Über Schleimfärbung.

Von

Paul Mayer.

In den folgenden Zeilen beabsichtige ich nur rein mikrotechnische Mittheilungen zu machen und gehe absichtlich auf die Fragen nach der feineren Beschaffenheit des thierischen Schleimes, nach der Entstehung, dem Bau und der Function der Becherzellen etc. nicht ein, obwohl die Versuchung dazu selbst nach den Arbeiten von PANETH, BIZZOZERO u. A. m. nahe genug liegen möchte. Der Leser findet also lediglich Angaben über die meisten Farbstoffe, die bisher zum Schleimfärben verwendet worden sind, und über ihre Wirksamkeit, ferner die Vorschriften zu neuen Färbmitteln, sowie eine neue Methode zum Schnellfärben von Paraffinschnitten, endlich einige allgemeine Erörterungen über Schleim und Mucin.

Auch in der oben angegebenen Beschränkung erfreut sich leider mein Thema einer ausgedehnten Litteratur; zum Glück liegen gute Zusammenstellungen der früheren Arbeiten bei PANETH und HOYER vor, wenigstens so weit die Vertebraten in Betracht kommen.

Ich bespreche zunächst die sogenannten Hämatoxyline, dann die Theerfarben, endlich meine neue Carminlösung.

1. Die sogenannten Hämatoxyline.

Wiederholt habe ich darauf hingewiesen, dass das Hämatoxylin allein die Kerne nicht färbt¹, und muss dies nun auch für die Schleime

¹ P. MAYER, Über das Färben mit Hämatoxylin. in: Mitth. Z. Stat. Neapel 10. Bd. 1891 pag. 170 ff. (pag. 184); Über das Färben mit Carmin, Cochenille und Hämateïn-Thonerde. *ibid.* 10. Bd. 1892 pag. 480 ff. (pag. 503). — Noch weniger als die thierischen Zellkerne nimmt der thierische Schleim in Lösungen von

constatiren. Stets ist beim Färben die Gegenwart eines anorganischen Salzes erforderlich, z. B. des Eisens, Kupfers, in der Regel aber des Aluminiums, und zwar in diesem Falle entweder des Chlorides oder des Nitrates oder endlich des Sulfates in Gestalt von Alaun. Ferner tritt auch nie das unveränderte Hämatoxylin, sondern nur seine Oxydationsstufe, das Hämatein, in die Farbe ein. Es wäre daher gut, wenn endlich eine exactere Bezeichnung allgemein Platz griffe; man sollte sagen: Färbung mit Hämatein-Thonerde nach BÖHMER, nach EHRLICH etc., oder mit Hämalaun, Hämacalcium etc.

Speciell zur Färbung des Schleimes hat man sich, so viel ich weiß, immer der Combinationen von Hämatein mit Thonerde bedient, leider aber häufig genug jede genaue Angabe über die Beschaffenheit der Lösung unterlassen. So auch HOYER, dem wir doch eine sehr ausführliche Arbeit über Schleimfärbung verdanken. Er drückt sich nämlich über die Verwendung der »Hämatoxylinlösungen« dabei kurz etwa folgendermaßen¹ aus. Ihre Zusammensetzung und Wirkungsweise sei nicht beständig genug, denn »um die specifische Tinction zu erzielen, bedarf es einer gewissen Reifung der Lösung; bei Bildung stärkerer Niederschläge geht dagegen die mucinfärbende Eigenschaft allmählich wieder verloren«. Ähnlich pag. 313, wo es von den »alaunhaltigen Hämatoxylinlösungen« heißt, die »metachromatische Tinction konnte durch die demselben Gefäße entnommene Lösung in späterer Zeit nicht mehr erzielt werden«.

Gegen diese Auffassung von HOYER habe ich bereits früher²

Hämatein oder Carminsäure eine Färbung an, und auch jene erlangen nur die ganz schwache diffuse, welche direct von der Imbibition herrührt und durch Auswaschen mit Wasser oder Alkohol größtentheils wieder entfernt werden kann. Vorausgesetzt wird dabei allerdings, dass man durch die Conservirung nicht eigens Stoffe in die Gewebe, speciell die Kerne oder den Schleim, geschafft hat, die vorher noch nicht darin waren; am besten eignet sich daher für diese Frage die Conservirung in reinem Alkohol. Die Kerne mancher Pflanzen verhalten sich allerdings, wie ich auch aus eigener Erfahrung weiß, in so fern anders, als sie mit Hämatein (oder nach der Methode von F. SCHMITZ mit Hämatoxylin unter dem Einflusse der Luft) leidliche Färbungen geben können, aber in den Geweben der Pflanzen ist ja Thonerde vorhanden, die in den thierischen bisher nicht nachgewiesen worden ist.

¹ H. HOYER, Über den Nachweis des Mucins in Geweben mittels der Färbemethode. in: Arch. Mikr. Anat. 36. Bd. 1890 pag. 310 ff. (pag. 365).

² Hämatoxylin (citirt oben pag. 303 Anm. 1) pag. 178 Anm. 1. Vielleicht in zu scharfer Form, im Wesen jedoch mit Recht, zumal so weit die Carminlösungen in Frage kommen.

opponirt, aber nur nebenher; jetzt muss ich ausführlicher darauf eingehen. Bedauerlich ist es zunächst, dass HOYER nicht angiebt, welche Lösungen er benutzt hat, denn eine praktische Controlle seiner Angaben wird dadurch unmöglich gemacht. Ferner spricht er sich so unbestimmt aus, dass er anscheinend Recht hat. Wenn nämlich eine Farblösung allmählich starke Niederschläge absetzt, in denen in unserem Falle bekanntlich die meiste Farbe enthalten ist, so kann von der Lösung selber kaum noch verlangt werden, dass sie ordentlich färbe; und wenn andererseits das Hämatoxylin sich noch nicht zu Hämatein oxydirt hat, so kann die Lösung ebenfalls nicht färben. HOYER sagt also eigentlich nur, eine gewisse Reifung sei erforderlich, aber das ist selbstverständlich; er präcisirt hingegen nicht, welchen Grad sie erreicht haben muss, und hierauf kommt es doch eben an.

Ich habe, um die Frage nach der Reifung beantworten zu können, nach der Vorschrift von RAWITZ¹ eine Lösung angefertigt von 1 g Hämatoxylin, 1 g Alaun, 35 cem Glycerin und 65 cem dest. Wasser. Nach einigen Wochen sah sie violett aus, und es ließ sich bereits gut damit färben, denn ein geringer Theil des Hämatoxylins war inzwischen zu Hämatein geworden. Zum Vergleich habe ich damals und auch mehrere Monate später mit ihr und mit verschiedenen Lösungen von Hämatein und Alaun operirt, wo also die sogenannte Reifung nicht mehr abgewartet werden muss, und zwar an mancherlei Schleim von Vertebraten und Mollusken. Da hat sich denn Folgendes ergeben:

1. enthält die Lösung freie Säure — z. B. Essigsäure, wie mein saures Hämalaun oder die Lösung von EHRLICH — so färbt sie in der Regel den Schleim nicht;

2. enthält sie relativ viel Alaun — 5%, wie mein Hämalaun, oder gar noch mehr — so färbt sie ihn in der Regel ebenfalls nicht;

3. enthält sie relativ wenig Alaun, aber viel Hämatein, so färbt sie manche Art Schleim, aber sie tingirt auch die Kerne stark. Dies ist der Fall bei der Lösung von RAWITZ, die ja nur 1% Alaun, dagegen bald schon im Verhältnis zum Alaun sehr viel Hämatein

¹ B. RAWITZ, Leitfaden für histiologische Untersuchungen. Jena 1. Aufl. 1889 pag. 42; 2. Aufl. 1895 pag. 62. — Die Lösung wird im Laufe der Zeit rothviolett, ein Zeichen, dass sich für die geringe Menge Alauns zu viel Hämatein gebildet hat.

enthält. Wie wenig es aber dessen bedarf, lehrt die Erfahrung, dass ein mit Wasser verdünntes Hämalaun, wenn es mit dem doppelten Quantum Hämäteïn bereitet ist, bereits den Schleim lebhaft färbt, welchen das gewöhnliche Hämalaun ungefärbt lässt. Wendet man dies auf die Lösung von RAWITZ an, die wegen ihres geringen Gehaltes an Alaun (1 %) als Fünftel-Hämalaun bezeichnet werden könnte, so brauchen von dem 1 g Hämatoxylin nur 2 Centigramm¹ zu Hämäteïn oxydirt zu sein, um wohl die Kerne zu färben, nicht aber bereits den Schleim; und ist dann die Oxydation auf das Doppelte² fortgeschritten, so wird auch der Schleim gefärbt;

4. in schwierigeren Fällen habe ich die Lösung von RAWITZ auf $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{10}$ verdünnt anwenden müssen. War hierzu destillirtes Wasser³ genommen, so färbte sich der Schleim vortrefflich, nicht hingegen, wenn Alaunlösung verwandt wurde, wie denn auch vorher gefärbter Schleim beim Einlegen in Alaunlösung wieder entfärbt wird. Auch hieraus geht hervor, dass die Gegenwart von viel Alaun schädlich wirkt. Offenbar ist hieran aber nicht die Thonerde Schuld, sondern die saure Eigenschaft des Alauns. Wenigstens habe ich Schleim, der sich sonst absolut nicht mit Hämäteïn-Thonerde färben wollte, durch vorsichtiges Neutralisiren einer solchen Farblösung mit Brunnenwasser oder essigsauerm Kali gut gefärbt. Allerdings war dazu eine Lösung erforderlich, die relativ noch mehr Hämäteïn ent-

¹ In 100 Cubikcentimetern meines Hämalauns steckt nur 0,1 g Hämäteïn, also dieselbe Quantität Fünftel-Hämalaun würde nur 0,02 g Hämäteïn enthalten. Man ersieht leicht, welche Verschwendung von Material sich die Vorschriften zu solchen Hämatoxylinlösungen zu Schulden kommen lassen.

² Man färbt daher mit einer Lösung von 0,04 g Hämäteïn und 1 g Alaun in 100 ccm Wasser (oder Wasser + Glycerin) den Schleim sofort und braucht nicht erst Wochen lang auf die Reifung zu warten. Indessen hält sich obige Lösung nicht lange und hat so nur für die Theorie der Färbung einigen Werth.

³ Ganz richtig färbt daher auch R. v. SEILLER (Über die Zungendrüsen von *Anguis* [etc.]. in: Arch. Mikr. Anat. 38. Bd. 1891 pag. 177 ff.) mit stark verdünnter DELAFIELD'scher Lösung (3—4 Tropfen auf 100 ccm dest. Wasser, 12—15 Stunden lang). Allerdings ist dann nur schwierig eine Überfärbung und das nachträgliche vorsichtige Auswaschen mit saurem Alkohol zu vermeiden. Ganz vor Kurzem, während obige Zeilen schon geschrieben waren, sind ferner RAWITZ (Über eine Modification in der substantiven Verwendung des Hämäteïns. in: Anat. Anzeiger 11. Bd. 1895 pag. 301 ff.) und ISRAEL (Zur Verwendung stark verdünnter Hämatoxylinlösungen. *ibid.* pag. 454 ff.) für die Nützlichkeit sehr starker Verdünnungen eingetreten, allerdings nicht speciell für Schleimfärbung.

hielt, aber sich zur Schleimfärbung so lange untauglich erwies, wie sie noch nicht neutralisirt war¹.

Aus dem Gesagten scheint mir klar hervorzugehen, dass es sich bei der sogenannten Reifung in unserem Falle nicht nur um eine Oxydirung des Hämatoxylin's zu Hämatein, sondern auch um eine allmähliche Abschwächung der anfänglich sauren Reaction des Alauns (durch das kohlen-saure Ammoniak der Luft, vielleicht auch durch die Alkalien des Glases) handelt. Aber es ergibt sich zugleich gegen HOYER, dass die Schleimfärbung² nicht etwa an das Vorhandensein von noch nicht umgewandeltem Hämatoxylin oder von Stufen zwischen diesem und dem Hämatein gebunden ist, vielmehr sich mit Hämatein eben so gut und oft auch bequemer ausführen lässt.

Bei weiteren Versuchen mit Hämatein habe ich eine Mischung ausfindig gemacht, die auch in schwierigen Fällen den Schleim schnell und intensiv färbt. Statt des Alauns mit seiner doch ziemlich stark sauren Reaction nehme ich Chloraluminium, nämlich Hämatein 0,2 g, Chloraluminium 0,1 g, Glycerin 40, destillirtes Wasser 60 ccm. Man zerreibt am besten in einem kleinen Mörser das Hämatein mit einigen Tropfen Glycerin und fügt dann erst die übrigen Substanzen zu. Ein Filtriren ist kaum nöthig.

Diese Lösung — sie sei kurz Muchämatein³ genannt — färbt

¹ Die Vorschrift zu dieser Lösung lautet: Hämatein 0,1 g, zu lösen in 40 ccm Glycerin, dazu 0,6 g Alaun in 60 ccm Wasser gelöst. Setzt mit der Zeit stark ab. Man neutralisire aber möglichst vorsichtig, also mit ganz schwacher Lösung von essigsäurem Kali, und auch nur so weit, bis die anfänglich ins Rothe spielende Farbe in Violett übergeht; nicht aber bis zu Blauviolett, denn alsdann ist der Farbstoff schon im Ausfallen begriffen.

Diese Flüssigkeit ist ebenfalls entbehrlich, da die gleich zu nennende schon ohne Neutralisirung selbst schwierige Arten von Schleim rasch und gut färbt. Ich erwähne sie überhaupt nur, um eine Prüfung meiner Angaben zu ermöglichen.

² Eine Untersuchung ähnlicher Art über das Verhalten des Schleimes »zu den verschiedenen, gebräuchlichsten Hämatoxylinarten« stellte in einer kurzen Auslassung gegen G. BIZZOZERO J. SCHAFFER (Beiträge zur Histologie menschlicher Organe [etc.], in: Sitz. Ber. Akad. Wien 100. Bd. 3. Abth. 1892 pag. 440 ff.; Citat pag. 473) seiner Zeit in Aussicht, aber sie ist bisher nicht erschienen. BIZZOZERO bemerkt übrigens (Sulle ghiandole tubulari del tubo gastro-enterico [etc.], in: Atti Accad. Torino Vol. 24 1889 pag. 110 ff.) mit Recht: »Le tinte d'ematoxilina preparate con diverse formole hanno diversa affinità pel muco« (pag. 114), geht indessen nicht weiter darauf ein.

³ Ich möchte befürworten, dass man diese und andere Bezeichnungen, z. B.

meist ungemein schnell; namentlich die Schleimpfröpfe in den Becherzellen werden sofort tief blau, während Kerne und Plasma selbst nach vielen Stunden noch fast gar keine Farbe angenommen haben. (Celloidin wird freilich mitgefärbt, aber das geschieht in der Lösung von RAWITZ auch. — Die Kerne färbt man zweckmäßig vorher mit Paracarmin.) Nur bei ganz schwierigen Objecten habe ich sie stark mit Wasser verdünnen müssen, und dann verhielt sie sich ähnlich wie die verdünnte Lösung von DELAFIELD (s. oben pag. 306 Anm. 3), d. h. sie färbte auch Plasma und Kerne mit, indessen nicht so stark, dass man mit saurem Alkohol hätte auswaschen müssen.

Wie ich so eben für die wässerigen Lösungen gezeigt zu haben glaube, dass die Färbung des Schleimes nicht lediglich von der Gegenwart des Hämateins und eines Thonerdesalzes, sondern auch von der Beschaffenheit der übrigen Ingredienzien der Lösung abhängt, so habe ich schon in meiner ersten kleinen Schrift über das Hämatein¹ für die spirituösen Mischungen dargelegt, dass die Zuthaten eine außerordentlich wichtige Rolle spielen. Dies halte ich nach erneuten Versuchen auch jetzt noch aufrecht. Eine Lösung von 0,2 g Hämatein und 0,1 g Chloraluminium in 100 cem Alkohol von 70 % mit Zusatz von 2 Tropfen Salpetersäure² habe ich beinahe 2 Jahre stehen; sie färbt noch immer den Schleim ungemein rasch und zuverlässig, ist also, wenn man wässerige Lösungen vermeiden möchte, sehr zu empfehlen. Verdünnt man nun diese Lösung mit einer reichlichen Menge von Chlorcalciumlösung (10 %ig in Alkohol von 70 %), so färbt sie den Schleim nicht, verdünnt man sie dagegen mit ebenso viel reinem Alkohol, so thut sie es wohl. Also trotz des Vorhandenseins der Componenten der Farbe — Hämatein und Thonerdesalz — kommt keine Färbung zu Stande, wenn gewisse Salze zugegen sind, wie ich dies schon damals für Chlorammonium, Chlornatrium, Chlorkalium, Chlormagnesium, Chlorcalcium und salpetersaures Ammoniak festgestellt habe. Ich betone

Hämalaun, Paracarmin etc. in die fremden Sprachen unverändert aufnehmen. Wer erkennt wohl im italienischen Emallume das Hämalaun wieder?

¹ MAYER, Hämatein (citirt oben pag. 303 Anm. 1) pag. 178—179.

² Die Säure ist nicht absolut nöthig, aber sie macht die Lösung haltbarer und lässt es nicht zu, dass auch das Plasma sich färbt, localisirt also die Tinction fast ganz auf den Schleim. Ich rathe übrigens an, zunächst nur 1 Tropfen Salpetersäure zuzusetzen und die Probe auf die Färbekraft zu machen; die Tropfen fallen nämlich aus verschiedenen Gläsern nicht gleich groß aus.

dies ganz besonders, weil neuerdings RAWITZ¹ das »Hämatoxylin (Hämatein) bei substantiver Anwendung geradezu als ein mikrochemisches Reagens auf Mucin angesehen« wissen will; dies ist, wie man sieht, unrichtig.

Es seien mir, bevor ich zu der Besprechung der Theerfarben übergehe, noch einige Worte über die Haltbarkeit der sogenannten Hämatoxylinlösungen gestattet. Bekanntlich setzen die meisten nach einiger Zeit bedeutende Quantitäten eines dunklen Stoffes auf dem Boden der Flaschen ab; zugleich oder schon früher entsteht auf der Oberfläche der Flüssigkeit eine Haut, und auch am Glase selber bildet sich je nach seiner Beschaffenheit eine dickere oder dünnere Schicht von dunkler Farbe. Die Lösungen von BÖHMER, DELAFIELD, SANFELICE, GAGE² und HANSEN³, auch mein Hämalau unterliegen diesem theilweisen Verderben, werden dadurch allmählich an Farbstoff schwächer und müssen auch wohl filtrirt werden. Nun hat zwar vor einigen Jahren UNNA⁴ allerlei Mittel gegen diese »Überreife« vorgeschlagen, indessen sind sie doch nicht einfach zu handhaben, und selbst das bequemste, nämlich der Zusatz von Schwefel zur Farblösung, hilft nach meiner Erfahrung auf die Dauer nicht. Dagegen wirkt Glycerin absolut sicher, verlangsamt allerdings die Färbung sehr und macht sie auch

¹ RAWITZ (citirt oben pag. 305 Anm. 1) 2. Aufl. pag. 62. Substantiv färben heißt direct, ohne vorheriges Beizen des Gewebes mit anderen Stoffen, färben. Unter den substantiven Lösungen führt RAWITZ auch mein Hämacalcium auf!

² H. GAGE, An aqueous solution of Hematoxylin which does not readily deteriorate. in Proc. Amer. Micr. Soc. Vol. 14 1893 pag. 125 ff. — Verf. supponirt die Einwirkung von Bakterien und bereitet desswegen seine Lösung mit gekochtem Wasser, setzt ihr auch 2% Chloralhydrat hinzu. Mir ist sie aber rasch verdorben, und GAGE redet selber von der Nothwendigkeit, sie wieder aufzukochen und zu filtriren, da mitunter in ihr Körnchen auftreten; das will doch heißen, dass sie nicht lange klar bleibt. Im Übrigen soll noch erst bewiesen werden, dass an der Zersetzung der Lösungen Spaltpilze Schuld sind. Meine Versuche mit Thymol sprechen nicht dafür.

³ FR. C. C. HANSEN, Eine schnelle Methode zur Herstellung des BÖHMERschen Hämatoxylins. in: Z. Anzeiger 18. Jahrg. 1895 pag. 158 ff. Auch HANSEN legt Werth darauf, dass die Lösung »so gut wie keimfrei« sei. Ich kann aber nicht finden, dass sie sich länger hielte als Hämalau; im Gegentheil, das Mangan begünstigt die Bildung des Niederschlages. Will man übermangansaures Kali zur Oxydation verwenden, so geschieht es weit richtiger, indem man eine alkoholische Lösung von Hämatoxylin kurze Zeit damit in Contact lässt und diese Flüssigkeit, die frei von Mangan bleibt, in der richtigen Menge zur Alaunlösung (5%) setzt.

⁴ P. G. UNNA, Über die Reifung unserer Farbstoffe. in: Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1892 pag. 475 ff.

etwas weniger präcis: z. B. färbt sich die Grundsubstanz des Knorpels mit. Will man also ein Hämalau haben, das auch nach Jahresfrist noch vollkommen klar ist, so braucht man ihm nur Glycerin (im Verhältnis von etwa 40 ccm auf 100 ccm Hämalau) zuzusetzen. Ich habe aber, um der Verlangsamung der Färbung entgegenzuwirken, nun auch mehr Hämatein genommen und empfehle unter dem kurzen Namen Glychämalau folgendes Gemisch: Hämatein 0,4 g (in einigen Tropfen Glycerin durch Verreiben im Mörser zu lösen), Alaun 5 g, Glycerin 30, dest. Wasser 70 ccm. Es färbt etwa in der Stärke wie die Lösung von RAWITZ, aber doch präciser, jedenfalls den Schleim in der Regel nicht und auch das Plasma nur wenig; freilich andererseits nicht ausschließlich die Kerne, wie es das Hämalau thut. — Leider ist es mir nicht zu ermitteln gelungen, worauf diese theils vortheilhafte, theils unerwünschte¹ Wirkung des Glycerins beruht. EHRLICH² lässt bei seiner Lösung die Essigsäure die Bildung von Niederschlägen verhindern, während ich glaube, auch hier spielt das Glycerin (33 Volumprocente) die Hauptrolle³. Denn falls nur im Verhältnis zum Hämatein genug Alaun vorhanden ist, so genügt schon der Zusatz von Glycerin ohne die Säure; andererseits verhindert selbst viele Essigsäure ohne Glycerin nicht die Zersetzung meines Hämalaus, wiewohl sie sie bedeutend verlangsamt.

¹ Ich verlange von einem Kernfärbemittel, dass es nur die Kerne färbe; die anderen Substanzen tingire ich lieber besonders und in möglichst abweichenden Tönen. Die gebräuchlichen »Hämatoxyline« (EHRLICH, DELAFIELD) thun dies aber nicht, und Mancher sieht darin vielleicht sogar einen Vorzug. Mir ist die oben erwähnte Nebenwirkung des Glychämalaus nicht angenehm, um so weniger als sie selbst durch einen relativ starken Zusatz von Salzsäure nur gemildert, nicht ganz aufgehoben wird.

² P. EHRLICH in: Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 pag. 150.

³ Der Niederschlag, der sich allmählich im Hämalau bildet, ist zwar in Alaunwasser löslich, nicht aber in Glycerin. Wie EHRLICH angiebt, entsteht er durch die Spaltung des Alauns in freie Säure und ein basisches Thonerdesalz, das mit dem Hämatein eine unlösliche Verbindung eingeht. Mir scheint daraus zu folgen, dass er dann besonders leicht auftreten wird, wenn relativ wenig Alaun in der Flüssigkeit vorhanden ist, und dann würde selbst die Gegenwart von viel Glycerin seine Bildung nicht verhindern können. So ließe es sich denn auch verstehen, warum die Lösung von RAWITZ bei mir bereits in acht Monaten viel abgesetzt hat, ohne aber dadurch ihre sonstigen Eigenschaften eingebüßt zu haben. — Beiläufig sei erwähnt, dass die Vorschrift von E. HACHE (Sur une laque à l'hématoxyline; son emploi en histologie. in: C. R. Soc. Biol. Paris (10) Tome 1 1894 pag. 253 u. 369) doch wohl kaum hätte veröffentlicht zu werden brauchen.

2. Die Theerfarben.

Ich beschränke mich hier auf die hauptsächlichsten und lasse weniger gebräuchliche, wie salpetersaures Rosanilin (LIST) etc., außer Acht.

Methylgrün und **Jodgrün**. Das Jodgrün scheint¹ Ende der siebenziger Jahre in die mikroskopische Technik eingeführt worden zu sein. GRIESBACH lobt es 1882 sehr, fügt jedoch gleich hinzu, es sei bereits »beinahe ganz« vom Methylgrün verdrängt² worden, da dieses billiger sei. Speciell für Schleim hat es GRIESBACH damals noch nicht ausdrücklich empfohlen, wohl aber giebt er an, der violette Farbstoff, welcher daraus durch Zusatz eines Alkalis »oder im Muschelorganismus durch den starken Kalkgehalt der Gewebe und des Blutes« entstehe, sei »die durch Zersetzung entstandene Basis des Salzes«. Er wiederholt³ diese irrige Behauptung 1886 für das Methylgrün, das schon früher als das Jodgrün (nämlich 1874 durch CALBERLA) Eingang in die Mikrotechnik gefunden zu haben scheint, unter Berufung auf CALBERLA⁴ und versteigt sich sogar zu dem Schlusse,

¹ Fide M. FLESCHE in: Z. Anzeiger 5. Jahrg. 1882 pag. 554.

² Dies mag für die Histologen gelten, nicht aber für die Pathologen, die auch jetzt noch aus guten Gründen das Jodgrün beim Nachweis des Amyloids vorziehen (s. auch unten pag. 325 Anm. 3). Auch die Botaniker scheinen das Jodgrün mit Vorliebe zu brauchen.

³ H. GRIESBACH, Weitere Untersuchungen über Azofarbstoffe [etc.]. in: Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 pag. 358 ff. (pag. 365).

⁴ CALBERLA hat 1874 das Methylgrün zuerst empfohlen und sagt speciell, Schnitte durch Menschenhaut seien darin polychrom geworden, nämlich die Kerne der Epidermis grünblau bis rein blau, die übrigen Kerne rosaroth bis rothviolett, die Intercellularsubstanz grünblau bis blau. Von reinem Grün redet er gar nicht. Offenbar war sein Methylgrün (als Vert en cristaux von M. B. VOGEL in Leipzig bezogen) recht unrein. LEE supponirt statt dessen (in der 3. Auflage seines Vade-Mecum 1893 pag. 75), es habe sich dabei um eine Doppelfärbung mit Eosin gehandelt, allein das würde CALBERLA wohl um so eher erwähnt haben, als er selber gleich darauf diese Doppelfärbung empfiehlt.

In diesem Falle lässt sich natürlich keine Gewissheit mehr erlangen, da CALBERLA längst todt ist. Mehr Erfolg habe ich einem anderen Autor gegenüber gehabt. A. MOSSO nämlich giebt in seinen »Studi sul sangue Nota 9 Applicazioni del verde metile per conoscere la reazione chimica e la morte delle cellule« (in: Rend. Accad. Lincei Roma Vol. 4 Sem. 1 1888 pag. 419 ff.) folgende Reaction an: mit Methylgrün in schwacher wässriger Lösung färben sich die Kerne der Blutkörperchen, so lange sie leben, gar nicht, beim Absterben violett und noch später grün. Ähnlich verhalten sich die Flimmerzellen von *Anodonta* und *Unio*. Zur Erklärung dieses Factums, das ich übrigens gar nicht bezweifle, sagt MOSSO, die Alkalinität der Zellen zerstöre das Methylgrün, das in sie hin-

die Gewebe verhielten sich sauer genug, um das Methylgrün zu zerlegen und »sich mit der farblosen Basis zu rothen, rothvioletten und blauen Farbstoffsalzen umzusetzen«. Davon kann indessen keine Rede sein, vielmehr erklärt sich die polychrome Färbung einfach durch das Vorhandensein fremder Farbstoffe, besonders des Methylviolett, im Methylgrün und noch mehr im Jodgrün. In der That haben auch einige Autoren¹ diese einfache Erklärung schon mehr oder minder bestimmt ausgesprochen, und ich kann mich ihnen nur anschließen. Im käuflichen Methylgrün² ist stets ein wenig — in schlechten Sorten sogar viel — eines violetten Farbstoffes vorhanden, den man durch Chloroform ohne Weiteres daraus extrahiren und auch dadurch sichtbar machen kann, dass man eine wässerige Lösung mit etwas Alkali versetzt: in der farblos werdenden Flüssigkeit tritt ein violetter Niederschlag auf³. Oder man färbt

eindringe, und »perciò la colorazione delle cellule in violetto sarebbe un indizio di un' alcalinità meno grande«. Ganz abgesehen davon, dass diese Phrase nicht klar ist, möchte ich nur constatiren, dass im hiesigen Institute sich noch ein Theil des von MOSSO damals mitgebrachten Methylgrüns befindet, und dass dieses sehr viel Violett enthält.

Neuerdings erwähnt auch PH. KNOLL (Über die Blutkörperchen bei wirbellosen Thieren. in: Sitz. Ber. Akad. Wien 102. Bd. 3. Abth. 1894 pag. 447), dass die Blutzellen von *Pectunculus* und *Capsa* sich mit Methylgrün sowohl grün als auch blau und violett färben, und möchte diese Farbenunterschiede auf »rege Stoffwechselvorgänge innerhalb dieser Zellen« zurückführen. Ferner hat ähnlich wie MOSSO auch V. GRANDIS (Sulle modificazioni degli epitelli ghiandolari durante la secrezione [etc.]. in: Atti Accad. Torino Vol. 25 1890 pag. 765 ff.; übersetzt in: Arch. Ital. Biol. Tome 14 1890 pag. 160 ff.) Jodgrün zur Erkennung der Reaction der Zellen in den Malpighischen Gefäßen von *Hydrophilus* benutzt: sie färben sich, so lange sie noch leben, violett (der Kern gar nicht), seien also alkalisch. Das Methylgrün sei in diesem Falle nicht empfindlich genug gewesen. Weiter giebt GRANDIS hierüber nichts an, und auch L. CUÉNOT (Etudes physiologiques sur les Orthoptères. in: Arch. Biol. Tome 14 1895 pag. 293 ff.), der es in ähnlicher Weise bei Orthopteren angewandt hat, versucht keine Erklärung der Metachromasie.

¹ H. FOL, Lehrbuch der vergleichenden mikroskopischen Anatomie [etc.] Leipzig 1884 pag. 192; P. W. SQUIRE, Methods and Formulae used in the Preparation of Animal and Vegetable Tissues. London 1892 pag. 37; HOYER (citirt oben pag. 304 Anm. 1) pag. 361.

² Ich habe mehrere Sorten zur Verfügung gehabt, darunter auch eine von der Berliner Aktiengesellschaft für Anilinfabrikation.

³ Nach G. SCHULTZ, Tabellarische Übersicht der künstlichen organischen Farbstoffe 2. Aufl. Berlin 1891 pag. 80 Nr. 283 und 284 müssen beide Arten Grün mit Natronlauge farblos werden. — Ich empfehle folgende sehr einfache Probe: ein Tropfen der Lösung von Jod- oder Methylgrün wird mit einem Glasstabe auf Filtrirpapier gebracht, der grüne Fleck sodann über eine

in einer heißen Lösung Wolle und wäscht sie mit Leitungswasser aus: die anfänglich grüne Wolle wird je nach der Stärke der Verunreinigung des Methylgrüns heller oder dunkler violett. Was vom Methylgrün gilt, gilt in noch höherem Maße vom Jodgrün¹: es ist stark mit Violett gemischt. Färbt man also Schnitte damit, so sind sie schon von vorn herein nicht rein grün, sondern grünblau; wäscht man sie dann mit Leitungswasser aus, welches das Grün zerstört, so bleibt ein schwaches Violett zurück, und wiederholt man Färbung und Entfärbung, so kann man das Violett recht kräftig machen.

Zur Färbung des Schleimes ist Jodgrün oder Methylgrün von SCHIEFFERDECKER, LIST, PANETH, HOYER, BIZZOZERO und vielleicht auch Anderen verwandt worden. Eine ausgesprochene Metachromasie scheint dabei nicht immer aufzutreten. In der Form des Gemisches von Biondi hat jüngst R. KRAUSE² das Methylgrün benutzt, giebt aber nichts Näheres darüber an. Ich ziehe, sobald es sich nur um den Schleim handelt, eine einfache Lösung von Methylgrün jener immerhin etwas launenhaften Flüssigkeit vor, obwohl der Contrast zwischen dem Grün des Schleimes und dem Orange des Epithels meist sehr scharf hervortritt, was ja bei Methylgrün allein nicht der Fall sein kann. Im Übrigen liefern die genannten Grüne trotz aller Vorsicht bei ihrer Anwendung doch recht vergängliche Färbungen, die auch in Balsam mitunter schon rasch verblässen. — HOYER erwähnt (pag. 319) noch einiger anderen Grüne (Methylengrün etc.), aber diese scheinen nichts Besonderes zu leisten.

Methylenblau und Methylviolett. Das Methylenblau hat HOYER mit Erfolg angewandt. Wirklich färbt es auch in dünnen Lösungen den Schleim intensiv und ziemlich dauerhaft, jedoch meist nicht metachromatisch. Über die Metachromasie näheren Aufschluss ertheilt zu haben, ist UNNA's Verdienst. Nach ihm³ kommt sie durch die Gegenwart von Methylenroth und Methylenviolett zu Stande, von denen jenes bereits im käuflichen Farbstoff vorhanden sein, dieses hingegen erst durch Behandlung mit Alkali daraus erzeugt werden muss. UNNA hat dieses polychrome Methylenblau viel benutzt

offene Flasche mit Ätzammoniak gehalten; er darf nicht violett werden, sondern muss verschwinden. Allerdings so empfindlich wie die im Texte angegebenen Methoden ist diese nicht, sie dürfte aber in der Regel genügen.

¹ Gleichfalls aus verschiedenen Quellen, darunter der eben genannten.

² R. KRAUSE, Zur Histologie der Speicheldrüsen. Die Speicheldrüsen des Igels. in: Arch. Mikr. Anat. 45. Bd. 1895 pag. 93 ff. (pag. 95).

³ UNNA, Reifung (citirt oben pag. 309 Anm. 4) pag. 477 ff.

und auch ganz speciell für Schleim empfohlen¹. Ich kann ihm darin wenigstens in so fern beipflichten, als ich bei Benutzung einer selbst bereiteten Lösung in der That den Schleim roth gefärbt erhalten habe, während die Kerne blau wurden. Dieselbe Sorte Methylenblau (von Höchst) färbte ohne jene Vorbereitung durch Alkalien den Schleim durchaus nicht roth, auch nicht, wenn man der Lösung etwas Alkali hinzufügte oder die gefärbten Schnitte hinterher mit alkalischem Wasser auswusch; vielmehr war zur Erzielung der polychromen Lösung das Abdampfen der Methylenblaulösung unter Zusatz von etwas Alkali und kohlen saurem Alkali durchaus erforderlich². Die Färbung ist fast so schön rothviolett wie mit Thionin, indessen wenig haltbar: in starkem Alkohol geht sie fast ganz wieder verloren, und deshalb hat auch UNNA eine eigene Methode zur Entwässerung der Schnitte erfinden müssen, auf die ich unten (pag. 321 Anm. 1) noch zurückkomme. Es ist indessen wohl kaum nöthig, hier näher auf das polychrome Methylenblau einzugehen, weil man die Doppel-färbung (des Schleimes und der Kerne) eben so einfach derart erzielen kann, dass man sich entweder des Methylvioletts oder einer Mischung von relativ viel Methylviolett und wenig Methylenblau in wässriger Lösung bedient. Ein geringer Zusatz von Essigsäure ist dabei vortheilhaft, und man erhält dann die Kerne schön blau, den Schleim lebhaft violett gefärbt. Allerdings lässt sich auch diese Färbung nicht durch Alkohol hindurch in Balsam überführen.

Methylviolett ist schon relativ früh zur Schleimfärbung verwandt worden. Ich finde übrigens, es lässt in schwierigen Fällen eben so im Stich wie Methylgrün und wie

Thionin und Toluidinblau. Jenes wird von HOYER, der es 1890 zuerst für Schleim angewandt hat, ungemein gerühmt und geradezu als Reagens auf Mucin bezeichnet. Auch wenn man dies nicht zugeibt, so wird man doch HOYER in seinem Lobe beistimmen müssen, allerdings mit der Einschränkung, dass selbst hier mitunter³ die

¹ P. G. UNNA, Über mucinartige Bestandtheile der Neurofibrome und des Centralnervensystems. in: Monatshefte Prakt. Dermat. 18. Bd. 1894 pag. 57 ff.

² In dem Maße wie das Methylenblau polychrom wird, löst es sich in Chloroform auf, was es sonst nicht thut. Methylviolett ist in Chloroform leicht löslich. — Das polychrome Methylenblau, wie es auf Empfehlung von UNNA hin die bekannte Leipziger Firma GRÜBLER & Co. liefert, färbt ungemein stark und präcis.

³ HOYER räth pag. 324 die Beizung mit Sublimatlösung an. Indessen auch diese kann vergeblich sein, und doch färben sich dieselben Schnitte hinterher noch mit meinem Mucicarmin (s. unten pag. 317). Mit Toluidinblau habe ich

Färbung ganz versagt und überhaupt nur wenig haltbar¹ ist. Wenn sie aber typisch geräth, so tritt sie ungemein scharf hervor. Ich habe Thionin sowohl von KLÖNNE & MÜLLER in Berlin als auch, obwohl es heißt, es sei im Handel nicht mehr zu haben, von E. MERCK in Darmstadt erhalten. Jenes stammt indirect von P. EHRLICH, aber das MERCK'sche färbt womöglich noch stärker und präciser. Das Toluidinblau (ebenfalls von HOYER eingeführt) hat sich mir in so fern besser bewährt, als es nicht nur überhaupt intensiver färbt, sondern auch sich in Balsam bringen lässt und darin nicht so leicht verblasst. Bei Thionin ist mir die Überführung in Balsam nur nach den beiden weiter unten (pag. 320 und 321 Anm. 1) zu schildernden Methoden gelungen, aber selbst dann hielt sich das Rothviolett des Schleimes kaum wenige Monate.

Bismarckbraun. Von den Theerfarben möchte ich diese über alle anderen desswegen stellen, weil die Färbungen mit ihr in Alkohol nicht ausgezogen werden und sich auch in Balsam halten. Der Schleim färbt sich meist ganz intensiv braun, viel stärker als die Kerne, aber in demselben Tone. Auch RAWITZ² lobt es sehr und

dieselben Erfahrungen gemacht. — Auch A. MAJEWSKI (Über die Veränderungen der Becherzellen im Darmcanal während der Secretion. in: Internation. Monatschr. Anat. Phys. 11. Bd. 1894 pag. 177 ff.) hat die besten Resultate mit Thionin erzielt, eben so P. NICOGLU (Über die Hautdrüsen der Amphibien. in: Zeit. Wiss. Z. 56. Bd. 1893 pag. 409 ff.), ferner SEIDENMANN, GREEN, WARBURG u. A. m.

¹ Dies hat außer NICOGLU kürzlich R. KRAUSE constatirt (Speicheldrüsen, citirt oben pag. 313 Anm. 2) und empfiehlt pag. 95, die Schnitte nach der Färbung auf 2—3 Minuten in eine concentrirte wässerige Lösung von Ferrocyankalium zu bringen, dann zu waschen und durch Alkohol in Balsam überzuführen. Allerdings werde dabei das Rothviolett der Schleimzellen mehr zu Roth, auch gehe im Alkohol ein Theil des Farbstoffes verloren. Ich bin trotz mehrfacher Versuche mit dieser Methode zu keinem guten Resultate gekommen, während das polychrome Methylenblau durch nachherige Behandlung mit rothem Blutlaugensalz in der That gut fixirt wird und sich in Balsam bringen lässt (s. UNNA, Dies pecifische Färbung der glatten Muskelfasern. in: Monatsh. Prakt. Dermat. 19. Bd. 1894 pag. 533 ff.).

² Leitfaden (citirt oben pag. 305 Anm. 1) 2. Aufl. pag. 66. Wie stark die concentrirte Lösung ist, sagt RAWITZ nicht. — Nach meinen Versuchen genügen 0,05 Farbstoff in 100 ccm dest. Wasser gewöhnlich. Man muss filtriren, aber das Filter hält ungemein viel Farbstoff zurück, und zwar so fest gebunden, dass er mit Wasser erst dann daraus zu entfernen ist, wenn man dies ansäuert (z. B. mit Essigsäure). Setzt man 4 Filter in einander, so läuft die obige Lösung fast farblos ab. Auf diesen unter Umständen schädlichen Einfluss des Filtrirens habe ich übrigens schon früher (Carmin, citirt oben pag. 303 Anm. 1. pag. 494 Anm. 1) aufmerksam gemacht und sehe jetzt, dass auch SCHIEFFER-DECKER (Mittheilung betreffend das von mir verwandte Anilingrün. in: Zeit.

verwendet es in concentrirter wässriger Lösung, worin die Präparate 24 Stunden bleiben sollen. In schwierigen Fällen (Darm von *Homo*) ist dies auch wirklich nothwendig, gewöhnlich aber genügt schon kürzeres Verweilen in schwächerer Lösung. Mitunter fällt die Färbung des Schleimes nicht rein braun, sondern schmutzig ins Schwärzliche aus.

Safranin. Auch dieser Farbstoff ist meist sehr gut zu verwenden, leider aber nicht immer zuverlässig, und es ist mir gleich PANETH¹, BIZZOZERO², HOYER³ u. A. m. nicht gelungen, die Ursachen dafür festzustellen. Im besten Falle wird der Schleim lebhaft gelb, während das übrige Gewebe roth ist; zuweilen aber ist auch der Schleim roth, dann freilich etwas intensiver gefärbt als der Rest. Dabei scheint es meist einerlei zu sein, ob man die Lösung⁴ rein wässrig oder mit Alkohol von 30 % oder 50 % macht, eben so, ob sie stark oder schwach ist. Leider hält das Gelb als solches nur in ganz seltenen Fällen (Schleim von *Limax* und *Tapes*) den Transport durch die Alkohole in Balsam aus, und so hat denn auch BIZZOZERO anfänglich Glycerin oder essigsäures Kali, schließlich dicken Zuckersyrup, der selbst etwas Safranin enthält, angewandt und scheint damit gute Resultate erzielt zu haben. RAWITZ⁵ giebt an, dass bei »langer Behandlung« Mucin und Knorpelgrundsubstanz violett werden; wolle man dies vermeiden und nur ein leuchtendes Roth haben, so müsse man in sehr verdünnten Lösungen 24 Stunden lang färben. Das habe ich mit meinen Präparaten auch gethan, aber kein gutes Resultat erzielt. Dagegen wird der Schleim sehr scharf und intensiv, allerdings schmutzig violett gefärbt, wenn man sehr concentrirte Lösungen in 30 %igem Alkohol über Nacht einwirken lässt

Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 pag. 43) es für Methylgrün und Anilingrün gethan hat. — Die Lösung von Bismarckbraun schimmelt nach längerer Zeit, und die Wand der Pilzhypen ist dann bereits im Leben intensiv braun gefärbt, hält auch die Farbe in Alkohol und Balsam fest.

¹ J. PANETH, Über die secernirenden Zellen des Dünndarm-Epithels. in: Arch. Mikr. Anat. 31. Bd. 1888 pag. 113 ff.

² G. BIZZOZERO, Ghiandole tubulari (citirt oben pag. 307 Anm. 2) pag. 130 und 131, ferner in den Fortsetzungen obiger Arbeit, die im 27. Bd. derselben Zeitschrift erschienen sind. Zuckersyrup: Tomo 27 1891 pag. 325. — Ähnlich wie BIZZOZERO hat auch D. BOSSALINO (Contributo allo studio dei tessuti mucosi. in: Arch. Sc. Med. Torino Vol. 17 1893 pag. 423 ff.) das Safranin verwandt, aber für Nabelstrang und Haut.

³ HOYER (citirt oben pag. 304 Anm. 1) nennt sie höchst capriciös und zu wenig empfindlich.

⁴ Ich nehme ein sogenanntes spirituslösliches Safranin von GRÜBLER.

⁵ RAWITZ, Leitfaden (citirt oben pag. 305 Anm. 1) 2. Aufl. pag. 65.

und später durch sauren Alkohol alle Farbe aus dem übrigen Gewebe entfernt. Dieses Violett¹ ist sehr widerstandsfähig: man kann die Präparate bequem in Balsam bringen oder auch erst in Wasser zurück, um sie mit Häkalaun oder Carmalaun nachzufärben, so dass die Kerne ebenfalls gut hervortreten. Direct erhält man das Violett, wenn man die starke Lösung des Safranins mit Salzsäure schwach ansäuert und damit färbt: dann ist nach dem Abspülen mit Alkohol nur der Schleim tingirt. Wahrscheinlich enthält das Safranin eine geringe Menge eines violetten Farbstoffes, der sich langsam aber dauerhaft an den Schleim bindet; ihn durch sonstige Mittel (Wolle etc., Chloroform etc.) aus der Lösung zu isoliren, habe ich aber vergeblich versucht.

3. Cochenille und Carmin.

Im Jahre 1879 habe ich² die Cochenilletinctur als Mittel zur Färbung von Drüsen bezeichnet, in so fern damit »sie oder ihre Secrete häufig graugrün werden und auf diese Weise leicht ins Auge fallen«; ausdrücklich von Schleim ist dabei aber keine Rede gewesen. Dagegen empfiehlt sie CARRIÈRE³ geradezu als ein Reagens auf »Schleimdrüsen und Becherzellen« von Schnecken, weil diese darin eine schwarze oder gleichmäßig graue Färbung annehmen, während die Kerne röthlich hervortreten.

Ich habe vergebliche Versuche mit dem Darm einer jungen Katze und eines Hundes sowie mit der Haut von *Limax* angestellt. Es kam keinerlei distincte Färbung des Schleimes zum Vorschein.

Mucicarmin. Nach meinen Erfahrungen stehe ich nicht an, dieses neue Mittel für eines der besten von allen, die zum Färben des Schleimes gebraucht werden, zu erklären. Denn nicht nur färbt es intensiv und in lebhaftem Roth, hebt also nach Häkalaun den Schleim gegen die Kerne stark ab, sondern die Färbung ist auch in infinitum haltbar. Es kommt daher dem Thionin nicht nur gleich, sondern übertrifft es sogar.

Schon vor einigen Jahren⁴ habe ich kurz angedeutet, dass sich

¹ RAWITZ, Leitfaden (citirt oben pag. 305 Anm. 1) 1. Aufl. pag. 50 erwähnt es bereits nebenher.

² MAYER, Über die in der Zoologischen Station zu Neapel gebräuchlichen Methoden [etc.]. in: Mitth. Z. Stat. Neapel 2. Bd. 1880 pag. 1 ff. (pag. 17).

³ J. CARRIÈRE, Die Fußdrüsen der Prosobranchier [etc.]. in: Arch. Mikr. Anat. 21. Bd. 1882 pag. 387 ff. (pag. 389 und 392).

⁴ Hämatoxylin (citirt oben pag. 303 Anm. 1) pag. 178 Anm. 1.

Schleim in einer »Lösung von Carmin + Chloraluminium in Alkohol« färbe, während HOYER schlechtweg alle Carminlösungen für unbrauchbar erklärt hatte. Meine Präparate stammen von 1890 und haben sich bisher ganz unverändert erhalten. Die damalige Flüssigkeit war eine Lösung von je 4 g Carmin und Chloraluminium in 100 g Alkohol von 70 %; sie wurde auch in dieser Concentration angewandt, indem die der Kerne wegen mit Hämalauun oder Hämacalcium vorgefärbten Schnitte einfach damit übergossen und sofort mit Alkohol abgespült wurden. All dies ist natürlich auch heute noch ausführbar, indessen ist nicht nur die Lösung selber unangenehm zu bereiten, weil der Alkohol längere Zeit kochen muss und dann heftig stößt, sondern obige Art ihrer Anwendung ist auch relativ theuer. Daher gebe ich jetzt folgende verbesserte Vorschrift.

1 Gramm Carmin und $\frac{1}{2}$ Gramm Chloraluminium (trockenes, nicht schon feucht und daher gelb gewordenes) werden in einem Porzellanschälchen gut gemengt und mit 2 cem destillirten Wassers übergossen¹. Das Schälchen wird dann über einer sehr kleinen Gas- oder Spiritusflamme etwa 2 Minuten lang erhitzt, bis das anfänglich hellrothe Gemenge ganz dunkel geworden ist. Dabei muss gut umgerührt werden; es steigen saure Dämpfe von eigenthümlichem Geruche auf. Ist die Mischung durch Verdampfen von Wasser zähflüssig² geworden, so fügt man etwas Alkohol von 50 % hinzu, worin sich die noch heiße Masse leicht lösen muss, und spült sie mit mehr Alkohol in eine Flasche hinein. Man bringt die gesammte Lösung durch Zusatz von Alkohol (stets 50 %!) auf 100 cem und filtrirt sie frühestens nach 24 Stunden. Der Bodensatz darf nicht erheblich sein; er besteht im Wesentlichen aus ungelöstem Carmin.

Bei dem eben geschilderten Processe, der übrigens fast eben so rasch verläuft wie er sich liest, ist die Hauptsache, dass die beiden Componenten der Farbe mit möglichst wenig Wasser auf einander einwirken, denn sonst dauert es sehr lange, bis das Chloraluminium das Carmin löst, oder es geschieht überhaupt nur ganz unvollkommen. Man mag auch etwas mehr Chloraluminium nehmen — auf die obige Menge bis zu 1 g — aber in eben demselben Maße färbt sich später der Schleim langsamer und weniger stark.

¹ Diese geringen Mengen lassen sich leichter verarbeiten als größere, genügen übrigens auch für 1 Liter Mucicarmin. Man nehme daher ohne Noth nicht mehr.

² Erkalte ist sie hart und lässt sich unverändert aufbewahren, ist aber leider hygroskopisch und daher in der Praxis nicht bequem verwendbar.

Die beschriebene alkoholische Stammlösung wird nun beim Gebrauch mit der zehnfachen Menge guten kalkreichen Brunnenwassers verdünnt; ich rathe an, davon nur relativ kleine Mengen (50 oder 100 ccm) vorrätzig zu machen, da sie mitunter¹ schon in einer Woche verdirbt, während die alkoholische sich unbegrenzt lange zu halten scheint. Brunnen- oder Leitungswasser ist deswegen zu empfehlen, weil es die etwaige freie Säure im Chloraluminium zum Theil abstumpft; man mag auch zuerst eine Probe mit destillirtem Wasser anstellen, und nur wenn diese nicht präcis genug färbt, Brunnenwasser nehmen.

Diese Lösung — sie enthält nur $\frac{1}{1000}$ Carmin und sei der Kürze halber Mucicarmin genannt — hat mir den Schleim selbst dann noch gefärbt, wenn fast alle anderen Mittel versagten. (Sie soll nur den Schleim färben, nicht auch die Kerne; leistet sie das nicht, so enthält sie aus irgend einem Grunde freie Säure, und dann muss von einer 1% igen Lösung von doppelkohlensaurem Natron in Wasser vorsichtig Tropfen für Tropfen so viel hinzugefügt werden, bis sich nur noch der Schleim färbt. Indessen dürfte das selten nöthig werden.) Die Kerne färbe ich vorher gewöhnlich mit Hämalaun, wasche gut mit Wasser aus und bringe dann das Präparat in das Mucicarmin. Oft genügen schon einige Minuten, um den Schleim intensiv roth zu färben, und meist tritt auch nach vielen Stunden keine weitere Veränderung ein, als dass das Bindegewebe einen rothen Ton annimmt. Zuweilen ist es gut, die Schnitte nach der Kernfärbung einen Augenblick in eine starke Pikrinsäurelösung zu bringen², rasch abzuspülen und dann mit Mucicarmin zu färben. In allen Fällen kommen die Präparate nachher flüchtig in Wasser und dann durch die Alkohole hindurch in Harz.

Dass die Farbe haltbar ist, versteht sich bei Carmin von selbst. Säuren jedoch oder Lösung von Alaun oder anderen Thonerdesalzen schaffen sie rasch aus dem Schleim weg, und das ist auch der Grund, wesshalb man die Kerne vorher färben muss. In Alkohol ist sie dagegen beständig, man braucht sich also bei der Fertigstellung der Präparate nicht zu beeilen, was ein großer Vortheil vor fast allen Theerfarben, speciell vor Thionin ist. Auch in Balsam

¹ Namentlich, wenn sie mit destillirtem Wasser gemacht ist.

² Man kann auch dem Mucicarmin, also der wässrigen $\frac{1}{1000}$ -Lösung, die Pikrinsäure gleich hinzufügen (auf 50 ccm etwa 5 Tropfen einer Lösung von 0,5 Pikrinsäure in 100 Wasser), aber zuweilen fällt schon nach 1—2 Tagen fast alles Carmin zu Boden.

und selbst in dem venetianischen Terpentin nach VOSSELER hält sie sich unbegrenzt lange.

Das Roth des mit Mucicarmin gefärbten Schleimes ist lebhafter als das der Kerne, wenn sie mit Carmalaun gefärbt sind. Es lässt sich daher auch zur Noth nach Carmalaun anwenden. Zum Durchfärben eignet sich übrigens Mucicarmin nur in geringem Maße, d. h. nur bei sehr durchlässigen Geweben; ich habe dafür die alkoholische Stammlösung benutzt, rathe aber, da sie nicht leicht in die Tiefe zu dringen scheint, im Allgemeinen die Schnittfärbung an und möchte auch diese nur ausnahmsweise mit der Stammlösung (oder ihrer Verdünnung auf $\frac{1}{5}$ — $\frac{1}{10}$ mit Alkohol von 50 oder auch 70 %) ausgeführt wissen, weil sich in den alkoholischen Lösungen die Kerne etwas mitfärben.

Anhangsweise seien hier einige Worte über das **Indigcarmin** gesagt. Es färbt den Schleim nicht, ist aber als Contrastfarbe sehr nützlich und hat vor einigen Theerfarben, mit denen es in der Wirkung auf Plasma, Bindegewebe etc. übereinkommt, den Vorzug größerer Haltbarkeit. In den Lehrbüchern treibt immer noch die ursprüngliche Vorschrift von MERKEL¹ zur Doppelfärbung mit Boraxcarmin und Indigcarmin ihr Unwesen und könnte doch nun endlich daraus verschwinden, da sie nicht nur ganz überflüssig, sondern auch unnöthig theuer, unpraktisch und wegen des großen Gehaltes an Borax sogar für feine Structuren schädlich ist. Ich nehme statt ihrer einfach eine Lösung von 0,1 g Indigcarmin in 50 ccm dest. Wasser (oder 5 % iger Alaunlösung) und setze davon dem Hämalaun oder dem Carmalaun nach Bedürfnis $\frac{1}{20}$ — $\frac{1}{5}$ seines Volumens zu. Die Lösung wird allerdings im Sommer bei dem hiesigen grellen Lichte nach einigen Monaten ganz hell und unbrauchbar, ist ja aber mit Leichtigkeit neu gemacht.

Ferner möchte ich als, so weit mir bekannt, neu eine höchst einfache **Methode zum Färben von Paraffinschnitten** publiciren, die unter Umständen gute Dienste leisten kann. Die Schnitte werden nämlich statt mit Wasser oder schwachem Alkohol mit der Farblösung selber aufgeklebt; dabei wirkt der Farbstoff, wenn man die Schnitte, um sie sich dehnen zu lassen, in die Wärme bringt, meist

¹ RAWITZ (citirt oben pag. 305 Anm. 1) schreibt sie irrthümlich NORRIS & SHAKESPEARE zu und »kann sie auf das Angelegentlichste empfehlen«. Die ungeheure Menge Borax und Indigcarmin löst sich aber gar nicht in dem wenigen Wasser, auch ist die Behandlung hinterher mit der Oxalsäure lästig.

ebenso rasch wie energisch, und so lassen sich Färbungen erzielen, die sonst nicht leicht zu Stande kommen. Man muss nur dafür Sorge tragen, dass die Schnitte auf der Farblösung schwimmen, dass diese später gut mit Wasser abgespült wird, und dass die Schnitte wirklich ganz trocken sind, bevor man sie in Xylol (zum Entfernen des Paraffins) und von da in Balsam überträgt. Aber es gelingt dafür auch, die gelbe Färbung des Schleimes mit Safranin und andere schwierige Tinctionen, welche dem Alkohol nicht widerstehen, ungefährdet¹ in Balsam zu bringen.

4. Allgemeines.

Mit der Theorie der Schleimfärbung, so weit davon bisher überhaupt die Rede sein kann, haben sich nur wenige Forscher beschäftigt. Zuerst wohl PANETH. Dieser äußert sich recht vorsichtig² dahin, dass in der Theca der Becherzellen sich »etwas finden müsse, was weder in den Kernen, noch im Protoplasma, noch sonst wo im Gewebe vorhanden ist«, und dass dieser Stoff, den »wir nicht benennen wollen, weder Mucin, noch Mucigen, noch sonst wie, weil wir ihn nicht analysiren oder isolirt untersuchen können«, offenbar auf den Farbstoff chemisch, nicht bloß physikalisch wirke und sich so (speciell mit Safranin metachromatisch) färbe. Ungefähr gleichzeitig hat sich auch SUSSDORF³ mikrochemisch mit dem Schleim abgegeben und sowohl Speicheldrüsen von Säugern als auch den Speichel selber, ferner Synovia etc. in ihrem Verhalten zu den »basischen Anilinfarbstoffen« geprüft, ohne jedoch, wie es scheint,

¹ Eine gute Methode zur Umgehung der schädlichen Wirkung des Alkohols auf die Theerfarben hat UNNA (Über Protoplasmafärbung [etc.], in: Monatsh. Prakt. Derm. 19. Bd. 1894 pag. 225 ff.) nach vielen Versuchen entdeckt. Er bringt nämlich die unaufgeklebten Schnitte aus dem Wasser direct in eine Mischung von 20 [Raumtheilen?] Alkohol absolutus und 30 Xylol, wo sie etwa $\frac{1}{4}$ Stunde bleiben, und von da in reines Xylol. Das geht, wie ich finde, eben so gut mit aufgeklebten Schnitten, kostet allerdings ziemlich viel Xylol, und die Färbung des Schleimes mit Thionin, Safranin oder Methylviolett leidet doch etwas, offenbar weil diese Farben auch in dem obigen Gemische nicht ganz unlöslich sind. Ich möchte aber die Methode sehr empfehlen, da sie eine allgemeinere Anwendung gestattet als die meinige.

² PANETH, Secernirende Zellen (citirt oben pag. 316 Anm. 1) pag. 119.

³ SUSSDORF, Eine mikrochemische Reaction auf thierischen Schleim. in: D. Zeit. Thiermed. 14. Bd. pag. 345—359 3 Figg. Die Original-Abhandlung stand mir nicht zu Gebote, wohl aber das ausführliche Referat von NÖRNER in: Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 pag. 205—208.

allgemeinere Resultate erhalten zu haben. Schließlich hat HOYER¹ in seiner ausführlichen Arbeit auch eine Hypothese über das Mucin geäußert, wonach »selbst das reine concentrirte Mucin kein einfacher Körper sei, sondern eine Combination von zwei Substanzen, einer gallertartigen quellungsfähigen an Quantität dominirenden und einer zweiten mit der ersteren meist innig verbundenen, aber wesentlich sparsameren, welche mit den basischen Farbstoffen chemische Verbindungen bildet (also vielleicht die Rolle einer Säure spielt) und dadurch zum Indicator wird für die Anwesenheit des Mucins«. HOYER fügt indessen gleich hinzu, er habe »chemisch rein dargestelltes Mucin« nicht in Händen gehabt, und ist sich auch des durchaus hypothetischen Charakters jener seiner Äußerung wohl bewusst. Trotzdem läßt er »die Tinctionsmethode als Mucinreaction ihren Werth behalten, wenn auch das Mucin als Ganzes dadurch nicht unmittelbar nachgewiesen wird«. Dieser Satz müsste indessen, so scheint es mir, auch noch erst stricte bewiesen werden; bei HOYER ist aber von einem Beweise keine Rede, vielmehr findet sich in der ganzen langen Abhandlung fortwährend nur der Circulus vitiosus: Thionin ist ein Reagens auf Mucin, ergo färbt Thionin etwas, so ist es Mucin, und was sich nicht färbt, ist kein Mucin. Dabei muss er selbst eingestehen, dass »es aber auch gewisse Körpertheile bei manchen Thieren giebt, in welchen die Becherzellen kein Mucin zu bilden scheinen oder wo das letztere wenigstens keine Färbung annimmt« (pag. 337) — so in der Rachenschleimhaut und der Zunge des Frosches — aber da »besteht der Inhalt der Theca entweder aus einem Umsetzungsproduct des Mucins oder einer ihm verwandten Substanz«. Auch hierfür wird kein Beweis geliefert.

Diese Schwäche in HOYER's Deductionen ist zum Theil wenigstens schon anderen Forschern aufgefallen. So sagt NICOGLU², die Reaction des Thionins sei nicht auf Mucin beschränkt, bleibe aber doch »für die schleimbereitenden Organe immer noch etwas Typisches und Charakteristisches«. Auch KRAUSE³ widerlegt HOYER's Behauptung »wenigstens in ihrer allgemeinen Fassung«, indem er richtig argumentirt, dass ja auch Gewebe ohne Mucin, wie der Knorpel, das Epithel der Gallenblase etc. sich mit Thionin rothviolett färben; mithin sei dies keine spezifische Reaction auf Mucin.

¹ HOYER, Mucin (citirt oben pag. 304 Anm. 1) pag. 359 ff.

² NICOGLU (citirt oben pag. 314 Anm. 3) pag. 420.

³ KRAUSE (citirt oben pag. 313 Anm. 2) pag. 127. Auf ein weiteres Argument von KRAUSE komme ich unten pag. 325 zu sprechen.

Ich selber habe bisher das Wort Mucin geflissentlich vermieden und dafür stets von Färbung des Schleimes gesprochen. In der That wissen wir vom Schleime der höheren Thiere chemisch noch recht wenig und von dem der allermeisten Wirbellosen so gut wie gar nichts. Oben habe ich bereits (pag. 305) angedeutet, dass die Schleime sich gegen einen und denselben Farbstoff sehr verschieden verhalten, indem ich bei Besprechung der Lösungen von Hämatoxylin oder Hämatein sagte: in der Regel färbt sich der Schleim, oder: in der Regel färbt er sich nicht. Das sollte heißen: die von mir geprüften Arten Schleim sind je nach ihrer Provenienz verschieden. Man könnte da eine förmliche Reihe aufstellen, die mit solchem Schleime zu beginnen hätte, dessen Färbung kaum zu verhindern ist, und mit solchem enden würde, der sich kaum noch färben lässt. Jener ist z. B. bei Muscheln vertreten, dieser findet sich im Darm von *Homo*¹.

In gleicher Weise giebt es auch nicht nur eine Art Mucin. Bereits jetzt unterscheiden die physiologischen Chemiker mehrere, und es ist daher auch nicht recht, wenn HOYER stets von Mucin redet, gerade als wenn es ein chemisch gut charakterisirter Stoff wäre. So kommt z. B. LIEBERMANN² in einer Besprechung der neueren Litteratur zum Schlusse, es »giebt wahrscheinlich verschiedene Mucine«, ja »vielleicht schwefelhaltige und schwefelfreie Mucine«. Und HAMMARSTEN, der auf diesem Gebiete seit Jahren arbeitet, drückt sich so vorsichtig wie möglich aus³ und nennt beispielsweise das Mucin aus der Submaxillardrüse von *Bos* eigens Submaxillarmucin. HOYER hat nun keineswegs seine Reactionen an irgend einer chemisch reinen Mucinart angestellt, sondern schlechtweg an Schleim von der allerverschiedensten Herkunft. Es war mir daher von dem größten

¹ Dass Schleim vom Menschen sich relativ schwer färbt, giebt schon PANETH (citirt oben pag. 316 Anm. 1) pag. 117 an. Es mag daran liegen, dass die Gewebe selbst von Hingerichteten doch nicht frisch genug sind, vielleicht aber ist der Schleim specifisch ein wenig von dem der anderen Säuger verschieden. Wenn die anderen Färbemittel meist versagten, hat mir Mucicarmin stets noch gute Dienste geleistet. Andererseits färbt sich der Schleim im Mantelrand von *Tapes* in Hämalaun sogar, wenn dies mit 10% iger Alaunlösung bereitet wird.

² L. LIEBERMANN, Kritische Betrachtung der Resultate einiger neuerer Arbeiten über das Mucin. in: Biol. Centralbl. 7. Bd. 1887 pag. 54 ff. (pag. 63).

³ O. HAMMARSTEN, Studien über Mucin und mucinähnliche Substanzen. in: Arch. Phys. Pflüger 36. Bd. 1885 pag. 373 ff. »Man ist noch nicht darüber einig, was man unter dem Namen Mucin verstehen soll« (pag. 413).

Werthe, als durch gütige Vermittelung von Prof. S. APÁTHY sein Landsmann Prof. L. UDRÁNSKY meinem Wunsche nachkam und mir nach HAMMARSTEN¹ eine reichliche Menge Submaxillarismucin darstellte. Dieses entsprach, so weit ich es controlliren konnte, durchaus² den Angaben von HAMMARSTEN und hat mir zu vielen Versuchen gedient, deren Resultate ich hier in Kürze wiedergebe.

Bringt man etwas Submaxillarismucin in Wasser, so reagirt dieses sofort auf Lakmuspapier sauer, fällt aber aus Mucicarmin und Muchämatein den Farbstoff energisch aus. Dessgleichen aus einer wässerigen Lösung von Bismarckbraun, nicht aber aus denen von Safranin, Thionin oder Toluidinblau. Mithin sind die drei zuerst genannten Flüssigkeiten viel empfindlicher als die übrigen. — Wird etwas Submaxillarismucin mit viel Wasser (1:100) geschüttelt und nach einiger Zeit filtrirt, so braucht die Lösung nicht mehr sauer zu reagiren, verhält sich aber gegen die Farbstoffe noch wie eben angegeben. — Löst man etwas Submaxillarismucin in ganz schwach alkalischem Wasser und fällt es durch Salzsäure wieder aus, so färben sich die Flocken trotz der Gegenwart freier Mineralsäure mit Mucicarmin stark roth. — Wird von der alkalischen Lösung auf mehreren Objectträgern je 1 Tropfen der Verdunstung überlassen, so hinterbleibt eine sehr dünne Schicht des Mucins (mit einer Spur kohlen-sauren Alkalis); solche Proben geben dann im Wesentlichen dieselben Reactionen auf die gebräuchlichen Farbstoffe, wie der Schleim im Darm von Hund und Katze, jedoch färben sie sich mit Safranin nie gelb, sondern nur roth.

Es ist daher nicht daran zu zweifeln, dass diese Farbstoffe wirklich die Gegenwart von echtem Submaxillarismucin anzeigen können, und damit stimmen auch die Resultate der Arbeit von KRAUSE über die Speicheldrüsen des Igels überein, so weit sie hier heranzuziehen sind. Ich verdanke nämlich der Freundlichkeit des Autors einige mit Wasser aufgeklebte, ungefärbte Schnitte durch alle drei von ihm untersuchten Drüsen von *Erinaceus* und habe daran mit Leichtigkeit constatirt, dass die genannten Farbstoffe bei der reinen Eiweißdrüse, der Parotis, versagen, hingegen bei der Retrolingualis als einer reinen Schleimdrüse in typischer Weise die Schleimzellen und auch den Schleim in den Ausführgängen

¹ O. HAMMARSTEN, Über das Mucin der Submaxillardrüse. in: Zeit. Phys. Chemie 12. Bd. 1888 pag. 163 ff.

² Nur war es nicht völlig aschenfrei.

tingiren. Nun ist aber von besonderem Interesse die Submaxillaris des Igels in so fern, als sie nach KRAUSE keinen Schleim liefert, wohl aber zwei Zellarten besitzt, von denen die eine sich zu Thionin und Biondischem Gemisch verhält, als wenn sie mucös wäre, indess die andere Zellart dies nicht thut. Auch hierin kann ich KRAUSE Recht geben und habe sogar, da die beiden Zellarten in ungefärbten Präparaten sich nicht leicht unterscheiden lassen, die Vorsicht geübt, in zwei Präparaten je eine bestimmte Gruppe zunächst zu zeichnen und dann der Reihe nach mit den genannten Theerfarben, aber auch mit Bismarckbraun und zuletzt entweder mit Muchämatein oder mit Indigcarmin und Mucicarmin zu behandeln. In der That verhielt sich die eine Zellart gegenüber allen¹ so, wie es Schleimzellen thun, und die andere blieb entweder farblos oder nahm (bei Biondi) die Contrastfarbe an oder färbte sich (mit Indigcarmin) blau. Wenn KRAUSE also auch hieraus ein neues Argument gegen HOYER herleitet, so kann ich ihm nur zustimmen und unterschreibe daher seinen Ausspruch² als völlig richtig: »die mikrochemischen Reactionen genügen nicht, wenn es sich um die Frage nach der Natur eines von den Drüsenzellen gelieferten Secretes handelt, sie können höchstens die Diagnose stützen, unerlässlich aber wird immer die chemische Untersuchung des Secretes selbst sein.«

Aber nicht nur gegen einige Gewebe, die kein Mucin liefern, verhalten sich Thionin, Safranin etc. so wie gegen Schleim, sondern auch gewisse formlose organische Stoffe³ und sogar anorganische Salze geben mit diesen Farben ähnliche Reactionen wie es echtes Mucin thut. In der Hoffnung, zu ermitteln, worauf die Schleimfärbung eigentlich beruhe, habe ich allerlei Versuche mit Eiweiß, Gummi arabicum und Salzen angestellt. So wird Eiweiß aus Hühnereiern, das ich durch Erhitzen coagulirt und dann in mehrfach gewechseltem Alkohol⁴ ein Jahr lang aufbewahrt habe, von den

¹ Beiläufig sei bemerkt, dass Mucicarmin und Muchämatein auch den Knorpel lebhaft färben, also wieder ganz analog dem Thionin.

² KRAUSE, Speicheldrüsen (citirt oben pag. 313 Anm. 2) pag. 94.

³ Auch die Corpora amylacea der Pathologen färben sich mit Safranin gelb (SQUIRE, citirt oben pag. 312 Anm. 1) und mit Thionin roth (HOYER pag. 314), und von Schleim ist in ihnen doch nicht die Rede. Selber habe ich amyloid degenerirte Leber zur Verfügung gehabt, aber daran ergaben mir Thionin und Mucicarmin keine Färbung, hingegen Safranin (gelb) und Methylviolett (roth) wohl, Jodgrün natürlich auch (violett).

⁴ Der Alkohol reagirte völlig neutral, fällte aber aus Mucicarmin, Bismarckbraun und Muchämatein den Farbstoff sofort aus. Bei der Verdunstung

schleimfärbenden Mitteln intensiv gefärbt; dabei war mir auffällig, dass Thionin allemal die Ränder der Schnitte roth, den Rest blau färbte. (Das Roth beruht überhaupt, wenn ich mich nicht täusche, nur darauf, dass ungemein viel Thionin gebunden wird; auch bei dem echten Mucin, das ich in Thioninlösung quellen ließ, färbten sich anfänglich manche Brocken blau, manche gleich von vorn herein roth, schließlich aber wurden auch die blauen roth, was hingegen bei den Schnitten von Eiweiß nie der Fall war. Allgemein habe ich gefunden, dass wenn sich auf Schnitten der Schleim in Becherzellen oder Drüsen nicht leicht und tief färben will, keinerlei Beize mit Sublimat¹ oder anderen Salzen hilft; ob dies nicht doch der

hinterblieb denn auch ein geringer Rückstand von derselben Eigenschaft. Ich habe schon früher (Hämatoxylin pag. 181) darauf aufmerksam gemacht, dass selbst anscheinend reiner Alkohol keine Gewähr dafür bietet, dass er für empfindliche Farbenreactionen auch wirklich rein sei, und wiederhole dies hier.

¹ HOYER giebt pag. 324 an, auf Schnitten, deren Kerne sich mit Thionin ebenfalls violett gefärbt hätten, seien diese nach Beizung mit Sublimat, Alaun oder Salpetersäure rein blau geworden, der Schleim hingegen nach wie vor violett, und er führt dies auf die Säure zurück. Dies wird richtig sein, berührt aber die Färbung des Schleimes an sich nicht, sondern nur die der Kerne. Ferner hat sich ihm getrockneter Schleim von *Helix* mit Thionin nur dann roth gefärbt, wenn er mit Sublimat und Alkohol behandelt worden war (pag. 362). Bei *Limax* ist das nach meinen Versuchen nicht nöthig.

Das Submaxillarmucin nimmt, wie ich gefunden habe, wenn man es in einer schwachen Lösung von essigsaurem Eisen quellen lässt, Eisen auf und hält es sehr fest; coagulirtes Eiweiß thut dies auch, aber in erheblich geringerem Grade. Ich habe daher Schnitte von Wirbelthieren, *Sepia*, *Ostrea* und *Limax* auf ihr Verhalten gegen genanntes Metall geprüft: Eisenalaun oder schwefelsaures Eisenoxydul werden gar nicht aufgenommen und das essigsaure Eisen auch nur dann, wenn die Objectträger, mit einer dünnen Schicht der Lösung bedeckt, einige Tage in einer feuchten Kammer liegen, nicht aber, wenn man sie in der Lösung senkrecht aufstellt. Wahrscheinlich spielt die Luft dabei irgend eine Rolle. Jedenfalls ist die Quantität Eisen so bedeutend, dass der Schleim meist hellbraun wird, und dass, wenn man die Kerne nachträglich mit Paracarmin färbt, daraus ein Bild ähnlich einer gelungenen Färbung mit Safranin resultirt. Man kann natürlich auch hinterher mit Tannin das Eisen schwärzen oder mit gelbem Blutlaugensalz und Salzsäure Berlinerblau daraus hervorrufen, aber die reine Eisenfarbe ist schon meist kräftig genug. — Submaxillarmucin giebt mit Tannin eine Fällung, und auch in den Schnitten nimmt der Schleim etwas davon auf, aber dann muss man, um gute Bilder zu bekommen, nach dem Abwaschen der Schnitte eine Eisenlösung darauf bringen, so dass der Schleim blauschwarz wird. Gegen die beiden Blutlaugensalze (gelbes und rothes) hat sich in meinen Versuchen der Schleim ablehnend verhalten, eben so gegen schwefelsaures und essigsaures Kupfer, aber ich glaube, wenn man andere Salze probirte, so würde man auch dieses Metall sowie vielleicht Quecksilber, Zink etc. vom Schleim binden lassen können.

Fall wäre, wenn man gleich beim Conserviren der Gewebe die erforderlichen Salze hinzuzufügen, habe ich freilich nicht untersucht.)

Ferner veranlasst ein dicker Schleim von Gummi arabicum, der blaues Lakmuspapier lebhaft röthet, nicht minder aber auch concentrirte Lösungen des sauer reagirenden Chlorammoniums, von Steinsalz und von Chlorkalium, die beide neutral reagiren, in einer Lösung von Safranin amorphe gelbe Fällungen¹, in der von Bismarckbraun braune, in Muchämatein blaue, in Mucicarmin² rothe; die Lösung von Toluidinblau wird in allen vier genannten Stoffen deutlich roth, dagegen wird dies die Lösung von Thionin nur mit Gummi, während die Salze sämmtlich das Thionin in feinen Nadeln ausfällen; bringt man aber Krystalle von Borax in Thioninlösung, so überziehen sie sich bald mit einer durchsichtigen, amorphen rothen Haut. Die Lösung von Methylgrün wird gar nicht verändert.

Man ersieht hieraus, dass es auf die Reaction der Stoffe gegen Lakmus nicht ankommt. Dies geht ferner daraus hervor, dass zwar die Lösung des Submaxillarismucins sauer reagirt (s. oben pag. 324), dass hingegen der Schleim der Nacktschnecke *Limax*, und zwar sowohl der vom Fuß als der vom Mantel abgesonderte, deutlich alkalisch³ ist und doch sich gegen die bekannten Farbstoffe eben wie Schleim verhält. Wohl aber darf man, wenn man alle bisher bekannten Thatsachen überblickt, sagen, der Schleim (oder auch das Submaxillarismucin) verhält sich den obigen Farbstoffen

¹ PANETH (citirt oben pag. 316 Anm. 1) sagt, er habe »eine Veränderung des Farbentons in das Gelbe in der Eprouvette nicht erzielen können« (pag. 118 Anm. 2), hat indessen nur Säuren oder Alkalien verwandt, nicht auch Salze. Aber die Gegenwart von freien Säuren oder Laugen war doch auch im Schleime der Becherzellen nicht anzunehmen!

² Indigcarmin wird ebenfalls durch alle vier Stoffe ausgefällt.

³ Von mir geprüft mit Lakmus, Curcuma, Säurefuchsin und Lakmoid. HAMMARSTEN giebt die Reaction des Schleimes von *Helix pomatia* nicht an. — Anhangsweise sei hier des Schleimes der Nemertine *Cerebratulus marginatus* erwähnt, den ich ein großes Exemplar hatte reichlich absondern lassen, um ihn näher zu prüfen. In der That bekam ich davon so viel, dass ich ihn in Paraffin einbetten und schneiden konnte, aber es zeigte sich, dass er nur zum geringsten Theile die Farbreactionen auf Schleim gab, dagegen mit allerlei anderen Secreten gemischt war. Das ist bei dem Reichthum der Nemertinen an Hautdrüsen auch nicht weiter merkwürdig, hat mir aber meine Absicht vereitelt. Als ich das lebende Thier in Seewasser mit Jodgrün brachte, färbte sich der Schleim natürlich violett (s. oben pag. 312). Ein Schnitt durch *Cerebratulus*, mit Hämalalaun, Indigcarmin und Mucicarmin gefärbt, giebt ein ungemein buntes Bild, dessen genauere Analyse hier aber zu weit führen dürfte.

gegenüber fast so, als wenn er eine concentrirte Lösung von Salzen in sich aufgespeichert hätte. Dass er letzteres in Wirklichkeit nicht gethan hat, geht schon zur Genüge aus dem analogen Verhalten des reinen Submaxillarismucins hervor, das ich bei einer eigens darauf angestellten Prüfung als nahezu aschenfrei befunden habe. Natürlich soll auch durch den obigen Vergleich nicht etwa eine Erklärung für die Eigenschaft des Schleims, gewisse Farbstoffe in charakteristischer Weise an sich zu binden, gegeben werden, vielmehr bleibt diese Frage einstweilen noch ganz unbeantwortet. Aber dies gilt auch leider von der anderen, wichtigeren nach dem Grunde der Färbbarkeit der Zellkerne.

Da bei der Schleimfärbung von Manchen der Metachromasie eine gewisse Bedeutung beigelegt wird, so sei ihrer hier zum Schlusse kurz gedacht. Sehr gute Mittel, wie Bismarckbraun und Mucicarmin, färben den Schleim im Tone der Farblösung, höchstens tiefer, man darf also annehmen, dass der Schleim den Farbstoff unverändert aus der Lösung an sich reißt und festhält. Bei Muchämatein und den anderen Lösungen von Hämatein plus Thonerde habe ich nur selten eine Metachromasie bemerkt, und sie war auch nie auffällig; sie mag darauf beruhen, dass der Schleim doch ein anderes Farbsalz ausfällt als es die Kerne thun. Dagegen ist sie bekanntlich sehr lebhaft bei Thionin, Methylviolett etc. und kann es sein bei Safranin. Hier scheint mir nun ein einfacher Versuch die richtige Deutung zu liefern: wenn man in einen Tropfen einer nicht zu starken Lösung von Safranin in Wasser einige Krystalle von Chlorammonium bringt, so erhält man außer feinen, doppelbrechenden Krystallen des Farbstoffes auch amorphe rothe und amorphe gelbe Massen; die beiden letzteren haben genau die Farbe, welche Kerne und Schleim mit Safranin annehmen. Ob es ganz unveränderter Farbstoff oder Verbindungen mit Chlorammonium sind, kann ich nicht entscheiden, jedenfalls lösen sie sich in Wasser oder Alkohol wieder leicht und mit dem Farbenton des Safranins auf, sind also doch wohl nur optische Modificationen, wie deren ja sonst in der Chemie genug bekannt sind. Ähnliches dürfte vom Methylviolett¹,

¹ Das Methylviolett wird bekanntlich von den Pathologen zur Erkennung der amyloiden Substanz benutzt und wirkt hier ähnlich wie das Thionin auf Schleim. A. CAPPARELLI nun (Sulla reazione della metilanilina nella degenerazione amiloide. in: Arch. Sc. Med. Torino Vol. 3 1879 No. 21 5 pagg.) führt die Metachromasie in diesem Falle auf eine rein optische Erscheinung zurück:

Thionin etc. gelten, denn auch hier scheint mir der an den Schleim gebundene Farbstoff durchaus unverändert zu sein¹. Man könnte also bisher nur beim Jodgrün (und Methylgrün), dem polychromen Methylblau und vielleicht dem Violett des Safranins (s. oben pag. 317) Metachromasien, die auf Verunreinigungen beruhen.

Zusammenstellung der Formeln zu den neuen Farblösungen.

Mucicarmin (pag. 317). Carmin 1 g, Chloraluminium 0,5 g, dest. Wasser 2 ccm, über kleiner Flamme etwa 2 Minuten lang erhitzen, bis das Gemisch ganz dunkel geworden. Dazu 100 ccm Alkohol von 50 %. Diese Stammlösung ausnahmsweise entweder direct oder nach Verdünnung auf $\frac{1}{5}$ — $\frac{1}{10}$ mit Alkohol von 50 oder 70 % gebrauchen, in der Regel aber mit (destillirtem oder) gewöhnlichem Wasser auf $\frac{1}{10}$ zu Mucicarmin (Gehalt an Carmin $\frac{1}{1000}$) verdünnen, das in den Schnitten oder dünnen Membranen nur den Schleim färben soll².

Indigcarmin zu lösen in dest. Wasser (oder 5 % iger Alaunlösung) 1:500. Kann auch in Verbindung mit Hämalan oder Carmalan gebraucht werden (pag. 320).

Muchämäteïn (pag. 307). Hämäteïn 0,2 g, zu zerreiben mit einigen Tropfen Glycerin, dazu Chloraluminium 0,1 g, Glycerin 40 ccm, dest. Wasser 60 ccm. — Spirituöse Lösung (pag. 308): Hämäteïn 0,2 g, Chloraluminium 0,1 g, Alkohol (von 70 %) 100 ccm, Salpeter-

die amyloide Substanz lasse die rothen Lichtstrahlen besser durch als die violetten. Er giebt auch die Experimente an, welche ihn zu diesem Schlusse veranlasst haben: ungefärbte Schnitte werden durch eine Schicht der Farblösung beobachtet etc. Es ist mir nicht bekannt, ob er von seinen Fachgenossen eigens widerlegt worden ist, jedenfalls aber ist es mir an amyloid degenerirter Leber, die ich der Güte von Dr. F. CAPOBIANCO verdanke und eigens mit den gebräuchlichen Reagentien auf Amyloid untersucht habe, nicht geglückt, das zu sehen, was er behauptet, eben so wenig mit Safranin.

¹ S. auch oben pag. 326. — Ich habe Submaxillarismucin in Thioninlösung quellen lassen, gut mit Wasser ausgewaschen und dann mit Alkohol von 90 % extrahirt: das Mucin und die Flüssigkeit wurden dabei rein blau, und das Mucin blieb es auch, als es wieder in Wasser kam. Die alkoholische Lösung wurde abgedampft, und der Rückstand, da er sich in Wasser nicht gut lösen wollte, mit Wasser + Essigsäure aufgenommen. Diese Flüssigkeit färbte auf Schnitten die Kerne blau, den Schleim roth, enthielt also wohl unverändertes Thionin.

² Die Stammlösung ist in guter Qualität von G. GRÜBLER & Co. in Leipzig zu beziehen; die Proben, welche Dr. G. auf meinen Wunsch angefertigt hat, befriedigten mich völlig.

säure 1—2 Tropfen. Beide Lösungen zur Färbung des Schleimes in Schnitten oder dünnen Membranen.

Glychämalaun (pag. 310). Hämatein 0,4 g, Alaun 5 g, Glycerin 30 cem, dest. Wasser 70 cem. Man löse unter Zerreiben im Mörser das Hämatein in ein wenig Glycerin und setze dann den Rest des Glycerins nebst der (warm oder kalt bereiteten) Alaunlösung hinzu. Da leicht etwas Alaun ausfällt, so filtrire man die Lösung erst nach einigen Tagen.

Über die **Färbung des Schleimes mit Eisen** s. oben pag. 326 Anm. 1.

Neapel, Ende December 1895.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mittheilungen aus der Zoologischen Station zu Neapel](#)

Jahr/Year: 1897

Band/Volume: [12](#)

Autor(en)/Author(s): Mayer Paul

Artikel/Article: [Über Schleimfärbung. 303-330](#)