

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

**ZWEI VERBESSERTE PRÄPARIERLÖSUNGEN  
FÜR DIE MIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG  
VON PILZEN**

Von  
Heinz Clémenton

**A. Eine stabilisierte, alkalische Lösung für allgemeine Zwecke**

Für die allgemeine mikroskopische Untersuchung frischer oder getrockneter Pilze werden meist Kalilauge oder Ammoniak, seltener Lactophenol nach A m a n n (1896) oder die Flüssigkeit nach A b e l (1913) gebraucht. Allen diesen Lösungen haftet der eine oder andere Nachteil an. Das Lactophenol ist stark sauer und sehr konzentriert; die Hyphen und oft auch die Sporen frischer Pilze kollabieren darin fast ausnahmslos und Herbarmaterial wird nicht oder nur schlecht gequollen. Das Ammoniak ist wegen seiner stark reizenden Dämpfe sehr unangenehm im Gebrauch und kann Augenentzündungen hervorrufen. Die A b e l'sche Flüssigkeit weist wegen des Ammoniakgehaltes denselben Nachteil auf. Die Kalilauge reagiert mit dem Flaschenglas und mit dem Kohlendioxid der Luft, es bilden sich die weißlichen Flocken und die Lösung ist nicht stabil. Alle vier Mittel benetzen trockene Pilze oft nur mit Mühe, besonders wenn es sich um lufthaltige Strukturen wie z. B. Capillitien handelt.

Ein befriedigendes Mittel muß folgenden Anforderungen entsprechen:

- a) Es soll vollständig geruchlos sein und darf keine flüchtigen Substanzen (außer Wasser) enthalten. Das schließt den Gebrauch oder Zusatz von Ammoniak oder Alkohol aus.
- b) Die Gesamtkonzentration der gelösten Stoffe muß gering genug sein, um auch empfindliche Zellen nicht zum Kollabieren zu bringen. Ein Zusatz von 20 Gew.-% Glycerin wird von den Zellen gut ertragen und bewirkt, daß die Präparate während länger dauernden Beobachtungen nicht austrocknen.

- c) Die Hydroxyionenkonzentration muß einerseits hoch genug sein um eine gute Quellung trockener Geflechte und Zellen zu erhalten und auch um eine genügende Farbvertiefung der inkrustierenden oder intraparietalen Pigmente (z. B. Sporen von *Cortinarius* oder Hyphen von *Xeromphalina*) zu erzielen, darf aber andererseits nicht zu hoch sein, damit das Flaschenglas nicht angegriffen wird. Dies entspricht einem pH von etwa 12,5. Zum Vergleich sei angegeben, daß eine 5%ige Kalilauge etwa pH 14, eine Ammoniaklösung etwa 11,5–12,0 haben.

Die Hydroxyionenkonzentration soll stabil sein und durch das Kohlendioxid der Luft nicht oder kaum verändert werden. Eine ausgezeichnete Stabilisierung des pH erreicht man mit einem Kaliumhydroxid-Natriumchlorid-Puffer, welcher seine größte Pufferkapazität zwischen pH 12 und 13 hat. Ich habe festgestellt, daß 5 Tropfen konzentrierte Eissigsäure auf 20 ml Puffer dessen pH von 12,6 auf 12,5 senkten. Das Kohlendioxid der Luft dürfte daher auch bei längerer Einwirkung keine merkliche Veränderung der Hydroxyionenkonzentration herbeiführen.

- d) Die Lösung soll stark benetzend sein. Durch einen Zusatz von organischen Lösungsmitteln (z. B. Alkohol) kann die Netzkraft stark gesteigert werden, doch sind solche Mengen erforderlich, daß b) nicht mehr beachtet werden kann. Zudem sind die meisten organischen Lösungsmittel flüchtig. Die modernen Netzmittel hingegen sind nicht flüchtig und es genügen schon sehr geringe Konzentrationen um eine sehr gute Benetzung trockener Pilzfragmente zu erreichen. Ein alkalibeständiges Netzmittel ist das *I n v a d i n* JFC von Ciba-Geigy, Basel, das in einer Verdünnung von 1 : 100 bis 1 : 1 000 ausgezeichnete Resultate gibt.
- e) Die Lösung darf mit den in den Pilzen und Nährböden enthaltenen Substanzen keine Niederschläge geben, und es sollen sich Farbstoffe darin auflösen lassen. Der beigefügte Farbstoff muß stabil sein und die Hyphenwände (besser als den Hypheninhalt) rasch und sauber färben, den Agar hingegen farblos lassen. Die geeigneten Farbstoffe werden weiter unten besprochen.

Gestützt auf diese Forderungen und Erfahrungen wurde die folgende Lösung angesetzt, die ich L4 (Lösung Nr. 4) genannt habe, und die mir seit einiger Zeit in meinem Labor und im Praktikum der Mykologie mit meinen Studenten hervorragende Dienste erwiesen hat:

|                         | Ansatz für 500 ml | Ansatz für 100 ml *) |
|-------------------------|-------------------|----------------------|
| Destilliertes Wasser    | 420 ml            | 84 ml                |
| KOH in Pastillen, p. a. | 3,60 g            | 0,72 g               |
| NaCl krist. p. a.       | 3,80 g            | 0,76 g               |
| Glycerin konz. puriss.  | 100 g (= 80 ml)   | 20 g (= 16 ml)       |
| Invadin JFC, Ciba-Geigy | 2,5 ml            | 0,5 ml               |

L4 hat pH 12,6 und ist gut gepuffert, hat keinen Geruch und irritiert die Augen nicht, quillt trockene Pilze gut, vertieft die Farbe vieler intraparietaler und inkrustierender Pigmente, kollabiert lebende Pilzzellen nicht, hat bei meinen Arbeiten bisher noch nie Niederschläge gegeben, benetzt ausgezeichnet, greift das Glas nicht an, ist stabil und die Präparate trocknen während längeren Beobachtungen nicht aus.

In L4 lassen sich viele Farbstoffe lösen. Von 84 geprüften Farbstoffen eignen sich eine ganze Anzahl zur Färbung der Pilze, aber die folgenden wurden wegen ihrer raschen, klaren, sauberen und intensiven Anfärbung der Zellwände (manchmal auch des Zellinhaltes) ausgewählt:

|                      |              |
|----------------------|--------------|
| Direkttiefschwarz EW | (gibt "L4D") |
| Chlorazolschwarz E   | (gibt "L4C") |
| Trypanblau           | (gibt "L4T") |
| Kongorot             | (gibt "L4K") |
| Brilliantrot A       | (gibt "L4B") |

Alle Farbstoffe von der Chroma-Gesellschaft in Stuttgart-Untertürkheim, gelöst zu 0,5 – 1 % und anderntags hart filtriert.

Direkttiefschwarz EW und Chlorazolschwarz E sind praktisch identisch in Farbton und Resultat. Beide färben hyaline Zellwände sehr rasch und außerordentlich sauber grau bis blauschwarz, ohne jedoch die natürliche Farbe pigmentierter Zellwände zu überdecken. Agar wird nicht angefärbt, so daß von Pilzkulturen sehr klare, bis in die letzten Einzelheiten gefärbte Präparate entstehen. Ich kann diese Farbstoffe sehr empfehlen.

Trypanblau zeichnet sich ebenfalls durch eine sehr klare Färbung aus. Pilzzellwände werden leuchtend blau dargestellt, pigmentierte Zellwände

\*) Da KOH in Pastillen benützt wird, ist es schwierig einen 100 ml-Ansatz genau herzustellen. Da eine präzise Dosierung von KOH und NaCl wichtig ist, ist es ratsam 500 ml oder 1 l zu bereiten, auch wenn dies viel erscheint.

aber nicht maskiert und der Agar bleibt farblos. Ich kann das Trypanblau ebenfalls sehr empfehlen.

Kongorot und Brilliantrot A sind einander sehr ähnlich. Zur völligen Auflösung muß kurz erhitzt werden, und anderntags bildet sich ein dichter Niederschlag. Nach dem Filtrieren ist die Lösung klar und stabil. Hyphenwände werden leuchtend rot dargestellt, kontrastieren aber weit weniger gut mit dem Hintergrund als die drei erstgenannten Färbungen. Leider wird Agar von Brilliantrot A beträchtlich, von Kongorot etwas weniger stark angefärbt.

In L4 oder einer der genannten Farblösungen in L4 können Schnitte und Pilzfragmente zwischen Objektträger und Deckglas über einer kleinen Flamme aufgeköcht werden. Meist wird diese Maßnahme jedoch überflüssig sein.

L4 und die Farblösungen eignen sich zur Untersuchung mannigfacher Pilze. Ich habe sie mit Erfolg angewendet bei Zygomyceten, Endomyceten, Deuteromyceten, Ascomyceten (*Eurotiales*, *Chaetomiales*, *Pezizales*, *Helotiales*, *Tuberales*, *Sordariales*, *Diatrypales*, *Xylariales*, *Clavicipitales*, *Pseudosphaeriales*, *Taphrinales*, *Erysiphales*), Basidiomyceten (*Auriculariales*, *Tremellales*, *Dacrymycetales*, *Aphylllophorales*, *Agaricales*, *Lycoperdales*, *Phallales*, *Nidulariales*, *Rhizopogonales* und *Gautieriales*). L4D, L4C und L4T waren im allgemeinen dem L4K und L4B weit überlegen.

## **B. Eine stabilisierte Kresylblaulösung zur Untersuchung metachromatischer Zellwände**

Kresylblau ist in einfachen wässrigen Lösungen nur kurz haltbar. Nach ein paar Tagen schon beginnt der Farbstoff auszuflocken und nach einigen Monaten ist die Lösung unbrauchbar geworden. Die Stabilität der Lösung kann durch einen Zusatz von Glycerin oder Alkohol beträchtlich erhöht werden. In der Praxis hat sich eine wässrige Lösung mit Aethylalkohol, Glycerin und dem Netzmittel Invadin JFC, Ciba-Geigy, gut bewährt:

|                        |                  |
|------------------------|------------------|
| Destilliertes Wasser   | 55,5 ml          |
| Aethylalkohol 96 %     | 27 ml (= 21,6 g) |
| Glycerin konz. puriss. | 17 ml (= 21,4 g) |
| Invadin JFC            | 0,5 ml           |
| Kresylblau Ciba        | 0,2–0,5 g        |

Diese Lösung wird anderntags hart filtriert und ist dann lange haltbar. Die orthochromatischen und metachromatischen Färbungen gelingen sofort und geben klare Resultate. Bisher konnte ich keine Unterschiede im Färbeverhalten zwischen der einfachen wässrigen Lösung und der obigen Lösung feststellen (angewendet auf Agaricales).

#### **Literatur:**

ABEL, R. (1913) - Bakteriologisches Taschenbuch. Würzburg, C. Kabitsch

AMANN, J. (1896) - Konservierungsflüssigkeiten und Einschlußmedien für Moose, Chloro- und Cyanophyceen, Z. wiss. Mikrosk. mikr. Techn. **13**, 18–21.

# 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): Clemencon Heinz

Artikel/Article: [ZWEI VERBESSERTE PRÄPARIERLÖSUNGEN FÜR DIE MIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG VON PILZEN 49-53](#)