

# FÄRBUNGSVERFAHREN ZUR ZÄHLUNG VON HYPHOMYCETESSPOREN

Mit 1 Abbildung

Von DR. S. VÁGÓ

(Leiter der bakteriologischen und biologischen Abteilung des französischen Spitals für Vorarlberg, Feldkirch)

Die Feststellung der Anwesenheit von Sporen der niedrigen Pilzarten ist eine Untersuchung, die in den verschiedensten Gebieten der Mikrobiologie vorgenommen werden muß. Abgesehen von den Forschungen betreffend die durch die Penicillin-Erzeugung in den Vordergrund getretene Art und von den botanischen Beziehungen, muß in erster Linie auf die laufenden Untersuchungen des klinischen Laboratoriums und auf die Lebensmitteluntersuchung hingewiesen werden. Bei allen diesen Untersuchungen hat man die Aufgabe, *erstens* festzustellen, ob Sporen von gewissen niedrigen Pilzarten überhaupt vorhanden sind, *zweitens*, in welcher Menge sie vorhanden sind.

Zu diesem Zwecke wurden im allgemeinen die Präparate in nativem Zustande untersucht, und zwar bei einer solchen Öffnung der Aperturblende, bei welcher die Sporen durch ihre Formen erkannt werden können.

Eine solche Untersuchung kann aber nur dann vorgenommen werden, wenn die Sporen auf klarem Untergrund stehen und ihre Form deutlich hervortreten kann. Bei der Mehrzahl der notwendigen Untersuchungen haben wir aber ein Untersuchungsmaterial vor uns, wo diese Sporen in Mengen von Epithelzellen, Leukozyten, Pflanzenteilen, Lebensmittelbruchteilen und hauptsächlich in Bakterienhaufen eingehüllt sind. In diesen Fällen ist es unmöglich, mit dieser Methode die Zahl der vorhandenen Sporen, sehr oft sogar das einfache Vorhandensein der Sporen festzustellen.

Die einwandfreie Zählung der Sporen kann nur mit Hilfe eines solchen Färbungsverfahrens erzielt werden, welches die Sporen von sämtlichen anderen Bestandteilen des Präparates zu trennen vermag.

Zu diesem Zwecke versucht man einfache Karbolfuchsin-, Methylenblau- usw. Lösungen zu verwenden, durch welche die Sporen sich nicht färben, und unter den gefärbten Bestandteilen des Präparates auffallen. Die Praxis hat aber gezeigt, daß diese Methode weitgehend unzuverlässig ist.

Zu bedeutend besseren Ergebnissen führen die für die Darstellung verschiedener sporulierender Bazillen ausgearbeiteten Verfahren. Die Farbunterschiede, die diese Verfahren bei den Pilzsporen erzielen, lassen diese aus der Umgebung hervortreten, doch ist die Absonderung der Sporen von der Umgebung noch nicht so vollkommen, daß sie die Forderungen der quantitativen Untersuchung erfüllen könnte.

Durch Einführung einer in der Mikrotechnik bisher nicht verwendeten Chemikalie ist es dem Verfasser gelungen, eine neue Färbungsreaktion hervorzurufen, die die Sporen der niederen Pilzarten in intensiver Farbe, mit

großem Farbunterschied von allen übrigen Bestandteilen des Präparates abhebt.

Die Differenzierung wird durch die Anwendung des Dinatriumsalzes des Dibrom-oxy-mercuri-fluoresceins erzielt. Diese chemische Verbindung ist ein Präparat der Firma HYNSON-WESCOTT & DUNNING in Baltimore, unter dem Namen „Mercurochrom“ bekannt. Jetzt wird es auch in Europa erzeugt. Es findet Verwendung als Desinfektionsmittel in der ärztlichen Praxis. Mit Hilfe dieses Mittels soll das Verfahren wie folgt ausgeführt werden:

Fixieren des Präparates über der Flamme (oder nach beliebiger Methode).

Färben mit alkalischer Methylenblaulösung unter Erhitzen (ca. 2 Minuten).

Abspülen mit Wasser.

Nachfärben mit Mercurochromlösung (ca. 5 Minuten).

Abspülen mit Wasser, trocknen. Untersuchung wie üblich.

### Lösungen:

#### A. Alkalische Methylenblau-Lösung:

|   |               |
|---|---------------|
| Methylenblau, konzentrierte Lösung in Aqua destillata | . 25,0 g      |
| Kalium hydricum                                       | 0,1 g         |
| Aqua destillata                                       | ad. 100,0 ccm |

(die LÖFFLERSche Methylenblau-Lösung ist wegen ihres Alkoholgehaltes (Erhitzen!) und ihrer nicht genügend alkalischen Reaktion weniger geeignet).

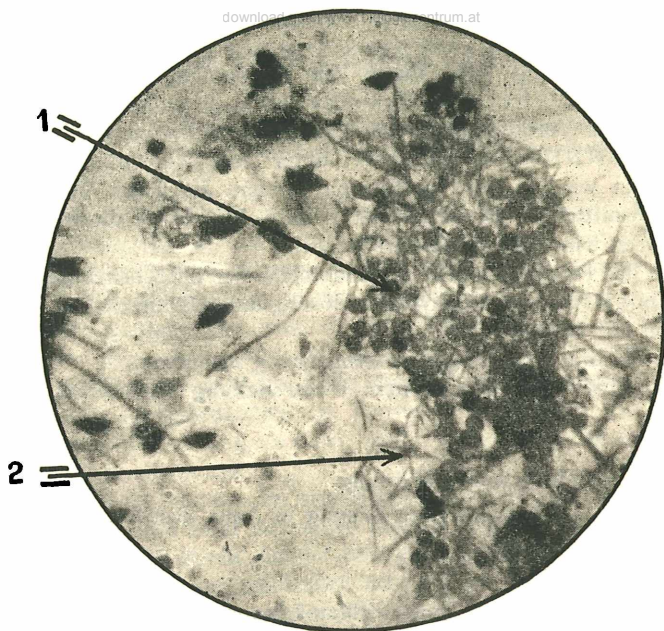
#### B. Mercurochrom-Lösung:

Konzentrierte wässrige Lösung des Dinatriumsalzes des Dibrom-oxy-mercuri-fluoresceins.

Der Wirkungsmechanismus der Methode kann kurz im folgenden zusammengefaßt werden:

Das heiße Methylenblau färbt sämtliche Teile des Präparates, so auch die Sporen. Die darauf folgende Einwirkung der Dibrom-oxy-mercuri-fluorescein-Lösung erzielt eine Entfärbung ohne Anwendung irgendeiner Entfärbungsflüssigkeit und gleichzeitig eine Rotfärbung. Eine für die Reaktion grundlegende Erscheinung ist, daß das Mercurochrom in die Sporen nicht eindringen kann (Struktur der Sporenzellenwand und molekuläre Eigenschaften des Mercurochroms). So können die Sporen in ihrer unveränderten blauen Farbe erscheinen, während alle anderen Bestandteile des Präparates die rote Farbe des Mercurochroms aufnehmen mußten. (Einzelheiten und Bemerkungen betreffs dieses Verfahrens siehe: Literatur 11.)

Das durch die Anwendung dieses Verfahrens zur Zählung der Sporen fertiggestellte Präparat erscheint unter dem Mikroskop in einer gleichmäßigen hellroten Farbe. Diese Farbe wird von den tierischen und pflanzlichen Zellen, den verschiedensten Mikrobenarten und anderen uncharakteristischen Stoffresten verursacht, die sich alle in der hell-



*Sporen von Penicillium glaucum in einer Bakterienmasse. Gefärbt durch die Methylenblau-Mercurochrom-Methode. Vergrößerung 1000 :1.  
1. Penicillium glaucum-Sporen. 2. Masse verschiedener Bakterien.*

roten Farbe des Mercurochroms färben. Dieser gleichmäßige Farbton wird durch andere Farben nicht gestört, nur die Sporen heben sich in dunkelblauer Farbe ab.

Für die Zählung ist es von außerordentlicher Wichtigkeit, daß wir nichts anderes im ganzen Bilde sehen, als nur auf rotem Grunde stehende, stark abgegrenzte Einheiten, die äußerst leicht zusammengezählt werden können.

Bei der Anwendung dieses Verfahrens fallen alle jene Schwierigkeiten weg, welche die quantitative Bestimmung der Sporen in kompakten Massen meistens unmöglich machten, was um so wichtiger ist, weil die zur Untersuchung kommenden Materialien fast immer solcher Natur sind. Gleichfalls braucht die Auflösung, lange Lockerung, chemische Isolierung des Untersuchungsmateriales zwecks Absonderung der Sporen von den anhaftenden Bestandteilen nicht zu erfolgen. Ferner ist man nicht genötigt, gewisse Teile des Präparates auszusuchen, wo die Sporen verhältnismäßig klar liegen, um eine leichtere Zählung zu ermöglichen. Die Zählung der Sporen kann nach Färbung mit dem besprochenen Verfahren in allen Teilen des Präparates vorgenommen werden, sogar auch in den dichtesten

Bakterienmassen, denn die intensive Farbe der dunkelblauen Sporen ist auch unter der Decke der hellrot gefärbten Bakterien, Epithelzellen usw. gut erkennbar.

Die Färbung kann so auf eingeteilten wie auch auf gewöhnlichen Objektträgern angewandt werden.

Das Verfahren leistet besonders gute Dienste bei solchen Untersuchungen, wo die Menge der vorhandenen Sporen nicht durch Zählung der Einheiten bestimmt wird, sondern nur durch einen Überblick beurteilt werden soll. Die Erfahrungen von vielen Untersuchungen dieser Art haben bestätigt, daß, bei Anwendung dieser Methode, die leuchtende blaue Farbe der Sporen, die ohne störende Farben anderer Bestandteile des Präparates hervortreten kann — man kann sagen — beim ersten Blick ins Mikroskop die Feststellung der Menge, eventuell der Verteilung der vorhandenen Sporen ermöglicht. Diese Eigenschaft wird sich um so mehr einer bevorzugten Verwendung erfreuen können, weil die Feststellung des Ausmaßes der Hyphomyzeten-Verunreinigungen in der klinischen Praxis, sowie bei der Lebensmitteluntersuchung größtenteils auf diesem Wege geschieht.

#### Literatur

1. *Carter*, Phytopathologie. I (1936).
2. *Hoffmann*, Schweiz. Med. Wochenschr. 39 (1946).
3. *Matras*, Wiener Klin. Wochenschr. (1937): 1680.
4. *Naumann*, Int. Rev. d. ges. Hydrobiol. I (1934).
5. *Payr*, Münchn. Med. Wochenschr. (1933): 1001.
6. *Ramon-Richon-Ramon*, La presse Medicale. 10 (1946).
7. *Schmidt*, Meteor. Zbl. (1913).
8. *Spitta*, Hb. der Path. Microorg. 10 (1930).
9. *Stundl*, Zbl. Bakt. Paras. u. Inf. (1941): 268.
10. *Tillmanns-Ohnesorge*, Praktikum der klinischen, chemischen, mikroskopischen und bakteriologischen Untersuchungsmethoden. Wien, 1946: 520—532.
11. *Vágó*, Differenzierungsverfahren zur mikroskopischen Darstellung der Penicilliumsporen. Feldkirch, 1947.
12. — Wiener Med. Wochenschr. 4 (1947).
13. — Schweiz. Med. Wochenschr. Im Druck.
14. *Verrey*, Étude des éléments figurés de l'humeur aqueuse pathologique. Lausanne, 1945.
15. *Wassmund*, Eiterungen durch Fadenbakterien. Lehrb. d. prakt. Chir. d. Mundes und der Kiefer. Leipzig, 1935: 515.
16. *Zih, Magy.* Biol. Kut. Int. Munk. 1928: 346.

# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mikroskopie - Zentralblatt für Mikroskopische Forschung und Methodik](#)

Jahr/Year: 1947

Band/Volume: [2](#)

Autor(en)/Author(s): Chiari Hermann

Artikel/Article: [Färbungsverfahren zur Zählung von Hyphomycetessporen. 114-117](#)