.

Indulin-Stammlösung: Indulin in 80%igem Äthylalkohol lösen bis undurchsichtig blau. Filtrieren. Gebrauchslösung: Verdünnen 1:1 mit 80%igem Äthylalkohol.

Gold-Imprägnierung (nach Eckert-Lindauer)

Das Prinzip der Einlage von metallischem Gold im Zellplasma wurde vor Jahren im Mikrokosmos von Nabias-Boušek an der Färbung von kleinen Medusen beschrieben. Ich versuchte diese Imprägnierung dann an Schnitten höherer Pilze, an Torfmoosblättern und Hydroidpolypen ebenfalls mit guten Ergebnissen. Auch bei Algen erzielt man damit schöne und sehr haltbare Färbungen von einem ansprechenden Rot- bzw. Blauviolett. Die Goldimprägnierung ist eine dankbare Algenfärbung. Sie ist in der Durchführung nicht läunisch und vollkommen problemlos. Bestimmte Fixiermittel sind nicht notwendig, sie haben aber einen Einfluß auf den Farbton. Die Färbung ist in allen Harzen, Glyzerin, Glyzeringelatine, Polyvinylalkohol und auch in Gelatinol gut haltbar. Mit anderen Färbungen kombiniert, ergeben sich instruktive Bilder. Bei Blaualgen erzielt man eine klare Konturenschärfe der Trichomzellen in den Gallertkapseln. Sehr schön ist die Färbung auch bei Zieralgen (mit Lichtgrün-Nachfärbung) und bei unseren Süßwasser-Rotalgen. — Das für die Reduktion des metallischen Goldes günstige grelle Sonnenlicht läßt sich auch durch diffuses Tageslicht mit längerer Einwirkung oder durch das gebündelte Licht einer Halogenlampe (Diaprojektor) ersetzen. Die Gold-Imprägnierung erfordert zwar

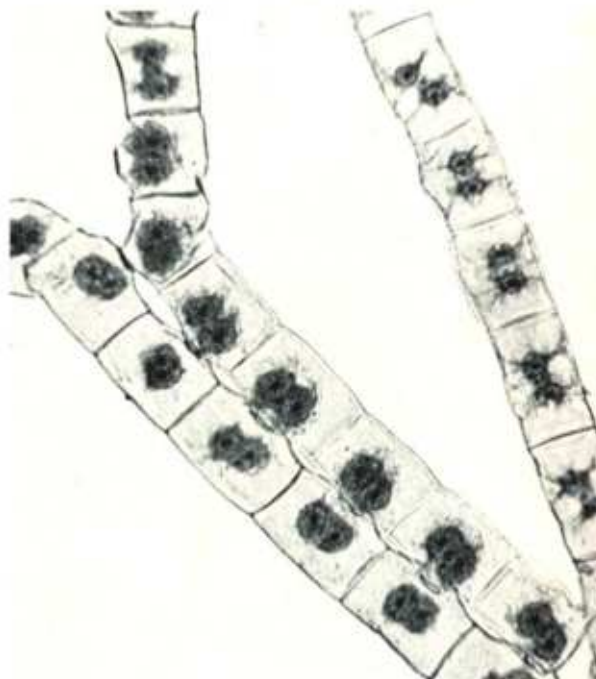


Bild 2: Zieralge *Zygnema stellinum*. Fixiert mit Chromessigsäure, Färbung Goldimprägnation-Lichtgrün, eingedeckt in Caedax. Das Präparat entstand 1936. Vergr. 360fach.

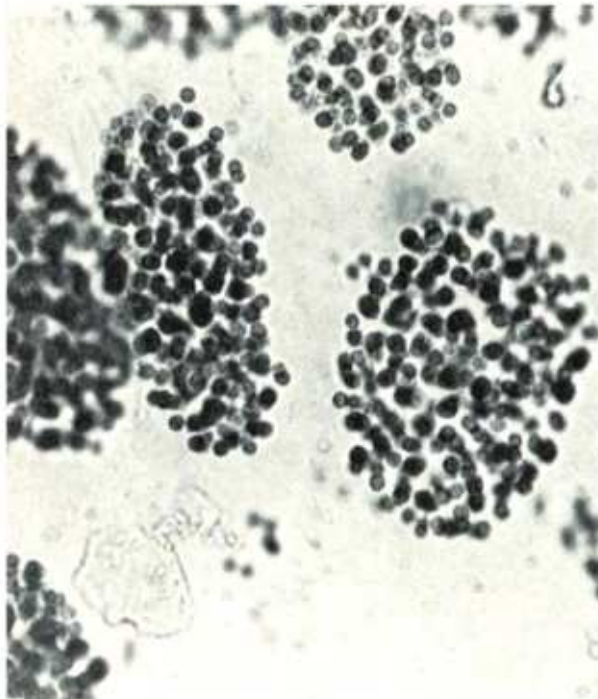


Bild 3: Blaualge *Aphanocapsa* spec. aus einer „Wasserblüte“: Massenv egetation von kirschgroßen, dunkel-blaugrünen, gallertig-festen Kugeln auf der Oberfläche eines kleinen, sonnigen Teiches. Fixiert mit Chromessigsäure, gefärbt mit Viridin, eingeschlossen in Euparal. Hergestellt 1936. Vergr. 470fach.

mehr Arbeitsgänge, aber sie gelingt immer und braucht keine Differenzierung.

Ausführung

Fixierung: Chromessigsäure (12–18 Stunden), Pfeiffers Gemisch, Doppelfixierung, Bouin.

1. Auswaschen mit destilliertem Wasser, bis das Fixiermittel restlos entfernt ist (möglichst nicht über 3 Stunden).
2. Destilliertes Wasser und dann in Jodlösung, 2–3 Stunden.
3. Auswaschen in destilliertem Wasser, bis die gelbe Farbe und der Jodgeruch vollständig verschwunden sind.
4. Goldchlorid-Lösung, 2 bis mehrere Stunden. Die Algen werden gelb.
5. Auswaschen mit destilliertem Wasser, 4–6mal wechseln.
6. Dann fügt man Resorzin-Lösung zu und stellt das Glas in grelles Sonnenlicht, bis die Algen schwarz-violett geworden sind (Sonne: Wenige Stunden, Tageslicht diffus: 6–12 Stunden, Halogenlicht: 1 bis 2 Stunden).
7. Auswaschen in destilliertem Wasser.
8. Fixiersalzlösung: 10 Minuten.
9. Auswaschen in Wasser, mehrmals wechseln.
10. Überführung in das Einschlußmittel, wenn Nachfärbung unterbleibt.

Die Einwirkung der Jod- und Goldsalze muß in völligem Dunkel geschehen (Punkt

2–5), wir stellen deshalb das Glas in eine Pappschachtel oder in eine verschlossene Blechbüchse. Bis Punkt 5 kann man auch Fläschchen aus dunklem Glas benutzen. Das Wechseln der Flüssigkeiten und das Auswaschen nehmen wir im Halbdunkel vor, grelles Sonnenlicht ist unbedingt zu vermeiden. Zum Übertragen der Algen nur Glasstäbe benutzen, nie Metallnadeln.

Ergebnis: Kernstrukturen schwarzviolett, Kernplasma rotviolett, Pyrenoide dunkelrot mit hellem Hof, Chloroplasten rot- bis blauviolett. Zellen der Blaualgen färben sich hell- bis dunkelviolett, die Gallerten rosa. Ganz leichte Viridin-Nachfärbung steigert die Kontraste. Der allgemeine Farbton kann je nach der Fixierung rot- bis blauviolett sein.

Entwässerung: Über Glycerin, Isopropylalkohol, Äthylglykol.

Einschluß: Alle Harze, Glycerin, Glycerin-gelatine, Polyvinylalkohol; auch in Gelatinol haltbar.

Geeignet: Für alle Algen.

Jod-Jodkalium: 200 ml destilliertes Wasser + 5 g Jodkalium + 0,5 g kristallisiertes Jod.

Goldchlorid-Lösung: 0,2%ig in destilliertem Wasser (braune Aufbewahrungsflasche).

Resorzin-Lösung: 2%ig in destilliertem Wasser.

Natriumthiosulfat (Fixiersalz): 5%ig in destilliertem Wasser. Von allen Salzen kann man sich stärkere Vorratslösungen ansetzen.

Bemerkungen: Destilliertes Wasser nehmen, wo es angeführt ist. Verfilzte Fadenalgen, Algen in dichtem Rasen, feste Algenüberzüge und Beläge so zerteilen, daß alle Flüssigkeiten gleichmäßig einwirken können. Das Licht muß von allen Seiten die Algen treffen, das Glas mit den Algen vorsichtig öfter schwenken und im Sonnenlicht öfter drehen. Die angegebenen Zeiten brauchen nicht genau eingehalten zu werden. Von der Dauer der Jod- und Goldbehandlung, sowie der Dauer der Lichteinwirkung zur Reduktion hängt die Tiefe der Färbung ab: je länger diese Einwirkungen, desto kräftiger und dunkler wird die Färbung. Bei zu langer Einwirkung kann sie ein undurchsichtiges Schwarzviolett erreichen, das nicht rückgängig gemacht werden kann. Die angegebenen Zeiten sind Durchschnittswerte, die verlängert werden können, wenn ein kräftiger Ton erwünscht ist. Für die Gold-Imprägnierung ist auch der Glycerineinschluß sehr gut geeignet.

Verfasser: Dr. Rudolf Lindauer, 843 Neumarkt, Schindlerstraße 6.

Dauerpräparate von Süßwasseralgen

IV. Mehrfachfärbungen

Von den bisher beschriebenen Färbungen können wir einige kombiniert anwenden, Zellkern, Zellwand, Chloroplasten und Gallerten sind dann unterschiedlich gefärbt. Doppel- oder Mehrfachfärbungen gelingen nicht bei jeder Algenart gut. Am instruktivsten sind Mehrfachfärbungen bei Arten, deren Zellkern groß ist und von Chloroplasten nicht verdeckt oder eingeschlossen wird. Oft erreicht man schon mit einem Farbstoff eine differenzierte Färbung; zum Beispiel färbt bei vielen Blaualgen Hämalaun nach Mayer die vegetativen Trichomzellen kräftig blau und vorhandene Gallerten zart rosa an.

Ich möchte hier einige mögliche Doppelfärbungen anführen und einige auch ausführlicher beschreiben. Der Arbeitsgang von Färbungen, die bereits eingehend behandelt wurden, ist hier nicht mehr näher erläutert.

Kern-Chromatophoren-Färbungen

Hämalaun-Viridin (Kernschwarz-Viridin)

Bei Algen, deren Kerne mit einem Hämatoxylin (oder Kernschwarz) gefärbt werden, können die Chromatophoren mit Viridin nachgefärbt werden. Die Fixierung richtet sich nach der vorangehenden Kernfärbung. Nach deren Durchführung wird kurz und gründlich gewässert und anschließend mit Viridin (1:5) nachgefärbt. Sind die Kerne von Chromatophoren verdeckt, dann färben wir mit verdünntem Viridin (1:10) nur so lange, daß die blaue Kernfärbung nicht zugedeckt wird.

Anstelle von Hämatoxylinfarben können wir die Kerne auch mit Kernschwarz färben. Der Arbeitsgang ist der gleiche.

Ergebnis: Kerne dunkelblau (bzw. schwarzblau), Chromatophoren und Pyrenoide abgestuft grün, Zellwand rotviolett. — Blaualgen: Vegetative Zellen blaugrün, Zellwand violett, Gallerten rosa getönt.

Einschluß: Alle Harze, Glycerin (säurefrei). **Bemerkung:** Mit Karminen oder Kernechtrot gefärbte Kerne werden durch eine nachfolgende Viridinfärbung vollkommen überdeckt.

Hämalaun-Viridin-Simultangemisch

Dieses Farbstoffgemisch des Handels ergibt bei Blaualgen mit Gallerten eine haltbare Färbung, während man bei anderen Algen nach einigen Monaten ein Ausblässen feststellen kann.

Fixierung: Chromessigsäure (nur 1–2 Stunden), Pfeiffers Gemisch. Nach gründlichem Auswaschen färben wir 15 Minuten bis mehrere Stunden (die Färbedauer ist sehr unterschiedlich, sie muß im Vorversuch festgestellt werden), spülen dann in destilliertem Wasser ab und bläuen in Leitungswasser, bis ein kräftiges Blau erreicht ist (eventuell mehrfacher Wasserwechsel).

Entwässern über Glycerin, Isopropylalkohol oder Äthylglykol.

Einschluß: In Harze oder Glycerin.

Ergebnis: Vegetative Zellen blaugrau bis blaugrün, Zellwand rotviolett, Gallerten rosa.

Herstellung der Farblösung: Wir lösen den Farbstoff 2%ig in heißem, destilliertem Wasser und filtrieren nach Erkalten. Verdünnt anwenden (1:5 bis 1:10) und Färbung überwachen.

Hämalaun-Safranin

Fixierung: Chromessigsäure, Doppelfixierung.

Wir färben die mit Hämalaun nach Mayer oder Hämatoxylin nach Delafield vorgefärbten Algen mit Safranin wenige Minu-

Der erste Teil dieser Arbeit „Die Fixierung“ erschien im Mikrokosmos 64, S. 79–85, H. 3, 1975; der zweite Teil „Färbung I“ im Mikrokosmos 64, S. 118–123, H. 4, 1975; der dritte Teil „Färbung II“ im Mikrokosmos 64, S. 151–155, H. 5, 1975.

Bild 1: Blaualge *Plectonema spec.* Fixierung Chromessigsäure, Färbung Goldimprägnierung-Viridin, Einschuß in Glycerin. Vergr. 510fach.

ten und spülen in destilliertem Wasser kurz ab.

Entwässerung über Glycerin oder Isopropylalkohol. In Glycerin wird wieder etwas Farbe ausgezogen, das muß man bei der Beurteilung der Färbedauer berücksichtigen.

Einschuß: Über Isopropylalkohol in Euparal und andere Harze. In Glycerin nur beschränkt haltbar.

Ergebnis: Kerne dunkelblau, übriger Zellinhalt rotviolett.

Farblösung: 2%ige Lösung von Safranin T in 50%igem Äthylalkohol. Gebrauchslösung: Verdünnung mit destilliertem Wasser 1:20.

Hämalaun-Erythrosin

Nach einer vorangegangenen Kernfärbung mit Hämalaun (oder Kernschwarz) können wir die Chromatophoren mit Erythrosin nachfärben. Wir bringen die Algen aus destilliertem Wasser in die Farblösung, färben einige Stunden und waschen mit destilliertem Wasser aus.

Entwässerung über Glycerin oder Isopropylalkohol.

Einschuß: In alle Harze.

Ergebnis: Kerne schwarzblau, Chromatophoren leuchtend rot, Pyrenoide dunkelrot.

Geeignet: Für Grün-, Joch-, Zieralgen u. a.

Farblösung: Stammlösung gesättigt in 70%igem warmem Äthylalkohol, filtrieren.

Gebrauchslösung: Verdünnt mit destilliertem Wasser 1:5 bis 1:10.

Hämalaun-Echtgrün

Fixierung: Chromessigsäure, Doppelfixierung.

Wir färben zuerst die Kerne mit Hämalaun nach Mayer oder Hämatoxylin nach Delafield, spülen in destilliertem Wasser ab und bläuen anschließend in Leitungswasser. Nach Zwischenschalten von destilliertem Wasser überführen wir die Algen über Glycerin oder Äthylalkoholstufen in 80%igen Äthylalkohol und schließen dann die Eisentinktion mit Echtgrün an. Auswaschen in reinem Isopropylalkohol und über Isopropylalkohol Einschuß in Euparal oder andere Harze.

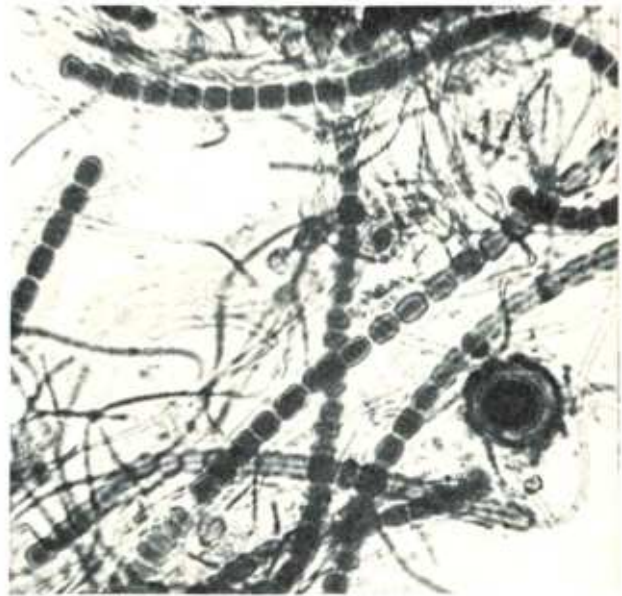
Ergebnis: Kerne dunkel- bis schwarzblau, Chromatophoren und Pyrenoide sattgrün, Zellwand hellgrün.

Geeignet: Grünalgen, Konjugaten.

Färbung von Gallerthüllen

Viridin-Mucikarmin

Diese Doppelfärbung ist für alle Blaualgen



angezeigt, die Gallerthüllen besitzen oder Schleimhüllen ausscheiden. Kontrastreicher wirkt noch die Färbung Goldimprägnierung-Viridin, die zwar gut gelingt, aber mehr Zeit beansprucht.

Fixierung: Pfeiffers Gemisch (2–6 Stunden), 0,5%ige Chromsäure, Chromessigsäure (2 Stunden), Doppelfixierung. Gallerten werden in Pfeifferschem Gemisch am besten erhalten.

Nach gründlichem Auswaschen färben wir kräftig mit Viridin, waschen wieder aus und färben dann mit Mucikarmin (1:10 verdünnt, einige Stunden). Diese Färbung muß überwacht werden.

Entwässern über Glycerin, Äthylalkohol, Isopropylalkohol.

Einschuß: Über Isopropylalkohol in Harze oder Glycerin.

Ergebnis: Vegetative Zellen grün, Gallerten rosa bis hellkarminrot, Zellwand dunkelviolett.

Hämalaun-Viridin-Mucikarmin

Die eben beschriebene schöne Doppelfärbung können wir auch bei anderen Algen anwenden, wenn wir sie um eine Kernfärbung mit Hämalaun erweitern und diese vor der Viridinfärbung vornehmen. Als Fixierung eignet sich dann Chromessigsäure oder Doppelfixierung besser.

Kombinationen mit Goldimprägnierung (nach Eckert-Lindauer)

Goldimprägnierung-Echtgrün

Wir nehmen zuerst die Färbung der Algen

mit Goldeinlagerung vor und überführen nach gründlichem Auswaschen in destilliertem Wasser in 80%igen Äthylalkohol und schließen dann die Echtgrün-Eisentinktion an. Einschluß über Isopropylalkohol in alle Harze.

Ergebnis: Zu der scharf gezeichneten Färbung der Goldimprägnierung kommt noch die Tönung der Chloroplasten und der Zellwand hinzu.

Geeignet: Für Grünalgen, Konjugaten, Rotalgen.

Goldimprägnierung-Lichtgrün FS

Nach der Goldimprägnierung werden die Algen über Glycerin oder Alkoholstufen in 80%igen Alkohol überführt. Wir ziehen dann den Alkohol bis auf einen Rest ab und fügen Lichtgrünlösung zu, die wir 10 bis 20 Minuten einwirken lassen. Die Farblösung ersetzen wir dann durch Isopropylalkohol, der gewechselt wird, bis keine Farbe mehr abgeht (Überfärbungen können durch Äthylalkohol rückgängig gemacht werden).

Einschluß: Alle Harze.

Geeignet: Für alle Algen, besonders gut bei Zieralgen und Rotalgen.

Lichtgrün-Stammlösung: Gesättigt in 95%igem Alkohol. **Gebrauchslösung:** Verdünnt mit Alkohol 1:5 bis 10.

Bemerkung: Lichtgrün ist begrenzt haltbar (einige Jahre). Aufbewahrung der fertigen Präparate im Dunkeln. Man kann statt Lichtgrün auch Fastgreen versuchen in 1%iger alkoholischer Lösung, 30–60 Minuten.

Goldimprägnierung-Viridin

Die Goldimprägnierung wird bei vielen Algen noch kontrastreicher, wenn wir mit Viridin schwach (!) nachfärben und dadurch einen grünvioletten, kräftigen Farbton erzielen. Gallerten erscheinen meist schwach grünlich. Eine weitere Möglichkeit ist die zusätzliche Gallertfärbung mit Mucikarmine.

Die Färbung Goldimprägnierung-Viridin erfordert weniger Arbeitsgänge als die vorher genannten Zusammenstellungen; sie bringt aber schöne Ergebnisse.

Fixierung: Neben Chromessigsäure und der Doppelfixierung ist auch das Pfeiffersche Gemisch für Blaualgen geeignet. Wir nehmen nach dem Fixieren und guten Auswaschen zuerst die Goldimprägnierung vor, dann nach kurzer Wässerung die Viridin-färbung, die soweit überwacht werden muß, bis der optimale grünviolette Farbton erreicht ist.

Einschluß: In alle Harze, auch in Glycerin. **Ergebnis:** Alle Zellelemente abgestuft grünviolett bis kräftig violett. Bei Blaualgen sehr scharf gezeichnete Konturen der Zell-

grenzen in den Gallerthüllen. Gallerten schwach grünlich (bzw. rosa).

Geeignet: Für alle Algen, besonders schön bei Blaualgen (Oscillatoren werden kräftig violett).

Hämatoxylin-Chrysoidin

Diese Doppelfärbung wurde von Buxbaum für kernhaltige Algen beschrieben. Man erzielt damit eine getrennte Färbung von Kern, Zellwand und Chloroplasten. Da die Färbung der Chloroplasten mit Chrysoidin durchsichtig oder zumindest durchscheinend bleibt, ist diese Färbung auch dann angebracht, wenn Kerne von Chromatophoren umschlossen oder überdeckt werden. Manche Algen besitzen in jeder Zelle viele sehr kleine Kerne. Sie können mit dieser Färbung zahlenmäßig leicht festgestellt werden, da sie sich rein schwarz vom übrigen hellgelben Plasma gut abheben. Buxbaum verwendet in seiner Vorschrift zwei verschiedene Hämatoxylin-Lösungen für die Kern- und Zellwandfärbung.

Ausführung:

Fixierung: Chromessigsäure, Doppelfixierung

1. Destilliertes Wasser
2. Hämatoxylin nach Hansen, 5 bis 60 Minuten
3. Destilliertes Wasser, kurz abspülen
4. Hämalan nach Mayer (weinrote Lösung, 5 bis 15 Minuten)
5. Destilliertes Wasser, abspülen
6. Bläuen in Leitungswasser, bis die Kerne blau sind
7. Chrysoidin-Lösung, bis Chromatophoren dunkelgelb bis rötlich sind
8. Destilliertes Wasser.

Entwässern über Glycerin, Isopropylalkohol, Äthylglykol.

Einschluß in alle Harze, Glycerin.

Differenzierung bei Überfärbung von Hämatoxylin nach Hansen in 5%iger Essigsäurelösung, von Hämatoxylin nach Mayer in 2%iger Kalialaunlösung, Chrysoidin in 20–30%igem Äthylalkohol bis goldgelb, Unterbrechen in destilliertem Wasser.

Bemerkungen: Hämatoxylin nach Hansen färbt oft sehr rasch und diffus, deshalb muß der Färbevorgang überwacht werden, wenn man nicht eine Probefärbung vornimmt. Die Färbung ist auch im Glycerin haltbar, wir sollten aber doch den Harzeinschluß vorziehen.

Ergebnis: Kerne blauschwarz bis rein schwarz, Chromatophoren goldgelb, Zellwand violett.

Geeignet für alle kernhaltigen Algen.

Farblösungen: Hämatoxyline fertig beziehen bzw. Selbstherstellung nach Romeis. Hämatoxylin nach Hansen ist eine braune Lösung, eine grüne Verfärbung zeigt ver-

minderte Färbekraft an. Chrysoidin wird in heißem, destilliertem Wasser gelöst und nach Erkalten filtriert. Gebrauchslösung: Verdünnen bis goldgelb.

Anilinblau-Erythrosin (Eosin)

Diese beiden Farbstoffe lassen sich gemischt anwenden und erfordern daher nur einen Arbeitsgang. Bei gelungener Färbung ergibt sich eine sehr schöne Differenzierung der Algenzelle.

Fixierung: Chromessigsäure, Doppelfixierung.

Ausführung: Wir überführen die Algen in 80%igen Alkohol

1. 80%iger Alkohol mit 0,5% Essigsäurezusatz, 5—10 Minuten
2. Anilinblau-Erythrosin, 2 bis mehrere Stunden, bis kräftiger Farbton erreicht ist.
3. Abspülen (Umschwenken) in 80%igem Alkohol mit 0,5 bis 1% Essigsäurezusatz, ca. 5 Minuten
4. Isopropylalkohol, dreimal wechseln
5. Einschuß in Harze.

Auch Eosin kann mit Anilinblau verwendet werden, der Arbeitsgang ist der gleiche.

Einschuß in alle Harze.

Geeignet für alle Algen.

Ergebnis: (*Spirogyra spec.*) Kernplasma hellblau, Kernkörperchen rot bis violett, Ausläufer dunkel- bis schwarzblau, Chloroplasten hellblau, Pyrenoide leuchtend rot bis violett mit hellem Hof. Zellen von Blaualgen blauviolett, Gallerten ungefärbt.

Bemerkungen: Die Farbkontraste sind sehr eindrucksvoll, die Farbtöne wechseln aber. Einen Einfluß scheint die Dauer der Alkohol-Essigsäure-Behandlung nach der Färbung zu haben (3). Kernkörperchen und Pyrenoide können rein rot oder kräftig violett sein. Wenigzellige, epiphytische Algen färben sich gut mit Anilinblau, wenn andere Färbungen versagen. Überfärbungen scheinen nicht vorzukommen. Diese Ergebnisse sind nur mit alkoholischen Lösungen zu erzielen, obwohl gerade bei Algen wässrige Lösungen einfacher anzuwenden wären.

Farbstofflösungen: Stammlösungen: Anilinblau wasserlöslich, gesättigt in 80%igem Alkohol, Eosin 1%ig wässrig, Erythrosin gesättigt in 80%igem Alkohol. Gebrauchsmischung: (Mischung kann variiert werden) 80% Alkohol mit 0,5 bis 1% Essigsäurezusatz 10 ml, Anilinblau-Lösung 10 ml Erythrosin (oder Eosin) 2 bis 3 ml.

Allgemeine Bemerkungen

Die Vielzahl der angeführten Methoden mag anfangs etwas verwirren, aber wenn wir uns einmal auf einige eingearbeitet haben und darüber genaue Aufzeichnungen

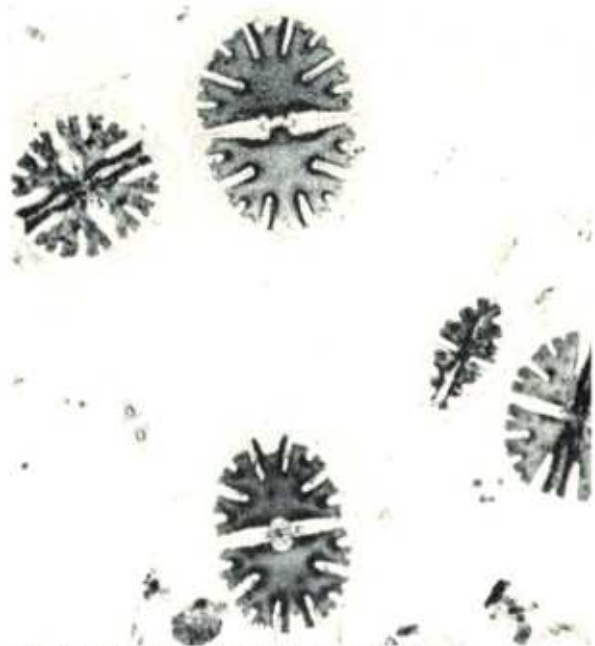


Bild 3: Zieralgen. Fixierung Chromessigsäure, Färbung Viridin, Einschuß in Caedax. Hergestellt 1937. Vergr. 125fach.

führen, wird es nicht schwer werden, die richtigen Methoden auszuwählen.

Gelungene Mehrfachfärbungen können sehr instruktiv sein; sie gelingen leider nicht bei jeder Algenart gleich gut. Entscheidend ist oft die Einwirkungszeit der verschiedenen Farblösungen und die anschließende Nachbehandlung, d. h. die Differenzierung im richtigen Zeitpunkt zu unterbrechen. Die Zeitangaben im Bericht sind als Anhaltspunkte und Mittelwerte zu betrachten. Es ist immer vorteilhaft, mit einer kleinen Algenmenge Vorversuche anzustellen und darüber lückenlos Notizen zu machen. Spricht einmal eine Färbung nicht an, so müssen wir es mit einer anderen versuchen.

Hämatoxylin-Lösungen, Becherfarben und andere Farbstofflösungen können im Laufe der Zeit feste Bestandteile absetzen. Es ist immer nützlich, wenn wir jede Lösung vor der Färbung durch einen ganz kleinen, zu einer Spitztüte zusammengefalteten und mit einer Büroklammer gehaltenen Filter laufen lassen. Niederschläge und besonders Pilzkolonien haften so fest an den Algen, daß sie meist nicht mehr abzutrennen sind. Die Tiefe des Farbtones läßt sich erst nach der Aufhellung im Einschußmittel richtig beurteilen. Eine kleine Algenmenge — einzelne Fäden genügen dazu — führen wir deshalb nach der Färbung schnell — ohne Rücksicht auf eventuelle Schrumpfungen — bis ins Einschußmittel durch.

Ein gutes Algenpräparat erfordert viel Zeitaufwand und Geduld. Sieht man dann aber Präparate durch, die vor einigen Jahrzehnten nach solchen Methoden gemacht wurden und fast nichts von ihrer schönen Färbung eingebüßt haben, dann lohnen sich die vielen Arbeitsgänge schon. Nach der Färbung sollten wir die Algen

ohne Einschaltung längerer Pausen in das Einschlußmittel bringen, da Färbungen durch langes Liegen in der Waschflüssigkeit viel von ihrer Leuchtkraft verlieren können (Ausblässen).

Verfasser: Dr. Rudolf Lindauer, 843 Neumarkt, Schindler Straße 8.

Zur Einführung in die Mikroskopie

Heinz Forstinger

Ein Kulturfolger im Blumentopf:

Das Seidenbirnmoos *Leptobryum piriforme*

Wohl keine Pflanzengruppe der Welt hat sich so verschiedene Lebensräume erobert wie die der Moose. Es gibt kaum eine Ritze hoch am Berg und keine Schlenke im Moor, keinen Wiesengrund und frischen Acker, kein Dach, keinen Baum und keinen Stein, auf dem sich nicht irgendeine Moosart aus dem Heer der etwa 25 000 bekannten Arten angesiedelt hätte. Als Pionierpflanzen, manche Arten kommen nur auf Ruderalstandorten vor, kommt ihnen eine eminente Bedeutung im Kreislauf der Natur zu.

Der Mensch, soviel er auch durch seine Eingriffe in die Natur vernichtet, schafft oft ungewollt für manches tierische und pflanzliche Wesen bessere Lebensbedingungen. Diese Individuen suchen daher die Nähe des Menschen, besser gesagt die durch ihn veränderten und neu geschaffenen Lebensräume. Diese Kulturfolger begegnen uns jeden Tag und werden gar nicht mehr bewußt zur Kenntnis genommen: z. B. Amsel, Spatz, verschiedene Nager; Wegerich, Huflattich, Mauerrauke. Unter den Moosen gibt es nun besonders viele Kulturfolger, was seinen Grund darin hat, daß viele Arten Besiedler von Ruderalplätzen sind und diese der Mensch am häufigsten künstlich schafft. An Mauern, Straßenböschungen, auf Schuttplätzen, Dächern und Brandstellen, überall finden sich ganz bestimmte Moosgesellschaften ein.

Hier soll jedoch eine Moosart vorgestellt werden, die ein ganz besonders „kulturfolgendes“ Verhalten zeigt, das Seidenbirnmoos *Leptobryum piriforme*. Diese Art besiedelt nämlich gerne die Gartenerde der Blumentöpfe in unseren Wohnungen. Ein Kulturfolger „par excellence“ also.

Die bis 2 cm hohen Pflänzchen stehen in lockeren Herden und zeigen eine auffallende Gestalt. Die Moosstengel sind an der Spitze gelbgrün-glänzend, schopfig beblättert (Bild 1). Diese Gipfelblätter (Bild 2) mit einer Länge von 2,5–3 mm sind relativ stark gezähnt und laufen in eine lange, grannenförmige Spitze aus (Bild 3). Eine



Bild 1: Das Seidenbirnmoos, *Leptobryum piriforme*, mit Brutkörpern, schematisch.

Bild 2: Stark gezähntes Schopfbblatt.

statik möglich ist. Dieser Aufsatz enthält nur Hinweise; in seinem Rahmen konnte wegen der mathematischen Schwierigkeiten nicht einmal auf so interessante Dinge wie Berechnung der Durchbiegung von Stäben eingegangen werden. Aus dieser Durchbiegung ließe sich recht einfach und

genau der Dehnungskoeffizient α und damit die Materialgüte ermitteln. Bei weitergehendem Interesse sind vor allem einführende Werke der Baustatik zu empfehlen.

Verfasser: Kurt-Rainer Roeser, 5159 Sindorf, Luisenstr. 20 a.

Winke fürs Labor

Rudolf Lindauer

Dauerpräparate von Süßwasseralgen

V. Die Entwässerung

Dem Einschluß der präparierten Algen in Glycerin und in Harze müssen ein Wasserentzug und die Durchtränkung mit Glycerin bzw. hochprozentigem Alkohol vorausgehen. Auch einige Färbungen sind nur in alkoholischen Lösungen möglich. Für die Überführung in Glycerin oder Alkohol gibt es mehrere Möglichkeiten. Die Wahl richtet sich nach Zweck und Algenart.

Direkte Überführung

Fast alle Blaualgen, Süßwasser-Rotalgen und verschiedene einzellige Grünalgen vertragen schrumpfungsfrei die Überführung durch Alkoholstufen.

Dazu bringen wir die Algen für je 20–30 Minuten ungefähr in folgende Wasser-Alkohol-Mischungen: 3:1, 1:1, 1:3 und zuletzt in 80%igen Alkohol. Meist genügen je Stufe schon 15 Minuten, aber auch längeres Verweilen schadet nicht. Nur in hochprozentigem Alkohol sollten wir wochenlanges Liegenlassen vermeiden. Kleinste Algenmengen können wir auch in abgedeckten Blockschälchen überführen. Dazu geben wir eine abgezählte Tropfenmenge Wasser mit den Algen hinein und die entsprechende Tropfenzahl Alkohol dazu. Durch vorsichtiges Kippen und Umschwenken mischen wir nach jeder weiteren Zugabe. Für größere Algenmengen verwenden wir zweckmäßigerweise Tablettenröhrchen passender Größe. Handelt es sich um gefärbte Algen, die wir anschließend in

Euparal einschließen wollen, so nehmen wir zur Durchtränkung Isopropylalkohol.

Überführung in Alkohol über Glycerin (Overton-Verfahren)

Empfindliche Algen reagieren auf direkte Alkoholeinwirkung mit mehr oder weniger starken Formveränderungen. Die Alkohol-Durchtränkung gelingt aber dann schrumpfungsfrei, wenn wir als Zwischenstufe Glycerin einschalten und auch diese Durch-

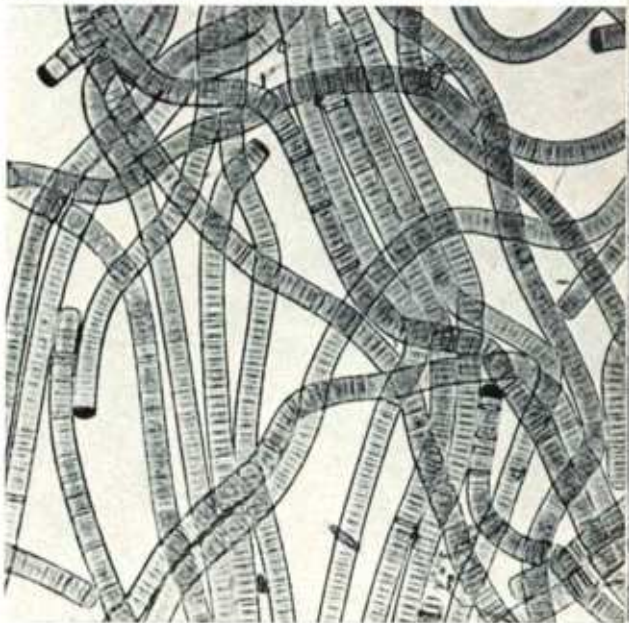


Bild 1: Die Blaualge *Oscillatoria limosa*, 175fach vergrößert. Fixiert in Formalin, gefärbt mit Viridin, Einschluß in Glycerin. Das Präparat entstand 1932.

tränkung allmählich und schonend vornehmen. Zwei Methoden stehen uns dazu nach Overton zur Verfügung: Das Senkungsverfahren (SV) und das Eindickungsverfahren (EV).

Senkungsverfahren

Das Senkungsverfahren eignet sich für alle einzelligen und kleinen Algen (Blau-, Grün-, Zier- und Kieselalgen). In ein Glasgefäß von 15–20 mm Weite und 4–6 cm Länge (Tablettenröhrchen, auch aus Kunststoff) geben wir 1 cm hoch konzentriertes, chemisch reines Glycerin und gießen bei sehr schräg — fast waagrecht — gehaltenem Glasgefäß die Algen (in destilliertem Wasser) in einer 1–2 cm hohen Schicht langsam (!) ein. Die beiden Flüssigkeiten dürfen sich jetzt nicht vermischen. Dann bringen wir das Glas vorsichtig wieder in die lotrechte Lage und lassen es, verschlossen oder abgedeckt, ruhig stehen.

Die Algen müssen anfangs auf der Oberfläche des Glycerins liegen. Allmählich werden sie immer mehr mit Glycerin durchtränkt und sinken dabei sehr langsam zu Boden. Die vollständige Durchtränkung ist meist nach ein bis zwei Tagen erreicht. Je kälter das Glas aufbewahrt wird, desto langsamer und schonender geht die Durchtränkung vor sich, umgekehrt läuft der Vorgang in mäßiger (!) Wärme rascher ab. Wenn alle Algen am Boden liegen, saugen wir mit der Pipette die Flüssigkeit bis auf

den Glycerinrest mit den Algen ab. Dann lassen wir bei schräggehaltenem Glas noch ca. 10–15 mm hoch reines Glycerin nachfließen, stellen das Glas auf und warten wieder, bis die zuerst oben schwimmenden Algen auf den Boden gesunken sind. Jetzt können wir in Alkohol überführen. Dazu saugen wir die Flüssigkeit wieder soweit ab, bis nur noch die Algen mit dem Glycerinrest zurückbleiben und füllen mit Isopropylalkohol oder 80%igen Äthylalkohol ca. 3 cm hoch auf. Nach einigen Minuten mischen wir durch Umschwenken und lassen das Glas 15 Minuten stehen. Währenddessen können wir das Glas immer wieder etwas bewegen. Der Waschvorgang — Abziehen der überstehenden Flüssigkeit, Nachgießen von Isopropylalkohol bzw. Äthylalkohol und Durchmischen — wird 4- bis 6-mal wiederholt, wobei wir das Glas immer 15 Minuten ruhig stehen lassen. Dann wird das Glycerin restlos entfernt sein, die Algen liegen jetzt in reinem Alkohol. Für den Harzeinschluß müssen die Algen vollkommen frei von Glycerin sein, sonst sind Trübungen im fertigen Präparat nicht zu vermeiden.

Eindunstungsverfahren

Das Eindunstungsverfahren eignet sich für alle Algen gleich gut, bei fadenförmigen und flächigen, großen Formen können wir nur diese Methode anwenden. Sie wirkt schonender als das vorher beschriebene Senkungsverfahren.

Wir bringen die Algen in ein Blockschälchen (oder ähnliches Gefäß) in verdünntes Glycerin (ein Teil Glycerin und neun Teile destilliertes Wasser) und lassen in mäßiger Wärme das Wasser langsam verdunsten, bis die Algen in reinem Glycerin liegen. Das stellen wir am einfachsten fest, wenn wir vorher die Höhe des einen Teils Glycerin von außen mit einem Fettstift am Glas markieren. Während des Verdunstungsvorganges müssen wir den Behälter unbedingt vor Staub schützen, da die spätere Entfernung von Staub oder Textilfasern schwer möglich ist. Wir können dazu das Gefäß mit Algen unter einen niedrigen Schachteldeckel stellen oder es mit Seidenpapier abdecken, wenn der obere Rand vollkommen trocken ist. Das Wasser darf nicht zu schnell verdunsten, damit die Algen sehr schonend in Glycerin überführt werden, was erst in ein bis zwei Tagen erreicht sein soll. Verwenden wir ein Heizkissen, so stellen wir das Schälchen so darauf, daß zwischen Heizkissen und Schalenboden ein kleiner Luftzwischenraum bleibt.

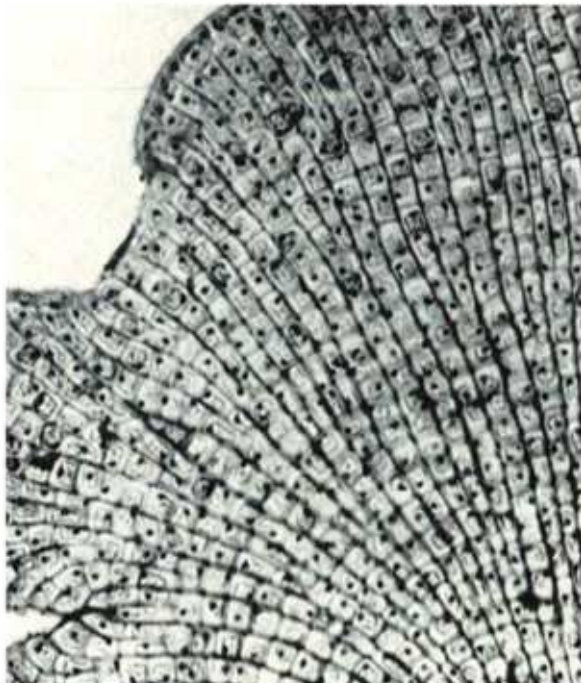


Bild 2: Die Grünalge *Chaetoptelia orbicularis* bildet ein scheibenförmiges, einschichtiges Lager. Fixiert mit Chromessigsäure, gefärbt mit Hämalaun, Einschuß in Caedax, 110fach vergrößert. Das Präparat entstand 1936.

Bild 3: Epiphytische Grünalge auf der Grünalge *Cladophora fracta*, 430fach vergrößert. Doppel-fixierung, gefärbt mit Hämatoxylin nach Dela-field und Safranin, Einschuß in Glycerin.

Ich selber lege auf das Heizkissen zuerst eine Aluminiumplatte und stelle darauf die Schale mit Zwischenlage von zwei Holzstäbchen. Mit einem hohen Schachteldeckel überdacht, wird das Heizkissen auf Stufe 1 geschaltet. Das Wasser können wir auch in einem Exsikkator entziehen. Liegen dann die Algen in reinem Glycerin, so übertragen wir sie in 80%igen Äthylalkohol oder Isopropylalkohol und wiederholen den Waschvorgang 5- bis 6mal, wie er beim Senkungsverfahren beschrieben wurde. Dazu verwenden wir dann verschließbare Glasgefäße. Für ganz empfindliche Algen können wir beide Methoden verbinden. Wir überführen die Algen zuerst durch das Senkungsverfahren in 20- bis 30%iges Glycerin und schließen dann das Eindunstungsverfahren an. Die beiden Verfahren wurden hier ausführlich beschrieben, denn eine schrumpfungsfreie Überführung in Alkohol ist Vorbedingung für den Einschuß in ein Harz.

Entwässerung über Äthylglykol

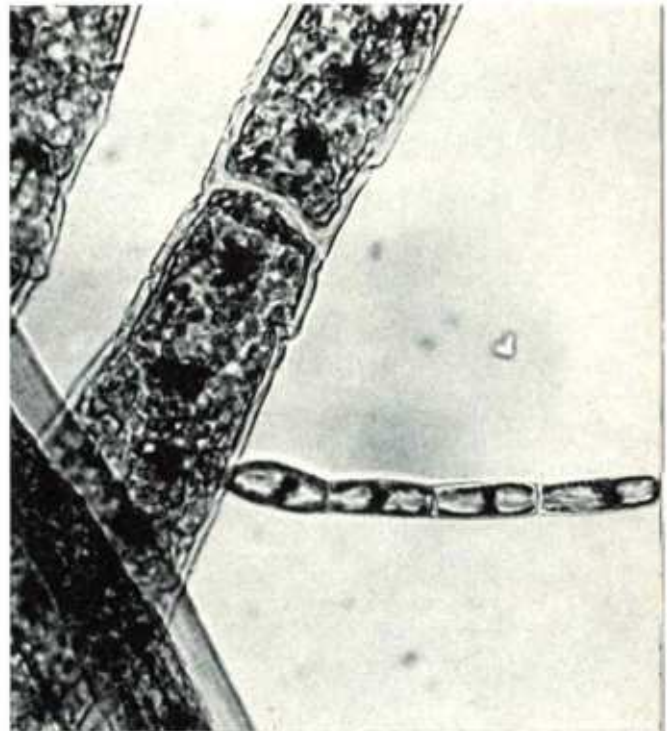
Im Äthylglykol haben wir ein Zwischenglied zur Überführung der Algen in Alkohol, das gegenüber der Glycerinmethode Zeit spart. Bei widerstandsfähigen Algen genügen drei bis vier Stufen.

Stufenmethode

Wir bringen die Algen aus destilliertem Wasser in folgende Konzentrationsstufen: 25% (3:1), 50% (1:1), 75% (1:3) und lassen nach Durchmischen (Umschwenken, Pipette) je Stufe 15–20 Minuten einwirken. Aus der 75%-Stufe übertragen in reines Äthylglykol, das noch zweimal gewechselt wird.

Schonende Überführung

Wir geben die Algen in ein Tabletten-gläschen oder Blockschälchen mit destilliertem Wasser, das wir aber vorher in Tropfen (Pipette) abzählen. Dann fügen wir in 15 bis 20 Minuten Abstand je 10% Äthylglykol zu, bis die Algen in der Konzentration 1:1 (50%) liegen. (Zum Beispiel: 30 Tropfen Wasser plus je 3 Tropfen Äthylglykol alle 15–20 Minuten.) Nach jeder Zugabe mischen wir durch Umschwenken oder mit der Pipette. Wir verfahren dann weiter so, bis die Algen in 75%igem Äthylglykol liegen und können dann in reines Äthylglykol übertragen, das noch zweimal gewechselt wird. Das Algengefäß muß immer abgedeckt bzw. verschlossen sein, die Zeiten müssen nicht genau eingehalten werden, längeres Verweilen schadet nicht. Die wei-



tere Überführung aus dem Äthylglykol in Alkohole nehmen wir in den Stufen 3:1, 2:1, 1:1, 1:3 mit jeweils 10–15 Minuten Einwirkungszeit vor. Bei robusten Algen genügt eine Zwischenstufe 1:1 vollauf. Eventuell einmal auftretende leichte Schrumpfungen können wir bei der Rückführung in die vorherige Stufe wieder beseitigen.

Bemerkungen: Färbungen werden in Äthylglykol nicht verändert, es hellt aber oft sehr stark auf. Äthylglykol mischt sich in jedem Verhältnis mit Wasser, Äthylalkohol, Isopropylalkohol, Glycerin, Xylol, Euparal. Trotzdem müssen wir vor dem Einschuß in Harze Isopropylalkohol zwischenschalten, da bei direkter Übertragung in Einschußharze (Euparal) später feinste Kristalle ausgeschieden werden.

Kleine Glasflaschen mit weitem Hals, die nur 1–2 ml oder 5–8 ml Inhalt haben, sind für viele Arbeiten mit kleinen Algenmengen recht gut brauchbar. Ebenfalls sehr praktisch sind käufliche Tablettengläser von 2 cm Durchmesser und 8 cm Länge mit Kunststoffverschlußkappe.

Verfasser: Dr. Rudolf Lindauer, 843 Neumarkt, Schindlerstr. 6.

Der erste Teil dieser Arbeit „Die Fixierung“ erschien in Mikrokosmos 64, S. 79–85, H. 3, 1975; der zweite Teil „Färbung I“ in Mikrokosmos 64, S. 118–123, H. 4, 1975; der dritte Teil „Färbung II“ in Mikrokosmos 64, S. 151–155, H. 5, 1975; der vierte Teil „Mehrfachfärbungen“ in Mikrokosmos 64, S. 218–222, H. 7, 1975.

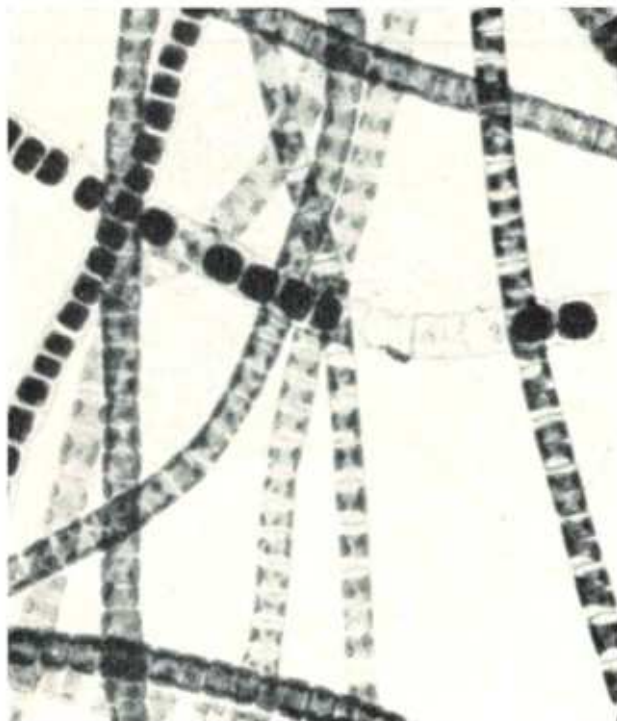
Dauerpräparate von Süßwasseralgen

VI. Einschluß in wasserlösliche Einschlußmittel — Lackabschluß

Der Einschluß von Algen (Dauerpräparate)

Gefärbte Algen (oder auch ungefärbte, deren natürliche Farben erhalten bleiben sollen), werden in geeignete Mittel eingeschlossen. Dazu stehen uns zwei große Gruppen von Einschlußmitteln zur Verfügung: Die wasserlöslichen und die alkohol- oder xylollöslichen Einschlußmittel, die sich mit dem Wasser nicht mischen. Zur ersten Gruppe gehören Glycerin, Kupfer-

Bild 1: Die Grünalge *Ulothrix zonata*. Fixiert mit Chromessigsäure, Goldimprägnation, Einschluß in Glycerin. Man erkennt vegetative Fäden und Fäden mit Aplanosporen. Vergr. 160fach.



laktophenol, Glyzeringelatine, Polyvinyl-Laktophenol und Gelatinol. In der anderen Gruppe finden wir die Harze Euparal, venezianischer Terpentin, Caedax u. a.

Der Harzeinschluß — für viele Algen möglich — ist der ideale Einschluß. Die wasserhaltigen Einschlußmittel sollten wir nur dann wählen, wenn wir aus folgenden Gründen nicht in Harz einschließen können:

1. Algenarten, bei denen der Wasserentzug zu schweren Formveränderungen führt (z. B. bei allen metabolischen Formen, Flagellatenformen, Volvocales, Algen ohne feste Zellwand. Sie sind in diesem Bericht nicht gesondert berücksichtigt).
2. Einschluß mit Erhaltung der natürlichen Farbe.
3. Darstellung von Gallerten mit Dunkelfeldeffekt.

Einschluß in wasserlösliche Einschlußmittel

Glycerin

Glycerin verwenden wir zum Einschluß von sehr empfindlichen Algen, die einen Wasserentzug nicht vertragen und auch für Algen, die ihre natürliche Farbe behalten sollen. Das verwendete Glycerin muß absolut chemisch rein sein und frei von Säurespuren. Glycerin bleibt flüssig, die fertigen Präparate müssen wir deshalb mit einem Lackring versehen, der luftdicht abschließt und das Deckglas festhält. Für den Einschluß mit Erhaltung der Eigenfarben fixieren wir die Algen in Pfeiffers Gemisch, Zinkchlorid-Eisessig oder Jodglycerin.

Der 1. Teil dieser Arbeit „Die Fixierung“ erschien im Mikrokosmos 64, S. 79–85, H. 3, 1975; der 2. Teil „Färbung I“ im Mikrokosmos 64, S. 118 bis 123, H. 4, 1975; der 3. Teil „Färbung II“ im Mikrokosmos 64, S. 151–155, H. 5, 1975; der 4. Teil „Mehrfachfärbungen“ im Mikrokosmos 64, S. 218 bis 222, H. 7, 1975; der 5. Teil „Die Entwässerung“ im Mikrokosmos 64, S. 243–245, H. 8, 1975.

Ausführung: Wir überführen die Algen nach dem Senkungsverfahren oder dem Eindunstungsverfahren in 80–100%iges Glycerin. Die Herstellung des Präparates richtet sich jetzt nach dem gewählten Abschlußverfahren. Nach dem Doppeldeckglas-Verfahren bringen wir in die Mitte des quadratischen Deckglases (20 mm) eine kleine Algenmenge mit etwas Glycerin, ordnen die Algen bei schwacher Vergrößerung mit der vorher mit Glycerin benetzten Nadel (die Verwendung einer ganz trockenen Nadel führt zu Luftblasen im Präparat), daß sie möglichst gleichmäßig verteilt liegen und decken mit dem runden Deckglas (15 mm) ab. Die weitere Technik siehe beim Lackringabschluß.

Ergebnis: Chemisch reines Glycerin erhält die natürlichen Farben (Chlorophyll, Hämatochrom) gut. Mit der Zeit aber können die Objekte sehr durchsichtig werden und die Zellkonturen undeutlich, so daß sie nur bei starker Abblendung noch sichtbar sind. Deshalb ist verdünntes 80%iges Glycerin oft günstiger. In Glycerin halten sich folgende Färbungen: Viridin, Kernschwarz, Kernechtrot, Eisentinktionen, Goldimprägnierung, Azokarmin und Karmin in schwach saurem, Hämatoxyline nur in chemisch streng neutralem und säurefreiem Glycerin.

Glycerin mit Zusatz von Kupfersalzen

Für die Konservierung der natürlichen Farben ist ein Zusatz von Kupfersalzen zum Glycerin immer günstig. Folgende Lösung hat sich bewährt:

80 ml reines Glycerin, 20 ml destilliertes Wasser und 0,2 g Kupferchlorid, 0,2 g Kupferacetat. Die Salze werden getrennt in je 10 ml destilliertem Wasser gelöst und filtriert dem Glycerin zugesetzt. Nach nochmaligem Filtrieren muß die Lösung schwach blau sein (nicht grünlich). Geeignet nur zum Einschluß von ungefärbten Algen.

Kupfer-Laktophenol

In Kupfer-Laktophenol können wir Algen fixieren und (neue Lösung) auch einschließen. Wir können aber auch Pfeiffers Gemisch und Jodglycerin verwenden. Die Naturfarben werden in Kupfer-Laktophenol sehr gut erhalten. In einem Versuch müssen wir vorher klären, ob Kupfer-Laktophenol mit dem verwendeten Abschlußlack emulgiert. Dieser Lack ist dann nicht geeignet.

Glyzeringelatine

Glyzeringelatine gehörte früher zu den viel verwendeten Einschlußmitteln für botanische Objekte. Seit es aber möglich ist, Algen über Isopropylalkohol in Harze ein-



Bild 2: Die Grünalge *Stigeoclonium tenue*, Hauptäste an der Basis. Fixierung mit Chromessigsäure, gefärbt mit Hämalaun-Viridin, Einschluß in Euparal. Vergr. 580fach.

zuschließen, ist ihre Bedeutung zurückgegangen. Bei Glyzeringelatine treten auch oft nach Jahren im Präparat bei einwandfreiem Abschluß Risse und Sprungfiguren auf, die das Präparat verderben. In Gelatine halten sich infolge der schwach sauren Reaktion nur wenige Färbungen gut: Karmin, Viridin und Goldimprägnierung. Gegenüber den flüssigbleibenden Einschlußmitteln hat Glyzeringelatine den Vorteil, daß die Präparate technisch einfacher herzustellen sind.

Ausführung: Wir bringen die Algen bis in 80%iges Glycerin. Dann schmelzen wir durch Erwärmen (nicht zu stark erhitzen!) ein kleines Stück Glyzeringelatine auf dem Objektträger, geben die Algen hinein, verrühren und ordnen mit der erwärmten und befeuchteten Nadel. Das erwärmte Deckglas legen wir ohne Luftblasenbildung auf. Mit einem kleinen Gewicht beschwert (2–5 g), lassen wir das Präparat waagrecht erstarren. Nach einigen Wochen können wir das Präparat reinigen und mit dem Lackring versehen. Wenden wir das Doppeldeckglas-Verfahren an, dann stellen wir das Präparat aus zwei Deckgläsern her. Geeignet für Algen der vorgenannten Färbungen.

Ungefärbte Algen schließen wir in Glyzeringelatine mit einem 5–10%igen Zu-

satz von Kupfer-Laktophenol ein. Wir geben der verflüssigten Gelatine Kupfer-Laktophenol zu, mischen durch vorsichtiges Rühren und filtrieren heiß durch Glaswolle. Erstarren lassen.

Polyvinyl-Laktophenol

Der Einschluß mit Polyvinyl-Laktophenol hätte technisch auch für Algen den Vorteil der schnellen und einfachen Durchführung. Leider ist er nur für wenige widerstandsfähige Algen brauchbar (Blaualgen, Kieselalgen). Von Färbungen halten sich nur die Goldimprägnierung und Viridin. Wir müssen auch die starke Aufhellung berücksichtigen, die mit der Zeit zunimmt.

Ausführung: Wir bringen die stark gefärbten Algen aus destilliertem Wasser oder 50%igem Glyzerin direkt in Polyvinyl-Laktophenol, in das wir möglichst wenig Wasser oder Glyzerin mitnehmen, um die Erhärtung nicht zu verzögern oder zu verhindern. Das Präparat können wir mit Objektträger und Deckglas oder zwei Deckgläsern herstellen.

Bei ungefärbten Algen kann die Aufhellung bis zur vollständigen Durchsichtigkeit fortschreiten.

Gelatinol

Als Einschlußmittel für Algen ist Gelatinol unbrauchbar mit einer Ausnahme: Mit Goldimprägnierung gefärbte Blaualgen mit

fester Gallerthülle und Kieselalgen können wir einschließen.

Ausführung: Wir übertragen die mit Gold gefärbten Algen aus dem destillierten Wasser in einen Tropfen Gelatinol auf dem Objektträger, ordnen mit der feuchten Nadel und legen das Deckglas auf, das anfangs leicht beschwert wird. Ein Lackringabschluß ist nicht notwendig.

Der Lackabschluß

Wasserlösliche Einschlußmittel müssen durch einen luftdichten Abschluß vor dem Austrocknen geschützt werden, der außerdem das Deckglas festhält. Die Technik der bekanntgewordenen Verfahren ist zeitraubend, und allen Verfahren haften gewisse Mängel an. Mit dem beschriebenen Doppeldeckglas-Verfahren (Lindauer 1934) erhalten wir einen dauerhaft-verlässlichen Verschuß, wenn die Technik genau beachtet wird. Das fertige Präparat sieht auch äußerlich sehr ansprechend aus.

Prinzip: Ein aus ungleich großen Deckgläsern hergestelltes mikroskopisches Präparat wird mit einem Abschlußlack auf dem Objektträger befestigt. Das zwischen den beiden Deckgläsern eingeschlossene Objekt wird mit einem Lackring umgeben, der nach Erhärtung luftundurchlässig ist.

Flüssigbleibende Einschlußmittel

Technik: 1. Wir stellen ein mikroskopisches Präparat aus zwei ungleichgroßen Deckgläsern her; 20 mm quadratisch und 15 mm rund sind praktische Größen. Das große Deckglas legen wir auf eine weiße, ebene Unterlage, geben in die Mitte das Einschlußmittel mit dem Objekt und decken mit dem zentrisch aufgelegten kleinen, runden Deckglas ein, nachdem wir vorher mit der Nadel die Objekte geordnet und möglichst gleichmäßig (!) verteilt haben. Von der richtigen Menge des Einschlußmittels hängt das Gelingen eines einwandfreien Verschlusses ab. Es soll den Raum zwischen beiden Deckgläsern ohne Hohlraumbildung ausfüllen, darf aber nicht am Deckglas hervortreten. Diesen Idealzustand auf Anhieb zu erreichen, ist meines Erachtens mehr Zufall als Fertigkeit; durch Übung kann man sich aber dem Idealzustand nähern. Nimmt man zur Übertragung des Einschlußmittels auf das Deckglas immer einen gleich dünnen (2 mm) Glasstab, und taucht ihn immer gleich tief ein, so ist das beim Abschätzen eine gute Hilfe.

2. Auf die Mitte des oberen Deckglases des eben fertiggestellten Präparates stellen wir

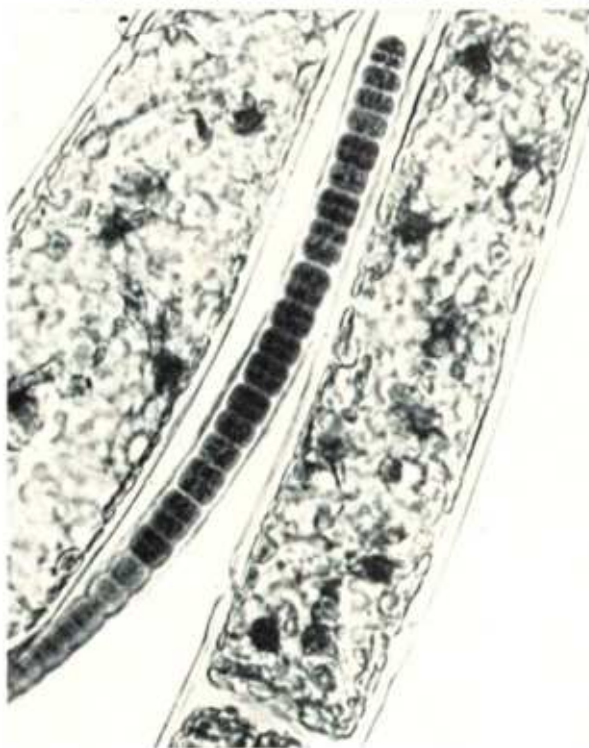


Bild 3: Die Blaualge *Plectonema* auf und an der Grünalge *Cladophora fracta*. Doppelfixierung, Färbung Delafield-Safranin, Einschluß in Glyzerin. Vergr. 540fach.

Bild 5: Die kleine Meeres-Braunalge *Elachista fucicola*. Fixierung Chromessigsäure, Färbung Goldimprägnation-Lichtgrün, Einschuß in Cae-dax. Vergr. 205fach.

ein kleines Gewicht (Flachkopf-Metall-schraube von 3—4 g) und beurteilen jetzt das Präparat. Drei Möglichkeiten können sich ergeben, eventuelle Fehler müssen wir jetzt beheben.

Die Menge des Einschlußmittels war richtig bemessen.

Wir sehen weder Hohlräume, noch tritt das Einschlußmittel am Rande des oberen Deckglases heraus.

Vom Einschlußmittel wurde zu wenig ge-nommen.

Das Einschlußmittel füllt den Raum zwischen den beiden Deckgläsern nicht voll-ständig aus, am Rande zeigt sich eine Luft-blase. Abhilfe: Wir geben — bei auflie-gendem Gewicht — das Einschlußmittel an nur einer Stelle am Rand des oberen Deckglases in kleinsten Tropfen so lange zu, bis der Hohlraum ausgefüllt ist. Zum Aufbringen des Einschlußmittels eignet sich eine Drahtöse von 1 mm Durchmesser. Luftblasen im Inneren können wir durch Senkrechtstellen des Präparates vielleicht nach außen verdrängen. Gelingt das nicht, so bleibt nur die Neuanfertigung, oder man läßt den Schönheitsfehler, wenn er nicht stört.

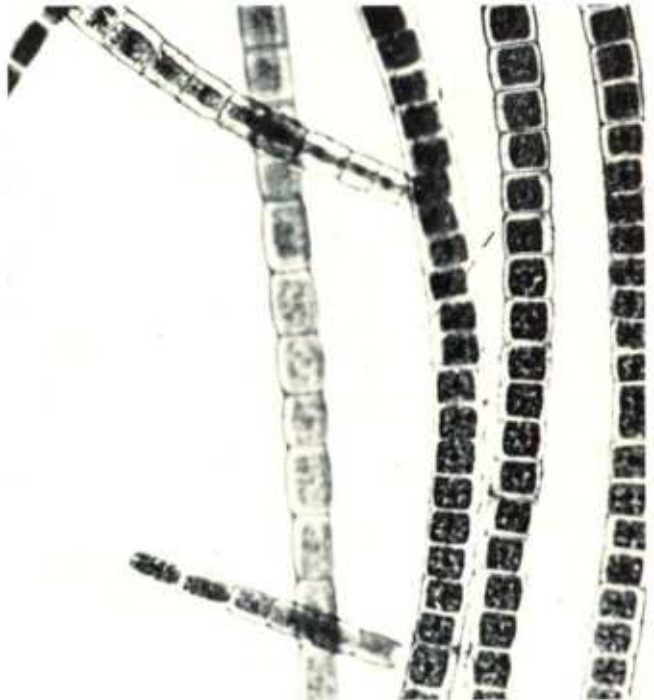
Vom Einschlußmittel wurde zu reichlich ge-nommen.

Bereits vor oder nach Auflegen des Ge-wichtes tritt das Einschlußmittel am Rande des oberen Deckglases hervor. Bei aufge-legtem Gewicht saugen wir mit der Spitze eines schmalen, rechteckig-geschnittenen Streifen Filtrierpapiers an nur einer Stelle das zu reichlich genommene Einschluß-mittel ab, ohne es in einer Schleifspur bis an den äußeren Rand des großen Deck-glases zu ziehen.

3. Ist die Menge des Einschlußmittels richtig bemessen, verbinden wir beide Deckgläser mit etwas Lack. Dazu geben wir am Rande des kleinen Deckglases ringsum verteilt, 5—6 winzige Tropfen un-seres Abschlußlackes, der das obere Deck-glas berührt und 2—3 mm breit sein kann.



Bild 4: Um den Rand des kleinen Deckglases verteilen wir 5—6 win-zige Tropfen des Ab-schlußlackes.



Der Tropfen soll ganz flach sein und nach dem Eintrocknen keine Kuppe bilden. Das Präparat bleibt mit dem Gewicht, staub-geschützt, überdeckt, waagrecht liegen, bis der Lack etwas erhärtet ist (Bild 4).

4. Fertigstellung. Auf die Mitte des Objekt-trägers auf einer schwarzen, waagrechten Unterlage geben wir einige große Tropfen des Abschlußlackes, breiten ihn etwas vier-eckig aus, nehmen nach Wegnahme des Ge-wichtes das Deckglas-Deckglas-Präparat mit der Pinzette und legen es, mit dem runden Deckglas nach unten, mit der Kante schräg auf den Lacktropfen auf (wie beim Harzeinschuß). Der Lack soll nicht zu steif und zu kalt sein, eher leicht angewärmt. Dann breitet er sich ohne Luftblasen schnell aus und füllt den Raum zwischen quadratischem Deckglas und Objektträger aus. Fehlt noch etwas Lack, so ergänzen wir ihn an zwei gegenüberliegenden Stel-len. Mit der Nadel lenken wir das Deck-glas genau in die Mitte und korrigieren die Lage noch einige Male, da es bis zur Beruhigung des Lackes zum Wegschwim-men neigt. Das ganze Präparat bleibt bis zur Erhärtung des Lackes noch einige Tage ruhig und eben liegen.

Bemerkungen: Die Auflage des Gewichtes bei der Präparateherstellung hat zwei Gründe. Einmal soll es die Objekte ab-flachen, ebnen und dünn ausbreiten; an-dererseits hilft es uns, die Menge des Ein-schlußmittels besser zu beurteilen. Bei ein-zelligen Algen, Pilzmyzelien, Sporen, Pol-len, feinen Moosblättern usw. genügen



Bild 6: Eine große aufgebogene Büroklammer (5 cm) eignet sich gut zum Auftragen des Lackes.

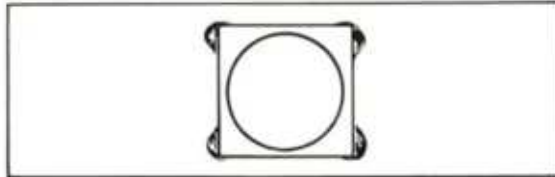


Bild 7: Einlaufstellen des Abschluslackes.

Gewichte von 3–5 g, bei dickeren Objekten — z. B. rasiß verfilzten Algen, Algen in Gallerthüllen, muß entsprechend schwerer gepreßt werden. Die Objekte sollen nach Möglichkeit gleichmäßig flach über die Fläche verteilt sein. Für stärkere Algen oder Algen in dichtem Verband oder mit Kalkinkrustierung ist das Abschlußverfahren nach Migula günstiger. Ist das Deckglas einseitig abgehoben, gelingt der Verschluss nach dem Doppeldeckglas-Verfahren nicht. Vermeiden müssen wir, Hartteile wie Steinsplitter oder harten Detritus mit einzuschließen. Nur saubere und fettfrei geputzte Deckgläser können wir verwenden. Immer ist auf eine waagrechte Unterlage zu achten, sonst gleiten die Deckgläser nach einer Seite langsam ab, bevor der Lack erhärtet ist. Das viereckige Deckglas legen wir kantengleich zum Objektträger auf. Manchmal dringt nach einiger Zeit zwischen die beiden Deckgläser etwas Lack ein. Da diese Einbuchtungen nur am Rande zu finden sind, stören sie die mikroskopische Betrachtung nicht.

Als Abschluslack können wir jeden guten Lack verwenden, der farblos und durchsichtig ist und ohne Nachdunkeln eintrocknet, der dünnflüssig beim Verwenden und elastisch nach dem Erhärten bleibt, der nicht empfindlich gegen Glyzerinspuren ist und am Glas gut haftet, der sich mit dem Einschlußmittel an den Berührungsgrenzen weder mischt noch emulgiert und Trübungen verursacht. (Unbrauchbar als Abschlußring sind die schnell erhärtenden Einschlußkunstharze.) Zum Auftragen des Lackes in größeren Tropfen sind die 5 cm langen metallenen Büroklammern mit verdickten Enden gut zu verwenden, wenn wir die äußeren Schenkel rechtwinkelig aufbiegen (Bild 6). Auch zur Entnahme von Einschlußmitteln sind sie praktisch. Man kann sie gut halten, leicht reinigen

und sie fallen in kleine Vorratsflaschen nicht hinein. Das Doppeldeckglas-Verfahren ist umständlicher zu beschreiben, als es tatsächlich durchzuführen ist. Einige Male geübt, ist alles selbstverständlich. Die fertigen Präparate sehen sehr sauber aus, der Abschluß ist luftdicht und dauerhaft (über 40 Jahre alte Präparate mit dieser Methode sind unverändert einwandfrei).

Wasserlösliche, erstarrende Einschlußmittel

Hier gibt es mit dem Doppeldeckglas-Verfahren keine Probleme. Wir fertigen das Präparat auch mit zwei verschiedenen großen Deckgläsern an, können fehlendes Einschlußmittel leicht ergänzen und nach dem Erstarren wegschaben, was zuviel war (Rasier Klinge). Gereinigt wird diese Stelle nachher mit Pinsel und Wasser mit Alkohol, die Gläser läßt man senkrecht aufgestellt an der Luft trocknen (nicht trockenwischen). Sobald das Einschlußmittel festgeworden ist, wird es mit Lack auf dem Objektträger abgeschlossen. Auch Präparate mit Objektträger und Deckglas können wir uns herstellen und den Lackring wie üblich ziehen. Zweckmäßig ist es, zwei bis drei Ringe übereinander anzubringen. Einfacher und viel sicherer arbeitet aber hier das Doppeldeckglas-Verfahren.

Müller (Hamburg) regte an, das kleine runde 15 mm-Deckglas vorher auf dem Objektträger mit einem Tropfen Lack zu befestigen und sich davon einen Vorrat nach Bedarf herzustellen. Das Objekt kommt dann mit dem Einschlußmittel auf das aufgeklebte, staubfreigeputzte Deckglas und wird mit dem quadratischen Deckglas (20 mm) abgedeckt. Man kann es in den Ecken unten mit je einem kleinen Lacktropfen versehen. Mit einem Gewicht beschwert, bleibt das ganze Präparat einige Stunden waagrecht liegen. Dann lassen wir an vier Ecken — parallel zur schmalen Objektträgerkante — dünnflüssigen Lack durch wiederholtes Anbringen von kleinen Tropfen einfließen, bis der Raum ausgefüllt ist (Bild 7).

Der Vorteil liegt im abgekürzten Arbeitsgang. Nachteilig ist aber, daß das Einschlußmittel gleich in der richtigen Menge gewählt werden muß, eine spätere Korrektur ist nicht möglich. Bei etwas zu wenig oder zu viel Lack mag das nicht stören, sonst bleibt nur die Neuanfertigung des ganzen Präparates.

Verfasser: Dr. Rudolf Lindauer, 843 Neumarkt, Schindlerstr. 6.



Bild 5: Hochleistungs-Lichtmikroskop von heute mit integrierter Fotografiereinrichtung.

1838/1839	Schwann und Schleiden stellen die Zelltheorie auf.
1845	Siebold definiert die Protisten als „Thiere, in welchen die verschiedenen Systeme der Organe nicht scharf ausgeschieden sind und deren unregelmäßige Form und einfache Organisation sich auf eine Zelle reduzieren lassen“.
um 1850	Pasteur beendet durch seine Forschung den Streit um die Urzeugung.
1880–1889	Bütschli schreibt für Bronn's Klassen und Ordnungen des Thier-Reichs eine 3bändige Protistologie.
1901	Calkins verfaßt „The protozoa“.
1916	Doflein gibt das „Lehrbuch für Protozoenkunde“ heraus.
ab 20. Jahrhundert	Neben systematischer und generell protozoologischer Arbeit setzen allgemein cytologische Untersuchungen bei Protisten ein.



Bild 6: Heute gebräuchliches Elektronenmikroskop vom Durchstrahlungstyp.

Verfasser: Dr. Klaus Hausmann, Lehrstuhl für Zellenlehre, 69 Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 230.

Winke fürs Labor

Rudolf Lindauer

Dauerpräparate von Süßwasseralgen

VII. Einschluß in Harze

Es scheint, daß der Harzeinschluß von Algen nicht so allgemein bekannt ist, wie er es eigentlich verdient. Wir sollten Algen immer in Harze einschließen, wenn es die Algenart und die Färbung zuläßt, denn der Harzeinschluß ist im Hinblick auf die Technik allen anderen Einschlußmedien weit überlegen.

Vorteile: Der Einschluß in Harz ist prä-

parationstechnisch viel einfacher und sicherer als der in wasserhaltige, flüssigbleibende oder erstarrende Mittel. Liegen die Algen einmal im Harz, können wir leicht und schnell mehrere Präparate anfertigen. Viele Färbungen halten in den Harzen ausgezeichnet. Das fertige Präparat bedarf keiner weiteren Nachbehandlung und ist gut haltbar.

Für den Harzeinschluß geeignete Algen

Für den Einschluß in ein Harz sind alle gefärbten Algen geeignet, mit Ausnahme der bereits erwähnten wenigen Arten, die einen vollständigen Wasserentzug infolge ihrer Zartheit nicht vertragen. Die natürlichen Farbstoffe werden in den Arbeitsgängen bis zum Harzeinschluß vollkommen ausgezogen. Die Sichtbarmachung von ungefärbten Gallerten mit Dunkelfeldeffekt ist nur in wasserhaltigen Einschlußmitteln möglich.

Für den Einschluß in harzige Einschlußmittel sind demnach folgende Arten geeignet: Blaualgen, die meisten Grünalgen, Jochalgen, Zieralgen, Süßwasser-Rotalgen und Kieselalgen, um nur einige Beispiele aufzuführen. Wenn in folgendem Text ganz allgemein von Algen gesprochen wird, so sind darunter die für den Harzeinschluß geeigneten gemeint.

Anforderungen an den Harzeinschluß

Von einem einwandfreien Harzeinschluß für Algen müssen wir verlangen, daß die Algen schrumpfungsfrei und ohne Formveränderung ins Harz überführt werden können. Eine geringe Verminderung von Länge und Durchmesser wird sich nicht vermeiden lassen (Wasserentzug). Messen können wir deshalb Algen nur im lebenden, unfixierten Zustand. Die angewandten Färbungen dürfen sich in Glycerin und Alkoholen nicht entfärben und müssen in dem betreffenden Harz dauerhaft und gut haltbar sein. Unbedingt nötig ist eine vorgehende kräftige Färbung vor dem Einschluß, da jeder Harzeinschluß die Algen stark aufhellt.

Algenfärbungen für den Harzeinschluß

Zu den Färbungen, die sich im Harzeinschluß unverändert oder durch Jahrzehnte fast unverändert gut halten, gehören: Becherfarben (Viridin, Kernechtrot), Karmine, Azokarmin B, Hämatoxyline, Kernschwarz, Safranin, Chrysoidin, Mucikarmin, Anilinblau-Erythrosin, Eisen-Echtgrüntinktionen, Goldimprägnierung, Lichtgrün FS (verblaßt nach einigen Jahren). Mit Ausnahme der Eisentinktion und Anilinblau-Erythrosin handelt es sich bei den erwähnten Färbungen um wäßrige Farblösungen, deren Ergebnis durch die Glycerin-Alkohol-Äthylglykol-Behandlungen nicht verändert wird. Da jeder Harzeinschluß mehr oder weniger stark aufhellt, wirkt sich eine leichte Überfärbung immer günstig aus, um einen optimalen satten Farbton zu erreichen.

Bild 1: Die Blaualge *Aphanizomenon flos-aquae* (Wasserblüte). Fixierung Chromessigsäure, Färbung Anilinblau-Erythrosin, Einschluß in Euparal. 490fach vergrößert.

Allgemeiner Arbeitsgang beim Harzeinschluß

Wir bringen die Algen über konzentriertes Glycerin oder Äthylglykol in Isopropylalkohol und aus diesem in eine Lösung von Isopropylalkohol und Euparal (oder Venetianisches Terpentin) von schwacher Konzentration; die allmähliche Überführung in reines Euparal (oder Venetianisches Terpentin) erfolgt im Exsikkator. Soll in Caedax eingeschlossen werden, wird noch eine Stufe Xylol eingeschaltet, mit ähnlichem Arbeitsgang wie bei Euparal, die Eindickung erfolgt hier durch Wärme. Der hierfür notwendige Exsikkator läßt sich leicht und billig selbst herstellen und erfüllt in dieser einfachen Form voll seinen Zweck. Ein 1 Liter fassendes, niedriges Einmachglas (gleiche Höhe wie Durchmesser) mit Gummiring und Stahlklammerverschluß füllen wir zu einem Drittel bis zur Hälfte mit wasserfreiem, gekörntem Chlorkalzium. Auf einen in das Glas gestellten, doppelt abgebogenen Aluminiumblechstreifen als Brücke können wir unsere Schalen oder Gefäße stellen. Denselben Dienst tut auch ein Deckel einer Nivea-Aluminiumschachtel mit aufgebogenem, niedrigem Rand. Ist das Chlorkalzium nach Wasseraufnahme feucht geworden, so erhitzen wir es in einem Metalltiegel, bis es wieder wasserfrei und klumpig wird, oder wir ersetzen es durch neues Chlorkalzium. Praktischer als Chlorkalzium ist das von



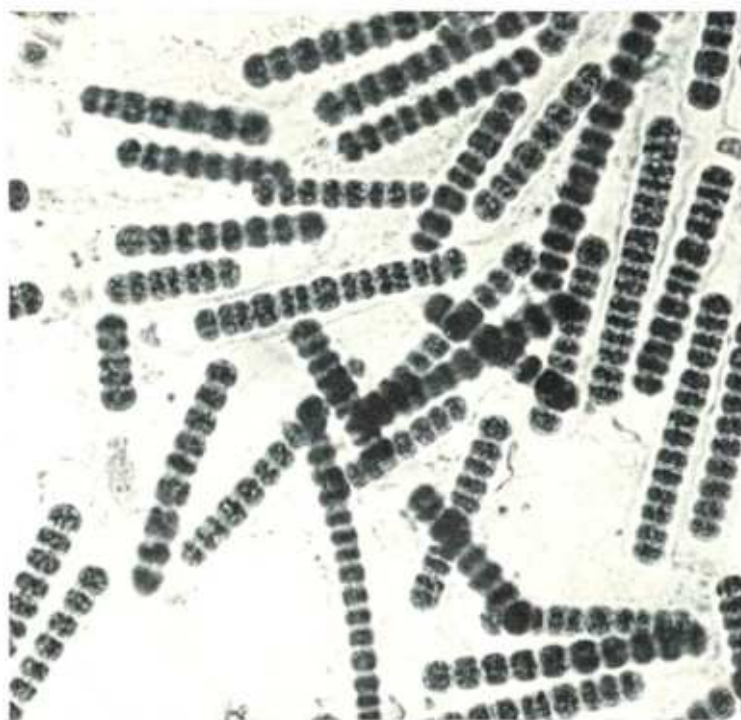


Bild 2: Die Blaualge *Plectonema spec.*, Hormogonien. Fixierung Chromessigsäure, Färbung Hämalaun, Einschuß in Euparal. Vergr. 530fach.

Merck hergestellte „Kieselgel mit Feuchtigkeits-Indikator“, das unter dem Namen „Blaugel“ im Handel ist. Die Wasseraufnahme zeigt es durch eine rosa Färbung an. Auch Blaugel wird in der Hitze regeneriert, dabei wird es wieder blau. Nach Aufsetzen des Glasdeckels mit Gummizwischenring und Festpressen mit der Deckelklammer arbeitet der Exsikkator. Man läßt ihn ruhig stehen, damit die Objekte nicht ausgekippt werden.

Für Algen werden wir solche Einschußharze bevorzugen, die den vollständigen Wasserentzug der einzuschließenden Objekte nicht verlangen. Zu diesen Harzen gehören Euparal und Venetianisches Terpentin.

Euparal

Euparal ist ein käufliches Harzgemisch mit einem Brechungsindex von $n_D = 1,535$. Es ist in Xylol löslich, aber auch mit Isopropylalkohol und 80%igem Äthylalkohol ohne Trübung mischbar. Diese Eigenschaft ist für Algen besonders günstig, da der vollständige Wasserentzug entfällt. Robustere Formen können wir ohne weitere Vorbereitung aus Isopropylalkohol in Euparal übertragen, für die anderen Arten wählen wir eine schonende Überführung.

Widerstandsfähige Algen (die meisten Blaualgen, Rotalgen, Zieralgen) übertragen wir aus dem Isopropylalkohol direkt in Euparal auf dem Objektträger. Das Deckglas drücken wir etwas an und lassen mäßig beschwert einige Wochen erhärten.

Besser ist das folgende, für alle Algen geeignete Verfahren, das die Algen schonend und allmählich durchtränkt. Dazu bringen wir die Algen aus dem Isopropylalkohol in eine 20%ige Euparal-Isopropylalkohol-Lösung und lassen im Exsikkator den Isopropylalkohol verdunsten und die Euparal-Lösung eindicken. Der Eindickungsvorgang wird dann unterbrochen, wenn das Euparal bei Neigung des Gefäßes nur noch langsam läuft, also die gewohnte Konsistenz eines Einschußharzes erreicht ist. Bei weiterem Eindicken würden die Algen beim Herausnehmen zerreißen. Ist das Euparal einmal zu dickflüssig geworden, verdünnen wir mit einigen Tropfen Isopropylalkohol und warten, bis es wieder die richtige Konsistenz hat.

Als Eindickungsgefäße können wir Blockschälchen nehmen, aber auch jedes andere Gefäß aus Glas oder Metall mit niedriger, möglichst senkrechter Seitenwand, das inhaltlich der ca. 20fachen Algenmenge entspricht. Die 20%ige Euparal-Lösung soll ungefähr das 10fache der Algenmenge betragen. Bei geringen Objektmengen oder einzelligen Formen eignen sich auch die Metallverschlußkappen von Tablettengläsern. Verwenden wir Kunststoffbehälter, so müssen wir prüfen, ob sie gegen die Euparal-Lösungen auch vollkommen neutral sind und sich nicht Lösungsvorgänge abspielen, die zu Trübungen führen. Ich verwende gerne kleine, weithalsige Glasfläschchen mit 2 ml Inhalt. Die Eindickung geht rascher vor sich, wenn wir den Exsikkator warmstellen (bis 30° C).

Eine Eigenart des Euparals aber müssen wir beachten: Es „kriecht“ beim Eindicken aus dem Behälter heraus. Wir können das aber leicht unterbinden, wenn wir den oberen Rand des Eindickungsgefäßes durch Eintauchen in flüssiges Hartparaffin (oder Stearin) mit einem 2–3 mm hohen Paraffinüberzug versehen. Ist das Euparal nun optimal eingedickt, so übertragen wir die Algen in einen Tropfen reines Euparal auf dem Objektträger und legen das Deckglas unter Vermeidung von Luftblasen schräg auf. Nach leichtem Andrücken (unter mikroskopischer Kontrolle) lassen wir das Präparat eben liegen und trocknen. Wir können später einen Lackring anbringen, notwendig für die Haltbarkeit des Präparates ist er aber nicht.

Euparal-Lösung: 1 Raumteil Euparal und 5 Teile Isopropylalkohol, bzw. 80–85%iger Äthylalkohol. Wir stellen uns davon 100 ml Vorratslösung her, die sich gut verschlossen unbegrenzt hält. Isopropylalkohol scheint günstiger zu sein als Äthylalkohol. Das käufliche Euparal hat als Einschlußharz schon die richtige Konsistenz.

Ergebnis: Bei guter Aufhellung ausgezeichnete Haltbarkeit von Form und Färbung der Algen.

Die folgenden Angaben sollten wir bei jedem Einschluß vor dem Auflegen des Deckglases beachten. Unter dem Mikroskop müssen wir die Algen bei schwacher Vergrößerung mit einer Nadel etwas ordnen. Haufen oder Zusammenballungen in Kolonien müssen wir etwas zerteilen, einzelne Zellverbände oder Fäden sollten gut sichtbar sein und sich nicht zu häufig überdecken. Auch Algen, die in Büscheln wachsen, als Wandbeläge oder in Krusten, sind häufig so verfilzt, daß ein Auflockern notwendig wird. Ein zu dichtes Fadengewirr läßt ebenfalls manche Einzelheit nicht erkennen. Die Nadel müssen wir befeuchten (Wasser, Alkohol, Xylol — je nach Einschlußmittel), sonst bringen wir Luftblasen ins Präparat. Auch Textilfasern müssen wir vor dem Einschluß entfernen.

Venetianisches Terpentin

Ebenso gute Eigenschaften wie Euparal hat als Einschlußharz Venetianisches Terpentin, das besonders von Pfeiffer von Wellheim als ideales Einschlußmittel beschrieben und empfohlen wurde.

Die Technik der Überführung in dieses Harz ist die gleiche wie bei Euparal. Wir bringen die Algen aus Isopropylalkohol in die verdünnte Lösung von Venetianischem Terpentin und dicken im Exsikkator in Gläschen mit Paraffinrand ein.

Bild 3: Die Grünalge *Tetraspora lubrica*. Fixierung Chromessigsäure, Färbung Alizarinviridin, Einschluß in Glycerin. Vergr. 205fach.

Venetianische Terpentin-Lösung: 1 Raumteil Venetianisches Terpentin und 4–5 Teile Isopropylalkohol (oder 95%iger Äthylalkohol). Nach der Lösung kommt es anfangs zu einer feinen Trübung, die wir absetzen lassen (nicht filtrieren). Verwendet wird der überstehende klare Teil der Lösung. Wir setzen auch hier 100 ml Vorratslösung an, von der wir ungefähr zwei Drittel verwenden können. Venetianisches Terpentin erhärtet im fertigen Präparat langsamer als Euparal, auch Euparal erhärtet langsamer als Caedax oder Malinol oder ein anderes Kunstharz. Bei Präparaten mit Venetianischem Terpentin sollten wir nach drei Monaten einen Lackring ziehen.

Ergebnis: Bei guter Aufhellung sehr gute Haltbarkeit der Algen in Form und Färbung, von Pfeiffer besonders für seine Eisentinktionen bestimmt.

Caedax

Da Caedax vollkommen neutral ist, hält sich in ihm jede Färbung gut.

Ausführung: Wir bringen die kräftig gefärbten Algen bis in reinen Isopropylalkohol und waschen sie darin mehrmals aus, wie bereits beschrieben. Im letzten Isopropylalkohol bleiben die Algen einen ganzen Tag. Wir wechseln dann den Isopropylalkohol noch einmal und geben dann gleichviel Xylol zu (= 2 ml Isopropylalkohol mit Algen + 2 ml Xylol), das in kurzen Zeitabständen in jeweils kleinen Mengen zugesetzt wird (Zugabe jeweils wenige Tropfen). Nach jeder Zugabe gut durchmischen.



Xylol können wir nur in Glasgefäßen zu-
geben, da viele Kunststoffe sich auflösen.
Nach 15 Minuten wird das Isopropylalko-
hol-Xylol-Gemisch abgegossen (ohne die
Algen) und durch reines Xylol ersetzt, das
wir noch 4–5mal wechseln, mit einer je-
weiligen Einwirkungszeit von ca. 20 Minu-
ten. Anschließend kommen die Algen in
eine 20%ige Lösung von Caedax in Xylol
(zarte Formen 10%ige Lösung). Nun lassen
wir in der Wärme — nicht über 30°C —
das Xylol so weit verdunsten, bis das Harz
die Einschluszkonzentration erreicht hat.
Auch das sollte wieder schonend gesche-
hen; wir werden deshalb den Eindickungs-
vorgang eher verlangsamen als absichtlich
beschleunigen. Als Eindickungsgefäß eig-
nen sich für nicht zu große Algenmengen
Blockschälchen sehr gut, wir können sie
bis auf einen kleinen Spalt abdecken. Ver-
gessen sei nicht, daß wir wieder unter
Staubschutz arbeiten sollten. Für die Cae-
dax-Einbettung ist als Zwischenmittel Iso-
propylalkohol zu verwenden, nicht Äthyl-
alkohol.

Andere Einschußharze

Canadabalsam neutral, Canadabalsam
künstlich, Malinol und andere können wir
ebenfalls verwenden; die Arbeitsweise
weicht nicht von der bei Caedax beschrie-
benen ab.

Bemerkung: Bei allen in Harz eingeschlos-
senen Algen kann es vorkommen, daß die
Zellwand — die ja je nach Algenart eine
so vielfältige Zusammensetzung im Auf-
bau aufweist — so durchsichtig wird, daß
die Zellgrenzen schwer zu erkennen sind.
In diesem Zusammenhang sei auf die gute
Zellwandfärbung Eisenchlorid-Echtgrün
nach Pfeiffer von Wellheim hingewiesen,
die die Zellgrenzen bei vielen Algen in
einem zart olivgrünen Farbton klar er-
kennen läßt. Zu erwähnen wäre auch noch
Mucikarmin, das die Zellwand schwach
rot-violett färbt und Chrysoidin, das
schwach gelb färbt.

Aufbewahrung von gefärbten Algen

Gefärbte und bereits in Harzvorstufen
überführte Algen lassen sich einwandfrei
und praktisch unbegrenzt lange aufbewah-
ren, wenn wir sie nach Überführung in
die 20%ige Euparal-Isopropylalkohol-Lö-
sung mit dieser in ein kleines Weithals-
Fläschchen von 1 bis 2 ml Inhalt geben,
und im Exsikkator das Lösungsmittel voll-
ständig verdunsten lassen. Die Algen sind
dann am Boden des Gefäßes im Harz wie
in einem Dauerpräparat eingeschlossen.
Nach Zugabe der 3–4fachen Lösungsmittel-
menge warten wir bei verschlossenem
Gefäß ruhig ab, bis das Harz eine dünne
Einbettungskonsistenz erreicht hat. In mä-

ßiger Wärme dauert es nicht allzulange.
Besonders bei Fadenalgen dürfen wir nicht
umrühren, da wir sie dadurch zerstören.
So können wir nach beliebig langer Zeit
wieder mühelos Dauerpräparate herstellen.
Vor allem Algen mit gut gelungener Fär-
bung, die nicht mehr zu Präparaten ge-
braucht werden, können wir auf diese
Weise gut für später aufbewahren.
Genauso verfahren wir, wenn Algen in
Venetianischem Terpentin-Isopropylalko-
hol oder in Caedax-Xylol liegen. Wir dür-
fen nur nicht vergessen, die Behälter gut
zu verschließen und genau zu beschriften.

Schlußbemerkungen

Die ganze Algentechnik, besonders die
Harzeinbettung, mag zuerst etwas um-
ständlich erscheinen. Doch erfordert jeder
Arbeitsgang eigentlich nur wenige Hand-
griffe und nimmt wenig Zeit in Anspruch.
Es werden nur Hilfsmittel gebraucht, die
jeder Mikroskopiker schon besitzt.

Die Überführung der Algen in Glycerin
und Alkohole sowie die Harzdurchträn-
kung wurden ausführlich behandelt, denn
diese Verfahren sind Voraussetzung für
das Gelingen der Harzeinbettung. Wer sich
darin einmal eingearbeitet hat, wird stau-
nen, wieviele Algenarten sich mühelos in
Harze einbetten lassen.

Alle Mikrofotos wurden mit einem selbst-
gebauten Gerät aufgenommen. Optik:
Achromatische Objektive 10- und 40fach
(Will-Optik), Periplan-Okular 10fach. Ne-
gativmaterial: Agfapan 25 Professional,
15 DIN, 6×9 cm. Grünfilter Lifa P0 und
P1. Leuchte: 100 Watt Osram-Silica (ohne
Kollektor).

Mehrere der beschriebenen Methoden ent-
standen vor Jahren (1930–1932) in Ge-
meinschaft mit Franz Eckert, Ingolstadt.
Ihm sei an dieser Stelle dafür herzlichst
gedankt.

Literaturhinweis:

Eckert, F. u. R. Lindauer: Die Präparationstech-
nik der Süßwasseralgen, Wegner-Verlag, 1934.

Verfasser: Dr. Rudolf Lindauer, 843 Neumarkt,
Schindlerstr. 6.

Der 1. Teil dieser Arbeit „Die Fixierung“ er-
schien in Mikrokosmos 64, S. 79–85, H. 3, 1975;
der 2. Teil „Färbung I“ in Mikrokosmos 64, S. 118
bis 123, H. 4, 1975; der 3. Teil „Färbung II“ in
Mikrokosmos 64, S. 151–155, H. 5, 1975; der 4. Teil
„Mehrfachfärbungen“ in Mikrokosmos 64, S. 218
bis 222, H. 7, 1975; der 5. Teil „Die Entwässerung“
in Mikrokosmos 64, S. 243–235, H. 8, 1975; der
6. Teil „Einschluß in wasserlösliche Einschuß-
mittel — Lackabschluß“ in Mikrokosmos 64, S. 314
bis 318, H. 10, 1975.

geschichtetes Sediment. Es muß schon sehr viel Aufmerksamkeit aufgewendet werden, um ein derart kleines Objekt im Gestein zu erkennen. Bei derartigen Objekten kann es sich wohl immer nur um ausgesprochene Zufallsfunde handeln.

Bei der mikroskopischen Betrachtung, besonders aber auch bei der Fotografie, spielt die Beleuchtung eine große Rolle. Je nach dem Einfallswinkel des Beleuchtungsstrahles treten stets verschiedene Details stärker in den Vordergrund, es ist daher zweckmäßig, um den günstigsten Beleuchtungswinkel ausfindig zu machen, die Leuchte kontinuierlich zu schwenken. Ich habe auch eine zeichnerische Darstellung versucht und dabei die Erfahrung gemacht, daß auch bei Auflichtbeleuchtung der Abbesche Zeichenapparat sehr wohl angewendet werden kann, es muß nur eine entsprechend helle Lichtquelle zur Verfügung stehen.

Am Objekt selbst sind deutlich die drei Abschnitte: Kopf, Brust und Hinterleib zu erkennen. Der Hinterleib zeigt die typische Segmentierung. Von den Extremitäten ist besonders ein Flügel mit gut sichtbarer Äderung bemerkenswert. Ein vom Kopfstück verlaufender, schwach gekrümmter dunkler Strich stellt möglicherweise den Rest eines Fühlers dar. Dem großen Flügel gegenüberliegend ist ein weiteres, flächiges Gebilde sichtbar, wahrscheinlich ein Hinterflügel, oder aber auch ein Bruchstück des zweiten Flügels.

Wenn man sich vor Augen hält, welche günstigen Umstände notwendig waren, um dieses zarte Tierchen über so lange Zeiträume zu „konservieren“, kann man nur staunen über die Vielzahl der noch erkennbaren Einzelheiten.

Verfasser: Rupert Lenzenweger, Schloßberg 16, A-4910 Ried/Innkreis, Österreich.

Winke fürs Labor

Rudolf Lindauer

Dauerpräparate von Süßwasseralgen

Methodenübersicht — geordnet nach Algenklassen

Aus der fast verwirrenden Vielzahl der in dieser Serie* beschriebenen Methoden zur Herstellung von Dauerpräparaten der Algen sind im folgenden einige herausgegriffen und nach Algenklassen geordnet. Die Technik ist nur in Stichworten angegeben; der genaue Arbeitsgang ist in dem betreffenden Kapitel ausführlich erläutert. Haben wir danach eine Methode ausgewählt, so schreiben wir uns am besten nach den vorher geschilderten ausführlichen Angaben den Arbeitsgang genau und lückenlos heraus. — Bei ein- oder nur wenigzelligen Algen, die sich dann langsam senken, müssen wir mit der Zentrifuge arbeiten, wenn eine kurze Arbeitszeit erforderlich ist. Wenn auch für viele Algen der Einschuß in Caedax möglich ist, so ist die Einbettung in Euparal oder Venetianisches Terpentin doch schonender, da hier die Xyloldurchtränkung entfällt. Blaualgen, Zieralgen,

Kieselalgen und Süßwasser-Rotalgen sind auch gegenüber Xylol sehr widerstandsfähig, daher ist hier der Einschuß in Caedax gut möglich.

Im Anhang werden auch Präparationsmethoden für Flagellaten beschrieben, die in den vorangegangenen Ausführungen nicht berücksichtigt wurden.

Blaualgen (Cyanophyta)

Präparate mit Erhaltung der natürlichen Farbe

1. Pfeiffers Gemisch — Glycerin — Einschuß in 80%iges Glycerin mit Zusatz von Kupferchlorid und Kupferacetat.
2. Jodglyzerin (III) — Einschuß in Glycerin mit Zusatz von Kupferchlorid und Kupferacetat.
3. Oscillatorien: wie vorher, Einschuß in Glycerin (ohne Zusätze).
4. 2%iges Formaldehyd — Einschuß in Glycerin (Oscillatorien).

* Die Serie: „Dauerpräparate von Süßwasseralgen“ erschien in den Mikrokosmos-Jahrgängen 64 und 65. Siehe auch S. 124.

Präparate von gefärbten Algen

5. Pfeiffers Gemisch — Alizarinviridin — Einschluß in Glycerin oder (besser) in Harze (Euparal, Venetianisches Terpentin, Caedax).
6. Chromessigsäure nach Flemming — Alizarinviridin — Einschluß in Harze (auch Glycerin).
7. Fixierung mit Chromessigsäure und Zinkchlorid-Eisessig — Hämaun und Alizarinviridin — Einschluß in Harze (auch Glycerin neutral).
8. Chromessigsäure nach Flemming — Azokarmin B — Einschluß in Harze.
9. Chromessigsäure nach Flemming — Goldimprägnation mit (oder ohne) Alizarinviridin-Nachfärbung — Einschluß in Glycerin, Harze.
10. Chromessigsäure nach Flemming — Anilinblau-Erythrosin (Eosin) — Einschluß in Harze (Venetianisches Terpentin).
11. Chromessigsäure nach Flemming oder Pfeiffers Gemisch — Eisentinktion Echtgrün-Indulin oder Gallein, Einschluß in Harze.

Blualgen mit Gallertscheiden

12. Pfeiffers Gemisch — Hämaun nach Mayer (kräftig färben) — Einschluß in Glycerin neutral (oder in Harze).
 13. Pfeiffers Gemisch — Alizarinviridin-Muzikarmin — Einschluß in Glycerin.
- Bemerkungen: Blualgen sind sehr widerstandsfähig. Sie können direkt in 50%igen und dann in 70%igem Äthylalkohol übertragen werden und darin 24 Stunden und länger liegen. In 96%igem Äthylalkohol oder in Isopropylalkohol lassen wir sie nicht länger als eine Stunde, da sie sonst spröde und brüchig werden können. Von hier können wir sie direkt in Euparal oder Venetianisches Terpentin übertragen oder in den verdünnten Lösungen darin eindicken. Auch der Einschluß in Caedax über die Xylol-Zwischenstufen gelingt einwandfrei.

Jochalgen (Conjugatophyceae)

Präparate mit Erhaltung der natürlichen Farbe

14. Pfeiffers Gemisch — Einschluß in Glycerin mit Zusatz von Kupferchlorid und Kupferacetat oder Kupferlaktophenol.

Präparate von gefärbten Algen

Fadenförmige (Zygnemales — *Spirogyra*, *Zygnema* u. a.)

15. Chromessigsäure nach Flemming — Alizarinviridin — Einschluß in Harze

- (Euparal, Venetianisches Terpentin).
16. Chromessigsäure nach Flemming — Goldimprägnation-Lichtgrün — Einschluß in Harze.
 17. Chromessigsäure nach Flemming — Goldimprägnation-Echtgrün, Einschluß in Harze.
 18. Chromessigsäure nach Flemming — Anilinblau-Erythrosin (Eosin), Einschluß in Harze.
 19. Doppelfixierung (Fixierung mit Chromessigsäure und Zinkchlorid-Eisessig) — Hämaun-Alizarinviridin — Einschluß in Harze.
 20. Doppelfixierung — Hämaun-Echtgrün — Einschluß in Harze.
 21. Doppelfixierung — Hämaun-Safranin — Einschluß in Harze.
 22. Chromessigsäure nach Flemming oder Doppelfixierung — Kernschwarz-Alizarinviridin, Einschluß in Harze.
 23. Chromessigsäure nach Flemming oder Pfeiffers Gemisch — Echtgrün-Indulin (oder Gallein) — Einschluß in Harze.
 24. Chromessigsäure nach Flemming — Kernechtrot — Einschluß in Harze.

Zieralgen (Desmidiaceae)

25. Doppelfixierung (Chromessigsäure und Zinkchlorid-Eisessig) — Hämaun (oder Kernschwarz) -Alizarinviridin — Einschluß in Harze.
26. Chromessigsäure nach Flemming — Goldimprägnation-Lichtgrün oder Alizarinviridin — Einschluß in Harze.
27. Chromessigsäure nach Flemming — Goldimprägnation-Echtgrün — Einschluß in Harze.
28. Chromessigsäure nach Flemming — Anilinblau-Erythrosin — Einschluß in Harze.

Bemerkungen: Die Zieralgen sind meist widerstandsfähig und vertragen eine vorsichtige Überführung in Xylol gut für den Einschluß in Caedax. Die fadenförmigen Zygnemales müssen wir jedoch schonend in Harze (Euparal, Venetianisches Terpentin) überführen.

Grünalgen (Chlorophyta)

Präparate mit Erhaltung der natürlichen Farbe

29. Pfeiffers Gemisch — Glycerin — Einschluß in Glycerin mit Zusatz von Kupferchlorid und Kupferacetat.
30. Kupferlaktophenol — Einschluß in Kupferlaktophenol oder Glycerin mit Zusatz von Kupferchlorid und Kupferacetat.

Präparate von gefärbten Algen

31. Pfeiffers Gemisch — Alizarinviridin —

- Einschluß in Glyzerin oder Harze (Euparal, Venetianisches Terpentin, Caedax).
32. Chromessigsäure nach Flemming — Alizarinviridin — Einschluß in Harze (oder Glyzerin).
 33. Doppelfixierung (Chromessigsäure und Zinkchlorid-Eisessig) oder Chromessigsäure nach Flemming — Hämaun-Alizarinviridin — Einschluß in Harze oder Glyzerin neutral.
 34. Doppelfixierung (Chromessigsäure und Zinkchlorid-Eisessig) — Hämaun-Saffranin — Einschluß in Harze.
 35. Chromessigsäure nach Flemming — Goldimprägnierung-Alizarinviridin — Einschluß in Harze (oder Glyzerin).
 36. Chromessigsäure nach Flemming — Goldimprägnierung-Echtgrün — Einschluß in Harze (Venetianisches Terpentin).
 37. Chromessigsäure nach Flemming — Goldimprägnierung-Lichtgrün — Einschluß in Harze (Caedax).
 38. Chromessigsäure nach Flemming oder Doppelfixierung — Anilinblau-Erythrosin — Einschluß in Harze.
 39. Chromessigsäure nach Flemming oder Pfeiffers Gemisch — Echtgrün-Indulin (oder Gallein) — Einschluß in Harze.
 40. Chromessigsäure nach Flemming oder Doppelfixierung — Kernechtrot — Einschluß in Harze (oder Glyzerin).

Bemerkungen: Alle Grünalgen haben meist zarte Zellwände und müssen durch das Senkungs- oder Eindickungsverfahren schonend in konzentriertes Glyzerin überführt werden und daraus erst in Alkohole. Dem Einschluß in Harze geht die Überführung in die Harzlösung und das Eindicken darin voraus.

Kieselalgen (Diatomeae)

Präparate mit Erhaltung der natürlichen Farben

41. Pfeiffers Gemisch — Glyzerin — Einschluß in Glyzerin.

Präparate von gefärbten Algen

42. Chromessigsäure nach Flemming (oder Pfeiffers Gemisch) — Alizarinviridin — Einschluß in Harze (Euparal, Caedax) oder Glyzerin.
43. Chromessigsäure nach Flemming — Goldimprägnierung-Echtgrün oder Lichtgrün — Einschluß in Harze (Venetianisches Terpentin bzw. Caedax).
44. Doppelfixierung (Chromessigsäure und Zinkchlorid-Eisessig) — Hämaun-Alizarinviridin — Einschluß in Harze.
45. Chromessigsäure nach Flemming — Kernechtrot — Einschluß in Harze (Euparal).

46. Chromessigsäure nach Flemming — Anilinblau-Erythrosin — Einschluß in Harze.

47. Chromessigsäure nach Flemming oder Pfeiffers Gemisch — Echtgrün-Indulin (oder Gallein) — Einschluß in Harze.

Bemerkungen: Da sich Kieselalgen nur langsam absetzen, ist zur Verarbeitung eine Zentrifuge erforderlich. Gefärbte Kieselalgen können wir über Isopropylalkohol — Äthylglykol — Benzol auch in Styrax (für Diatomeen) einschließen. Das fertige Präparat erhärtet aber sehr langsam, da eine stärkere Erwärmung nicht möglich ist.

Süßwasser-Rotalgen (*Rhodophyta* — *Chamansea*, *Thorea*, *Batrachospermum* u. a.)

Präparate mit Erhaltung der natürlichen Farbe

48. Pfeiffers Gemisch — Einschluß in Glyzerin mit Zusatz von Kupferchlorid und Kupferacetat oder Kupferlactophenol.

Präparate von gefärbten Algen

49. Chromessigsäure nach Flemming oder Pfeiffers Gemisch — Alizarinviridin — Einschluß in Harze (Euparal) oder Glyzerin.
50. Chromessigsäure nach Flemming — Azokarmin B — Einschluß in Harze (Euparal).
51. Chromessigsäure nach Flemming — Goldimprägnierung-Lichtgrün — Einschluß in Harze (Caedax).
52. Chromessigsäure nach Flemming — Goldimprägnierung-Echtgrün (oder Alizarinviridin) — Einschluß in Harze (Venetianisches Terpentin, Euparal).
53. Chromessigsäure nach Flemming — Kernechtrot — Einschluß in Harze (Caedax).
54. Chromessigsäure nach Flemming — Anilinblau-Erythrosin — Einschluß in Harze (Caedax).

Bemerkungen: Rotalgen sind widerstandsfähig, wir können sie aus Wasser direkt in 50%igen, 70%igen und dann in 96%igen Alkohol übertragen und vom letzten Isopropylalkohol direkt in die Einschlußharze, oder über Xylol auch in Caedax. Schonender ist jedoch das Verfahren über die Glyzerin-Durchtränkung.

Algen (alle Klassen) mit Gallerthüllen und Scheiden

55. Pfeiffers Gemisch — Alizarinviridin-Muzikarmin — Einschluß in Glyzerin oder Harze.

Anhang: Flagellaten (alle Methoden nach Eckert).

Chrysomonaden

1. Pikrinsäure (1%/ig wäßrig) — Alizarinviridin (oder Erythrosin) — Einschuß in Glycerin (oder Euparal).
2. Pikrinsäure — Hämalun — Einschuß in Glycerin neutral.

Dinoflagellaten

3. Chromessigsäure nach Flemming — Kernechtrot — Einschuß in Euparal oder Venetianisches Terpentin über Isopropylalkohol.
4. Chromessigsäure nach Flemming — Goldimprägnierung-Echtgrün (oder Lichtgrün) Einschuß in Venetianisches Terpentin über Isopropylalkohol.
5. Chromessigsäure nach Flemming — Goldimprägnierung-Lichtgrün — Einschuß in Caedax (über Isopropylalkohol-Xylol).
6. Doppelfixierung (Chromessigsäure und Zinkchlorid-Eisessig) — Hämalun-Echtgrün — Einschuß in Caedax.
7. Chromessigsäure nach Flemming — Anilinblau-Erythrosin — Einschuß in Venetianisches Terpentin über Isopropylalkohol.

Volvocales (Volvox, Eudorina u. a.)

8. Chromessigsäure nach Flemming — Alizarinviridin — Einschuß in Glycerin.
9. Chromessigsäure nach Flemming — Goldimprägnierung — Einschuß in Glycerin.
10. 1%/ige Chromsäure — Gentianaviolett — Einschuß in Kaliumacetat (Gentianaviolett: 1% in 10% Äthylalkohol, Färbedauer eine halbe bis zwei Stunden. Kaliumacetat (chemisch rein, neutral) 50%/ig in destilliertem Wasser).

11. Chromessigsäure nach Flemming — Goldimprägnierung-Hämatoxylin — Einschuß in Glycerin neutral.

Euglenen (Augenflagellaten)

12. 2%/iges Formaldehyd — Alizarinviridin — Einschuß in Glycerin oder Venetianisches Terpentin.
13. Sublimat-Eisessig — Hämalun-Alizarinviridin — Einschuß in Glycerin neutral.
14. Sublimat-Eisessig — Goldimprägnierung-Lichtgrün (oder Alizarinviridin) — Einschuß in Glycerin oder Venetianisches Terpentin.

Bemerkungen: Jeder Flüssigkeitswechsel muß mit der Zentrifuge vorgenommen werden. Alle Formen — außer den Volvocales — können wir auch bei sehr vorsichtiger und schonender Überführung in Harze einschließen, *Volvox* nur in wäßrige Einschußmittel (Glycerin, Kaliumacetat). Um *Volvox* nicht zu zerdrücken, müssen wir zur Einbettung den Abschluß nach Migula anwenden und genügend hohe Lackringe (mehrere übereinander) anbringen.

Die Artikelreihe „Dauerpräparate von Süßwasseralgen“ erschien in den Mikrokosmos-Jahrgängen 64 und 65, 1975 und 1976:

- I. „Die Fixierung“ Mikrokosmos 64, S. 79–85, H. 3, 1975.
- II. „Färbung I“, Mikrokosmos 64, S. 118–123, H. 4, 1975.
- III. „Färbung II“, Mikrokosmos 64, S. 151–155, H. 5, 1975.
- IV. „Mehrfachfärbungen“, Mikrokosmos 64, S. 218–222, H. 7, 1975.
- V. „Die Entwässerung“, Mikrokosmos 64, S. 235 bis 243, H. 8, 1975.
- VI. „Einschuß in wasserlösliche Einschußmittel — Lackabschuß“, Mikrokosmos 64, S. 314 bis 318, H. 10, 1975.
- VII. „Einschuß in Harze“, Mikrokosmos 65, S. 20–24, H. 1, 1976.

Verfasser: Dr. Rudolf Lindauer, Schindlerstraße 6, 8430 Neumarkt.

Bücherschau

Daecke, H.: Chromatographie unter besonderer Berücksichtigung der Papier- und Dünnschicht-Chromatographie, 106 S. Diesterweg-Salle, Frankfurt, 1974.

Das in der „Schriftenreihe Chemie“ des o. g. Verlages gut eingeführte Praktikumsbuch von Daecke erscheint nun, stark überarbeitet, auch äußerlich in neuem Gewande, d. h. als „Ringbuch“.

Nach Behandlung der Definitionen, Einteilung und Grundprinzipien der chromatographischen Arbeitsverfahren werden zunächst allgemein (mit kurzen Hinweisen einiger grundlegender Demonstrationsversuche) die technischen Methoden der Säulen-, vor allem aber der Papier(PC)- und Dünnschichtchromatographie (DC) eingehend besprochen (49 S.).