

Zeitschr. f. Pilzkunde	38	Lehre	1972	J. Cramer
------------------------	----	-------	------	-----------

## CHEMISCHE REAGENZIEN IN DER HAND DES MYKOLOGEN

Von

W. M a t h e i s

Seit Mitte des vorigen Jahrhunderts kennt man die Verwendung von chemischen Reagenzien in der Mykologie. Der Chemiker C. F. S c h ö n - b e i n, damals Professor in Basel, hatte festgestellt, daß die schon lange bekannte Guajak-Tinktur nicht nur durch Kartoffelschalen, sondern auch durch Extrakte gewisser Pilzarten gebläut wurde.

Heute ist für den ernsthaften Mykologen die Benutzung von Chemikalien ebenso selbstverständlich wie z. B. die Verwendung des Mikroskops. Für den chemischen Laien unter den Pilzkundigen ergeben sich nun aber zuweilen Schwierigkeiten bei der Herstellung von Lösungen und bei der Beurteilung von deren Haltbarkeit. Um dieser – vielleicht nicht allzu kleinen – Gruppe von Lesern eine gewisse Möglichkeit der Information zu bieten, wurden im folgenden die in der Mykologie am häufigsten verwendeten chemischen Lösungen und Reagenzien zusammengestellt und mit mykologischen Hinweisen versehen. Diese Liste erhebt absolut keinen Anspruch auf Vollständigkeit, und manch einer hat mit einer anderen Konzentration, mit einer anderen Reagenzienkombination bessere Erfahrungen gemacht. Es wäre schön, wenn darüber mehr bekannt werden würde. In diesem Sinn ist die Aufstellung für den Fortgeschrittenen nur als Anregung aufzufassen, der Mykophile ohne chemisches Fachwissen wird hingegen manch nützlichen Hinweis entnehmen können. Ich möchte nur noch darauf hinweisen, daß diese Arbeit mehr die chemischen Aspekte berücksichtigt als die mykologischen. Wer sich eingehend über die mykologische Seite der chemischen Reaktionen informieren will, möge die am Schluß zitierte Literatur konsultieren, ganz besonders R. Singer (1962).

### **Grundsätzliches über die Haltbarkeit.**

Genaue Zeitangaben über die Haltbarkeit von Lösungen können naturgemäß

nicht gemacht werden, weil diese von zahlreichen, im einzelnen nicht vorhersehbaren Faktoren abhängig ist, wie z. B. von der ursprünglichen Reinheit der Reagenzien und Lösungsmittel, der Häufigkeit des Gebrauchs, der Sauberkeit des Benutzers, der Qualität des Fläschchenverschlusses, dem sekundären Verschmutzungsgrad der Lösung u.v.a.m. Es leuchtet ein, daß eine Lösung, die nur fünf Mal im Jahr verwendet wird, länger hält als eine solche, die fünfzig Mal gebraucht wird und in der am Schluß Lamellenteile umherschwimmen.

### **Beschaffung der Chemikalien**

Die größten Schwierigkeiten für einen Laien sehe ich vor allem in der Tatsache, daß es äußerst schwierig ist, geeignete Kleinmengen einzukaufen und sich daraus Lösungen herzustellen. Wer Beziehungen zu einem Laboratorium oder zu einer Apotheke hat, mag es einfacher haben – sehr gern stellt ihm aber niemand diese Lösungen her.

Viel rationeller wäre es, wenn eine Chemikalienhandlung (oder auch eine größere Drogerie) sich bereit erklären würde, ein Sortiment der am häufigsten benutzten Chemikalien bzw. deren Lösungen zusammenzustellen (inkl. Nachfüllpackungen!) und diese in den mykologischen Fachzeitschriften der Allgemeinheit zum Kauf anbieten würde. Ich bin überzeugt, daß rege Nachfrage herrschen wird.

Für die richtige Aufbewahrung der Lösungen haben sich kleine Glasfläschchen mit Schraubverschluß, die im Deckel eine Polyäthyleneinlage mit angesetztem Tupper aus dem gleichen Material besitzen, sehr gut bewährt. Solche Fläschchen werden sonst als Behälter für Hühneraugentinkturen benutzt.

### **Einteilung der Reagenzien**

Man kann die in der Mykologie benutzten Reagenzien nach ihrem Verwendungszweck in zwei Gruppen einteilen, die sich nicht immer scharf trennen lassen:

- A. Chemikalien und deren Lösungen, die vorwiegend für makroskopische (Farb-) Reaktionen benötigt werden („Makro-Reagenzien“) und
- B. Chemische Reagenzien, die man vorwiegend beim Mikroskopieren braucht („Mikro-Reagenzien“).

## A. Makro-Reagenzien

### 1. Säuren

Allgemeines: Beim Arbeiten mit Säuren, insbesondere konzentrierten, ist größte Vorsicht geboten. Konzentrierte Schwefelsäure frißt sehr rasch Löcher in Tischdecken und Anzüge. Ähnlich wirkt Salzsäure, besonders gegenüber synthetischem Gewebe. Man sollte eigentlich immer etwas Natriumbikarbonat („Kaiser's Natron“, „Bullrichsalz“) griffbereit neben sich liegen haben, um kleinere Säurespritzer sofort neutralisieren zu können. Auf die Haut getropfte Säure sofort gründlich mit Wasser waschen!

Die Säuren im einzelnen:

- a) **Schwefelsäurekonz.** ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , handelsüblich ca. 95–98 %) ist in reiner Form farblos, kann jedoch in technischer Qualität leicht bräunlich gefärbt sein. Beim offenen Stehenlassen an der Luft zieht sie begierig Wasser an und verdünnt sich dadurch selbst. Sie ist dann für manche Zwecke nicht mehr brauchbar, ebenso, wenn sie schwarzbraun gefärbt ist. Die Aufbewahrungsgefäße müssen daher immer ganz dicht schließen und es ist darauf zu achten, daß keine Teilchen von organischer Substanz (also z. B. vom zu untersuchenden Pilz) hineinfallen. Die konzentrierte Schwefelsäure braucht man eigentlich weniger als solche, sondern mehr zum Herstellen der verdünnten und von Kombinationslösungen. Wesentlich häufiger benötigt man
- b) **Schwefelsäure 60–70 %**. Unter Beachtung der notwendigen Sicherheitsvorkehrungen (z. B. Gefäß, in dem die Verdünnung vorgenommen werden soll, in ein Abwaschbecken stellen und immer erst das Wasser vorlegen, dann die Säure unter Rühren zulaufen lassen) kann man sich eine ca. 70-prozentige Lösung aus 3 ccm Wasser und 4 ccm konz. Schwefelsäure selbst herstellen. Diese Schwefelsäure ist jahrelang haltbar.
- c) **Salzsäure**. ( $\text{HCl}$ , handelsüblich ca. 36–38 %). Für die Salzsäure gelten in der Handhabung die gleichen Vorsichtsmaßnahmen wie für die Schwefelsäure. Reine Salzsäure ist farblos, technische oft leicht gelblich gefärbt, was von Eisenspuren herrührt. Bei starker Gelb- und Gelbgrünfärbung sollte man die Salzsäure ersetzen. Wenn nichts anderes angegeben, ist immer die konzentrierte Salzsäure gemeint. Verdünnte Salzsäure, die man sich durch Vermischen von 4 Volumenteilen Wasser mit 1 Teil konz. Salzsäure leicht selbst herstellen kann, wird in der Mykologie fast nicht verwendet.

d) **Salpetersäure konz.** ( $\text{HNO}_3$ , handelsüblich ca. 65 %) ist eine stark oxydierend wirkende Säure und daher besonders sorgsam zu behandeln. Bringt man einen Tropfen davon auf die Haut, so verfärbt sich diese trotz schnellen Abwaschens intensiv gelb. Diese Färbung ist außer durch mechanische Mittel (Bimsstein) nicht mehr zu entfernen. Nach einer Woche löst sich die verfärbte Haut ohne Schaden von allein ab. Konzentrierte Salpetersäure braucht man entweder als solche, oder in Verbindung mit Anilin für die **Schäffer-Reaktion**, die man zur Unterscheidung verschiedener *Agaricus*-Arten anwenden kann.

## 2. Laugen

Allgemeines: Laugen sind stark ätzende Flüssigkeiten und man hüte sich ganz besonders davor, sie auf Schleimhäute (Mund oder Augen) zu bringen! Für die Unschädlichmachung (Neutralisation) danebengefallener Tropfen verwendet man am besten verdünnten Haushaltessig. Angeätzte Hautstellen sind sehr lange mit Wasser abzuwaschen! Offenstehende Laugen ziehen aus der Luft schnell Kohlensäure an. Dadurch bilden sich Carbonate, die mit der Zeit einen Bodensatz bilden können und den Wert der Lauge stark mindern. Frisch bereitete Lauge ist wasserklar, leichte Flockenbildung macht noch nicht viel aus. Ist die Lauge aber undurchsichtig trübe geworden, so muß man sie ersetzen.

a) **Natronlauge konz.** ( $\text{NaOH}$ , im Handel als 30- oder 40-prozentige wäßrige Lösung) kauft man entweder als Flüssigkeit in der angegebenen Konzentration, oder man löst festes Natriumhydroxid (Ätznatron), das es in Plätzchen- oder Schuppenform zu kaufen gibt, in der notwendigen Menge destillierten oder entsalzten Wassers auf. Kalkhaltiges Leitungswasser gibt Trübungen! Herstellung: Zu 70 ccm entsalztem Wasser gibt man 30 g festes Natriumhydroxid und rührt vorsichtig mit einem Glasstab, bis sich alles gelöst hat. Die Lösung erwärmt sich dabei sehr stark, wie bei der Schwefelsäure. Vorsicht! Einfache Gefäße aus Preßglas können dabei zerspringen!

**Verdünnte Natronlauge** (ca. 3-prozentig) stellt man sich am besten durch Verdünnen oder Konzentrieren her (1 Teil konz. Lauge + 9 Teile entsalztes Wasser).

b) **Kalilauge konz.** ( $\text{KOH}$ , handelsüblich ca. 40-prozentige, wäßrige Lösung) kann man sich aus 40 g festem Kaliumhydroxid (Ätzkali) durch Auflösen in 60 ccm entsalztem Wasser selbst herstellen. Da sich auch hier die Lösung stark erwärmt, sind die gleichen Vorsichtsmaßnahmen zu

beachten wie bei der Natronlauge. Für praktisch alle Reaktionen, für die „Laugen“ erforderlich sind, kann man wahlweise Natron- oder Kalilauge nehmen. Die unterschiedliche Verfärbung des Fleisches oder der Huthaut ist z. B. bei der Gattung *Cortinarius* ein gutes Merkmal zur Unterscheidung einzelner Arten, Artgruppen oder Untergattungen.

Kalilauge 5 % wird zur Untersuchung von Herbarmaterial verwendet (siehe B 6). Man stellt sie sich her entweder durch Auflösen von 5 g festem Kaliumhydroxid in 95 ml entsalztem Wasser oder durch Verdünnen von 10 ml konz. Kalilauge mit 70 ml entsalztem Wasser.

- c) Ammoniakkonz. ( $\text{NH}_3$ , handelsüblich 24- bis 25-prozentige wäßrige Lösung) wurde früher auch als „Salmiakgeist“ bezeichnet. Da das im konz. Ammoniak enthaltene Ammoniakgas flüchtig ist, kann die Konzentration bei häufigem Gebrauch ziemlich abnehmen. Ist daher der stechende Ammoniakgeruch nicht mehr stark wahrnehmbar, so sollte man das Ammoniak durch frisches ersetzen. Bei der Angabe „Lauge oder  $\text{NH}_3$ “ kann unbedenklich statt Ammoniak Natron- oder Kalilauge (oder umgekehrt) genommen werden. Ist jedoch bei einer Farbreaktion nur „Ammoniak“ angegeben, so muß man in diesen Fällen auch beim  $\text{NH}_3$  bleiben.

Ammoniak 10 % dient ebenfalls wie 5-prozentige Kalilauge zur mikroskopischen Untersuchung von Exsikkaten (siehe B 7). Die Herstellung erfolgt durch Vermischen von 10 ml konz. Ammoniak mit 15 ml entsalztem Wasser.

### 3. Lösungen von Salzen

Normalerweise versteht man bei einer Konzentrationsangabe „in %“ reine Gewichtsprozent (g in 100 g Lösung). Der Einfachheit halber – und für die makrochemischen Reaktionen ohne Belang – sollen unter „%“ ab jetzt „g zu lösen in 100 ml (ccm) Lösungsmittel“ verstanden werden.

- a) Eisensulfat 10 % ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , Eisen-(II)-sulfat, Eisenvitriol) ist eine Lösung, die es nicht zu kaufen gibt, die man sich aber aus den leicht grünlich gefärbten Kristallen ohne Schwierigkeit selbst herstellen kann: Man löst davon 1 g in 10 ccm Wasser und gibt noch 2–3 Tropfen konzentrierte Schwefelsäure hinzu, um Trübungen zu verhindern. Statt Eisen-(II)-sulfat läßt sich auch Eisenammoniumsulfat (Eisenalaun) verwenden. Es ist chemisch sogar etwas beständiger als gewöhnliches Eisensulfat.

Die 10-prozentige Eisensulfatlösung ist ein häufig verwendetes Reagens

und dem entsprechend wird hier auch viel gesündigt.  $\text{FeSO}_4$ -Lösungen sind nämlich sehr luftempfindlich, d. h. das darin befindliche 2-wertige Eisen wird durch Luftsauerstoff zum 3-wertigen oxydiert, das dann die bekannten Farbreaktionen nicht mehr exakt liefert. Die Farbreaktionen können sehr verschieden sein: olivgrün über blaugrün bis blau, rosa- bis lachsrot oder negativ. Bei so diffizilen Farbunterschieden kann eine überalterte  $\text{FeSO}_4$ -Lösung leicht zu Fehldiagnosen Anlaß geben. Oft benutzte Eisensulfatlösung kann u. U. schon nach 2–3 Monaten unbrauchbar geworden sein. Frisch zubereitete Lösung ist fast farblos oder höchstens schwach gelblichgrün. Ist die Lösung jedoch schon bräunlich, oder hat sich gar ein Bodensatz von bräunlichen Flocken ausgeschieden, so muß man frische Lösung ansetzen. Bei weniger häufigem Gebrauch kann man vielleicht eine Saison durchstehen. Wenn man ganz sicher gehen will, kann man sich kurz vor der Verwendung einige Kristalle in ein paar Tropfen entsalztem Wasser lösen, aber notwendig ist das nicht. Eine charakteristische  $\text{FeSO}_4$ -Reaktion erhält man z. B. bei verschiedenen Arten der Gattungen *Russula*, *Tricholoma* und anderen.

- b) Eisenchlorid ( $\text{FeCl}_3$ , Eisen-(III)-chlorid), von Hennig unrichtig als „Eisenperchlorat“ bezeichnet (wahrscheinlich infolge fälschlicher Übersetzung von frz. „perchlorure de fer“) soll nach Singer (1962) die gleichen Reaktionen wie Eisensulfat geben. Ich selbst habe es noch nie verwendet.
- c) Silbernitrat 10 % ( $\text{AgNO}_3$ , Höllenstein) kann man normalerweise in dieser Konzentration auch nicht kaufen. Man bereitet sich die Lösung durch Auflösen von 1 g käuflichem Silbernitrat in 10 ccm entsalztem Wasser. Achtung: Kristalle nicht mit den Fingern anfassen und Lösung nicht auf die Haut bringen! Es ist zwar sehr harmlos, aber es entstehen unschöne, schwarze Flecken von ausgeschiedenem Silber, die höchstens mechanisch (Bimsstein) entfernbare sind. Ein Tip: Wenn man den auf die Haut gebrachten Tropfen sofort abspült und mit verdünntem Ammoniak (und nur dieses!) nachwäscht, so kann man die Entstehung des schwarzen Fleckens verhindern.

Silbernitrat ist lichtempfindlich, man sollte es daher in braunen Flaschen oder sonstwie unter Lichtabschluß aufbewahren. Unter diesen Bedingungen hält es sehr lange, da es ja auch nur selten gebraucht wird, z. B. nach Moser zum Bestimmen von *Cortinarius infractus*.

#### 4. Lösungen von sonstigen Stoffen in Wasser

- a) **Lugolsche Lösung**, oder kurz **Lugol**, ist nichts anderes als eine Lösung von Jod ( $J_2$ ) in Wasser, dem man zum Zwecke der Löslichkeitserhöhung Kaliumjodid (KJ) zugefügt hat. Herstellung: In ca. 20 ccm entsalztem Wasser löst man zuerst 2 g Kaliumjodid und dann 1 g Jod (braune Kristallblättchen). Wenn sich alles klar gelöst hat, fügt man noch 130 ccm Wasser hinzu. Viele nehmen statt 130 ccm Wasser 280 ccm. Für meine Begriffe ist diese Lösung dann aber zu verdünnt.

Zur Entfernung von Jodflecken aus Kleidern etc. nimmt man einige Körnchen Natriumthiosulfat (Fixiersalz), in wenig Wasser gelöst.

Lugol wird von den Bakteriologen sehr häufig bei der Färbung nach **Gram** verwendet, die Mykologen brauchen sie z. B. zur Charakterisierung der Untersektion *Purpurascetes* in der Gattung *Cortinarius*, zur Feststellung der Amyloidität von Sporen usw. Für letzteren Fall, sowie in der Mikroskopie nimmt man besser Melzer Reagens (siehe A 6 c) und B 3).

- b) **Phenollösung 2 %** ( $C_6H_5OH$ ) wurde früher auch als „Karbollösung“ bezeichnet und hat einen ganz intensiven, charakteristischen Geruch. Man stelle sich die Lösung her aus 2 g festem, kristallisiertem Phenol, das durch Lichteinwirkung auch rötlich gefärbt sein kann, und 100 ccm entsalztem Wasser. Phenol soll man tunlichst nicht auf die Haut bringen, da es rasch in sie eindringt und außerdem stark ätzend wirkt. Vor Licht geschützt ist es sehr lange haltbar. Man braucht es z. B. zur Abgrenzung von *Russula olivacea* gegenüber anderen Täublingsarten.
- c) **Anilin (-wasser)** ( $C_6H_5NH_2$ ). Während von **V. Melzer**, dem Entdecker zahlreicher spezifischer Farbreaktionen in der Gattung *Russula*, ursprünglich Anilinwasser, d. h. eine mit Anilin gesättigte, wässrige Lösung verwendet wurde, hat **J. Schäffler** für den gleichen Zweck das reine Anilin genommen. Um dieses gegenüber dem Anilinwasser besser zu unterscheiden, hat **Schäffler** es als Anilinöl bezeichnet. Spätere Mykologen haben zwar den Begriff „Anilinöl“ übernommen, man nennt es aber am einfachsten nur „Anilin“. Reines Anilin ist, frisch destilliert, eine farblose bis schwach gelbliche Flüssigkeit. Es ist licht- und luftempfindlich und färbt sich mit der Zeit braun. Die gleiche Farbe hat technisches Anilin. Die Vorratsflaschen sollten daher stets gut verschlossen und unter Lichtabschluß aufbewahrt werden. Da Anilin giftig ist, sollte man das Einatmen von Dämpfen vermeiden. Man hüte sich, Phenol- und Anilinreaktionen am gleichen Pilz auszuführen, da durch Anilindämpfe der Phenolfleck intensiv rot wird! Anilin nimmt man zur Unterscheidung

verschiedener Täublingsarten (z. B. kupferrote Verfärbung von *R. xerampelina*), sowie in Kombination mit Salpetersäure für die Schäffer-Reaktion. Diese ist typisch für verschiedene *Agaricus*-Arten, insbesondere *A. arvensis*. Auch braun verfärbtes Anilin gibt noch eine gute Farbreaktion.

- d) F o r m a l d e h y d (HCHO, handelsüblich 35- oder 40-prozentige, wäßrige Lösung) ist ein stechend riechendes Gas und kommt als gesättigte Lösung unter dem Namen „Formol“ oder „Formalin“ in den Handel. Es hat eiweißhärtende und bakterientötende Eigenschaften und wird daher als Konservierungsmittel benutzt. Formol ist längere Zeit haltbar, da es meist mit einem Zusatz von Methanol als Stabilisator in den Handel kommt. Im Laufe der Zeit kann allerdings eine Abnahme der Konzentration eintreten. Schön positive Formolreaktion gibt die Gruppe um *Russula nigricans* oder auch z. B. *Tricholoma orirubens*. S i n g e r (1965) benutzt Formol zur Differenzierung innerhalb der Gattung *Leccinum*.

## 5. Lösungen von organischen Stoffen in Alkohol

- a) G u a j a k - T i n k t u r ist, wie bereits am Anfang erwähnt, schon 1855 von S c h ö n b e i n für Versuche an Pilzen herangezogen worden. Es ging ihm allerdings dabei nicht um makrochemische Reaktionen im heutigen Sinn, sondern er wollte beweisen, daß die das Blauen gewisser Röhrlinge (z. B. *B. luridus*) verursachende Substanz eine ähnliche sei, wie die im Guajakharz enthaltene. Er konnte durch Versuche bestätigen, daß sowohl alkoholische Guajak-Tinktur als auch der unter Luftabschluß aus *B. luridus* gewonnene alkoholische Preßsaft sich unter genau denselben Bedingungen blau färben. So durch verschiedene Oxydationsmittel wie Chlor oder Brom, oder durch Luft – aber nie durch Luft allein, sondern immer in Gegenwart von bestimmten Pflanzenteilen, wie z. B. Kartoffelschalen oder (nicht blauenden) Pilzen. Er schloß daraus, daß eben in diesen bestimmten Substraten noch ein zweiter Stoff vorhanden sein muß, der den Sauerstoff aktiviert, so daß dieser vom Guajakharz wie vom *Luridus*-Extrakt unter Blaufärbung aufgenommen werden kann. Wir wissen heute, daß es sich bei diesen von S c h ö n b e i n postulierten Stoffen um Oxydasen handelt, das sind Fermente, die die Aufnahme von Sauerstoff katalysieren.

Guajak-Tinktur stellt man sich nach B a t a i l l e durch Auflösen von Guajak-Körnern (Guajak-Harz, dunkelgrüne bis braunschwarze Harzmassen, die aus dem Kernholz des westindischen Baumes *Guajacum officinale* gewonnen werden) in der 5-fachen Gewichtsmenge reinen

Alkohols her, also z. B. 1 g Harz in 5 g (= etwas mehr als 6 ml) Alkohol. Diese Lösung ist nicht unbeschränkt haltbar und man sollte sie sich jedes Jahr, kurz vor der Pilzsaison, frisch ansetzen. Guajak gibt mit vielen Pilzen aus zahlreichen Gattungen meist bläulichgrüne Verfärbungen. Sein Wert besteht eigentlich hauptsächlich darin, daß einige wenige diese Reaktion nicht geben, wie *Russula fellea*.

- b) *a*-N a p h t h o l ( $C_{10}H_7OH$ ) ist chemisch dem Phenol verwandt und gibt i. a. eine blaue bis blauviolette Farbreaktion bei verschiedenen Blätterpilzarten, mit Ausnahme der Champignons, bei denen die Reaktion mehr rötlich ist. Der Wert von *a*-Naphtol bei der Gattung *Russula* liegt, ähnlich wie bei Guajak, mehr in einer Negativ-Reaktion. Es ist also mehr bei den Arten interessant, die keine allgemeine Blaufärbung geben, wie z. B. *R. fellea* und *R. turci*. Die relativ haltbare Lösung stellt man sich durch Auflösen des bräunlich gefärbten *a*-Naphtols (0,1 g, eine gute Messerspitze voll) in 2 ccm Alkohol her. Wenn sich alles gelöst hat, gibt man noch 4 ccm Wasser hinzu.
- c) *B e n z i d i n* gibt, als 1-prozentige alkoholische Lösung angewandt, mit verschiedenen Arten, z. B. aus der Gattung *Agaricus*, eine Blaufärbung. Wegen der stark krebserregenden Wirkung dieses Stoffes, ist seine Anwendung in der Mykologie nicht empfehlenswert.

## 6. Kombinierte Lösungen

- a) *S u l f o f o r m o l* ist eine 1:1-Mischung aus 35- bis 40-prozentiger Formaldehydlösung (Formol, Formalin) und 70-prozentiger Schwefelsäure. Dieses Gemisch ist nach meinen Erfahrungen infolge Polymerisationsreaktionen nicht lange haltbar. Am besten scheint es mir, wenn man sich auf einem Uhrglas 2 Tropfen Formol und 2 Tropfen Schwefelsäure kurz vor Gebrauch zusammenmischt. *Bataille* benutzte für seine Versuche Schwefelsäure mit 66° Baumé, was einer konzentrierten Schwefelsäure von 95–97 % ( $D = 1,84$ ) entspricht. Das von ihm angegebene „Formol à 40° Baumé“ gibt es in dieser Konzentration nicht. 40° Baumé entspräche einer Dichte von 1,382, eine 40- (gewichts-) prozentige Lösung hat aber lediglich die Dichte 1,125. Offensichtlich meinte *Bataille* „Formol 40 P r o z e n t“.

*Maire* war wohl der erste, der Sulfoformol auf Vorschlag von *Arnould* in die Mykologie einführte. Sein Originalrezept lautete: 25 Tropfen destilliertes Wasser, 5 ccm reine Schwefelsäure, 75 Tropfen Formol (40 %). *Bataille* hat dann später das Reagens in größerem

Umfange benutzt, wie auch neuere Mykologen z. B. Singer (1962), jedoch ist seine Bedeutung weit hinter dem Sulfovanillin (6 b) zurückgeblieben. Der erste Pilz, an dem Maire Sulfoformol makrochemisch ausprobierte, war *Russula rosea*, dessen Fleisch sich nach einigen Minuten blau färbte. Mikrochemisch bewirkt Sulfoformol bei den *Russulaceen* eine Braunfärbung der Zystiden.

Da dem Formol zur Verhinderung von Polymerisationen kleine Mengen an Methanol (bis zu 10 %) zugesetzt sind, kann sich beim Zusammenmischen mit Schwefelsäure u. U. das sehr giftige Dimethylsulfat bilden. Allein aus diesem Grunde ist es nicht ratsam, sich allzu große Mengen herzustellen.

- b) Sulfovanillin, ein Gemisch aus Vanillin und Schwefelsäure, ohne Zweifel eine gute Kombination, wird relativ häufig verwendet. Seine erstmalige Anwendung in der Mykologie geht auf Arnold et Goris zurück. Es gestattet die sichere Unterscheidung von *Russula rosea* und *minutula* (intensiv eosinrote Färbung) gegenüber *R. rosacea*, die die Reaktion nicht gibt. Andere Täublinge werden purpurn bis blaurot verfärbt.

Die Herstellung ist einfach: Man gibt 1–2 Tropfen 70-prozentige Schwefelsäure (nach Bataille konz.  $H_2SO_4$ ) auf ein Uhrglas oder eine Glasplatte und löst einige Kriställchen Vanillin darin auf. Auf diese Art hat man immer frisches Sulfovanillin zur Hand und muß sich wegen der Haltbarkeit keine Sorgen machen. Die Originalvorschrift von Arnold et Goris lautet: 2 ccm Wasser, 2 ccm Schwefelsäure (konz.) und 0,25 g Vanillin. Nach Schäffler ist jedoch die Lösung schlecht haltbar, da zu verdünnt.

Als mikrochemische Reaktion ausgeführt, läßt sich unter dem Mikroskop eine Blaufärbung der Zystiden erkennen.

- c) Melzer Reagens ist das neben Säuren und Laugen am meisten verwendete Reagens und wird meist kurz „Melzer“ genannt. Man stellt es folgendermaßen her: In 20 ml destilliertem oder entsalztem Wasser löst man 1,5 g Kaliumjodid und dann 0,5 g reines Jod. Wenn sich alles gelöst hat, fügt man noch 20 g Chloralhydrat zu. Diese Lösung ist nach meinen Erfahrungen mehrere Jahre haltbar, d. h. das Chloralhydrat (farblose Kristalle vom Schmelzpunkt  $57\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) muß nicht erst kurz vor Gebrauch zugesetzt werden. Melzer wird mit Vorteil dort eingesetzt, wo eine erhöhte Jodkonzentration gewünscht wird, z. B. bei der Feststellung der Amyloidität von Sporenpulver. Das vorhandene Chloralhydrat erleichtert auch gegenüber der Lugolschen Lösung – das Eindringen des Jods in die Zellmembran.

Größere Bedeutung hat Melzer jedoch in der mikroskopischen Praxis (siehe B 3).

## B. Mikro-Reagenzien

Es ist nicht meine Absicht, im folgenden die Vielzahl von Farbstofflösungen aufzuführen, die in der mykologisch-mikroskopischen Praxis zur Anwendung kommen können. Es sollen hier wirklich nur ein paar allerwichtigste, beim Mikroskopieren öfter benutzte Stoffe Erwähnung finden.

### 1. Chloralhydrat/Wasser (1 : 1)

Um die Eigenfarbe z. B. von Sporen besser erkennen zu können, oder auch bei der Herstellung einfacher Quetschpräparate, nimmt man meistens reines Wasser als ungefärbtes Medium zwischen Objektträger und Deckgläschen. Seit längerer Zeit benutze ich für den gleichen Zweck statt Wasser ein Chloralhydrat/Wasser-Gemisch (1 : 1), das man sich leicht durch Auflösen von 10 g Chloralhydrat in 10 ml Wasser herstellen kann.

Chloralhydrat ist als Zusatzmittel in der Mikroskopie schon lange bekannt, nicht nur im Melzer Reagens, sondern auch in verschiedenen Einbettungsmischungen, z. B. nach Faure und Berlese. In letzteren dient es als Konservierungs- und als Aufhellungsmittel. Auch berichtet R. Singer (1962) über die Verwendung konzentrierter Chloralhydratlösung bei der Stärkereaktion nach Imleer. Es war daher sehr naheliegend, Chloralhydrat/Wasser beim Mikroskopieren generell als Lösungsmittelgemisch zu verwenden. Es hat folgende Vorteile:

1. Infolge des höheren Brechungsindex dieses Gemisches ( $n_D^{20} = 1,404$  gegenüber reinem Wasser ( $n_D^{20} = 1,333$ ) erhält man, besonders bei starken Vergrößerungen, ein klareres Bild. Zum Vergleich: Immersionsöl hat einen Brechungsindex von 1,515!

2. Dies ist der weitaus größere Vorteil: Das Präparat trocknet auf dem Objektträger nicht so schnell aus! Dies werden besonders jene zu schätzen wissen, deren Mikroskoplampe viel Wärme entwickelt. Während man bei der Verwendung von Wasser ziemlich schnell agieren muß, um ein Austrocknen des Präparates zu vermeiden, kann man sich bei Verwendung obiger Mischung getrost Zeit lassen: Selbst nach einer Stunde ist die Flüssigkeit zwischen Deckgläschen und Objektträger noch nicht merklich eingetrocknet. Und hat man einmal vergessen seine Objektträger zu reinigen (was zwar nicht

vorkommen sollte, bei nichtprofessionellen Mykologen aber einmal vorkommen kann) so läßt sich am anderen Tag – bei Verwendung des angegebenen Gemisches – mit warmem Wasser das Deckgläschen leicht entfernen und damit reinigen, während sonst der Reinigungsvorgang meist mit dem Bruch des Deckgläschens endet.

Das Gemisch von Chloralhydrat und Wasser ist mehrere Jahre haltbar.

## 2. Melzer Reagens

Obwohl dieses Reagens unter A 6c schon ausführlich besprochen wurde, sei es hier nochmals erwähnt, weil die amyloiden oder dextrinoiden Reaktionen meist unter dem Mikroskop beobachtet werden und äußerst wichtig sind.

Für die Ascomycetenfreunde ist Melzer fast zu einem Routinefärbemittel geworden: Einmal dient es bei den operculaten Ascomyceten zur Gattungsdifferenzierung (z. B. Blaufärbung der Asci bei *Peziza*) und bei den inoperculaten trägt es wesentlich zur Artdiagnose bei (Blaufärbung des Schlauchporus). Von Boudier wurde das Blauen der Schläuche zum ersten Mal entdeckt und als Mittel zur Klassifizierung der Discomyceten angewandt. Melzer eignet sich aber auch ganz allgemein zur Kontrastfärbung.

Die Basidiomycetenfreunde benötigen Melzer zur Feststellung der Amyloidität, z. B. von Sporen der Gattungen *Leucopaxillus* und *Melanoleuca*, von Hyphen (Myzelhyphen der Stielbasis) der Gattung *Chroogomphus* (siehe z. B. Mottier) sowie bei einigen *Mycena*- und *Marasmius*-Arten (Kühner 1962). Die sich manchmal stellende Frage, ob es sich bei der positiven Reaktion (=Blaufärbung) der erwähnten Gattungen um eine echte Stärke-Reaktion (lat. *amylum*, frz. *amylon* = Stärke) oder nur um eine Reaktion stärkeähnlicher (amyloider) Substanzen handelt, ist für den Mykologen ohne Belang, kann aber sicher zugunsten der zweiten Möglichkeit beantwortet werden.

Von der Amyloid-Reaktion zu unterscheiden ist die dextrinoide (dextrin-ähnliche) oder pseudoamyloide Reaktion, die in einer Rotbraunfärbung z. B. der Hyphen verschiedener *Lepiota*-Arten oder der Sporen von Arten der Gattung *Hygrophoropsis* besteht (Kühner 1962).

## 3. Baumwollblau

Baumwollblau (Cotton Blue, Anilinblau, Chinablau, Wasserblau) gehört zum Typ der sauren Fuchsinfarbstoffe und ist chemisch kein einheitlicher Stoff.

Zudem wird er von verschiedenen Firmen nach unterschiedlichen Verfahren hergestellt und unter zahlreichen Namen verkauft. Die verschiedenen Blau sind sich sehr ähnlich im Molekülbau, und ihre geringfügige Verschiedenheit hat keinen Einfluß auf die Verwendbarkeit. Meist nimmt man eine 0,1-prozentige wäßrige Lösung (0,1 g – eine gute Messerspitze voll – auf 100 ml Wasser) und benutzt sie für allgemeine Kontrastfärbung.

Für die Untersuchung der Ornamentierung von Ascomycetensporen ist eine Lösung von Baumwollblau in Milchsäure (0,05 g auf 30 ml) empfehlenswert (Dennis).

#### 4. Kresylblau

Kresylblau (Cresyl Blue) ist ein basischer Farbstoff nicht genau bekannter Zusammensetzung. Er gehört zum Typ der Monooxazinfarbstoffe und wird vornehmlich zum Färben von Baumwolle verwendet. In der Mykologie benutzt man eine 1-prozentige Lösung zur Protoplasmafärbung. Durch Kühner (siehe Kühner & Romagnesi, sowie Singer 1962) hat besonders die metachromatische Färbung Bedeutung erlangt, die auf der Tatsache beruht, daß die Stielhyphen gewisser Arten der Gattungen *Marasmius* und *Mycena* durch Kresylblau rot gefärbt werden, während die Normalfärbung der Zellwände blau ist.

#### 5. Sonstige Farbstoffe

Es gibt noch eine Unzahl von Farbstoffen, die der fortgeschrittene Mikroskopiker für Spezialfärbungen braucht, z. B. Karminessigsäure für die Zellkernfärbung, Anthracengrün zur Anfärbung eingelagerter Calciumoxalatkristalle usw., über die man Näheres bei Kühner & Romagnesi und Singer (1962) findet. Es würde zu weit führen, sie an dieser Stelle im einzelnen abzuhandeln.

#### 6. Reagenzien für Herbarmaterialuntersuchung

Die wichtigsten seien stichwortartig erwähnt:

5-prozentige Kalilauge (siehe A 2 b), 10-prozentiges Ammoniak (A 2 c), dieses auch mit Farbstoffzusatz, z. B. Erythrosin B (0,5 mg in 100 ml 10 %  $\text{NH}_3$  nach Palmer), sowie Baumwollblau in Milchsäure. Wegen Einzelheiten muß auf die Spezialliteratur verwiesen werden.

## Schlußbetrachtung

Die vorangehenden Ausführungen waren dazu bestimmt, dem Anfänger und chemischen Laien, sowie dem, der nicht über umfassende Spezialliteratur verfügt, gewisse Grundkenntnisse zu vermitteln sowie Hilfestellung zu bieten bei der Bereitung der Lösungen. Es ist mir ein Anliegen darauf hinzuweisen, daß die makrochemische Diagnostik niemals Selbstzweck sein darf, sondern daß sie genauso kritisch angewendet werden muß wie andere makroskopische Beurteilungskriterien, wie z. B. Geruch, Geschmack oder Farbe. Die kritische Beurteilung der Pilzreaktionen in mykologischer Hinsicht muß jeder, aus der eigenen Erfahrung heraus, selbst finden, denn oft geben zu alte (oder auch zu junge) oder zu trocken gewachsene Exemplare nur mangelhafte oder unklare Reaktionen. Damit die Beurteilung der Reaktionen in chemischer Hinsicht dem einzelnen erleichtert wird, sollte der Zweck der vorliegenden Arbeit gewesen sein.

## Literaturverzeichnis:

- ARNOULD, I. et GORIS, A., (1907) - "Sur une réaction colorée chez les Russules et les Lactaires", Bull. Soc. Myc. France **23**, 174–178
- BATAILLE, F., (1948) "Les reactions macrochimiques chez les Champignons" Paris (Reprint Lehre 1969)
- BOUDIER, E., (1907) "Histoire et classification des Discomycètes d'Europe" Paris
- DENNIS, R. W. G., (1968) "British Ascomycetes", S. XXVIII, Lehre
- HENNIG, B. in MICHAEL-HENNIG, "Handbuch für Pilzfreunde": Bd. I, S. 98–101, Jena (1968); Bd. IV, S. 144–146, Jena (1967); Bd. V, S. 104–105, Jena (1970)
- KÜHNER, R. & ROMAGNESI, H., (1953) "Flore analytique des champignons supérieurs", S. 489–493, Paris
- MAIRE, R., (1910) "Les bases de la classification dans le genre *Russula*", Bull. Soc. Myc. France **26**, 98–100 (1910)
- MELZER – ZVÁRA, (1927), "Česke Holobinky", zit. n. SCHÄFFER
- MOSER, M., (1960) "Die Gattung *Phlegmacium*", S. 40–46, Bad Heilbrunn
- MOSER, M., (1967) "Kleine Kryptogamenflora" Bd. II b/2: Die Röhrlinge und Blätterpilze, S. 3–4, Stuttgart (1967)
- MOTTIER, A., (1972) "Les hyphes amyloides chez *Chroogomphus corallinus*", Schweiz. Zeitschr. f. Pilzk. **50**, 13–14
- PALMER, J. T., (1968) Acta Mycologica **4**, 225

SCHÄFFER, J., (1952) "Russula-Monographie", S. 24–27, Bad Heilbrunn (Reprint Lehre 1970)

SCHÖNBEIN, C. F., (1856) "Über die Selbstbläuung einiger Pilze und das Vorkommen von Sauerstofferregern und Sauerstoffträgern in der Pflanzenwelt", Verh. d. Naturf. Ges. Basel 3, 339–355

SINGER, R., (1962) "The *Agaricales* in Modern Taxonomy", S. 77–95, Weinheim

SINGER, R., (1965) "Die Röhrlinge Teil I", S. 21–23, Bad Heilbrunn

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

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Zeitschrift für Pilzkunde](#)

Jahr/Year: 1972

Band/Volume: [38\\_1972](#)

Autor(en)/Author(s): Matheis Walter

Artikel/Article: [CHEMISCHE REAGENZIIEN IN DER HAND DES MYKOLOGEN 33-47](#)