

Die Verwendung von Kupfersalzen zur Herstellung von *Paramaecium*-Präparaten.

Von

Hugo Merton (Heidelberg).

(Hierzu 8 Textfiguren.)

1. Einleitung.

Die Versuche, über die hier berichtet werden soll, wurden zuerst an Stentoren vorgenommen; dieselben haben aber noch nicht zu völlig befriedigenden Resultaten geführt und konnten daher noch nicht abgeschlossen werden. Da andererseits ähnliche Versuche mit Paramäcien (*Paramaecium caudatum*) brauchbare positive Resultate gezeitigt haben, schien es richtig, sie jetzt zu veröffentlichen, zumal ich annehmen darf und hoffe, daß diese so leicht ausführbaren Methoden sowohl im Unterricht als auch bei speziellen Untersuchungen an *Paramaecium* oder an anderen Infusorien Verwendung finden werden.

An den üblichen *Paramaecium*-Präparaten sind außer den Kernen kaum Einzelheiten zu erkennen; allenfalls sind einige Vakuolen gerade zu ahnen, von den Wimpern ist nichts mehr zu sehen, und die an sich so charakteristische Gestalt ist fast nie vollkommen erhalten geblieben. Das Aussehen der Paramäcien im fertigen Präparat ist somit in der Regel wenig erfreulich. Vor allem die Art der Fixierung scheint an dem ungünstigen Erhaltungszustand schuld zu sein. Diese Überlegung war für mich der Anlaß, auszuprobieren, ob es nicht möglich sei, durch eine der Fixierung vorausgehende Vorbehandlung zu verhindern, daß die Paramäcien sich derart nachteilig verändern.

Verschiedene Angaben aus der Literatur legten es nahe, zu diesem Zweck Schwermetallsalze zu verwenden. Bei verschiedenen, be-

sonders empfindlichen Meerestieren, wie Siphonophoren, Medusen, Salpen u. a. sind Lösungen von Kupfersulfat und andere Kupfer-salze und Eisenchlorid mit Erfolg angewandt worden, wenn es galt, die Gestalt der betreffenden Tiere in möglichst natürlichem Zustand zu erhalten. Außerdem liegen Angaben vor, daß diese Salze auch zur mikroskopischen Untersuchung als wertvolle Hilfsmittel verwandt worden sind. So hat sich nach FOL die Verwendung von Eisenchlorid in alkoholischer Lösung zur Fixierung von Cilien und Pseudopodien bewährt, und die Verwendung von Kupferacetat und Kupferchlorid wird zur Untersuchung frischer empfindlicher Pflanzenzellen empfohlen, wobei nur die vorübergehende Erhaltung der Zellen in Frage kam.

Es wurden daher zunächst einige orientierende Vorversuche vorgenommen, um festzustellen, welche Wirkung Eisen- und Kupfer-salze auf die Paramäcien haben; es zeigte sich bald, daß bei geeigneter Auswahl eine Methode gefunden werden kann, welche es ermöglicht, die Paramäcien mit gut erhaltener Gestalt zu fixieren. Schon diese ersten Versuche waren in ihrem Ergebnis direkt überraschend, da durch Verwendung dieser Metallsalze jegliche Verkürzung der Paramäcien verhindert und ein lebensähnlicher Erhaltungszustand erreicht werden kann. Bei diesen Vorversuchen eröffnete sich noch eine weitere Möglichkeit, die zunächst nicht ins Auge gefaßt worden war. Es stellte sich nämlich heraus, daß bei Verwendung vor allem von Kupfersalzen ein Teil der Paramäcien auf dem Tragglas haften blieb. Diese Feststellung schien mir sehr wichtig und war bestimmend für den weiter einzuschlagenden Weg, dessen Ziel es jetzt war, eine Methode ausfindig zu machen, durch welche die Paramäcien in gut erhaltenem Zustand fixiert wurden und gleichzeitig dabei auf dem Tragglas festklebten. Es mußte dann möglich sein, die Paramäcien wie aufgeklebte Schnitte weiter zu behandeln; jegliches Zentrifugieren und Pipettieren war dann nicht mehr nötig.

Die einzige mir bekannte Untersuchung, in der auch Paramäcien auf das Tragglas aufgeklebt und weiterbehandelt worden sind, ist die von BOZLER¹⁾, der die Paramäcien mit starkem FLEMMING'schen Gemisch 2 Minuten lang fixierte, wobei ein Teil der Paramäcien am Tragglas haftete und sodann mit Eisenhämatoxylin gefärbt werden konnte.

¹⁾ E. BOZLER, Über die Morphologie der Ernährungsorganellen und die Physiologie der Nahrungsaufnahme bei *Paramaecium caudatum*. Arch. f. Protistenk. Bd. 49 p. 24.

2. Die Wirkung der Kupfersalze auf die Paramäcien.

Von Eisensalzen wurden nur Lösungen verschiedener Konzentration von Eisenchlorid und Eisenalaun (Eisenammoniak-Alaun) wie er für die HEIDENHAIN'sche Eisenhämatoxylin-Färbung verwandt wird, ausprobiert. In ihrer gestalterhaltenden Wirkung leisten sie das gleiche wie die Kupfersalze, sind also in Konzentrationen von $\frac{1}{2}$ —1 Proz. sehr geeignet, um die Paramäcien in unbeweglichem Zustand etwa 10 Minuten lang zu beobachten. Da diese sich aber nach der Einwirkung von Eisensalzen bei der Weiterbehandlung



Fig. 1. a Drei Paramäcien mit gut erhaltener Gestalt; die zum Cytostom ziehende Einsenkung, die Peristommelde, ist zu erkennen. 1,5 Proz. Kupferacetat 1 Min., Osmiumsäuredämpfe 45 Sek., Sublimat 10 Min., Alaunkarmin 12 Min., Anilinblau-Orange 3 Min. b Ein *Paramaecium* 30 Sek., in 1,5 Proz. Kupferacetat und dann in Jodwasser.

fast sämtlich vom Tragglass wieder ablösen, wurde davon abgesehen, auf diesem Wege Dauerpräparate herzustellen.

Von Kupfersalzen wurden Kupfersulfat, Kupferchlorid und Kupferacetat in verschiedenen Konzentrationen durchprobiert, und zwar zeigte es sich bald, daß bei Kupferchlorid nicht unter Konzentrationen von 0,4 Proz., bei Kupfersulfat nicht unter 0,5 Proz. und auch bei Kupferacetat nicht unter 0,5 Proz. herabgegangen werden darf, wenn ein Teil der Paramäcien seine Gestalt bewahren soll. Mit allen schwächeren Konzentrationen wird dieser Zweck nicht mehr erreicht; die Paramäcien erscheinen dann breit und

nicht mehr natürlich. Nach oben wurde nicht über Lösungen von 1,5 Proz. hinausgegangen, und zwar aus dem einfachen Grunde, weil in diesen Konzentrationen die Paramäcien schon nach einer Einwirkungsdauer von 1—2 Minuten im umgekehrten Sinne deformiert werden, zunächst zusehends schlanker wurden und sehr bald Längsfalten und Buckel und Wellen an ihrer Oberfläche bekommen und so immer mehr an Volumen einbüßen, wie etwa ein Froscherythrocyt in einer hypertonischen Salzlösung. Die besondere Wirkung der Kupfer- und auch der Eisensalze auf die Paramäcien beruht ziemlich sicher nicht darauf, daß auf der gesamten Oberfläche der Pellicula ein feiner, unsichtbarer Niederschlag entsteht, sondern, daß die Oberflächenschicht durch das Metallsalz gefällt wird und dabei so stark abgedichtet und verfestigt wird, daß das Tier sich nicht mehr zu kontrahieren vermag. Wir sind daher wohl berechtigt, anzunehmen, daß zunächst etwa das Ectoplasma von dem Kupfersalz gefällt wird. Ist die Gesamtkonzentration (Salzlösung + Kulturtropfen) niedriger als $\frac{1}{2}$ Proz., dann reicht die Verfestigung der Oberflächenschicht nicht aus, um gegen die Kontraktionskraft des *Paramaecium*s genügend Widerstand zu bieten. Da bei Zusatz eines Tropfens einer 1proz. Kupfersulfatlösung zu einem Tropfen *Paramaecium*-Kultur nicht in allen Teilen die Konzentration genügend stark ist, wird sich immer auch dann noch ein Teil der Paramäcien kontrahieren. Je stärker die verwandte Kupfersalzlösung ist, um so stärker ist auch die Fällung; die gefällte Ectoplasmaschicht wirkt dann wie eine semipermeable Membran, indem offensichtlich Wasser nach außen tritt, so daß die Paramäcien bald zusammenschrumpfen. Durch Überführung in destilliertes Wasser kann dieser Prozeß rückgängig gemacht und die Oberfläche des *Paramaecium*s wieder glatt werden.

Von Interesse ist auch die Wirkung der Kupfersalzlösungen auf das Verhalten verschiedener Organellen der Paramäcien. Bei Zusatz eines Tropfens 1proz. Kupfersulfatlösung zu einem *Paramaecium*-Tropfen schlagen die Wimpern noch eine Zeitlang, nachdem die Paramäcien schon ihre Bewegung eingestellt haben, und wenn die Wimpern des größten Teiles der Körperoberfläche schon stillstehen, dann schlagen die des Peristomfeldes noch kräftig weiter, wohl ein Zeichen dafür, daß sie mit größerer Energie bewegt werden. In stärkeren Kupfersalzlösungen schlagen unter Umständen nur noch die Peristomwimpern kurze Zeit.

Auffallender noch und bemerkenswert ist das Verhalten der kontraktilen Vakuolen in $\frac{1}{2}$ proz. Kupfersulfatlösung. Es

zeigte sich, daß bei den immobilisierten Paramäcien die kontraktilen Vakuolen noch 4 Minuten lang zu abnormer Größe anschwellen können, dann nehmen sie wieder langsam an Volumen ab und können 10 Minuten nach Zusatz des Kupfersulfats unsichtbar sein. Es kann unter Umständen auch neben einer vorhandenen noch eine zweite kontraktile Vakuole auftreten (siehe Fig. 3, rechtes *Paramaecium*). Dieses Verhalten der kontraktilen Vakuolen ist so zu erklären, daß infolge Erstarrung der gesamten Körperoberfläche, den Paramäcien die Möglichkeit genommen wird, ihren Inhalt nach außen zu entleeren. Aus der Tatsache, daß die kontraktilen Vakuolen in Kupfersulfatlösung noch anschwellen, muß weiterhin gefolgert werden, daß die Paramäcien zunächst nur an ihrer Oberfläche abgetötet worden sind, während ihr Zelleib größtenteils noch am Leben ist. Damit wird die oben geäußerte Vermutung bestätigt, daß zunächst nur die Ectoplasmaschicht von der Kupfersalzlösung gefällt wird. Durch diese erstarrte Ectoplasmaschicht dringt die Kupferlösung nur allmählich in das Entoplasma ein, das daher erst später absterbt. Ein verschiedenes Verhalten von Ecto- und Entoplasma konnte auch für *Stentor coeruleus* in 1 proz. Kupfersulfatlösung festgestellt werden; hier erstarren zunächst die Tiere im



Fig. 2. a *Paramaecium* mit scharfen Konturen. 1,5 Proz. Kupfersulfat 2 Min., Holzessigdämpfe 10 Min., Sublimat 10 Min. Alaunkarmin, Anilinblau-Orange. b Desgl. Am Vorderende sind die Trichocysten zu sehen. $\frac{1}{2}$ Proz. Kupfersulfat 6 Min., Osmiumsäuredämpfe 25 Min., EHRLICH-sches Hämatoxylin 45 Min. Salzsäurealkohol.

halbgestreckten Zustand, kontrahieren sich aber noch nach etwa 7 Minuten bei Zusatz eines Fixierungsmittels, um dann zu sterben. Die hier mitgeteilten Beobachtungen über die kontraktilen Vakuolen bedürfen noch insofern einer gewissen Einschränkung, als sie deutlich nur an solchen Paramäcien gemacht werden können, die längsgestreckt geblieben sind, aber nicht ganz schlanke Form haben. Bei schlanken Paramäcien nehmen dagegen die kontraktilen Vakuolen in $\frac{1}{2}$ proz. Kupfersulfat kaum mehr an Volumen zu und werden

bald unsichtbar; Entsprechendes ist an den meisten Paramäcien in Kupfersalzlösungen in stärkerer Konzentration zu beobachten. Bei Paramäcien, die dagegen auch noch längsgestreckt, aber dabei eher breit geblieben waren, können die ziemlich großen Vakuolen erhalten bleiben, und Entsprechendes gilt für verkürzte Paramäcien. Dieses verschiedene Verhalten der kontraktilen Vakuolen ist so zu erklären: bei den schlanken Paramäcien, einerlei in welcher Kupfersalzlösung, ist die Oberflächenschicht am stärksten abgedichtet, infolgedessen wandert hier schon bald mehr Wasser nach außen (Schrumpfung) als Kupfersalzteilchen nach innen; infolgedessen steht für das Anwachsen der kontraktilen Vakuolen kein Wasser zur Verfügung. Wann bei solchen Paramäcien der Zelleib ganz abstirbt, war nicht zu ermitteln, auch bei Dunkelfeldbeleuchtung nicht, da die Oberflächenschicht zusehends stärker lichtbrechend wird. Bei Paramäcien mit zunächst anwachsenden kontraktilen Vakuolen ist dieses Anwachsen möglich, da die Abdichtung der Oberfläche hier geringer ist und zunächst kein Wasser nach außen wandert. Bei den verkürzten Paramäcien schließlich ist die Abdichtung so gering, daß das Kupfersulfat rascher einzudringen vermag, und der Zelleib der Paramäcien mit seinen angeschwellenen, kontraktilen Vakuolen in diesem Zustand abgetötet wird.

Vergleichsweise wurden kurz Versuche mit Chlorkalzium in ähnlichen Konzentrationen ausgeführt, um festzustellen, ob durch die Abdichtung der Oberflächenschicht der Paramäcien, die diesem Salze eigentümlich ist, eine ähnliche Wirkung erzielt werden kann, wie mit Kupfersalzen. In Konzentrationen von 1—2 Proz. starben die Paramäcien, ohne ihre Gestalt zu bewahren; die meisten aber zerplatzten in diesen Lösungen.

3. Die Verwendung von Kupfersalzen zur Konservierung der Paramäcien.

Wenn man einem Tropfen Kulturwasser mit Paramäcien einen gleich großen Tropfen von 1 proz. Kupfersulfat hinzufügt, dann wird ein Teil der Paramäcien sogleich immobilisiert, andere schwimmen noch lebhaft herum, und es kann bis zu 2 Minuten dauern, bis alle Paramäcien bewegungslos sind. Ihr verschiedenes Verhalten beruht darauf, daß nur diejenigen, die gleich mit der unverdünnten Kupfersalzlösung in Berührung kommen, still stehen, die übrigen aber an Stellen geringerer Konzentration noch herumschwimmen. Schließlich streben sie irgendwo der Oberfläche des Tropfens zu, ohne dieselbe

immer zu erreichen; bevor sie ihre Bewegungen einstellen, schaukeln sie vielfach hin und her oder rotieren um einen Punkt, wobei ihr Vorder- oder ihr Hinterende im Drehpunkt liegt. Ein Teil der Paramäcien haftet nun an dem Tragglass, andere an der freien Oberfläche des Tropfens, die meisten sind in dem Flüssigkeitstropfen suspendiert. Entsprechend verhielten sich kleine Stylonychien, die wesentlich längere Zeit in den Kupfersalzlösungen herum-schwammen. Am besten wird die Gestalt derjenigen Paramäcien erhalten, die ziemlich schnell nach Zusatz des Kupfersalztropfens immobilisiert werden, weniger gut bei denjenigen, die erst nach einer gewissen Einwirkungsdauer zum Stillstand kommen. Von diesen können einige unter Umständen die äußerste Peripherie des Tropfens erreichen und sich hier, wenn derselbe sehr flach ist, stark abplattten (Fig 3 und 4). Wenn sie nicht weiter deformiert sind, läßt sich an ihnen manches besser erkennen als an solchen mit gut erhaltener Gestalt; meistens haften erstere besonders fest an der Oberfläche des Tragglases.

Aus diesem verschiedenen Verhalten der Paramäcien geht auch hervor, daß die Gestalt des Tropfens für das Gelingen eines Präparates von großem Einfluß ist, und daß es von Vorteil ist, wenn sich der Tropfen möglichst ausbreitet. An sich genügt es, wenn ein peinlich sauberes Tragglass zur Herstellung eines *Paramaecium*-Präparates verwandt wird. Es ist aber anzuraten, um eine Ausbreitung des Tropfens immer sicher zu erreichen, den mittleren Teil des Tragglases ziemlich breit mit Eiweißglycerin einzureiben und zwar ein wenig stärker als es sonst beim Aufkleben



Fig. 3. Abgeplattete Paramäcien mit kontraktile Vakuolen. Der schräg nach hinten aus dem Macronucleus verlaufende helle Keil ist der Cytopharynx. Mit der Lupe ist in der vorderen Körperhälfte die Pelliculastruktur zu erkennen. Am linken *Paramaecium* links am Macronucleus der Micronucleus. $\frac{1}{2}$ Proz. Kupfersulfat 8 Min., Osmiumsäuredämpfe 3 Min., Sublimat 10 Min., Alaunkarmin 2 Std.

von Schnitten nötig ist. Die Fläche, die mit Eiweißglycerin eingerieben wird, muß größer sein als die sie bedeckende Flüssigkeitsschicht, auch nachdem sich letztere ausgebreitet hat. Auch die Methode, den Objektträger mit der Zunge zu befeuchten, kann gute Dienste tun. Alle anderen Klebmittel, wie reines Eiweiß, Gummi arabicum und Mastix, die versucht wurden, um ein besseres Haften der Paramäcien am Tragglas zu erreichen, erwiesen sich als weniger vorteilhaft. Das Eiweißglycerin wird ebenso wie die Oberfläche der Paramäcien durch die Kupfersalzlösung gefällt; dadurch haften die Paramäcien, die an seiner Oberfläche sitzen oder in das Eiweißglycerin eingedrungen sind, an den dabei entstehenden Häutchen und damit auch an der Oberfläche des Tragglases.

Es wurde daher so verfahren, daß ein Tropfen mit Paramäcien auf ein Tragglas mit Eiweißglycerin gebracht wurde und $\frac{1}{2}$ Minute später, als sich der Tropfen schon merklich ausgebreitet hatte, die Kupfersalzlösung zugesetzt wurde. (Eiweißglycerin, das mit etwas Karbolsäure versetzt ist, wirkt auf die Dauer schädigend auf die Paramäcien, aber bei der kurzen in Betracht kommenden Einwirkungszeit spielt das weiter keine Rolle.) Da auch bei diesem Verfahren sich bei der Weiterbehandlung ein großer Teil der Paramäcien ablöst, ist es erforderlich, daß der Kulturwassertropfen reichlich Paramäcien enthält. Um sicher zu sein, daß das Kupfersalz immer in der gewünschten Konzentration verwandt wird, empfiehlt es sich, für *Paramaecium*-Tropfen und Kupfersalztropfen die gleiche Pipette zu verwenden. Nach Aufsetzen des ersteren hat man ja Zeit, die Pipette kurz auszuspülen und möglichst zu trocknen. Der Kupfersalztropfen darf nur aus geringer Höhe auf die Paramäcien herunterfallen, da sie sich sonst durch die damit verbundene Erschütterung noch kontrahieren.

Von gewissem Einfluß auf das Gelingen der Präparate scheint auch das Alter einer *Paramaecium*-Kultur zu sein. Jüngere Kulturen mit verhältnismäßig geringem Salzgehalt und eher breiten Paramäcien eignen sich weniger als ältere mit solchen von ausgeprägter Gestalt. Auch ist es zu vermeiden, daß sich in dem Kulturtropfen viel Detritus oder Zoogloeen befinden, da sich alle Paramäcien, die sich in ihnen aufhalten, bei Zusatz der Kupfersalzlösung stark verkürzen.

Was nun die Konzentration der anzuwendenden Kupfersalzlösung anbetrifft, so war ich zunächst der Meinung, daß die niedrigste, noch eben zulässige Konzentration am geeignetsten sei. Später zeigte es sich, daß bei $1\frac{1}{2}$ proz. Kupfersalzlösung und

relativ kurzer Einwirkungszeit noch bessere Resultate erzielt werden können und der Prozentsatz von Paramäcien, deren Gestalt nicht gut erhalten wird, dann immer viel geringer ist. Bei Verwendung von Kupfersulfat dürfen die Paramäcien bei einer Konzentration von $\frac{1}{2}$ Proz. 7—8 Minuten der Lösung ausgesetzt sein, bevor zur Weiterbehandlung geschritten wird, bei 1 Proz. nicht länger als 3 Minuten, bei 1,5 Proz. 1 bis höchstens 2 Minuten. Kupferchlorid



Fig. 4. Etwas abgeplattetes *Paramaecium*. Hintere kontraktile Vakuole und Cytopharynx zu sehen, der im Präparat hellblau gefärbt ist, im Gegensatz zu dem sonst hellviolett gefärbten Plasma. Die Kerne erscheinen rot. Auf der linken Seite die Peristommulde mit ihrer durch den Macronucleus ziehenden Begrenzungsfläche. 1 Proz. Kupfersulfat 5 Min., Formoldämpfe 10 Min., 10 Proz. Formol 20 Min., Alaunkarmin 30 Min., Anilinblau-Orange 10 Min.



Fig. 5. *Paramaecium* mit besonders deutlichen Nahrungsvakuolen; auch der auf der linken Seite sitzende blaugefärbte Cytopharynx ist gut zu erkennen. Der Micronucleus sitzt unmittelbar am Vorderrand des Macronucleus. Das Präparat ist sehr farbenprächtig. $\frac{1}{2}$ Proz. Kupfersulfat 8 Min., Osmiumsäuredämpfe 8 Min., Sublimat 10 Min. Alaunkarmin, Anilinblau-Orange.

führt sehr schnell zu Deformationen und darf nur sehr kurze Zeit einwirken: $\frac{1}{2}$ Proz. 2 Minuten; 1,5 Proz. maximal 1 Minute. Die Resultate waren hier nicht so gleichmäßig wie bei Kupfersulfat. Kupferacetat bewährte sich am besten. Eine $\frac{1}{2}$ proz. Lösung darf bis zu 5 Minuten einwirken, 1 proz. bis zu 3 Minuten, 1,5 proz. in der Regel 45 Sekunden, maximal 90 Sekunden. Im Interesse einer guten Gestalterhaltung ist es wichtig, daß diese Zeiten nicht

wesentlich unterschritten werden, es sei denn, daß bei zu langsamem Eindringen des nachfolgenden Fixierungsmittels die Einwirkungs-dauer der Kupfersalzlösung unbeabsichtigt verlängert wird.

Die Kupfersalzlösungen wurden immer in doppelter Stärke, als hier angegeben, verwandt, aber da sie ja einem gleichgroßen Tropfen Kulturwasser zugesetzt wurden, erfolgte ihre Verdünnung auf die Hälfte. Allerdings ist dabei nicht auszuschließen, daß im Augenblick des Zusetzens in einigen Partien des Tropfens eine stärkere Konzentration herrschte, als oben angegeben worden ist. Wie durch vergleichende Versuche ermittelt wurde, ist ein Hin- und Herschwenken der Flüssigkeit zum Zwecke einer besseren Durchmischung der beiden Tropfen zu vermeiden, da dadurch die Paramäcien verhindert werden, sich an der Oberfläche des Tragglases festzusetzen.

Wenn man die Paramäcien betrachtet, nachdem sie durch die Kupfersalzlösung immobilisiert worden sind, so findet man, daß sie häufig von einer Hülle umgeben sind, die aber nicht als eine Hüllbildung im Sinne BRESSLAU'S¹⁾, also als Ausscheidung der Paramäcien betrachtet werden darf, da sie nur auftritt, wenn Eiweißglycerin verwandt worden ist, sonst aber fehlt. Außerdem werden ja auch — nach BRESSLAU — von den Paramäcien keine eigentlichen Tektinhüllen ausgeschieden. Die Hüllbildungen entstehen hier vielmehr so, daß die Paramäcien in die Eiweißglycerinschicht eindringen und sich dann aus ihr zu befreien suchen, was ihnen aber nicht mehr gelingt, und so gelegentlich einen kleinen Hohlraum schaffen und das Eiweißglycerin nach allen Seiten etwas zurückdrängen. In dieser Eiweißglycerinhülle sitzen vielfach explodierte Trichocysten, die vor dem Absterben der Paramäcien zur Entladung gekommen sind.

4. Verschiedene Wege der Weiterbehandlung.

Wir haben oben gesehen, daß bei langer Einwirkungs-dauer der Kupfersalzlösung die Paramäcien deformiert werden, da das Entoplasma zu allmählich gefällt wird. Als Fixierungsmittel kommen also die Kupfersalze nicht in Frage; sie sind nur gestalt- und strukturerhaltende Konservierungsmittel, machen aber eine nachfolgende Fixierung nicht entbehrlich. Es zeigte sich nun bald, daß

¹⁾ E. BRESSLAU, Die experimentelle Erzeugung von Hüllen bei Infusorien als Parallele zur Membranbildung in der künstlichen Parthenogenese. Naturwiss. Bd. 9 p. 21.

sich bei direkt nachfolgender Fixierung die allermeisten Paramäcien entweder gleich oder im Laufe der Weiterbehandlung ablösen. Viel bessere Resultate wurden erzielt, wenn eine Vorfixierung eingeschaltet wurde, und zwar bewährten sich dabei besonders Osmiumsäuredämpfe. Es wurde nun so verfahren: nach Beendigung der Kupfersalzeinwirkung wurde zunächst schnell ein Teil der Flüssigkeit mit der Pipette abgesaugt und dann das Tragglas mit der Schichtseite nach unten auf ein Schälchen mit 2proz. Osmiumsäure gelegt. Die Einwirkungsdauer ist je nach der Stärke der Osmiumsäure verschieden zu bemessen. Bei frischer 2proz. Osmiumsäure genügt eine Räucherung von 1 Minute; eine längere Einwirkungszeit erschwert die spätere Kernfärbung. Kommt es darauf nicht an, so kann man auch 5 oder 10 Minuten räuchern oder bei schwächerer Osmiumsäure entsprechend länger. Die Gestalt der Paramäcien wird durch diese Behandlung sehr prägnant erhalten (Fig. 1 u. 2). Vorder- und Hinterende sind deutlich voneinander zu unterscheiden, und die vom Vorderende zum Cytostom ziehende charakteristische Peristomeinsenkung ist klar zu erkennen. Auch die kontraktile und Nahrungsvakuolen bleiben bei dieser Behandlung gut erhalten. Nach längerer Osmierung kann man direkt in 70proz. Alkohol überführen, bei kürzerer — und so wurde in der Regel verfahren — wurden einige Tropfen einer konzentrierten Sublimatlösung auf das Präparat getropft und 10 Minuten darauf belassen (Fig. 1, 3, 5 u. 6). Weder vor der Osmierung, noch nach derselben darf mit destilliertem Wasser abgespült werden. Die noch vorhandene Kupfersalzlösung ist, nachdem die Fixierung eingesetzt hat, bedeutungslos geworden. Gleich nach Sublimatzusatz stellt man unter dem Mikroskop fest, ob die Weiterbehandlung lohnt; sonst kann man ohne viel Zeitverlust ein neues Präparat beginnen. Nach der Sublimateinwirkung kommt das Tragglas für 10 Minuten in 70proz. Alkohol, dann 2 Minuten in destilliertes Wasser und weiter in die Farblösung, was weiter unten noch besprochen wird. Fixierungsmittel, die Alkohol enthalten, sind zu vermeiden, da durch sie starke Strömungen auf dem Tragglas entstehen, wodurch die Paramäcien losgerissen werden. Es wurden natürlich auch zur Kontrolle Paramäcien mit und ohne Kupfersalzvorbereitung und nur mit Sublimatfixierung weiterbehandelt. Abgesehen davon, daß nur wenige Paramäcien dann überhaupt am Tragglas festhaften, wurde auch ihre charakteristische Gestalt viel weniger gut erhalten, und von der Peristommulde war dann nichts zu sehen.

Die Vorteile der Osmiumräucherung bestehen darin, daß sie die durch die Kupfersalzlösung konservierte Gestalt vorzüglich fixiert und die Wimpern, die Pelliculastruktur, ebenso wie die Vakuolen sehr gut erhalten werden, und daß auch bei ihrer schnellen Einwirkung auf die Oberfläche der Paramäcien ein Nachwirken der Einflüsse der Kupfersalzlösung ausgeschlossen wird. Die Nachteile der Osmiumsäure beruhen darauf, daß eine weitere Verfestigung der Oberfläche der Paramäcien eintritt, was das Ein-

dringen von Farbstoffen sehr erschwert. Aus diesem Grunde, und um auch für Praktikumszwecke die teure Osmiumsäure entbehrlich zu machen, wurden auch andere Substanzen ausprobiert, und es zeigte sich, daß sowohl mit den Dämpfen einer konzentrierten Formollösung (3 Minuten lang) oder von Holzessig (3—10 Minuten lang) die Vorfixierung vorgenommen werden kann. Da diese beiden Stoffe nicht so rasch einwirken wie Osmiumsäure, sind bei ihrer Anwendung die Zeiten für die Kupfersalzlösungen etwas abzukürzen. Nach Formoldämpfen wurde 10 proz. Formol (Fig. 4) oder Sublimat zur Nachfixierung verwandt, nach Holzessigdämpfen, Holzessig oder auch wieder Sublimat. Die Nach-

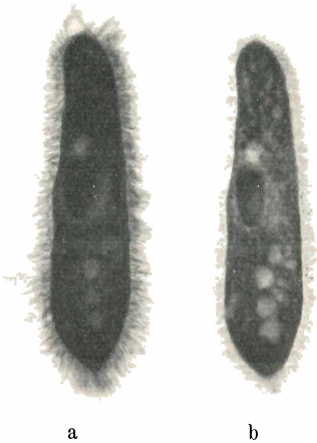


Fig. 6. a *Paramaecium*, dessen Wimpern intensiv blau gefärbt sind. b Das gleiche *Paramaecium* nach etwas längerer Exposition, in dem nun der Macronucleus und die Vakuolen zu erkennen sind. $\frac{1}{2}$ Proz. Kupferchlorid 2 Min., Osmiumsäuredämpfe 1 Min., Sublimat 10 Min.

Alaunkarmin, Anilinblau-Orange.

teile dieser Methoden sind, daß die Paramäcien nicht so scharf umrissen aussehen, die Vorteile, daß die Farbstoffe leichter eindringen als nach Osmiumräucherung, so daß die Färbedauer sehr kurz bemessen werden kann. Offenbar wird die durch die Kupfersalze abgedichtete Ectoplasmaschicht durch die Formol- und Holzessigdämpfe wieder etwas aufgelockert. Nach Holzessigräucherung konnte das Ectoplasma mit den Trichocysten bei nachfolgender Alaunkarminfärbung als deutlicher heller Saum vom dunkler gefärbten Entoplasma Färbung unterschieden werden (Fig. 7). Andererseits ist eine positive Färbung der Trichocysten mit Eisenhämatoxylin dann gut möglich (Fig. 8).

Wir sind damit schon auf das Gebiet der Färbung dieser *Paramaecium*-Präparate gelangt, worüber noch Einiges zu sagen ist. Zur Kernfärbung bewährte sich am besten, mit Essigsäure angesäuerter Alaunkarmin, wie es HAMBURGER¹⁾ empfohlen hat. Während der Färbung ist öfter unter dem Mikroskop zu kontrollieren. Bei Überfärbung darf Salzsäurealkohol angewandt werden. Jedoch ist es richtiger, es nicht zur Überfärbung kommen zu lassen. Auch HEIDENHAIN'sches Eisenhämatoxylin mit nachfolgender weitgehender Differenzierung ergibt eine gute Kern-



Fig. 7. Paramäcien mit hellem Trichocystensaum. Kupferacetat 1,5 Proz. 50 Sek., Holzessigdämpfe 3 Min., Holzessig 10 Min. Alaunkarmin.



Fig. 8. Vorderende eines *Paramaeciums* mit gefärbten Trichocysten. 1,5 Proz. Kupferacetat 50 Sek., Holzessigdämpfe 3 Min., Sublimat 10 Min., 2 Proz. Eisenalaun 12 Std., $\frac{1}{2}$ Proz. wässriges Hämatoxylin 24 Std., Differenzierung in Eisenalaun.

färbung. EHRLICH'sches Hämatoxylin färbte zu diffus. Für allgemeine Zwecke dürfte eine Kernfärbung genügen, zumal sich das Plasma immer schwach dabei mitfärbt.

Sehr bemerkenswerte Resultate wurden bei der Nachfärbung mit Anilin blau-Orange G²⁾-Gemisch erzielt, ein Farbstoffgemisch, das HEIDENHAIN zur Bindegewebsfärbung empfiehlt und das in der

¹⁾ CL. HAMBURGER, Die Conjugation von *Paramaecium bursaria* FOCKE. Arch. f. Protistenk. Bd. 4 p. 34.

²⁾ Nach ROMEIS, Taschenbuch der mikroskopischen Technik wird das Gemisch folgendermaßen hergestellt: 0,5 g wasserlösliches Anilinblau und 2 g Goldorange G werden in 100 ccm destilliertem Wasser gelöst, 8 ccm Eisessig zugesetzt, aufgekocht und nach Erkalten filtriert.

histologischen Technik zur Schnittfärbung häufig verwandt wird. Der Dispersitätsgrad der beiden hier verwandten Farbstoffe ist offenbar ein sehr verschiedener; denn nach vorausgegangener Osmiumröucherung dringt nur das Orange G in das Innere der Paramäcien ein, während durch das Anilinblau die Pellicula und vor allem die Wimpern sehr intensiv gefärbt werden können; auch die Trichocysten, soweit sie ausgestoßen sind, werden blau gefärbt. Besonders schön färbt sich schließlich noch der schwach S-förmig gebogene Cytopharynx mit seinen Wimpern als einzige blaugefärbte Partie, die in das Innere des Zellkörpers eindringt und sich dadurch sehr deutlich von dem orangegefärbten Entoplasma abhebt. Soll die Färbung gut gelingen, so darf eine nicht zu lange Osmierung der Paramäcien vorausgegangen sein, da sonst das Anilinblau gar zu wenig in die Erscheinung tritt; andererseits muß eine Osmierung stattgefunden haben, da erst durch diesen Prozeß die Pellicula derart abgedichtet wird, daß sie nur die Orange-Farbstoffteilchen passieren läßt, während die Anilinblauteilchen an der Oberfläche zurückgehalten werden. Das geht auch deutlich daraus hervor, daß nach Vorfixierung mit Holzessig- oder Formoldämpfen eine so ausgesprochen differente Färbung nicht gelingen will. Bei solchen Präparaten wurden nach Anilinblau-Orangenachfärbung die Oberflächenelemente nicht spezifisch gefärbt; nur der blau gefärbte Cytopharynx hob sich klar von dem rötlich-violett gefärbten Plasma ab (Fig. 4). Die Stammlösung von Anilinblau-Orange G muß für den hier in Betracht kommenden Zweck auf $\frac{1}{7}$ verdünnt werden. Die Färbedauer variiert zwischen 2 und 10 Minuten, je nach der Dauer der vorausgegangenen Osmierung, und es zeigt sich dabei, daß es oft nicht gelingen will, alle Paramäcien eines Präparates richtig zu färben, da z. B. dann, wenn die abgeplatteten Individuen gerade richtig gefärbt sind, die langgestreckten oftmals eine zu intensive Färbung zeigen und dann zu undurchsichtig sind. Als Kontrastfärbungen nach Alaunkarmin wurde noch mit Erfolg verdünntes Lichtgrün in alkoholischer Lösung angewandt und nach Eisenhämatoxylin $\frac{1}{2}$ proz. Kongorot in wässriger Lösung.

Nur bis zur Beendigung der Fixierung werden die Prozeduren an den horizontal gelagerten Präparaten vorgenommen, von dann ab werden sie im Farbsatz wie Schnittpreparate behandelt und dann ebenso auch weiterhin nach beendigter Färbung durch die Alkoholreihe in Xylol übergeführt, wobei sie nur in absolutem Alkohol und Xylol etwas länger als 2 Minuten belassen wurden. Wenn man die für die einzelnen Phasen erforderlichen Zeiten zu-

sammenzählt, so ergibt sich, daß man ein *Paramaecium*-Präparat, nach dieser Methode behandelt, bequem in 1 Stunde fertigstellen kann.

Das Auflegen des Deckglases erfolgt am zweckmäßigsten so, daß man es zuerst mit der einen Kante aufsetzt, den eher flüssigen Canadabalsamtropfen sich unter ihr ausbreiten läßt und dann bei langsamem Senken des entgegengesetzten Deckglasrandes eine Bildung von Luftblasen möglichst vermeidet. Gelingt das nicht restlos, so muß man sich hüten, die Luftblasen nachträglich durch Druck aus dem Canadabalsam herauszupressen, da die Paramäcien, die infolge der Konservierung und Fixierung sehr brüchig geworden sind, dabei leicht beschädigt werden. Daher empfiehlt es sich, lieber den Schönheitsfehler einer Luftblase mit in Kauf zu nehmen, als das fertige Präparat zu gefährden. Aus dem gleichen Grunde ist ein nachträgliches Verschieben des aufgelegten Deckglases zu vermeiden. Von der Sprödigkeit der Paramäcien, namentlich nach Osmierung, bekommt man einen Begriff, wenn einige durch leichten Druck auf das Deckglas beschädigt worden sind; es können dann eckige Sprünge durch die Paramäcien hindurchziehen. Auf das Anbringen von Wachsfüßchen wurde in der Regel verzichtet.

Es ist vielleicht hier der Ort, die hier beschriebene Methode deren Eigenart auf der Verwendung von Kupfersalzen beruht, mit jener von BRESSLAU¹⁾ kurz zu vergleichen, der schnell gelatinierende Farbstoffe zur Fixierung und Färbung verwendet. Bei beiden Methoden werden die Infusorien nicht plötzlich, sondern allmählich abgetötet. Die BRESSLAU'sche Methode ist vorzüglich geeignet zum Studium der Pellicularstruktur und der Wimpern, und sowohl in dieser Hinsicht, als auch bezüglich der Kürze des Verfahrens unserer Methode überlegen; sie gibt uns aber kein vollständiges Bild von der Organisation eines Infusors. Die hier beschriebene Methode leistet dagegen Besonderes bezüglich der Gestalterhaltung der Paramaecien und gestattet uns, die Kerne, die kontraktile Vakuolen und die Nahrungsvakuolen darzustellen und außerdem die Bestandteile des Ektoplasmas deutlich zu erkennen. Und da die Paramäcien, angeklebt an das Tragglas, von einer Flüssigkeit in die andere überführt werden, so ist auch hier die Handhabung verhältnismäßig einfach.

Es wurde schon in der Einleitung und auch späterhin darauf hingewiesen, daß es nach den hier angewandten Methoden gelingt,

¹⁾ E. BRESSLAU, Die Gelatinierbarkeit des Protoplasmas als Grundlage eines Verfahrens zur Schnellanfertigung gefärbter Dauerpräparate von Infusorien. Arch. f. Protistenk. Bd. 40 p. 21.

nur einen Bruchteil der ursprünglich auf dem Präparat vorhandenen Paramäcien durch alle Flüssigkeiten hindurch an der Oberfläche des Tragglases bis in den Canadabalsam zu bringen. Die meisten Paramäcien gehen bei dem Übergang von der Fixierungsflüssigkeit in den Alkohol verloren, einzelne auch noch später. Hat man aber mit reichlich viel Paramäcien das Präparat begonnen, so werden auch in dem fertigen Präparat mindestens noch zwölf, meist aber noch viele Paramäcien vorhanden sein, und unter diesen wird man immer eine Anzahl finden, die durch ihren relativ naturgetreuen Erhaltungszustand auffallen und dadurch viel mehr befriedigen als Paramäcien, die nach den bisher üblichen Methoden behandelt worden sind.

Es ist natürlich möglich und lag nahe, bei der großen Verlustziffer an Paramäcien, die ganze hier beschriebene Methode, mit Ausnahme der Osmierung, an einer größeren Zahl von Paramäcien durch Behandlung im Reagenzgläschen und durch Zentrifugieren vorzunehmen. Es haben sich aber dabei folgende Nachteile ergeben: die Oberfläche der Paramäcien wird durch die Kupfersalzbehandlung klebrig; sie neigen daher dazu, wenn sie beim Zentrifugieren zusammengedrängt werden, miteinander zu verkleben, und an ihrer Oberfläche haften leicht allerlei störende Partikel. Immerhin ist es möglich, auch auf diesem Wege einzelne, allerdings nur mit Alaunkarmin gefärbte Paramäcien mit gut erhaltener Gestalt im fertigen Präparat aufzufinden. Diese Methode wurde indessen nicht weiter ausgearbeitet, da die Möglichkeit, die Paramäcien wie Schnitte auf dem Tragglas aufgeklebt, zu behandeln, wegen ihrer bequemen Handhabung entschieden den Vorzug zu verdienen schien.

In Kürze sei hiermit nochmals die fast immer zum Ziele führende Methode zusammengefaßt: ein Tropfen einer dichten *Paramaecium*-Kultur auf ein Tragglas, das mit Eiweißglyzerin eingerieben, dazu ein Tropfen 3proz. Kupferacetat, 45 Sekunden lang; Absaugen eines Teiles der Flüssigkeit mit Pipette. Osmiumräucherung über frischer 2proz. Osmiumsäure 45 Sekunden; Sublimat 10 Minuten. Dann Behandlung im Färbesatz: 70 Proz. Alkohol 10 Minuten; destilliertes Wasser 2 Minuten; Färbung mit angesäuertem Alaunkarmin; destilliertes Wasser; Färbung mit $\frac{1}{7}$ Anilinblau-Orange G (Färbedauer unter Mikroskop kontrollieren); destilliertes Wasser; Alkoholreihe; Xylol: Canadabalsam.

Hat man mit dieser Methode gute Erfolge erzielt, so kann man sie in verschiedenster Hinsicht variieren, indem man z. B. auf eine schwächere Kupferacetatlösung eine längere Osmierung folgen läßt

und auf die Anilinblau-Orangefärbung verzichtet, wie das weiter oben näher ausgeführt worden ist. Man erhält dann zwar eine weniger markante Kernfärbung, aber die Pellikularstruktur wird dabei viel deutlicher und die einzelnen Vakuolen kommen dann noch schärfer heraus.

V. Zusammenfassung.

Es wird gezeigt, daß durch Kupfer- und Eisensalze bestimmter Konzentration zunächst nur die Oberflächenschicht von *Paramaecium caudatum* gefällt und verfestigt wird, so daß sich die Tiere nicht mehr zu kontrahieren vermögen, und ihre Gestalt sehr gut erhalten wird; das Entoplasma wird erst etwas später abgetötet, was vor allem aus dem Verhalten der kontraktilen Vakuolen geschlossen werden kann.

Diese Eigenschaft, besonders der Kupfersalze, gestattet es, Dauerpräparate von Paramäcien herzustellen, die zunächst mit Kupfersalzlösungen bestimmter Konzentration behandelt werden; es folgt eine Vorfixierung mit Dämpfen von Osmiumsäure, Formol oder Holzessig und danach eine endgültige Fixierung mit Sublimat oder anderen Fixierungsmitteln. Da ein Teil der Paramäcien an dem Tragglas haftet, ist es möglich, sie zur Härtung und Färbung wie aufgeklebte Schnitte im Farbglassatz von einer Flüssigkeit in die andere überzuführen. Als Farbstoffe bewährten sich vor allem angesäuerter Alaunkarmin und zur Nachfärbung Anilinblau-Orange G-Essigsäure.

Im fertigen Dauerpräparat ist bei einem Teil der Paramäcien die Gestalt sehr gut erhalten; ebenso auch die Peristommelde und das Cytostom. Auch alle wesentlichen Bestandteile des Zellkörpers der Paramäcien sind mit dieser Methode, die mannigfach variiert werden kann, deutlich zu erkennen, und zwar: die Pelliculastruktur, die Wimpern, die Trichocysten, der Cytopharynx, die Kerne, die kontraktilen Vakuolen und die Nahrungsvakuolen.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Archiv für Protistenkunde](#)

Jahr/Year: 1932

Band/Volume: [76 1932](#)

Autor(en)/Author(s): Merton Hugo

Artikel/Article: [Die Verwendung von Kupfersalzen zur Herstellung von Paramaecium-Präparaten. 171-187](#)