

aderig, bei der anderen nur die unteren deutlich netzaderig und die höher gestellten 1- (die mittleren selten 3-) nervig, dabei aber weniger häutig und weniger bleich als bei *O. pallens*. Blüten gelb. Aeussere Perigonblätter eiförmig und stumpf, 3-nervig; die seitlichen inneren merklich kürzer, übrigens fast gleich gestaltet; bei allen Perigonblättern die Nerven (wie bei *O. sambucina*) stark hervortretend. Lippe ungefähr so lang wie die äusseren Perigonblätter (7—8 mm), unpunktirt (?), seicht dreilappig und in ihrer Form zumeist mehr auf *O. pallens* hinweisend. Sporn etwa so lang als der Fruchtknoten, kegelig-walzenförmig, hier und da walzenförmig, bei der einen Pflanze bei sämtlichen Blüten wagerecht abstehend oder aufstrebend, bei der anderen Pflanze abwärts geneigt und nur die der oberen Blüten aufstrebend. — Die breiten Blätter, wie die Gestalt der Blüten, insbesondere der äusseren Perigonblätter, bezeugen die Anwesenheit der *O. pallens*, die grossen, netzaderigen Deckblätter die der *O. sambucina*. Joux Brûlée im Canton Wallis Chenevard! — *O. Chenevardii* n. sp.<sup>1)</sup>

*O. incarnata* L. var. *albiflora* Lec. u. Lamtt. Gampel bei Genf Chenevard! — var. *ochroleuca* Wüsten. Frastanzer-Au (Hb. Ohnesorge u. Hb. Richen) Richen.<sup>2)</sup>

(Fortsetzung folgt.)

## Beiträge zur Fixirung und Praeparation der Süswasser-algen.

Von Ferdinand Pfeiffer R. v. Wellheim (Wien).

Jeder Algologe hat gewiss schon die Erfahrung gemacht, dass eben gesammeltes Material selbst einen kurzen Transport in verschlossener Flasche nicht aushielt, sondern sofort abstarb oder, wenn es auch am Leben blieb, für die Untersuchung und Conservirung vieler feinerer Structuren, wie z. B. der Gallerte bei den Conjugaten, unbrauchbar geworden war.

An diesem Verderben sind unter Anderem der Mangel an genügender Durchlüftung des Wassers, die Fäulniss der rasch zu Grunde gehenden thierischen Organismen und die plötzliche Aenderung der gewohnten Lebensbedingungen schuld.

Für schwierigere Untersuchungen und Studien ist es daher, um derartige Verluste zu vermeiden, unbedingt nöthig, die erbeuteten, empfindlicheren Algen am Fundorte selbst und möglichst rasch zu fixiren.

Das für diese Zwecke bisher meist gebrauchte Fixirungsmittel ist der Alkohol.

<sup>1)</sup> Nach P. Chenevard in Genf, dem Entdecker dieses Bastardes, dessen Eifer in der Durchforschung seiner Gegend bereits zahlreiche interessante Orchideenformen zu Tage förderte.

<sup>2)</sup> S. G. Richen, Zur Flora von Vorarlberg und Liechtenstein, in Oest. botan. Zeitschr., 1897, S. 139.

Dieser hat zwar den Vortheil, dass er überallhin leicht mitgeführt und das Material in seinen mehr oder minder mit Wasser oder Wasser und Glycerin verdünnten Lösungen zugleich conservirt werden kann, also eine höchst bequeme Anwendung gestattet, gibt aber bezüglich der Structuren des Zellinhaltes oft unzureichende Resultate und verursacht auch an der äusseren Form bei stärkerer Concentration bedeutende Schrumpfungen.

In letzterer Zeit wird vielfach für die Conservirung von Pflanzen das im Jahre 1869 von Hofmann im gasförmigen Zustande hergestellte Formaldehyd (Formalin, Formol)  $H.CHO$  ( $CH_2O$ ) in der käuflichen 40procentigen Lösung in Anwendung gebracht, welche von Dr. F. Blum<sup>1)</sup> in die Mikrotechnik eingeführt worden ist.

Sie wird dem Wasser, in welchem sich die Algen befinden, in dem Masse zugesetzt, dass der Gehalt an Formol ungefähr 4 bis 5 Procent beträgt.

Formollösungen zeigen nach längerer Zeit oft einen flockigen, weissen Niederschlag.

Formol dringt ausserordentlich rasch in die Objecte ein, schneller als die meisten anderen Fixirungsmittel. Schrumpfungen der äusseren Form ruft dasselbe im Gegensatze zum stärker procentigen Alkohol nie hervor.

Auch hier ist die Fixirung des Zellinhaltes meist ungenügend. Nur bei den Conjugaten erhielt ich manchmal zufriedenstellende Resultate.

Dagegen fixirt Formol die Gallerte vortrefflich; ebenso erhält es in manchen Fällen, z. B. bei den Chlorophyceen, die natürliche Farbe. Uebrigens ist deren Erhaltung für den Histologen eher unerwünscht, weil dadurch später vorzunehmende Färbungen erschwert werden.

Kalium aceticum und Chromalaun sind gleichfalls empfohlen worden. Dieselben sind jedoch keine Fixirungsmittel im mikrotechnischen Sinne. Sie erhalten zur Noth die äussere Form und, wie Formol, bei einzelnen Algen die natürlichen Farben und haben daher für den Systematiker, wo es auf die Erhaltung der Farbe ankommt, einige Bedeutung. Für den Histologen hat so conservirtes Material keinen Werth.

Bessere Fixirungen lassen sich mit der bekannten Ripart-Petit'schen Flüssigkeit<sup>2)</sup>, der jünger von Amann in Vorschlag ge-

<sup>1)</sup> „Das Formaldehyd als Härtungsmittel“, Zeitschrift für wissenschaftl. Mikroskopie von Dr. W. J. Behrens, Band X, Jahrg. 1893, pag. 314.

<sup>2)</sup> Carnoy, La Biol. Cell., pag. 95.

Kampherwasser, ungesättigt .....	75 gr.
Aqua destillata .....	75 gr.
Eisessig .....	1 gr.
Kupferacetat .....	0 bis 30 gr.
Kupferchlorür .....	0 bis 30 gr.

Gestattet zur besseren Fixirung einen Zusatz von Osmiumsäure oder Bromwasser.

brachten Lactophenol-Kupferlösung<sup>1)</sup> und dem von E. Strasburger<sup>2)</sup> wieder empfohlenen Holzessig erzielen. Sämmtliche dieser Mittel bieten ungefähr eine gleich bequeme Anwendung, wie Alkohol oder Formol.

Im Grossen und Ganzen musste man aber bisher auf eine Fixirung des Materials am Fundorte selbst verzichten und dieselbe zu Hause mit längst erprobten Mitteln vornehmen, unter welchen die Chromessigsäure und die übrigen Chromsäure-Mischungen den ersten Rang einnehmen.

Diese haben jedoch, wie bemerkt, den Nachtheil, dass es unthunlich ist, sie im concentrirten Zustande auf Excursionen mitzuführen, um sie den Aufsammlungen entsprechend zuzusetzen. Ihre Anwendung ist stets eine relativ umständlichere und sie erfordern unmittelbar nach erfolgter Fixirung ein gründliches Auswaschen, wenn nicht Niederschläge, Macerationen oder sonstige Schädigungen eintreten sollen.

Um für algologische Zwecke brauchbar zu sein, müsste vielmehr ein Fixirungsmittel folgende Eigenschaften besitzen:

1. Das Mittel muss bei Wanderungen ohne besondere Gefahr im trockenen Zustande oder in concentrirter Lösung mitgeführt und den Aufsammlungen einfach zugesetzt werden können.

2. Es muss lange Zeit haltbar sein.

3. Es muss den Grundbedingungen einer Fixirungsflüssigkeit völlig entsprechen, vor Allem also die Objecte rasch durchdringen, den Zellinhalt ohne allzu starke Plasmolyse, Ausfällungen oder Lösungen wichtiger histologischer Bestandtheile abtöden (fixiren) und zugleich härten.

4. Es darf Veränderungen der äusseren Form durch Quellungen oder Schrumpfungen nicht hervorrufen und nachträgliche Färbungen weder verhindern, noch erschweren. Diese letztere Forderung be-

<sup>1)</sup> Zeitschrift für wissensch. Mikroskopie von Dr. W. J. Behrens, Band XIII, Jahrg. 1896, pag. 18 u. f.:

a) Lactophenol-Kupferlösung:

Kupferchlorid, kristallisirt.....	0·2 gr.
Kupferacetat, kristallisirt.....	0·2 gr.
Aqua destillata.....	95 gr.
Lactophenol.....	5 gr.

Dient zum Aufbewahren.

b) Die Lösung a) zehnfach concentrirt:

Kupferchlorid, kristallisirt.....	2 gr.
Kupferacetat, kristallisirt.....	2 gr.
Lactophenol.....	96 gr.

Dient zum Fixiren auf algologischen Excursionen. Beim Einsammeln wird das Wasser, in welchem die Algen enthalten sind, mit 5 bis 10 Procent der Lösung b) versetzt.

Lactophenol besteht aus:

Carbolsäure, chemisch rein, kristallisirt.....	20 gr.
Milchsäure, spec. Gewicht 1·21.....	20 gr.
Glycerin, spec. Gewicht 1·25.....	40 gr.
Aqua destillata.....	20 gr.

<sup>2)</sup> Das botanische Practicum, III Auflage, Jena 1897, pag. 366.

zieht sich natürlich nur auf die Tinctionsfähigkeit im Allgemeinen, nicht aber etwa auf eine Färbung mit einem bestimmten Farbstoff. Es ist ja bekannt, dass gewisse Fixierungsmittel Färbungen mit bestimmten Farbstoffen begünstigen, indem sie gleichzeitig als Beize wirken, während Fixirungen mit sonst vortrefflichen Mitteln an denselben Objecten bei Anwendung desselben Farbstoffes keine gleich günstigen Tinctionsresultate zu Stande kommen lassen.

5. Endlich muss es ein Auswaschen der Objecte, wenigstens unmittelbar nach der Fixirung nicht erfordern, sondern soll eine immerwährende oder doch längere Conservirung des Materiales in der eigenen Lösung gestatten.

Da die bisherigen zur Fixirung verwendeten Mittel diesen Ansprüchen nicht vollständig zu entsprechen vermochten, und bei ihrem Gebrauche bald dem einen, bald dem anderen derselben kein Genüge geleistet war, so wurden im Laufe des vergangenen Frühjahres und Sommers Reihen von Fixirungsgemischen systematisch an einer grösseren Zahl Algen der verschiedensten Gattungen erprobt und versucht, durch entsprechende Modificationen dem erstrebten Ziele, soweit es anging, nahezukommen.

Den Ausgangspunkt bildeten dabei die von Lavdowsky<sup>1)</sup> zur Untersuchung der karyokinetischen Vorgänge in thierischen und pflanzlichen Zellen empfohlenen Fixirungsgemische.

Beide seiner Lösungen, u. zw.:

I.		II.	
Aqua destill. ....	20 Thl.	Aqua destill. ....	30 Thl.
Alkohol 95% ....	10 Thl.	Alkohol 95% ....	15 Thl.
Formol conc. ....	3 Thl.	Formol conc. ....	5 Thl.
Eisessig .....	0.5 Thl.	Eisessig .....	1 Thl.

geben wohl auch bei Algen gute Kernfixirungen, aber weniger günstige Resultate rücksichtlich der Chromatophoren.

Uebrigens liessen diese Versuche deutlich die grosse Brauchbarkeit des Formols für die vorliegenden algologischen Zwecke erkennen, sobald dasselbe nicht allein, sondern in Verbindung mit anderen tauglichen Reagentien zur Verwendung gelangte, und war damit der Weg gewiesen, auf welchem ein Erfolg möglich schien.

Zuerst versuchte ich es mit einer Mischung von gleichen Volumtheilen des käuflichen, 40procentigen Formols und concentrirter, wässriger Sublimatlösung. Ich erzielte damit prächtige Fixirungen z. B. bei *Volvox*, über deren Ergebnisse seinerzeit berichtet werden wird.

Bei der Giftigkeit des Sublimats ist jedoch das Mitnehmen derartiger concentrirter Lösungen auf Excursionen schwer zulässig. Weiters ist ein Auswaschen der Objecte, wenn auch nicht unmittelbar, so doch in kurzer Zeit nach der Fixirung nöthig.

<sup>1)</sup> Von der Entstehung der chromatischen und achromatischen Substanz in den thierischen und pflanzlichen Zellen. (Anat. Hefte, Band IV, H. 3, 1894, pag. 355—447.)

Dann wurden Formol-Jod- und Formol-Methylalkohol-Jod-Mischungen in Anwendung gebracht, welche öfters gut fixirten, aber Unzukömmlichkeiten vorzüglich in der Richtung boten, dass die Lösungen nur kurze Zeit haltbar waren und die Algenfarbstoffe, (wenn auch verändert) in einer Weise widerstandsfähig machten, dass sich dieselben später schwer durch Alkohol extrahiren liessen.

So erhielt ich dadurch bei *Cosmarium Botrytis* Menegh., welches mit Formol-Jod fixirt und nach Hämatoxylinfärbung in venetianischen Terpentin eingeschlossen wurde, das eigenthümliche Bild des grünen Chromatophors, aus welchem der blaue Kern und die schwächer blau gefärbten Pyrenoïde hervorleuchteten. An demselben Objecte hoben sich auch die stärker gefärbten Poren von der Zellmembran, welche fast ungefärbt blieb, und vom grünen Chromatophor scharf ab.

Schliesslich versuchte ich eine Mischung von Formol-Holzessig und, als diese vielfach gute Fixirungen des Zellinhaltes gab, aber in manchen Fällen z. B. bei *Vaucheria*, *Cladophora*, *Closterium*, *Penium*, *Tetmemorus* Zellhautquellungen und Plasmolyse hervorrief, Gemische von Formol-Holzessig-Methylalkohol, sowie von Formol-Holzessig-Methylalkohol, in welch' letzterem mehr oder weniger Pikrinsäure gelöst war.

Da die Pikrinsäure-Mischung gegenüber dem einfachen Formol-Holzessig-Methylalkohol keine wesentlichen Vortheile bietet und im Uebrigen der letztere so ziemlich allen gestellten Anforderungen entspricht, so habe ich mit demselben allein die Versuche in ausgedehnter Masse fortgesetzt und glaube auf Grund der gewonnenen Erfahrungen dem Algologen denselben mit bestem Gewissen empfehlen zu dürfen.

Ich beschränke mich daher auch im Folgenden lediglich auf dieses Gemisch, auf die Mittheilung seiner Zusammensetzung und Anwendungsweise, wie auch auf gewisse Umstände, welche bei der Untersuchung oder Praeparation des damit fixirten Materials zu beachten wären.

Die concentrirte Mischung, — sie sei als Stammlösung bezeichnet, — besteht aus je gleichen Volumtheilen 40procentigen Formols, Holzessigs (acetum pyrolignosum puriss.) und Methylalkohols (rectif. puriss.) und kann vorrätzig gehalten werden.

Ihre Anwendungsweise ist eine sehr einfache.

Der Algenwatte oder dem Magma wird nach dem Decantiren des überschüssigen Wassers ein Quantum der Stammlösung zugesetzt, welches mindestens das doppelte Volumen des übrig gebliebenen Wassers beträgt und dabei wiederholt aufgeschüttelt. Letzteres ist für das rasche und gleichmässige Eindringen der Fixirungsflüssigkeit wichtig.

In dieser durch das Algenwasser mehr oder weniger verdünnten Mischung können die Algen, deren Fixirung und Härtung gewöhnlich nach einigen Stunden vollendet sein wird, lange Zeit (nach den bisherigen Beobachtungen durch Wochen und Monate)

ohne Schädigung verweilen und entfällt somit gänzlich das unmittelbare, auf Excursionen oder Reisen lästige und oft unmögliche Auswaschen des Materials.

Fürchtet man übrigens bei subtilem Material Schädigungen durch allzu lange Zeit andauernde Einwirkung, so steht es natürlich frei, gelegentlich die Fixirungsflüssigkeit zu decantiren und durch Wasser (am besten luftfreies, also ausgekochtes und abgekühltes) zu ersetzen, welchem irgend ein Desinfectionsmittel, etwa Carbol-säure beigefügt ist. Ebenso kann hiezu mit Vortheil die von mir empfohlene 10procentige Glycerinmischung<sup>1)</sup> verwendet werden.

Hat man diese Procedur ein oder mehrere Male bis zum Verschwinden des Geruches der Fixirungsflüssigkeit vorgenommen, so lässt man in der Regel bis zur weiteren Verwendung stehen.

Nur wenn es sich um die Gallerte selbst oder um gallertige Algen (*Hydrurus* z. B.) handelt, welche durch längeren Aufenthalt in Wasser oder 10procentigem Glycerin leiden würden, ist es nöthig das Material entweder bis zur Bearbeitung in der concentrirten Fixirungsflüssigkeit zu belassen oder dasselbe, sobald als thunlich, nach irgend einer der bekannten Methoden<sup>2)</sup> in starken Alkohol zu bringen. Ich ziehe das letztere vor.

Die Uebertragung in Alkohol muss übrigens stets vor der Untersuchung oder Färbung und Praeparation geschehen, weil die Algenfarbstoffe auch durch diese Fixirungsflüssigkeit unvollständig zerstört werden. Meist bilden sich in den Zellen kugel- und tropfenförmige Ausscheidungsproducte, welche das Bild des Zellinhaltes stören, den Einblick hindern und daher vorerst durch Alkohol entfernt werden müssen, in welchem sie sich übrigens leicht lösen.

Ist die Alge oder das Magma stark mit Kalk, welcher sich bei der Fixirung nicht löst, versetzt oder incrustirt, so muss vor der Untersuchung, bezhgw. Praeparation entkalkt werden. Ich verwende dazu mit Vortheil die meinerseits zur Fixirung empfohlene Chromessigsäure<sup>3)</sup>, in welche die Objecte aus der obigen Fixirungsflüssigkeit direct ohne Auswaschen übertragen werden können.

Die Entkalkungsflüssigkeit muss gegenüber der Algenmenge reichlich vorhanden sein, eventuell gewechselt werden. Nach einigen Stunden pflegt der Kalk gelöst zu sein. Ausserdem werden auch die noch vorhandenen Algenfarbstoffe vollständig zerstört, so dass bei solchem Material eine Extrahirung derselben durch Alkohol entfällt. Nach der Entkalkung wird natürlich sofort gründlich ausgewaschen.

Das Entkalken von Magma ist immer mit grösseren Schwierigkeiten verbunden, weil die sich entwickelnde Kohlensäure die Theilchen nach Oben reisst und die Sedimentirung erschwert. Man wird daher nur in seltenen Fällen bei wirklich grossen Kalkmengen dazu greifen.

<sup>1)</sup> Zur Praeparation der Süswasser-algen. (Pringsheim's Jahrbücher für wissenschaft. Botanik, Bd. XXVI. pag. 678.)

<sup>2)</sup> l. c. pag. 679 u. f.

<sup>3)</sup> l. c. pag. 676.

Das Ueberführen in Alkohol kann nach dem bekannten Glycerinverfahren<sup>1)</sup> geschehen.

Wird hiebei zur langsamen Concentrirung des 10procentigen Glycerins der Schwefelsäure-Exsiccator benützt, so ist darauf hinzuweisen, dass Formol in den Algen fast stets zurückgehalten wird, wenn auch die Fixirungsflüssigkeit durch Wasser oder 10procentiges Glycerin soweit ausgewaschen erscheint<sup>2)</sup>, dass keinerlei Geruch mehr bemerkbar ist. Die Dämpfe desselben gehen, wo sie mit der Schwefelsäure in Berührung treten, mit letzterer Verbindungen ein, welche auf deren Oberfläche eine mitunter starke Haut bilden.

(Schluss folgt.)

## Zur Pilzkunde Vorarlbergs.

Von J. Rick S. J. (Feldkirch.)

### I.

(Schluss.)<sup>3)</sup>

- Agaricus procerus* Scop. Reichenfeld.  
 — ? *polystichus* Berk. Göfiser Wald.  
 — *melleus* Fl. Dan. An Stämmen nicht selten.

#### *Phalloidei.*

- Phallus impudicus* L. Saminathal.  
 — *caninus* Huds. Reichenfeld.

#### *Sclerodermei.*

- Scleroderma Bovista* Fr. Reichenfeld.

#### *Lycoperdinci.*

- Lycoperdon caelatum* Bull. Bei Dalaas. An der Nob.  
 — *gemmatum* Batsch. In Wäldern häufig.  
 — — var. *furfuraceum* Fr. Göfiser Wald.  
 — — var. *echinatum* Pers. Saminathal. (v. Bresad.)  
 — — var. *excipuliforme* Scop. Ibid. (v. Bresad.)  
 — *pyriforme* (wohl *piriforme*) Schaeff. In Wäldern häufig.  
*Geaster fornicatus* (Huds.) Fr. Göfiser Wald und Reichenfeld.  
 (v. Bresad.)  
 — *limbatus* Fr. Reichenfeld. (v. Bresad.)  
 — *Bryantii* Berk. Ibid. (v. Bresad.)  
 — *tunicatus* Vitt. Göf. Wald. Garina. (v. Bresad.)  
 — *striatus* (DC.) Fr. Reichenfeld.

#### *Nidulariei.*

- Crucibulum vulgare* Tul. Nicht selten.  
*Cyathus striatus* (Huds.) Hoffm. Sehr häufig.  
 — *vernicosus* (Bull.) DC. Reichenfeld. An Holz.

<sup>1)</sup> l. c. pag. 679 u. 680.

<sup>2)</sup> Durch Alkohol dagegen wird Formol vollständig und leicht entfernt.

<sup>3)</sup> Vgl. Oesterr. botan. Zeitschr. Nr. 1, S. 17.

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

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Österreichische Botanische Zeitschrift = Plant Systematics and Evolution](#)

Jahr/Year: 1898

Band/Volume: [048](#)

Autor(en)/Author(s): Pfeiffer R. v. Wellheim Ferdinand

Artikel/Article: [Beiträge zur Fixirung und Praeparation der Süßwasseralgen. 53-59](#)