© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

aber keineswegs gegen die Geltung des Gesetzes auch in diesen Fällen; die anatomischen Eigenschaften der betreffenden Arten gestatteten die Bestimmung der Fadenformel nicht, die Ueberlagerung und damit die charakteristische Gruppirung der Zellen im Faden, war nicht mit genügender Sicherheit zu erkennen; indess sind auch meine Bemühungen nach dieser Richtung bisher keineswegs erschöpfend gewesen.

---

3. E. Pfitzer: Ueber ein Härtung und Färbung vereinigendes Verfahren für die Untersuchung des plasmatischen Zellleibs.

Eingegangen am 18. Januar 1883.

Bei der Untersuchung der Kerntheilungsvorgänge der *Bacillariaceen* und *Desmidieen*, mit welcher ich seit einiger Zeit beschäftigt bin, erwiesen sich die zur Zeit üblichen besten Färbungsmethoden als in mancher Hinsicht nicht recht genügend. Nach dem an sich sehr guten Böttcher-Hermann-Flemming'schen Saffranin-Verfahren[1]) ist es nöthig, die zur Härtung der Objecte benutzte verdünnte Chromsäure rein wieder auszuwaschen, ehe die alkoholische Saffraninlösung zugesetzt wird — ausserdem muss man, wenn man recht reine Kernfärbungen erhalten will, überfärben und den Ueberschuss des Farbstoffs wieder mit Alkohol auswaschen, womit aber gerade im richtigen Moment inne zu halten ist. Das Letztere hat immer seine Schwierigkeiten — bei dickeren Schnitten wird, wie schon Flemming[2]) hervorhebt, bei der Alkoholauswaschung der Farbstoff bereits aus den oberflächlichen Schichten entfernt, während er in der Tiefe noch diffus vertheilt ist, so dass man keine gleichmässig gefärbten Präparate erhält. Ganz besonders unbequem aber ist dieses Verfahren natürlich bei freilebenden mikroskopischen Organismen, die mit Schlamm gemengt sind, also z. B. gerade bei *Bacillarien*-Aufsammlungen. Wählt man mit Strasburger[3]) zur Härtung absoluten Alkohol, so vereinfacht sich die Methode, je-

1) Vgl. Flemming in Archiv f. mikrosk. Anatomie XIX, S. 317. Strasburger, Theilungsvorgang der Zellkerne 1882, S. 2. Flemming, Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung 1882, S 383.

2) Archiv u. s. w. XIX, S. 327.

3) a a. O.

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

doch bei minder guter Fixirung, etwas — immerhin sind aber noch drei Operationen, Härten in starkem, Färben in stark wasserhaltigem und Wiederauswaschen mit starkem Alkohol nothwendig. Der absolute Alkohol hat dabei als Härtungsmittel bei Algen noch zwei weitere Nachtheile. Erstens ist es oft nicht möglich, von den Objecten, etwa im Schlamm lebenden einzelligen Algen das Wasser vor dem Zusatz des Härtungsmittels so vollständig zu entfernen, dass der Alkohol nicht schon im Einwirkungsmoment verdünnt ist, zweitens giebt derselbe mit Meerwasser lästige Niederschläge. Gerade die beste wässrige Härtungsflüssigkeit aber, die mir für Algen bekannt ist, concentrirte Pikrinsäurelösung, giebt, wie ebenfalls schon Flemming[1]) betont, bei nachheriger Saffraninfärbung sehr unsichere Erfolge.

Was die Tinction mit Hämatoxylin, oder richtiger mit Hämatein-Ammoniak[2]) anbetrifft, so ist, wofern Chromsäure oder Pikrinsäure zum Fixiren benutzt wurde, ebenfalls sorgfältigstes Auswaschen vor dem Zusatz des Farbstoffs nöthig, da derselbe für freie Säure äusserst empfindlich ist. Ausserdem ist die genannte Substanz an sich sehr leicht zersetzbar, was manche Missstände herbeiführt und wohl auch verursacht, dass, wie Flemming[3]) fand, auch die besten Hämatoxylin-Präparate selbst in Harzeinschluss allmälig verblassen.

Unter diesen Umständen habe ich mich bemüht, einen Farbstoff aufzufinden, der auch in sauren Lösungen gut und rein tingirt, so dass er gleichzeitig mit der fixirenden Säure zugesetzt werden kann. Von Chromsäure und Osmiumsäure sah ich dabei ab, da sie durch organische Substanzen, also wohl auch durch organische Farbstoffe zu leicht reducirt werden, und beschränkte mich auf Versuche mit Pikrinsäure. Nachdem diese, wie ich glaube, einigermassen erfolgreich gewesen sind, erlaube ich mir bei der grossen Arbeitsmenge, welche augenblicklich auf das Studium des plasmatischen Zellleibs verwandt wird, mein Verfahren schon vor der Veröffentlichung der betreffenden Einzeluntersuchung hier mitzutheilen und möchte bitten es bei verschiedenen Objecten zu erproben.

Der angewandte Farbstoff ist das Nigrosin (Qual. I.), welches ich von Trommsdorff in Erfurt bezogen habe. Dasselbe löst sich leicht in Wasser mit tief violettblauer Farbe, langsamer wird es von gewöhnlichem Spiritus aufgenommen — sehr starker Alkohol löst nur bei längerem Stehen kleine Mengen, so dass das Nigrosin in ganz wasserfreiem Alkohol wohl unlöslich sein dürfte. Die durch Vermischen einer concentrirten wässrigen Pikrinsäurelösung mit einer kleinen Menge wässriger Nigrosinlösung hergestellte tief olivengrüne Flüssigkeit tödtet

1) Archiv u. s. w. S. 328.

2) Vgl. Schmitz in Sitzungsber. d. Niederrhein. Gesellsch. f. Natur- u. Heilkunde, 1880, S. 160. Flemming, Zellsubstanz, S. 382.

3) Archiv u. s. w. S. 328.

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

ausserordentlich schnell ohne erhebliche Contraction: wo sie zu stark wasserhaltigen Objecten hinzugefügt wird, kann man gleich noch einige Pikrinsäurekrystalle hinzufügen, um eine Verdünnung des Härtungsmittels möglichst zu vermeiden. Nachdem die Nigrosin-Pikrinsäure einige Stunden eingewirkt hat, giesst man sie von dem Algenschlamm u. s. w., soweit es bequem geht, ab oder nimmt die eingelegten Schnitte heraus, die dann in Wasser oder gewöhnlichen Spiritus gelegt werden, wodurch die Pikrinsäure und das gelöste Nigrosin entfernt werden, ohne dass die Tinction der plasmatischen Theile sich verändert. Spiritus ist namentlich dann anzuwenden, wenn aus den Objecten gleichzeitig noch Chlorophyll oder ähnliche in Alkohol lösliche Farbstoffe entfernt werden sollen, oder wenn man die gefärbten Objecte längere Zeit aufheben will. Es ist dabei durchaus nicht nöthig, den Ueberschuss von Nigrosin-Pikrinsäure sorgfältig auszuwaschen — gefärbte *Bacillarien*, die ich schon Wochen lang in noch ganz dunkel gefärbtem Spiritus stehen habe, zeigen sich noch eben so gut tingirt, wie am ersten Tage.

In dieser Weise angewandt, färbt das Nigrosin dünne Plasmaschichten überhaupt nicht wahrnehmbar, dichtere Massen schwach hellviolett. Weit intensiver ist schon die Färbung der Chromatophoren, die sich scharf von dem allgemeinen Zellplasma abheben. Immerhin erscheinen auch diese noch blass gegenüber der tiefen Färbung der Pyrenoide, Nucleolen und der übrigen „chromatischen“ Bestandtheile des Zellkerns. Gewöhnliche Cellulosemembranen werden gar nicht oder fast gar nicht tingirt, ebenso bleiben die Stärkekörner farblos.

Die in Wasser betrachteten fertigen Präparate haben keinen ganz rein blauen, sondern einen etwas blaugrauen Farbenton. Ueberträgt man sie aber in concentrirtes Glycerin, welches solche mit Pikrinsäure gehärtete Objecte kaum contrahirt, oder lässt man verdünntes Glycerin sich langsam auf den Präparaten concentriren, so wird die Färbung schon viel reiner, bei weitem am schönsten rein blau aber, wenn man die aus dem Spiritus gewonnenen Objecte zuerst mit Nelkenöl behandelt und dann in Harzen, etwa in Terpentinöl gelöstem Dammarharz oder Canadabalsam einschliesst. Zur Vermeidung nachträglicher Contractionen habe ich es dabei oft zweckmässig gefunden, mit Alkohol stark verdünntes Nelkenöl sich auf den Objekten allmälig durch Verdunstung des Alkohols concentriren zu lassen. Die so erhaltenen Präparate dürften allen Anforderungen genügen und ist zu hoffen, dass sie sich sowohl in Glycerin als in Harzeinschluss nnverändert halten werden, da das Nigrosin eine sehr beständige, schwer zersetzbare Verbindung ist, die nur freie Alkalien nicht gut verträgt — mit Ammoniak kann man die Färbung rasch abblassen machen.

Zur Prüfung des Verfahrens empfehle ich z. B. *Spirogyra*-Fäden, welche in der beschriebenen Weise behandelt mit ihren lichtblauen, in ihrer zackigen Begrenzung vortrefflich erhaltenen Chromatophoren, die

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

sich scharf vom farblosen wandständigen Plasmaschlauch abheben, den von weissen Stärkekörnern umgebenen tiefer blauen Pyrenoiden, dem durch Färbung der eingelagerten Chromativfäden lichtblauen Kern mit fast schwarzblauem Nucleolus sehr elegante und instructive Präparate geben. Auch die in Theilung begriffenen Endospermzellen von *Liliaceen* sind sehr geeignete Objecte um die tiefe Färbung der Kernfäden und der aus ihnen hervorgehenden Kernplattenelemente gegenüber dem farblosen Kernsaft und den hellen Spindelfasern zu zeigen, die bei richtiger Intensität der Färbung ganz farblos bleiben.

Die wässrige Nigrosin-Pikrinsäure eignet sich auch sehr gut, um Zellen, z. B. einzellige Organismen, die man gerade in einem interessanten Entwicklungszustand unter dem Mikroskop hat, in situ zu tödten und zu färben, indem man einen Tropfen an den Rand des Deckglases giebt. Man erhält so bessere, weniger veränderte und dauerhaftere Präparate, als mit der bisher zu dem genannten Zwecke hauptsächlich angewandten Methylgrün-Essigsäure, welche oft die Kerne aufbläht und nur wenige Stunden haltbare Präparate liefert.

Man kann übrigens die Nigrosin-Pikrinsäure auch in alkoholischer Lösung anwenden und stellt man diese letztere, da das Nigrosin nicht in jedem Verhältniss in Alkohol von bestimmter Concentration löslich ist, am zweckmässigsten so dar, dass man Krystalle von Pikrinsäure und ein Stückchen Nigrosin zusammen mit dem betreffenden Alkohol übergiesst. Bei längerem Stehen erhält man so noch mit käuflichem absolutem Alkohol einen zur Färbung ausreichenden Nigrosin-Gehalt. Algen, die mit starker alkoholischer Nigrosin-Pikrinsäure behandelt wurden, wobei die nachträgliche Entfernung des Chlorophylls fortfällt, geben ebenfalls schöne Präparate. Die Färbung der Chromatophoren und Pyrenoide wird minder intensiv, während die chromatischen Einschlüsse des Zellkerns besonders tief tingirt werden, so dass unter Umständen dieses Verfahren vorzuziehen sein wird.

Die Ergebnisse, welche ich mit der angegebenen Methode über die Kerntheilung u. s. w. bei *Bacillariaceen* und *Desmidiaceen* erhalten habe, sollen bald in ausführlicher Darstellung veröffentlicht werden. Hier möchte ich nur noch die eine Bemerkung hinzufügen, dass die von Schmitz[1]) neuerdings als Pyrenoide bezeichneten dichten kernähnlichen Körper schon 1872 von mir[2]) bei einigem *Cymbelleen* und *Gomphonemeen* als bestimmt geformte Massen dichteren Plasmas beschrieben und abgebildet worden sind. Die intensive Tinctionsfähigkeit dieser Gebilde habe ich freilich erst jetzt constatirt. Das Vorkommen der Pyrenoide ist somit auch nicht, wie es nach Schmitz's Erfahrung schien, bei den *Bacillariaceen* auf die Meeresformen beschränkt.

---

1) Die Chromatophoren der Algen, 1882, S. 37 f.

2) Untersuchungen über Bau und Entwicklung der Bacillariaceen, 1872, S. 59, 76, 78, 80 u. s. w., Taf. III, Fig. 10, 11. Taf. IV, Fig. 11.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft

Jahr/Year: 1883

Band/Volume: 1

Autor(en)/Author(s): Pfitzer Ernst Hugo Heinrich

Artikel/Article: Ueber ein Härtung und Färbung vereinigendes Verfahren für die Untersuchung des plasmatischen Zellleibs 44-47