Mikrogruppe Hamburg

Virtuelles Treffen 24.4.2021

Vortrag: Die Suche nach dem geheimnisvollen Kernschwarz

Praktikum: Botanische Schnitte mit dem Zylindermikrotom

(**Bob Lammert / Sven Kötter**)

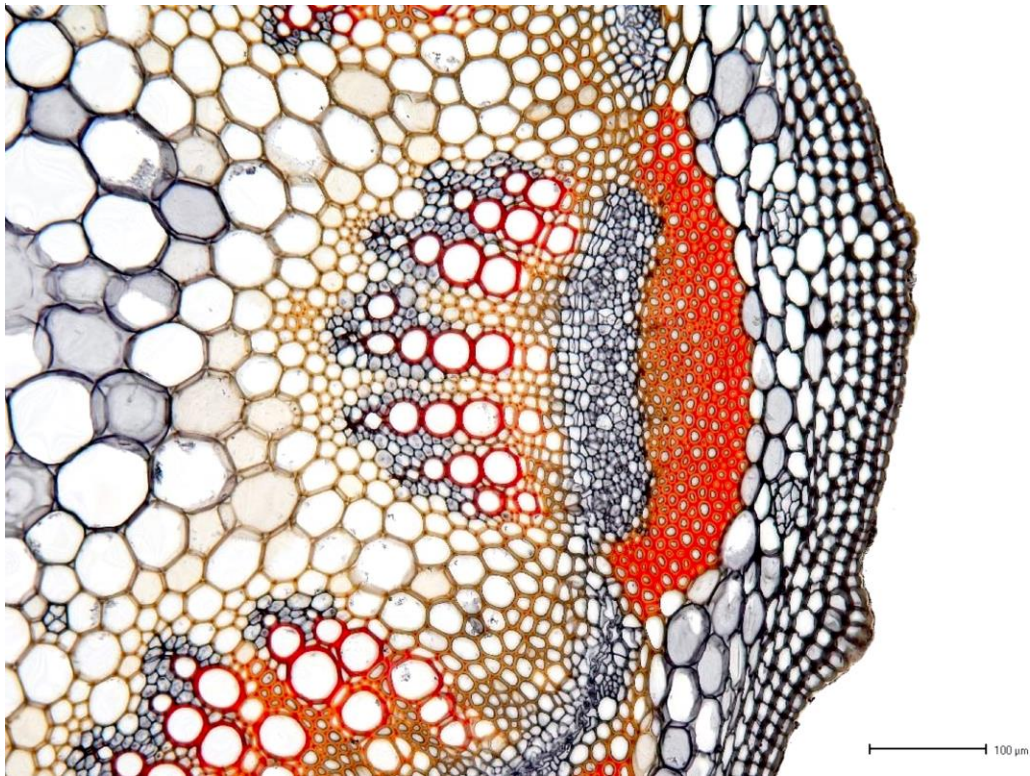
Notizen zum Kernschwarz

- Das Kernschwarz als mikroskopischer Farbstoff wurde erstmals 1887 erwähnt.
  Platner, Gustav: Mitteilungen zur histologischen Technik. Zeitschr. f. wiss. Mikrosk., Bd. IV, 1887, S. 349
- Weil der Farbstoff schon früh Rätsel aufgab, wurde eine Variante ausprobiert und von Grübler & Hollborn in den Handel gebracht. Das neue Verfahren stammt von P. Mayer **(P. Mayer, Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie 26, S. 518, 1909**). Es beruht auf Eisenchlorid, Gallussäure und Ammoniak. Mayer färbt damit Glykogen sehr selektiv an. Wird aber auch in der Botanik beschrieben: "Cellulosewände werden sehr schön und haltbar gefärbt, besonders wenn man die Schnitte vorher mit Eau de Javelle vom Zellinhalt befreit hat“
- Werner Schlüter, Mikroskopie für Lehrer und Naturfreunde, Verlag Volk und Wissen, 1975: Erwähnung einer 5%igen Kernschwarzlösung in dest. Wasser zur Färbung unverholzter pflanzlicher Zellmembranen und Pflanzenkernen
- **Kühne 1888**: „Von Dr. Grübler in Leipzig bezogenes Kernschwarz wurde mit 3-4 Teilen Wasser verdünnt und damit die entwässerten Schnitte einige Minuten gefärbt, bis sie einen dunkelgrauen Ton angenommen hatten. Die dann vorzunehmenden Manipulationen sind folgende: Abspülung in einer schwachen, wässrigen Lösung von kohlensaurem Lithion (Nr. 3), welche gleichzeitig einen Teil der Farbe auszieht, was so lange zugelassen wird, bis der Schnitt einen hellgrauen Ton angenommen hat.“

Notizen zum Kernschwarz

- Ende 2020 hat das Mikroskopisches Kollegium Bonn die verfügbaren Basisdaten zum Farbstoff „Kernschwarz“ unter http://www.mikroskopie-bonn.de/bibliothek/botanische_mikrotechnik/346.html zusammengetragen und deren Stand der Entwicklung einer Ersatzfärbung beschrieben

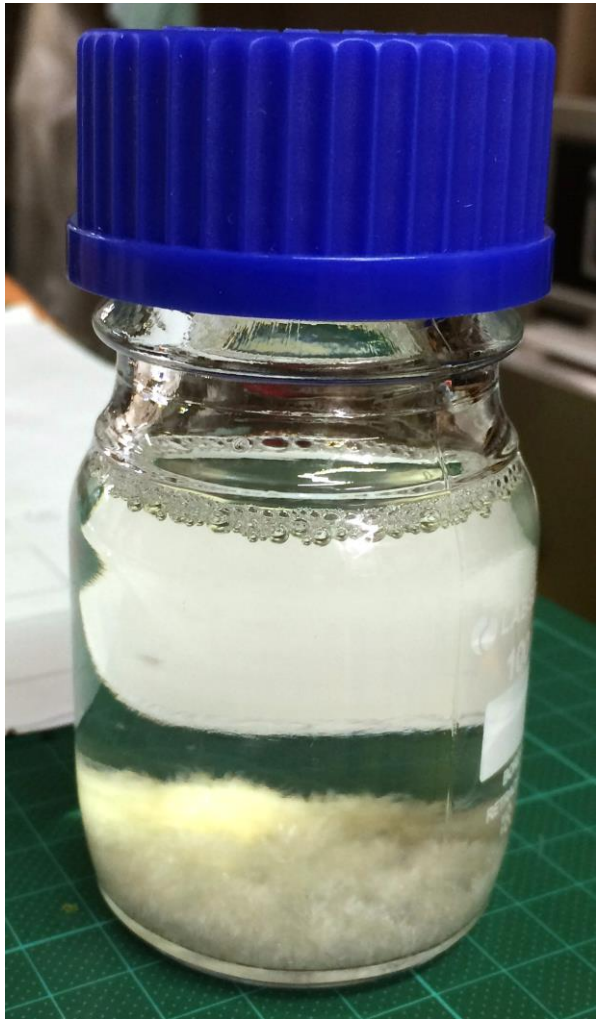
- MKB: Bilder vom Beifussblättriges Traubenkraut (*Ambrosia artemisiifolia*):



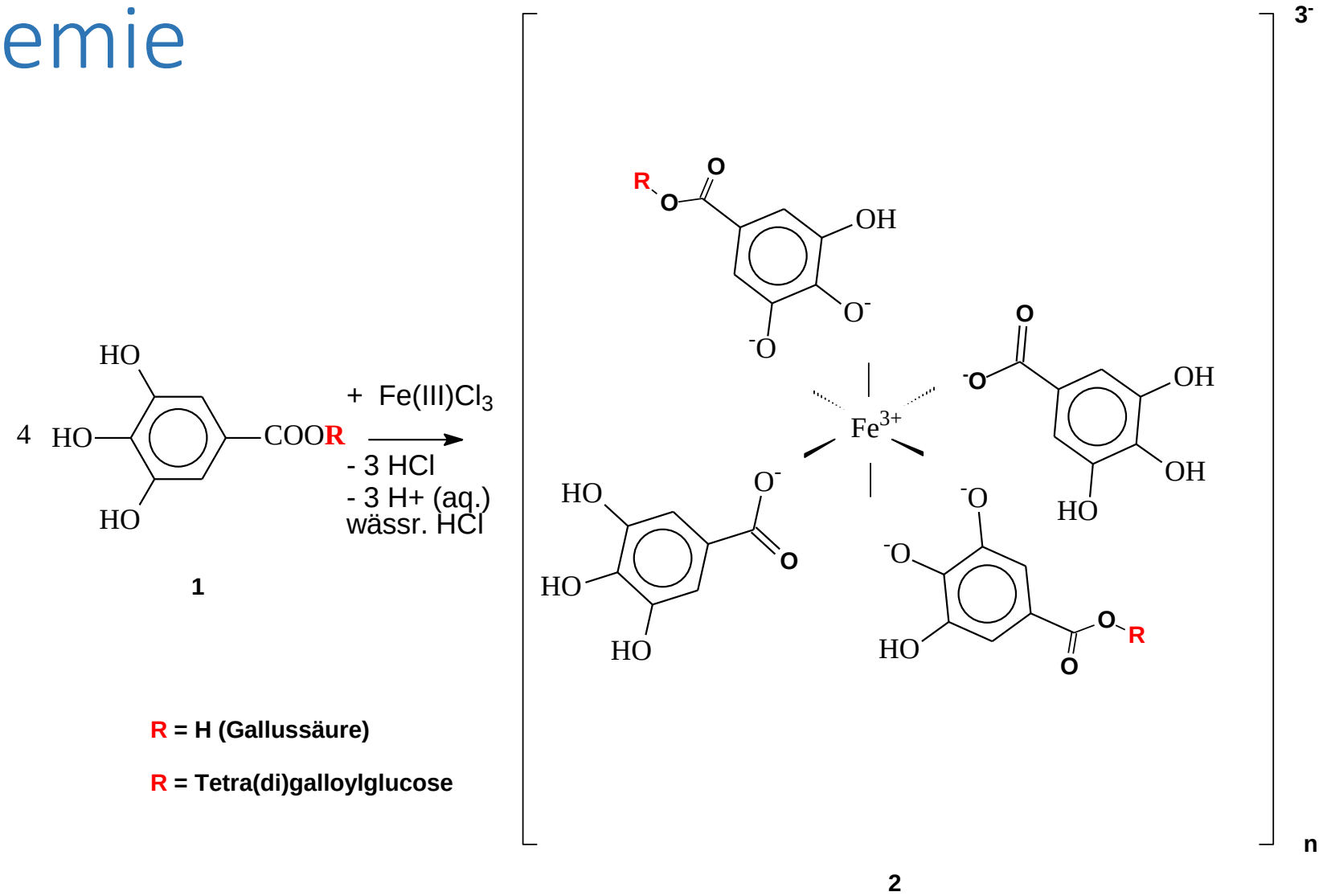
Besteht eine Analogie zwischen dem Kernschwarz und der Eisengallustinte?

zwischen dem ursprünglichen Kernschwarz wohl ja,
zum Kernschwarz von Hollborn, Chroma – nein!

- ist Kernschwarz als Feststoff gleichwertig zu einem Eisen-Gallussäure-Komplex, der *in situ* durch Luftsauerstoff oder Komplexbildung entsteht??? – nein, färbt schlecht
- der Eisen(III)komplex mit Gallussäure ist im ammoniakalischen Bereich stabil, im Sauren flockt er ohne weitere Hilfsstoffe aus, selbst in niedrigen Konzentrationen



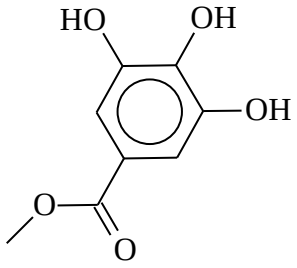
Chemie

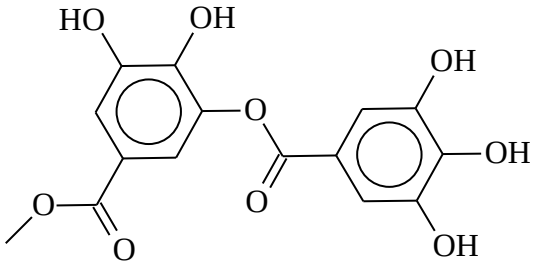


jedes Eisen-Ion ist oktaedrisch über die Sauerstoffatome koordiniert. Eine weitere Assoziation von Fe^{3+} an diesen Komplex führt zur Bildung eines dreidimensionalen Netzwerkes, welches die Cellulosefasern umschließt und somit nicht mehr so einfach entfernbar ist

Abb. 1: Schema eines möglichen Eisen(III)-Komplexes mit Gallussäure und Tannin **1**

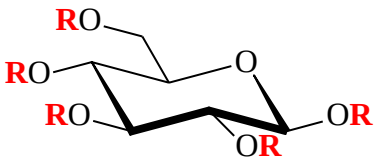
Tannin





R = Gallussäure-Rest

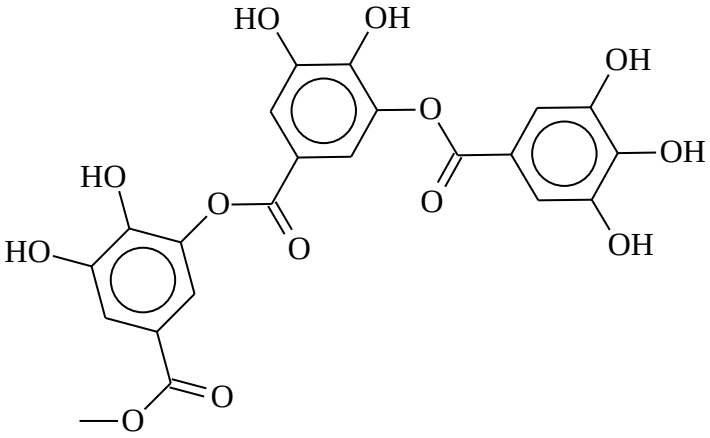
R = Digalloyl-Rest



Tannin

(Gemische von Pentagalloylglucosen $C_{76}H_{52}O_{46}$)

965.25 g/mol



R = ggf. Digalloylgallussäure-Rest

Abb. 5: Schema von Tannin

Römpp Chemie-Lexikon A-Z, 8. Auflage Bd. 6, S. 4121, Franck`sche Verlagsbuchhandlung Stuttgart 1988

Mögliche Nebenreaktionen

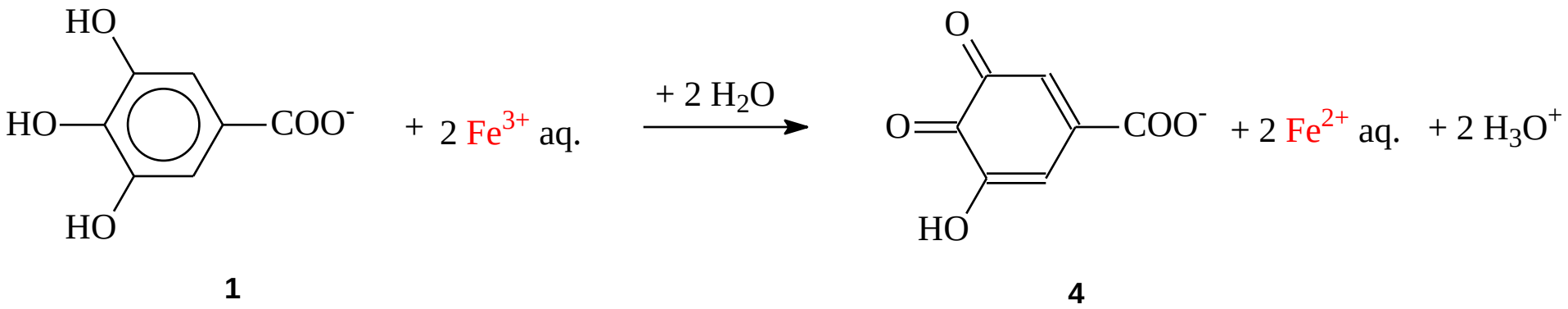


Abb. 4: Gallussäure **1** als Reduktionsmittel kann die Farbigkeit mit der Zeit verringern

pro Fe^{3+} werden 2 Protonen gebildet

Löslichkeit Gallussäure/Tannin

Abb. 7: angesäuertes Gemisch aus Gallussäure und Tannin & Gummi arabicum, dann Zugabe von $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$

Literaturvorschrift adaptiert nach Mayer

- 1,5 g (9.25 mmol) kristallisiertes Eisenchlorid und 1.4 g (8.23 mmol) kristallisierte Gallussäure werden unter Erhitzen in 20 ml Wasser gelöst und nach dem Erkalten 3 ml (ca. 47 mmol) konz. Ammoniaklösung (konz. Ammoniak 25-32 %) hinzugegeben.
  Hierbei fällt zunächst die neue Verbindung ganz aus, löst sich aber im Überschuss des Ammoniaks wieder auf. Man filtriert, setzt 14 ml 90-%igen Alkohol zu, filtriert den Niederschlag und wäscht diesen erst mit ca. 50%igem, zuletzt mit 90% Alkohol aus und trocknet. Das Pulver ist in kaltem Wasser leicht löslich, in 50% Alkohol zu weniger als 2%.
- Mayer empfiehlt, 1 g der festen Substanz zunächst in Wasser zu lösen, dann 30 ml 90% Alkohol zuzufügen und nach längerem Stehenlassen entweder zu filtrieren oder vom Bodensatz abzugießen.

Mayer, P., Zur Färbung des Glykogens, *Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie*, 1909, Bd. XXVI, Heft 4, S.518 ff.

Isolierter Feststoff nach Mayer

Nach Aeisner 5 g Kernschwarz in heißen 100 ml dest. Wasser lösen, nach dem MKB eine Lösung 1:10 verdünnt für Färbungen verwenden.

Kernschwarz/Chrysoidin-Färbung
Vorfärbung für 60 Minuten mit Kernschwarzlösung 1:3 mit Wasser verdünnt.
Nachfärbung für 14 Stunden mit 1%iger Chrysoidinlösung 1:7 mit Wasser verdünnt.

färbt nicht überzeugend, stark reversibel
(ev. mit Zink^{2+} Fasern aufweiten?)

http://www.aeisner.de/daten/kernschwarz.html

http://www.mikroskopie-bonn.de/bibliothek/botanische_mikrotechnik/284.html

Rezeptur **Version 6** (finale Version, Paraffinschnitte)

Eisentinte sauer, 2 Komponenten:

Lösung A:

- zuerst 1.17 g (ca. 1.2 mmol) Tannin in schwach erwärmtem 20 ml dest. Wasser lösen,
- dann Zugabe von 385 mg (2.26 mmol) 3,4,5-Trihydroxybenzoesäure

aufgefüllt mit etwas Thymol auf 50 ml und Filtration nach dem Erkalten

Lösung B:

Es wird eine 2%ige w/w Lösung von $FeCl_3$ wasserfrei nach Filtration verwendet (ca. 12 mM)

Anwendung:

Schnitte mit 3-4 Tropfen Wasser versetzen, 1 Tropfen der Lösung **A** zugeben, kurz hin- und herbewegen, dann 1 Tropfen der Lösung **B** (ohne Abkippen der Lösung **A)** draufgeben und sofort schräg abfließen lassen, mit Wasser gut nachwaschen. Überschuss an Eisen vermeiden!

Rezeptur **Version 8** (finale Version, Frischschnitte)

Eisentinte sauer, 2 Komponenten:

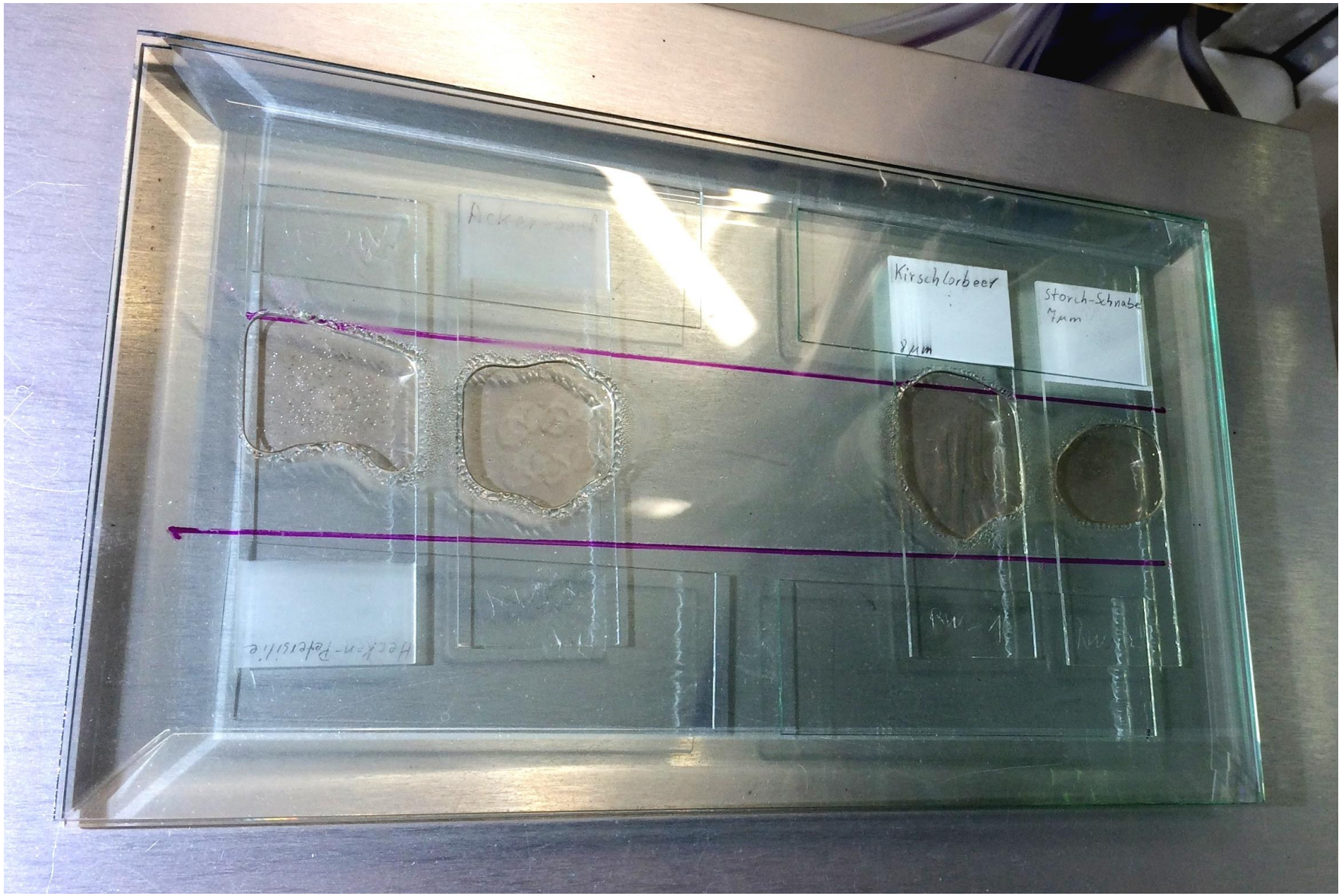
Lösung A:

1 Teil der Lösung A v6 + 4 Teile dest. H_2O (1 : 5 verdünnt)

Meine Empfehlung für Paraffinschnitte:

6 Teile Lösung A **v6** + 3 Teile Lösung A **v8** + 3 Teile Lösung B (6 : 3 : 3)

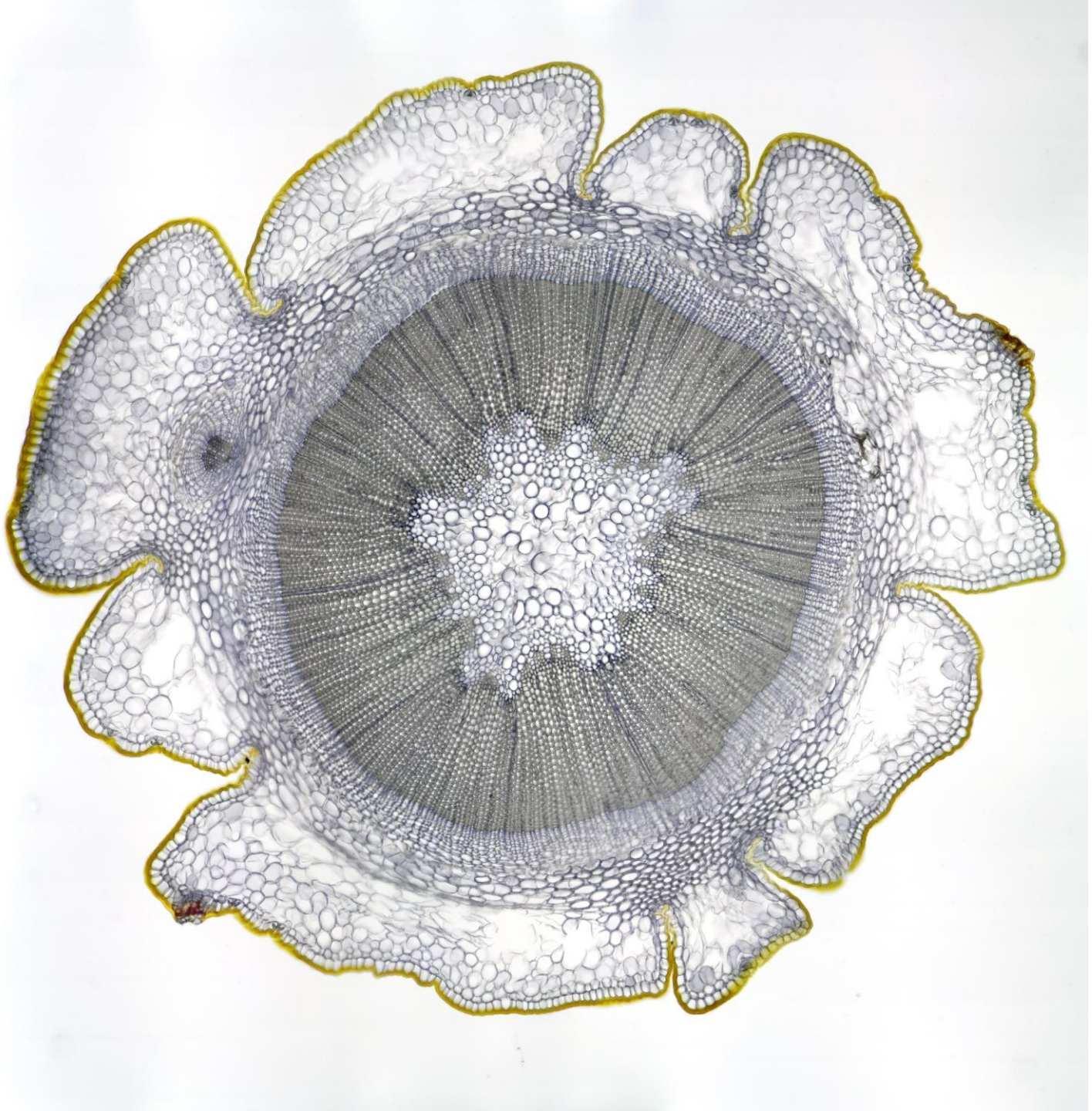
lange Färbezeiten bei höheren Temperaturen:



- einfach 2 Glasplatten mit aufgeklebten Objektträgern als Abstandshalter verwenden

Vorfärbung mit Safranin-Chrysoidin

- *am besten mit stark verdünnten Farblösungen ohne Differenzieren, wenn man den günstigen Zeitpunkt zum "Ausstieg" findet*
- *in Anlehnung an die Vorgabe vom MKB wird mit Safranin O (1 Tropfen in 100 ml Wasser) 1 h bei 40°C (zu lange) gefärbt, danach ohne weitere Differenzierung mit 0.1% Chrysoidin 2 h bei 40°C (auch etwas zu lange)*
- *oder simultan färben mit 0.05% Chrysoidin-Lösung, die 1 Tropfen Safranin pro 100 ml enthält*

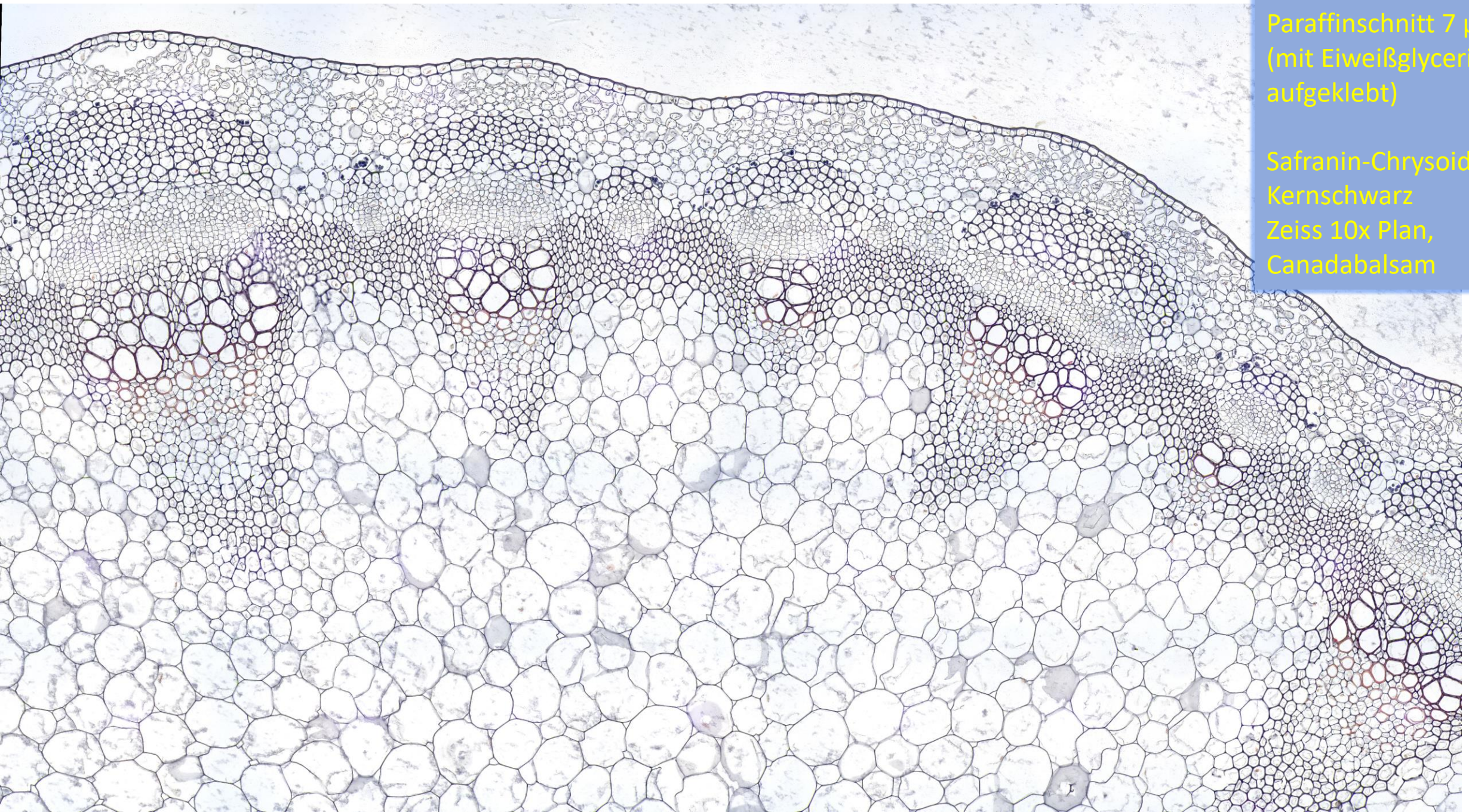


Thuja Handschnitt

nur Kernschwarz
Zeiss 10x Plan, Euparal

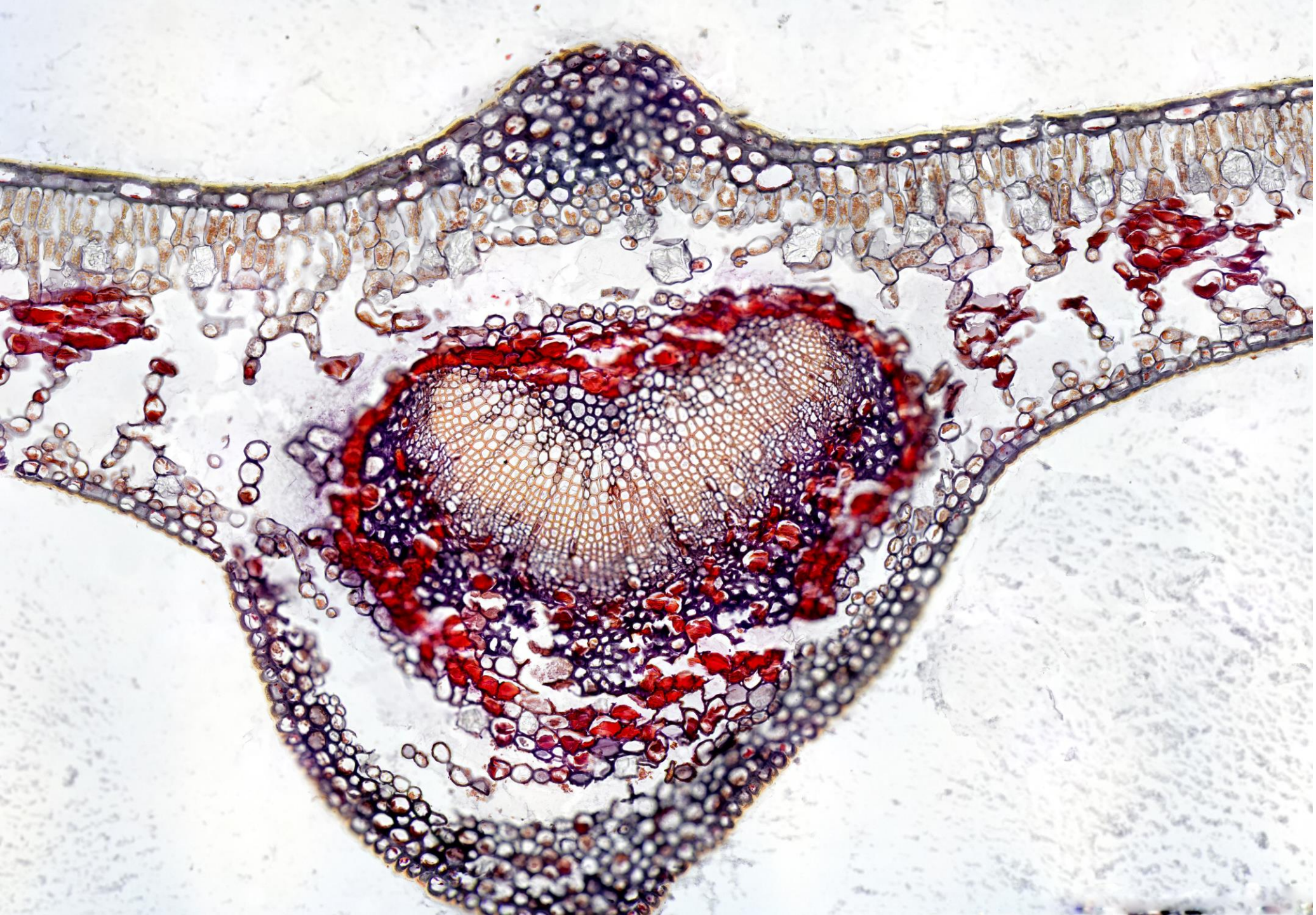
Eisentinte sauer Version 2, ca. 5 min, dünner Flüssigkeitsfilm auf dem Schnitt, Heißluftfön oder ggf. wenige Tropfen der 2%igen Fe(III)chlorid-Lösung hinzufügen. Mit Wasser waschen, entwässern, eindecken

Thuja Handschnitt: Safranin-Chrysoidin-Kernschwarz, Zeiss 25x Plan, Euparal



Acker-Senf
Paraffinschnitt 7 µm
(mit Eiweißglycerin
aufgeklebt)

Safranin-Chrysoidin-
Kernschwarz
Zeiss 10x Plan,
Canadabalsam



Kirsch-Lorbeer
Paraffinschnitt 8 µm
(mit Eiweißglycerin
aufgeklebt)

Safranin-Chrysoidin-
Kernschwarz

Zeiss 10x Plan,
Canadabalsam

Brenn-Nessel
Paraffinschnitt 10 µm

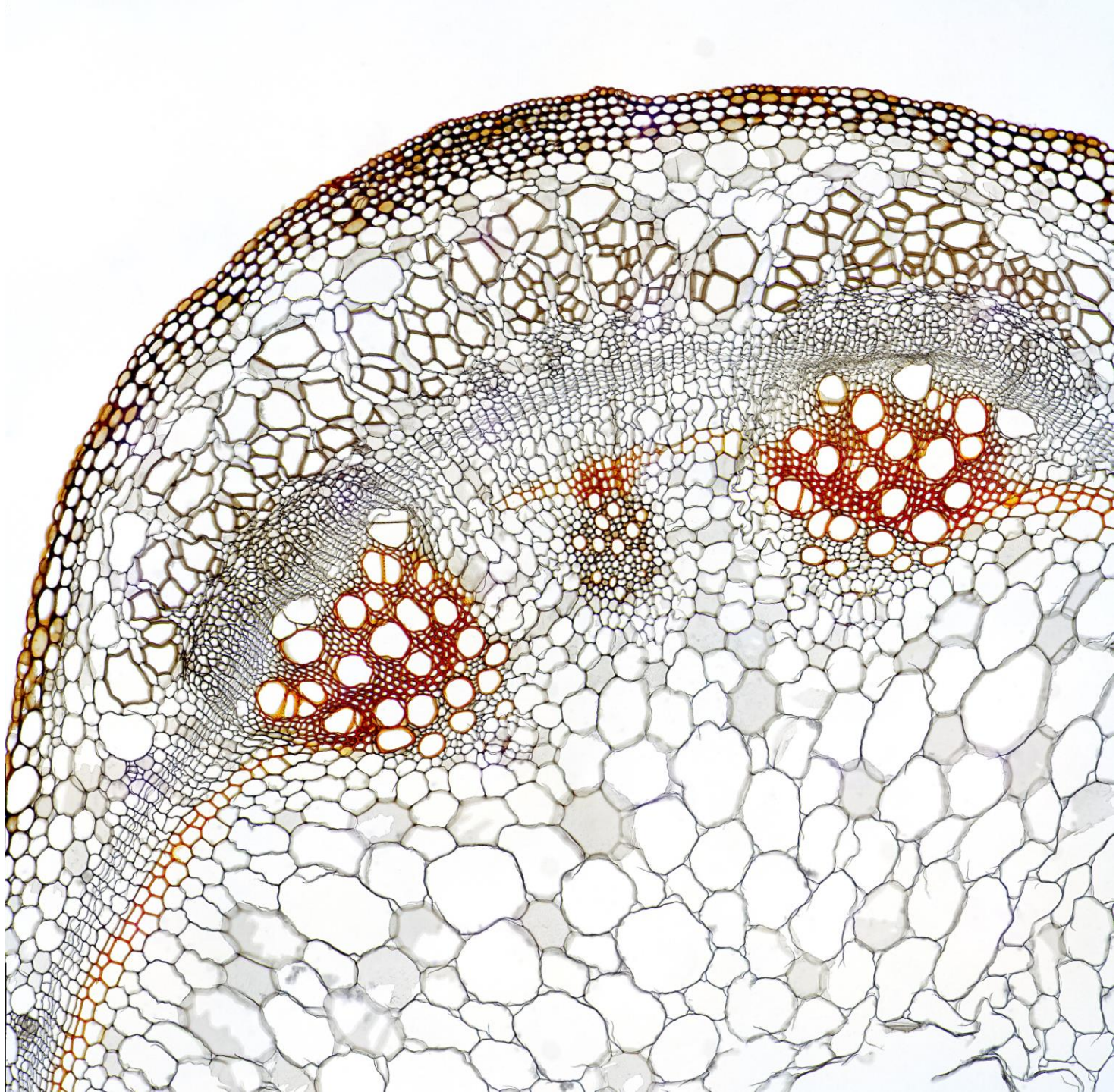
Safranin-Chrysoidin-Kernschwarz

Zeiss 10x Plan,
Euparal

Brenn-Nessel
Paraffinschnitt 10 µm

Safranin-Chrysoidin-Kernschwarz

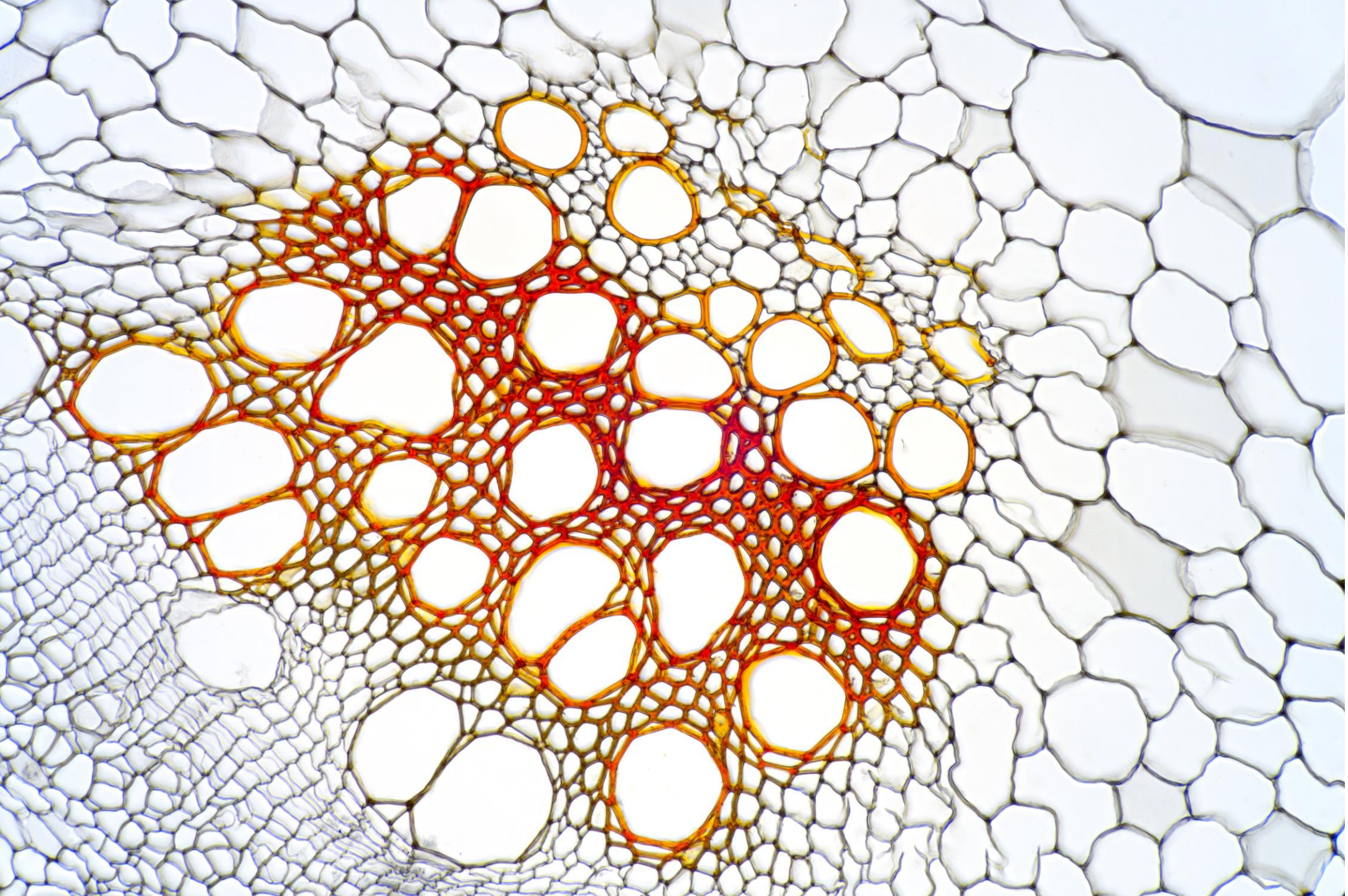
Zeiss 10x Plan, Euparal



Brenn-Nessel
Paraffinschnitt 10 µm

Safranin-Chrysoidin-Kernschwarz

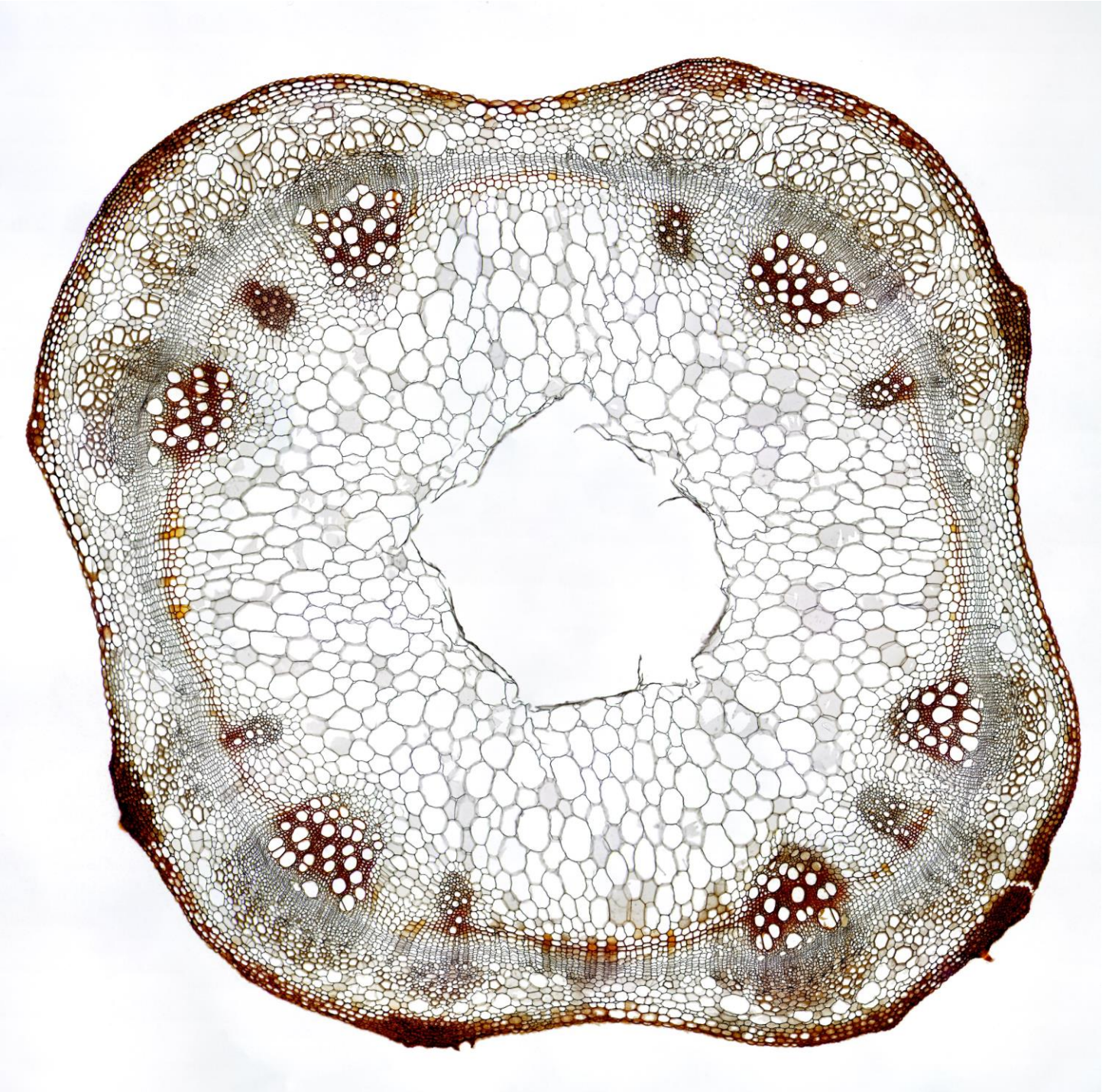
Zeiss 25x Plan, Euparal



Brenn-Nessel
Paraffinschnitt
10 µm

Safranin-
Chrysoidin-
Kernschwarz

Zeiss 10x Plan,
Euparal



Brenn-Nessel
Paraffinschnitt 10 µm

Acridinrot-Acriflavin-
Alcianblau-
Kernschwarz

Zeiss 10x Plan,
Euparal

Brenn-Nessel
Paraffinschnitt 10 µm

Acridinrot-Acriflavin-
Alcianblau-
Kernschwarz

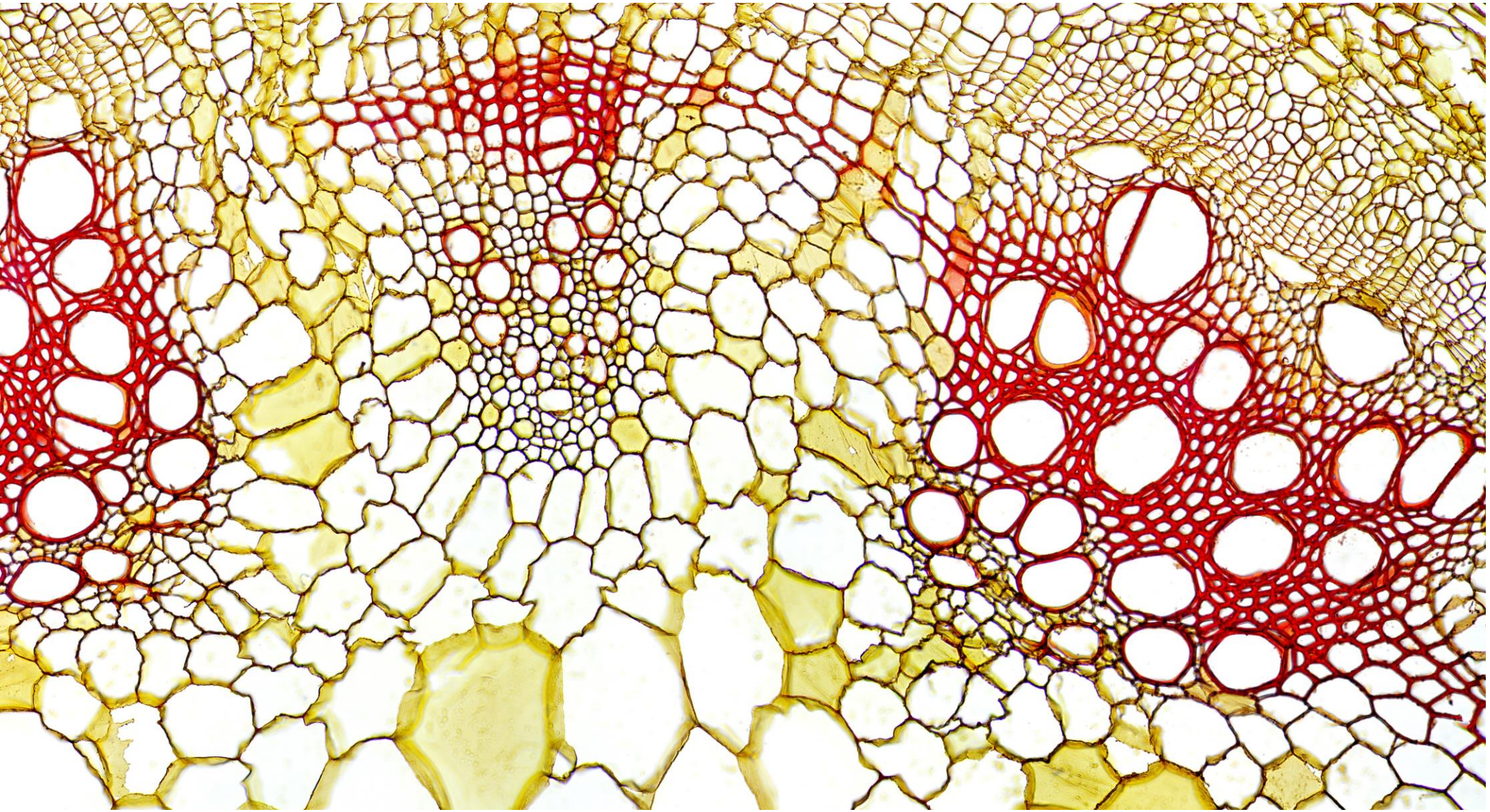
Zeiss 10x Plan,
Euparal

Brenn-Nessel
Paraffinschnitt 20 µm

Acridinrot-Acriflavin-Kernschwarz

Schwarz-Rot-Gold geplant…

Zeiss 10x Plan, Euparal

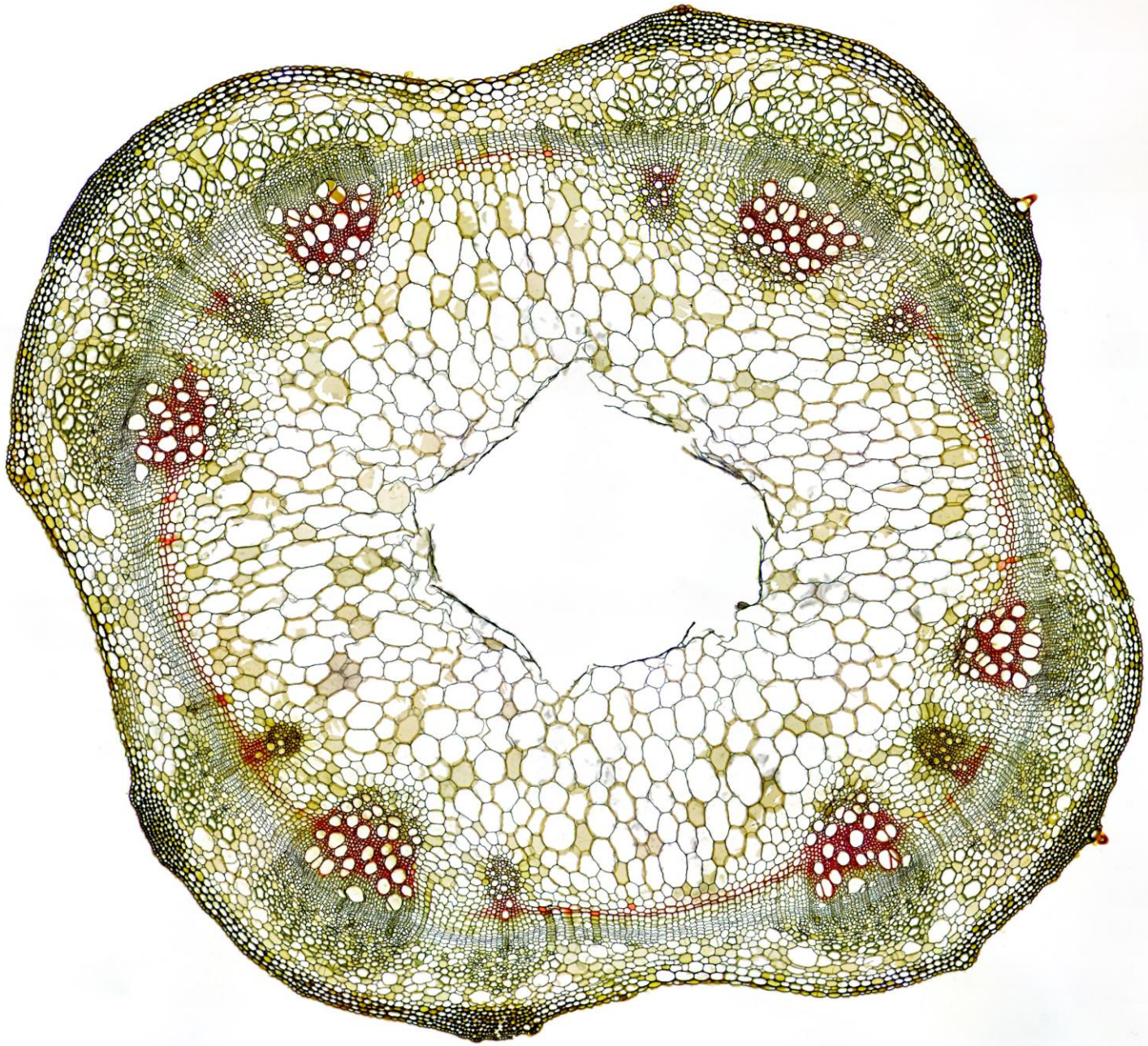


Brenn-Nessel
Paraffinschnitt 20 µm

Acridinrot-Acriflavin-Kernschwarz

Schwarz-Rot-Gold geplant…

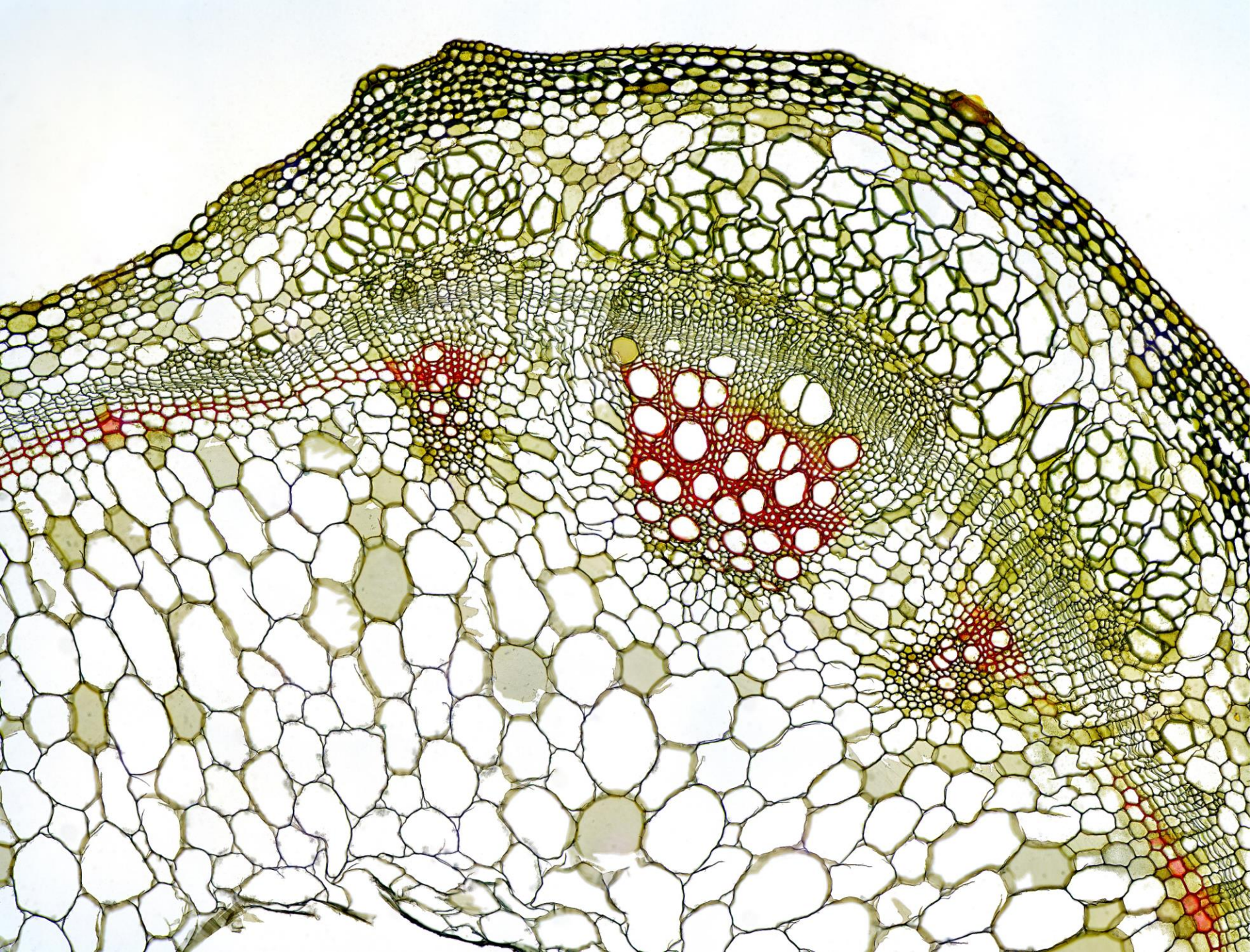
Zeiss 10x Plan, Euparal



Brenn-Nessel
Paraffinschnitt 20 µm

Acridinrot-Acriflavin-
Alcianblau-Kernschwarz

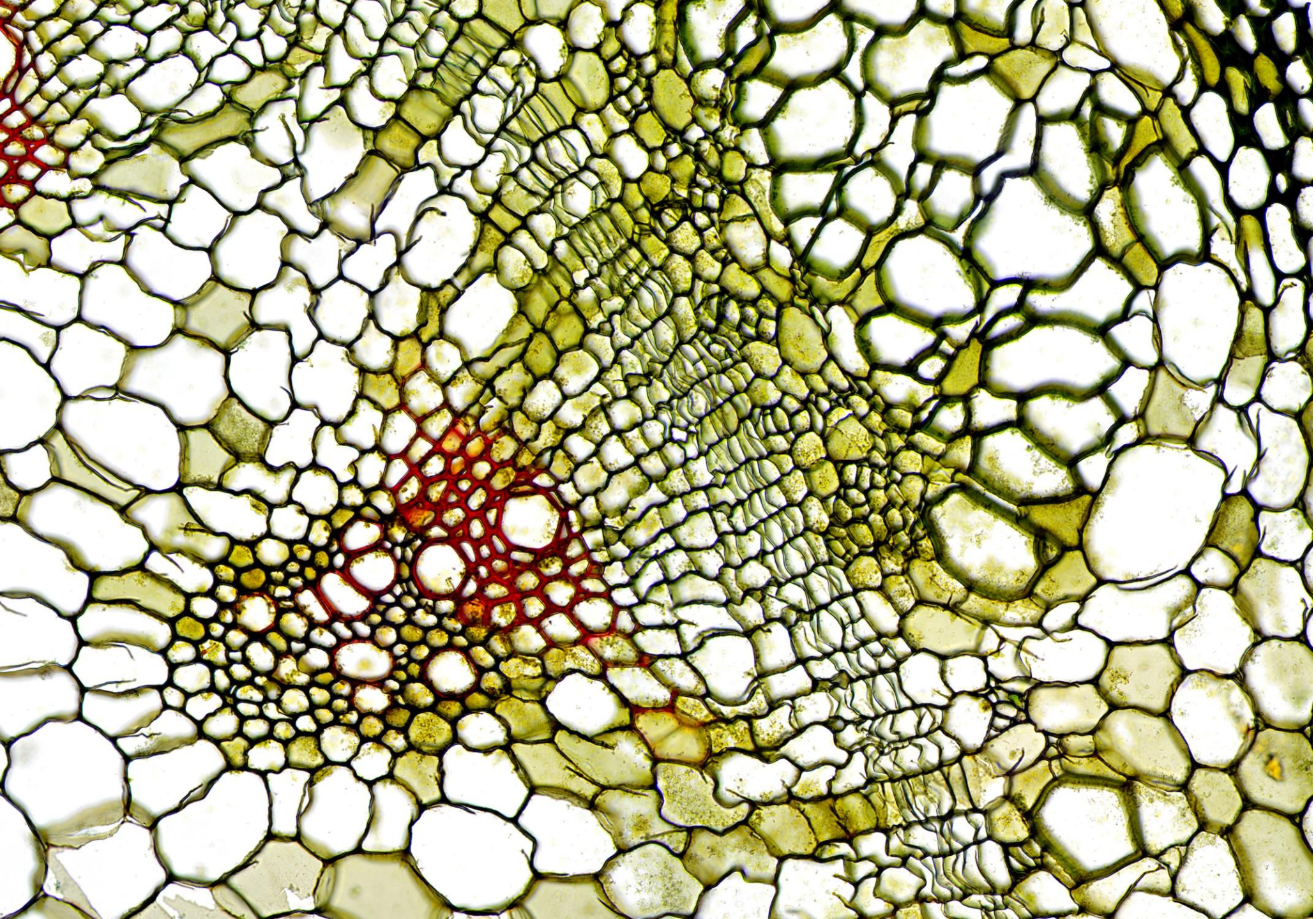
Zeiss 10x Plan, Euparal



Brenn-Nessel
Paraffinschnitt 20 µm

Acridinrot-Acriflavin-
Alcianblau-Kernschwarz

Zeiss 25x Plan, Euparal



Brenn-Nessel
Paraffinschnitt 20 µm

Acridinrot-Acriflavin-Alcianblau-Kernschwarz

Zeiss 25x Plan,
Euparal

Chroma-“Kernschwarz“

- bekannt ist, dass ein zusätzlicher organischer Farbstoff enthalten ist
- Rezeptur unbekannt, pH ca. 4, enthält kein Eisen, zumindest Chroma KS 1!
- hat einen braunen Farbton, passt gut zur orangefarbenen Gegenfärbung
- die Probe von Jürgen (Kernschwarz : H_2O : Ethanol 90% unvergällt 10 : 45 : 45) sieht so aus (links):

Chroma KS 1
(Grübler?)

Versuch eines Nachbaues mit
Bismarckbraun und Anilinschwarz

1% Anilinschwarz

Hamburger Anilinschwarz v1

Chroma-“Kernschwarz“

- bekannt ist, dass ein zusätzlicher organischer Farbstoff enthalten ist
- Rezeptur unbekannt, pH ca. 4, enthält kein Eisen!
- hat einen braunen Farbton, passt gut zur orangefarbenen Gegenfärbung
- die Probe von Jürgen (Kernschwarz : H_2O : Ethanol 90% unvergällt 10 : 45 : 45) sieht so aus (links):

Färbt ausgezeichnet!

Chroma KS 1 (Grübler?)

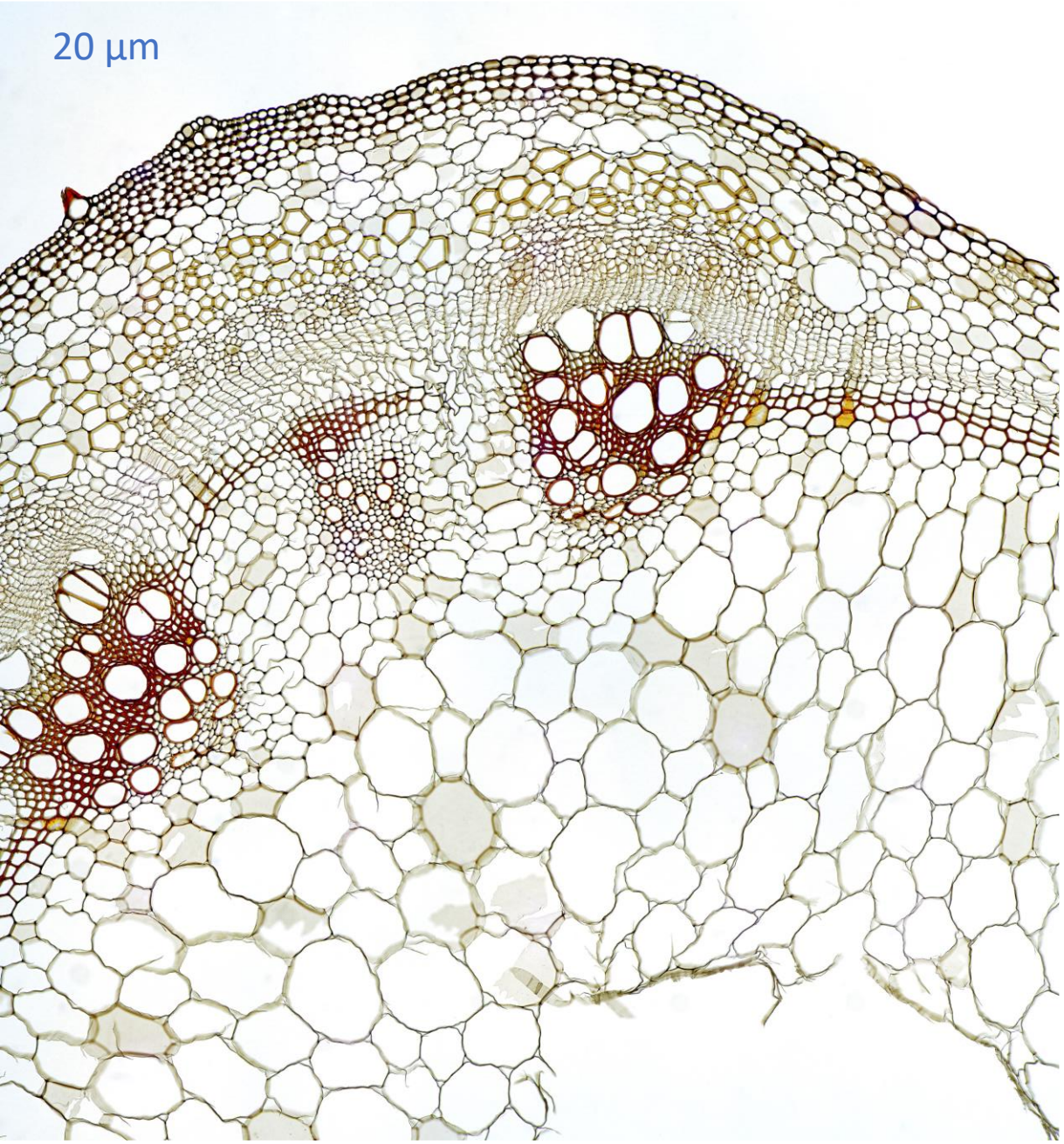
Chroma KS 2 (Hollborn?)

Versuch eines Nachbaues mit Bismarckbraun und Anilinschwarz

1% Anilinschwarz

Hamburger Anilinschwarz v1

Vergleich der Eisengallus- mit der neusten Anilinschwarz-Färbung



Vergleich der Eisengallus- mit der neusten Anilinschwarz-Färbung

Rezepte

Hamburger Anilinschwarz-Färbung Botanik

Benötigte Chemikalien:

Anilinschwarz (CI Pigment Black 1), Bismarckbraun Y (CI 21000), Ethanol, Isopropanol

Bemerkung: analoge Ergebnisse wie eine Eisengallus-Tannin-Färbung

Literatur: NWV Hamburg

Arbeitsablauf:

1. Paraffinschnitte über die Alkoholreihe entwässern
2. Anilinschwarz- mit der Bismarckbraunlösung im Verhältnis 1 : 1 für 60-90 Min bei Raumtemperatur einwirken lassen (je dicker der Schnitt, desto kürzer die Färbezeit)
3. Auswaschen mit dest. Wasser
4. Gegenfärbung z.B. mit Safranin O (1 Tropfen einer 1%igen Lösung in 100 ml Wasser) für 60-90 Min.
5. Auswaschen mit dest. Wasser
6. Färbung mit 0.1% Chrysoidin für 270 Min.
7. schnelles Auswaschen mit dest. Wasser
8. schnelles Entwässern in abs. Isopropanol
9. Einbetten in Euparal oder nach 2x Xylol in Canadabalsam

Ergebnis:

Anilinschwarz färbt nicht verholzte Zellwände rein schwarz mit hoher Randschärfe. Bismarckbraun färbt eher unspezifisch braun, daher ist eine hohe Verdünnung erforderlich. Im Gegensatz zur Eisengallus-Tannin-Färbung ist diese Methode sehr einfach umzusetzen.
Eine Gegenfärbung mit Safranin-Chrysoidin ergibt eine schöne Farbkomposition! Allerdings zieht das Chrysoidin schnell wieder aus, wenn der Schnitt zu lange im Isopropylalkohol mit Wasserspuren belassen wird

Hamburger Anilinschwarz-Färbung Botanik

Ansätze:

- **Anilinschwarzlösung:** Eine 1%ige Lösung von Anilinschwarz in 48%igem Ethanol wird 30 min bei 80°C gerührt, nach Erkalten filtriert und mit 2% Eisessig versetzt. Lange haltbar
- **Bismarckbraunlösung:** Eine 2%ige Lösung von Bismarckbraun in 30%igem Ethanol wird 30 min bei 80°C gerührt und nach Erkalten filtriert. 350 µl dieses Filtrates werden mit dest. Wasser auf 30 ml aufgefüllt und mit 2% Eisessig versetzt. Lange haltbar

Kernschwarz – eine Eisengallus-Tannin-Färbung Botanik

Benötigte Chemikalien :

3,4,5-Trihydroxybenzoesäure (Gallussäure), Tannin, Eisen(III)chlorid, Kali-Alaun, Ethanol, Isopropanol

Bemerkung: analoge Ergebnisse wie mit dem Hamburger Anilinschwarz – nur schneller

Literatur: NWV Hamburg

Arbeitsablauf:

1. Paraffinschnitte über die Alkoholreihe entwässern
2. Färbung z.B. mit Safranin O (1 Tropfen einer 1%igen Lösung in 100 ml Wasser) für 60-90 Min.
3. Auswaschen mit dest. Wasser
4. Färbung mit 0.1% Chrysoidin für 270 Min.
5. schnelles Auswaschen mit dest. Wasser
6. (ggf. wenige Tropfen einer 5%igen Kali-Alaun-Lösung 30 s einwirken lassen, kurz waschen)
7. 3-4 Tropfen der Lösung **A** auf den Schnitt geben, dann 1 Tropfen der Lösung **B** (ohne Abkippen der Lösung A) dazugeben und nach ca. 10-15 s schräg abfließen lassen)[1]
8. schnelles Entwässern in abs. Isopropanol
9. Einbetten in Euparal oder nach 2x Xylol in Canadabalsam

Kernschwarz – eine Eisengallus-Tannin-Färbung Botanik

Ansätze:

- **Lösung A:**
  - zuerst 1.17 g (ca. 1.2 mmol) Tannin in schwach erwärmtem 20 ml dest. Wasser lösen,
  - dann Zugabe von 385 mg (2.26 mmol) 3,4,5-Trihydroxybenzoesäure
  - aufgefüllt mit etwas Thymol auf 50 ml und Filtration nach dem Erkalten
- **Lösung B:** Es wird eine 2%ige w/w Lösung von $FeCl_3$ wasserfrei nach Filtration verwendet (ca. 12 mM)

)[1] Für dünne Paraffinschnitte hat es sich bewährt, die Lösung **A** 1 : 5 zu verdünnen.
Anwendung mit 6 : 3 : 3 = 6 Teile Lösung **A** + 3 Teile verdünnte Lösung **A** + 3 Teile Lösung **B** ergibt eine homogene schwarze Farblösung, die keine Punkte im Schnitt hinterlässt und bei schneller Anwendung auch nicht allzu viel unspezifisch anfärbt