

MIKROKOSMOS

Zeitschrift für angewandte

Mikroskopie, Mikrobiologie, Mikrochemie und mikroskopische Technik

Organ der Deutschen Mikrobiologischen Gesellschaft Stuttgart, der Mikrobiologischen Vereinigung Hamburg, der Mikrobiologischen Arbeitsgemeinschaft Mannheim, der Mikrobiologischen Vereinigung München, der Mikrographischen Gesellschaft Wien, der Mikroskopischen Arbeitsgemeinschaft Stuttgart e.V., der Mikroskopischen Gesellschaft Zürich.

Inhalt

Schneider, Prof. Dr. H.: Euglenen aus einer Wegpfütze	33
Mulisch, Dr. M.: Die Flaschentierchen (Folliculiniden): Interessante Bewohner des Meeres . . .	39
Zöffel, M.: Karl Bělař und die Zeichentechnik in der Protozoologie	45
Matthes, Prof. Dr. D.: Wie wichtig der Mikrokosmos sein kann oder: Der Mikrokosmos ist an allem schuld	49
<i>Zur Einführung in die Mikroskopie</i>	
Pederzani, H.-A.: Fundort-Aquarium. Ein Amphipode – aber welcher?	50
<i>Winke fürs Labor</i>	
Meller, Prof. Dr. A.: Einschlußmittel mit hohem Brechungsindex für Diatomeen	55
<i>Unser Umschlagbild</i>	
Hausmann, Prof. Dr. K.: Die Radula der Mollusken	61
Kleine Mitteilungen	60
Bücherschau	64

Umschlagbild: Ausschnitt aus der Radula des Tintenfisches *Septia* im Differential-Interferenzkontrast. Aufnahme Dr. KLAUS HAUSMANN. Siehe auch S. 61.

ISSN 0026-3680 74. 1985. Nr. 2, S. 33–64

Herausgeber: Dr. Dieter Krauter. **Redaktion:** Rainer Gerstle und Dr. Dieter Krauter, Stuttgart/© 1985. Franckh'sche Verlagshandlung W. Keller + Co., Stuttgart/Printed in Germany/Imprimé en Allemagne/Die in dieser Zeitschrift veröffentlichten Beiträge sind urheberrechtlich geschützt. Alle Rechte, insbesondere das der Übersetzung in fremde Sprachen, vorbehalten. Durch das Einsenden von Fotografien und Zeichnungen stellt der Absender den Verlag von Ansprüchen Dritter frei. Kein Teil dieser Zeitschrift darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form – durch Fotokopie, Mikrofilm oder andere Verfahren – reproduziert oder in eine von Maschinen, insbesondere von Datenverarbeitungsanlagen, verwendbare Sprache übertragen werden. Auch die Rechte der Wiedergabe durch Vortrag, Funk- und Fernsehsendung, im Magnettonverfahren oder ähnlichem Wege bleiben vorbehalten. Fotokopien für den persönlichen und sonstigen eigenen Gebrauch dürfen nur von einzelnen Beiträgen oder Teilen daraus als Einzelkopien hergestellt werden. Jede im Bereich eines gewerblichen Unternehmens hergestellte oder benutzte Kopie dient gewerblichen Zwecken gem. § 54 (2) UrhG und verpflichtet zur Gebührenzahlung an die VG WORT, Abteilung Wissenschaft, Goethestraße 49, 8000 München 2, von der die einzelnen Zahlungsmodalitäten zu erfragen sind. Die Vervielfältigungsstücke sind mit einem genauen Quellenhinweis zu versehen/Verantwortlich für den Anzeigenteil: Dr. Konrad Bay, Stuttgart/Werbung: Jürgen Ritter, Stuttgart/Druck: Konrad Tritsch, Graph. Betrieb, Würzburg/Der „Mikrokosmos“ erscheint monatlich. Bezugspreis (12 Hefte jährlich) DM 72.– zuzügl. Versand- oder Zustellgebühr. Sonderpreis für Schüler und Studenten jährlich DM 61.80 zuzügl. Versand- oder Zustellgebühr/ Einzelhefte DM 9.– zuzügl. Versand- oder Zustellgebühr/Bezug durch den Buch- oder Zeitschriftenhandel oder den Verlag/Das Abonnement ist jeweils, unter Einhaltung einer Frist von 6 Wochen, vor Ablauf des jeweils berechneten Bezugsjahres kündbar, soweit nichts anderes vereinbart ist. Bezug durch den Buch- und Zeitschriftenhandel oder den Verlag.

Verlag und Redaktion: Franckh'sche Verlagshandlung, W. Keller & Co., Postfach 640, Pfizerstr. 5–7, 7000 Stuttgart 1, Telefon-Sammelnummer (07 11) 21 91-1.

Einschlußmittel mit hohem Brechungsindex für Diatomeen

Styrax, Hyrax, Naphrax, Pleurax sind Namen von Diatomeen-Einschlußmitteln. Mit diesen und anderen hochbrechenden Medien versuchen die Diatomeenforscher, feinste Strukturen der Kieselalgen-Schalen darzustellen.

Prof. Dr. Anton Meller beschreibt die wichtigen Einschlußmittel, nennt Vor- und Nachteile der verschiedenen Medien und gibt genaue Herstellungsvorschriften.

Eine Reihe von Zuschriften und Artikeln im *MIKROKOSMOS* 1984 [Lit. 1–5] zeigt ein waches Interesse an hochbrechenden Einschlußmitteln für Diatomeen. Die Gerüststrukturen der Kieselalgen, die weitgehend aus SiO_2 bestehen, besitzen einen Brechungsindex von etwa $n = 1,43$ und bilden seit der Entdeckung ihrer Feinstrukturen in den vierziger Jahren des vorigen Jahrhunderts [6, 7] beliebte Objekte für mikroskopische Studien. Über die Arbeit des Algologen hinaus ist es vor allem die Möglichkeit, mit Hilfe der Beugungsbilder feinsten Diatomeenstrukturen die Leistungsfähigkeit der mikroskopischen Optik [7–12] und mikroskopischer Verfahren [13] zu prüfen, die dieses Interesse über mehr als 140 Jahre wachgehalten hat.

Die Möglichkeit zur Differenzierung von Strukturmerkmalen der Diatomeen ist nicht allein von der Apertur der Objektive und der Beleuchtung begrenzt, sondern wesentlich auch vom geringen Kontrast feiner Struktureinzelheiten, der durch den Charakter der Diatomeenschalen als Phasenobjekte bedingt ist [14, 15]. Eine Erhöhung dieses Kontrastes kann einerseits durch optische Kontrastierungsverfahren – Phasenkontrast oder Interferenzkontrast – erfolgen. Die Wirkung dieser Verfahren ist oft verblüffend: man betrachte einmal die bekannte Testdiatomee *Surirella gemma* im normalen Hellfeld und im positiven Phasenkontrast! Eine Grenze finden diese Verfahren jedoch dort, wo die Strukturdetails zu fein sind,

um bei normaler, gerader Beleuchtung noch ein differenziertes Beugungsbild zu liefern. Dies ist besonders der Fall bei den feiner gezeichneten Objekten von *Frustulia rhomboides*, bei *Amphipleura pellucida* und einigen *Nitzschia*-Diatomeen, beispielsweise *Nitzschia acicularis*. Hier kommt es wesentlich darauf an, durch einen großen Unterschied zwischen dem Brechungsindex des Einbettungsmediums und jenem der Diatomeen einen guten Kontrast zu erhalten. Der manchmal vorgenommene Einschluß in Luft (Brechungsindex $n = 1,0$), der sich bei Objekten, die mit einer Lichtführung von $nA \leq 1,0$ auflösbar sind, durchaus bewährt, ist bei den feinsten Objekten ganz unbrauchbar, weil durch Totalreflexion weder gerade Beleuchtung mit Aperturen von über 1,0 noch die für die Auflösung dieser Objekte erforderliche schiefe Beleuchtung (einseitig mit Spiegel oder *ABBÉ*-Blende oder allseitig mit dem Immersions-Dunkelfeldkondensator) möglich ist.

Da nun die sonst gebräuchlichen Einschlußmittel für Dauerpräparate mit einem Brechungsindex von etwa $n = 1,52$ infolge des geringen Unterschiedes zum Index der Diatomeen, der $\Delta n = 0,09$ beträgt, nur bei den allergrößten Formen zu einem ausreichenden Kontrast führen, ist die Suche nach geeigneten Einschlußmitteln seit jeher ein Anliegen der Diatomisten gewesen. Eine Vielzahl von meist weniger befriedigenden Einschlußmitteln ist seit den achtziger Jahren des vorigen Jahrhunderts beschrieben worden [16–20], wobei letztlich der Einschluß meist in Styrax, einem Naturharz bzw. daraus gewonnenen, gereinigten Inhaltstoffen, erfolgte. Der Brechungsindex dieses Mediums liegt bei $n = 1,58$; nachteilig ist die langsame Erhärtung [17–20]. Ebenso wie die Verwendung des Styrax geht der Einschluß von Diatomeen in Gemischen auf der Basis von Piperin auf den seinerzeit sehr berühmten Diatomeenforscher H. VAN HEURCK

zurück. Piperin selbst besitzt zwar einen Brechungsindex von $n = 1,68$, kristallisiert jedoch als Reinsubstanz rasch aus und zerstört so die Präparate. Alle Gemische mit hochbrechenden, anorganischen Verbindungen wie $SbBr_3$ oder HgI_2 sind empfindlich in der Verarbeitung und von begrenzter Haltbarkeit. Von den Piperinkondensaten mit organischen Partnern hat sich die von KOLBE und WISLOUCH [18–20] angegebene Kombination mit Cumaron (Benzo(b)furan) noch am besten bewährt. Das so erhaltene Harz hat einen Brechungsindex von n etwa 1,64, dunkelt allerdings besonders bei längerer Lichteinwirkung nach.

Vor etwa 35 Jahren wurden erstmals synthetische Harze als Diatomeeneinschlußmittel eingesetzt. G. D. HANNA [21] experimentierte mit Formaldehyd-Naphtalin-Kondensaten, die unter dem Namen Hyrax in den Handel kamen. Das Produkt wurde nicht patentiert und die Beschreibung, die HANNA gab, war auch nur sehr allgemeiner Art. Dies ist wohl darauf zurückzuführen, daß derartige Harze damals schon über zwei Jahrzehnte bekannt waren und offenbar industriell hergestellt wurden. Man vergleiche hierzu [22–24], was nur einen kleinen Teil der darüber bestehenden Literatur bzw. Patente darstellt. Später ließ sich FLEMING [25] solche Kondensate als Einschlußmittel für die Mikroskopie patentieren und gab in der Folge auch eine detaillierte Beschreibung der Herstellung seines Produktes, das er Naphrax nannte [26]. In der ursprünglichen Arbeit von HANNA [21] wird auch über die Kondensation von aromatischen Verbindungen mit Schwefel berichtet und 18 Jahre später die Herstellung eines Phenol-Schwefel-Kondensats beschrieben [27], das Pleurax genannt wurde. Pleurax war nie im Handel, kann aber nach der neueren, ganz vorzüglichen Beschreibung durch v. STOSCH [28] leicht hergestellt werden.

Auch hier ist festzustellen, daß Phenol-Schwefel-Harze schon vor den Versuchen von HANNA wohlbekannt waren, vergleiche hierzu [29] S. 1189/91. Von diesen Harzen sind noch heute, in wohl etwas modifizierter Form und sehr guter Qualität, Hyrax (mit einem Brechungsindex von $n = 1,71$) und Naphrax (mit einem Brechungsindex von $n = 1,69$) im Handel (s. Herstellerverzeichnis). Hierauf werde ich noch zurückkommen. Pleurax (bereitet nach [28]) zeigt einen Brechungsindex von $n = 1,73$.

Hier ist zunächst etwas über die Bestimmung der Brechungsindices von Harzen zu sagen. Während der Brechungsindex von Flüssigkeiten mit dem ABBÉ-Refraktometer mit hoher Genauigkeit bestimmt werden kann, steht für feste Harze als exakte Methode primär das aufwendige Verfahren nach BECKE [30 (auf S. 569) – 31] zur Verfügung. Glücklicherweise wurden unlängst im Mi-

KROKOSMOS einfache Verfahren zur Bestimmung von Brechungsindices zitiert, die sich auch auf Harze anwenden lassen [3]. Die hier angegebenen Brechungsindices wurden nach der von ROSENFELDT [3] beschriebenen Methode A gemessen und jeweils an mehreren Proben überprüft. Sie beziehen sich auf grünes Licht bei einer Temperatur von $25^\circ C$ (siehe Tabelle 1). Präzisionsbestimmungen sind schon aus dem Grund nicht sinnvoll, weil der Brechungsindex von Kondensatharzen wesentlich von Einzelheiten der Herstellung, von der Erhitzungszeit des Präparates in Abhängigkeit von der Schichtdicke und einem eventuellen Restgehalt an Lösungsmittel (der oft aus Gründen der Duktilität und Haftfähigkeit des Einschlußmittels durchaus erwünscht ist) abhängt. Im Prinzip sind solche Präzisionsmethoden (z. B. unter dem Schmelzpunktmikroskop nach KOFLER oder mit Streifen-Interferenzkontrast) natürlich anwendbar [31].

Nach 1950 sind noch mehrere neue Harze mit hohen Brechungsindices in die mikroskopische Technik eingeführt worden, so Caedax 547 mit $n = 1,63$ (Bayer-Leverkusen), Diatopan mit $n = 1,63$ (Chroma) [32], Clearax mit $n = 1,66$ (G. T. Gurr, Ltd.), Mikrops 163 mit $n = 1,63$ (Flatters u. Garnett) Plexisol mit $n = 1,63$ (Kosmos-Lehrmittel) [33] sowie Aroclor (Monsanto) mit $n = 1,66$ [31]. Alle diese Harze werden aus unterschiedlichen Gründen nicht mehr hergestellt und sollen daher hier außer Betracht bleiben.

Für Diatomeenpräparate, die gute Haltbarkeit, Farblosigkeit des Mediums in dünner Schicht mit einfacher Verarbeitung verbinden und einen Brechungsindex um $n = 1,70$ besitzen, ist der Präparator mit dem sehr preiswerten Naphrax [2], ebenso wie mit dem recht teuren Hyrax [1], bestens bedient. Diese Naphthalin-Aldehydkondensate sind in Toluol löslich. Verarbeitungshinweise liefern die Hersteller auf Merkblättern zusammen mit den Harzen. Die mit Hyrax bzw. Naphrax hergestellten Präparate erfordern keinen Lackring. Die Haftfähigkeit ist vor allem bei dem derzeit gelieferten Naphrax sehr gut. Ähnliche Ergebnisse erhält man auch mit dem Phenol-Schwefelkondensat Pleurax [28, 34, 35], das in Alkohol und Aceton löslich ist. Seine Synthese wird bei den Herstellungsverfahren angegeben. Ein Unterschied in Kontrast und Auflösung ist in diesen drei Medien nicht festzustellen.

Es zeigt sich aber allgemein, daß letztlich für die Kontrastierung nicht nur der Brechungsindex ausschlaggebend ist. Wesentlich scheinen dabei auch Dispersion, und vor allem die Oberflächenaktivität des Einbettungsmediums gegenüber den Diatomeenschalen zu sein. Dies zeigt sich auch an dem neuerdings im Handel befindlichen Dirax C (s. Herstellerverzeichnis), einem Extrakt aus Naturharz (Tolubalsam oder Perubalsam?).

das lediglich einen $n=1,59$ aufweist, von leicht bräunlicher Farbe ist, aber dennoch eine Auflösung liefert, die einen weit höheren Brechungsindex vermuten läßt. Allerdings reicht es an Naphrax nicht ganz heran. Dirax C gibt aber eindeutig bessere Bilder als monobromnaphthalinhaltiges Polystyrol, das man durch Auflösen von Styropor in Monobromnaphthalin und Erhitzen eines Tropfens zwischen Deckglas und Objektträger erhält und das ein n um 1,65 zeigt. Darüber hinaus sind die Hafteigenschaften des Polystyrol-Mediums sehr schlecht. Übrigens ist das in [3] erwähnte, hochbromierte Polystyrol (das mit Divinylbenzol vernetzt ist) wegen seiner Unlöslichkeit und seines hohen Schmelzpunktes für die Diatomeeneinbettung nicht geeignet.

Es erhebt sich nun die Frage, was man tun kann, wenn höchster Kontrast bei feinsten Details erzielt werden soll. Die meisten Kunst- und Naturharze haben eine relativ niedrige Brechung [s. 30 auf S. 596/7]. Ausgehend von den Kondensaten aromatischer Verbindungen wie Phenol- oder Naphthalinderivaten scheint es zunächst naheliegend, höher kondensierte Aromaten (wie Anthracenderivate oder Phenanthrenderivate) mit Aldehyden zu kondensieren. Hierbei ist einmal die potentielle Cancerogenität von hochkondensierten Aromaten und andererseits die Tatsache zu beachten, daß bei deren Umsetzung meist tiefgefärbte Nebenprodukte entstehen, die aufwendige Trennoperationen (Chromatographie) erforderlich machen. Ich habe daher versucht, ausgehend von Naphthalinderivaten und Schwefel, Naphthalinpolysulfidkondensate mit hohem Brechungsindex herzustellen. So gelingt es, ein Einbettungsmedium zu erhalten, das in dünner Schicht gelb ist, soweit bisher zu sehen völlig bestandige Präparate liefert und in der Kontrastierung den bisherigen organischen Einschlußmitteln deutlich überlegen ist. Zu diesem Zweck müssen allerdings zwei verschiedene Produkte miteinander gemischt werden (siehe Herstellungsvorschriften), die jeweils für sich allein keine so günstigen Resultate liefern. Der Brechungsindex des so erhaltenen Einschlußmittels liegt, in Abhängigkeit von der Präparation, zwischen $n=1,78$ und $1,81$.

Mit anorganischen Medien auf der Basis von Arsensulfid (As_2S_3) gelingt allerdings eine noch bessere Kontrastierung. Das „gelbe Medium“ geht auf H. L. SMITH [16] zurück, ist aber heute wegen der weit höheren Qualität der zu Verfügung stehenden Chemikalien in besserer Reinheit herstellbar als früher [16–20, 32]. Das Reaktionsprodukt von As_2S_3 mit $AsBr_3$ und Schwefel zeigt (wenn man es nicht zu hoch erhitzt, was eine bessere Beständigkeit ergibt) ein $n=2,18$. Präparate, die mit dem „gelben Medium“ hergestellt werden, zeigen einen hervorragenden Kon-

Tabelle 1: Berechnungsindices von Einschlußmitteln und Eichflüssigkeiten, gemessen nach [3]. Methode A im grünen Spektralbereich bei 25° C

Substanz	n
Wasser	1,33
Immersionsöl	1,52
Dirax C (Northern Biological Supplies)	1,59
Polystyrol mit 1-Bromnaphthalin	1,65
1-Bromnaphthalin	1,66
Naphrax (Northern Biological Supplies)	1,69
Hyrax (Custom Research Development Inc.)	1,71
Pleurax (nach v. Stosch)	1,73
Methyleniodid	1,74
Naphthol/Naphthalinsulfidharze	1,78–1,81
$As_2S_3-AsBr_3-(C_6H_5)_2As-S_8$ -Medium	1,85
$As_2S_3-AsBr_3-S_8$ -Medium nach H. L. Smith	2,18

Den Herren J. R. CARTER (Hawick, Scotland), Dr. K. KRAMMER (Düsseldorf) und Prof. Dr. H. A. V. STOSCH (Marburg) danke ich für die Überlassung von Diatomeenmaterial für Testzwecke.

trast, wobei allerdings gröbere Teile der Diatomeen bereits mit breiten schwarzen Rändern abgebildet werden. Die Haltbarkeit der Präparate kann nicht garantiert werden; nach mehreren Monaten zeigen sich in einem Teil der Präparate kristalline Ausscheidungen. Wichtig ist ein sofortiger Abschluß mit einem mehrschichtigen Lackring. Setzt man das Arsen(III)sulfid mit Arsen(III)bromid, Triphenylarsin und Schwefel um, kommt man zu einem beständigeren Medium, das allerdings nur mehr ein $n=1,85$ besitzt. Die Farbe in dünner Schicht ist zitronengelb. Herstellungsvorschriften siehe unten.

Dem Diatomeenforscher stehen demnach eine Reihe von Einschlußmitteln sowohl für gute, dauerhafte Präparate für seine Sammlung als auch solche mit höchster Kontrastleistung für spezielle Untersuchungen zur Verfügung. Bei der Prüfung der Abbildungsleistung von Objektiven bzw. ihrem Vergleich ist es wesentlich, daß solche Untersuchungen stets mit Präparaten durchgeführt werden, in denen identische Testobjekte im gleichen Medium eingebettet sind und bei feinsten Strukturen die Beleuchtung völlig gleichartig erfolgt. Bei allseitig schiefer Beleuchtung mit dem Immersionsdunkelfeldkondensator (die bei den Ölimmersionen mit höchster Apertur zu einem allseitig schrägen Hellfeld führt) bietet letzteres keine Schwierigkeit. Bei einseitig schräger Beleuchtung, die senkrecht zu den abzubildenden Feinstrukturen erfolgt und zu der – wie schon HUSTEDT [11] ausführt – der Spiegel noch besser geeignet ist, als die Iris des ABBÉschen Beleuchtungsapparates, ist es wesentlich, den immergierten Kondensator zunächst so einzustellen, daß eine maximale Ausleuchtung der Hinterlinse des Objektivs erfolgt – unabhängig davon, ob dies exakt dem KÖHLERSchen Beleuchtungsprinzip entspricht.

Herstellungsverfahren

Die Verwendung von reinen Chemikalien ist für das Gelingen der Herstellungsverfahren wichtig. Empfohlen wird die Verwendung der im Herstellerverzeichnis genannten Ausgangsstoffe. Bitte beachten Sie strikt die auf den Verpackungen der Chemikalien gegebenen Gefahrenhinweise (R-Zahlen) sowie die Sicherheitsratschläge für gefährliche Chemikalien (S-Zahlen), die entsprechend auch für die Endprodukte gelten (Schutzbrille tragen!).

Pleurax (nach H. A. v. STOSCH [28])

In einem 250 ml 3-Hals-Normschliffkolben vermischt man 110 g (1,17 mol) Phenol, 40 g (1,25 mol) sublimierten Schwefel und 0,1 g wasserfreies Natriumcarbonat und gibt ein mit Teflon umkleidetes Magnetrührstäbchen dazu. Der Kolben wird mit einem einfachen Liebig-Kühler und einem Thermometer versehen, das in die Schmelze reicht. Der dritte mit Schliffstopfen verschlossene Hals dient der Probenentnahme. Auf die Heizplatte eines Magnetrührers wird ein Aluminiumtopf mit Siliconöl gebracht und mit diesem als Heizbad das Reaktionsgemisch auf 180 bis 190° C erwärmt. Nach dem Aufschmelzen des Gemisches aktiviert man den Rührer. Der entstehende H₂S wird in den Abzug geleitet. Die Schwefelwasserstoffentwicklung nimmt nach einigen Stunden ab und ist nach 5–8 Stunden beendet. Das Ende der Reaktion ist auch daran zu erkennen, daß eine mit dem Glasstab entnommene Probe sich ohne Trübung in 5 ml 75% Methanol löst (d. h. es ist dann kein unumgesetzter Schwefel mehr vorhanden). Man erhitzt dann noch eine Stunde. Das Produkt ist ziemlich dickflüssig honigfarben und hat jetzt ein *n* von etwa 1,66. Man bringt davon einen Tropfen auf den Objektträger und erhitzt, um überschüssiges Phenol abzdampfen, auf einer kleinen Flamme (Bunsenbrenner, Spirituslampe oder einem Elektrobrenner). Auf das geschmolzene Harz wird das Deckglas mit den Diatomeen aufgelegt und unter vorsichtigem Erhitzen und eventuellem Andrücken mit einem abgebrannten Zündholz Luft- bzw. Phenoldampfblasen herausgedrückt. Eine Vorschrift für die Herstellung von nicht mit Säure behandelten Planktonpräparaten findet sich bei [28].

Naphthol-Naphthalinsulfidharz

1. Herstellung der Naphtholkomponente: In einer Apparatur, wie sie für die Herstellung von *Pleurax* beschrieben ist, vermischt man 72 g (0,5 mol) 1-Naphthol mit 32 g (1,0 mol) sublimiertem Schwefel und 0,05 g wasserfreiem Natriumcarbonat. Man erhitzt das Reaktions-

gemisch unter Rühren 22 Stunden auf 165° C. Das resultierende, in dicker Schicht dunkelgrün gefärbte Produkt wird heiß auf ein V 2a-Blech gegossen, wo es erstarrt. Das gebildete Harz wird in einem verschlossenen Kolben aufbewahrt.

2. Herstellung der Naphthalinkomponente: In der oben beschriebenen Apparatur werden 103 g (0,5 mol) 1-Bromnaphthalin und 38 g (1,2 mol) sublimierter Schwefel unter Rühren und allmählicher Steigerung der Temperatur von 160 auf 190° C 20 Stunden erhitzt. Evtl. in den Kühler sublimierender Schwefel ist wieder in die Reaktion einzubringen (z. B. durch Schmelzen mit einem Heißluftgebläse). Der entstehende Bromwasserstoff wird einem Abzug zugeführt. Nach Abkühlen auf etwa 100° C setzt man etwa 100 ml Toluol und einen gehäuften Eßlöffel gekörnte Aktivkohle zu und rührt bei dieser Temperatur noch 15 Minuten. Nach dem Abkühlen und Stehenlassen über Nacht wird über eine Glasfritte G 3 filtriert und anschließend das Toluol unter Vakuum bei Raumtemperatur abgezogen. Sollten sich hierbei oder beim weiteren Stehen Kristalle (Schwefel) aus dem braun-schwarzen, leicht viskos-flüssigen Reaktionsprodukt abscheiden, sind diese vor Gebrauch durch Dekantieren oder Abfritzen zu entfernen. Das Produkt enthält kein Brom mehr.

3. Herstellung der gebrauchsfähigen Lösung des Naphthol-Naphthalinsulfidharzes: In einen 100 ml Schliff-Erlenmeyerkolben gibt man 30 g des Naphtholharzes, 7 g des Naphthalinsulfidprodukts, 3 g 1-Bromnaphthalin und 11 g Toluol. Man läßt ohne zu erhitzen unter gelegentlichem Umschütteln mehrere Tage stehen, bis das Harz in den anderen Komponenten gelöst ist. Die in dicker Schicht tief braun-schwarze Lösung zeigt im reflektierten Licht einen metallischen Glanz. Die Herstellung der Präparate kann wie bei *Pleurax* beschrieben erfolgen. Eine andere Möglichkeit ist das von GÖKE [31] für Aroclor beschriebene Verfahren. In den Präparaten ist das Medium leicht braun-gelb. Ein Verschuß mit einem Lackring ist nicht unbedingt nötig.

„Gelbes Medium“ (nach H. L. SMITH [16])

Auf einer regelbaren Heizplatte (z. B. des Magnetrührers) schmilzt man in einem Schliff-Erlenmeyerkolben (Pyrex oder Duran) unter dem Abzug 20 g (0,06 mol) AsBr₃ mit 20 g (0,08 mol) As₂S₃ und erhitzt das 2-phasige Gemenge etwa 10 Minuten gelinde. Hierauf gibt man 6,4 g (0,2 mol) sublimierten Schwefel zu und erhitzt noch 5 Minuten. Es bildet sich am Boden des Kolbens eine gelbe Schmelze und darüber eine

Das trübe, farblose Flüssigkeit. Man läßt erkalten und dekantiert die Flüssigkeit weitgehend von der Schmelze. Die dekantierte Flüssigkeit dient man der Sondermüllbeseitigung zu. Die gelb-graue, trübe Schmelze bewahrt man luftverschlossen auf. Bei Bedarf wird mit einem Glasstab ein Tropfen der Schmelze entnommen und auf einen Objektträger, den man am besten mit einer Klemmpinzette hält, vorsichtig über einer kleinen Flamme (unter dem Abzug) getropft, bis sich Blasen entwickeln, der Tropfen sich klärt und orange zu verfärben beginnt. Hierauf legt man unter fortgesetztem Erhitzen das Deckglas mit den Diatomeen auf und preßt die Blasen mit einem abgebrannten Zündholz heraus. Es ist günstig, kleine Deckgläser (12 mm) zu verwenden. Wenn man das Medium stärker erwärmen, länger erhitzt, steigt der Brechungsindex weiter an. Zugleich wächst aber die Gefahr balgiger, kristalliner Ausscheidungen von As_2S_3 . Das Medium ist außerdem sehr hydrolyseempfindlich. Nach dem Erkalten (auf Holz oder Zeichenkarton) entfernt man sofort das überschüssige Medium mit einer scharfen Klinge, verbleibende Spuren des Mediums durch Reiben mit einem mit Ethylacetat befeuchteten Lappen und verschließt mit einem mehrschichtigen Lackring. Die Farbe der Präparate ist lichtgelb.

Arsensulfid-Arsenbromid-Triphenylarsin-Medium

In einem kleinen Duran- oder Pyrex-Schliffkölbchen, das man am besten mit einer hölzernen Reagenzglas- oder Reagenzglas-Klemme hält, erhitzt man über einer kleinen Flamme vorsichtig unter dem Abzug ein Gemisch von 6,5 g (0,02 mol) $AsBr_3$, 13 g (0,04 mol) As_2S_3 , 6,0 g (0,02 mol) $(C_6H_5)_3As$ und 4,2 g (0,15 mol) sublimierten Schwefel. Die Reaktionsmischung wirft Blasen, und Teile des Reaktionsgutes sublimieren bzw. verspritzen an die Kolbenwand. Man versucht, diese Anteile durch Schwenken des Kölbchens wieder der Reaktion zuzuführen. Es wird so lange gelinde über der Flamme erhitzt, bis die leicht bewegliche, flüssige Phase weitgehend verschwunden ist und der Inhalt des Kölbchens aus einer (evtl. nicht ganz homogenen) gelben Schmelze besteht (etwa 10-12 Minuten). Dann läßt man erkalten, säubert den Schliff und verschließt das Kölbchen. Für die Herstellung von Präparaten bricht man vom gebildeten gelben Harz mit einem kantigen Schraubenzieher vorsichtig kleine Stückchen los und verfährt wie beim Medium nach H. L. SMITH. Jedoch soll hier länger und höher erhitzt werden, allerdings sind Luftblasen schwerer zu entfernen. Das Medium ist nur wenig hydrolyseempfindlich, doch kann ein Lackring nicht schaden. Die Haltbarkeit der Präparate ist weit besser als beim „gelben Medium“.

Literaturhinweise:

- GÖKE, G.: Einschluß von Diatomeen. MIKROKOSMOS 73, 192 (1984).
- KRAMMER, K.: Einschluß von Diatomeen. MIKROKOSMOS 73, 320 (1984).
- ROSENFELDT, G.: Hochbrechende Beobachtungs- und Einschlußmedien. Suchen und Finden, Teil I: Bestimmung der Brechungsindices. MIKROKOSMOS 73, 214/16 (1984).
- ROSENFELDT, G.: Hochbrechende Beobachtungs- und Einschlußmedien. Suchen und Finden, Teil II: Hochbrechende Beobachtungsmedien. MIKROKOSMOS 73, 245/47 (1984).
- ROSENFELDT, G.: Hochbrechende Beobachtungs- und Einschlußmedien, Suchen und Finden, Teil III: Hochbrechende Einschlußmedien. MIKROKOSMOS 73, 285/87 (1984).
- SOLLIT, J. C. und HARRISON, R.: Quart. Journ. Microscop. Sci. II, 61/4 (1854).
- HARTING, P.: Das Mikroskop. Theorie, Gebrauch, Geschichte und gegenwärtiger Zustand desselben in 3 Bänden. Theile. F. W. Herausg., 1. Band Theorie und allgem. Beschreibung des Mikroskops. 2. Auflage Vieweg u. Sohn, Braunschweig 1866. S. 319/24. Neudruck: B. M. Israel, Amsterdam 1970.
- GÖKE, G.: Prüfung der Bildübertragungsleistung von Mikroskopen. I. Die chromatischen und monochromatischen Bildfehler. MIKROKOSMOS 72, 182/88 (1983). 2. Das Auflösungsvermögen. MIKROKOSMOS 72, 247/52 (1983), siehe auch: G. GÖKE: Die Prüfung von Mikroskop-Objektiven mit Testdiatomeen (Merkblatt der Fa. R. Göke).
- MARSON, J. E.: Test Diatoms [Leaflet for use with NBS (Northern Biological Supplies) Set 6 AK].
- DIPPEL, L.: Das Mikroskop und seine Anwendung. 2. Aufl., 1. Teil. Handbuch der Allgemeinen Mikroskopie. 2. Buch. S. 374/409. Vieweg u. Sohn, Braunschweig (1882).
- HUSTEDT, F.: Das Studium der Testdiatomeen als Einführung in die mikroskopische Praxis. MIKROKOSMOS 38, 265/69 (1949).
- KAISER, W.: Die Technik des modernen Mikroskops. 2. Aufl., S. 112/28. M. Perles, Wien (1906).
- NEÜBERT, W.: Optische Rastermikroskopie. MIKROKOSMOS 73, 299/305 (1984).
- KRAMMER, K.: Zur Deutung der Diatomeen-Feinstrukturen im Lichtmikroskop. MIKROKOSMOS 68, 66/71 (1979).
- KRAMMER, K.: Mikroskopie und Fotografie von Kieselalgen II. Die Kontrastierung bei der Abbildung von Diatomeen. MIKROKOSMOS 69, 300/05 (1980).
- SMITH, H. L.: Mounting Media of High Refraction Index. The Amer. Monthly Microscop. Journ. 6, 161/63 (1885).
- VAN HEURCK, H.: Mediums pour l'étude des Diatomees. Z. f. angew. Mikrosk. 3, 285/97 (1898).
- KOLBE, R. W.: Über Einschlußmittel für Diatomeen. Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie 44, 196/211 (1927).
- MIGULA, W.: Die Beobachtungs- und Einschlußmittel für Diatomeenschalen. MIKROKOSMOS 25, 46/50 (1931/32).
- HUSTEDT, F.: Vom Sammeln und Präparieren der Kieselalgen sowie Angaben über Untersuchungs- und Kulturmethoden. In: Aberhalden, Handbuch d. biolog. Arbeitsmethoden. Abt. XI, Teil 4, 1. Hälfte, 27/41. Urban und Schwarzenberg, Wien (1939).
- HANNA, G. D.: Hyrax, a new mounting medium for diatoms. J. Roy. Microsc. Soc. 50, 424/6 (1931), siehe auch: Custom Research Development Inc.: Hyrax high refractive index mounting medium (Merkblatt).

22. BASF: D.R.P. 207.743 (1907).
 23. FARBWERKE vorm. Meister Lucius und Brüning, in Höchst a.M.: Verfahren zur Darstellung künstlicher Harze und Öle. D.R.P. 403 264 (1924).
 24. FOLCHT, P.: Die Herstellung des Naphthalin-Formaldehyd-Kondensationsproduktes usf. Chemiker Ztg. **46**, 714/15 (1922).
 25. FLEMING, W. D.: Synthetic mounting material for microscopic specimens. U.S. Pat. 2.312.239 (1943). Chem. Abstr. **37**, 4842 i (1943) und U.S. Pat. 2.502.446 (1950). Chem. Abstr. **44**, 6195 h (1950).
 26. FLEMING, W. D.: Naphrax: A Synthetic Mounting Medium of High Refractive Index. New and Improved Methods of Preparation. J. Roy. Microsc. Soc. **74**, 42/44 (1954).
 27. HANNA, G. D.: A Synthetic Resin which has unusual Properties. J. Roy. Microsc. Soc. Ser. 3. **69**, 2518 (1949).
 28. v. STOSCH, H.-A.: Pleurax, seine Synthese und seine Verwendung zur Einbettung und Darstellung der Zellwände von Diatomeen usf. Arch. Protistenkunde **116**, 132/44 (1974).
 29. ELLIS, C.: The Chemistry of Synthetic Resins. Vol. 1. Reinhold Publ. Corp., New York (1935).
 30. MORREL, R. S-Editor: Synthetic Resins and Allied Plastics. 3rd ed. (by Langton, H.M.). Oxford Univ. Press, London (1951).
 31. GÖKE, G.: Ein neues Diatomeeenschlußmittel hoher Brechzahl: Aroclor. MIKROKOSMOS **62**, 278/80 (1973).
 32. BECK, E.: Beobachtungs- und Einschlußmittel für Diatomeen. MIKROKOSMOS **48**, 376/83 (1959).
 33. GÖKE, G.: Methoden der Mikropaläontologie. S. 49. Franckh-Kosmos, Stuttgart (1963).
 34. GERLACH, D.: Botanische Mikrotechnik. S. 218. Thieme-Verlag, Stuttgart (1977).
 35. HUSTEDT, F.: Kieselalgen (Diatomeen). S. 48. Franckh-Kosmos, Stuttgart (1973).
- Alfa Ventron GmbH**, Postfach 6540, 7500 Karlsruhe 1
 Arsen(III)bromid, [AsBr₃],
 Alfa Nr. 12115, 50 g DM 55,20
 Arsen(III)sulfid, [As₂S₃], ultrapure
 Alfa Nr. 12146, 25 g DM 78.–
- Custom Research Development, Inc.**, 8500 Mt. View Rd., Auburn, Cal. 95603 USA. In Deutschland: Fema-Salzgitter, R. Stratmann, Friedrich-Ebert-Str. 53, 3320 Salzgitter-Bad
 Hyrax, 30 ml DM 181,20
- Göke, R.**, Bahnhofstraße 27, 5800 Hagen 1
 Testpräparate in größerer Auswahl
- Merck, E.**, Postfach 4119, 6100 Darmstadt 1
 1-Bromnaphthalin [1-BrC₁₀H₇], zur Synthese
 Merck-Nr. 806210, 100 ml DM 16.–
 Ethylacetat [H₃CCOOC₂H₅], zur Synthese
 Merck-Nr. 822277, 1 l DM 19,25
 1-Naphthol [1-HOC₁₀H₇], zur Synthese
 Merck-Nr. 822289, 250 g DM 16.–
 Natriumcarbonat wasserfrei [Na₂CO₃], zur Analyse
 Merck-Nr. 6392 E, 500 g DM 13,75
 Phenol [C₆H₅OH], zur Analyse
 Merck-Nr. 206, 250 g DM 20,25
 Schwefel [S₈], sublimiert, DAB 6
 Merck-Nr. 7982, 2,5 kg DM 23,75
 Toluol [C₆H₅CH₃], reinst
 Merck-Nr. 8223, 1 l DM 17,75
 Triphenylarsin [As(C₆H₅)₃], zur Synthese
 Merck-Nr. 808653, 25 g DM 33.–
- Northern Biological Supplies**, Mr. J. E. Marson, 3 Ber Ave, Martlesham Heath, Ipswich IP 5 7HR, Great Britain (die in [2] gegebene Adresse ist überholt)
 Dirax C, 30 ml L 2,45
 Naphrax, 200 ml L 12,75
 Testpräparate in größerer Auswahl

Die Preise sind ohne MwSt. und ohne Versandkosten (Preisänderungen möglich).

Herstellerverzeichnis der Chemikalien und käuflichen Einbettungsmittel sowie von Testpräparaten (in größerer Auswahl)

Verfasser: Prof. Dr. Anton Meller, Institut für Anorganische Chemie der Universität Göttingen, Tammannstraße 4, 3400 Göttingen

Moose als Untersuchungsobjekte der Fluoreszenzmikroskopie

Sowohl in lebensfrischem Zustande, als auch als Herbarmaterial, das in Wasser eingeweicht und kurz erhitzt werden muß, damit Luftblasen aus den Geweben entweichen können, eignen sich Laubmoose ebenso gut wie Lebermoose bereits ohne jede Färbung zur Untersuchung mit dem Fluoreszenz-Mikroskop. Dabei ist es bei Herbarmaterial sogar oft noch von Vorteil, daß hier kein Chlorophyll mehr mit seiner starken Rotfluoreszenz stört. Am besten werden die zu untersuchenden Pflanzenteile mit reinem Wasser eingedeckt, da z. B. bei Einschluß in phenolhaltiger Glycerin-gelatine das Einschlußmittel selbst auch fluoresziert und dadurch den Bilduntergrund aufhellt. Angeregt wird die Fluoreszenz der Moosproben mit Blaulicht, das durchweg bessere Ergebnisse liefert als ultraviolettes Licht: (verwendet wurde ein Auflicht-Illuminator nach PLOEM mit dem Anregungsfilter BP 450 490, dem dichroitischen Teilerspiegel RKP 510 und dem Sperrfilter LP 515, als Lichtquelle diente eine 50 W-Quecksilberdampf-Hochdrucklampe).

Ergebnis:

Während das Sporophytengewebe der meisten untersuchten Laub- und Lebermoose keine primäre Fluoreszenz zeigt, (nur bei den Laubmoosen *Leptobryum pyriforme* und *Bryoerythrophyllum recurvirostrum* fluoresziert die Seta schwach, bei *Radula complanata* leuchten

knötige Verdickungen der Kapselwand gelblichweiß auf, bei *Leptobryum pyriforme* und bei *Pohlia lutescens* fluoresziert das Peristom) sind die Sporen aller untersuchten Laub- und Lebermoose an ihrer charakteristischen Fluoreszenz zu erkennen.

Bei den Gametophyten, also den eigentlichen Moospflänzchen, fluoreszieren wie bei *Jungermannia gracillima* und *Frullania dilatata* die Zellwände, wogegen der Zellinhalt dunkel erscheint, bei *Ceratodon purpureus* sind es gelbfluoreszierende Vakuolen in den Zellen der Stengel, bei *Polytrichum alpinum* wiederum sind es kappenförmige Wandverdickungen der Blattlamellen-Spitzenzellen, die deutliche Primärfluoreszenz zeigen. Besonders fallen jedoch durch ihre starke, überwiegend gelbe Fluoreszenz die als Gemmen bzw. Bulbillen, je nach Gestalt und Bildungsort bezeichneten, ein- bis mehrzelligen Vermehrungsformen auf, die an den Rhizoiden, den Blättchen, den Blattachsen oder in besonderen Brutbechern gebildet werden. Junge Bulbillen fluoreszieren dabei besonders intensiv.

Die primäre Fluoreszenz bei Moosen ist vermutlich durch verschiedene Substanzen wie Cutin und Sporopollenin, eventuell sogar auch Lignin, Flavonoide bzw. glykosidisch gebundene Phenolsäuren bedingt.

NÖRDHORN-RICHTER, G.: Primäre Fluoreszenz bei Moosen. LEITZ-Mitt. Wiss. u. Techn. **8**, H. 6, 167–170 (1984).

Alexander Pareto