

A. Allgemeiner Teil.

Das Untersuchungsmaterial.

Zu mikrochemischen Studien läßt sich nicht nur lebendes und in geeigneter Weise lebend fixiertes und gehärtetes Material, sondern in vielen Fällen auch konserviertes (Alkohol, Formaldehyd), sowie getrocknetes (Drogen- und Herbarmaterial) verwenden. Überall dort, wo es sich um den Nachweis von Körpern handelt, die im Zellsaft gelöst sind (und das sind die meisten mit Ausnahme der organisierten Zellbestandteile), ist lebendes Material vorzuziehen, sehr oft unbedingt notwendig. Im allgemeinen wird der Mikrochemiker in seinen Objekten und Präparaten auf größere Mengen an reagierenden Substanzen rechnen können, als es nach den quantitativen Befunden der Chemie den Anschein hat, denn die chemische Isolierung der meisten Körper ist mit großen Verlusten verbunden. Hier ist ein Vorteil gegeben, der jedoch durch verschiedene Umstände sehr eingeschränkt wird.

Selbst **lebendes Material** verlangt Beachtung verschiedener Faktoren. Es ist wohl selbstverständlich, daß das Vegetationsstadium der Pflanzen und das Alter der untersuchten Organe zu berücksichtigen ist und daß die Literaturangaben, falls nicht ausdrücklich etwas anderes vermerkt ist, sich nur auf gesunde Pflanzen und Pflanzenteile beziehen. Glykoside sind in ausdauernden Gewächsen vor dem Austreiben der Knospen in größeren Mengen gespeichert, während der Vegetation erfolgt zuweilen eine Zunahme (Syringin), in anderen Fällen nicht (Hesperidin). Sie können in lebenden Pflanzen durch Pilze zersetzt werden (*Convallaria majalis*) und in etiolierten Blättern geschwunden sein (Blausäureglykosid in *Prunus laurocerasus*). Die Tageszeit der Einsammlung kann ebenfalls die Untersuchung beeinflussen. In der Nacht findet bei den von Weevers untersuchten Glykosiden eine Abwanderung des glykosidischen Zuckers statt, am frühen Morgen trifft man in den Blättern nur den zuckerfreien Spaltling an. Da wir nur

letzteren nachweisen, so wird die Abwanderung im allgemeinen nicht störend sein, falls nicht, was ebenfalls eintritt, eine Spaltung des Aglykons erfolgt. Außerdem weisen viele Pflanzen eine weitgehende Individualität im Gehalt an Glykosiden (s. d.) und Alkaloiden (s. d.) auf. Die Individualität wird sich jedenfalls auch bei anderen Körpern herausstellen; sie kann zu abweichenden Ergebnissen führen (s. Alkaloide). All diese Verhältnisse treten bei makrochemischen Arbeiten, bei denen bei der Verarbeitung vieler Pflanzen Durchschnittswerte erzielt werden, weniger in Erscheinung, sind bei der mikrochemischen Untersuchung jedoch von großem Einfluß. Hier hat die Mikrochemie noch ein weites unbebautes Feld. Häufig stellt man Pflanzen, um sie frisch zu halten, in Wasser. Bei längerem Stehen in Wasser können die Objekte weitgehende Veränderungen im Chemismus erleiden. Reservestoffe (Zucker, Stärke, Glykoside u. a.) können aufgebraucht werden; andere Körper (Colchicin) erfahren Zersetzungen und sind dann nicht mehr nachweisbar. Anormale Bodenverhältnisse und abnorme Witterung werden sich ebenfalls bei dem Untersuchungsmaterial bemerkbar machen.

Lebend fixiertes und gehärtetes Material ist bei Zellkernstudien unentbehrlich, ebenso bei leicht löslichen Schleimen, Gallerten und gummösen Flüssigkeiten; es wird auch zur Untersuchung von Plasma und Chromoplasten benutzt. Die Art der Fixierung richtet sich nach der beabsichtigten Untersuchung. Zur Härtung dient in erster Linie Alkohol, bei Schleimen Bleiazetat und Kupferazetat (s. Schleim). Vorzugsweise wird fixiertes Material zu Färbungen genommen. Die Fixierung soll möglichst die Strukturverhältnisse des lebenden Zustandes erhalten. Vielfach entstehen hierbei Kunstprodukte, so daß ein Vergleich mit lebendem Material unerläßlich ist. Näheres über Fixierung und Härtung s. unter Zellkern.

Konserviertes Material: Die Art der Konservierung muß sich ebenfalls nach der vorzunehmenden Untersuchung richten. Zum Konservieren dient gewöhnlich Alkohol, weniger Formaldehyd, Pikrinsäurealkohol u. a. (s. Zellkern). Alkoholmaterial ist nur zum Teil mit fixiertem identisch, da man zur Aufbewahrung in der Regel nur 70% Alkohol nimmt, der zudem durch Verdunstung (wiederholtes Öffnen des Präparatenglases) und durch das in den Pflanzen enthaltene Wasser noch schwächer wird. Überdies dringt der Alkohol in Pflanzen und größere Pflanzenteile nicht genügend rasch ein, so daß die Härtung (und Fixierung) gewöhnlich unvollkommen ist. Absoluter Alkohol wird selten benutzt. Er ist zu teuer und ruft zu starke Schrumpfungen hervor. Alkohollösliche Substanzen fehlen naturgemäß, scheiden sich bisweilen beim Trocknen des Alkoholmaterials an der Oberfläche desselben aus (Kristalle von Hydrastin, Vanillin, Alantsäureanhydrid u. a.).

Da viele Enzyme durch kalten Alkohol, wie er zum Einlegen benutzt wird, nicht abgetötet werden, so finden im Alkoholmaterial vielfach Spaltungen statt. Andererseits gelangen wasserlösliche Körper (Inulin, Phosphate und andere anorganische Salze) zur Abscheidung. Chlorophyllfarbstoff und andere Farbstoffe werden ausgezogen, die Pflanzen werden mehr oder weniger gebleicht, zuweilen aber auch gebräunt und geschwärzt. Letztere Färbung erscheint selbst beim Einlegen in völlig absoluten Alkohol. In diesen Fällen ist der Alkohol ebenfalls zu langsam eingedrungen und hat die Farbstoff abspaltenden Enzyme nicht sofort abgetötet (Nekrobiose¹⁾). Ein Eintragen der Pflanzen, sofort nach dem Abpflücken, auf 10 bis 20 Minuten in siedendes Wasser oder auf einige Minuten in siedenden Alkohol bringt Abhilfe. Darauf werden die Pflanzen in gewöhnlichen Spiritus gebracht. Eine stärkere Nachfärbung ist nicht mehr zu befürchten. Diese „Kochmethode“ ist von Heinricher²⁾ bei chlorophyllfreien phanerogamen Parasiten und Saprophyten benutzt worden. — Gerbstoffhaltige Zellen fallen in Alkoholmaterial gewöhnlich durch ihre Färbung sofort auf. — Ziemlich weitgehend sind die Veränderungen, welche die Schleimmembranen, die resinogene Schicht, die Aleuronkörner u. a. in Alkohol erfahren.

Sublimat- oder Phenolalkohol leistet im allgemeinen keine besseren Dienste als Alkohol allein.

Recht empfehlenswert ist Alkoholdampf. Auf den Boden eines luftdicht schließenden Gefäßes kommt etwas absoluter Alkohol oder ein mit Alkohol getränkter Wattebausch. Das Material wird an einem Faden am Deckel aufgehängt, ohne daß es mit dem Alkohol in Berührung kommt. — Alkoholmaterial wird leicht brüchig; es wird durch 1—2ständiges Behandeln mit Glyzerinwasser wieder geschmeidig und schneidbar.

Formaldehyd (Formol)³⁾ gebraucht man, wenn man die Schrumpungen und Entfärbungen umgehen will, die das Material in Alkohol erleidet. 40% Formaldehyd (die Handelsware) wird mit dem 2—3-fachen Volumen destillierten Wassers verdünnt. Die Flüssigkeit braucht nur den unteren Teil des Gefäßes zu erfüllen. Die Gefäße müssen luftdicht verschlossen sein. Stärkere Lösungen härten und sollen

¹⁾ Bei Nekrobiose stirbt das Protoplasma ab, die Enzyme bleiben erhalten und in Tätigkeit (Beijerinck).

²⁾ E. Heinricher, Über das Konservieren von chlorophyllfreien, phanerogamen Parasiten und Saprophyten, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1892, IX, S. 321.

³⁾ Formaldehyd wurde zur Härtung und Konservierung tierischer Gewebe von F. Blum empfohlen: Das Formaldehyd als Härtungsmittel, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1893, X, S. 314 und: Notiz über die Anwendung des Formaldehyds als Härtungs- und Konservierungsmittel, Anatom. Anzeiger, 1893, IX.

nach Penzig¹⁾ auch bei Ganzmaterial das Protoplasma fixieren, ohne es zu koagulieren (?). Im allgemeinen bleiben die Farbstoffe erhalten, selbst Blütenfarben, doch werden Pflanzen mit hohem Gerbstoffgehalt bräunlich. Es läßt sich ferner Formoldampf verwenden. Bruns²⁾ benutzte bei Florideen eine 1% Formollösung, doch müssen die Algen vor Licht geschützt werden, um ihre Farbe zu behalten, „wenige Tage Belichtung genügen aber meist, um sie mißfarbig zu machen. Von einer Fixierung des Inhalts durch Formalin kann natürlich keine Rede sein.“ Gleiche Erfolge sollen mit Kampfer versetztes Meerwasser oder eine konzentrierte Lösung von Chlornatrium in Meerwasser liefern. Für Plankton dienen Mischungen von Methylalkohol, Holzessig, Formalin u. a. Setchell und Osterhout³⁾ benutzten bei Cyanophyceen 1% Formaldehydlösung, die mit 1% Chromalaun versetzt ist, bei Phaeophyceen 1–2% Formaldehydlösung in Seewasser; bei Rodophyceen erhält 1% Chromalaunlösung am besten die Farbe. Bei quellbaren Algen (Polysiphonia) ist Formolseewasser (1. Formol : 20.0, eine Stunde) zu empfehlen, „danach Abspülen in Seewasser und Übertragen in Alkohol + Seewasser 1:9“ (Tobler)⁴⁾. Zum Konservieren von Chlorophyceen, vorzüglich ihrer Chloroplasten, wird die Ripartsche⁵⁾ Flüssigkeit benutzt (nach Tempère: Kupferchlorid, Kupfernitrat je 0.2 g, Phenol 1 g, Wasser 99 ccm, Eisessig 1 ccm). — Chalon⁶⁾ hält eine Lösung von 3% Borsäure und 1–5% Natriumsulfat für morphologische Sammlungen als geeignet. — Auch Schwefeldioxyd in wässriger Lösung⁷⁾ wurde empfohlen und soll sich besonders bei Pilzen bewähren. Die Objekte entfärben sich (die gelbe Farbe hält sich am besten), bleiben aber elastisch. In vielen Fällen wird sich eine konzentrierte alkoholische Lösung von Pikrinsäure eignen, besonders bei Schleimen höherer

¹⁾ O. Penzig, Das Formalin als Konservierungsflüssigkeit für pflanzliche Präparate, *Malpighia* 1894 und *Ztschr. f. wiss. Mikr.*, 1895, XII, S. 115; L. Linsbauer, Über einige Versuche über die konservierende Wirkung von Formol, *Bot. Centralbl.*, 1894, LX, S. 364.

²⁾ E. Bruns, Beitrag zur Anatomie einiger Florideen, *Ber. deutsch. bot. Ges.*, 1894, XII, S. 178.

³⁾ W. A. Setchell und W. J. V. Osterhout, Some aqueous media for preserving algae for class material, *Bot. Gazette*, 1896, XXI, S. 140.

⁴⁾ F. Tobler, Fehlergröße einiger Fixierungsmethoden und Quellung einer Algenmembran, *Zeitschr. f. wiss. Mikr.*, 1909, XXVI, S. 51.

⁵⁾ Behrens-Küster, *Mikr. Tabellen*, 1908, S. 79.

⁶⁾ J. Chalon, Liquides conservateurs pour échantillons botaniques en bocaux, *Bull. Soc. Bot. de Belgique*, XXXVI, S. 39.

⁷⁾ G. Pollacci, Schwefeldioxyd als Konservierungsmittel für Pflanzen, *Atti dell' Ist. Bot. dell' Univ. di Pavia*, 1900, 2. Ser. VI, S. 165.

Pflanzen, nach Gomont¹⁾ auch (mit etwas Glyzerinzusatz) bei grünen Süßwasseralgen. Osmiumsäure wird bei pflanzlichen Objekten weniger benutzt.

Getrocknetes Material, auf das man oft ausschließlich angewiesen ist, wird in vielen Fällen, wenn man vom Plasma, Kern und Chromoplasten absieht, gleich gute Dienste wie konserviertes leisten. Von Einfluß auf manche Inhaltsstoffe ist die Art des Trockenprozesses. Verläuft dieser langsam, so finden tiefgreifende Spaltungen statt. Bei schnellem, scharfem Trocknen lassen sich enzymatische Prozesse zum großen Teile ausschalten. Jahrelanges Lagern von Drogen und Herbarpflanzen, vornehmlich bei schlechter Aufbewahrung, kann natürlich weitere Zersetzungen bedingen. Im Zellsaft gelöste Substanzen imprägnieren die organisierten Bestandteile der Zelle, dringen auch in die Membranen ein. Vorzüglich aus Sekretbehältern gelangen leicht flüchtige Bestandteile teils zur völligen Verdunstung und sind nicht mehr nachweisbar, teils an sekundäre Lagerstätten und zur Kristallisation (Alantsäureanhydrid, Santonin, Kampfer). Sehr viele Substanzen kristallisieren in der Zelle bei Wasserentzug aus (Inulin, Fett, Zucker, Hesperidin, Farbstoffe u. a.). Zuweilen wird ein Aufbewahren der luftgetrocknenen Objekte über Chlorkalzium anzuraten sein. Behält doch selbst Pollen bei sachgemäßer Aufbewahrung über Chlorkalzium seine Keimfähigkeit (s. Chemotropismus).

Zum Aufweichen getrockneter Algen und Pilze bedient man sich der Milchsäure. Die Objekte werden in Wasser aufgeweicht, dann in konzentrierte Milchsäure gebracht und auf dem Objektträger erhitzt, bis keine Gasbläschen mehr hervortreten²⁾. Das Verfahren ist auch für Drogen neben der Behandlung von Kalilauge, Chloralhydrat u. a. zu empfehlen.

Beim **Versand** von lebendem Material zu mikrochemischen Studien ist auf die Verpackung zu achten, denn für die Enzyme sind günstige Bedingungen auf dem Transporte gegeben, zumal, wenn dieser längere Zeit dauert. Allgemein gültige Vorschriften für die Verpackung lassen sich nicht geben, da viel von dem Zustand der Pflanzen und von der Dauer des Transportes abhängt. Alkaloidpflanzen, die gleich nach der Ernte trocken in Spankörbchen verpackt und verschickt wurden, haben sich bei Postversand nach eigenen Erfahrungen einige Tage gut gehalten. Die Pflanzen müssen jedoch lose (nicht gepreßt) im Körbchen

¹⁾ H. Gomont, *Conseils aux voyageurs pour la préparation des algues*, Journ. de Bot., 1906, XX, S. 18.

²⁾ G. Lagerheim, Über die Anwendung von Milchsäure bei der Untersuchung von trockenen Algen, Hedwigia 1888, S. 58 und: L'acide lactique, excellent agent pour l'étude des champignons secs, Rev. mycolog., 1889, XI, S. 95.

liegen, so daß die Luft allseitig Zutritt hat; auch darf ihnen äußerlich kein Wasser anhaften. In neuerer Zeit kommt bei Tropenmaterial der Versand in Torfmull¹⁾ in Blechdosen unter Luft- und Lichtabschluß in Aufnahme, der sich bei Kola²⁾ und Ananasfrüchten bewährte und auch für andere Samen und Früchte zweckmäßig sein wird. Seit langem verschickt man Pflanzen in zugelöteten Blechbüchsen, für derbere Objekte recht geeignet. Enzymatische Spaltungen sind naturgemäß nicht ausgeschlossen und wiederholt beobachtet worden (Vanillin-geruch bei ganz jungen, nicht fermentierten Früchten von Vanilla). Für Samen, die ihre Keimkraft leicht einbüßen, hat sich gepulverte Holzkohle als geeignetes Verpackungsmaterial erwiesen (Erythroxylon coca³⁾).

Einiges über die Präparation.

Die zu mikrochemischen Reaktionen erforderlichen Schnitte werden überwiegend mit freier Hand geschnitten. Die Technik des Schneidens muß hier als bekannt vorausgesetzt werden. Objekte, die sich nicht gut in der Hand halten lassen, werden zwischen Hollundermark oder wenn sie derb sind, zwischen Kork eingeklemmt. Hierbei bekommt gleichzeitig das in freier Hand gehaltene Messer eine bessere Stütze.

Getrocknetes Material läßt sich ohne weiteres ganz gut schneiden, jedenfalls besser, als vielfach angenommen wird. Von einem Aufweichen in Wasser (oder besser in Glycerinwasser) und von der oft empfohlenen Vorbehandlung mit verdünnter Ammoniaklösung oder schwacher Kalilauge kann meist abgesehen werden. Diese Vorbehandlung kommt mehr für feinere anatomische Untersuchungen und auch dann nur für Studien der Vegetationsspitzen und der Reproduktionsorgane in Betracht. Einmal werden bei der Vorbehandlung die Zellinhalte verändert, und Schleime u. a. gelöst und dann liefert zwischen Kork eingeklemmtes trockenes Material sogar dünnere Schnitte als lebendes oder erweichtes. Getrocknetes Material kann auch mit dem Mikrotom (s. d.) geschnitten werden. Liegen sehr spröde Objekte vor, dann ist es ratsam, diese über Nacht in eine feuchte Kammer zu bringen, indem man in ein-

¹⁾ L. Bernegau, Über Verschiffung und Frischhaltung tropischer Früchte in Torfmullpackung, Ber. deutsch. pharm. Ges., 1911, XXI, S. 162.

²⁾ Auf diese Weise versandte Keimlinge keimten und konnten nach einem Jahre im Topf ausgepflanzt werden.

³⁾ Es hängt viel von dem Entwicklungsstadium der Samen ab; Kokafrüchte, die nach allgemeiner Ansicht nur 14 Tage ihre Keimkraft behalten, kamen, aus Saigon im Papierbeutel als Warenmuster bezogen, im Botanischen Garten in Bern zur Entwicklung.

facher Weise auf einen tiefen mit Wasser gefüllten Teller eine trockene, die Objekte enthaltende Schale stellt und das Ganze mit einer Glasglocke bedeckt.

Handelt es sich um den Nachweis eines Körpers in den Zellen selbst und über seine Verteilung im Gewebe (Lokalisation), so müssen wir selbstredend die Reaktionen mit den unversehrten Zellen ausführen. Bei zarten Objekten (einzelligen Organismen, Pollen, Zellfäden und -flächen), die durch das Deckglas leicht zerdrückt werden können, bringt man auf dem Objektträger 4 Stützfüßchen für das Deckglas aus Wachs (3 Teile Wachs, 1 Teil Terpentin), Platin oder erwärmter Kakaobutter an. Praktisch sind auch 2 Stützleisten an den Längsseiten. Schnitte müssen so dick sein, daß sie eine (besser zwei) Reihen völlig unangeschnittener Zellen enthalten. Sind die Zellen relativ hoch (Leitparenchym) oder langgestreckt (Idioblasten, mechanische Elemente), dann wähle man Längsschnitte. Diese sind bei Wurzeln, Stengeln, Blattstielen und -nerven Querschnitten vorzuziehen, da sie nicht so dick zu sein brauchen, um unversehrte Zellen zu enthalten. Überhaupt sind stets bei Lokalisationsermittlungen die an Querschnitten erhaltenen Befunde durch Prüfung von Längs- und Flächenschnitten zu ergänzen. Die Präparation kann besonders bei Blättern einige Schwierigkeiten bereiten. Bei etwas starken Blättern gelingt die Herstellung von Flächenschnitten gut, indem man das Blatt über den Zeigefinger der linken Hand spannt, mit dem Messer die Epidermis schräg anschneidet und das angeschnittene Stück mit der Pinzette abzieht¹⁾. Nach Entfernung beider Epidermen bleibt gewissermaßen ein Flächenschnitt des Mesophylls zurück. Zur Herstellung von Blattquerschnitten legt man bekanntlich eine Anzahl Blattstückchen aufeinander und klemmt das Päckchen zum Schneiden zwischen Hollundermark ein. Bei starken, lederartigen Blättern (*Arctostaphylos*, *Pilocarpus*) kann man sich die Präparation erleichtern. Man schneidet mit einer kleinen, scharfen Schere einfach feine Schnipsel ab. Derartige Schnipsel geben recht brauchbare mikroskopische Präparate.

Stark brüchiges Material, von dem man unbedingt größere Schnitte haben muß, wird man unter Umständen vorteilhaft vor dem Schneiden in Glyzeringelatine (Zusammensetzung s. Dauerpräparate) einbetten. Auch zartes lebendes und fixiertes Material kann mit durch Erwärmen flüssig gemachter Gelatine unter dem Rezipienten der Luftpumpe injiziert werden. Fixierte Objekte müssen zuvor gewässert haben. Durch Einlegen in Alkohol erfährt die eingetrocknete Gelatine eine

¹⁾ In ähnlicher Weise fertigt man Längsschnitte aus Stengeln, Blattstielen u. a. an.

weitere Härtung. Aus den Gelatinestücken werden die Schnitte hergestellt; sie gelangen sofort auf den Objektträger. Wenn erforderlich, kann die Gelatine durch gelindes Erwärmen flüssig gemacht und mit Glyzerin und lauwarmem Glyzerinwasser entfernt werden.

Selbst das Schneiden sehr kleiner Objekte, wie Drüsen, Sporen, Pollen, Algen, ist mit freier Hand möglich. Zu diesem Behufe werden die Objekte mit einer dicken Gummilösung vermischt; die Mischung wird auf einen geeigneten Kork aufgetragen und der Kork an einem staubfreien Orte, evtl. im Exsikkator, bis zum Eintrocknen der Masse hingelegt. Einlegen in Alkohol bedingt weitere Härtung. Die durch die harte Gummimasse mit einem scharfen Messer hergestellten Schnitte führen mehr oder weniger Quer- und Längsschnitte der Objekte.

Einige Hinweise erfordert die Präparation verkohlter Pflanzenteile, da das Schneiden dieser mit einiger Schwierigkeit verbunden ist, weil die Präparate selbst bei vorsichtiger Behandlung leicht zerbröckeln und zerfallen. Es empfiehlt sich, derartiges Material zuvor mit Kanadabalsam zu durchtränken. Das Material gelangt zunächst auf einige Zeit in Xylol (um das Eindringen des Balsams zu erleichtern), dann auf 1 bis 2 Tage in Kanadabalsam und wird schließlich etwa eine Woche hindurch an der Luft trocknen gelassen. Auf diese Weise haben Wittmack und Buchwald¹⁾ verkohlte Getreidekörner behandelt, die sich nunmehr wie frische anfassen und präparieren ließen. Präparate aus stark verkohlten Pflanzen erscheinen unter dem Mikroskop schwarz und lassen von der Struktur des Gewebes wenig erkennen. Bleichen der Präparate mit einem der üblichen Bleichmittel (s. d.) hat wenig oder gar keinen Erfolg. Netolitzky²⁾ hat daher die Aschenskelette der Präparate (s. d.) zur Diagnose herangezogen, die vornehmlich dort, wo verkieselte Membranen vorliegen, gute Dienste leisten. Diese Methode haben Wittmack und Buchwald bei verkohltem Holz benutzt und zunächst größere Stücke des Materials vorsichtig verascht und aus der Asche die Präparate hergestellt. Die Veraschung muß sehr vorsichtig ausgeführt werden, damit das veraschte Pflanzenstück nicht zerfällt. Es wird dann in heißes flüssiges Paraffin übertragen und darin erkalten gelassen. Die in Paraffin eingebettete Asche läßt sich gut schneiden. Die Paraffinschnitte dürfen

¹⁾ L. Wittmack u. J. Buchwald, Pflanzenreste aus der Hünenburg und eine verbesserte Methode zur Herstellung von Schnitten durch verkohlte Hölzer, Ber. deutsch. bot. Ges., 1902, XX, S. 21.

²⁾ Fr. Netolitzky, Mikroskopische Untersuchung gänzlich verkohlter vorgeschichtlicher Nahrungsmittel aus Tirol, Ztschr. d. Nahrungs- u. Genußmittel, 1900, III, S. 401.

auf dem Objektträger nur sehr gelinde erwärmt werden. Bei zu starker Erwärmung wird das Paraffin flüssig und der Schnitt zerfließt. Nun wird das undurchsichtige Paraffin mit erwärmtem Xylol ausgewaschen; ein Tropfen Kanadabalsam dem Präparat zugesetzt und sehr vorsichtig das Deckglas aufgelegt.

Bei der Präparation von Braunkohlenhölzern wandte Triebel ebenfalls Kanadabalsam an und stellte dann Dünnschliffe her, während Schmalhausen die Stücke in glyzerinhaltige Gummilösung legte und nach dem Trocknen Handschnitte anfertigte und Gothan¹⁾ sich des Waxes bediente. Bei der letztgenannten Methode kommt das Objekt auf 2 bis 4 Minuten in absoluten Alkohol, dann wird eine gute Schnittfläche hergestellt und auf 5 Minuten in geschmolzenes Bienenwachs eingelegt, wobei das Wachs während dieser Zeit durch schwaches Erwärmen flüssig gehalten wird. Sobald nach dem Erkalten das Wachs Butterkonsistenz annimmt, wird das Holzstück herausgenommen und ist nach völligem Erhärten des Waxes schnittfähig. Die Schnitte werden in Glycerin untersucht, das mit etwas Alkohol versetzt ist.

Bemerkungen über Reagentien und Reaktionen.

Absolute Reinheit der Reagentien ist bei mikrochemischen Arbeiten noch mehr als bei makrochemischen Untersuchungen Grundbedingung, denn bei den minimen Mengen der in Reaktion tretenden Substanzen wirkt jede Beimischung weit leichter störend. Nur in seltenen Fällen ist die Beimischung eines ganz bestimmten Körpers im Reagens vorteilhaft, so beim Alaunnachweis mit Cäsiumchlorid (das eine Spur von Cäsiummalaun enthält). Beim Arbeiten mit Schnitten wird man von dem sog. Impfen absehen (Zusatz einer Spur der gleichen Substanz zu träge und schlecht kristallisierenden Körpern) und selbst beim Arbeiten mit Lösungen umgeht man es tunlichst. Der Konzentrationsgrad der Reagentien, zu deren Herstellung stets destilliertes Wasser genommen werden muß, läßt sich nur von Fall zu Fall bestimmen. Dies gilt auch für die Reagentien auf organisierte Zellbestandteile und auf Membransubstanzen (Jodjodkalium, Chlorzinkjod). Im allgemeinen sind die Reagentien entgegen vielen Literaturangaben nicht in konzentrierter Lösung anzuwenden. Verschiedene Fällungen lösen sich im Überschuß der Reagenzlösung leicht auf und es wäre wohl am richtigsten, wenn die reagierenden Körper im Verhältnis ihrer

¹⁾ Näheres bei W. Gothan, Über die Präparation von Braunkohlenhölzern zur mikroskopischen Untersuchung, Naturwiss. Wochenschr., Jena 1904, XIX, S. 574.

Atom- resp. Äquivalentgewichte zusammentreten würden. Bei Schnitten, in denen meist nur geringe Mengen des zu prüfenden Körpers zugegen sind, gelangen somit verdünnte Reagenzlösungen zur Anwendung.

Der Aufbewahrung der Reagentien ist besondere Sorgfalt zu widmen. In dieser Hinsicht wird sehr häufig gesündigt. Korkstöpselflaschen mit eingelassener feiner Pipette zum Ansaugen (ohne Gummikappe), die man in den Reagentienblocks antrifft, sind nicht praktisch. Bei den Gummipipetten (Augentropfgläser und -fläschchen) hält sich die Gummikappe nur beschränkte Zeit. Sie wird vorteilhaft in der von Schürhoff¹⁾ gegebenen Anordnung durch eine Glaskappe ersetzt. Über den oberen Teil des Pipettenrohres kommt ein etwa 1 cm breiter, mit Glyzerin befeuchteter Gummiring und darüber als Ersatz für die



Fig. 1.
Tropfglas mit
Glaskappe nach
Schürhoff.

Gummikappe ein fest anschließendes, am oberen Ende zugeschmolzenes Glasrohr. Durch Heben und Niederdrücken dieser Glasrohrkappe werden die Reagentien entnommen (Fig. 1). Man wählt am besten durchweg braune Fläschchen (Kobaltglas), die mit verdünnter Salzsäure ausgekocht und mit destilliertem Wasser gründlich ausgewaschen wurden. Vielfach werden sich Flaschen mit eingeschliffenen Glasstöpseln eignen, die mit einer Spur Wachs oder Fett gut eingerieben und bei manchen Reagentien (Chloralhydrat) mit angeschnittenen Glasstäbchen versehen sind. Bei verdünnten Laugen sind Stöpsel aus gutem Gummi oder Holz längere Zeit haltbar. Für ölig-harzige Flüssigkeiten, insbesondere für Kanadabalsam sind besondere Flaschen im Handel (nach Schuberg, A. Meyer, Kunz-Krause), bei denen ein Verschmutzen des Glases und der Finger ausgeschlossen ist. Bei dem Glase von Kunz-Krause (Pharm. Zentralh. 1912, LIII, S. 36), das von Franz Hegershoff, Leipzig zu beziehen ist, ist der Tropfstab verstellbar und endet in eine „durch einen merklich verjüngten Teil verbundene Kugel“, wodurch „die jederzeitige Absetzung der Flüssigkeit in Form eines, und zwar stets gleich großen Tropfens“ ermöglicht wird. Übrigens müssen relativ oft die erforderlichen Lösungen frisch bereitet werden. Wo diese Vorschrift besteht, befolge man sie und greife nicht aus Bequemlichkeit nach einer, wenn auch „nur einige Tage“ alten Lösung (Alkaloidreagentien). Zur sorgfältigen Aufbewahrung gehört ferner, daß man die Reagentien beim Gebrauch nicht unnötig lange offen stehen läßt. Die Unsitte, Reagentien mit eingetauchtem Glasstabe stunden-

¹⁾ P. Schürhoff, Pipettenglas für mikroskopische Reagentien, Pharm. Ztg., 1906, LI, S. 931.

lang, selbst über Nacht offen stehen zu lassen, scheint leider vielfach vorzukommen. Es ist doch selbstverständlich, daß, um nur ein Beispiel anzuführen, Schwefelsäure, die häufig gebraucht wird und dabei längere Zeit offen steht, sich nicht mehr in konzentriertem Zustande befindet und leicht zu unrichtigen Resultaten führen muß (bei Membranen). Osmiumsäure, über deren Zersetzung man zuweilen klagen hört, wird nicht durch Licht zersetzt¹⁾, sondern dadurch, daß beim vielfachen Öffnen und bei langem Geöffnetsein der Flasche oxydierbare Substanzen aus der Luft hineingelangen. Außerdem ist die Laboratoriumsluft zu berücksichtigen.

Bei sachgemäßer Entnahme der Reagentien wird ein längeres Geöffnetsein der Reagenzgefäße umgangen. Sind größere Quantitäten zu einer Reaktion oder zu einer Serie von Reaktionen notwendig, dann füllt man die erforderliche Menge auf ein tiefes Uhrglas oder Schälchen, das mit einer Glasplatte bedeckt wird. Bei der Prüfung von Auszügen, bei der man nur geringe Mengen braucht, bringt man einen größeren Tropfen der Reagenzlösung seitlich auf den Objektträger und entnimmt diesem das nötige Quantum mittels eines feinen Glasstäbchens oder einer Glasöse, über deren Anfertigung Schouten²⁾ eingehende Angaben gemacht hat. In den meisten Fällen wird man indessen das Reagens direkt zum Präparate bringen und das Standgefäß sofort wieder schließen. Lösungen, die ausschließlich zum Fixieren und Härten für Färbungen dienen, können, wenn sie sich nicht zersetzt haben, filtriert und weiter verwendet werden. Dies gilt vornehmlich für die teuren Fixiermittel. Bei billigen und einfach herzustellenden Lösungen jedoch (Kaliumdichromat bei Gerbstoffen, Kupferazetat bei Harzen u. a.) sieht man von einer mehrmaligen Verwendung ab.

Überwiegend gelangen die Reagentien in Lösungen zur Anwendung, in neuerer Zeit verschiedentlich auch in Dampfform, selten in fester Form. Die erhaltenen Reaktionen sind Quellungs- und Lösungsvorgänge, oder bestehen in Fällungen und Niederschlägen sowie in Färbungen.

Über die **Ausführung** der mikrochemischen Reaktionen lassen sich nur wenige allgemeine Gesichtspunkte hervorheben. Wir

¹⁾ Osmiumsäure braucht nicht vor Licht geschützt aufbewahrt werden, eine nahezu zweijährige, in einem weißen Glasstöpselglase aufbewahrte Stammlösung ist noch tadelloß.

²⁾ S. L. Schouten, Methoden zur Anfertigung der gläsernen Isoliernadeln, gehörend zu dem Isolierapparat für Mikroorganismen, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1907, XXIV, S. 258.

wollen mit Hilfe der Reagentien nicht nur die chemische Beschaffenheit der organisierten Bestandteile der Zellen (Membran und Inhalte) feststellen, sondern auch die im Zellsaft in gelöster Form auftretenden Substanzen ermitteln. Vor Ausführung der Reaktion unterrichtet man sich eingehend an lebenden Schnitten, bei getrockneten Pflanzen und Pulvern an aufgehellten und an nicht aufgehellten Präparaten über die Gewebselemente und die Zellinhalte. Die Reaktionen werden überwiegend mit den Präparaten (Schnitten, Pulvern, ausgetretenen Sekreten u. a.) direkt vorgenommen oder (in seltenen Fällen) mit den aus den Präparaten in geeigneter Weise gewonnenen Auszügen und Sublimaten. Die letztgenannte Arbeitsweise, bei der eine Lokalisationsermittlung nur unter bestimmten Verhältnissen (bei vorangegangener mechanischer Trennung einzelner Schichten und Organe) möglich ist, hat mehr für angewandte Zwecke Interesse. Sie kommt jedoch auch für all die zahlreichen Fälle in Betracht, für die derzeit eine Methode zur Ermittlung der Lokalisation noch nicht gefunden ist. Ganz allgemein führen wir unsere Reaktionen am Objektträger aus. Während in der reinen Mikrochemie die Reaktionen seit Behrens an dem einen Ende der Objektträger vorgenommen werden, führen wir sie meist in der Mitte der Objektträger aus. Beide Arbeitsweisen haben ihre Vor- und Nachteile, viel hängt von der Gewohnheit ab. Hingegen ist das Arbeiten in Uhrgläsern, wie es in der toxikologischen Analyse seit langem Brauch ist, nicht zu empfehlen, schon weil ein Hantieren mit Uhrgläsern am Mikroskope umständlich ist. Ist man einmal gezwungen, Reaktionen auf Uhrgläsern vorzunehmen, dann leisten die von Kunz-Krause gute Dienste (Pharm. Zentralh. 1912, LIII, S. 49). Sie sind mit einem Ausguß und mit konzentrischer und radiärer Zonenteilung versehen (Bezugsquelle: Franz Hugershoff, Leipzig). Wir benutzen stets die gebräuchlichen Objektträger aus Glas; sie ersetzen ebenfalls die in der Toxikologie bei Farbenreaktionen im Gebrauch stehenden Porzellanplatten. Um Farbenreaktionen makroskopisch verfolgen zu können, hält man den Objektträger abwechselnd über weißes und schwarzes Papier. (Porzellanplatten sind überdies schwer völlig rein zu halten, wahrscheinlich infolge der kleinen Luftblasen, die Tafner (Ztschr. f. wiss. Mikr. 1911, XXVIII, S. 286) in Porzellangefäßen auffand, der den Grund der sogenannten „launischen Reaktionen“ in dem Gefäßmaterial vermutet.)

Bei der Ausführung der Reaktion an **Schnitten** und mit Reagenzlösungen verfährt man in verschiedener Weise. Die Präparate kommen auf den Objektträger entweder direkt in einen Tropfen der betreffenden Reagentien und werden mit dem Deckglase bedeckt, oder aber man legt sie zunächst in einen kleinen Tropfen Wassers, legt das

Deckglas auf, setzt am rechten Deckglasrande das Reagens zu und saugt links die überschüssige Flüssigkeit mit einem Streifen Fließpapier ab. Bei dem direkten Eintragen sind Färbungen und Niederschläge besser lokalisiert; letztere entstehen jedoch oft erst nach längerer Zeit. Bei der Durchsaugungsmethode werden bei Trockenpräparaten die eingetrockneten Gewebe durch das kurze Einlegen in Wasser zunächst ihre natürliche Gestalt zum Teil wieder annehmen. Niederschläge entstehen schneller, ihre Bildung läßt sich leichter verfolgen, doch wird die Lokalisation undeutlich, die Fällungen gelangen infolge der Strömung leichter an sekundäre Lagerstätten. In bestimmten Fällen werden die Reagentien durchgesaugt, um die einzelnen Stadien ihrer Einwirkung kennen zu lernen (Chromsäure, Schwefelsäure bei Membranen). In solchen Fällen läßt man das Reagens einige Zeit einwirken und wäscht vor erneutem Reagenzzusatz jedesmal mit Wasser oder Glycerinwasser aus, um die Wirkung festzustellen.

Besonders zu beachten sind Strömungen, die selbst beim direkten Eintragen der Schnitte lebenden Materials in das Reagens entstehen. Wenn Fällungen an bestimmten Stellen innerhalb lebender Zellen sich anhäufen, so ist diese Erscheinung noch kein Beweis dafür, daß der gesuchte Körper auch an dieser Stelle lokalisiert war. Die Reagentien durchdringen¹⁾ die Zellwände nicht gleichmäßig an allen Punkten (dünne Membranstellen, Tüpfel), so daß Niederschläge zunächst dort entstehen, wo das Reagens am leichtesten eingedrungen ist. Außerdem ist es nicht ausgeschlossen, daß das eingedrungene Reagens von bestimmten organisierten Bestandteilen (Chromatophoren, Zellkern) der Zelle angesaugt wird, so daß Niederschläge auf diesen zur Ausbildung gelangen können, trotzdem sie in lebendem Zustande die reagierenden Körper nicht enthielten. Auch andere bei der Reaktion nicht beteiligte Substanzen können die Lokalisation der Niederschläge innerhalb der Zellen beeinflussen. Doch sind wir über diese Vorgänge noch sehr wenig unterrichtet.

Umsetzungen von schwer sichtbaren oder leicht löslichen Fällungen in gut sichtbare und unlösliche führt man in neuerer Zeit häufig aus. So werden die schwer sichtbaren gelben Fällungen von Kaliumkobaltnitrit durch Ammoniumsulfid in schwarzes Kaliumsulfid, die leicht lösliche Barytverbindung der Saponine mit Kaliumdichromat in unlösliches gelbes Baryumchromat umgesetzt. Besonders Alkaloidfällungen werden durch Umsetzungen weiter identifiziert (zuerst wohl von Geroch und Skippari, s. Alkaloide). Goldsalze werden durch Schwefelwasser-

¹⁾ Das Eindringen der Reagentien kann in vielen Fällen durch schwaches Erwärmen gefördert werden.

stoff zu Schwefelgold oder durch Eisensulfat zu metallischem Gold reduziert, Quecksilbersalze durch Schwefelwasserstoff als Sulfide kenntlich gemacht.

Reagentien in fester Form gelangen bei Schnitten nur hier und da zur Verwendung. So bringt man an Stelle von Phosphorsäure ein Körnchen Phosphorsäureanhydrid auf den Objektträger, legt den Schnitt darauf, bedeckt mit dem Deckglase und verflüssigt das Reagens durch gelindes Erwärmen. Kristallisiertes Phenol wird beim Nachweis verkieselter Membranen in gleicher Weise benutzt.

Dampfförmige Reagentien wurden zuerst ausschließlich zum Fixieren benutzt (Osmiumsäure). 1876 gebrauchte Herrmann Ammoniakdampf zum Juglonnachweis. Dampfförmige Reagentien werden herangezogen, wenn man bei Jod- und Bromreaktionen störende Färbungen (der Stärke) vermeiden will, wenn die sich bildenden Niederschläge sehr leicht wasserlöslich sind (Alkaloide), oder wenn die Lokalisation einer Farbenreaktion nicht verwischt werden soll (Juglon, Oxymethylanthrachinone). Als dampfförmige Reagentien (Barth, s. Alkaloide) werden benutzt: Jod, Brom, Chlor, Ammoniumkarbonat (Ammoniak), Salzsäure, Salpetersäure. Die Reagentien gelangen in den Fuß eines kleinen Exsikkators, in dessen oberen Teil die Objektträger mit den trockenen Schnitten gebracht werden. Jod wird durch Bedecken mit einer Sandschicht an zu schneller Verdunstung verhindert, Brom wird als Bromkalk benutzt, bei Säuren muß auf niedrige Temperatur geachtet werden, damit nicht gleichzeitig zuviel Wasser mit verdunstet. Der Exsikkator läßt sich natürlich durch andere gut schließende Gefäße ersetzen, in die man passende Glasbehälter stellt, welche die Deckgläser mit den Präparaten aufnehmen. Gleiche Dienste leisten aufeinandergelegte Petrischalen mit eingelegtem Uhrglase als Unterlage für die Objekte sowie die Objektträger mit aufgekitteten hohen Glasringen. Aus Säuren mitgerissenes Wasser wird aus den Präparaten im Schwefelsäure-Exsikkator entfernt. Nach Möglichkeit muß jedoch das Übergehen von Wasserdämpfen durch Kühlstellen des Apparates und durch nicht zu lange Wirkung der Säuren vermieden werden. Denn durch die Wasserdämpfe tritt der Niederschlag leicht aus den Schnitten heraus und gelangt zum großen Teil auf den Präparaten zur Kristallisation. Die Schnitte werden in Paraffinöl untersucht.

Dauerbeobachtung ist überall dort notwendig, wo Fällungen erst nach längerer Zeit entstehen. Aber auch dann, wenn sich Niederschläge sofort bilden, ist es dringend notwendig, die Präparate nach 1 bis 2 Tagen nochmals zu durchmustern, um die etwa eingetretenen Veränderungen festzustellen, die sich vor allem in der Kristallbildung zeigen. Handelt es sich um Auszüge aus Präparaten und um Fällungen

außerhalb der Schnitte, so ist sogar eine Beobachtung nach 1 Woche von großem Vorteil. Man wird erstaunt sein, wie schön manche Körper alsdann herauskristallisiert sind. Insbesondere ist dies notwendig bei Sublimaten, beim Nachweis der Zuckeralkohole, von anorganischen Salzen und Amidokörpern. In anderen Fällen muß die Reagenslösung vor dem Verdunsten geschützt werden. Man schließt daher die Präparate ein, indem man das Deckglas mit Vaseline oder Wachsterpentin luftdicht umzieht. Diese Anordnung hat Siim Jensen beim Nachweis der Alkaloide (s. d.) getroffen. Das Umranden ist nicht gerade bequem, daher habe ich mich folgender Methoden bedient: Die Kontrollschnitte werden auf einem Uhrglase mit dem Reagens gut durchfeuchtet, das Uhrglas wird mit einer Glasplatte bedeckt, so daß ein Verdunsten unmöglich ist. Nach einem Tage werden die Schnitte auf den Objekt-

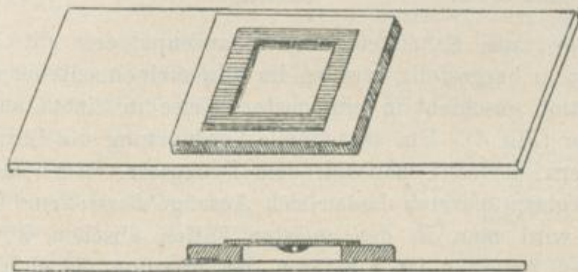


Fig. 2. Feuchte Kammer, angefeuchteter Papprahmen mit aufgelegtem Deckgläschen und Hängetropfen.

träger gebracht und untersucht. Es läßt sich ferner der Hängetropfen in der feuchten Kammer benutzen, die man seit langer Zeit zur Dauerbeobachtung und zur Kultur von Mikroorganismen gebraucht (Fig. 2). Aus einem rechtwinkligen Stückchen Pappe, das so dick, doch nicht ganz so breit wie der Objektträger ist und etwa 3–6 cm lang sein kann, schneidet man ein Fenster aus, dessen lichte Weite etwas geringer als die Größe des Deckglases ist. Den Papprahmen läßt man in Wasser vollsaugen, wischt ihn oberflächlich ab und legt ihn feucht auf den Objektträger. Das Deckglas, das den Reagentstropfen mit den Schnitten enthält, wird mit dem Tropfen nach unten (Hängetropfen) auf den Papprahmen aufgelegt. Feuchtet man den Rahmen durch seitlichen Zusatz von etwas Wasser abends an, so bleibt der Tropfen, ohne zu verdunsten, über Nacht erhalten. Die Beobachtung kann direkt geschehen oder man bringt das Deckglas hierzu auf einen anderen Objektträger. Der Hängetropfen läßt sich ebenfalls auf einem Objektträger anbringen. Das einfachste ist schließlich, für derartige Zwecke einen Objektträger zu führen, auf dem ein 1,5 mm hoher und genügend

weiter Glasring aufgekittet ist (hierzu können die für die Differentialdiagnose der ätherischen Öle angegebenen Objektträger benutzt werden, s. d., sowie die im Handel befindlichen „feuchten Kammern“, Fig. 3). Vielfach läßt sich die Reaktion auf einem Deckgläschen ausführen. Das Deckgläschen mit dem Präparate wird zur Dauerbeobachtung auf einen ausgehöhlten Objektträger gelegt, den man um die Aushöhlung etwas eingefettet hat. Nicht zu empfehlen ist jedoch ein Aufheben

der Präparate in der gebräuchlichen Weise unter einer großen Glasglocke, deren Unterlage feucht gehalten wird.

Man versäume nicht, diese Präparate genau zu signieren, sei es mit Fettstift, mit chinesischer Tusche oder mit Papieretiketten.



Fig. 3. Feuchte Kammer mit aufgekitteter Zelle. Grübler & Co, Leipzig.
10 Stück = 3 M.

Auszüge, aus Schnitten oder Pflanzenpulvern mit geeigneten Lösungsmitteln hergestellt, werden im allgemeinen seltener untersucht. Die Extraktion geschieht in einfachster Weise in einem ausgehöhlten Objektträger (Fig. 4). Um zu schnelle Verdunstung des Lösungsmittels zu verhindern, bedeckt man mit dem Deckglase. Auch mit gewöhnlichen Deckglaspräparaten lassen sich Auszüge herstellen. Von einem **Filtrieren** wird man in den meisten Fällen absehen können. Bei quantitativen Arbeiten ist Filtrieren der Auszüge jedoch unerlässlich.

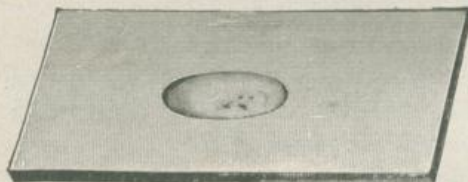


Fig. 4. Ausgehöhlter Objektträger zum Ausziehen von Schnitten und Pulvern, auch als feuchte Kammer zu benutzen. Grübler & Co., Leipzig.
10 Stück = 1,20 M.

Meist wird eine Saugfiltriervorrichtung benutzt, welche aus einer kleinen Glasglocke besteht, die oben 2 Öffnungen besitzt und auf einer Glasplatte ruht. Die eine Öffnung faßt die Filtrierkapillare, welche oben zur Aufnahme des (anzufettenden) Filterchens trichterförmig erweitert ist und unten am Abfluß schräg

ausläuft. Durch die zweite Öffnung führt ein Glasrohr zur Wasserstrahlpumpe. Das Filtrat wird in kleine Reagenzgläschen, Schälchen oder in ausgehöhlte Objektträger aufgefangen.

Mit dieser Saugpumpe oder mit einer kleinen, ebenso ausgerüsteten Woulschen Flasche läßt sich Filtration und Extraktion in bequemer Weise verbinden, wie es Grutterink¹⁾ ausführt. In den

¹⁾ A. Grutterink, Beiträge zur mikrochemischen Analyse, Dissertation, Rotterdam 1910, S. 34.

Trichter kommt ein Wattepfropfen, darauf die zu extrahierende Substanz, die mit dem Lösungsmittel übergossen wird. Hierbei kann als Trichter ein kleines, spitz auslaufendes Glasröhrchen dienen; der untere Teil der Woulfischen Flasche wird zur besseren Aufnahme der Filtriergefäße (Reagenzgläser, Schälchen) mit Watte oder Sand angefüllt (Fig. 5). — Ein Mikrofilter (feines Glasrohr mit hartem Filtrierpapier) hat für mikroskopische Wasseruntersuchungen Dibdin¹⁾ angegeben.

Die erhaltenen Auszüge werden in sehr dünner Schicht ausgebreitet und an den Rand mit Hilfe der Platinöse ein kleines Partikelchen des Reagens in fester Form gebracht (Behrens). Das Reagens löst sich und kommt in verschiedenen Konzentrationen mit der zu prüfenden Lösung zusammen. Wendet man Reagenslösungen an, so bringt man einen kleinen Tropfen dieser neben den Auszug und zieht mit der Nadel einen kleinen Verbindungsfaden zwischen beiden Tropfen. Haupterfordernis ist stets: Arbeiten mit sehr dünnen Flüssigkeitsschichten (flachen Tropfen).

Abschleppen ersetzt bei unseren Untersuchungen, vorzüglich bei der Extraktion auf dem Objektträger, vollkommen das Filtrieren. Wird die Extraktion im ausgehöhlten Objektträger vorgenommen, so hat man nach vollzogener Extraktion nur die Schnitte oder die Pulverpartikelchen mit der Nadel oder einer Platinöse herauszunehmen. Bei der Extraktion unter Deckglas hebt man das Deckglas an einer Kante und stellt es auf der anderen senkrecht auf. Dadurch sammelt sich der Auszug etwas an und läßt sich durch geeignetes Nachhelfen mit der Nadel an eine andere (reine) Stelle

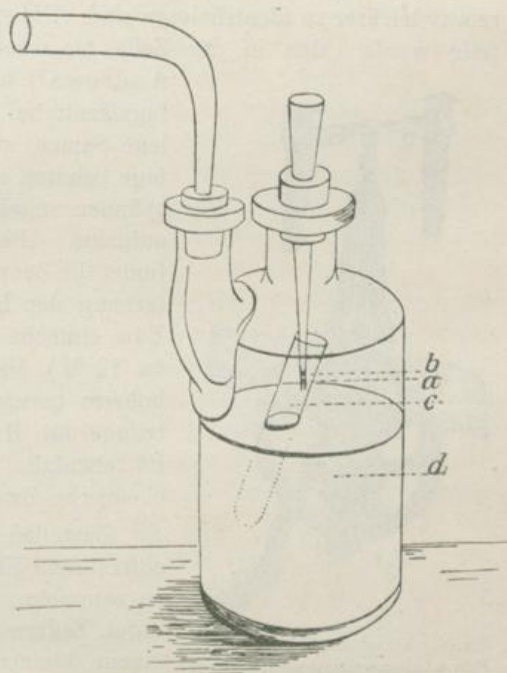


Fig. 5. Extraktionsapparat in $\frac{2}{3}$ der natürlichen Größe (nach Grutterink).

a Wattepfropfen; b zu extrahierende Substanz;
c mikrochemisches Reagenzrohr (absichtlich schief gestellt, damit der Tropfen die Wand berührt und beim Saugen nicht verspritzt); d Sand, Watte.

¹⁾ W. J. Dibdin, The Analyst, 1896, XXI, Nr. 238.

des Objektträgers befördern. In ähnlicher Weise dient das Abschleppen zur Trennung von Niederschlag und Lösung.

Die **Zentrifugalkraft** ist bisher bei mikrochemischen Untersuchungen der Pflanzen noch wenig herangezogen worden. Doch unterliegt es keinem Zweifel, daß beim Nachweis kleinster Substanzmengen in der Zelle ein Zentrifugieren der Objekte vor der Präparation von Vorteil sein wird, da die zusammengeschleuderten Massen relativ leichter zu identifizieren sind. Die spezifisch schwersten Bestandteile werden sich in der Zelle am zentrifugalen Ende ansammeln.

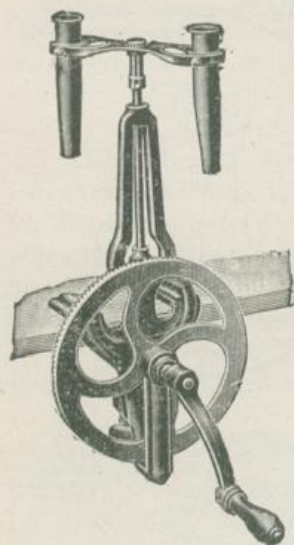


Fig. 6. Kurbel-Zentrifuge d. Ver.
Fabr. f. Laboratoriumsbedarf, Berlin N.
(Preis 13,50 M.)

Andrews¹⁾ hat die Wirkung der Zentrifugalkraft bei einigen Objekten (angequollene Samen) studiert und eine Milchzentrifuge benutzt, an deren Scheibe ein Messingzylinder angebracht war, der die Objekte aufnahm. Bei bakteriologischen Studien findet die Zentrifuge oft Verwendung (Kernfärbung der Bakterien [s. d.], A. Meyer). Eine einfache und billige Zentrifuge (Preis ca. 12 M.), die auf dem Prinzip des Trillbohrers beruht, empfahl Cori²⁾. Die Zentrifuge für Handbetrieb von H. Behrens ist ebenfalls geeignet³⁾ und für mikrochemische Zwecke zu empfehlen (Fig. 6).

Zuweilen kann es nötig sein, selten auftretende Elemente aus Pflanzenpulvern zu sammeln. Die Anreicherung geschieht durch **Sedimentieren**. Das Pulver wird in einem kleinen (weithalsigen) Präparatenglase mit Wasser durchgeschüttelt. Das Gemisch läßt man genügend lange absetzen. Sehr leichte Elemente schwimmen als Schaum an der Oberfläche und können mit einem gebogenen Spatel abgehoben werden, die schweren sind im Bodensatz, den man entweder mit einem Glas-

¹⁾ F. M. Andrews, Die Wirkung der Zentrifugalkraft auf Pflanzen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1903, XXXVIII, S. 1.

²⁾ C. J. Cori, Über die Verwendung der Zentrifuge in der zoologischen Technik und Beschreibung einer einfachen Zentrifuge, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1895, XII, S. 303.

³⁾ Ver. Fabr. f. Laboratoriumsbedarf, Berlin N, Scharnhorststr. liefern diese Kurbel-Zentrifuge für 13,50 M. und eine kleine Turbinen-Zentrifuge für Wasserbetrieb, die in der Minute bis zu 8000 Touren leistet, zu 15 M.

rohr abhebt oder durch Dekantieren gewinnt. Kleine Spitzgläschen sind recht geeignet zum Sedimentieren. Wenn erforderlich und zugänglich, wird die Stärke zuvor durch Kochen mit verdünnter Salzsäure verzuckert. Hartwich¹⁾ hat einen kleinen Sedimentierapparat konstruiert, der im wesentlichen aus 2—3 gut ineinanderpassenden, sich allmählich verjüngenden Glasröhrchen besteht. Die Röhrchen werden ineinandergeschoben, das mit Wasser oder einem anderen Medium angeschüttelte Pulver eingefüllt und der Apparat in ein kleines Becherglas gestellt. Nach dem Absetzen finden sich in den einzelnen Schichten der Flüssigkeitssäule die verschiedenen Elemente. Jedes Rohr wird einzeln mit seinem Inhalt abgehoben. Bei dem Absetzen spielt die Größe der Elemente eine erhebliche Rolle, feinkörnige Stärke erscheint in den oberen Schichten, grobkörnige in den tieferen Schichten, ebenso die Oxalatkristalle. Der Hartwichtsche Apparat ist recht empfehlenswert und sehr preiswert (1,75 Fr.) zu beziehen von Niggli & Co., Zürich III, Zollstraße 44.

Als **direkte Kristallisationsmethode** wollen wir die Methode bezeichnen, bei der unter Deckglas der betreffende Körper aus Schnitten oder aus Pulvern mit einem geeigneten Medium gelöst wird und sich bei teilweiser oder gänzlicher Verdunstung des Lösungsmediums in kristallinischer Form abscheidet. Da die Kristalle in vielen Fällen zumeist am Deckglasrande entstehen, so sind Identitätsreaktionen bequem auszuführen und die Methode kann an Stelle der Extraktion treten. Das Verfahren, das noch viel zu wenig benutzt wird, wurde von Molisch wiederholt herangezogen, so beim Nachweis von Aloin, der Anthocyane und der Algenfarbstoffe, von Borodin beim Dulzitinachweis und leistete mir beim Nachweis von Sorbit, Methysticin, Hydrastin, Agaricinsäure, Juglon u. a. gute Dienste. Als Lösungs- und Kristallisationsmedien kommen nicht nur Wasser und Alkohol, sondern auch Äther, Azeton, Chloroform, Chloralhydrat u. a. in Betracht.

Als **Abziehmethode** sei an dieser Stelle ein Verfahren bezeichnet, das sich zum Nachweis von an der Oberfläche eines Objektes befindlichen Substanzen benutzen läßt. Es kann bei aufgefärbten Gegenständen zur schnellen Ermittlung des benutzten Farbstoffes dienen. Wie mir einige noch nicht abgeschlossene Versuche zeigen, verdient die Methode weitere Erprobung. Streicht man nämlich Kollodium auf einen Objektträger und hebt es nach dem Erstarren ab, dann erhält man ein vollkommen durchsichtiges Häutchen, falls der Objektträger trocken war. An den Stellen, an denen der Objektträger Spuren von Feuchtig-

¹⁾ C. Hartwich, Die Sedimentiermethode, Schw. Wchschr. f. Ch. u. Ph., 1907, XLV, S. 544.

keit enthielt, ist das Kollodiumhäutchen trübe. Buscalioni und Pollacci¹⁾ haben diese Eigentümlichkeit zur Ermittlung der Transpiration der Blätter an Stelle der Stahlschen Kobaltmethode benutzt. Diese Kollodiumhäute geben nun die feinsten Skulpturen der Epidermen wieder, erscheinen bei mikroskopischer Betrachtung wie die besten Flächenschnitte. Man wird die Kollodiummethode überall dort anwenden können, wo sich Flächenschnitte schwer herstellen lassen oder aus Schonung des Materials unterbleiben müssen. Jost²⁾ hat sie bei fossilen Pflanzen ausprobiert, und bei verschiedenen Harzen gab sie ebenfalls schöne Resultate. Auch Abdrücke von Diatomeenschalen hat man mit Kollodium hergestellt³⁾.

Es ist nun ersichtlich, daß das Kollodiumhäutchen alle die der Oberfläche eines Objektes aufgetragenen Stoffe aufnehmen wird, sofern diese im Kollodium löslich sind. Hierzu gehören die in Äther löslichen Körper. Wo Kollodium versagt, muß zu einem anderen hautbildenden Lösungsmittel gegriffen werden. So hat Lagerheim⁴⁾ künstliche Färbungen an Kaffeebohnen ermittelt, indem er die Bohnen in eine sirupdicke Lösung von farblosem Zelluloid in Azeton brachte und diese eintrocknen ließ. Die eingetrocknete Haut nimmt die Farbstoffe auf, wird abgezogen und auf dem Objektträger weiter untersucht. Wir trennen mit der Abziehmethode die an der Oberfläche befindlichen Substanzen auf leichte Weise ab und erhalten sie in möglichster Reinheit, wodurch die weitere Diagnose wesentlich erleichtert wird.

Das **Trocknen** von Sublimaten, Niederschlägen, von mit Säuredämpfen behandelten Schnitten u. a. kann in dem bekannten Exsikkator geschehen. Als Ersatz eignen sich genügend große, weithalsige Präparatengläser mit eingeschliffenen Glasstöpseln, auf deren Boden Schwefelsäure oder Chlorkalzium kommt. Eingestellt wird ein leeres Glas zur Aufnahme der Objektträger. Oft dauert hierbei das Trocknen längere Zeit. Schneller kam ich zum Ziel bei Benutzung eines Objektträgers mit aufge kittetem Glasring als Mikroexsikkator. In die Fassung kommt Schwefelsäure oder Chlorkalzium, der abgeschliffene Rand des Glasringes wird etwas eingefettet, und das Deckglas oder der Objektträger mit dem Niederschlag oder dem Sublimate nach unten wird auf-

¹⁾ L. Buscalioni e G. Pollacci, L'applicazione delle pellicole di collodio allo studio di alcuni processi fisiologici nelle piante ed in particolar modo alla traspirazione, Atti del istituto botanico Pavia, 1902, VII, S. 1.

²⁾ L. Jost, Bot. Ztg., 1902, LX2, S. 266.

³⁾ L. Flögel, Arch. f. mikr. Anat., VI, S. 489.

⁴⁾ G. Lagerheim, Färgardt kaffe och dess undersökning, Svensk Farm. Tidskrift, 1905, Nr. 12.

gelegt. v. d. Kolk¹⁾ benutzt bei kleinsten Mengen einen ausgehöhlten Objektträger, in dessen Höhlung ein Tropfen Säure kommt. Das Deckglas mit der Substanz wird als Hängepräparat aufgelegt. Hierbei muß man bei Schnitten sehr vorsichtig verfahren, um einen Übertritt der Säure zu vermeiden.

Kristallbildung²⁾, die wir bei unseren Reaktionen in erster Linie anstreben, wird als Kriterium für die Reinheit der Körper angesehen, vorzüglich, wenn die gleichen Kristalle beim Umkristallisieren entstehen. Bekanntlich gibt es aber Mischkristalle. Es erscheint fraglich, ob bei Sphärokristallen stets einheitliche Körper vorliegen. Bei mikrochemischen Reaktionen, die direkt mit den Präparaten ausgeführt werden, kann Bildung von Mischkristallen sehr leicht erfolgen. Bemerkenswert ist die Feststellung, daß die Amyrine und das Lupeol, die in den Pflanzen sehr verbreitet sind und wahrscheinlich als Ester der Zimt- und Essigsäure vorkommen, in Mischkristallen auftreten, die trotz 3 bis 8 maligem Umkristallisieren mikroskopisch einheitliche Bilder liefern³⁾.

Es ist somit erforderlich, mit den erhaltenen Kristallen möglichst zahlreiche **Identitätsreaktionen** anzustellen. Es kommen nicht nur weitere chemische Umsetzungen, sondern auch Lösungsverhältnisse und Farbenreaktionen in Betracht. Bei Lösungen wird man nicht stets die gleichen Befunde, die die Chemie angibt, erhalten. Wir müssen berücksichtigen, daß minime Mengen vorliegen, welche sich bei Anwendung von relativ großen Quantitäten des Lösungsmittels mehr oder weniger lösen können, trotzdem der betreffende Körper makrochemisch als unlöslich bezeichnet wird. So gelingt es bei wiederholtem kräftigem Durchsaugen von Wasser, kleinere Kalziumsulfatkristalle in Lösung zu bringen. Beim Arbeiten mit Geweben dürfen wir außerdem nicht vergessen, daß in den Schnitten andere, uns unbekannte Stoffe zugegen sein können, welche die Lösungsverhältnisse beeinflussen, die Lösungen beschleunigen oder verhindern. Farbenreaktionen bei Kristallen sind recht brauchbar, dienen zwar als Hilfsreaktionen, können aber sogar ausschlaggebend werden.

Den **Kontroll- und Parallelreaktionen** kommt eine sehr große Bedeutung zu. Verschiedentlich ist, und nicht ohne Berechtigung, ein-

¹⁾ L. C. Schroeder v. d. Kolk, Beiträge zur Kenntnis der Mischkristalle von Salmiak und Eisenchlorid, Ztschr. f. phys. Chem., XI, S. 172.

²⁾ Durch Benutzung von geätzten Objektträgern läßt sich die Kristallisation nicht befördern; zudem sind geätzte Objektträger schwieriger zu reinigen.

³⁾ J. E. Quintus Bosz und N. H. Cohen, Über das sogenannte Chiclegummi, Arch. d. Pharm., 1912, CCL, S. 52.

gewendet worden, daß viele mikrochemische Reaktionen nicht eindeutig sind. Insbesondere gilt dieses für die Farbenreaktionen. Wenn wir beispielsweise mit Schwefelsäure eine Rotfärbung im Gewebe erhalten, so besagt die Reaktion sehr wenig, denn bei Gegenwart von Zucker und Eiweiß erhält man bekanntlich eine Rotfärbung (Raspailsche Reaktion), ebenso bei Gegenwart von Eisen und Gerbstoffen, Fetten u. a. Tritt die Färbung aber auch an gut gewässerten oder selbst an ausgekochten Schnitten ein, dann ist die Farbenreaktion als brauchbare Hilfsreaktion anzusprechen, die sogar bei späteren Untersuchungen und bei weiterer makrochemischer Erforschung des Objektes wegleitend werden kann. Man hat daher seit Errera (s. Alkaloide) sogenannte — Schnitte zur Kontrolle herangezogen. Als — Schnitte bezeichnen wir Schnitte, denen die betreffenden Körper in geeigneter Weise entzogen worden sind (Alkaloide durch Weinsäure-Alkohol, Zucker durch Wasser). Es werden — Schnitte und + Schnitte mit den gleichen Reagenzien behandelt und miteinander verglichen.

Kontrollreaktionen sind ferner mit den Reagentien selbst anzustellen, indem man einen Tropfen der benutzten Lösung auf dem Objektträger eindunsten läßt und den Rückstand durchmustert.

Parallelreaktionen mit chemisch reinen Substanzen müssen, wenn irgend möglich, alle mit dem Pflanzenmaterial erhaltenen Befunde ergänzen. Eigentlich sollten derartige Untersuchungen stets vorausgehen. Leider ist aber nur ein kleiner Teil der Pflanzenstoffe isoliert und genügend gut erforscht. Relativ gering ist die Zahl der isolierten Substanzen, die im Handel zu haben sind, bei denen es überdies noch oft fraglich ist, ob chemisch einheitliche Individuen vorliegen. So ergibt sich denn die Notwendigkeit, bei Pflanzen, deren Chemie noch unbekannt ist, den die Reaktionen bedingenden Körper selbst zu isolieren. Hierbei wird es nicht einmal auf die absolute Reinheit des isolierten Körpers ankommen, so sehr dieselbe erwünscht sein mag, denn im Gewebe treten organische Verbindungen meist nicht in reiner Form in Reaktion; und über die Form, in der die Pflanzenstoffe nativ vorkommen, sind wir nur sehr mangelhaft unterrichtet. Im allgemeinen wird sich die Mikrochemie nach dem Stande der Phytochemie richten müssen.

Die Bestimmung der Farben, die bei Farbenreaktionen und Lösungen entstehen, ist ganz vernachlässigt. Zur genauen Feststellung dienen Farbentafeln. Da viele der in der Literatur erwähnten Farbentafeln nicht mehr im Handel zu haben sind, so ist nach Möllers¹⁾

¹⁾ H. J. Möller, Internationale Farbenbestimmungen, Ber. d. pharm. Ges., 1910, XX, S. 358.

Ausführungen der Code des Couleurs von Klincksieck und Valette zu empfehlen. Das Werk ist im Verlage von Léon Lhomme, Paris, rue Corneille zu 11 M. erhältlich und enthält auf 24 Tafeln je 30 Farbtöne, zusammen also 720 Farbenangaben.

Beim **Reinigen** verschmutzter Objektträger und Deckgläser vermeide man Kratzen und Schaben mit scharfen Instrumenten. Dadurch entstehen Schrammen, die später beim Mikroskopieren stören. Bei Balsam- und Gelatinepräparaten wird das Deckglas durch gelindes Erwärmen abgehoben. Zum Reinigen wird vielfach Schwefelsäure, sowie Chromatschwefelsäure benutzt¹⁾ (10 % wässrige Kaliumdichromatlösung mit 10 g Schwefelsäure versetzt). Erwärmen in der Lösung beschleunigt den Reinigungsprozeß. Fette und fettige Harzschmierer reibe ich mit Zeitungspapier ab. Zur Beseitigung teerartiger Sublimationsprodukte sind Säuren nicht geeignet, hingegen leistet mir Abreiben mit konzentrierter Kalilauge die besten Dienste, event. wird mit einem Streichholz etwas nachgeholfen. Millons Reagens wird durch verdünnte Salpetersäure entfernt. Allgemein gültige Vorschriften lassen sich natürlich nicht geben.

Die Mikrosublimation.

In neuester Zeit hat sich die Mikrosublimation als ein brauchbares Hilfsmittel auf unserem Gebiete bewährt. Lokalisationsermittlungen sind mit Hilfe der Sublimation naturgemäß nicht möglich oder doch nur in jenen Fällen ausführbar, in denen eine mechanische Trennung einzelner Gewebeschichten gelingt.

Wir können die Sublimationsmethoden mit Rücksicht auf ihre Ausführung in vier Gruppen zusammenfassen²⁾:

1. Erhitzen der freiliegenden Substanz bis zur Dampfentwicklung, Auffangen der Dämpfe durch in der Hand bereit gehaltene Objektträger.
2. Sublimation im sogenannten geschlossenen Raum.
3. Sublimation zwischen zwei Objektträgern oder zwei Glasplatten.
4. Sublimation im luftleeren und luftverdünnten Raum.

Die Mikrosublimation wurde eingeführt von A. Helwig³⁾, der sie für toxiologische Untersuchungen (Nachweis der Alkaloide und anderer Gifte) empfahl. Die Methode wurde nachgeprüft von Guy⁴⁾. Ersterer sublimierte zuerst auf einer

¹⁾ Zettnow, Reinigen verschmutzter Objektträger und Deckgläser, Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk., 1894, XV, S. 555.

²⁾ O. Tunmann, Vergleich. Unters. über die Mikrosublimationsmethoden, Apoth.-Ztg., 1912, XXVII, S. 494.

³⁾ A. Helwig, Die Sublimation der Alkaloide und ihre mikroskopische Verwertung für die differentielle Diagnose derselben, Ztschr. f. analyt. Chem., 1864, III, S. 43.

⁴⁾ W. A. Guy, On the melting and subliming temperatures of the principal poisons organic and anorganic, Pharm. Journ. and Trans., 1867, 2 ser. IX, S. 370.

Glasplatte, später auf Platinblech, legte um die Substanz 4 Glasleisten und auf diese eine Glasplatte zum Auffangen des Sublimats. Guy verfährt ähnlich, benutzt aber als Unterlage eine Porzellanplatte und nimmt die Sublimation zur Vermeidung höherer Temperaturen auf dem Wasserbade vor. Beide sublimieren im sogenannten geschlossenen Raum. Infolge unberechtigter Kritik kam das Verfahren in Vergessenheit. Erst Behrens¹⁾ zog es wieder hervor. Er gebraucht die Sublimation hauptsächlich zur chemischen Charakteristik einiger Alkaloide, dann auch zur Trennung schwer flüchtiger Kohlenwasserstoffe, Phenole und aliphatischer Karbonsäuren. Benutzt wird die Objektträgermethode. Zwei Objektträger werden aufeinander gelegt und an einem Ende durch einen kleinen eingeschalteten Glasscherben (Bruchstück eines Objektträgers) auseinander gehalten. In die eine Ecke des unteren Objektträgers kommt die zu sublimierende Substanz. Da Behrens die Körper erst aus dem Pflanzenpulver isolierte, so waren mit der Sublimation nur geringe Vorteile gegeben, denn mit den Auszügen lassen sich die meisten Reaktionen direkt ausführen. Allerdings war mit der Sublimation eine weitgehende Reinigung verbunden. In ähnlicher Weise wird auch jetzt noch in der Chemie gearbeitet, nur vermeidet man den reichlichen Bruch und „erhitzt



Fig. 7. Anordnung der Sublimationsvorrichtung nach Nestler.

ebenfalls in der Ecke des Objektträgers; sobald lebhaftere Verdampfung einsetzt, wird von der Flamme weggezogen und rasch unter einen kalten Objektträger gebracht, den man in der anderen Hand bereit hält“. (Emich, Mikrochemie 1911, S. 20).

Die Mikrosublimation gewann erst allgemeines Interesse, als Nestler 1901 die Xanthinbasen durch direkte Sublimation aus Pflanzenteilen gewann. Die Sublimation wurde im sog. geschlossenen Raum ausgeführt. Anfangs wurde zwischen 2 aufeinander gelegten Uhrgläsern sublimiert, so daß im Zentrum die Höhe des Sublimationsraumes 1,4 cm betrug. Auf das untere Uhrglas kam die Substanz, dann wurde das andere Uhrglas aufgelegt und mit einer vom unteren Uhrglase 7 cm entfernten Mikroflamme erhitzt. Die Untersuchung des Sublimats in dem Uhrglase unter dem Mikroskop war natürlich umständlich und daher wurde das obere Deckglas später von Nestler durch eine Glasplatte ersetzt. Die Höhe des Sublimationsraumes beträgt jetzt 7 mm, außerdem kam auf die Mitte der Glasplatte ein Wassertropfen zur Kühlung, im übrigen blieb die Anordnung die gleiche (Fig. 7). Die Flamme steht direkt unter dem Uhrglase; die Sublimation beansprucht einige Zeit, eine Temperatur von 80—100° wird in einer halben Stunde erreicht. Höhere Temperaturen verursachen Springen der Gläser. Nestler sublimierte derart Xanthinbasen, Kumarin, Vanillin, Benzoessäure und für leicht flüchtige Substanzen ist das Verfahren recht

¹⁾ H. Behrens, Anleitung zur mikr. Analyse, 1895—1900, 3. Heft.

geeignet. Diese Methode wurde später von Mitlacher beim Nachweis der Oxymethylanthrachinone sowie von anderen Autoren benutzt.

Um höhere Temperaturen zu erzielen, sublimiert Behrens ebenfalls im geschlossenen Raum in nachstehender Weise: Die Substanz wird auf ein Glimmerplättchen gebracht und ein zuvor ausgeglüht und gepreßter Asbestring aufgelegt (1 mm stark, 8–10 mm lichte Weite). Auf den Asbestring kommt ein Objektträger und das Ganze wird auf einen kleinen Drahring gestellt. Derart lassen sich größere Flammen, selbst Gebläse zur Erhitzung benutzen, und man kann Bleichlorid, selbst Natrium- und Kaliumsulfat zur Sublimation bringen. Da aber der Objektträger bei höherer Temperatur leicht in der Mitte springt, so ist es ratsam, entweder den Ring in eine Asbestplatte von der Gestalt des Objektträgers anzubringen oder das Sublimat auf Deckgläser aufzufangen. Die Behrensschen Methoden wurden vorzugsweise von den holländischen Forschern benutzt, auf unserem Gebiete besonders von Weevers, der bei der Sublimation alkoholischer Lösungen, die bekanntlich gern breit laufen, das Wijsmannsche kupferne Täfelchen gebrauchte (s. Brenzkatechin).

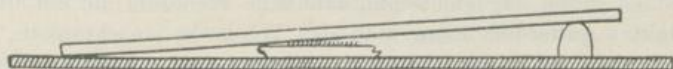


Fig. 8. Mikrosublimation auf der Asbestplatte nach Tunmann.

Die Sublimation auf der Asbestplatte wurde mit Erfolg von Tunmann benutzt. Die Anordnung geht aus Fig. 8 hervor. Auf eine genügend große Asbestplatte (12×12 cm) von 2 mm Dicke kommt ein kleines Stückchen eines Objektträgers zu liegen (etwa der vierte Teil eines solchen), größere Glasstücke springen bei höheren Temperaturen leicht. Auf das Glasplättchen kommt die zu untersuchende Substanz. Ungefähr 2–3 cm davon entfernt liegt auf der Asbestplatte ein kleines Holzstäbchen von 3–4 mm Höhe und 6–8 cm Länge. Nun wird der Objektträger derart über die Substanz aufgelegt, daß er mit dem einen Ende auf der Asbestplatte selbst, mit dem anderen auf dem Holzstäbchen ruht. Es ist vorteilhaft, daß der aufgelegte Objektträger (Rezipient) das untere Glasstückchen nicht berührt. Die Höhe des Sublimationsraumes ist bei dieser Anordnung 0,5–1,5 mm. Die Asbestplatte ruht auf einem starken Eisenring, den ich an das Stativ der kleinen Stativlupe von Seibert angeschraubt habe. Dadurch stört der Apparat auf dem Mikroskopierteisch nicht. Als Flamme wird eine Spirituslampe benutzt, deren Spitze die Unterseite der Asbestplatte erreicht, und die je nach Bedarf 2–5 cm hoch gehalten wird. Selbstverständlich wird man beim Suchen nach flüchtigen Substanzen zuerst mit kleiner Flamme arbeiten. Die Rezipienten werden nach Beginn der Erhitzung alle Minuten gewechselt. Während man mit der rechten Hand den einen abhebt, wird der in der linken Hand bereit gehaltene

aufgelegt. Das Wechseln kann sehr schnell ausgeführt werden und ist recht handlich, insbesondere wird das Auflegen wesentlich durch die Länge des Holzstäbchens erleichtert. Anfangs ging ich von der in der Literatur vertretenen Anschauung aus, daß das Wechseln der Rezipienten nur zwecks Auffangen mehrerer Sublimate zu geschehen habe. Diese Ansicht erwies sich indessen als irrig. Sublimiert man beispielsweise Rheumpulver ohne Wechselung der Rezipienten einige Minuten, dann entweichen die Sublimationsdämpfe an beiden Seiten. Das Entweichen der Gase erfolgt bei lebhafter Sublimation selbst bei Kühlung des Rezipienten durch aufgetragene Wassertropfen. Der Sublimationsraum ist in solchen Fällen mit Dämpfen in kurzer Zeit völlig erfüllt, die Dämpfe können sich nicht genügend schnell niederschlagen und entweichen seitwärts. Das Entweichen der Gase wird also ebenfalls durch zu reichliche Gasentwicklung veranlaßt. Ein geringer Verlust an Material erfolgt allerdings beim Wechseln der Rezipienten. Dieser wird jedoch durch das leichte und handliche Wechseln auf ein Minimum beschränkt. Außerdem kann man das Wechseln einschränken, indem man das Stäbchen beim Beginn der Sublimation möglichst nahe an die Glasplatte bringt, so daß der Rezipient ebenfalls entsprechend weit nach links zu liegen kommt und nun während der Sublimation Holzstab und Rezipient langsam nach rechts schiebt. Auf diese Weise erhält man ein strichförmig ausgezogenes Sublimat. Doch ist das Wechseln vorzuziehen.

Die abgehobenen Rezipienten kommen mit den Sublimaten nach unten auf ein Gestell; vornehmlich für die ersten Sublimate, welche leicht flüchtige Stoffe enthalten, ist dies angebracht. Von den späteren Sublimaten kann man das eine sofort auf den (kalten) Objektisch des Mikroskopes bringen und die durch schnelle Abkühlung hervorgerufenen Erscheinungen beobachten. Die Sublimate werden sofort, am nächsten Tage und nach einer Woche untersucht: für die ersten ist baldige mikroskopische Durchmusterung Bedingung, da sich feine Beschläge verschiedener Substanzen schon bei Zimmertemperatur nach einigen Stunden verflüchtigen. Die Beschläge sind genau zu durchmustern. Während beim Auskristallisieren aus Flüssigkeiten Zerrformen und Kristallskelette oft am Rande entstehen, finden wir in den Sublimaten gerade die schönsten Kristalle am Rande und Zerrformen in den zentralen Partien, in denen überdies die Kristalle zuweilen so stark gehäuft sind, daß ihre Formen schwer zu erkennen sind. Versuche, geätzte Objektträger zum Auffangen der Sublimate zu verwenden, um derart die Kristallisation zu befördern, bringen keinen Nutzen (s. auch S. 21, 2).

Bei der Sublimation von Pflanzenpulvern (nicht bei Schnitten) können, da der Sublimationsraum sehr niedrig ist, leicht Pflanzen-

teilchen mitgerissen werden, die zu Täuschungen dem Ungeübten Anlaß geben. Es sind meist Membranstücke epidermaler Zellen und von mechanischen Elementen, also doppelbrechende Elemente. Diese Mißstände lassen sich umgehen, wenn man die Pulver mit einem Tropfen Wasser auf der Glasplatte zu einem dicken Brei verrührt (Tunmann, Gehe's Ber. 1911). Alsdann müssen beim Beginn der Sublimation die Rezipienten allerdings öfters gewechselt werden, da die ersten Sublimate naturgemäß größere Flüssigkeitsmengen enthalten. Wir verbinden hierbei die Mikrosublimation mit einer Mikrodestillation. Des weiteren wird man mit einem durchfeuchteten Pflanzenpulver zuweilen bessere Resultate erhalten wie mit einem trockenen. In solchen Fällen müssen wir annehmen, daß die Zellmembranen durch das Durchfeuchten permeabler für die entweichenden Gase geworden sind, oder daß die sublimierenden Körper durch das warme Wasser zuvor in Lösung gingen und in gelöster Form leichter sublimieren. Bei der Objektträgersublimation muß an einem zugfreien Platze gearbeitet werden. Fensterplätze sind aber häufig dem Luftzug mehr oder weniger ausgesetzt. Ein Luftzug verrät sich schon an der Flamme. Darauf hat vornehmlich der Anfänger zu achten. Um in solchen Fällen ein Entweichen der Dämpfe zu verhindern, kann man zwei Objektträger nebeneinander auflegen (die Länge des Holzstäbchens gestattet dies) oder man stellt einen Pappdeckel vor dem Apparat auf, wodurch die Flamme gleichmäßig wirken wird. Ein vorgestellter Pappdeckel von 20 cm Höhe und 10 cm Breite gestattet in allen Fällen die Wahrnehmung der geringsten Dampfbildung und selbst sehr schwache Gerüche lassen sich deutlich ermitteln.

Die Vorteile des eingehend geschilderten Verfahrens sind vorzüglich folgende: Der Apparat hat eine stabile Lage, gestattet die Anwendung von Temperaturen bis zu 300° (höhere wurden nicht erprobt), ohne daß Verluste durch Bruch zu beklagen sind, sowie ein leichtes und schnelles Wechseln der Objektträger. Durch die Heranziehung höherer Temperaturen wird die Sublimationsdauer auf fünf Minuten herabgesetzt; auch sind weit mehr Erfolge zu erzielen. Die Methode liefert übereinstimmende Resultate; 1910 haben im Tschirchschen Institut sämtliche Praktikanten ohne weiteres die gleichen Befunde erzielt. Weitere Prüfungen zeigten, daß, bis jetzt wenigstens, in keinem Falle mit anderen Methoden, die zudem komplizierter sind, bessere Resultate erreicht werden. Die einfache Apparatur gestattet die Ausführung der Sublimation neben dem Mikroskop, ein Umstand, der für den Mikroskopiker von wesentlicher Bedeutung ist. Hierzu kommen als weitere nicht zu unterschätzende Vorteile, daß die Sublimate (nach Bedarf in Serien) auf den Objektträgern erhalten werden und schließlich,

daß sich der bei der Erhitzung auftretende Geruch feststellen läßt. Gerade der Geruch, den man bisher nicht beachtete, kann für die Diagnose von großer Bedeutung werden. Manche Pflanzen und Drogen lassen selbst in Mischungen ihren spezifischen Sublimationsgeruch erkennen. Nach einiger Übung lassen sich nicht unwichtige diagnostische Anhaltspunkte herausfinden.

Das geschilderte Verfahren teilt mit allen anderen Methoden den Nachteil, daß es eine genaue Feststellung der Sublimationstemperatur nicht gestattet. Der Chemiker, der mit Recht gewohnt ist, dem Schmelzpunkt und der Sublimationstemperatur großen Wert beizulegen, würde wahrscheinlich diesen Nachteil als einen großen bezeichnen, auf alle Fälle sehr überschätzen. Für die mikroskopische Praxis haben die Sublimationstemperaturen keinen oder doch nur geringen Wert. Die Sublimation verläuft bei den einzelnen Methoden unter verschiedenen Bedingungen. Aus diesem Grunde wurde die Höhe des Sublimationsraumes angegeben. Durch das relativ schnelle Steigen der Temperatur wird jedenfalls die Luft im Sublimationsraume verändert. Mehr oder weniger wird beim Erwärmen die Innenluft entweichen können, auch bei den Methoden mit sogenanntem geschlossenen Raum. Chemisch reine Substanzen liefern zum Teil kurz nach Beginn des Erhitzens schon Sublimate. In solchen Fällen schien die angewendete Temperatur nicht die Höhe erreicht zu haben, welche nach der chemischen Literatur zur Sublimation nötig wäre. Naturgemäß ließ sich das Thermometer nicht in den niedrigen Sublimationsraum einführen. Beobachtungen zeigten aber, daß gerade der niedrige Raum zur Erlangung geringer Sublimationstemperaturen beiträgt, wahrscheinlich durch die schnellere Abkühlung der Dämpfe. Jedenfalls sind bei der geringen Entfernung der aufgelegten kalten Objektträger die ersten Anfänge der Sublimate besser zu beachten als bei makrochemischen Versuchen. Auch waren bei einer Reihe von Substanzen (Kodein- und Hydrastinsalzen) Sublimate bereits sichtbar, ohne daß man, mit bloßem Auge wenigstens, ein Schmelzen der betreffenden Körper bemerkt hätte. In solchen Fällen muß die Sublimation beim Beginn des Schmelzens einsetzen. Schließlich wären die äußerst geringen Substanzmengen zu berücksichtigen, die auch sonst mikrochemische Reaktionen beeinflussen.

Um die Bestimmung der Sublimationstemperaturen einheitlicher zu gestalten, und um Fehlerquellen, welche beim Auflegen des Thermometers auf Platten unvermeidlich sind, nach Möglichkeit auszuschalten, kann man eine Asbestschachtel benutzen (Fig. 9). Man faltet aus einer genügend großen Asbestplatte (also aus einem Stück) von 2 mm Dicke durch Einritzen und Umbiegen eine kleine Schachtel, deren Höhe nur wenig die Stärke des Thermometers übertrifft. Die Schachtel wird mit dünnem Draht zunächst bis auf eine Schmalseite zugenäht, dann werden die Kanten und Ecken innen mit passenden feinen Asbeststreifen ausgelegt und schließlich wird auch die Schmalseite geschlossen. Vorversuche zeigten, daß innerhalb der kleinen Schachtel die Temperatur beim Erwärmen gleichmäßig steigt, Die Schachtel kommt auf einen Drahttring über die Spiritusflamme. An der rechten Schmalseite erhält sie eine Öffnung, durch die das Thermometer eingeschoben wird, welches an seinem oberen Ende (außen) gestützt wird. Die Schachtel

muß so hoch sein, daß das Thermometer weder oben noch unten der Innenwand der Schachtel anliegt. Auf der Oberseite erhält die Asbestschachtel eine zweite Öffnung, in die ein kleines, unten zugeschmolzenes Glasröhrchen eingelassen wird, welches nicht den Boden der Schachtel berührt und an einer Seite dicht an das Quecksilber des Thermometers grenzt. Das obere Ende des Glasröhrchens, das vorteilhaft abgeschliffen ist, steht in gleicher Höhe mit der Oberfläche der Schachtel. Das Glasrohr faßt die zu sublimierende Substanz, läßt sich leicht herausnehmen und reinigen. Man kann die Glasröhrchen umgehen und den Sublimationsraum in noch einfacherer Weise herstellen; man setzt in die Öffnung einen kleinen Glasring ein, für den man in der Schachtel selbst einen Boden aus einem Stückchen Glas bereitet, oder aber man schiebt direkt unter die Öffnung ein Stückchen Glas; in letzterem Falle käme der Sublimationsraum in die Öffnung des Deckels. Außerdem könnte man den Asbestkasten höher gestalten, wodurch das Thermometer in senkrechte Stellung käme. Die Erfolge mit diesem Apparate waren bisher zufriedenstellend. Es kommt ja für uns nicht darauf an, möglichst übereinstimmende

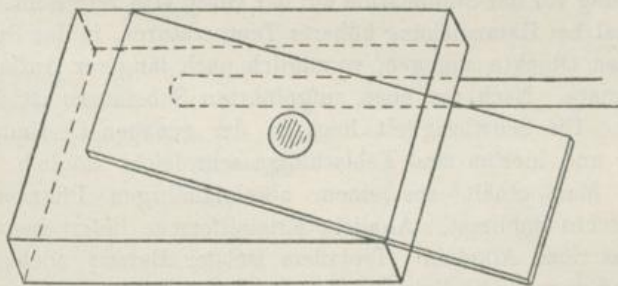


Fig. 9. Sublimation auf der Asbestschachtel zur annähernden Ermittlung der Sublimationstemperatur (Tunmann).

Resultate mit den Temperaturen der Chemie zu erhalten (diese werden bei Benutzung von Drogen und Pflanzenteilen doch kaum zu erreichen sein), als weit mehr darauf, daß verschiedene Beobachter zu übereinstimmenden Werten kommen. Dies ist von vornherein zum großen Teil durch die kleinen Dimensionen der Schachtel gegeben, welche Differenzen durch verschiedenartiges Anbringen von Substanz und Thermometer erschweren.

Die Asbestschachtel¹⁾ gestattet eine annähernde Feststellung der Sublimationstemperaturen, ohne daß dadurch die Mikrosublimation an sich umständlicher und unbequemer wird, und dies ist ein wesentlicher Vorteil. Denn die Temperaturen, selbst wenn man sie ganz genau angeben könnte, würden uns im Grunde genommen gegenwärtig nicht viel besagen. Die Temperaturen, die uns die Chemie gibt, beziehen sich doch nur auf die isolierten Körper, und zwar in möglichst reinem Zustande. Wir wissen, wie groß der Einfluß von Beimengungen und Verunreinigungen auf den Schmelzpunkt ist. Die Schmelzpunkte der nativ in den

¹⁾ Die Schachtel wird in verbesserter Form von Dr. R. Muencke, Berlin N, Luisenstr. 58, hergestellt.

Pflanzen vorkommenden Substanzen, vornehmlich der primären Glykoside, sind uns noch so gut wie unbekannt. Und in glykosidischer Bindung werden wohl mehr Alkaloide auftreten, als man im allgemeinen glaubt. Die Mikrosublimation ist indessen, selbst ohne Temperaturangaben, ein wichtiges Hilfsmittel bei der Diagnose.

Bei der Sublimation auf der Asbestplatte lassen sich sehr viele Substanzen in großer Reinheit aus den Pflanzenteilen direkt nachweisen (Gentisin, Ferulasäure, Chinasäure, Shikimisäure, Zitronensäure u. a., Fettsäuren, Arbutin-Hydrochinon, Aesculetin-Gelseminsäure, Zuckeralkohole, Rubiaglykoside, Juglone und andere Naphthalinderivate, s. auch S. 24 u. 25). Auch die Spaltlinge verschiedener Substanzen sind unter Umständen diagnostisch wertvoll; zuweilen ist es sogar angebracht, die Hydrolyse mit der Sublimation zu verbinden (Tunmann, Arbutinnachweis), indem man die Substanz mit einer Spur Salzsäure oder mit Enzymlösung vor der Sublimation auf der Glasplatte vermischt. Kristalle sind, zumal bei Heranziehung höherer Temperaturen, in den Sublimaten der meisten Objekte zugegen, vorzüglich nach längerer Aufbewahrung der Sublimate. Nach den eben aufgeführten Substanzen ist dies nicht sonderbar. Die Schwierigkeit liegt in der genauen Bestimmung der Kristalle; und hierbei sind Fehlschlüsse sehr leicht möglich. Nur ein Beispiel. Man erhält aus einem alkaloidhaltigen Pflanzenteil ein kristallinisches Sublimat. Ähnliche Kristallformen liefert bei der Sublimation das reine Alkaloid. Trotzdem ist der Beweis noch nicht erbracht, daß gerade die Kristalle des aus dem Schnitte erhaltenen Sublimates die Alkaloide darstellen, denn diese können im amorphen Zustande zugegen sein und die Reaktionen veranlassen, während die Kristalle von anderen Körpern herrühren.

Bei der Bestimmung der Kristalle sind wir in erster Linie auf die chemischen Reaktionen angewiesen. Einmal gelangen die meisten Substanzen in den Sublimaten in Nadeln und Stäbchen zur Ausscheidung, in Kristallformen, die wenig charakteristisch sind, und dann beeinflussen die Temperaturen die Kristallformen. Vorzüglich Nadeln legen sich gern aneinander und verwachsen zu bandartigen Bildungen (Fig. 10). Auch die Menge ist von Einfluß (s. Fig. b. Ferulasäure). Bei Gegenwart reichlicher Quantitäten vereinen sich Nadeln und Prismen zu Sternen, Sonnen und verwachsen baum- und strauchartig. Auf die Farbe der Kristalle ist ebenfalls nicht immer ein großes Gewicht zu legen. Sehr feine Kristalle gelber Körper (Gentisin, Rubiadinglykosid, Oxymethylanthrachinone u. a.) erscheinen zuweilen bei mikroskopischer Betrachtung farblos. Färbung und Aussehen isolierter Substanzen hängen nicht nur von der Eigenfarbe jener Körper ab, sondern auch von der Kristallform, von der zurückgehaltenen Luft u. a., so daß das

mikroskopische Aussehen einzelner Kristallindividuen meist Abweichungen aufweist.

Zur genauen Ermittlung der Sublimationstemperatur ist für chemisch-toxikologische Zwecke in Anlehnung an die Apparate von Kempf¹⁾ und Riiber²⁾ in letzter Zeit von Eder³⁾ ein neuer Apparat konstruiert und bei reinen Alkaloiden erprobt worden. Dieser gestattet Temperaturmessungen an der Stelle, wo der Körper verdampft und wo das Sublimat entsteht. Der Apparat (Jenaer Glas, zu beziehen von A. Wittmann, Zürich IV, Sonnegstr.) besteht aus 2 Rohrteilen von 2,5 cm Weite. Der kürzere, untere Teil (4,5 cm lang) verengt sich unten zu einem Zapfen (1 cm lang, 0,5 cm weit), der die zu sublimierende Substanz aufnimmt. Auf das Zäpfchen kommt das (runde) Deckglas. Am oberen, offenen Ende ist dieser untere Teil mit einem verdickten flachen Rand versehen. Dieser ist sehr fein geschliffen und paßt dicht auf das gleich gebaute untere Ende

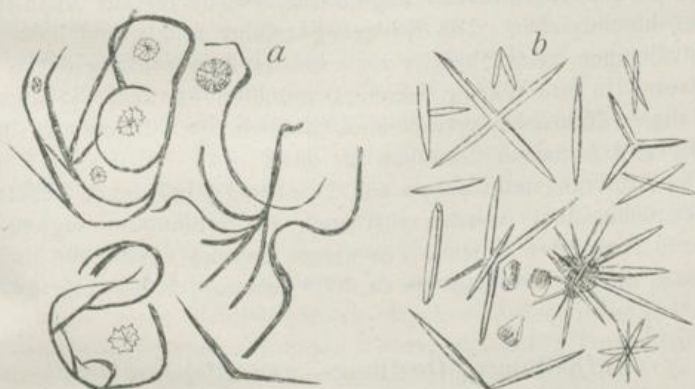


Fig. 10. Kristalle der Oxymethylantrachinone, aus Rheum auf der Asbestplatte sublimiert; a) bei höherer Temperatur, b) bei niedriger Temperatur. Die bandförmigen Kristalle von a lassen sich durch Resublimation bei niedriger Temperatur in die kurzen Nadeln von b überführen, ebenso die Sphärite von a in die Ballen von b. Die Kristalle sind nach Photographien kopiert (Tunmann).

des oberen Apparatenteiles. Letzterer ist 12 cm lang, oben etwas verjüngt und mit dem das Thermometer tragenden Kautschukstopfen verschlossen. Das Thermometer reicht bis ans Deckgläschen. Außerdem befindet sich am oberen Teil ein seitliches Ansatzrohr, welches zum Manometer und zur Wasserstrahlpumpe führt. Der Apparat wird in ein Schwefelsäurebad gebracht, dessen Temperatur während der Sublimation durch ein zweites Thermometer gemessen wird. Dann wird die Pumpe in Gang gesetzt und das Bad angeheizt.

¹⁾ R. Kempf, Praktische Studien über Vakuum-Sublimation, Journ. f. prakt. Chem., 1908, LXXVIII, S. 201.

²⁾ C. N. Riiber, Ein neuer Sublimationsprozeß, Ber. d. chem. Ges., 1900, XXXIII, S. 1655.

³⁾ R. Eder, Über die Mikrosublimation von Alkaloiden im luftverdünnten Raum, Dissert. Zürich, 1912 u. Vierteljahrsschr. Nat. Ges. Zürich 1912, LVII.

Zur Sublimation, besonders zur Bestimmung der Sublimationstemperatur unter dem Mikroskope wird sich mit geringer Änderung ebenfalls die Vorrichtung benutzen lassen, die H. Weber¹⁾ zur Schmelzpunktbestimmung unter dem Mikroskop angegeben hat (Bezugsquelle: Dr. R. Muencke, Berlin N, Luisenstr. 58). Die Vorrichtung läßt Temperaturen bis zu 200° zu. Der Apparat besteht aus einem Kasten aus Aluminium (25 cm lang, 6 cm breit, 2 cm hoch) und besitzt in der Mitte eine Vertiefung für den Objektträger (Größe 75:28 mm). In der Mitte dieser Vertiefung befindet sich eine Öffnung (1,3 cm), welche den Lichtstrahl durchläßt. Auf der Unterseite befindet sich noch ein Schlitz von 4 cm Länge und 2 mm Höhe, auf der Oberseite sind beiderseits der Vertiefung für den Objektträger 2 abnehmbare Tuben für Thermometer angebracht, welche bis zur Mitte in den Apparat hineinreichen. Die Erhitzung erfolgt rechts und links durch 2 Spirituslampen. Das Objektiv muß bei der Beobachtung durch einen Kühlmantel (in dem Wasser zirkuliert) geschützt werden. R. Muencke liefert diesen Mikroskopiertisch einschließlich der Kühlkammer für das Objektiv und Anpassen desselben für 34 M.

Die Erhitzungsmikroskope von Doelter²⁾, bei denen Elektrizität als Heizquelle dient, werden sich auch zur Sublimation eignen (Hersteller: C. Reichert, Wien). Für unsere Zwecke werden die einfachen Apparate, die ein Erhitzen bis zu 400° zulassen, vollständig genügen.

Aufhellungs-, Quellungs- und Bleichmittel.

Aufhellungsmittel bezwecken, Präparate oder einzelne Objekte in den Präparaten für die mikroskopische Betrachtung geeignet zu machen. Die zu benutzenden Aufhellungsflüssigkeiten sollen tunlichst keine Formveränderung hervorrufen, besonders keine Schrumpfung; sie müssen möglichst mit wässrigen Flüssigkeiten, fetten und ätherischen Ölen und Harzen mischbar sein (zwecks weiterer Behandlung der Schnitte). Die Aufhellung geschieht dadurch, daß der Brechungsindex der Flüssigkeit dem des Gewebes genähert wird, ferner durch Quellung (doch darf diese nicht zu stark sein) und schließlich durch Entfernung störender Inhaltsstoffe. Viele Mittel kombinieren die genannten Eigenschaften.

Chemische Aufhellungsmethoden werden mit Vorteil besonders dann ausgeführt, wenn die zu untersuchenden Inhalte durch andere

¹⁾ H. Weber, Über Camidge-Reaktion und Schmelzpunktbestimmung unter dem Mikroskop, Naturf. Vers. Karlsruhe, Verh. (1911), 1912, II₂, S. 125.

²⁾ C. Doelter, Ein neues Erhitzungsmikroskop, Sitzber. Wien. Akad., 1909, CXIII, 1. Abt., S. 489, dort Abbild.

Bestandteile der Zelle verdeckt werden oder der Protoplast störend wirkt, wie bei gewissen Membranstudien. Bei der Wahl der Aufhellungsreagentien muß man selbstredend berücksichtigen, daß einmal die störenden Stoffe in gewünschter Weise entfernt werden und daß anderseits der zu prüfende Körper möglichst unverändert bleibt. Ob und inwieweit letzteres der Fall ist, muß durch Kontrollreaktionen mit nicht aufgehellten Präparaten festgestellt werden.

Das beste Aufhellungsmittel ist in jeder Hinsicht die Chloralhydratlösung, welche als mikrochemisches Reagens von A. Meyer¹⁾ eingeführt wurde. Sie zeichnet sich durch ihr rasches Eindringungsvermögen, durch ihr großes Quellungsvermögen (Stärke wird bis zur Unkenntlichkeit verquollen) und durch ihren Brechungsindex aus. Eine Lösung von 8 Teilen Chloralhydrat und 5 Teilen Wasser stimmt in der Lichtbrechung mit einem Glycerin mit 67% Gehalt an wasserfreiem Glycerin überein ($n = 1,4272$, $n_F - n_C = 0,00788$ bei $15,3^\circ \text{C}$) und hat ein spezifisches Gewicht von $1,3677$ bei 15°C (Lenz²⁾). In der Praxis achtet man weniger auf eine genaue Konzentration der Lösung, sondern hält eine konzentrierte Lösung (5. Chloral + 2. Wasser oder aus gleichen Gewichtsteilen, letztere spez. Gewicht $1,2315$ bei 17°C , $n = 1,4479$, $n_F - n_C = 0,01318$ bei $15,4^\circ \text{C}$) vorrätig (zuerst von Lenz empfohlen), von der man soviel zu den Präparaten zusetzt, bis der gewünschte Erfolg erreicht ist, event. wird durch Erwärmen, selbst durch Aufkochen nachgeholfen. Beim Sichtbarmachen mancher Niederschläge (Alkaloide) wird man zunächst eine verdünnte Lösung einwirken lassen und diese erst allmählich durch eine konzentrierte Lösung ersetzen. Zur stärkeren Lösung greife man erst dann, wenn die schwächere Lösung selbst nach mehreren Stunden oder nach einem Tage ohne Erfolg war. Das Chloralhydrat der Apotheken genügt stets in bezug auf Reinheit unseren Anforderungen. Sollte sich das Chloralhydrat infolge schlechter Aufbewahrung zersetzt haben, insbesondere Salzsäure enthalten (mit Silbernitrat sofort einen Niederschlag geben), so würde dieser Umstand zwar nicht beim Aufhellen der Gewebe, wohl aber beim Nachweis von kleinen Oxalaten u. a. zu Irrtümern Anlaß geben können. Man kann dann mit Tschirch³⁾ die Lösung mit kohlensaurem Kalk digerieren und nach dem Absetzen durch Glaswolle filtrieren. Eine konzentrierte alkoholische Lösung, die schon Zimmermann⁴⁾, allerdings nur zur

¹⁾ A. Meyer, Das Chlorophyllkorn, 1883, S. 29.

²⁾ W. Lenz, Bemerkungen über die Aufhellung und über ein neues mikroskopisches Aufhellungsmittel, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1894, XI, S. 18.

³⁾ Anatomischer Atlas, Nachträge.

⁴⁾ A. Zimmermann, Bot. Mikrotechnik, S. 10.

schnellen Extraktion von Chlorophyll empfahl, leistet beim Entfernen schwer löslicher Harze und eingetrockneter Fette gute Dienste. Ihr Quellungsvermögen ist nicht so groß (Tunmann)¹⁾, wodurch bei Schleimmembranen ein wesentlicher Vorteil gegeben ist.

Auch ganze Blätter, bei denen man die Verteilung von Oxalaten und anderen, in Chloralhydrat unlöslichen kristallinen Ausscheidungen (Hesperidin, Scutellarin) ermitteln will, lassen sich meist ohne weiteres durch Aufkochen mit (konz.) Chloralhydratlösung aufhellen. Man kann die Quantität der Kristalle derart annähernd abschätzen und nimmt zweckmäßig das polarisierte Licht zu Hilfe. Oft ist es vorteilhaft, die Farbstoffe zuvor mit Alkohol auszuziehen oder alkoholisches Chloral zu benutzen. Bei ganz alten Blättern genügt Alkohol allein nicht, sondern die Blätter werden „zunächst 2–7 Tage in mit schwefliger Säure gesättigten absoluten Alkohol gesetzt, letzterer 2–3 mal gegen reinen Alkohol gewechselt“ und dann erst mit Chloral behandelt (Wehmer)²⁾. Hier geht dem Aufhellen ein Bleichungsprozeß voraus (s. Bleichmittel, S. 37). In der Anatomie wird in gleicher Weise Schultzes Mazerationsgemisch und Chloralhydrat vielfach angewendet, u. a. von Virchow³⁾. Aber diese Methoden sind nicht allgemein brauchbar, wie man nach der Literatur glauben könnte, sondern beziehen sich nur auf spezielle Fälle, denn wenn wir Blätter von Rheum-Arten mit dem Mazerationsgemisch bleichen und in Alkohol auswaschen, dann werden die gebleichten Stücke durch Chloralhydrat rotbraun (H. Miller und Tunmann).

Eau de Javelle wurde als Reagens in der tierischen Histologie seit 1882 von Noll (Vater) benutzt und von Noll⁴⁾ (Sohn) 1885 in die botanische Mikrotechnik eingeführt. Die Javellesche Lauge ist ein vorzügliches Lösungsmittel für Plasma; Stärke wird schwer angegriffen. Sie bleicht schneller als Chloralhydrat. Doch steht sie in vieler Hinsicht hinter diesem zurück. Sie findet namentlich Anwendung bei Membranstudien, zum Aufhellen der Vegetationspunkte, zu embryologischen Studien u. a. Gewöhnlich wird unter Deckglas aufgehellt, bei Membranstudien im bedeckten Schälchen. Bei längerer Einwirkung scheidet

¹⁾ O. Tunmann, Beitr. z. Kenntnis der Hautdrüsen, Ber. deutsch. pharm. Ges., 1908, XVIII, S. 503.

²⁾ C. Wehmer, Das Verhalten des oxalsauren Kalkes in den Blättern von *Symphoricarpus*, *Alnus* und *Crataegus*, Bot. Ztg., 1889, XLVII, S. 142.

³⁾ H. Virchow, Über Bau und Nervatur der Blättzähne und Blattspitzen mit Rücksicht auf diagnostische Zwecke im Gebiet der Pharmakognosie, Arch. d. Pharm., 1896, CCXXXIV, S. 92.

⁴⁾ F. Noll, Eau de Javelle, ein Aufhellungs- und Lösungsmittel für Plasma, Bot. Centralbl., 1885, XXI, S. 377.

sich unter dem Einfluß der Luft Kalziumkarbonat aus, welches mit verdünnter Essigsäure zu entfernen ist.

Die Lauge, die gut verschlossen und vor Licht geschützt aufbewahrt werden muß, kann mit Kalium- oder Natriumkarbonat bereitet werden. Zu einer Anreibung von 20,0 Chlorkalk und 175,0 Wasser kommt eine Lösung von 25,0 Natriumkarbonat in 75,0 Wasser. Die Mischung wird nach 4tägigem Stehen im Dunkeln filtriert und so lange mit 10% Kaliumoxalatlösung versetzt, bis ein Niederschlag entsteht. Nach dem Absetzen wird nochmals filtriert¹⁾. Man kann auch eine Anreibung von 20,0 Chlorkalk und 100,0 Wasser mit einer Lösung von 15,0 reiner Pottasche in 100,0 Wasser versetzen und nach mehrstündigem Stehen filtrieren. Überschüssiger Kalk wird durch Zusatz einiger Tropfen Pottaschelösung entfernt (Noll).

Kalilauge war früher das bevorzugte Aufhellungsmittel und wurde von Hanstein²⁾ zum Aufhellen der Vegetationspunkte und bei embryologischen Studien empfohlen. Nicht nur Schnitte, sondern auch Blätter, Stengel u. dergl. werden aufgehellt. Bei Schnitten wird eine verdünnte, bei Pflanzenstücken eine etwas stärkere (keine konzentrierte) Lösung benutzt. Über die Dauer der Einwirkung entscheidet die Beschaffenheit der Objekte. Nach der Behandlung mit Lauge folgt Auswaschen mit Wasser und Neutralisation mit Essigsäure oder verdünnter Salzsäure. Tritt bei der Neutralisation zu starke Trübung ein, dann wird mit verdünntem Ammoniak ausgewaschen. Zu durchsichtig gewordene Schnitte erfahren eine Nachbehandlung mit wässriger Alaunlösung. Russow benutzte eine alkoholische Lauge, um zu starke Quellung zu vermeiden.

Phenol³⁾ (kristallisierte Karbolsäure mit 10% Alkohol versetzt) C₆H₅OH wurde von Leitgeb bei Moosen zur Aufhellung benutzt, hat sich aber wenig eingebürgert. Schnitte werden beim Erwärmen oft zerstört. Bei Pilzen, Algen, Drogen leistet Milchsäure (vergl. S. 5) gute Dienste. Amann⁴⁾ empfiehlt, speziell für Kryptogamen, Laktoral (Chloralhydrat und Milchsäure 1 + 1, n = 1,4796), Chloralphenol, n = 1,5241 (2. Chloralhydrat, 1. krist. Phenol), Chlorallaktophenol, n = 1,4932 (2. Chloral, 1. krist. Phenol, 1. sirupdicke Milchsäure), p-Monochlorphenol, n = 1,5671, sowie für Diatomeen Chinolin. Auch verdünnte Mineralsäuren (verdünnte Salpetersäure) werden zuweilen zum Aufhellen benutzt.

¹⁾ A. Meyer, Grundlagen und Methoden f. d. mikr. Unters. von Pflanzenpulvern, 1901, S. 15.

²⁾ J. Hanstein, Die Scheitelzellgruppe im Vegetationspunkt der Phanerogamen, Bot. Ztg., 1868, XXVI, auch Festschr. niederrh. Ges., Bonn 1868, S. 108 und Russow, Mém. de l'Acad. de St. Pétersbourg, sér. VI, XIX, S. 15.

³⁾ C. Naegeli u. S. Schwendener, Das Mikroskop, 1877, S. 476.

⁴⁾ Jules Amann, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1899, XVI, S. 38.

Chloralhydrat kann zuweilen, abgesehen von dickeren Präparaten, durch Natriumsalicylat (1 + 1, Brechungsindex 1,449) ersetzt werden, welches mit Nelkenöl (und Phenolen) mischbar ist. Die Schnitte lassen sich somit aus dem Salicylat direkt in Nelkenöl übertragen¹⁾. Aufhellungsmittel sind schließlich in speziellen Fällen alle Flüssigkeiten, die den die Beobachtung störenden Bestandteil herauslösen (Alkohol, Äther bei fetthaltigen Geweben). Ammoniak ist bei *Polyporus officinalis* und wahrscheinlich auch bei anderen harzhaltigen Pilzen u. a. das beste Aufhellungsmittel (Tunmann)²⁾, die Agaricinsäure (das Harz) wird sofort gelöst, schneller als von Chloral, ohne daß wie in diesem die Hyphenmembran zum Quellen kommt.

Physikalische Aufhellungsmethoden werden ausgeführt mit Flüssigkeiten, deren Brechungsexponent dem des zu prüfenden Objektes nahe kommt. Gewöhnlich wendet man konzentriertes Glycerin an, ferner fette Öle (Olivenöl, Rizinusöl), doch auch konzentrierte Rohrzuckerlösung, Pyridin, Xylol, Anilin u. a. Vorzügliche Aufhellungsmedien sind die ätherischen Öle und die Balsame; bei ihnen, zum Teil auch bei Glycerin, ist zur Vermeidung von Kollaps eine Vorbehandlung der Schnitte notwendig. Hierzu wird man in vielen Fällen auch heute noch die einfachsten von Overton³⁾ angegebenen Methoden verwenden können. Die Schnitte kommen in ein Uhrgläschen in stark verdünnte Lösungen (10⁰/o), die mit Alkohol (bei ätherischen Ölen) oder mit Wasser (bei Glycerin) bereitet sind. Das Uhrgläschen wird in den Exsikkator gebracht. Die Lösungen konzentrieren sich allmählich durch Verdunstung des Alkohols und des Wassers, so daß die Präparate schließlich völlig in Öl oder in fast konzentriertem Glycerin liegen. Bei Anwendung eines Schwefelsäure-exsikkators beschleunigt schwaches Erwärmen des Exsikkators auf 35⁰ die Konzentration bedeutend⁴⁾. Aus Glycerin können selbst zarte Objekte auch mit absolutem Alkohol behandelt werden, ohne daß Schrumpfungen erfolgen. Will man mit Kanadabalsam aufhellen, dann werden die Objekte zunächst in Xylol übergeführt, indem man sie in einem Uhrgläse in eine 10⁰/o-Lösung von Xylol in Alkohol bringt und das Uhrglas in einen Exsikkator stellt, dessen Fuß reines Xylol enthält. Nach einigen Stunden ist die xylolhaltige Präparatenlösung genügend

¹⁾ W. Lenz, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1894, XI, S. 21.

²⁾ O. Tunmann, Schw. Wehschr. f. Ch. u. Ph., 1909, XLVII, Nr. 11.

³⁾ E. Overton, Mikrochemische Mitteilungen aus dem botanischen Laboratorium der Universität Zürich, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1890, VII, S. 9.

⁴⁾ F. Pfeiffer v. Wellheim, Zur Präparation der Süßwasseralgen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1894, XXVI, S. 674.

konzentriert¹⁾. Aus Xylol können die Präparate, ohne daß Kollaps erfolgt, in Xylol-Kanadabalsam übertragen werden.

Als **Quellungsreagentien** kommen die vorstehend genannten chemischen Aufhellungsreagentien in Betracht, außerdem werden herangezogen verdünnte Chromsäure (Stärke), verdünnte Schwefelsäure, Kupferoxydammoniak, Ammoniak, verdünnte Salpetersäure, Kaliumquecksilberjodid (Membran). Die meisten (wasserlöslichen) Schleime quellen bereits bei Zutritt von stark verdünntem Alkohol. Der Quellung bedient man sich zur Sichtbarmachung feinerer Strukturverhältnisse.

Als **Bleichmittel** dienen zunächst stärkere Aufhellungsreagentien, Eau de Javelle, Salpetersäure u. a.; dann mit schwefliger Säure gesättigter Alkohol, und in neuerer Zeit hat sich Wasserstoffsuperoxyd vielfach bewährt. Es ist aber nur in ziemlich konzentrierten Lösungen wirksam und wird nach Carazzi²⁾ vorteilhaft ersetzt durch Natriumperborat. „Bei gewöhnlicher Temperatur lösen 100 ccm Wasser 2,5 g Natriumperborat; erhitzt man aber das Wasser auf 30—35°, so löst sich das doppelte Quantum. Fügt man dann ein wenig Zitronen- oder Weinsäure hinzu, so kann man die Sauerstoffmenge auf das Zehnfache des ursprünglichen Volumens erhöhen.“ Bei Anwendung einer alkoholischen Lösung (50—70% Alkohol) ist der Zusatz der Säure unbedingt erforderlich. Bei dem Bleichverfahren von Alfieri³⁾ kommen die Schnitte in Kaliumpermanganat (1:2000), und dann wird das niedergeschlagene braune Manganoxyd durch Oxalsäure (1:300) entfernt. Die Prozedur muß bis zum gewünschten Erfolg eventuell einige Male wiederholt werden. In dieser Weise hat Lagerheim⁴⁾ Torf gebleicht, der an der Luft schwarz geworden war. Der Mazeration mit Permanganat folgte eine Behandlung mit 3% Oxalsäurelösung im Sonnenlichte. Energischer wirkt Chlorwasser, das auch einfacher in der Anwendung ist. Der Objektträger mit dem Präparate wird auf die Öffnung der Chlorwasserflasche gelegt. Am stärksten bleicht im allgemeinen Schultzes Mazerationsgemisch (konzentrierte Salpetersäure mit einigen Kristallen Kaliumchlorat, s. Mazeration) oder nach Mayer⁵⁾ ein Gemisch von Salzsäure und Kaliumchlorat (Entwicklung von Chlor und Unterchlorsäureanhydrid). Die Wahl des Bleichmittels hängt naturgemäß in erster Linie von der

¹⁾ A. Zimmermann, Bot. Mikrotechnik, 1892, S. 16.

²⁾ D. Carazzi, Zur Bleichtechnik, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1900, XXVI, S. 526.

³⁾ Alfieri, Monit. Zool. Ital., 1897, VII, S. 57.

⁴⁾ G. Lagerheim, Torftekniska Notiser, Geol. Fören. Förhandl., 1903, XXIV, S. 407.

⁵⁾ P. Mayer, Zur Bleichtechnik, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1907, XXIV, S. 353.

chemischen Beschaffenheit des zu bleichenden Gegenstandes ab. Das Bleichungsverfahren, an sich bereits ein Aufhellungsverfahren, wird oft durch chemische Aufhellungsreagentien verstärkt.

Mazerationsmethoden.

Unter Mazeration versteht man die Isolierung von Zellen aus den Geweben. Die Methode dient bei histologischen, weniger bei mikrochemischen Studien und gestattet die Gestalt und Größe der einzelnen Zellen zu ermitteln. Die Zellen werden durch die Mittellamelle (Interzellulärsubstanz) zusammengehalten, welche sich aus Pektinsubstanzen aufbaut (s. Pektinmembran), die im Laufe der Entwicklung vielfach ihre Zusammensetzung ändern. Die Mittellamelle ist in ständiger Metamorphose begriffen, sie verschleimt oft. Diese Verhältnisse sind bei der Mazeration zu berücksichtigen. Zuweilen wird die Isolierung schon durch längeres Kochen mit Wasser erfolgen. In solchen Fällen darf man das Isolierungsvermögen nicht ohne weiteres dem Wasser zuschreiben, sondern muß die im Gewebe anwesenden Substanzen berücksichtigen. Denn wenn wir Schnitte von *Rumex* durch Kochen mit Wasser mazerieren, so beteiligen sich hierbei jedenfalls auch die in den Zellen befindlichen löslichen Oxalate. Überwiegend werden jedoch stark wirkende Reagentien erforderlich sein; die hauptsächlichsten sind hier angeführt:

Schultzes Mazerationsgemisch steht an erster Stelle, ist bei der Mazeration festerer Gewebe (Holz) unerläßlich und wurde hierzu bereits von Sanio¹⁾ vielfach erprobt. Bei Schnitten kann die Isolierung unter Deckglas vorgenommen werden. Die Schnitte werden auf dem Objektträger mit Salpetersäure und einigen Körnchen chloresäurem Kalium versetzt (die dem Volumen nach den Schnitten entsprechen), das Deckglas aufgelegt und erwärmt. Vorteilhafter ist es indessen, schon um selbst sehr große Elemente (Bastfasern) im ganzen Zustande zu erhalten, 2 mm starke und genügend lange Stücke im Reagenzglas mit dem Gemisch bis zur Entwicklung brauner Dämpfe zu erwärmen. Die Stücke werden gebleicht, zerfallen zum Teil in kleinere Teile. Einige Minuten nach dem Erkalten der Flüssigkeit wird diese mit den Objekten in eine große Schale mit Wasser gegossen. Das Wasser wird 2—3 mal abgegossen und durch neues ersetzt, dann werden geeignete Stückchen auf dem Objektträger in Wasser oder in Glycerin zerzupft. Die Reaktion darf nicht im Mikroskopierzimmer, sondern muß unter dem Abzuge vorgenommen werden.

¹⁾ C. Sanio, Üb. d. Zusammens. d. Holzkörpers, Bot. Ztg. 1863, XXI, S. 632.

Konzentriertes Ammoniak hat (neben Kalilauge, Chromsäure u. a.) von Höhnel¹⁾ zur Isolierung der Gewebselemente von tierischen Wollen und Haaren benutzt. Richter²⁾ führte das Reagens zu diesem Zwecke in die botanische Mikrotechnik ein. Die Mazeration mit Ammoniak läßt sich durch höhere Temperaturen beschleunigen. Siedendes Ammoniak mazeriert das Parenchym der Kartoffel nach 1 Minute, das Endosperm von Rizinus nach 5, Stengelstücke von Cucurbita Pepo nach 15—20 Minuten; Stärke, Aleuronkörner, Chlorophyllkörner, Siebröhren bleiben dabei noch gut erhalten. Warmes Ammoniak von 40° mazeriert das Holz von *Taxus baccata* nach 4, das von *Diospyros Ebenum* nach 11 Tagen, kaltes Ammoniak das Periderm der Kartoffel nach 23 Tagen. Das Richtersche Verfahren, das Molisch zur Isolierung der Milchröhren benutzte, hat den Vorteil, daß die Zellinhalte relativ gut erhalten bleiben.

Für krautartige Gewächse führte A. Fischer³⁾ Mazeration mit Glycerin-Schwefelsäure ein. Die Präparate kommen unter Deckglas in Glycerin, alsdann wird am Deckglasrande ein Tropfen konzentrierte Schwefelsäure zugesetzt und eine halbe Minute lang aufgekocht. Nur bei starken Präparaten koche man 1 Minute. Längeres Kochen ist zu vermeiden, da die Membranen sonst zu stark quellen. Die einzelnen Zellen werden durch einen Druck auf das Deckglas voneinander getrennt. Durch halbstündiges Kochen mit 10% wässriger Natriumkarbonatlösung (Vétillard)⁴⁾ erfolgt nur unvollständige Trennung. In vielen Fällen wird Kochen mit 50% Kalilauge gute Dienste leisten, während die Mazeration mit Chromsäure⁵⁾, deren Konzentration von Fall zu Fall erprobt werden muß, jetzt weniger geübt wird. Die Isolierung mit Chromsäure geschieht vorteilhaft unter Deckglas bei ständiger mikroskopischer Kontrolle. Nach einer 1—3 Minuten langen Einwirkung der Säure wird mit Wasser ausgewaschen; dann lassen sich die Schnitte zerzupfen, oder man muß die Prozedur wiederholen. In speziellen Fällen mazerierte Solla⁶⁾ Früchte mit Oxalsäure oder mit Weinsäure, Möhren und Kartoffeln mit Essigsäure,

¹⁾ F. v. Höhnel, Die technisch verwendeten Faserstoffe, Wien 1888.

²⁾ O. Richter, Ein neues Mazerationsverfahren für Pflanzengewebe, Öster. bot. Ztschr., 1900, LV, S. 5.

³⁾ A. Fischer, Neue Beobachtungen über Stärke in Gefäßen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1886, IV, S. 97.

⁴⁾ M. Vétillard, Etudes sur les fibres végétales textiles, Paris 1876.

⁵⁾ L. Dippel, Anwendung des Mikroskopes auf die Histologie der Gewächse, 2. Aufl., Braunschweig, 1898, S. 215.

⁶⁾ R. Solla, Beiträge zur Kenntn. d. chem. u. phys. Beschaffenheit der Interzellularsubstanz, Öster. bot. Ztschr., 1879, XXXIV, Nr. 11.

Wille Laminarien mit Säuren und Sodalösung, Macallum Cyano-phyceen mit Pikrinsäure, Kroemer Korkgewebe mit Eau de Javelle. Allgemeine Anwendung kann Salzsäure-Alkohol mit Nachbehandlung mit Ammoniak finden (Mangin), doch wird diese Methode, da zeitraubend, zur Mazeration wenig benutzt (vergl. Pektinmembran).

Unter Umständen wird man die Mazeration gleichzeitig mit Aufhellungsmitteln kombinieren. Auch Natriumsalicylat ist benutzt worden. Die Columella der Illicium-Früchte brachte Lenz¹⁾ in kleine mit Natriumsalicylat (1 + 1) gefüllte Fläschchen (von 3 ccm Inhalt, sog. homöopathische Gläschen), die, gut verschlossen, $\frac{1}{2}$ Stunde in strömendem Wasserdampf erhitzt wurden. Die Fruchtspindeln sind nun so weich, daß sie ohne Benutzung schneidender Gerätschaften zerkleinert werden können. Alsdann werden die Objekte nacheinander mit heißem Wasser, Eau de Javelle, Salzsäure und Alkohol behandelt.

Bemerkungen über die Mikrotomtechnik.

Das Mikrotom kann in der Mikrochemie bei gewissen Studien nicht entbehrt werden. Daß cytologische Studien sich nur mit Mikrotomschnitten ausführen lassen, ist bekannt. So hat sich leider die Ansicht herangebildet, daß das Instrument nur für den Cytologen notwendig ist. Ohne dem Schneiden mit freier Hand die erste Stelle absprechen zu wollen, wird man doch der Überzeugung sein müssen, daß verschiedene Fragen der Mikrochemie nicht ohne Mikrotom in wünschenswerter Weise lösbar sind. Überall dort, wo Serienschnitte erforderlich sind, bedarf es des Mikrotoms. Bei Membranstudien wird man öfters auf sehr feine Mikrotomschnitte angewiesen sein, die uns ebenso wie bei der Bildung der ätherischen Öle in den Zellen, auch bei der Entstehung der Membranschleime u. a. Einblicke gestatten, die selbst mit den besten Freihandschnitten nicht zu erhalten sind. Und wenn man bei Niederschlägen Vergleiche über die Menge der betreffenden Substanz anstellen will, dann sind Schnitte von gleicher Dicke nötig, die eben nur das Mikrotom liefern kann.

Sehr verbreitet ist immer noch die Meinung, daß das Mikrotom sich bei Herbar- und Drogenmaterial nicht anwenden lasse. Wir besitzen indessen Mikrotome, die sich recht gut zum Schneiden harter Objekte eignen. Schon Koch und Raciborski haben über erfolgreiche Versuche berichtet.

Bei sehr harten Samen läßt man nach Koch²⁾ vor dem Schneiden 1—2 Tropfen Wasser 1—2 Minuten lang auf die Schnittfläche einwirken. Kleine Samen werden

¹⁾ W. Lenz, Zur anatomischen Unterscheid. d. Früchte v. *Illicium religiosum* Sieb. und *Illicium verum* Hook. fil., Arch. d. Pharm., 1899, CCXXXVII, S. 241.

²⁾ L. Koch, Mikrotechn. Mitteilungen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1896, XXIX, S. 39.

in japanisches Wachs oder (besser) in ein Gemisch von Paraffin und Sebum (1:1) eingebettet. Zerfallen die Präparate leicht beim Schneiden, dann hilft Bestreichen der Schnittfläche mit Kollodium, das sofort eintrocknet und nach $\frac{1}{2}$ Minute das Abheben des Schnittes gestattet. Empfehlenswert ist das Imprägnieren harter Objekte mit Glyzeringummi. Die Objekte dürfen nicht mehr als 2 cm Rauminhalt haben. Harte lebende Pflanzenteile werden vor dem Einbetten mit Alkohol abgetötet, mit dem man auch aus trockenen Hölzern u. a. die Luft entfernt. Der Alkohol ist stets durch Wasser zu verdrängen, worauf die Imprägnierung erfolgt. Hierzu wird die Dippelsche Einbettungsmasse¹⁾ benutzt (10 g Gummiarabikum, 10 g Wasser, 40–50 Tropfen Glyzerin und Zusatz von Karbolsäure als Antiseptikum). In diese Masse, die mit dem dreifachen Volumen Wasser verdünnt wird, gelangen die Stücke in einen offenen Behälter. Nach 6–8 Tagen hat die Masse durch Verdunstung Sirupkonsistenz angenommen. Die Stücke werden nun herausgenommen, vom anhaftenden Gummi möglichst befreit, zum weiteren Trocknen auf eine Glasplatte gestellt; am nächsten Tage wird durch Anschneiden die Schnittfläche hergestellt, und nach weiteren 3–4 Tagen können die Mikrotomschnitte hergestellt werden. Die Schnitte werden durch eintägiges Digerieren mit Wasser von 40–50° vom Gummi befreit. Auf diese Weise hat Koch von Pinus-Holz 1–2 qcm große Schnitte von 10–20 μ Dicke erhalten. — Schneller gelangt man zum Ziel, wenn man die Objekte in absoluten Alkohol bringt und aus diesem über Xylol die Einbettung in Paraffin-Sebum vornimmt.

Die Objekte von Herbarmaterial²⁾ gelangen auf einige Stunden in Alkohol, auf 2–3 Stunden in Wasser, auf 24 Stunden in 50% Ammoniak bei 40°. Als dann wird das Ammoniak mit Wasser ausgewaschen, dann folgt Alkohol, Toluol, Einbetten in Paraffin (s. weiter unten). Bei brüchigen Objekten wird der Paraffinblock vor jedem Schnitt mit einer dünnen Schicht leichtflüssigen Paraffins überzogen. Die Aufklebung erfolgt in der üblichen Weise mit Glyzerin-Eiweiß oder mit Wasser. Selbstverständlich muß bei der, mikrochemischen Untersuchungen dienenden Mikrotompräparation stets auf die Natur der zu prüfenden Substanzen geachtet werden. Ein Fixieren der Inhalte ist bei Herbar- und Drogenmaterial natürlich nicht mehr möglich, doch ist ein Härten oft dienlich (Schleim, Gummi).

Bei lebendem Material wird man im allgemeinen den von den Cytologen ausgearbeiteten Gang bei der Herstellung von Mikrotomschnitten benutzen. Dieser gliedert sich in Fixierung, Härtung (und Entwässerung) und Einbettung (in Paraffin, selten in Celloidin) des Materials, dann folgt Herstellung der Präparate mit dem Mikrotom, Aufkleben der Schnitte auf den Objektträger und Färbung der Schnitte (event. Verstärkung und Differenzierung der Färbung).

Die **Fixierung** hat die Aufgabe, die Strukturverhältnisse des lebenden Zustandes möglichst zu erhalten. Da aber durch die Fixierungsmittel Veränderungen unvermeidlich sind, so ist eine Kenntnis der Wirkung verschiedener Fixierungs-

¹⁾ L. Dippel, Handb. d. allg. Mikr., II. Aufl., S. 773.

²⁾ M. Raciborski, Die Schutzvorrichtungen der Blütenknospen, Flora 1895, LXXXI, S. 151.

mittel, vor allem ein Vergleich mit lebendem Material unbedingt erforderlich, um Struktur und Kunstprodukte auseinanderhalten zu können (vergl. hierzu „Zellkern“). Ein gutes Fixierungsmittel muß sofort zur Wirkung gelangen und den Protoplasten möglichst rasch zum Erstarren bringen. Zu diesem Behufe muß es schnell und vollständig die Gewebe durchdringen. Größere Stücke und Pflanzen werden in kleinere zerlegt, schwer durchdringbare Häute und Gewebe (Kutikula, Kork) werden entfernt. Das Eindringen verschiedener Fixierungsmittel wird durch Anwendung von Wärme unterstützt und beschleunigt. Ein gutes Fixierungsmittel ist für verschiedene Fälle (Embryosack) kochender Alkohol; er hat vor anderen Mitteln den Vorzug, daß ein Auswaschen fortfällt (der Alkohol dient gleichzeitig zum Konservieren). Mit Alkohol fixierte Objekte bedürfen auch keiner Härtung. Weitere Fixierungsmittel sind: Jod, Chrom-, Essig-, Pikrin- und Osmiumsäure, Sublimat, Platinchlorid. Man wendet diese Mittel meist nicht für sich allein an, sondern sucht ihre Wirkung durch Kombination zu erhöhen. Die Zusammensetzung der gebräuchlichsten Mittel ist unter „Zellkern“ angeführt. Die Fixierung wird stets mit größeren Mengen der Fixierungsmittel vorgenommen. Die Dauer der Einwirkung ist je nach Objekt und Fixierungsmittel verschieden lange zu bemessen (von 1 Minute, Algen, bis mehrere Stunden, bei einigen sogar mehrere Tage). Besteht das Fixierungsmittel aus einer alkoholischen Lösung, so wird mit Alkohol ausgewaschen, in den übrigen Fällen meist in fließendem Wasser. Hierzu bedient man sich seit langem kleiner Siebeimerchen aus unglasiertem Porzellan¹⁾ (auch aus Platin), die mit den Objekten gefüllt und mit einem Kork verschlossen in eine geräumige Kristallisierschale unter die Wasserleitung gebracht werden. Der Wasserstrom wird in die Schale geleitet und letztere fast ganz mit einer Glasplatte bedeckt, so daß das überschüssige Wasser abfließen kann und das Herausspülen der Eimerchen verhindert wird. Eine einfache Wässerungseinrichtung, bei der für einen gleichmäßigen Wasserstrom gesorgt ist, hat Kowler²⁾ angegeben. Der Apparat besteht aus einem U-förmigen Glasrohr; der eine Schenkel ist glatt und steht oben durch einen Gummischlauch mit der Wasserleitung in Verbindung. Der andere Schenkel ist in seiner Mitte kammerartig erweitert; sein oberes Ende ist verjüngt und nach unten gebogen (Ausflußstelle). Die Kammer selbst läßt sich in der Mitte auseinandernehmen (nimmt die Objekte auf) und dicht verschließen, da die Ränder geschliffen sind. An der Außenseite der Kammer angebrachte Federn halten die Hälften zusammen. Die Kammer ist nach oben und unten durch eingeschmolzene Glassiebe abgeschlossen (Apparat mit 50 ccm Kammerinhalt bei Otto Teschner, Jena, 3 M.). Auch die Vorrichtung von Suzuki läßt sich zum Auswaschen benutzen (s. weiter unten). Da das Auswaschen nicht nur in der Mikrotomtechnik, sondern auch bei mikrochemischen Arbeiten öfters notwendig ist, so sei noch die einfache Vorrichtung von Schaffnit³⁾

¹⁾ D. G. Fairchild, A perforated porcelain cylinder as washing apparatus, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1895, XII, S. 301.

²⁾ B. Kowler, Einfache Wässerungsvorrichtung für fixierte Objekte, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1909, XXVI, S. 259.

³⁾ E. Schaffnit, Ein einfacher Auswaschapparat, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1901, XXVIII, S. 49.

erwähnt. Sie besteht in einfachster Form in einer Flasche, deren Boden abgesprengt ist. Die Flasche wird nach dem Einfüllen der Objekte unten mit Müllerseide überspannt, der Hals der Flasche durch einen Gummischlauch mit dem Hahn der Wasserleitung verbunden. „Zum Einfüllen von Wasser dreht man das frei schwebende Waschgefäß um, füllt es durch Aufdrehen des Hahnes zur Hälfte mit Wasser und kippt es dann wieder nach unten. Das Wasserniveau bleibt infolge des Luftdruckes konstant.“ Die Vorrichtung ist in Form eines Trichters mit umgeschlagenem Rande von Hegershoff-Leipzig zu beziehen.

Die **Härtung** (und Entwässerung), die der Fixierung folgt, ist bei den meisten Fixierungsmitteln, die nicht alkoholische Lösungen sind, unbedingt erforderlich, um die Objekte schnittfähig zu machen. Ganz allgemein benutzt man hierzu Alkohol. Bei Objekten, die mit wässerigen Lösungen fixiert wurden, besonders bei empfindlichen, bedarf die Entwässerung zur Vermeidung von Kollaps einiger Vorsicht. Hierzu ist eine ganze Anzahl von Apparaten im Gebrauch. Einige Entwässerungsapparate beruhen auf dem Prinzip der Dialyse (F. E. Schulze, Franchotte, Kolster), andere sind bestrebt, die zu entwässernden Objekte möglichst nahe dem Flüssigkeitsspiegel in einer spezifisch leichteren wasserärmeren Schicht zu lagern (Siebdosen von Steinach¹⁾, Suchanek, Porzellaneimer von Fairchild, Platinkörbchen von Schaffer) oder die Flüssigkeit in steter Bewegung zu halten (oberschlächtiges Wasserrad Thommas); der Greilsche Apparat²⁾ gestaltet die Dialyse gleichmäßig und ermöglicht eine Regulierung derselben. Vielfach werden wir ohne Apparat auskommen und die Stücke durch Umfüllen in allmählich konzentrierteren Alkohol überführen. Bei kleinen Algen u. a. können wir die Entwässerung mit Glycerin vornehmen (S. 36) oder uns ein Schulzesches Entwässerungsgefäß³⁾ in primitiver Weise herstellen, indem wir in ein weithalsiges, zum größeren Teile mit Alkohol gefülltes Gefäß einen unten mit Papier verklebten Zylinder einhängen, der die Objekte in stark verdünntem Alkohol enthält. Durch Osmose konzentriert sich der Alkohol des Zylinders langsam. Eine einfache und billige Vorrichtung hat Suzuki⁴⁾ empfohlen. Sie



Fig. 11. Glassiebchen nach Steinach, aus der Preisliste von Gräbner & Co., Leipzig.

¹⁾ E. Steinach, Siebdosen, eine Vorrichtung zur Behandlung mikroskopischer Präparate, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1888, IV, S. 433; bei Gräbner-Leipzig, Glassieb und Glasdose 2 M., 1 Garnitur (Sieb mit 3 Dosen) 3,50 M. (Fig. 11).

²⁾ A. Greil, Ein neuer Entwässerungsapparat, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1906, XXIII, S. 286.

³⁾ F. E. Schulze, Ein Entwässerungsapparat, Arch. f. mikr. Anatomie, XXVI, S. 539. Dieser Apparat hat 2 Einsatzzylinder. Ver. Fabr. f. Labor. Bed., Berlin N, führen den Apparat für 2,50 M., ferner Osmosepapier, dünn 1 m = 0,60, stark 1,00 M. (Fig. 12, s. S. 44).

⁴⁾ B. Suzuki, Eine einfache Entwässerungs-, Härtungs- und zugleich Auswaschvorrichtung für mikrotechnische Zwecke, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1909, XXVI, S. 211.

besteht im wesentlichen aus 2 U-förmig miteinander verbundenen Zylindern. Die beiden Schenkel (Zylinder, Zu- und Ablaufgefäße) fassen je 80–100 ccm Inhalt (3 cm weit, 9 cm hoch), das verbindende Knie ist enger und wird mit Watte verstopft. Der Ablaufschenkel, in dem die zu entwässernden Objekte zu liegen kommen, hat oben einen Abflußhahn, welcher zu einer tiefer stehenden Flasche führt, die das Ablaufende auffängt. Auf den Zulaufschenkel kommt ein umgekehrter, die Flüssigkeit enthaltender Glaskolben, durch dessen Stöpsel 2 Glasröhren führen, wie es bei einem Wasserbade mit konstantem Niveau der Fall ist. Zu- und Ablauf kann leicht reguliert werden. Die auf die eine oder andere Art in konzentrierteren Alkohol überführten Objekte gelangen schließlich auf einen bis mehrere Tage in absoluten Alkohol.

Die **Einbettung** kann in allen Fällen in Paraffin vorgenommen werden (bei Drogen in Paraffin-Talg). Zuvor passieren die Objekte Chloroform-Paraffin oder Xylol und Xylol-Paraffin (auch Toluol, Benzol, Terpentinöl werden zur Passage benutzt). Die Objekte kommen daher aus dem absoluten Alkohol zunächst in ein Gemisch von Chloroform-Alkohol (1+1) oder Xylol-Alkohol (2+1) und nach 24 Stunden (oder länger) in reines Chloroform resp. Xylol, worin sie ebenso lange verweilen. Nach völliger Durchtränkung wird die überschüssige Flüssigkeit abgegossen und der Rest der Flüssigkeit nebst den Objekten in kleine Schälchen übergeführt, die man in den Thermostaten bei 20–30° bringt. Dort setzt man der Flüssigkeit nach und nach kleine Mengen von Paraffin zu. So kommen die Objekte schließlich in fast reines Paraffin zu liegen, denn einerseits verdunstet das Chloroform (resp. Xylol), anderseits vermehren wir durch Zusatz den Paraffin-gehalt. Nun erst erfolgt die Überführung in reines Paraffin.

Der Schmelzpunkt des Paraffins zum Schneiden mit quer-
gestelltem Messer soll 60°, der des Paraffins zum Schneiden mit schräggestelltem Messer 57–58° betragen¹⁾. Es ist vorteilhaft, das durch Erwärmen flüssig gemachte Paraffin und die paraffindurchtränkten Objekte in entsprechender Anordnung in Uhrgläsern einzutragen. Waren die Uhrgläser zuvor mit Glycerin eingerieben, dann läßt sich die erstarrte Paraffinmasse leicht herausheben. Das Erstarren des Paraffins wird beschleunigt, indem man die beschickten Uhrgläser auf Wasser schwimmen läßt und nach oberflächlichem Erstarren ins Wasser untertaucht. Das Untertauchen im Wasser ist nötig, damit im Paraffin keine Hohlräume entstehen. Hingegen ist die verschiedentlich empfohlene Kühlung des Wassers durch Eis nicht erforderlich, zuweilen sogar schädlich (Carazzi)²⁾. Aus dem erstarrten Paraffinblock werden die Objekte in kleinen Würfelchen herausgeschnitten, die man mit einer heißen Nadel auf Blöcke von Paraffin aufschmilzt,



Fig. 12. Entwässerungsapparat,
Ver. Fabr. f. Laborat.-
Bedarf, Berlin N.

¹⁾ Diese Paraffine liefern Grübler-Leipzig u. a. zum Preise von 2,50 M. das Kilo.

²⁾ D. Carazzi, Über die Abkühlung des Paraffins, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1909, XXVI, S. 530.

welche in die Klammer der Objekthalter passen¹⁾. Auch Metallwinkel sind als Paraffineinbaltungsrahmen vielfach im Gebrauch (Fig. 13).

Über das **Schneiden** mit dem Mikrotom lassen sich allgemein gültige Anweisungen nicht geben. Die Schnittfähigkeit des Materials, die Stärke und Größe der gewünschten Schnitte bedingen vielfache Modifikationen, die nur die Praxis zu lehren vermag. Jedem Mikrotom liegen ausführliche Gebrauchsanweisungen bei. Es ist jedoch vorteilhafter, sich erst in einem botanischen Institute die nötigen Fähigkeiten anzueignen und sich dann erst das zusagende Instrument zu beschaffen. Besonderes Gewicht ist auf die Schärfe des Messers zu legen. Zum Schleifen der Mikrotommesser sind Messerhalter erforderlich. Eine recht brauchbare Anleitung zum Schleifen der Messer gab Ssobolew²⁾. Übrigens wird das Schleifen der Messer jetzt auch von den Mikrotomfabrikanten (Jung, Heidelberg) besorgt.

Das **Aufkleben** (Befestigen) der Paraffinschnitte auf den Objektträgern kann in verschiedener Weise ausgeführt werden: Mit Wasser durch Kapillarattraktion nach Gulland³⁾. Die Schnitte werden auf warmes, in einem flachen Gefäße befindliches Wasser geworfen. Die Temperatur des Wassers darf nicht so hoch sein, daß das Paraffin zum Schmelzen kommt. Die Schnitte breiten sich aus und werden mit einem Objektträger⁴⁾ herausgehoben. Man läßt das Wasser abfließen und läßt die Objektträger vor Staub geschützt bei mäßiger Wärme (50°) 1—5 Stunden (je nach der Dicke der Schnitte) liegen. Nun wird durch Erwärmen das Paraffin geschmolzen und mit Xylol (oder Terpentin) entfernt; die Schnitte bleiben auf dem Objektträger haften. Nach Heidenhain⁵⁾ ist

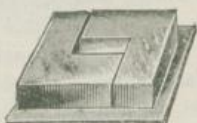


Fig. 13.
Paraffineinbaltungsrahmen
aus Metallwinkeln
(Preis 3 M.) aus der Preis-
liste von Gräbner & Co.,
Leipzig.

¹⁾ Über die Einbettung in Celloidin, die bei pflanzlichen Objekten nur selten benutzt wird, sind die Publikationen von Schiefferdecker, Apáthy, W. Busse in der Ztschr. f. wiss. Mikr. einzusehen. Über das Verhalten von Celloidinschnitten s. D. Carazzi, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1909, XXVI, S. 533 u. a.

²⁾ L. W. Ssobolew, Theorie und Praxis des Schleifens, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1909, XXVI, S. 65; die Anleitung bezieht sich auch auf das Schleifen der Rasiernesser; vergl. ferner: J. Lendvai, Apparat zum Schleifen des Mikrotommessers, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1909, XXVI, S. 203.

³⁾ H. L. Gulland, A simple method of fixing paraffin sections to the slide, Journ. of Anat. and Physiol., 1891, XXVI, S. 56—58.

⁴⁾ Die Objektträger werden mit Kaliseife durch Reiben zwischen beiden Handflächen gereinigt und nach gründlichem Abspülen der Seife mit Wasser sofort benutzt (ohne abgetrocknet zu werden). Vergl. J. F. Gudernatsch, Zur Technik der Wasseraufklebung von Paraffinschnitten, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1907, XXIV, S. 357. Die Objektträger müssen nämlich völlig entfettet sein, damit das Wasser sich gleichmäßig verteilt. Andere reinigen die Gläser durch 2—3 wöchentliche Behandlung mit Kaliumdichromat-Schwefelsäure, dann Abwaschen mit Wasser, schließlich folgt Alkohol.

⁵⁾ M. Heidenhain, Über Kern und Protoplasma, Koelliker Festschrift, Leipzig 1892, S. 109.

die Methode gut bei Alkohol- und Sublimatpräparaten, unsicher, wenn zur Fixierung Chromsäure- oder Osmiumsäuregemische benutzt wurden. Bei der Befestigung mit Eiweiß-Glyzerin¹⁾ wird eine filtrierte Lösung von gleichen Teilen Eiweiß und Glyzerin benutzt. Nach Reinke²⁾ wird die Filtration durch wenig Thymolzusatz beschleunigt. Thymol macht die Lösung ebenso wie Kampherstückchen für einige Wochen haltbar. Eine Spur dieser Mischung wird mit dem Finger auf dem Objektträger fein verrieben, dann werden die Schnitte aufgelegt und mit dem trocknen Finger angedrückt. Nun werden die Objektträger erwärmt und das Paraffin mit Xylol oder Terpentin entfernt. Reinke (a. a. O.) bringt auf die mit Eiweiß-Glyzerin eingeriebenen Objektträger reichlich destilliertes Wasser, legt dann die Präparate auf, erwärmt gelinde (das Paraffin darf hierbei nicht schmelzen), bis sich die Schnitte geglättet haben, saugt das überschüssige Wasser ab und läßt die Präparate bei 30–35° eintrocknen.

Färbung: Die aufgeklebten Schnitte werden fast stets gefärbt. Vor der Färbung muß das Paraffin mit Terpentinöl, dann mit absolutem Alkohol aus den Schnitten entfernt werden. Stückfärbung der Objekte vor dem Einbetten in Paraffin wird nur selten geübt. Meist führt man Doppelfärbungen aus und läßt Farbstoffgemische oder mehrere Farben nacheinander einwirken. Beizen sind nur bei den adjektiven (indirekten) Färbungen erforderlich, nicht bei den substantiven (direkten). Die meisten Fixierungsmittel wirken als Beizen (Alaun). Bei der Wahl der Farblösung ist die Natur des Fixierungsmittels zu berücksichtigen. Die Farbstoffe sind nur aus zuverlässiger Quelle zu beziehen, Teerfarben von Grübler-Leipzig, Kahlbaum-Berlin, Merck-Darmstadt, von den Höchster und Elberfelder Farbenfabriken u. a. Bei Benutzung nicht eingeführter Teerfarben muß stets die Bezugsquelle angegeben werden, da selbst die Präparate der genannten Firmen nicht immer miteinander übereinstimmen. In solchen Fällen ist die Angabe orientierender makrochemischer Versuche über die Natur des Farbstoffes erforderlich. Fabrikate vergangener Jahrzehnte, welche sich öfters in den Institutsammlungen finden, sollten von der Benutzung ausgeschlossen werden; gar zu oft ist ein derartiges Produkt im Handel nicht mehr zu haben. Bei Erprobung neuer Farbstoffkombinationen wende man sich an Dr. R. Hollborn-Leipzig, Kronprinzenstr. (Grübler & Co.), der stets gern Auskunft erteilt.

Die Konzentration und die Zusammensetzung der Farblösung läßt sich nur von Fall zu Fall entscheiden, ebenso die Dauer der Einwirkung. Vorteilhaft wird zuweilen überfärbt und der überschüssige Farbstoff ausgewaschen. Auch über die Dauer des Auswaschens und über die Wahl der Waschflüssigkeit läßt sich kein allgemein gültiges Gesetz aufstellen. Die Färbungen erfahren oft eine Nachbehandlung zur Erzielung besserer Bilder mit Säurefuchsin, Säurealkohol u. dergl., sie werden differenziert.

Zur gleichzeitigen Färbung einer größeren Anzahl aufgeklebter Präparate benutzt man jetzt allgemein nach dem Vorschlage von Caro³⁾ Glaströge von an-

¹⁾ P. Mayer, *Mittel. d. Zool. Station zu Neapel*, 1883, IV, S. 521.

²⁾ F. Reinke, *Die japanische Methode zum Aufkleben von Paraffinschnitten*, *Ztschr. f. wiss. Mikr.*, 1895, XII, S. 21–23.

³⁾ Caro, *Eine einfache Methode zur gemeinsamen Behandlung von aufgeklebten Serien- und Kurspräparaten*, *Ztschr. f. wiss. Mikr.*, 1895, XII, S. 19.

nähernder Höhe der Objektträger. Diese werden zu $\frac{2}{3}$ mit der Farblösung gefüllt und erhalten einen Deckel aus steifer Pappe, in dem Schlitz geschnitten sind, die etwa je 0,5 cm voneinander entfernt sind und durch die je 2 mit der Rückseite aufeinander gelegte Objektträger durchgeschoben werden können. Diese paarweis zusammengelegten Objektträger werden oben durch kleine Gummiringe (0,3 cm lange, aus einem fingerdicken Gummischlauch geschnittene Stücke) zusammengehalten, wodurch auch ein Durchrutschen der Objektträger durch die Öffnungen verhindert wird. Die Objektträger sind wie bei einer Tauchbatterie angeordnet¹⁾. Den gleichen Zweck erfüllt in sehr einfacher Weise nach Funck²⁾ ein dem Boden eines geeigneten Glashafens aufliegender vernickelter Rahmen. Nickeldraht wird in Schlangenlinien, die rechtwinklig verlaufen, gebogen. Die Winkel dienen als Stützpunkt für die senkrecht eingestellten Objektträger, die mit ihren oberen Enden aus der Flüssigkeit herausragen und einander aufliegen können. In der Mitte, wo sich die Präparate befinden, sind sie genügend weit voneinander entfernt. Diese Vorrichtungen dienen natürlich ebenfalls zur Passage (verd. Alkohol, absoluter Alkohol, Xylol-Alkohol, Xylol) aufgeklebter Schnitte.

Nach erfolgter Färbung erfahren die Schnitte eine Aufhellung. Dies geschieht gewöhnlich in Xylol-Kanadabalsam nach vorheriger Passage von Alkohol, Nelenöl und Xylol.

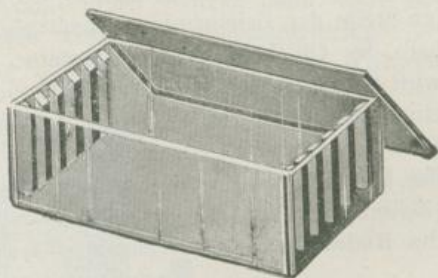


Fig. 14. Färbekasten (Preisliste, Grübler & Co., Leipzig).

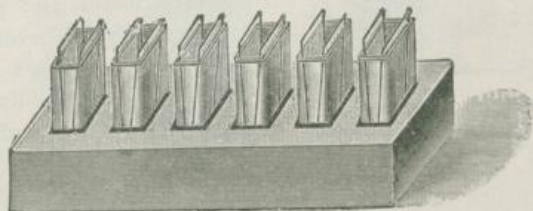


Fig. 15. Färbekasten im Holzblock (Grübler & Co., Leipzig).

Optisches.

Das polarisierte Licht ist in der Mikrochemie ein vorzügliches Hilfsmittel. Es dient nicht nur zur näheren Bestimmung von Kristallen, zur Auffindung sehr feiner kristallinischer Niederschläge, die im gewöhnlichen Licht kaum zu erkennen sind, sondern es leistet wertvolle diagnostische Dienste bei organisierten Zellbestandteilen, bei Membranen,

¹⁾ Praktisch sind ferner die Färbekästen aus Glas (bei Grübler-Leipzig zu 1,25 M. für 10 Objektträger, Fig. 14); auch gibt es Holzblöcke, in denen rechteckige Glaskästen von Objektträgerhöhe stehen (4,50 M., Fig. 15).

²⁾ Ch. Funck, A propos de la déshydratation des coupes montées sur lames porte-objet, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1909, XXVI, S. 422.

bei der Stärke, selbst bei Schleimen. Ein eigenes Polarisationsmikroskop wird nur selten zur Verfügung stehen, meist wird der Polarisationsapparat dem Arbeitsmikroskop bei Bedarf angefügt. Derartige Polarisationsapparate (im Preise von 45—60 M.) bestehen aus zwei Nicolschen Prismen, dem Polarisator (Fig. 16) und dem Analysator (Fig. 17). Der erstere wird in die Schiebehülse des Diaphragmenhalters eingeschoben (an Stelle des Beleuchtungsapparates), dieser Nicol befindet sich unterhalb des Objektes. Der Analysator, der den zweiten Nicol enthält, wird über dem Objekt, gewöhnlich dem Okular aufgesetzt und besitzt ein Fadenkreuz und ev. einen Teilkreis zum Messen der Drehung der Polarisationssebene. Dreht man nun den Analysator um die Achse des Instrumentes, während man das aufgelegte Präparat beobachtet (Zellmembran und Kristalle), so wird man finden, daß die Helligkeit des Bildes wechselt. Wenn das Gesichtsfeld am dunkelsten ist (ganz schwarz), stehen die beiden Nicols gekreuzt, wenn es am hellsten ist, parallel.

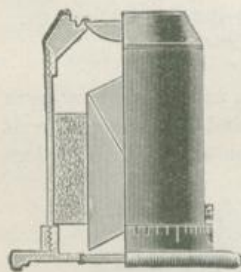


Fig. 16. Polarisator des Polarisationsapparates von W. u. H. Seibert, Wetzlar.

Bei gekreuzten Nicols (im polarisierten Lichte) können zwei Fälle eintreten. Entweder bleiben alle Gegenstände des Präparates, auch beim Drehen des Präparates, stets dunkel. Membranen, Kristalle und andere Körper, die dieses Verhalten zeigen, bezeichnen wir als einfachbrechend (isotrop). Hierher zählen amorphe Substanzen und die Kristalle des regulären Systems. Körper, die aufleuchten, wie Stärke, die meisten Kristalle und Membranen und manche Schleime werden doppelbrechend (anisotrop) genannt. Lassen wir die beiden Nicols in gekreuzter Stellung und drehen wir das Objekt, resp. einen Kristall vollständig um seine Achse, indem wir den Objektisch langsam drehen, so können wir die optischen Achsen ermitteln. Wir nennen einen Kristall optisch einachsig, wenn er nur in einer einzigen Richtung nicht aufhellt (Kristalle des hexagonalen und tetragonalen Systems), optisch zweiachsig, wenn er in zwei Richtungen nicht aufhellt (rhombisches, mono- und triklines System). Wie man sieht, kann man derart leicht wichtige Anhaltspunkte für die kristallographische Bestimmung der Kristalle erhalten. Von einer eingehenden Bestimmung wird man meist absehen müssen, denn die bei den pflanzlichen Objekten erhaltenen Niederschläge führen relativ selten so gut ausgebildete Kristalle, daß ihre Bestimmung möglich ist, ganz abgesehen davon, daß die genaue kristallographische Bestimmung eine spezielle Ausbildung verlangt. In den meisten Fällen wird man sich mit der Angabe der Auslöschungsrichtung und des Verhaltens der Kristalle gegenüber den Gipsplättchen begnügen.

Die Richtungen, in denen ein Kristall nicht aufhellt, in denen er sich wie ein einfachbrechender verhält, werden seine Auslöschungsrichtungen genannt. Verläuft die Auslöschungsrichtung der Hauptkante des Kristalles parallel, so spricht man von einer geraden Auslöschung, die vorzüglich den Kristallnadeln zukommt. Bildet die Auslöschungsrichtung mit der Hauptkante einen Winkel, dann löscht der Kristall schief aus und der Winkel wird als Auslöschungsschiefe bezeichnet. Zu seiner Bestimmung ist natürlich ein feinerer Teilkreis am Analysator erforderlich.

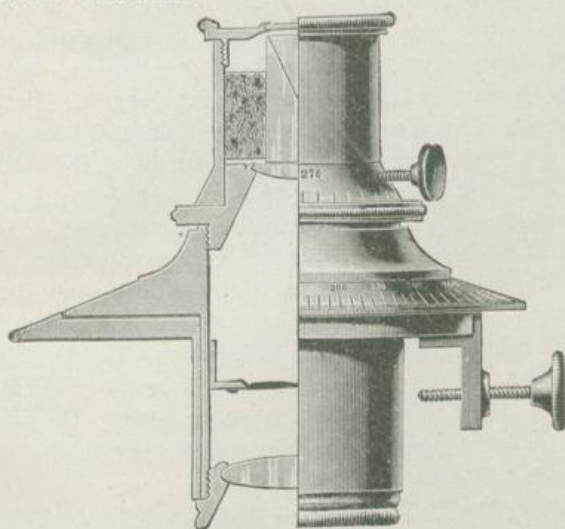


Fig. 17. Analysator des großen Polarisationsapparates von W. u. H. Seibert, Wetzlar.

Eine für unsere Zwecke ausreichende Anleitung für die Ermittlung des Kristallsystems findet sich bei Fuchs-Braun (Anleitung zum Bestimmen der Mineralien, Gießen 1907, S. 71):

- I. Alle Kristalle bleiben bei gekreuzten Nicols in jeder Lage dunkel; sie sind einfach brechend, regulär (Caesiumalaun).
- II. Die meisten Kristalle werden zwischen gekreuzten Nicols hell (oft nur grau) und farbig und besitzen gerade Auslöschung, einzelne bleiben in allen Lagen dunkel; sie sind doppelbrechend und optisch einachsigt. Man hat weiter den Umriß der dunkel bleibenden Kristalle zu beachten:
 - a) der Umriß der dunkel bleibenden Kristalle ist vierseitig (oder achtseitig), quadratisch, die Kristalle sind quadratisch [tetragonal] (Kalziumoxalat);
 - b) der Umriß ist sechsseitig, die Kristalle sind hexagonal (Kieselfluornatrium);
 - c) der Umriß der dunkel bleibenden Kristalle ist dreiseitig; die Kristalle sind rhomboedrisch (Natronsalpeter).

III. Alle Kristalle werden zwischen gekreuzten Nicols hell (oft nur grau) und farbig, sie sind optisch zweiachsig:

- a) alle besitzen gerade Auslöschung, sie sind rhombisch (Chlorblei);
- b) die meisten besitzen schiefe, einige gerade Auslöschung, sie sind monoklin (Gips);
- c) alle Kristalle zeigen schiefe Auslöschung, sie sind triklin (Kupfervitriol).⁴

Mit Hilfe von Gipsplättchen werden die Additions- und Subtraktionsfarben der doppelbrechenden Kristalle bestimmt. Die Gipsplättchen werden dem Polarisationsmikroskop in verschiedener Weise eingeschaltet, teils unmittelbar über dem Objektiv, teils auf dem Okular unter Analysator. Sie sind derart beschaffen, daß sie bei gekreuzten Nicols das Violett erster Ordnung zeigen. Betrachten wir doppelbrechende Kristalle bei eingelegtem Gipsplättchen, dann geht das Violett des Plättchens in andere Farben über; Kristall und Gipsplättchen wirken entweder gleichsinnig, es resultieren Additionsfarben oder entgegengesetzt, es entstehen Subtraktionsfarben. Viele Kristalle erscheinen bekanntlich im polarisierten Lichte silbergrau, dann ist bei eingeschaltetem Gipsplättchen Blau die Additions- und Gelb die Subtraktionsfarbe. Von den Membranen zeigen die kutinisierten Subtraktions-, die zellulosehaltigen Additionsfarben. Bei den Stärkekörnern erscheinen die Arme des Kreuzes in der Farbe des Gesichtsfeldes (bei Benutzung des Plättchens Rot I) rot oder grün. Die zwischen den Armen des Kreuzes liegenden Teile des Kornes zeigen abwechselnd Additions- und Subtraktionsfarben.

Über das Verhalten der Zellbestandteile und der bei den Reaktionen erhaltenen Niederschläge bei gekreuzten Nicols finden sich Angaben im speziellen Teil. Vielfach stehen noch Angaben aus und das polarisierte Licht könnte noch weitere Anwendung finden¹). Zur Diagnose von Pflanzenfasern wurde es von Schacht²) bereits empfohlen. Lenz³) studierte das Verhalten der Jute-, Leinen- und Hanffaser. Eingehend beschäftigte sich Behrens⁴) mit der „spezifischen Doppelbrechung“, sowie Remec⁵). Grundlegend sind die Arbeiten von Ambronn. In der Baumwollfaser fällt die Längsachse der Elastizitätsellipse nicht in

¹) Über das Polarisationsmikroskop geben die Bücher von Ambronn (Leipzig 1892) und Weinschenk (Freiburg i. B. 1910) eingehende Aufklärung.

²) Schacht, Anat. u. Phys. d. Gew., 1856, I, S. 430.

³) W. Lenz, Unterscheidung von Hanf und Flachs, Zeitschr. f. analyt. Chem., 1890, XXIX, S. 133.

⁴) W. Behrens, Anleitung zur mikroch. Analyse, 1896, 2. Heft, S. 3.

⁵) B. Remec, Über die spezifische Doppelbrechung der Pflanzenfasern, Sitzber. Wien. Akad., 1901, CX, 1. Abt., S. 364.

die Richtung der Faserlängsachse, sondern bildet mit ihr verschieden große Winkel. Herzog¹⁾ empfiehlt, vor der Untersuchung Aufkochen der Fasern unter Deckglas in konz. Chloralhydratlösung. Lignin hat auf die Doppelbrechung keinen Einfluß. Fettartige Einlagerungen setzen den Grad der Doppelbrechung herab, der infolge von Organisationseigentümlichkeiten selbst bei gleicher Dicke und gleicher chemischen Beschaffenheit der Membran verschieden sein kann. Selbst jugendliche Zellmembranen sind anisotrop. Mit Hilfe des polarisierten Lichtes kann man Kork (s. d.) von Zellulose unterscheiden. Bei der Untersuchung von Nahrungs- und Genußmitteln ist eine ausgedehntere Benutzung des polarisierten Lichtes nur zu empfehlen, so weist man, um an dieser Stelle nur ein Beispiel aus neuerer Zeit anzuführen, Oliventrester noch bei Zusatz von weniger als 5 % im Pfefferpulver leicht mit Hilfe des polarisierten Lichtes nach. Das Pulver wird mit einer 1 %igen salzsauren Lösung von Paraphenylendiamin befeuchtet und das Präparat nach $\frac{1}{4}$ Stunde bei gekreuzten Nicols untersucht. Die Trester treten sehr scharf gelbrot leuchtend hervor²⁾.

Bestimmung der Brechungsexponenten. Von den Mineralogen wird seit etwa 30 Jahren (seit Thoulet, Bull. Soc. min. France, 1880, III, S. 62) zur Identifizierung von Mineralien als Konstante der Brechungsindex herangezogen. Die Methoden beruhen auf der Beobachtung der Lichterscheinungen an der Grenze zweier Körper von verschiedenen Brechungsexponenten. Der eine Körper ist eine Flüssigkeit von bekanntem Brechungsindex; in diese Flüssigkeit wird der feste Körper, dessen Brechungsindex bestimmt werden soll, eingebettet. Hierauf fußen die Einbettungsmethoden von Schroeder van der Kolk³⁾ und von Kley⁴⁾. Zur Ausführung ist eine größere Anzahl von Flüssigkeiten von bekannten Brechungsindices nötig. Diese Flüssigkeiten hat man in eine Reihe geordnet, und so gewählt, daß zwei benachbarte Glieder der Reihe zur Erzielung von Zwischenwerten miteinander mischbar sind. Die Werte der einzelnen Glieder differieren durchschnittlich um 0,02. Natürlich dürfen sich die zu prüfenden Kristalle in den Flüssigkeiten nicht zu schnell lösen. Ist dies der Fall (besonders wenn nur sehr kleine und winzige Kristalle vorliegen), dann

¹⁾ A. Herzog, Zur Kenntnis der Doppelbrechung der Baumwollfaser, Ztschr. f. chem. Kolloid., 1909, V, S. 246.

²⁾ V. Garola und V. Brain, Recherche du Grignon d'Olive dans le Poivre, Ann. d. Falsificat., 1911, IV, S. 467.

³⁾ Schroeder van der Kolk, Tabellen zur mikr. Bestimmung der Mineralien nach ihrem Brechungsindex, Wiesbaden 1900, II. Auflage 1905 von Beekmann bearbeitet.

⁴⁾ P. D. C. Kley, Rec. d. travaux chim. des Pays-Bas, 1903, XXV, S. 367.

muß man wie Kerbosch¹⁾ verfahren und die betreffenden Flüssigkeiten zuvor mit der betreffenden Substanz sättigen, hat dann allerdings von den gesättigten Flüssigkeiten die Brechungsexponenten mittels Refraktometers festzustellen²⁾.

Man legt nun einige Fragmente oder Kristalle (reguläre) des zu prüfenden Körpers auf den Objektträger in einen Tropfen einer Flüssigkeit mit mittlerem Brechungsexponenten. Mit Hilfe der Beckeschen Linie³⁾ läßt sich feststellen, ob die Substanz stärker oder schwächer bricht als die Flüssigkeit, indem man bei möglichst enger Blendenöffnung auf eine Kante des Körpers scharf einstellt, und während der Beobachtung den Tubus hebt; eine feine, helle Lichtlinie schreitet nun parallel mit der Kante gegen den stärker lichtbrechenden Körper hin fort. Bricht der Körper stärker, dann liegt der Lichtschein gewissermaßen auf dem Körper, bricht er schwächer, dann ist der Körper mit einem Lichtschein gewissermaßen umhüllt, welcher beim Heben des Tubus von dem Körper abwandert. Hat man festgestellt, ob der Körper stärker oder schwächer bricht als eine bestimmte Flüssigkeit, dann wiederholt man den Versuch mit einer anderen Flüssigkeit, wählt aber nicht die mit dem nächst höheren, resp. niederen Index, sondern überspringt einige Glieder der Reihe, um zu Grenzwerten (Grenzflüssigkeiten) zu gelangen. Zwischen diesen operiert man weiter, mischt ev. die benachbarten in Betracht kommenden Flüssigkeiten. Solange die Indices von Körper und Flüssigkeit nicht übereinstimmen, ist die Beckesche Linie gut wahrzunehmen; auch wenn die Indices nur wenig verschieden sind, treten Farbenerscheinungen an dem Rand des Kristalles auf, welche auf der verschiedenen Dispersion von Kristall und Flüssigkeit beruhen und ein schnelles Arbeiten erleichtern. Bei der Beobachtung werden alle Linsen zwischen Spiegel und Objekt ausgeschaltet; es wird mit dem Planspiegel (im parallelen Licht) gearbeitet.

Doppelbrechende Kristalle, denen ein verschiedener Index zukommt, werden in einen Tropfen Flüssigkeit eingebettet, in eine Auslöschungsrichtung zwischen gekreuzten Nicols gebracht. Dann wird der

¹⁾ J. M. Kerbosch, Bildung und Verbreitung einiger Alkaloide in *Papaver somniferum* L., Arch. d. Pharm., 1910, CCXLVIII, S. 536.

²⁾ Die Serie Einbettungsflüssigkeiten mit Indices von 1,46—1,93 nach v. d. Kolk ist bei F. Krantz-Bonn käuflich zu erhalten; ihre Anschaffung ist zu empfehlen, da die Refraktometer kostspielig sind. Doch hat E. Clerici eine Methode ausgearbeitet, um den Brechungsexponent einer Flüssigkeit mit dem Mikroskop bestimmen zu können, die es also gestattet, die Bestimmung des Index von Kristall und Flüssigkeit zu kombinieren (Rendiconti R. Ac. Lincei Roma 1907, XVI, S. 336).

³⁾ Becke, Sitzber. Wien. Akad., 1893, CII, S. 358.

obere Nicol entfernt und der Brechungsindex bestimmt. Nun dreht man den Objektisch um 90° und stellt den Index in der anderen Auslöschungsrichtung fest. Die Versuche werden mit anderen Flüssigkeiten weitergeführt. Kristallographisch richtig ist die Methode, wie Kley betont, bei optisch einachsigen Kristallen, bei optisch zweiachsigen hat man eigentlich drei Indices zu bestimmen; meist, wie bei den Alkaloiden, genügt die Bestimmung von zwei Indices.

Im folgenden sind nach Kolk die Brechungsindices der hauptsächlich in Betracht kommenden Flüssigkeiten angegeben:

I. Hexan 1,37, Heptan 1,39, Cajeputöl 1,46, Olivenöl 1,47, Rizinusöl 1,49, Benzol, Xylol, Buchenkernöl 1,50, Zedernöl 1,51, Nelkenöl 1,53, Anisöl 1,56, Bittermandelöl 1,60, Schwefelkohlenstoff 1,63, α -Monobromnaphthalin 1,66, Methylenjodid 1,76, Phenylsulfid 1,95. — II. Methylalkohol 1,32, Wasser 1,34, Äthyläther 1,36, Äthylalkohol 1,37, Amylalkohol 1,40, Chloroform 1,45, Glycerin 1,47, Kreosot 1,54, Anilin 1,60, Cadmiumborowolframat 1,70, Kaliumquecksilberjodid 1,72, Baryumquecksilberjodid 1,79, Lösung von Quecksilberjodid in Anilin und Chinolin 2,20. — Weiteres muß in der angeführten Literatur ersehen werden.

Das **Ultramikroskop**, mit dem man bekanntlich die Homogenität eines Mediums feststellt, ist auf unserem Gebiete noch nicht in genügender Weise erprobt worden. Überdies steht es nicht jedem zur Verfügung, so daß wir von einem Eingehen absehen können. Die Erfahrungen Gaidukows¹⁾ sind bei den betreffenden Objekten mitgeteilt. Bei der Prüfung gefärbter Gespinste und bedruckter Erzeugnisse der Textilindustrie hat es sich bewährt. Die nach verschiedenen Verfahren gefärbten Fasern lassen im ultramikroskopischen Lichte verschiedene Merkmale erkennen. Färbungen mit unlöslichen und adjektiven Farbstoffen sind gut von direkten Färbungen zu unterscheiden²⁾. Die Membranen lebender in einem optisch leeren Substrat liegender Bakterien treten im Dunkel- felde klar hervor und heben sich scharf vom Inhalte ab. Die Inhalte überstrahlen teils die Membran (wenn sie stark leuchten, Fette, Volutin), teils grenzen sie sich nur unvollständig von der Membran ab (wenn sie schwach leuchten, Glykogen)³⁾.

Tswett⁴⁾ hat bei botanischen Untersuchungen ein von ihm konstruiertes „Luminoskop“ benutzt und in neuerer Zeit bei Chlorophyll- und Cyanophyll-Studien das Fluoreszenz-Mikroskop von C. Reichert, Wien angewandt. Fast alle Stoffe können zur Fluoreszenz erregt werden, zu den wenigen Ausnahmen zählen die roten Blutkörperchen, Porzellan u. a. Dem Fluoreszenzmikroskop steht

¹⁾ N. Gaidukow, Dunkelfeldbeleuchtung u. Ultramikroskopie in d. Biologie u. Medizin, Jena, 1910.

²⁾ J. Schneider u. G. Künzl, Spinnfasern und Färbungen im Ultramikroskope, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1906, XXIII, S. 393.

³⁾ A. Meyer, Notiz über das Aussehen der Bakterien im Ultramikroskop, Arch. f. Protistk., 1911, XXIV, S. 76.

⁴⁾ M. Tswett, Zeitschr. f. phys. Chem., 1901, XXXVI, S. 450; Ber. deutsch. bot. Ges., 1911, XXIX, S. 744 und: O. Heimstädt, Das Fluoreszenzmikroskop, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1911, XXVIII, S. 330.

ein weites Arbeitsfeld offen, auch für angewandte Zwecke. Sehr geringe Beimengungen von Mutterkorn im Mehl lassen sich ohne Schwierigkeit feststellen, denn Stärke fluoresziert dunkelviolett, Mutterkorn gelblichweiß.

Auf die Spektralanalyse ist in diesem Buche nicht eingegangen.

Zählen, Messen, Wiegen.

Das Absuchen der Präparate wird durch Suchtische erleichtert, die gleichzeitig ein sicheres Zählen von Kristallen u. dergl. ermöglichen. Mit den Suchtischen lassen sich bei Heranziehung von Kontrollmischungen auch quantitative mikroskopische Analysen von Nahrungs-, Genuß- und Futtermitteln ausführen¹⁾. Schon der kleine Suchtisch für 36 M. nach A. Meyer wird meist genügen (Seibert-Wetzlar). Größeren Ansprüchen genügen der Engelsche Tisch (Leitz-Wetzlar), der Perquirator nach A. Meyer (100 M., Seibert-Wetzlar) und die Fabrikate anderer Firmen, die in den Preislisten sowie auch meist in der Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie²⁾ eingehend geschildert sind.

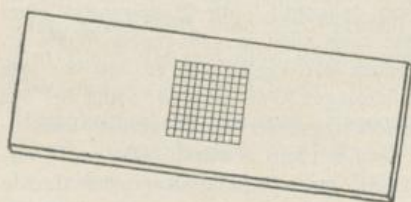


Fig. 18. Objektträger zum Absuchen
(nach O. Linde).

In Ermangelung der Suchtische lassen sich Deckgläser und Objektträger verwenden, die in kleine Quadrate eingeteilt sind. Hansen³⁾ hat schon 1884 zur Erleichterung der Zählung den inneren Teil eines Deckglases mit kleinen Quadraten eingeritzt. Linde⁴⁾ folgt ihm im Prinzip,

wenn er auf dem Objektträger ein Quadrat von 15 mm Seitenlänge einätzt. Das große Quadrat wird durch je neun auf jeder Seite eingezogene Linien in 100 kleine Quadrate gefeldert. Die eingezogenen Linien werden mit Eisenchlorid und Ferrozyankalium blau gefärbt. Die Blaufärbung der Linien läßt sich daher bei längerem Gebrauch leicht auffrischen, ist aber für mikrochemisches Arbeiten nicht zweck-

¹⁾ Hierüber näheres bei A. Meyer, Der Artikel Flores Koso d. Arzneib. und eine Methode der quant. mikr. Analyse. Arch. d. Pharm., 1908, CCXLVI, S. 523, u. Grundlagen u. Methoden f. d. mikr. Unters. v. Pflanzenpulvern, sowie bei G. Bredemann, Die quantitative mikroskopische Bestimmung der Brandsporen (Tilletia-Sporen) in Mehl, Kleie und Getreide, Landw. Versuchsstat., 1911, LXXV, S. 135.

²⁾ 1906, XXIII, S. 145, 1908, XXV, S. 60, 1909, XXVI, S. 80 u. a.

³⁾ E. Chr. Hansen, Über das Zählen mikroskopischer Gegenstände in der Botanik, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1884, I, S. 203.

⁴⁾ O. Linde, Zur Untersuchung des Kosoblütenpulvers, Apoth.-Ztg., 1911, XXVI, S. 136.

mäßig. Die Objektträger liefert Seibert-Wetzlar für 5 M. (Fig. 18). Sie verlangen ein recht vorsichtiges Arbeiten mit kleinen Tropfen, denn ein Austreten der Flüssigkeit über das Zählquadrat muß vermieden werden. Hartwich und Wichmann¹⁾ haben daher um die Einteilung einen Glasrahmen in Deckglashöhe (0,25 mm) aufkitten lassen. Auch bei diesen Zählkammern, die Seibert für 12 M. liefert, darf nur so viel Flüssigkeit genommen werden, daß die Kammer nicht ganz erfüllt ist. Die Kammer gestattet ein Arbeiten bis zur 290fachen Vergrößerung. Ähnliche Dienste, und auch bei stärkeren Vergrößerungen benutzbar, leistet das Okularnetzmikrometer (Zeiss, 5 M.), das auf einem Glasplättchen, welches auf die Blenden der Okulare zu liegen kommt, ein Quadrat von 5 mm, in kleine Felder (0,5 mm) geteilt, zeigt.

Messungen sind in der Mikrochemie häufig vorzunehmen. Nicht nur Membranen und Zellinhalte sowie nativ vorkommende Kristalle sind zu messen, auch die Größenverhältnisse der bei Fällungen erhaltenen Kristalle bieten immerhin einen, wenn auch recht geringen Anhaltspunkt, der aber bei Nachprüfungen angenehm ist. Von den verschiedenen Vorrichtungen zum Messen: Objekt-, Objektiv-, Okularmikrometer, hat sich das letztere, schon seines billigen Preises wegen (5 M.), am meisten eingebürgert. Es ist bekanntlich ein mit dem Maßstabe versehenes Glasplättchen, das auf die Blendung des Okulars zu liegen kommt. Der zu messende Gegenstand des Präparats wird unter den Maßstab gebracht. Die Teilstriche des letzteren müssen deutlich sichtbar sein, sie treten schärfer hervor, wenn man die obere Okularlinse etwas emporschraubt, also der Sehweite des Beobachters anpaßt. Bei genauer Messung muß das Objekt, wenn angängig, unter die Mitte des Maßstabes (nicht an den Endstrich) gebracht werden. Die abgelesenen Teilstriche, mit den dem Mikroskope beigegebenen, auf die Verzögerung sich beziehenden Werten multipliziert, geben die Maße in Mikromillimeter (ein Mikromillimeter = $1 \mu = 0,001 \text{ mm}$) an. Um das Messen in stark gefärbten Präparaten zu erleichtern (vorzüglich für minder Geübte) hat Hartwich (Ztschr. f. wiss. Mikr. u. Apoth.-Ztg. 1901) Okularmikrometer konstruieren lassen (zu beziehen von Zulauf, Zürich), die mit 2 den Teilstrichen gleichlaufenden schwarzen Fäden versehen sind. Der erste Teilstrich ist durch einen feststehenden Faden gekennzeichnet, an diesen wird das Objekt angelegt, der andere schwarze Faden ist verschiebbar und wird an das Ende des Gegenstandes gebracht. Der Wert kann somit nach Entfernung des Präparates bequem abgelesen werden.

¹⁾ C. Hartwich u. A. Wichmann, Einige Beobachtungen an Stärkekörnern und über die Zählkammer, ein Hilfsmittel zur quantitativen Ermittlung von Verfälschungen vegetabilischer Pulver, Arch. d. Pharm., 1912, CCL, S. 452.

Aus den Maßen eines in der Zelle befindlichen Körpers läßt sich, falls die erforderlichen Werte des isolierten Körpers bekannt sind, das absolute Gewicht berechnen, wie es in einigen Fällen von Andrews und Richter bei Kristallen, von Mesnard bei Fetttropfen ausgeführt wurde.

Wägungen werden auf unserem Gebiete gegenwärtig noch nicht ausgeführt. Erst bei weiterem Ausbau der Mikrochemie wird die Mikrowage Eingang in die botanischen Institute finden. Die zweiarmige Hebelwage von Warburg und Ihmori, die Federwage von Salvioni, sowie die Wage von Steele und Grant, die noch 4 μg (ein Millionstel Gramm = 0,001 mg = 1 μg) angibt, sind im Handel nicht zu haben. Es käme im Bedarfsfalle nur die Nernst-Emichsche Wage in Betracht, die leicht zu handhaben ist, mit Fernrohrablesung für Wägungen bis zu 0,005 g bestimmt ist und dabei 1 μg anzeigt. Ohne Fernrohr kostet die Wage 100 M. (Spindler & Hoyer-Göttingen). Eine übersichtliche Abhandlung über die Mikrowagen brachte in neuerer Zeit W. Lenz¹⁾. Alle Bestimmungen, bei denen ein Niederschlag zur Wägung gelangt, können auf mikrochemischem Wege ebenso genau wie makrochemisch ausgeführt werden (Fehler im Mittel 0,3%), erfordern aber bedeutend weniger Substanz (einige Milligramm genügen) und weit weniger Zeit²⁾. — Über Bestimmungen des spezifischen Gewichtes findet sich eine kurze Darstellung bei Emich³⁾, über die Bestimmung des spez. Gewichtes der Stärke mit Hilfe des Regnaultschen Pyknometers eine ausführliche Schilderung bei Hartwich und Wichmann (Lit. s. S. 55).

Dauerpräparate und ihre Anfertigung.

In der Mikrochemie besitzen die Dauerpräparate nicht die gleiche Bedeutung wie in der Anatomie. Frisch hergestellte Präparate sind im allgemeinen vorzuziehen, besonders dann, wenn Fällungen und Niederschläge in den Zellen lokalisiert sind. Damit soll die Bedeutung der Dauerpräparate für mikrochemische Zwecke keineswegs in Abrede gestellt werden, in vielen Fällen werden sie von Wert sein. Die folgenden Zeilen sollen nur dem Anfänger einige Hinweise geben. Wir unterscheiden bei der Anfertigung der Dauerpräparate: die Vorbehandlung der Präparate, den Einschluß sowie den Verschuß (Zukitten) und Signierung. Anschaffung von Hilfsapparaten ist nicht erforderlich, die nötigen Lösungen kann man auch von Grüber-Leipzig beziehen.

Die **Vorbehandlung** hat den Zweck, die Präparate geeignet für das zu wählende Einschlußmedium zu machen. Zarte Präparate, die

¹⁾ W. Lenz, Hilfsmittel zur Bestimmung kleinster Gewichtsmengen, Apoth.-Ztg., 1912, XXVII, S. 189.

²⁾ Die hierzu erforderliche Apparatur liefern die Ver. Fabr. für Laboratoriumsbedarf, Berlin N, Scharnhorststr. 22 für 125 M. (Filtriervorrichtung, Platin-, Quarz-, Glasutensilien, ohne Wage).

³⁾ F. Emich, Lehrb. d. Mikrochemie, 1911, S. 16.

in konzentriertes Glyzerin oder Glyzeringelatine eingeschlossen werden sollen, erleiden beim direkten Übertragen aus Wasser in diese Medien häufig Schrumpfung. Daher saugt man zunächst das Wasser ab, fügt verdünntes Glyzerin zu und läßt die Objektträger (ohne Deckglas) an einem vor Staub geschützten Orte (unter einer Glasglocke) bis zur Vollsaugung mit Glyzerin liegen. Chloralpräparate müssen vor dem Einschließen in Glyzeringelatine mit Glyzerin behandelt werden. Über die Vorbereitung für Balsampräparate s. S. 36. Bei Trockenpräparaten ist eine Vorbereitung bei Sublimaten gewöhnlich nicht erforderlich, bei Fällungen müssen die Mutterlaugen möglichst entfernt werden. Zu diesem Zwecke wird mit einem fein zugespitzten Streifen Fließpapier die Mutterlauge sorgfältig abgesaugt, dann mit etwas Wasser oder verdünntem Alkohol ausgewaschen und die Waschflüssigkeit ebenfalls abgesaugt. Die Wahl der Waschflüssigkeit richtet sich naturgemäß nach der Natur der Kristalle. Die ausgewaschenen und abgesaugten Präparate werden unter der Glasglocke einige Zeit zum völligen Austrocknen liegen gelassen.

Der **Einschluß** erfolgt in Flüssigkeiten oder in Luft (Trockenpräparate). Die Wahl des Einschlußmediums ist von der Natur des Objektes abhängig (gefärbte oder ungefärbte Objekte, bei Kristallen die Löslichkeitsverhältnisse, die Brechungsexponenten von Objekt und Medium u. a.). Die besten Einschlußmedien sind entschieden Glyzeringelatine und von den Balsamen der Kanadabalsam.

Von dem früher vielfach üblichen und sonderbarerweise auch jetzt noch hier und da empfohlenen Einschließen in Glyzerin sieht man am besten ganz ab, denn Glyzerin weist gegenüber der Glyzeringelatine keine Vorteile, wohl aber mannigfache Nachteile auf. Glyzerin (konzentriert, mit gleichen Teilen Wasser verdünnt, oder mit Essigsäure schwach angesäuert) zieht die meisten Farbstoffe nach längerer Zeit aus, gewährt den Objekten im Präparate keinen festen Halt und gestaltet den Verschluß langwierig. Glyzerinpräparate dürfen nicht senkrecht aufbewahrt werden, da die Objekte sonst heruntersinken und dabei, falls sich mehrere in einem Präparate befinden, durcheinander geraten. Man begegnet zuweilen der Angabe, daß das Einschließen in Glyzerin das einfachste Verfahren wäre; es gestatte die Präparate ohne Übertragung, also unter dem gleichen Deckglase, unter dem man die Reaktion vorgenommen, einzuschließen, indem man Glyzerin durchsaugt, den Deckglasrand ordentlich trocknet und mit Asphaltlack verschließt (der gleiche Erfolg läßt sich jedoch bequemer mit Glyzeringelatine erreichen). Reinigung und Verschließung sind bei den lose liegenden Deckgläsern der Glyzerinpräparate recht schwierig. Von über 80 auf obige Weise 1898 hergestellten Präparaten haben sich nur einige wenige gut gehalten, bei der Mehrzahl ist der Lack mehr oder weniger tief unter das Deckglas eingedrungen. Ist man gezwungen, Glyzerin als Einschlußmittel anzuwenden, so muß zuerst auf dem Objektträger aus Xylol-Kanadabalsam (gleiche Teile käuflicher Balsam und

Xylol oder Chloroform) mit einem fein zugespitzten Holzstäbchen (Zahnstocher, Streichholz) oder einem dünnen Glasstäbchen ein Rahmen gezogen werden, der einen etwas größeren Umriß als das benutzte Deckglas besitzt und an einer Stelle nicht völlig schließt. Ist der Balsamrahmen etwas eingetrocknet, so wird er mit Glycerin erfüllt und die Objekte werden eingelegt. Schließlich wird das Deckglas von einer Seite aus auf den Rahmen gelegt und etwas angedrückt, wobei das überschüssige Glycerin durch die offene Stelle des Rahmens austritt und entfernt wird. Dann schließt man die offene Stelle des Rahmens mit Xylolbalsam und nun erst wird der Verschuß angebracht.

Am bequemsten ist das Einschließen in Glyzeringelatine¹⁾. Diese eignet sich für viele Kristallfällungen (Hesperidin, Scutellarin, Osazone) und manche Färbungen. Von der festen Gelatinemasse²⁾ wird das erforderliche Quantum auf dem Objektträger durch gelindes Erwärmen verflüssigt und die Flüssigkeit in annähernder Deckglasgröße mit der Nadel flach gestrichen, wobei sich etwaige Luftbläschen leicht entfernen lassen. In die noch flüssige Gelatine werden die Präparate vom Rande her eingeschoben und nebeneinander möglichst in der Mitte des Tropfens angeordnet. Dann wird das einige Male durch die Flamme gezogene Deckglas von einer Seite aus aufgelegt und angedrückt. Das Andrücken geschieht hier und bei den Balsampräparaten durch einen Korkstopfen, der mit einem kleinen Gewichte beschwert wird. A. Meyer³⁾

¹⁾ 7 g Gelatine (fein zerschnitten) werden mit 42 ccm Wasser über Nacht quellen gelassen, dann werden 50 ccm Glycerin und 1 g Karbolsäure zugefügt; die Mischung wird unter Umrühren bis zum Verschwinden der Trübung erwärmt und noch warm durch ein feines zwischen den Fingern geriebenes Leinwandläppchen in eine passende Deckelkruke koliert. Bei Bedarf wird das nötige Quantum der erstarrten Masse entnommen. Man kann auch die kolierte Masse auf einen Teller in dünner Schicht ausgießen. Die erstarrte Schicht schneidet man „in kleine Würfelchen von ausprobiert, je einen flachen Tropfen bildender Größe“ (Ed. Strasburger, Praktikum, 2. Pensum, auch A. Zimmermann, Mikrotechnik, S. 40). Die Würfelchen werden zum Bedarf in einem verschlossenen Gefäße vorrätig gehalten. Mir scheint hiermit kein Vorteil gegeben zu sein, denn die Menge der Gelatine richtet sich nach der Beschaffenheit (Größe und Dicke) und der Anzahl der Präparate, wechselt somit von Fall zu Fall.

²⁾ Andere bringen einen Tropfen der zuvor flüssig gemachten Gelatine auf den Objektträger. Dann wird entweder das Gefäß mit der Gelatine in warmes Wasser genügend lange eingestellt oder, wie es W. Behrens macht, der die Gelatine in Reagenzgläsern aufbewahrt, nur der obere Teil des Inhaltes über der Flamme geschmolzen. Durch den flüssig aufgetragenen Gelatinetropfen sollen Luftblasen vermieden werden (W. Behrens, Leitfaden der botan. Mikroskopie 1890, S. 174). Abgesehen davon, daß dieses Ziel nicht in erwünschtem Maße erreicht wird, verliert nach eigener Erfahrung die Masse durch das häufige Erwärmen ihr schnelles Erstarrungsvermögen und wird bräunlich.

³⁾ A. Meyer, Mikroskopisches Praktikum, 1907, S. 76.

gebraucht ein mit etwas Schrot gefülltes Glasröhrchen. Andere „Objektpresser“, die mehrfach empfohlen wurden, sind entbehrlich, selbst bei Anfertigung von Serienpräparaten.

Überschüssige Gelatine tritt beim Andrücken des Deckglases aus und wird erst nach völligem Erstarren mit dem Messer abgeschnitten. Hat man zu wenig Gelatine genommen, dann füge man nicht gleich neue hinzu, sondern erwärme zunächst das Präparat nochmals und halte es kurze Zeit etwas schräg, damit die Masse sich nach der leeren Stelle hinziehen kann. Neue Masse setze man erst hinzu, wenn es sich nach dem Anpressen des Deckglases als unbedingt nötig erweist. Man bringt dann mit der Nadel etwas feste Gelatine an den Deckglasrand und erwärmt das Präparat gelinde. Dadurch tritt die zugesetzte Masse unter das Deckglas ein, ohne daß man dieses abzuheben braucht. — Gilt es sehr zarte Objekte einzuschließen, die ein Abheben des Deckglases oder gar ein Übertragen nicht zulassen, so bringt man nach vorsichtigem Durchsaugen von verdünntem Glycerin an den Deckglasrand etwas Glyzeringelatine, die man unter Anwendung von gelinder Wärme unter das Deckglas einsaugt. Sind störende Luftblasen entstanden, so entfernt man diese, indem man das Präparat nochmals erwärmt oder es längere Zeit auf einer warmen Platte (Ofen) liegen läßt. Oft gelingt es, die Schnitte aus Luftblasen an den wieder flüssig gemachten Präparaten durch ein unter das Deckglas geschobenes Roßhaar oder Schnurrbarthaar herauszubringen oder die Blasen an den Rand zu schieben. Derart lassen die Schnitte sich auch zurechtrücken, falls sie beim Auflegen des Deckglases übereinander oder zu nahe dem Deckglasrande gekommen sind. — Kleine Objekte (Pollenkörner, Stärke, Trichome) dringen beim Auflegen des Deckglases meist bis an den Deckglasrand vor, wenn man sie in die flüssig gemachte Gelatine eingetragen hat. Um dieses zu vermeiden, breitet man den flüssigen Gelatinetropfen in Deckglasgröße auf dem Objektträger aus, läßt ihn erstarren, bringt auf die Mitte desselben die Objekte, legt das Deckglas auf und verflüssigt jetzt vorsichtig die Gelatine. Auf diese Weise bleiben selbst sehr kleine Objekte im Gesichtsfelde. — Der Verschuß wird erst nach einem Jahre angebracht. Präparate von Drogen, 1892 mit Glyzeringelatine bereitet, sind jetzt noch von tadelloser Beschaffenheit.

Ein Einschlußmittel, dessen Lichtbrechung der des konz. Glycerins und der Glyzeringelatine gleichkommt, hat Bálint¹⁾ angegeben. Die

¹⁾ S. Bálint, Botanisch-mikrotechnische Notizen, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1910, XXVII, S. 243.

Objekte schrumpfen in dem Gummi-Zucker-Gemisch¹⁾ nicht; auch soll eine Lackumrandung nicht erforderlich sein. Die Schnitte müssen vor dem Einbetten Glyzerin passiert haben. — In gleicher Weise wird das Apáthysche Gemisch benutzt (Ztschr. f. wiss. Mikr., 1892, IX, S. 37; gleiche Teile Gummiarabikum, Rohrzucker und Wasser mit 0,01 % Thymolzusatz). Bei zarten Objekten wird die Mischung mit Wasser verdünnt benutzt; nach dem Einlegen der Objekte läßt man die Präparate an der Luft eindicken.

Kanadabalsam²⁾ ist ein vorzügliches Einschlußmittel; es wird überwiegend für farbige Kristalle und ganz allgemein bei Mikrotomschnitten gebraucht, die infolge ihrer Vorbehandlung besonders hierzu geeignet sind. Die Präparate erhärten allerdings selbst bei mäßiger Wärme erst nach mehreren Tagen (bei Zimmertemperatur erst nach Wochen), zeichnen sich aber durch große Haltbarkeit aus. Vor allem achte man darauf, nicht zuviel Balsam zu nehmen. Im übrigen ist die Ausführung ebenso wie bei der Gelatine. Kanadabalsam ruft oft gute Differenzierungen der Färbungen hervor und hellt die Präparate stark auf. Aber gerade das starke Aufhellungsvermögen ($n = 1,54$) macht den Balsam für zarte und ungefärbte Objekte, wie Stärke, verschiedene Zellmembranen, Diatomeen u. a. weniger geeignet. In solchen Fällen greift man zu anderen Balsamen, so zum venetianischen Terpentin³⁾ (auch anwendbar bei Safranin-, Carmin-, Hämatoxylinfärbungen), zum

¹⁾ Gummi arabicum 40, Hutzucker 60, Wasser zur Lösung, Kaliumazetat 10 g und je 10 ccm Eisessig, Glyzerin und Laktophenol. Die filtrierte Gummilösung wird mit der Zuckerlösung und dem Kaliumazetat gemischt und die Mischung auf dem Wasserbade eingedickt (bis zur Hautbildung), dann mit den anderen Bestandteilen versetzt und in weithalsige Gläser gefüllt. Der entstandene Schaum wird durch Einstellen des Gefäßes in warmes Wasser entfernt.

²⁾ Es ist ratsam, eine Xylollösung von festem Kanadabalsam zu benutzen, der frei von bleichendem Terpinöl ist und besser erhärtet. Fester Balsam wird gepulvert in viel Xylol gelöst, die Lösung wird filtriert, das Filtrat durch freiwilliges Eindunsten zur Sirupkonsistenz gebracht und diese Masse, „Xylol-Balsam“, in Tuben gefüllt. Vorteilhaft bezieht man die Balsamlösungen von Grübler-Leipzig, die saure Balsamlösung ist für Färbungen mit Hämatoxylin und sauren Farbstoffen, die neutrale, die vor Licht und Luft geschützt werden muß, ist für Präparate, die mit basischen oder neutralen Farbstoffen gefärbt sind (nach O. Linde, Die Darstellung pharmakognostischer Dauerpräparate, Apoth.-Ztg., 1910, XXV, S. 837). — Kanadabalsam wurde zuerst 1883 von Hillhouse empfohlen.

³⁾ 100 g venetianischer Terpentin wird mit 100 ccm Alkohol in lose bedeckter Flasche 3 Wochen lang unter Umschütteln mazeriert, bis eine hellgelbe Lösung resultiert. Die Lösung wird nur sehr langsam fest (Vosseler, Venetianisches Terpentin als Einschlußmittel für Dauerpräparate, Ztschr. f. wiss. Mikrosk., 1889, VI, S. 292).

Dammarharz¹⁾ ($n = 1,50$, Teerfarben, farblose Kristalle), Styrax²⁾ ($n = 1,58$, Diatomeen), Metastyrol³⁾ ($n = 1,58$, Kristalle), Tolu-balsam⁴⁾ ($n = 1,64$), α -Monobromnaphthalin ($n = 1,66$, Diato-meen) u. a.

Zu außergewöhnlich großen und dickeren Schnitten eignet sich Gelatine nicht so gut wie Balsam. Die Schnitte werden mit Glyzerin völlig durchtränkt, oberflächlich zwischen Fließpapier abgetrocknet, dann auf dem Objektträger in einen hinreichend großen Tropfen von dünnflüssigem Xylol-Kanadabalsam gebracht, die Luftblasen durch vorsichtiges Erwärmen entfernt und schließlich in Balsam eingeschlossen. Dünne Objektträger dienen als Deckgläser⁵⁾.

Trockenpräparate sind bisher in der Pflanzenmikrochemie wenig beachtet und nur zur Aufbewahrung von Aschenskeletten empfohlen worden. Mit der Einbürgerung der Mikrosublimite kommt den Trockenpräparaten eine größere Bedeutung zu. Die Einbettung ist sehr einfach. Die lufttrockenen Sublimate oder Niederschläge (S. 57) werden mit dem Deckglase bedeckt und dieses mit Wachs oder Paraffin umrandet. Beide Wachse lassen sich in geschmolzenem Zustande mit einem zugespitzten Hölzchen oder einem feinen Pinsel auftragen. Man kann auch von beiden Körpern größere feste Stücke vorrätig halten; bei Bedarf nimmt man eine auf einen Flaschenkork (als Handgriff) gesteckte Haarnadel, die man am Knie erhitzt und heiß in die Stücke einsticht. Das an der Nadel haftende flüssige Wachs wird dann aufgetragen. Liegen zarte Objekte vor, die durch das Deckglas zerdrückt werden können, so zieht man zunächst auf dem Objektträger einen Stützrahmen aus Wachs, auf den das Deckglas zu liegen kommt, welches nochmals umzogen wird. An Stelle des Wachsr Rahmens lassen sich Rahmen von Schreibpapier verwenden (in Form der Pappdeckel zur feuchten Kammer, doch nur von Deckglasgröße). Der Rahmen wird in Wasser etwas eingeweicht, zwischen Fließpapier abgepreßt, mit flüssigem Leim⁶⁾ getränkt und der Überfluß des Kleb-

¹⁾ Mehrtägige Mazeration von gleichen Teilen Damar, Terpentinöl und Benzol; die Lösung wird abgesehen, filtriert und das Filtrat bis zur Sirupkonsistenz der Verdunstung überlassen. Bei Xylol-Damar muß Xylol in mehrfacher Menge zur Lösung genommen werden (Behrens-Küster, Tabellen 1908, H. Behrens, Mikrochemische Technik, 1900).

²⁾ 100 g Styrax in 100 g Chloroform gelöst, die filtrierte Lösung, mit 1000 ccm Benzin versetzt, bis zur Sirupkonsistenz eindunsten lassen.

³⁾ Metastyrol ist eine farblose Flüssigkeit.

⁴⁾ Eine eingedickte Lösung von 100 g Tolubalsam in 300 g Chloroform.

⁵⁾ H. Schenck, Über Einschließen von größeren Schnitten zur Herstellung von Demonstrationspräparaten, Bot. Centralbl., 1893, LIV, S. 1.

⁶⁾ Als Leim empfiehlt F. Emich (Mikrochemie 1911, S. 203 u. 158) „Wisein“ von Th. Schroeter, Leipzig-Connewitz.

stoffes durch Pressen zwischen zwei Objektträger entfernt. Nun wird der Rahmen, dann das Deckglas aufgelegt und letzteres durch Kork und ein größeres Gewicht (200 g) angepreßt.

Einen **Verschuß** pflegt man bei allen Präparaten anzubringen. Präparate, die in einem flüssig bleibenden Medium eingebettet sind, müssen sofort luftdicht verkittet werden, damit die Flüssigkeit nicht verdunsten kann. Wie bei Glyzerinpräparaten benutzt man bei Metastyrol u. a. hierzu Kanadabalsam. Zunächst bringt man einen schmalen Verschußstreifen an, und nachdem dieser eingetrocknet ist, umzieht man nochmals. Ein guter Verschuß muß auf allen Seiten gleich stark sein und gleich weit auf Deckglas und Objektträger übergreifen. Balsampräparate erhalten nach völligem Eintrocknen des Balsams, Gelatinepräparate erst nach 6—9 Monaten einen Lackverschuß¹⁾. Verschußlacke sind in großer Zahl empfohlen worden. Wenn auch die Herstellung der meisten nicht mühevoll ist, so ist es vorteilhafter, sie gebrauchsfertig zu beziehen. Am meisten gebraucht wird Asphaltlack (115 g Asphalt, 120 g Leinöl, 260 g Terpentinöl) und Maskenlack.

Signierung: Schließlich werden die Präparate signiert. Zu diesem Zwecke werden den Objektträgern beiderseits vom Präparate zwei Quadrate aus starkem Papier aufgeklebt, welche die nötigen Bezeichnungen aufnehmen. Zum Ankleben benutzt man Wisein oder flüssigen Leim von Le Page der Russia Cement Co.; beide sind in Tuben und kleben sehr schnell und fest (die früher benutzten Klebmittel: Baumwachs, Gelatine in Eisessig, Gummiarabikum-Kalziumkarbonat u. a. sind nicht so gut). Die Rückseite des Papiers wird mit dem Leim bestrichen, den man erst einige Augenblicke einziehen läßt. Dann trägt man die Etiketten auf, beschwert sie aber nicht direkt, sondern legt die Objektträger um; durch das Gewicht der Objektträger wird eine ausreichende Pressung erzielt.

Wer über Präparatenkästen²⁾ verfügt, kann die Signierung auch direkt auf dem Objektträger vornehmen. Dies wurde besonders früher empfohlen, als gute Klebstoffe nicht zur Verfügung standen und die Etiketten öfters abfielen. Schoebel³⁾ empfahl für schwarze Schrift eine Mischung von 1—2 Teilen Wasserglas und 1 Teil flüssiger chine-

¹⁾ Diese Präparate erhalten eine vorläufige Bezeichnung, d. h. die nötigen Daten werden mit schwarzer Tusche von Günther Wagner-Hannover-Wien direkt auf den Objektträger geschrieben. Die Tusche trocknet sehr schnell, haftet fest am Glase und verträgt trockenes Abwischen. *

²⁾ Bezugsquelle: Th. Schroeter, Leipzig-C.

³⁾ E. Schoebel, Vorschläge zu einer rationellen Signierung von Präparaten und Reagentien, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1894, XI, S. 331.

sischer Tusche (Bezugsquelle: E. Wolff & Son, London), für weiße Schrift 3—4 Teile Wasserglas und 1 Teil chinesisches Permanentweiß (Winsor & Newton, London). Beide Tuschen trocknen jedoch recht langsam, und am einfachsten und besten ist es jedenfalls, mit schwarzer Tusche von Günther Wagner-Hannover-Wien zu signieren. Schiefferdecker¹⁾ empfiehlt ferner die flüssige chinesische Tusche „Atral“ von A. Leonhardi-Dresden und Unna²⁾ die Glastinte aus Gelanth (7,5 g Gelanth, 7,5 g Zinkoxyd, 15 g Wasser, Schwanenapotheke, Hamburg).

Die Präparate können aber auch tadellos in einfachster Weise in die leeren Objektträgerkartons übereinander eingestellt werden, wenn man zu den Etiketten einen Pappkarton von der Stärke der Objektträger (1—1,5 mm) wählt³⁾. Die Etiketten müssen so stark sein, daß bei übereinander geschichteten Objektträgern Deckglas und Lackring des einen Präparates nicht den nächsten Objektträger berühren. Ein auf dem Deckel der Schachtel angebrachtes Verzeichnis erleichtert das Herausfinden der Präparate. Gelatinepräparate, 1901 auf diese Weise eingelegt, sind noch jetzt in gutem Zustande, trotzdem sie mehrere Male mit der Post versandt wurden.

Früher wurde öfters über ein Beschlagen der Deckgläser oder Objektträger bei alten Dauerpräparaten geklagt. Nach Weber⁴⁾ sollte ein zu hoher Prozentgehalt der Gläser an Kalk das Beschlagen bewirken, bei schlechtem Glase verhält sich Kalk zu Alkali wie 1:1,74, bei guten Gläsern beträgt das Verhältnis 1:0,8.

Zur schnellen Herstellung von Halbdauerpräparaten hat sich wiederholt (Aleuron, Agar-Agar-Diatomeen) eine konzentrierte Rohrzuckerlösung (event. mit Thymol versetzt) als brauchbar erwiesen (Tunmann), für Diatomeen ist Chinolin, das sich nur sehr langsam verflüchtigt, geeignet (Amann).

¹⁾ P. Schiefferdecker, Das Signieren von Präparaten, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1896, XIII, S. 299.

²⁾ P. G. Unna, Monatshefte f. prakt. Dermatologie, 1901, XXXII, S. 343.

³⁾ O. Tunmann, Über die Anfertigung einer mikroskopischen Präparatensammlung, Pharm. Ztg., 1906, LI, S. 1079.

⁴⁾ R. Weber, Über den Einfluß des Glases der Objektträger und Deckgläser auf die Haltbarkeit mikroskopischer Präparate, Fortschr. d. Med., 1893, XI, S. 49; Ref. in Ztschr. f. wiss. Mikr.