

## Kapitel IV Farbstoffe und Färben

**§ 87. Zweck des Färbens.** Objekte, die nicht genügend Einzelheiten erkennen lassen, da sie zu schwach oder gleichmäßig gefärbt sind, können mit Gewinn erst dann im Mikroskop studiert werden, wenn durch die Anwendung von Färbungen die Einzelheiten besser in Erscheinung treten. Zwar läßt eine tote Zelle manchmal ohne Färbung Plasma und Einschlüsse erkennen, aber der Aufbau des Kernes und die sonstigen Einzelheiten treten erst dann deutlich hervor, wenn es gelungen ist, durch Färbung optische Unterschiede der einzelnen Bestandteile zu erhalten. Die Färbungen müssen daher, wenn sie ihren Zweck erfüllen sollen, so ausgeführt werden, daß die einzelnen Elemente deutlich hervortreten und von anderen Elementen möglichst durch eine andere Farbe abstechen, mindestens aber durch eine andere Stärke der Tönung.

Die erste botanische Färbung wurde im Jahre 1843 von den Botanikern *P.Cohn* und *Göppers* in *Breslau* mit Karmin ausgeführt. Im Jahre 1865 wurde von *Böhmer* das Hämatoxylin angewandt und 1875 endlich wurde durch *Weigert* die erste Bakterienfärbung mit Methylviolett durchgeführt.

Zur Zeit verfügen Technik und Wissenschaft über eine geradezu ungeheuer große Anzahl von Farbstoffen, von denen aber nur eine kleine Auswahl in der mikroskopischen Technik Verwendung findet. Die Auswahl von Farbstoffe, die für die Bearbeitung der Kryptogamen in Frage kommt, ist noch kleiner.

Die Farbstoffe für wissenschaftliche Zwecke sind fast ausnahmslos von der Technik der Textilienfärberei übernommen worden. Da nun die Anforderungen der Textilindustrie an ihre Farben mit dem Wechsel der Spinnstoffe (Kunstseide usw.) selbst dem Wechsel unterliegen, wechselten auch manchmal die Farbstoffe. Gleichgeblieben ist jedoch der Name der Farben, hauptsächlich aus kaufmännischen Gründen. So kommt es vor, daß bewährte Farbstoffe wie z.B. Magdalarot oder Karmin dem Wissenschaftler nicht mehr zuverlässig erscheinen. Ja, es hat sogar dazu geführt, daß die Veröffentlichungen früherer Autoren nachträglich angezweifelt wurden. Sehr zu Unrecht natürlich. Jetzt werden unter der Bezeichnung *Standardisierte Farbstoffe "Bayer"* (35) Farben für wissenschaftliche Zwecke in den Handel gebracht, die ein für allemal die gleiche Zusammensetzung aufweisen.

Im folgenden wird nun das Wichtigste über Farbstoffe kurz ausgeführt. Allgemeines über organische Farben

(35) Farben für mikroskopische Zwecke auch in kleineren Mengen geben ab:

*Dr.K.Hollborn & Söhne*, Leipzig S 3, Hardenbergstraße 3

*Dr. G. Grübler & Co.*, Leipzig C 1, Liebigstraße 1-b

*Franckh'sche Verlagshandlung W. Keller & Co.*, Stuttgart S, Heusteigstraße 44

### § 88.

1. Als Farben geeignet sind chemische Verbindungen, die selbst farbig sind, d.h. das Licht selektiv absorbieren und sich fest mit dem Färbegut vereinen lassen.

2. Die in der Mikroskopie verwendbaren Farben sind, wie schon einmal erwähnt, fast alle der Färbereitechnik entnommen. Nur die künstlichen Beizenfarbstoffe nach *Becher* sind ausschließlich für die Zwecke der Wissenschaft entwickelt worden, aber auch hier wieder unter Verwendung von Farben, die in anderer Weise von der Technik schon genutzt worden waren.

Für den Mikroskopiker erweist es sich nun sowohl für das theoretische Verständnis des Färbungsvorganges als auch für die praktische Durchführung der Färbung als nützlich, ja sogar als notwendig, über Farbenchemie und über die technische Textilfärbung in den Grundzügen das Allerwichtigste kurz kennenzulernen. Auftretende Schwierigkeiten werden um so leichter behoben und viele Mißerfolge treten überhaupt gar nicht erst auf, wenn an die Stelle des planlosen Herumprobierens ernste wissenschaftliche Überlegungen treten.

3. Das Färben der Textilien wird in wässrigen Bädern vorgenommen, die Flotte genannt werden. Da die zu färbenden Objekte sehr umfangreich sind, werden die Farben und die sonstigen

Zusätze in Gewichtsprozenten der zu färbenden Textilien berechnet. In der mikroskopischen Technik ist die Farbe immer im Überschuß vorhanden.

4. Der Färbeprozess selbst ist noch nicht genügend erforscht. Teils ist er rein chemisch, teilweise ein Adsorptions- bzw. ein Absorptionsprozeß, also physikalisch.

5. Um die Farbstoffe besprechen zu können, muß man sie in irgendeiner Weise einteilen und aufzählen. Dies kann entweder nach chemischen oder nach praktischen Gesichtspunkten geschehen. Die chemische Einteilung der organischen Farben unterteilt die Farben in

1. **Azofarbstoffe**, welche die größte Gruppe darstellen. Man unterscheidet saure Azofarbstoffe, basische Azofarbstoffe oder auch Monoazofarbstoffe, Disazofarbstoffe, Benzidinfarbstoffe, Tris- und Polyazofarbstoffe.
2. **Nitroso- und Nitrofarbstoffe**
3. **Chinone**. Man unterscheidet Benzochinone, Naphthachinone und Anthrachinone.
4. **Di- und Triphenylmethanfarbstoffe**
5. **Xanthenfarbstoffe** mit den Unterabteilungen der Pyronine und Phthaleine
6. **Akridinfarbstoffe**
7. **Azinfarbstoffe**
8. **Oxazinfarbstoffe**
9. **Thiazinfarbstoffe**
10. **Küpenfarbstoffe**, die wieder eine große Gruppe von Farbstoffen umfassen. Hierher gehören der Indigo, die neuen Indanthrenfarbstoffe, die meisten Schwefelfarben.

Jedes Lehrbuch über Farbchemie teilt die Farben etwas anders ein, je nach dem persönlichen wissenschaftlichen Standpunkt des Verfassers.

§ 89. Die praktische Einteilung der Farbstoffe beruht auf dem Färbefeffekt bei den verschiedenen Stoffarten. Man unterscheidet hier:

1. **Basische Farbstoffe**. Sie färben Baumwolle und Kunstseide nach vorausgegangener Gerbstoffbeize. Hierher gehören z.B. Methylgrün, Methylviolett, Safranin, Fuchsin, Bismarckbraun.
2. **Saure Farbstoffe**. Sie färben Wolle, Seide und Jute. Hierher gehören z.B. Eosin, Lichtgrün, Säurefuchsin, Pikrinsäure, manche Anthrachinonfarbstoffe.
3. **Substantivische Farbstoffe**. Sie färben Baumwolle, Seide und Wolle direkt ohne vorhergehende Beize. Hierher gehören Benzoazurin, Benzopurpurin, Kongorot.
4. **Beizenfarbstoffe**. Sie färben Baumwolle, Seide und Wolle erst nach vorausgegangener Beizung. Hierher gehören Hämatoxylin, Brasilin, Karmin.
5. **Entwicklungsfarbstoffe**. Sie färben Baumwolle und Kunstseide. Hierher gehören Anilinschwarz, Paranitranilinrot, Naphtholrot, Echtrot.
6. **Küpenfarbstoffe**. Sie färben Baumwolle, Kunstseide, Wolle und Seide in der Form der Farbküpe. Hierher gehören Indigo und die Indanthrenfarben.
7. **Schwefelfarben**. Sie färben substantivisch bei Anwesenheit von Schwefelnatrium Baumwolle. Hierher gehören Vidalschwarz, Pyrogenblau.

Dazu kommen noch weitere Farben für Papier, Leder, Holz, Tapeten, Fette und Wachse und für das graphische Gewerbe. Sie sind sämtlich ohne Interesse für die Mikroskopie.

§ 90. Die **Benennung der Farbstoffe** ist nicht nach einem einheitlichen Gesichtspunkt durchgeführt worden. Meistens tragen die Farben Phantasienamen wie Gentianaviolett, Fuchsin, Echtrot usw. Oder sie haben alte Volksbezeichnungen wie Indigo, Krapp beibehalten.

Eine Bezeichnung nach dem chemischen Aufbau ist sehr schwierig, umständlich und dem Nichtchemiker nicht immer verständlich. Vielfach wird ein und derselbe Farbstoff von den verschiedensten Fabriken hergestellt und dann jedesmal mit einem anderen Namen versehen. So

kommt es, daß z.B. ein und dasselbe Grün bis zu zwanzig verschiedene Namen aufweisen kann. Wer also nur nach dem Katalog ohne Kenntnis der tatsächlichen Verhältnisse sich verschiedene Farben bestellt, kann mehrmals denselben chemischen Körper erhalten. Gerade für den Anfänger ist die Kenntnis der hier vorliegenden Verhältnisse wichtig.

Die Farben werden von den Fabriken in großen Mengen, vielfach oft mehrere hundert Kilogramm pro Arbeitsgang, hergestellt. Jeder Arbeitsgang liefert aber ein etwas unterschiedliches Produkt. Die Fabriken vermischen nun die Erzeugnisse vieler Arbeitsgänge miteinander und stellen nach Probefärbungen so eine Handelsmarke mit bestimmter, vom Verbraucher erwarteter Färbekraft her. Manchmal ist dazu die Beigabe von Neutralstoffen wie Dextrin oder Glaubersalz usw. nötig. Diese Einstellung ist für die Textilienfärberei wichtig, da ja die Farbe in der Flotte nach Gewichtsmengen angesetzt wird. Die Farbenfabriken fügen nun zu ihren Farbennamen noch Buchstaben an wie O, G, B oder 5 B und so weiter. Diese Buchstaben sind entweder ganz willkürlich gewählt und bezeichnen nur etwas für die kaufmännische oder technische Leitung der betreffenden Fabriken Wichtiges, oder sie geben dem Verbraucher einen Hinweis und haben dann z.B. folgende Bedeutung:

- O** heißt Grundton oder Originalton, das bedeutet, die Farbe ist nicht mit anderen Farben versetzt, geschönt oder verschnitten.
- L** heißt leicht löslich oder für Leinenfärberei, auch lackbildend.
- S** heißt seidefärbend, oder saure Farbe ( Sulfosäure, Bisulfitverbindung ).
- W** heißt wollefärbend, **HW** halbwohle färbend.
- G** heißt gelblich oder grünlich.
- R** heißt rot, rötlich. **RR** oder **2 R** ist dann stärker rot.
- B** heißt baumwollfärbend, blau. **BB**, **5 B** usw. noch blauer als der Grundton.

Eine Übersicht über alle bisher bekannt gewordenen Farben geben die Farbstofftabellen von *G. Schulz-Julius*. Der Leser dieses Buches findet als Anhang eine Zusammenstellung der wichtigsten chemischen Eigenschaften, der Löslichkeit, Echtheit, sowie der wichtigsten färberischen Eigenschaften von einigen häufig in der Literatur erwähnten organischen und anorganischen Farben.

[ Am besten informiert man sich in dem mehrbändigen Werk *Colour Index* über die verschiedenen Farbstoffe. Hat der Farbstoff eine CI-Nummer ( Color-Index-Nummer ), so ist die Identifizierung eindeutig; es ist aber auch möglich, den Farbstoff über einen seiner vielen Handelsnamen aufzufinden ]

## Das Färben

§ 91. In der technischen Praxis hat sich das Färben zu einer hohen Kunst entwickelt. Angestrebt wird in der Färberei eine gleichmäßige egalisierende Färbung des Farbgutes. Der Färber färbt nun folgendermaßen:

**Saure Farbstoffe.** Bei den sauren Farben enthält der Säureanteil des Moleküls die färbende Gruppe. Die Farbe wird mit heißem Wasser gelöst. Man gibt auf die Gesamtmenge der Farblösung 10 bis 20% Glaubersalz ( krist. ) und 2-5% Schwefelsäure. Hiermit wird bei Wolle und Seide eine egalisierende Färbung erzielt.

**Basische Farbstoffe.** Der basische Anteil des Moleküls enthält die färbende Gruppe. Die basischen Farben färben tierische Fasern ( Wolle, Seide ) in wässriger Lösung ohne jeden Zusatz, sie färben pflanzliche Fasern ( Baumwolle ) nur nach Vorbehandlung mit Gerbsäure und Metallsalzen. Die Stoffe werden 24 Stunden lang mit 2-5% iger Tanninlösung behandelt, gewa-

schen und dann mit 1-2,5% iger Brechweinsteinlösung fixiert, wiederum gewaschen und dann endlich anschließend gefärbt. In den letzten Jahren hat sich immer mehr das Vorbeizen mit dem synthetischen **Katanol** eingebürgert.

**Substantiv-färbende, direkt ziehende Farben.** Diese färben Zellulose ( pflanzliche Faser ) direkt in wässriger Lösung mit 20 % Glaubersalzzusatz ohne beigefügte Säuren. Diese Färbungen werden waschecht gemacht durch das Nachkupfern in 2 %iger Kupfervitriollösung mit 0,3% Essigsäurezusatz.

**Beizenfarbstoffe** bedürfen zum Färbeeffect einer Faser, deren Vorbehandlung mit einer Beize das Zustandekommen eines unlöslichen Farblackes auf der Faser ermöglicht. Zur Anwendung kommen z. B. Aluminium-, Chrom-, Eisen-, Zinn- und Kupfersalze. Die Beizenfarbstoffe werden sowohl auf Wolle als auch auf Baumwolle angewandt.

**Entwicklungsfarbstoffe.** Die Entwicklungsfarbstoffe, die verschiedensten chemischen Gruppen angehören können, werden aus ihren löslichen Komponenten erst auf der Faser erzeugt. Da die Entwicklungsfarbstoffe selbst unlöslich sind, erweisen sich die Färbungen als sehr echt.

**Küpenfarbstoffe.** Die Küpenfarbstoffe sind in Wasser und Alkohol unlösliche Farben. Durch Behandeln mit Alkalien und Reduktionsmitteln werden sie in lösliche Verbindungen übergeführt ( verküpt ). Die pflanzliche Faser nimmt die Küpe dann auf. Durch Oxydation an der Luft entsteht abermals der Farbstoff.

**Schwefelfarben.** Die Stoffe werden in einer soda-alkalischen Natriumsulfidlösung des Farbstoffes unter Erwärmen behandelt. Die eigentliche Färbung tritt dann auf, wenn durch Oxydation an der Luft oder mit Metallsalzlösungen der Farbstoff gebildet wird.

§ 92. In der **Mikroskopie** ist das Färben nicht minder wie in der Technik eine große Kunst und dazu auch eine schwierige Wissenschaft geworden. Angestrebt wird dabei keineswegs das Ideal der Textilfärberei, eine möglichst gleichmäßige Färbung der Objekte zu erzielen. Im Gegenteil, gerade durch die Färbung soll eine Differenzierung der einzelnen Bestandteile der Objekte ermöglicht werden.

Die Textilfärberei kennt neben den Stoffen aus einheitlichen Fasern auch kompliziertere Objekte aus Pflanzenfasern und Wolle, die in einem Farbgang verschieden gefärbt werden können, aber im großen ganzen werden bunte Stoffe durch das Weben mit verschieden gefärbten Garnen oder durch Buntdruck erzeugt.

Die mikroskopischen Objekte sind in der Regel recht kompliziert gebaute Gebilde. Eine Ausnahme machen vielleicht nur die Bakterien, an denen bei den bisher erreichten Vergrößerungen nur eine einheitliche Färbung des Bakterienleibes möglich gewesen ist. Aber auch hier schon können Sporen und Kapseln im Kontrast gefärbt werden.

Die zoologischen, histologischen und pathologischen Objekte bestehen hauptsächlich aus den verschiedensten Eiweißarten, die noch Fett, Glykogen, Kalksalze und verschiedene pathologische Bestandteile aufweisen können.

Die botanischen Objekte bestehen aus Zellulose als Grundgerüstsubstanz, Eiweiß als Lebensträger und zahlreichen, besonders der Zellulose eingelagerten Stoffen, wie Holz und Kork. Aber auch Farbstoffe wie das Blattgrün, die Blütenfarben, eine Reihe anderer Stoffe wie Harze, Fette, Öle, Stärke, Gerbstoffe und noch manches andere findet sich vor. Besonders die Kryptogamen enthalten besondere Stoffe ( Chitin, Flechtensäuren ), die bezüglich ihrer chemischen Bestandteile noch längst nicht alle sicher erkannt sind.

Hinsichtlich der morphologischen Gestaltung unterscheiden wir mühelos einen verwickelten Aufbau ( Kern, Zellinhalt, Zellwand ). Mindestens diese drei sollen verschieden gefärbt werden können. Da in der Mikroskopie differenzierte Färbungen notwendig sind, werden beim Färben die Zusätze der Textilfärberei nur dann angewandt, wenn einheitliche Objekte vorliegen oder wenn diese Zusätze erst das Färben ermöglichen.

Bei den Beizenfarbstoffen kennt die Mikroskopie gleich der Textilfärberei zwei Wege. Zunächst kann das Objekt gebeizt werden. Dieser Vorgang ist von den meisten Mikroskopikern

übersehen worden oder ihnen unbekannt, denn das Beizen wird oft schon durch das Fixieren bewirkt, wie etwa bei der Verwendung von chromhaltigen Fixiermitteln. Eine Vorbeizung mit Eisen wird bei der Eisenhämatoxylinfärbung nach *Heidenhain* angewendet. Der zweite Weg ist die Anwendung von löslichen Metallfarblacken wie bei vielen Karminfärbungen (Karmalaun, Parakarmin nach *P.Mayer*), dann Hämatoxylinfärbungen (Hämatoxylin nach *Delafield*, saures Hämalalaun nach *P.Mayer*, Kernechtrot, alle *Becher*-Farben).

Entwicklungsfarbstoffe, Küpenfarbstoffe und die Schwefelfarben werden in der Mikroskopie bislang nicht verwendet.

Die Farben selbst haben als saure und basische Farben verschiedene Affinitäten zu den einzelnen Bestandteilen der Objekte (Kern, Plasma, Zellulose, Holz, Einschlüsse), und so kommt eine verschiedene Färbung der zu unterscheidenden Bestandteile zuwege.

### § 93.

1. Die technische Durchführung der Färbung in der Mikroskopie kann nun eine **progressive** oder **regressive**, eine **unmittelbare** oder mittelbare (direkte oder indirekte, auch inverse Färbung genannt) sein.

2. **Progressiv** ist eine Färbung dann, wenn die Farbe nur die gewünschten Bestandteile färbt. Wenn eine Farbe nur die Kerne färbt und sonst nichts, auch wenn sie noch so lange einwirkt, ist dies der Fall. Eine reine progressive Färbung haben wir in der Fettfärbung mit Sudanfarbstoffen.

3. **Regressiv** ist eine Färbung, wenn der Farbstoff zunächst das ganze Objekt gleichmäßig anfärbt und sich dann durch Behandeln mit bestimmten Stoffen oder Reagenzien aus denjenigen Teilen, die nicht gefärbt bleiben sollen, wieder auswaschen läßt (Differenzieren der Färbung). Dies ist der häufigste Fall in der Praxis. Das Differenzieren bedarf aber der Aufmerksamkeit, damit der Vorgang der Entfärbung nicht zu weit getrieben wird. Groß ist das Unglück der Entfärbung ja nicht, denn die Färbung kann auf jeden Fall wiederholt werden.

4. **Unmittelbar oder substantivisch** ist eine Färbung, wenn das Objekt die Farbe direkt in den gewünschten Teilen annimmt. Hierher gehört die Kernfärbung mit basischen organischen Farbstoffen oder mit den Farblacken (Karmin, *Becher* usw.).

5. **Mittelbar, indirekt, adjektivisch** oder **invers** ist die Färbung dann, wenn das Objekt zuvor durch eine Vorbehandlung mit Beizen (Tannin, Brechweinstein) in die Lage gebracht werden muß, in den gewünschten Teilen die Farbe annehmen zu können. So lassen sich invers mit sauren Farben Kernfärbungen und mit basischen Farben Plasma und Zelleinschlüsse wie Stärke färben.

6. Für das Zustandekommen einer befriedigenden Färbung sind die Voraussetzungen eine entsprechende Behandlung des Objektes und einwandfreie Farblösungen. Die Objekte müssen gehörig durchfixiert, aber nicht überfixiert sein. Ferner muß das überschüssige Fixiermittel, gegebenenfalls auch das Aufbewahrungsmittel, vollständig ausgewaschen sein. Zur Konservierung von Aufbewahrungsmitteln darf nur Karbolsäure Verwendung finden. Andere Stoffe wie Benzoessäure, Nipagin, Salizylsäure usw. beeinflussen das Färben sehr ungünstig, besonders bei basischen Farben.

Pyridin, insbesondere die sogenannten Pyridinbasen (Brennspiritus, Pyridinzelloidineinbettung), verhindern gleichfalls eine gute Färbung. Sind die Objekte mit Pyridin in Berührung gekommen, so muß der Färbung ein 1%iges Essigsäurebad (1 Stunde) vorausgehen. Die Essigsäure ist natürlich ebenfalls wieder auszuwaschen.

Nach langer Formalineinwirkung färben basische und saure organische Farben ebenfalls schlecht. Abhilfe kann hier durch Vorbehandlung mit 1%iger Silbernitratlösung (im Dunkeln vornehmen!) geschaffen werden. Die Dauer der Silbernitrateinwirkung kann nach jahrelangem Aufenthalt in Formalin auf 8-14 Tage zu bemessen sein. Indirekte Färbungen mit *Becher*-

Farben, manchen Hämatoxylinfarben sowie die Metallimprägnationen gelingen jedoch an Formolmaterial sehr gut.

§ 94. Wenn nötig, muß nach dem Färben das **Differenzieren** vorgenommen werden. Das Differenzieren kann bei

1. **lichtunechten Farbstoffe** wie Magdalarot, Erythrosin im Sonnenlicht vorgenommen werden. Diese Methode ist jedoch wenig im Gebrauch ( Algenfärbung nach *Pfeiffer* und *Eckert* ).
2. Säureunechte Farbstoffe werden mit 0,5 %igem bis 2 %igem Salzsäurealkohol, wässriger Essigsäure, Schwefelsäure in 0,5 %igen Lösungen differenziert. Bei **alkaliunechten Farbstoffen** verwendet man Sodalösungen oder verdünnte Natronlauge.
3. Bei **leichtlöslichen Farben** genügt schon das Auswaschen in Wasser oder Alkohol allein. Manche Farbstoffe, besonders die basischen und sauren organischen Farbstoffe, sind leicht auszuwaschen. Sie werden oft zu leicht bei dem Einschließen der Präparate durch die Intermedien Wasser, Alkohol, Nelkenöl usw. ausgezogen, und der Färbeerfolg ist dann in Frage gestellt. Manchmal hilft ein rasches Arbeiten über diese Kalamität hinweg, aber in der Regel kann der ursprüngliche feurige Farbton nicht erhalten bleiben. Zur Abhilfe gibt es mehrere Wege:
  - a) Man verwendet zunächst Intermedien, in denen die Farbstoffe nicht löslich sind, z.B. Azeton oder Isopropylalkohol, auch tertiären Butylalkohol. Ferner kann man den Farbstoff wie Eosin in dem Intermedium ( Nelkenöl ) auflösen und so die Färbung in Nelkenöl erst vervollständigen. Dies sind aber nur Notbehelfe, die auch einmal versagen können.
  - b) Ein weiterer Ausweg ist die Wahl eines Einschlußmittels, das einer Entwässerung nicht bedarf. So ist bei Färbungen mit organischen Farben das Einschließen in Medien, die hauptsächlich Traubenzucker enthalten, sehr gut möglich. Die Farben halten sich darin recht gut.
  - c) Das beste ist es jedoch, die Färbungen in einen unlöslichen Zustand überzuführen, das heißt, nachträglich zu beizen.

#### Nachträgliches Beizen der Färbungen zur Erhöhung der Echtheit

§ 95. Die Lichtechtheit der mikroskopischen Färbungen ist gewöhnlich ausreichend. Voraussetzung ist nur, daß die Objekte genügend durchgefärbt und durch Wässern von allen schädlichen Stoffen ( Differenzierungsmitteln ) befreit worden sind. Die Präparate werden ja auch nur kurze Zeit im Mikroskop betrachtet, während sie die meiste Zeit im Dunkeln, im Präparatekasten aufbewahrt werden.

Der Widerstand gegen das Ausgewaschenwerden mit Wasser, Alkohol, Nelkenöl, Terpeneol usw. kann dadurch erreicht werden, daß die Farben in den Objekten nachträglich in Verbindungen übergeführt werden, die in den genannten Medien unlöslich sind. Diesen Zweck erfüllt die Herstellung unlöslicher Farblacke.

Die gefärbten Objekte ( Schnitte, Totalpräparate, Ausstriche ) kommen für 10-20 Minuten in die Beizbäder. Umfangreichere Totalpräparate benötigen manchmal eine Behandlungsdauer bis zu einer Stunde, bis sie durchgebeizt sind. Hernach wird mit destilliertem Wasser sorgfältig ausgewaschen. Die Beizvorschriften sind für basische und saure Farben verschieden. Besteht über den Charakter einer Farbe Unsicherheit, so kann die Feststellung, ob die Farbe sauer oder basisch ist, leicht durch ein einfaches Experiment gemacht werden: Alle basischen Farben geben in Lösungen beim Vermischen mit Pikrinsäurelösung Niederschläge, saure Farben nicht. Das basische Chinolinblau verändert sich jedoch nicht mit Pikrinsäure.

**Das Beizen von basischen Farbstoffen.** Basische Farbstoffe können gebeizt werden:

1. **Mit Tannin-Brechweinstein.** Die Schnitte werden 10 Minuten lang mit einer 10 %igen Lösung von Tannin behandelt, dann ausgewaschen und ebenso lang in 3% iger Brechweinsteinlösung nachbehandelt. Hierauf erneutes Auswaschen. Der Farbton wird nicht geändert.
2. **Mit Pikrinsäure.** Die Schnitte werden mit 0,5% iger Pikrinsäurelösung 10 Minuten lang behandelt. Man kann auch eine konzentrierte alkoholische Lösung anwenden. Die Färbung wird in jedem Fall verändert. Blaue Farben werden grün, rote violett usw. Aus diesem Grunde wird das Verfahren eigentlich nur da angewandt, wo der Farbumschlag erwünscht ist. Zu empfehlen ist das Verfahren nicht.
3. **Mit Phosphormolybdänsäure oder Phosphorwolframsäure.** Dies ist unstreitig das beste und empfehlenswerteste Verfahren. Die beiden genannten Substanzen werden in 5% iger Lösung verwendet. Die Beizungsdauer ist 2-3 Minuten. Sie ergeben leuchtende Lacke. Beide Substanzen sind jedoch starke Säuren und greifen Metallinstrumente schnell an. Schließlich kann in speziellen Fällen noch weiterhin ein Salz der Molybdänsäure verwendet werden ( Ammonium- und Kaliumsalz.) Näheres bei den einzelnen Färbvorschriften.

**Das Beizen von sauren Farbstoffen** ist leider nicht so einfach durchzuführen. Zwar bilden die sauren Farben willig mit Metallsalzen Farblacke, doch sind diese in Alkohol nur etwas schwerer löslich als die ursprüngliche Färbung, also leider nicht völlig unlöslich. Das Verfahren genügt meistens, um die Objekte die Intermedien unausgezogen passieren zu lassen. In Zuckereinschlusmediem sind sie absolut haltbar.

**Eosinfarbstoffe** bilden Lacke mit löslichen Bleisalzen. Man verwendet ameisensaures Blei in 0,5 %iger wässriger Lösung.

**Die Mehrzahl der sauren Farben** bilden Lacke mit den Salzen der Erdalkalimetalle Kalzium und Barium. Man verwendet 0,5-1% ige wässrige Lösungen von Chlorkalzium oder Chlorbarium. Die Farbe wird etwas geändert. Das Kalziumsalz ändert den Ton nach blau, das Bariumsalz ins Rötliche um.

**Substantivische Farben** werden mit 0,5 % igem Kupferacetat oder -sulfat gebeizt. Dauer 1 Stunde.

[ Es sei schon an dieser Stelle nachdrücklich betont, daß verbleibende Säurespuren die Haltbarkeit der Färbungen sehr negativ beeinflussen. Wird mit sauren Farblösungen gefärbt, muß sehr gründlich mit Leitungswasser ( nicht mit destilliertem Wasser! ) ausgewaschen werden. Die Verwendung von Natriumhydrogencarbonat zur Neutralisation ist von zweifelhaftem Wert. Pikrinsäurereste müssen schon vor dem Färben durch Waschen mit ammoniakhaltigem wässrigem Alkohol restlos beseitigt werden! ]

### **Die gebräuchlichsten organischen Farbstoffe**

§ 96. Es folgen nun die Arbeitsvorschriften für die einzelnen organischen Farbstoffe. Die hier angeführten Farbstoffe sind nicht alle unbedingt nötig, um die späteren Arbeitspläne durchzuführen, jedenfalls nicht für den Anfänger. Im Laufe der Zeit wird jedoch der Umfang der Farbstoffe bei jedem Mikroskopiker größer und größer.

Der Anfänger verwendet am besten zunächst nur die Vorschriften, die als besonders zuverlässig und dankbar gekennzeichnet sind. Die Auswahl der einzelnen Farbstoffe ist zum Teil reine Geschmackssache, besonders hinsichtlich des Farbtones. Ferner ist in Betracht zu ziehen, daß eine an und für sich gut verlässliche Färbung in der Hand einzelner versagt, während andere wieder damit glückliche Ergebnisse erzielen.

Auch die vorausgegangene Fixierung ist bei der Auswahl der Farben zu beachten. Bei den einzelnen Vorschriften sind darüber ausführliche Anmerkungen geboten.

In den Tabellen werden die folgenden Abkürzungen verwendet:

<b>FX</b>	Fixierung
<b>FB</b>	Färbung
<b>DA</b>	Färbedauer
<b>DF</b>	Differenzierung
<b>BZ</b>	Beizung
<b>ES</b>	Einschluß
<b>BM</b>	Bemerkung

### Vorschriften für basische organische Farben

§ 97. Die Lösungen werden mit destilliertem Wasser hergestellt. Die vielfach anempfohlenen Stammlösungen in 96 %igem Alkohol sind unnötig. Wenn die wässrigen Farblösungen einen entsprechenden Karbolzusatz aufweisen, sind sie in der Regel ausreichend haltbar, zumal wenn sie etwas Alkohol enthalten. Es ist soviel Karbolsäure zu nehmen, daß die fertige Lösung 0,25% Karbolsäure enthält. Man gibt also auf 100 ccm Farblösung 5 ccm einer 5 %igen wässrigen Karbolsäure. Acidum carbolicum liquefactum den Lösungen zuzusetzen ist falsch. Dies verursacht in der Regel Ausfällungen, die Farbe unbrauchbar machen.

§ 98. **Bismarckbraun.** Man löst 2 g Farbe in 15 ccm Wasser, dem 25 ccm Alkohol zugesetzt waren, durch Kochen auf. Nach dem Erkalten filtrieren.

FX	Beliebig
DA	5-10 Minuten, je nach Schnittdicke
DF	Salzsäurealkohol
BZ	Tannin-Brechweinstein oder Phosphormolybdänsäure
BM	

Bismarckbraun färbt auch in stark alkoholischen Lösungen. Es färbt Kerne und Zellwände. Beliebt war lange Zeit eine Doppelfärbung mit Methylgrün oder Bleu de Lyon.

§ 99. **Chinolinblau ( Zyanin ).** Chinolinblau ist ein sehr teurer Farbstoff. 5 g in Substanz kosten je nach Firma 9-13 DM. Man löst 1 g Chinolinblau in 100 ccm 95 %igem Alkohol auf und gibt nach vollkommener Lösung 100 ccm Wasser zu. In Wasser allein ist die Farbe unlöslich.

FX	Beliebig
DA	10-20 Minuten bis einige Tage bei schwer färbbaren Objekten
DF	Alkohol, notfalls salzsaurer Alkohol
BZ	Nicht möglich. Die Farbe bildet keine Lacke
BM	

Chinolinblau wird fast nur noch bei Flechten zur Färbung der Gonidien gebraucht. Ferner färbt es: Chromosomen dunkelblau, Spindelfasern leicht blau, verholzte und verkorkte Membranen blau, moderndes Holz grün. Chinolinblau ist in Glycerin, Glyceringelatine und allen Harzen haltbar, außer Venetianer Terpentin.



**§ 100. Chrysoidin.** Man löst 1 g Farbstoff in 100 ccm Wasser auf. Die Lösung ist nur einige Wochen brauchbar. Am besten setzt man sie öfters in kleinen Mengen an.

FX	Beliebig
DA	20 Minuten. Am schönsten färben ganz verdünnte Lösungen bei entsprechend langer Färbedauer.
DF	HC1-Alkohol
BZ	Tannin-Brechweinstein oder Phosphormolybdänsäure
ES	gebeizt in allen Medien
BM	Chrydsoidin färbt Holz orange-gelb. Es wird besonders angewandt als Nachfärbung nach Kernschwarz, blauen <i>Becher</i> -Farben und Hämatoxylinfärbungen ( H. Thaler, Mikrokosmos 1930/31, S.80, und Mikrokosmos 1933/34, S.200 ). Chrysoidin färbt nach Formalinfixierung in 1% iger Farbstofflösung Fette braun.

### § 101. Fuchsin basisch

Vorschrift I. Man löst 1g Fuchsin in 100ccm Wasser durch Kochen. Nach dem Erkalten filtern.

FX	Beliebig
DA	5-10 Minuten
DF	Mit salzsaurem Alkohol (70%iger Alkohol mit 1% HC1)
BZ	Phosphormolybdänsäure, Phosphorwolframsäure, Tannin-Brechweinstein
ES	Harze
BM	Fuchsin gewährleistet haltbare Färbungen. Man nimmt Fuchsin bei Mehrfachfärbungen immer an erster Stelle, da es sich schwer auswäscht.

Vorschrift II. Karbolfuchsin nach *Ziehl-Neelsen*: Man verreibt 1 g Fuchsin mit 10-15 ccm Alkohol im Mörser und gibt 100 ccm 5 %iges Karbolwasser hinzu. Gut haltbar.

FX	Beliebig
DA	5-10 Minuten
DF	Wie bei Vorschrift I
BZ	Wie bei Vorschrift I
BM	Karbolfuchsin färbt außer Bakterien auch die Sporen höherer Pilze wie Morcheln und Röhrenpilze, ferner manchmal auch pflanzliche Kutikula. Hierbei ist eine Nachfärbung mit Methylenblau günstig. ( H.Fischer, Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie XXIX, 1912 )

Vorschrift III. Nach *Zimmermann* kann mit Fuchsin auch in violetterem Farbton gefärbt werden. Man färbt mit einer der beiden obigen Vorschriften 15 Minuten. Verbringt hierauf den Schnitt in eine konzentrierte Pikrinsäurelösung in 70% igem Alkohol. Hierin wird geschwenkt, bis der dunkelviolette Ton erreicht ist. Abwaschen in 90% igem Alkohol, bis keine Farbe mehr abgeht. Das Verfahren ist eine Beizung der Fuchsinfärbung mit Pikrinsäure. Ähnliche Verfahren können mit noch anderen Farben wie Methylenblau, Malachitgrün usw. durchgeführt werden.

**§ 102. Gentianaviolett, Methylviolett , Kristallviolett.** Diese drei Farben werden nach der gleichen Vorschrift angewandt.

Vorschrift I. Man löst 1 g Farbstoff in 100 ccm Wasser durch Kochen auf. Nach dem Erkalten wird filtriert und 30 ccm Alkohol zugesetzt.

- FX Im allgemeinen beliebig.  
 Färbt besonders gut nach Fixierung mit den beiden *Flemmingschen* Gemischen
- DA 5-10 Minuten
- DF Wässrige Essigsäure oder 2 %iger HCl-Alkohol
- BM  
 Alle drei Farbstoffe färben Zelloidin stark an. Gentianaviolett ist Bestandteil des *Flemmingschen* Dreifarbenverfahrens.

Vorschrift II. Karbolgentiana zur Bakterienfärbung für schwer färbbare Arten wird wie Karbofuchsin hergestellt.

Vorschrift III. Ammoniakalische Gentianaviolettlösung zur Korkfärbung. Zu konzentrierter alkoholischer Lösung von Gentianaviolett wird tropfenweise Ammoniak bis fast zur Entfärbung zugesetzt. Die Lösung ist haltbar.

- DA 10-30 Minuten
- DF Auswaschen der Schnitte in 5 %iger wässriger Salzsäure.  
 Dabei bleiben dann nur die Korkgewebe gefärbt.
- BM  
 Wird nur mit Wasser ausgewaschen, so färbt sich neben dem Kork auch das Holz. Statt Gentianaviolett kann fast jede andere basische Anilinfarbe genommen werden.

**§ 103. Kresylechtviolett.** Man stellt sich eine gesättigte wässrige Lösung her.

- FX Beliebig
- DA 5-10 Minuten
- DF In 70 %igem Alkohol
- BZ  
 Mit Tannin-Brechweinstein, mit Phosphorwolframsäure oder mit Phosphormolybdänsäure
- BM  
 Kresylechtviolett ist einer der echtsten Kernfarbstoffe. In wässriger Lösung färbt Kresylechtviolett metachromatisch. In Alkohol verschwindet die Metachromasie teilweise.

**§ 104. Malachitgrün.**

Lösung I:

Man löst 2 g Malachitgrün in 100 ccm Wasser durch Kochen auf.

Lösung II:

Man löst 2 g Malachitgrün in 100 ccm einer 2% igen Natriumthiosulfatlösung auf.

- FX Beliebig  
 DA 5 Minuten bis einige Stunden.  
 Besonders gut färbt die Lösung mit Natriumthiosulfat.  
 DF Mit HCl-Alkohol.  
 War mit der natriumthiosulfathaltigen Farbe gefärbt worden, ist zuerst auszuwaschen, da sonst Niederschläge von Schwefel entstehen können.  
 BZ Mit Tannin-Brechweinstein, mit Phosphormolybdänsäure oder Phosphorwolframsäure.  
 BM Die einfache Farblösung, mit einigen Tropfen Schwefelsäure angesäuert, färbt wie eine saure Farbe, und zwar vornehmlich das Plasma.

### §105. Methyleneblau.

Vorschrift I. Man löst 2 g Methyleneblau in 100 ccm Wasser durch Kochen auf. Filtrieren.

- FX Beliebig  
 DA 5-10 Minuten, eventuell bedeutend länger  
 DF 1 %ige wässrige Essigsäure oder HCl-Alkohol  
 BZ Mit Tannin-Brechweinstein, mit Phosphormolybdänsäure oder mit Phosphorwolframsäure

Vorschrift II. *Löfflers* alkalische Methyleneblaulösung. Man mischt 30 ccm gesättigte alkoholische Methyleneblaulösung mit 100 ccm 0,01 %iger Kalilauge. Die Farbe ist haltbar. Fixierung, Färben usw. wie oben bei Vorschrift I.

- BM Alte alkalische Lösungen von Methyleneblau färben metachromatisch (manche Stellen werden rot).  
 Ungebeizt wird Methyleneblau leicht durch gewöhnlichen Alkohol ausgezogen, ist aber unlöslich in Butylalkohol. Will man durch Butylalkohol einbetten, so wäscht man zuerst 1 Minute in einer Mischung von Alkohol mit Butylalkohol zu gleichen Teilen und dann in reinem Butylalkohol aus und überträgt in neuen Butylalkohol für 10-15 Minuten. Einschließen dann über Xylol, Terpineol in Caedax.  
 Methyleneblau färbt manche Pilze und Pilzhyphen lebend. Diese lebendgefärbten Objekte werden dann fixiert mit wässriger konzentrierter Lösung von Ammoniumpikrat oder 5%igem wässrigem Ammoniummolybdat mit nachfolgender Formalinhärtung.

**§ 106. Methylgrün.** Man löst 1g Methylgrün in 100ccm kochend heißem Wasser auf. Methylgrün ist stark alkaliempfindlich, was bei der Verarbeitung zu beachten ist.

- FX Beliebig  
 DA 5-10 Minuten  
 DF 70 %iger Alkohol, kein HCl-Alkohol  
 BZ Entweder mit 5%iger wässriger Lösung von Ammoniummolybdat in Wasser oder Phosphormolybdänsäure  
 BM Methylgrün färbt in normaler Lösung nur das Kerngerüst. Methylgrün färbt aber nach Schwefelbeize oder in ammoniakalischer Lösung auch das Plasma. Zur Nachfärbung wird hauptsächlich Säurefuchsin verwendet.

**§ 107. Safranin.** Es gibt ein wasserlösliches und ein alkohollösliches Safranin.

Vorschrift I. Man löst 2 g Safranin in 100ccm 50%igem Alkohol auf.

Vorschrift II. Man löst 1 g des alkohollöslichen Safranins in 100 ccm absolutem Alkohol auf. Ferner löst man 1 g des wasserlöslichen Safranins in 100 ccm Wasser auf. Nach vollständiger Lösung der beiden Ansätze werden beide miteinander vermischt ( nach *Chamberlain* ). Zum Färben verdünnt man zweckmäßig die Stammlösung mit dem gleichen Volumen Wasser.

- FX Beliebig, außer Formalin.  
Formalinmaterial muß wenigstens 2 Stunden mit 1 %iger Chromsäure gebeizt werden.
- DA Für Kernfärbungen benötigt man 3-8 Stunden.  
Histologische Gewebefärbungen benötigen mindestens 24 Stunden.
- DF HCl-Alkohol
- BZ  
Nicht nötig, da meistens auf Metallsalzbasis beim Fixieren oder Nachbehandeln gefärbt. Sonst Tannin-Brechweinstein, Phosphormolybdänsäure oder Phosphorwolframsäure.
- BM Die Safraninfärbung gelingt nach Paraffineinbettung sehr schlecht.  
Safraninfärbungen sind schlecht zu differenzieren, wenn die Objekte mit Brennspritus in Berührung kamen. Wird Safranin als zweite Farbe nach einer *Becher*-Farbe gebraucht, so wird zweckmäßig mit wässriger Essigsäure differenziert.  
Lichtgrün, zu 0,5% in Alkohol gelöst, treibt das Safranin aus unverholzten Stellen schnell aus. Auch bei Farnen und Bärlappen tritt eine Differenzierung der Gewebe auf. Man spült kurz mit Isopropylalkohol ( nicht Ethylalkohol ) ab und kann dann über Terpeneol in Caedax einbetten.

### Vorschriften für saure organische Farbstoffe

**§ 108. Anilinblau wasserlöslich.** Man löst 1 g Anilinblau in 100 ccm Wasser auf.

- FX Beliebig
- DA Man färbt 10-20 Minuten.  
Bei zu rascher Färbung verdünnt man zweckmäßig die Lösung mit gleichen Teilen Wasser.
- DF Alkohol, wenn nötig etwas alkalisch gemachter Alkohol.  
Säuren machen die Färbung beständiger.
- BZ Anilinblau ist eine saure Farbe mit schwach basischen Eigenschaften, es läßt sich daher mit Phosphormolybdänsäure fixieren. Aus demselben Grunde färbt Anilinblau auch Zellkerne.
- BM Anilinblau färbt Kallose, einen Stoff, der nur in den Siebröhren der Phanerogamen vorkommt. Anilinblau ist Bestandteil der Spezialfärbung für pflanzliche Sexualzellen nach *H.Sieben*.

**§ 109. Alizarinrot S.** Man löst 5 g Alizarinrot S in 100 ccm heißem Wasser auf und filtriert nach dem Erkalten.

- FX Färbt nur nach chromhaltigen Fixiermitteln gut.  
Nach anderen Fixiermitteln ist die Färbung launisch, daher mit Chromalaun vorbeizen. Bei vorausgegangener Färbung mit dem *Becher*-Farbstoff Alizarinviridin färbt Alizarinrot nach allen Fixiermitteln, da diese Farbe Chromalaun enthält.
- DA 2-24 Stunden. Überfärbung tritt nicht ein.  
Nach dem Färben gründlich auswaschen in Leitungswasser, wobei erst der schöne rote Farbton erscheint.
- BZ Wenn die Färbung ohne Chromvorbeizung gelang, muß mit Chromalaun nachgebeizt werden
- ES Haltbar in allen Medien
- BM Färbt Plasma und Chromatophoren rot.

**§ 110. Azokarmin B.** Man löst 1 g Azokarmin B in 100 ccm Wasser durch leichtes Erwärmen auf und setzt 1 ccm Eisessig zu. Die Lösung ist gut haltbar.

- FX Färbt nur nach Fixierung mit Chromsäure oder Chromessigsäure. Nach anderen Fixiermitteln ist mit 1 %iger Chromsäure vorzubезen ( 1 Stunde ).
- DA 1-2 Stunden in der unverdünnten Lösung.
- DF Die Azokarminfärbung kann mit vielen aromatischen Basen differenziert werden, so mit Anilinöl, Pyridin, Chinolin und Paraphenyldiamin. Man differenziert mit 20 %igem Alkohol, dem einige Tropfen Anilin pur. zugesetzt sind. Nach meinen Erfahrungen genügt der Pyridingehalt des Brennspritus vollauf zum Differenzieren. Man kann daher reinen Brennspritus verwenden. Die Differenzierung kann unterbrochen werden mit 96%igem Alkohol, der mit Essigsäure angesäuert ist.
- ES Nur in Harzen, Glycerin zieht die Färbung in wenigen Stunden aus.
- BM Der Farbstoff färbt Kerne und Plasma, ähnlich dem Anilinblau. Spezialfarbstoff für Blaualgen und Rotalgen. Azokarmin färbt Zelloidin an, läßt sich aber mit Alkohol auswaschen.

**§ 111. Benzoazurin und Benzopurpurin.** Das blaue Benzoazurin und das rote Benzopurpurin werden in gleicher Weise verwendet. Man löst in 100ccm heißem Wasser zuerst 20g Glaubersalz oder Soda auf und dann so viel Farbstoff wie sich löst. Die Farben sind schwer löslich. Man filtriert durch Glaswolle oder läßt 3 bis 4 Tage lang absetzen.

- FX Beliebig
- DA Man färbt 1-2 Tage und spült schnell mit Wasser ab.
- DF Wenn überhaupt nötig, vorsichtig mit Brunnenwasser
- BZ Die Färbungen müssen unbedingt mit 0,5 %igem Kupferacetat gebeizt werden ( 20 Minuten ).
- BM Benzoazurin färbt Zellulose blau bis blauschwarz, das Benzopurpurin rot. Am besten verwendet man ein Gemisch beider Lösungen zu gleichen Teilen, das sehr häufig verschieden inkrustierte Zellulose verschieden färbt, so daß z.B. Gefäßbündel bei höheren Kryptogamen gegen das Grundgewebe kontrastieren. Die beiden Farbstoffe sind typische Membranfarbstoffe.

**§ 112. Eosin - Jodeosin - Erythrosin.** Diese drei Farbstoffe sind chemisch sehr ähnlich; sie werden daher alle drei nach gleicher Vorschrift verwandt. Von dem Eosin wird hauptsächlich das sogenannte wasserlösliche gelbe Eosin gebraucht.

Vorschrift I. Man löst 1g Farbstoff in 100 ccm Wasser auf.

FX	Beliebig
DF	Verdünnter Alkohol ohne Salzsäurezusatz
BZ	1% ige Lösungen von Bleisalzen ( Bleinitrat, Bleiformiat )
ES	Am besten in Harzen, Einschluß in Zuckermedien möglich
BM	

Eosin färbt Zellwände und Zellplasma. Jodeosin und Erythrosin werden bei Algenfärbungen angewendet. Eosin wird durch tertiären Butylalkohol nicht ausgezogen.

Vorschrift II. Jodwasser-Eosin nach *Palla* (36).

- Eosin oder Methyleosin statt in Wasser in Jodwasser aufgelöst, wird zu diagnostischen Färbungen lebender niederer Pflanzen verwandt. Jodwasser wird vorrätig gehalten. In eine Glasstöpselflasche mit Aqua dest. wirft man einige Jodkristalle. Das Jodwasser-Eosin stellt man am besten jedesmal frisch her.
- Man kann auch so verfahren, daß man mit Jodwasser fixiert und unausgewaschen mit Eosinlösung färbt. Zellkerne, Pyrenoide und Karyoide bei Algen färben sich zeitlich vor den Chromatophoren.

(36) E.Palla, Berichte Deutsche botanische Gesellschaft; Bd. XII, 1894, S.134

**§ 113. Kongorot.** Man löst 1 g Kongorot in 75 ccm Wasser und gibt noch 25 ccm Alkohol hinzu. Kongorot wird bereits durch Säurespuren blau gefärbt.

FX	Beliebig
DA	5-10 Minuten. Tritt ein Umschlag nach Blau auf, so ist der Farblösung 1 oder 2 Tropfen Ammoniak zuzusetzen.
DF	Ist bei der Säureempfindlichkeit schlecht durchzuführen. Man färbt entweder mit verdünnten Lösungen und vermeidet damit eine Überfärbung oder man überwacht den Färbeprozess genau.
BZ	Mit 1 %igem Kupferacetat wie Benzoazurin
BM	

Kongorot färbt Plasma und verschiedene Membranen ( Zellulose, Pilzmycelien ) rot. Pilzmycelien werden auch in den Geweben höherer Pflanzen gefärbt. Kongorot färbt auch Chromoplasten.

**§ 114. Lichtgrün SF.** Man löst 0,5 g Lichtgrün SF in 100 ccm heißem Wasser auf.

FX	Beliebig
DA	5-10 Minuten
DF	HCl-Alkohol
BZ	

Mit Kalzium- oder Bariumchlorid. Da Lichtgrün nicht von Isopropanol ausgezogen wird, erübrigt sich das Beizen bei dessen Verwendung.

BM	Lichtgrün ist ein beliebter Plasmafärbstoff zur Nachfärbung bei Karmin, Safranin, auch nach Goldimprägnationen. Lichtgrün färbt auch Zellulose ( siehe Sa-
----	--

franin ). Lichtgrün wird in alkoholischen Lösungen zur Algenfärbung und zur Färbung von Pilzhyphen gebraucht. Lichtgrün färbt Zelloidin unauswaschbar und stark an.

**§ 115. Naphtholschwarz.** Man löst 1 g Naphtholschwarz in 100 ccm Wasser auf. Nach dem Erkalten wird filtriert.

FX Beliebig  
 DA 5-10 Minuten  
 DF HCl-Alkohol  
 BZ unnötig, da in Alkohol schwer löslich  
 BM

Naphtholschwarz kann mit Orange-G simultan angewandt werden. Nach *Merkl* nimmt man 1%ige wässrige Naphtholschwarzlösung und konzentrierte wässrige Orangelösung zu gleichen Raumteilen. Die Färbedauer ist 10 Minuten. Naphtholschwarz wird besonders als Nachfärbung nach Safranin empfohlen. In der zoologischen Technik wird es häufig mit Pikrinsäurelösung kombiniert angewandt.

**§ 116. Nigrosin.** Man löst 1 g Nigrosin in 100 ccm heißem Wasser auf.

FX Beliebig, am besten nach pikrinsäurehaltigen Fixiermitteln und nach Pikrinsäure selbst  
 DA Man versetzt 100-200 ccm Wasser mit 1-2 Tropfen obiger Stammlösung. Färbedauer ist dann 1-3 Stunden.  
 DF HCl-Alkohol  
 BM Wird besonders für fadenförmige Algen und Pilze, auch für Diatomeen empfohlen. Vergleiche auch Pikro-Nigrosin. Die Färbung ist haltbar in Glycerin, Venetianer Terpentin und allen Harzen, nicht aber in Glyceringelatine. Nigrosin färbt Zelloidin stark an.

**§ 117. Orange G.** Man löst 0,1-0,5 g in 100 ccm heißem Wasser auf.

FX Beliebig  
 DA 1-5 Minuten  
 BZ Kalzium- oder Bariumchlorid  
 BM

Orange färbt Zelloidin nicht an. Die Färbung ist sehr lichteht und eine der schönsten Plasmafärbungen. Orange wird von tertiärem Butylalkohol nicht ausgezogen.

[ Dem heute erhältlichen Orange-G fehlen offenbar gerade diejenigen Verunreinigungen, welche die guten Färbereigenschaften seinerzeit bewirkt haben. Die Färbung der Erythrocyten bei der in der Zoo-Histologie oft angewandten Azan-Färbung gelingt nicht mehr einwandfrei. ]

§ 118. **Orseillin BB.** Man löst 0,25 g Orseillin BB in 100 ccm Wasser auf.

FX	Beliebig
DA	10 Minuten bis 1 Stunde. Man kann auch über Nacht färben.
DF	Brunnenwasser, verdünnter Brennspritus oder auch HCl-Alkohol. Die Differenzierung wird unterbrochen durch Wasser, Alkohol oder Isopropanol, wenn mit Essigsäure angesäuert worden sind.
ES	Caedax
BM	Orseillin B B färbt Zelloidin nicht an.

§ 119. **Pikrinsäure.** Pikrinsäure ist als trockenes Pulver wie auch seine Salze explosiv. Wird daher in konzentrierter wässriger Lösung oder in angefeuchtetem Zustand bezogen.

DA	Man färbt mit dem Entwässerungsalkohol, dem man einige Tropfen der konzentrierten wässrigen Lösung beigegeben hat. Überfärbung tritt leicht ein.
BM	Pikrinsäure ist als Plasmafärbung nur zu empfehlen bei vorausgegangenen basischen Farben, die mit Pikrinsäure einen Farblack geben, z.B. mit Fuchsin mit violetter Farbe, Methylviolett mit indigoblauer Farbe. Chinolinblau ist nicht geeignet. Die Pikrinsäure findet in Form ihres Ammoniumsalzes oder als freie Säure Anwendung in Farbgemischen zur simultanen Mehrfachfärbung. Siehe Pikrokarmin-Anilinblau ( <i>Hollborn</i> ). Pikrinsäure färbt rein gelb, ihr Ammoniumsalz orange. Die reine Pikrinsäurefärbung ist als solche ausgezeichnet haltbar. Pikrinsäure als Plasmafarbe wird aber besser ersetzt durch andere gelbe Farben wie Orange G, Aurantia oder Anthrazengelb.

§ 120. **Pyronin G.** Man löst 1 g Pyronin in 100 ccm Wasser auf.

FX	Beliebig
DA	Wenige Minuten
DF	Mit 30 %igem Alkohol oder Brennspritus
BM	Die Schnitte werden schnell über Isopropanol oder besser über Butylalkohol-Ethylalkohol zu gleichen Teilen und dann über reinen Butylalkohol, anschließend Terpeneol, in Caedax übergeführt. Pyronin hat einen sehr angenehmen Farbton.

§ 121. **Säurefuchsin.** Säurefuchsin ist eine der wichtigsten Farben. Für das Arbeiten mit diesem Farbstoff sind eine Reihe von Vorschriften bekannt geworden.

Vorschrift I. Man löst 0,2-1 g Säurefuchsin in 100 ccm Wasser auf.

Vorschrift II. Man löst in 100ccm heißem Wasser der Reihe nach auf:

Säurefuchsin	1 g
Eisessig	1 ccm
Phosphormolybdänsäure	1 g

Das Gemisch soll gute Haltbarkeit aufweisen. Ich empfehle jedoch, die Farbe kurz vor Gebrauch herzustellen.



Vorschrift III. Vorschrift nach *Erös*: Man löst in 100 ccm Wasser 1 g Säurefuchsin und soviel Kalialaun wie sich löst ( etwa 10-12 g ).

Vorschrift IV. Vorschrift nach *Seki*: Man löst 5 g Säurefuchsin in 100 ccm 5 %iger Karbolsäurelösung auf.

Alle Farblösungen können auch heiß angewandt werden, falls die Objekte sich schlecht anfärben. Im allgemeinen wird man mit Vorschrift I sein Auslangen finden.

FX Beliebig  
DA 5-10 Minuten  
DF

Überfärbungen werden schon durch destilliertes Wasser korrigiert. Unterbrochen wird das Differenzieren durch Wasser oder Alkohol, dem einige Tropfen Essigsäure zugefügt sind.

ES

Nur in Caedax oder anderen Harzen. Manche Autoren empfehlen, dem Harz einen Splitter Salizylsäure beizufügen, um die Haltbarkeit zu erhöhen. Nach meiner Erfahrung ist dies unnötig, wenn das Objekt durch Wasser und Alkohol geführt worden war, die einen Essigsäurezusatz aufwiesen. Die Färbung ist aber auch zu beizen, und zwar entweder mit 1 %iger Phosphormolybdänsäure oder einer 1 %igen Lösung eines wasserlöslichen Zinnsalzes ( Zinn-II-chlorid ).

BM

Alle Farblösungen können lange aufbewahrt werden.

### Vorschriften für Beizenfarbstoffe

§ 122. Alle Beizenfarbstoffe sind saure Farbstoffe. Durch die Verbindung mit einer basischen Beize erhalten sie die Eigenschaften einer basischen Farbe. Der entstehende färbende Farblack ist basisch. Die Beizenfarbstoffe gestatten haltbare und reine Kernfärbungen oder Kern- und Plasmafärbungen, je nach dem Arbeitsgang. Dabei sind die einzelnen Zell- oder Gewebsbestandteile schön differenziert.

Die Beize wird bei den Beizenfarbstoffen in der Mehrzahl der Arbeitsvorschriften mit der Farbe vereint zu einem Farblack angewandt. Als Beizen kommen nur Metallsalze zur Verwendung, und zwar Salze des Aluminiums, Chroms, Eisens und des Berylliums. Auch Borax findet vereinzelt Anwendung.

Als Beizenfarbstoffe werden verwendet: Karmin, Hämatoxylin, Kernechtrot und verschiedene weitere künstliche Farbstoffe, die sogenannten *Becher*-Farben.

### Färbungen mit Karmin

#### Vorschriften unter Verwendung von Cochenille und Karmin

§ 123. **Alaun-Cochenille nach Chamberlain.** Die Farblösung hat folgende Zusammensetzung:

Gepulverte Cochenille	50 g
Kalialaun	5 g
Dest.Wasser	500 ccm

Man löst zuerst den Alaun in Wasser und kocht unter Zufügen der gepulverten Cochenille bis auf 2/3 der Menge ein und filtriert dann ab. Karbolzusatz verhindert Schimmeln. Diese Vorschrift wird deshalb gebracht, weil sie nur noch selten erwähnt wird und die Färbeergebnisse gleich schön sind in der Stückfärbung wie in der Schnitffärbung.

**§ 124. Alaunkarmin, wässrig nach Grennacher.** Man kocht 1/2 bis 1 g Karmin *Merck* in 100 ccm 5 %iger wässriger Alaunlösung etwa 20 Minuten lang und filtriert nach dem Erkalten. Es kann Kalialaun oder Ammoniumalaun genommen werden. Karbolzusatz.

FX

Alle Karminfärbungen gelingen am schönsten nach Fixierungen, die Quecksilber enthalten. Das sich bildende karminsäure Quecksilber hat eine schöne feurige Farbe.

Die Färbungen gelingen auch nach Fixierungen mit Pikrinsäure, nach den Flemmingschen Gemischen und manchmal auch nach Formalin.

DA

Für Schnittfärbung rechnet man 2-4 Stunden. Überfärben tritt nicht ein, deshalb können die Objekte unbedenklich auch länger in der Farbe verbleiben. Dieses Karmin färbt auch unverholzte Zellmembranen. Für Stückfärbung benötigt man 2 Tage. Dann Auswaschen.

DF

Fällt weg, da eine reine Kernfärbung resultiert.

BM

Diese Vorschrift wird viel gebraucht, da sie im Gegensatz zu den Boraxkarminen nicht überfärbt und eine reine Kernfärbung liefert. Notfalls kann an den Schnitten mit dem bekannten HCl-Alkohol die Differenzierung vorgenommen werden.

**§125. Boraxkarmin, alkoholisch nach Grennacher.**

Vorschrift I. Man löst 4-5 g des fertigen Farbgemisches von *Grübler (Leipzig)* in 100 ccm kochenden Wassers und filtriert, bis die Lösung klar abläuft. Hierauf fügt man nach dem Erkalten 100 g Alkohol (96 %ig) hinzu.

Vorschrift II. Man löst in 100 ccm destilliertem Wasser 4 g Borax und 3 g Karmin *Merck* auf. Das Borax wird im Wasser gelöst und dann erhitzt. Nach dem Erhitzen löst sich auch das zugeetzte Karmin auf. Abkühlen. Zusatz von 100 ccm 90 %igem Alkohol.

Die Stücke kommen aus 50 %igem Alkohol in die Farblösung. Dauer der Stückfärbung 2 Tage. Hernach ohne Waschen zum Differenzieren sofort in 70 %igen Alkohol mit 0,5-1% Salzsäure. Diese Färbvorschrift wird fast nur für Stückfärbung benützt. Boraxkarmin färbt Kerne tiefrot und die übrigen Zellbestandteile schwächer rot.

**§ 126. Methylkarmin, alkoholisch nach Schwarz.** In neuer Zeit führen manche Autoren darüber Klage, daß die Karminfärbungen früher mit den damals unreineren Karminsorten besser gewesen seien als heutzutage. Besonders wird die Durchdringungsfähigkeit der Farbstoffe bei Stückfärbung heute als kleiner angesehen wie ehemals.

*Fritz Schwarz* (Zeitschrift f. wissenschaftliche Mikroskopie Bd.50, Heft 3) hat für die heute erhältlichen Karminsorten eine Vorschrift zur Stückfärbung bekanntgegeben, die stärker, jedoch sonst in gleicher Weise färbt wie *Grennachers* alkoholisches Boraxkarmin und besonders für die neueren Karminsorten ausgearbeitet worden ist. Vorschrift:

Destilliertes Wasser	200 ccm
Borax	4 g
Karmin <i>Merck</i>	4 g

Die Mischung wird mindestens eine volle Stunde lang gekocht. Nach *Schwarz* ist diese lange Kochdauer wesentlich für die Güte der Farbe. Dabei verdampft das Wasser bis auf 50 ccm. Noch während des Kochens füllt man mit destilliertem Wasser auf 100 ccm auf und läßt dann langsam abkühlen. Die noch etwas warme Mischung wird unter Umschwenken nach und nach in kleinen Portionen mit 100 ccm absolutem Methylalkohol versetzt. Abkühlen. Nach 24 Stunden filtrieren. Es darf sich kein nennenswerter Rückstand zeigen. Fixieren der Objekte, Färben

wie *Grennachers* Boraxkarmin. Differenzieren der Stücke mit 50 %igem Alkohol, der 0,5-1 ccm Salzsäure enthält. Dauer des Differenzierens 1-2 Tage.

Geeignet für Stücke bis 1 cm im Durchmesser. Die geeignete Schnittdicke ist 15-40µ.

**§ 127. Chromalaunkarmin nach Fyg.** Man löst in 100ccm heißem Wasser zuerst 6g Chromalaun. Nachdem die Lösung vollständig ist, gibt man 1g Karmin *Merck* hinzu und kocht 15 Minuten. Filtrieren nach dem Erkalten. Karbolzusatz.

FX

Quecksilberhaltige Fixiermittel, Pikrinsäure. Ungeeignet sind *Flemmingsche* Gemische und andere chromhaltige Fixiermittel.

DA 1/2 Stunde bis 24 Stunden

DF Wenn nötig, 0,5% iger HCl-Alkohol. Überfärbung tritt selten ein.

ES Caedax

BM

Kernfärbung für Schnitte. Für Stückfärbung weniger geeignet. Die Färbung ist eine scharfe, schwarzblaue Kernfärbung, das übrige Gewebe schwach blauviolett. Als Nachfärbung wird von *Fyg* besonders Säurefuchsin-Pikrinsäure empfohlen.

**§ 128. Muzikarmin.** Muzikarmin wird am besten gebrauchsfertig bezogen. Selbstherstellung möglich, wenn auch umständlich. 1g Karmin *Merck* wird mit 0,5g Aluminiumchlorid und 2ccm destilliertem Wasser gemischt und über kleiner Flamme 2 Minuten erhitzt, bis das Ganze recht dunkel geworden ist. Hierauf setzt man langsam unter Umrühren 100ccm 50%igen Alkohol zu. Diese Stammlösung ist haltbar.

Färben: Zum Gebrauch wird eine 10%ige Lösung in Wasser hergestellt,

DA 2-12 Stunden.

BM

Spezialfarbe für Schleime und Gallerten. Besonders schön für Niglitineinschluß nach *Eckert* als Gegenfarbe für grüne und blaue *Becher*-Farben-Vorschriften unter Verwendung von Karminsäure

**§ 129. Karmalaun nach P. Mayer.** In heißem destillierten Wasser in der Menge von 200 ccm werden gelöst: 10 g Kalialaun und 1 g Karminsäure *Merck*. Nach dem Erkalten wird filtriert und 1ccm Formol oder etwas Karbol zugesetzt. Ältere Lösungen sind vor Gebrauch zu filtrieren.

FX Beliebig. Die Farbe färbt nach allen Fixierungen.

DA

Die Färbedauer muß in jedem einzelnen Falle ausprobiert werden. Sie differiert von 10 Minuten bis 6 Stunden. Färbung nur für Schnitte. Stückfärbung siehe Eisenalaunkarmin nach *de Grot*.

**§ 130. Eisenalaunkarmin nach de Grot.** Zu 200 ccm Karmalaun, der in § 129 angeführten Vorschrift *ohne Karbolzusatz* gibt man 0,1 g Eisenalaunpulver und 2 Tropfen Salzsäure sowie einen Thymolkristall.

FX Beliebig

DA

Besonders für Stückfärbung geeignet. Färbedauer 2 Tage mit nachfolgendem ebenso langem Auswaschen in Wasser.

DF

Im allgemeinen nicht nötig. Sonst mit 1 %iger Kalialaunlösung oder 0,5 %iger wässriger Salzsäure möglich.

BM

Schnittfärbung ist natürlich auch mit Eisenalaunkarmin nach *de Grot* möglich. Für Schnittfärbung wird zweckmäßig die Farbe mit 4 Raumteilen einer 5% igen Kalialaunlösung verdünnt. Färbedauer dann 1/2 bis einige Stunden. Plasma-nachfärbung mit Lichtgrün SF .

§ 131. **Parakarmin nach P.Mayer ( alkoholisch )**. Unter Erwärmen auf dem Wasserbade ( Vorsicht! ) wird folgende Lösung angefertigt:

70%iger Alkohol	100 ccm
Aluminiumchlorid	0,5 g
Kalziumchlorid	4,0 g
Karminsäure <i>Merck</i>	1,0 g

Nach dem Erkalten filtriert man. Die Lösung ist lange haltbar. Fixierung: siehe § 124 Alaunkarmin nach *Grennacher*. Färbung: Schnittfärbung und Stückfärbung werden mit der gleichen Farbe durchgeführt. Auswaschen mit 70 %igem Alkohol.

DF

Differenzierung wird erreicht, wenn mit alkoholischer Aluminiumchloridlösung oder essigsauerm Alkohol ausgewaschen wird. ( 2-5 Tropfen Eisessig auf 100 ccm Alkohol).

BM

Karmalaun und Parakarmin färben nur Objekte, die nicht alkalisch reagieren.

§ 132. **Karminessigsäure nach Schneider**. Die Karminessigsäure nach *Schneider* wird für diagnostische Schnellfärbungen gebraucht vor allem an cytologischem Material. Die Objekte werden lebend in heiße Karminessigsäure gebracht. In kochender 45 %iger Essigsäure löst man gepulvertes Karmin *Merck* bis zur Sättigung auf, läßt erkalten und filtriert. Wird heiß angewandt. Die Färbung ist jedoch nur einige Tage haltbar. Nach *Zacharias* können Färbungen damit mit 1 %igem Ferriammoniumsulfat geschwärzt und etwas haltbarer gemacht werden.

Karminessigsäure kann auch mit Karminsäure angefertigt werden, wenn etwas Aluminiumchlorid und Kalziumchlorid zugefügt wird.

§ 133. **Schlußbemerkungen zu den Karminfärbungen**. Die Zeit der bevorzugten Verwendung von Karminfärbungen ist vorüber. Sie sind durch die Hämatoxylinfärbungen und teilweise auch durch die *Becher*-Farben verdrängt worden. Dem Anfänger seien sie trotzdem warm empfohlen, weil sie sehr sicher im Erfolg und einfach in der Anwendung sind, besonders bei der Stückfärbung. Nach dem Schneiden kann - ebenso natürlich auch bei Totalpräparaten wie Algen und Pilzen - das Plasma mit Lichtgrün FS oder mit Anilinblau gegengefärbt werden. Die Verbindung der Karmine mit Pikrinsäure hat sich nicht recht bewährt. Jedenfalls sind deren Erfolge umstritten. Arbeitsvorschriften über Pikrokarmin siehe bei *Straßburger*! Wässriges Boraxkarmin mazeriert, es ist deshalb hier nicht aufgenommen worden.

Für Zelloidineinbettung ist Stückfärbung anzuwenden. Eine Schnittfärbung ist nur nach Auflösung des Zelloidins durchzuführen. Alle Karmine färben Zelloidin stark an.

Karminfärbungen werden schokoladenbraun, wenn sie längere Zeit mit Brennspritus in Berührung kommen. Man kann also nicht den HCl-Alkohol zum Differenzieren mit Brennspritus ansetzen. Die schokoladebraune Färbung ist überdies nicht so haltbar und unschön im Ton.

### Färbungen mit Hämatoxylin

§ 134. Für das Färben mit Hämatoxylin sind im Laufe der Jahre recht viele Vorschriften veröffentlicht worden. Hier wird wieder nur eine Auswahl gebracht, und zwar wurden die einzelnen Lösungen so ausgesucht, daß jede der Vorschriften tatsächlich eine Farbe mit etwas anderen Eigenschaften ergibt. Überflüssig ist daher keine. Die Farblösungen für getrenntes Beizen und

Färben können recht gut selbst hergestellt werden. Die anderen Farblösungen bezieht man besser in gebrauchsfertigem Zustand von einer renommierten Firma.

[ Hämatoxylin, der Extrakt des Blauholzbaumes, ist ein hellbraunes, alkohollösliches Pulver, das keinerlei Färbekraft besitzt. Durch Oxidation (Luft,  $\text{NaJO}_3$ , Fe-III-Salze) geht es in Hämatein über, das den eigentlichen Farbstoff darstellt. Die natürliche Reifung durch Luft dauert einige Wochen, gewöhnlich oxidiert man mit 0,2 g  $\text{NaJO}_3$  pro 1 g Hämatoxylin, wobei ein Überschuß zu vermeiden ist. Aus diesem Grund nimmt man besser 0,2 g  $\text{KJO}_3$ , das weniger wirksames Jodat enthält.

Die Färbung erfolgt stets in saurer Lösung, welche ein Beizensalz enthält. Hierbei beladen sich die Schnitte mit Hämatein, erscheinen jedoch auch nach der Färbung noch ziemlich farblos, da sich der eigentliche Farbstoff erst im alkalischen Milieu bildet.

Aus diesem Grunde schließt sich an die Färbung grundsätzlich ein gründliches Wässern in Leitungswasser an (Bläuen der Schnitte), wobei der tiefviolette Farbstoff entsteht. Destilliertes Wasser oder Regenwasser können nicht zur Bläuung verwendet werden, auch sehr weiches Wasser ist ungeeignet. Notfalls bläut man mit Wasser, dem man etwas Natriumhydrogencarbonat zugesetzt hat.

Eisenhaltige Färbelösungen färben schon in saurem Milieu tief schwarz, allerdings muß auch hier „gebläut“ werden, damit der Farbstoff in eine haltbare Form überführt wird.

***Da bei allen Hämatoxylinfärbungen saure Lösungen zur Anwendung kommen, kann das nachträgliche Wässern gar nicht sorgfältig genug vorgenommen werden!***

Die Hämatoxylinfärbung gehört zu den ältesten Methoden der Mikrotechnik. Wegen ihrer großen Haltbarkeit und den vielen Variationsmöglichkeiten zählt sie auch heute noch zu den Standardmethoden!

Gewöhnlich schließt sich an die Hämatoxylinfärbung eine Gegenfärbung mit einem sauren Farbstoff an. ]

## Verfahren mit getrenntem Beizen und Färben

**§ 135. Eisenhämatoxylin nach Heidenhain.** Zur Durchführung der Färbung benötigt man folgende zwei Lösungen:

1. Man fertigt zunächst eine 1,5% ige wässrige Lösung von Eisenalaun an. Die Kristalle dürfen nicht verwittert sein. Manche Autoren empfehlen, den Gehalt an Eisenalaun auf 2,5% zu steigern. Im allgemeinen ist dies nicht notwendig, wenn auch verdünntere Lösungen etwas langsamer wirken als die stärkeren. Die Eisenalaunlösung ist hält sich nur 3-4 Wochen.
2. Man löst 0,5 g Hämatoxylin in 100 ccm Wasser auf. Zuerst löst man das gepulverte Hämatoxylin in 10 ccm 96 %igem Alkohol auf und setzt nach vollkommener Lösung das Wasser zu. Diese Hämatoxylinlösung soll 3 Wochen lang reifen, d.h. das Hämatoxylin muß durch Sauerstoffaufnahme aus der Luft in Hämatein übergeführt werden. Zur Beschleunigung des Reifungsprozesses kann man auf 500 ccm Hämatoxylinlösung 0,2 g Natriumjodat ( $\text{NaJO}_3$ ) zusetzen. Zu 100 ccm der Hämatoxylinlösung also 0,04 g. Die Lösung reift dann in 24-28 Stunden. Dunkel oder gar schwarz gewordene Lösungen kann man nicht mehr benutzen.

FX Am besten in quecksilberhaltigen Fixiermitteln

FB

Die Schnitte werden für 12-24 Stunden in der Eisenalaunlösung gebeizt. Kurzes Abspülen in Wasser. Hierauf erfolgt das Schwärzen in der Hämatoxylinlösung innerhalb einer Zeit von 12-24 Stunden. Abspülen in Leitungswasser.

DF

Mit ungebrauchter Eisenalaunlösung. Durch das Differenzieren werden nacheinander alle gefärbten Objektstellen wieder entfärbt, wenn man lange genug differenziert.

BM

Die Eisenhämatoxylinfärbung dient hauptsächlich zum Färben von Zellteilungsfiguren. Sie kann aber auch benützt werden, um die Gonidien der Algen, die Sporen der Ascomyceten usw. zur Darstellung zu bringen. Man hat nur das Differenzieren zu überwachen und im geeigneten Augenblick zu unterbrechen. An das Differenzieren schließt sich gründliches Auswaschen mit Wasser an. Ge-

färbt werden vor allem Kerne und Polkörperchen, achromatische Spindeln und manchmal die Zellgrenzen. Nachfärbung kann geschehen mit Lichtgrün, Bordeaux oder Säurefuchsin.

§ 136. **Eisenhämatoxylin nach Häggqvist** (37). Das Eisenhämatoxylin nach *Heidenhain* hat verschiedentliche Nachteile. Es ist an eine bestimmte Fixierung gebunden und die einzelnen Lösungen sind entweder wenig haltbar oder an bestimmte Reifestadien gebunden. Diese Nachteile vermeidet das Eisenhämatoxylin nach *Häggqvist*, das daher ganz besonders zu empfehlen ist. Man benötigt zwei Lösungen:

Lösung I: Dest. Wasser 100 ccm und Eisen-III-chlorid krist. 5 g

Lösung II: Dest. Wasser 100 ccm und Hämatoxylin 1 g

Die Eisenchloridlösung ist absolut haltbar. Die Hämatoxylinlösung ist sofort gebrauchsfertig. Frische Lösungen ergeben einen dunkelvioletten Farbton, ältere einen schwarzen.

FX Beliebig, die Färbung gelingt immer gut.

FB

Die Objekte werden 1 Stunde in der Eisenchloridlösung gebeizt. Nach Abspülen in destilliertem Wasser färbt man ebenfalls 1 Stunde in der Hämatoxylinlösung.

DF

Das Differenzieren geschieht entweder mit salzsaurem Alkohol oder aber mit 0,5 %iger wässriger Eisenchloridlösung, wobei die Kontrolle leichter ist als bei Anwendung des salzsauren Alkohols. Hernach gründliches Auswaschen in Wasser.

ES Nur in neutralen Harzen

BM

Die Methode ist für Zelloidinschnitte bestens geeignet, da das Zelloidin beim Differenzieren vollkommen entfärbt wird. Die Färbungen sind in viel kürzerer Zeit zu erzielen als bei der Eisenhämatoxylinfärbung nach *Heidenhain*.

(37) G.Häggqvist, Zeitschrift f. wissenschaftl. Mikroskopie 50, 1933, S.77

§ 137. **Kupfer-Hämatoxylinfärbung nach Benda**. Diese Färbung ist ausgearbeitet worden, um auch Objekte mit Chromfixierungen genau so färben zu können, wie es die Eisenhämatoxylinfärbung nach *Heidenhain* ermöglicht. Die Färbung ist eigentlich durch die Eisenhämatoxylinfärbung nach *Häggqvist* in gewissem Sinne überholt worden. Sie gestattet jedoch ein besonders langsames und sorgsames Differenzieren und deshalb wird sie in diesem Buche noch mit aufgeführt.

FX

Beliebig, die Färbung gelingt besonders nach Anwendung der beiden *Flemmingschen* Gemische und nach anderen chromhaltigen Fixiermitteln.

FB

1. Die Schnitte kommen für 48 Stunden in eine konzentrierte wässrige Lösung von Kupferacetat.
2. Hieran schließt sich ein Auswaschen.
3. Nach dem Auswaschen verbringt man die Schnitte in 1 %ige wässrige Hämatoxylinlösung bis zum völligen Schwarzwerden.

DF

Das Differenzieren nimmt man in folgender Lösung vor: Destilliertes Wasser 500 ccm, Salzsäure 1 ccm Hieran schließt sich erneutes Auswaschen an. Nach dem Auswaschen müssen die Schnitte mit frischer Lösung von Kupferacetat

gebläut werden. Dann endgültiges Auswaschen und weiteres Behandeln. Das Färbeergebnis ist wie bei den beiden Eisenhämatoxylinfärbungen.  
 ES Nur in neutralen Harzen.

## Verfahren mit Beize und Farbstoff in einer Lösung

### I. Ältere Vorschriften

**§ 138. Hämatoxylin nach Böhmer (Alaunhämatoxylin).** Die Hämatoxylinfärbung nach *Böhmer* wird vielfach der *Heidenhainschen* Eisenhämatoxylinfärbung vorgezogen. Sie ist jedenfalls sehr einfach auszuführen und leicht zu überwachen. Es gibt zwei Modifikationen:

Vorschrift I.

Lösung 1: Destilliertes Wasser 240 ccm und Kalialaun 1 g  
 Lösung 2: 96 %iger Alkohol 15 ccm und Hämatoxylin 1 g

Die Lösung 2 kann erst verwendet werden, wenn sie braun geworden ist.

FX Beliebig

FB

In ein Uhrschälchen gießt man zu einigen Kubikzentimetern der Lösung 1 einige Tropfen der Lösung 2. Die Objekte färben sich darin sehr rasch.

DF

Die Differenzierung erfolgt mit salzsaurem Alkohol. Dann Auswaschen und Nachbläuen mit ammoniakalischem Alkohol.

Vorschrift II.

Lösung 1: Alkohol abs. 10 ccm und Hämatoxylin 1 g  
 Lösung 2: Destilliertes Wasser 200 ccm und Kalialaun 20 g

Nachdem beide Lösungen 24 Stunden gestanden haben, mischt man sie miteinander. In offener Schale läßt man sie 8-10 Tage reifen und filtriert sie dann durch Glaswolle. Die Lösungen sind lange haltbar!

FX Beliebig

FB Die Schnitte färben sich innerhalb von 5-10 Minuten.

DF In salzsaurem Alkohol, dann Waschen und Bläuen.

**§ 139. Hämatoxylin nach Delafield.** Man benötigt zunächst folgende zwei Lösungen:

1. Destilliertes Wasser 100 ccm und Ammoniakalaun 15 g. Diese Lösung läßt man unter öfterem Umschütteln einige Tage stehen, bis sich eine gesättigte Lösung gebildet hat. Es bleibt dabei in der Flasche immer eine Menge ungelösten Alauns zurück. Abgießen, Filtrieren!
2. Absoluter Alkohol 6 ccm und Hämatoxylin 1 g

Das Hämatoxylin nach *Delafield* wird folgendermaßen hergestellt. Lösung 2 gießt man *tropfenweise* unter fortwährendem Umschütteln in Lösung 1. Die Mischung läßt man nun offen an der Luft und am Licht stehen, bis sie dunkel genug geworden ist. Das ist in der Regel in einer Woche der Fall. Nun werden noch 25 ccm Methylalkohol und 25 ccm reines Glycerin zugesetzt. Schließlich wird mit Glaswolle filtriert und die Farblösung in drei Flaschen von je 50 ccm abgefüllt. Es ist besonders darauf zu achten, daß die Korkstopfen gut schließen. In diesen Fla-

schen hat die Farblösung noch gut 2 Monate zu stehen, bevor sie gebrauchsfertig ist. In gut verschlossenen Flaschen ist die Farbe lange haltbar.

*Chamberlain* berichtet, daß er Hämatoxylin nach *Delafield* noch nach 20 Jahren voll gebrauchsfertig gefunden hat.

FX Am besten Alkohol abs.

FB

Die Färbedauer ist 5-10 Minuten. Hämatoxylin nach *Delafield* hat in der Botanik eine gewisse Berühmtheit erhalten. Es färbt Zellkerne, auch in stärkehaltigen Zellen. Es ist eine Spezialfärbung für Pektinstoffe. In Kombination mit Safranin ist es auch zur Untersuchung von Kernteilungsfiguren geeignet (*Straßburger*).

DF

Salzsaurer Alkohol. Nach dem Differenzieren muß mit etwas ammoniakalischem Alkohol die schöne purpurne Farbe wieder hergestellt werden. Zelloidin läßt sich beim Differenzieren völlig entfärben.

**§ 140. Saures Hämatoxylin nach Ehrlich.** Lösungsvorschrift: Man löst 2 g Hämatoxylin in 100 cm Alkohol auf. Hierauf werden 100 ccm destilliertes Wasser, 100 ccm Glycerin puriss., 10 ccm Eisessig und 3 g Kalialaun zugefügt. Das Gemisch wird mit Seidenpapier zugedeckt, um Verunreinigung durch Staub zu vermeiden, und 14 Tage in einer Schale zur Reifung bis zur dunkelroten Färbung stehen gelassen. Hierauf ist es gebrauchsfertig und in gut verkorkter Flasche jahrelang haltbar.

FX Beliebig

FB Man färbt 5-10 Minuten. Auswaschen mit 50 %igem Alkohol.

DF

Wenn nötig mit HCl-Alkohol. Überfärbung tritt fast nie ein. Nach dem Differenzieren Bläuen mit ammoniakalischem Alkohol.

BM Hämatoxylin nach *Ehrlich* färbt das Zelloidin überhaupt nicht an.

**§ 141. Hämatoxylin nach Hansen.** Herstellungsvorschrift:

1. Absoluter Alkohol	10 ccm	und	Hämatoxylin	1 g
2. Destilliertes Wasser	200 ccm	und	Kalialaun	20 g
3. Destilliertes Wasser	16 ccm	und	Kaliumpermanganat	1 g

Nachdem die drei Lösungen 24 Stunden gestanden haben, mischt man Lösung 1 und Lösung 2 miteinander und gießt sie in eine Porzellanschale. In dieser Porzellanschale erwärmt man nun das Gemisch und unter stetem Erwärmen und stetem Umrühren gibt man tropfenweise 3 ccm der Lösung 3 zu. Ist dies geschehen, erwärmt man bis zum Aufkochen und läßt die Farbe 1/2 Minute sieden, kühlt dann *schnell* ab und filtriert durch Glaswolle. Die Farblösung ist sofort gebrauchsfertig.

FX Am besten Formalin

DA 5-10 Minuten

DF Mit salzsaurem Alkohol. Nachbläuen!

**§ 142. Saures Hämalalaun nach P.Mayer.** In 100 ccm destilliertem Wasser werden 1 g Hämatoxylin gelöst, 5 g Kalialaun und 0,02g [ ist 0,2 g gemeint? ] Natriumjodat (  $\text{NaJO}_3$  ) gegeben. Nach völligem Lösen dieser Bestandteile gibt man 5 g Chloralhydrat und 0,1 g kristallisierte Zitronensäure zu. Die Lösung ist rotviolett und lange haltbar.

*Grübler* und *Hollborn* bringen auch fertige Mischungen in Pulverform in den Handel, die nur in der angegebenen Menge destillierten Wassers aufzulösen sind, um eine gute gebrauchsfertige Farblösung zu erhalten.



FX Beliebig, außer Formalin  
 FB

Die Schnitte kommen aus *destilliertem* Wasser in die Farblösung. Die Färbung erfolgt in 1-10 Minuten. Auswaschen in destilliertem Wasser. Übertragen in Leitungswasser, in dem der schöne blaue Ton erscheint. Zum Bläuen kann auch mit bestem Erfolg hier - wie bei allen Hämatoxylinfärbungen überhaupt - eine 1 %ige wässrige Lösung von Kupferacetat genommen werden.

DF

Wenn nötig, wird die Differenzierung vorgenommen entweder in 5 %iger Kalialaunlösung oder in HCl-Alkohol. Hiernach wieder Auswaschen und erneutes Bläuen.

**§ 143. Glycerin-Alaun-Hämatein-Lösung nach Rawitz.** In 100ccm destilliertem Wasser werden 0,5g Hämatein (*nicht Hämatoxylin!*) gelöst. Das Lösen wird durch leichtes Erwärmen beschleunigt. In diese noch warme Lösung kommen 3 g Ammoniumalaun. Nach dem Erkalten fügt man noch 100 g Glycerin pur. hinzu.

FX Beliebig  
 FB

Die unverdünnte Lösung färbt innerhalb von 5 bis 20 Minuten. Die schönsten Färbungen erreicht man jedoch mit ganz verdünnten Lösungen. Man gibt auf 100ccm destilliertes Wasser 1-3 Tropfen der Farbe und färbt 24-48 Stunden. Durch die verdünnte Lösung wird Zelloidin nicht im geringsten angefärbt.

DF

In 1 %igem HCl-Alkohol. Nachbläuen!

ES

Neutrale Harze

BM

Für Kryptogamenfärbung wird die Glycerin-Alaun-Hämatein-Färbung nach *Rawitz* von keiner anderen Hämatoxylinfärbung an Güte der Färbung, Verlässlichkeit des Ergebnisses und Sicherheit der Überwachung erreicht. Notwendig ist nur eine einwandfreie Farbe, deren Güte wesentlich von dem verwendeten Alaun und Glycerin abhängt

## II. Neuere Vorschriften

**§ 144. Eisenhämatoxylin nach Weigert.** Man benötigt zwei Lösungen:

- |    |                                   |         |
|----|-----------------------------------|---------|
| 1. | 96 %iger Alkohol                  | 100 ccm |
|    | Hämatoxylin                       | 1 g     |
| 2. | Destilliertes Wasser              | 95 ccm  |
|    | FeCl <sub>3</sub> -Lösung, offic. | 4 ccm   |
|    | Salzsäure                         | 1 ccm.  |

Diese beiden Teillösungen sind haltbar.

FX Beliebig, am besten jedoch Formalin.  
 FB

Unmittelbar vor Gebrauch mischt man Lösung 1 und Lösung 2 zu gleichen Teilen. Die Mischung ist tiefschwarz und nur wenige Stunden haltbar. Die Färbedauer ist kurz. Man kann aber beliebig lange färben, da ein Überfärben kaum eintritt. Eventuell nimmt man bei langsamer Färbung eine neue Farbmischung.

DF

Kaum nötig; wenn ja, mit salzsaurem Alkohol; hernach Auswaschen mit Wasser, Bläuen.

BM

Eisenhämatoxylin nach *Weigert* ergibt eine sehr reine Kernfärbung. Nachfärbung besonders mit Eosin oder Säurefuchsin (Rubin S).

**§ 145. Molybdän-Hämatoxylin nach Held.** Man löst 1 g Hämatoxylin in 100 ccm 70 %igem Alkohol auf und setzt dazu 2-3 Messerspitzen Molybdänsäure. Umschütteln! Es muß immer ein Überschuß von ungelöster Molybdänsäure vorhanden sein. Die Farblösung färbt frühestens 4 Wochen nach der Herstellung. Sie ist fast unbegrenzt haltbar und färbt mit den Jahren immer besser.

FX Beliebig.

FB

In 50 ccm destilliertes Wasser gibt man 2-4 Tropfen der Farblösung und färbt innerhalb 12-24 Stunden.

DF

Leitungswasser 10 Minuten bis mehrere Tage. Salzsaurer Alkohol wird nur in Ausnahmefällen angewendet werden müssen.

### Färbungen mit künstlichen organischen Beizenfarbstoffen ( *Becher-Farben* )

**§ 146.** Die natürlichen Beizenfarbstoffe Karmin und Hämatoxylin ergeben sehr schöne Färbungen. Vom Hämatoxylin kann man ohne Übertreibung sagen, daß es in der Histologie und Pathologie auch heute noch der meistgebrauchte Farbstoff ist. Die sogenannte H-E-Färbung (Hämatoxilin-Eosin) ist eigentlich *die* Färbung in den Laboratorien. Hämatoxylin und auch Karmin halten sich jedoch schlecht in Kanadabalsam und überhaupt nicht in Glyceringelatine, so daß wirkliche Dauerpräparate erst dann möglich wurden, als die *Behringwerke* ihr *Caedax* den Mikroskopikern schenkten.

Die Anilinfarben spielen nur in der Bakteriologie wirklich eine Rolle. In der Histologie, Zoologie und Botanik verwendet man sie weniger. Der Grund dafür ist vor allem der, daß die Beizenfarbstoffe viel schönere und prägnantere Kernfärbungen abgeben.

*Becher* hat nun in schönen und umfassenden Untersuchungen nach Beizenfarbstoffen gesucht, die Vorteile der natürlichen Beizenfarbstoffe hinsichtlich der Färbungsfähigkeit aufweisen und zugleich in allen Medien wirklich haltbar sind. Dieses Ziel hat *Becher* wirklich erreicht. Der Verfasser besitzt Algen, die mit Alizarin-Viridin nach *Becher* gefärbt, in Glyceringelatine eingeschlossen, sich bereits über 14 Jahre vollkommen unverändert gehalten haben. Färbungen mit künstlichen organischen Beizenfarbstoffen können tatsächlich in allen Medien eingeschlossen werden. Man kann daher bei ihrer Anwendung das Einschlußmedium nur nach den optischen Eigenschaften der Medien auswählen.

Für botanische Zwecke ist allerdings nur eine beschränkte Anzahl von künstlichen Beizenfarbstoffen verwendbar. Immerhin haben wir unter den Farben Rot, Grün und Blau verschiedene Nuancen zur Auswahl, und das reicht wirklich aus.

Die Färbungen können mit Farblacken in einem Arbeitsgang oder mit getrenntem Beizen und Färben erzielt werden. Die Farblacke überfärben nie, was ein weiterer Vorzug dieser Farbensgruppe ist.

### Verfahren mit getrenntem Beizen und Färben

**§ 147. Naphthazarin und Naphthopurpurin.** Naphthazarin ergibt eine schwarzblaue Färbung und Naphthopurpurin eine dunkelrote. Die Verarbeitungsweise ist bei beiden Farben die gleiche. Man benötigt folgende zwei Lösungen:

1. Destilliertes Wasser 100 ccm und Eisenalaun 1 g
2. Destilliertes Wasser 100 ccm und Naphthazarin oder Naphthopurpurin 1 g

FX Beliebig.

FB

Man beizt die Objekte 12-24 Stunden in Lösung 1. Dann schwenkt man ab und färbt in Lösung 2. Zelloidin färbt sich unauswaschbar an. Das Zelloidin wird daher zweckmäßig vorher entfernt. In der Farblösung bleiben die Objekte bis die gewünschte Färbung erreicht ist oder auch 24 Stunden.

DF

Bei diesem getrennten Verfahren ist in der Regel stärkeres Differenzieren notwendig. Dieses kann vorgenommen werden mit 10-20 %igem salzsaurem Alkohol, mit 5 %iger Phosphormolybdänsäure oder mit 5 %iger Phosphorwolframsäure. Phosphorwolframsäure verändert manchmal den Farbton. Hernach Auswaschen mit Wasser. Zu schwach ausgefallene Färbungen können - wie überhaupt alle *Becher*-Färbungen - mit einer 5 %igen wässrigen Lösung von Kobaltchlorid nachträglich dunkler gefärbt werden. Meistens resultiert ein dunkler blauer Farbton.

**§ 148. Alizarinzyanin RR, Alizarindunkelgrün, Alizarinviridin.** Diese drei Farbstoffe können nach gleicher Vorschrift angewendet werden. Man benötigt folgende zwei Lösungen:

- |                                 |     |                |     |
|---------------------------------|-----|----------------|-----|
| 1. Destilliertes Wasser 100 ccm | und | Chromalaun     | 1 g |
| 2. Destilliertes Wasser 100 ccm | und | Alizarinzyanin | 1 g |

Statt Alizarinzyanin kann auch die gleiche Menge von Alizarindunkelgrün oder Alizarinviridin genommen werden.

- FX Beliebig.  
 FB Wie oben bei Naphthazarin.  
 DF Wie oben bei Naphthazarin.

Diese von Becher empfohlenen regressiven Färbungen scheinen wenig gebräuchlich geworden zu sein, obwohl sie bei einiger Einarbeitung nur Gutes leisten. Sie sind besonders zu empfehlen bei Objekten, die sich mit den Farblacken nicht oder nur unwillig färben. Am meisten gebraucht werden wegen ihrer Einfachheit die Verfahren mit Beize und Farbe in einer Lösung.

### Verfahren mit Beize und Farbstoff in einer Lösung

**§ 149. Alizarinviridin nach Becher.** Man löst in 100 ccm 5 %iger, kochender wässriger Chromalaunlösung so viel Farbstoff auf, wie sich lösen kann. Das sind ungefähr 0,5-1,0 g. Die Lösung läßt man wenigstens 5 Minuten lang tüchtig kochen. Einen Tag nach dem Abkühlen filtriert man ab. Die Lösung ist jahrelang haltbar. Bei älteren Lösungen kann erneutes Filtrieren notwendig werden, besonders, wenn sich reichlich Alizarinviridin aufgelöst hat.

FX Beliebig. Sehr geeignet ist das *Pfeiffersche* Gemisch.

Da

In der Originallösung färben sich die meisten Objekte in wenigen Stunden. In Farblösungen, die mit 2 bis 5 Teilen Wasser verdünnt wurden, dauert die Färbung bis zu 12 Stunden.

DF

Die Farblösung überfärbt nicht. Geringe Farbabschwächung tritt beim Passieren von Glycerin ohnehin ein, was man berücksichtigen muß, wenn in Glycerin oder in Glyceringelatine eingeschlossen werden soll.

BM

Alizarinviridin ist bei Kryptogamen als Universalfarbstoff anzusprechen. Es lassen sich fast alle Objekte damit färben. Zudem ist die Färbung ein sehr angenehmes Grün.

Es färben sich: Kerne, Kernkörperchen, Chromatophoren, Zellwände bei Farnen, Bärlappen. Totalfärbungen von Algen und niederen Pilzen sind möglich, ferner Gonidienfärbung bei Flechten.

Schleime und Gallerten bleiben ungefärbt. Zelloidin wird unauswaschbar angefärbt.

[ An dieser Stelle sei eine Anmerkung zu den grünen Farbstoffen der Mikrotechnik gestattet.

Es ist leicht, Farbstoffe zu synthetisieren, welche blaues oder grünes Licht absorbieren und die dem entsprechend gelb oder rot aussehen ( Komplementärfarbe ). Dagegen nimmt die Zahl derjenigen Farbstoffe, die gelbes Licht absorbieren und die deshalb blau aussehen, schon deutlich ab, und Farbstoffe, die ausschließlich rotes Licht absorbieren und damit einen rein grünen Farbton besitzen, sind ganz selten.

Zudem läßt sich zeigen, daß bei Verschiebung des Absorptionsmaximums von blau über grün und gelb nach rot die Moleküle immer instabiler und damit zum Färben immer ungeeigneter werden, es sei denn, man stabilisiert z.B. durch die Bildung von Komplexen oder von Farblacken. Dem entsprechend werden in der Mikrotechnik nur vier grüne Farbstoffe verwendet: Methylgrün, Malachitgrün, Lichtgrün und Alizarinviridin, wobei nur Alizarinviridin, zusammen mit einer Beize angewendet, eine wirklich stabile Färbung ergibt.

Leider besitzen die genannten Farbstoffe alle einen unangenehmen Blaustich, was gerade bei der Nachfärbung von Algen stört. Bis heute ist es nicht gelungen, Farbstoffe aufzufinden, welche den leuchtend grünen Farbton vieler Algen nachahmen, und gelbgrüne Farbstoffe, die zum Nachfärben der Chrysophyceen geeignet wären, gibt es ebenfalls nicht. *Schömmers* Angaben über die Farbechtheit des Alizarinviridins sind korrekt - vom Farbton her ist auch dieser Farbstoff nur ein Notbehelf. ]

**§ 150. Säurealizarinblau nach *Becher*.** Man löst in 100 ccm destilliertem Wasser 10 g Aluminiumsulfat und 0,5 g Säurealizarinblau auf. Die Lösung läßt man gut 10 Minuten kochen. Nach 24 Stunden wird filtriert.

FX Beliebig.

DA Die Lösung färbt die meisten Objekte in wenigen Stunden.

DF

Säurealizarinblau färbt Zelloidin an, das Zelloidin entfärbt sich jedoch beim Differenzieren.

Die 5 %ige Phosphormolybdänsäure stabilisiert beim Differenzieren die blaue Farbe. Die 5 %ige Phosphorwolframsäure verwandelt die blaue Farbe in rote Farbe um. Man kann daher mit Säurealizarinblau in Blau und in Rot färben.

BM

Für die weitere Behandlung der Objekte ist von Wichtigkeit, daß *schwacher* Alkohol die Farbe etwas auszieht, *hochprozentiger* nicht. Man hat daher etwas stärker zu färben, als die fertigen Präparate gefärbt sein sollen.

**§ 151. Anthrazenblau nach *Becher*.** Anthrazenblau nach *Becher* wird in zwei Formen in den Handel gebracht, als Anthrazenblau siccum und als Anthrazenblau WR extra in Teigform, neuerdings auch in Pulverform.

#### Vorschrift I

Destilliertes Wasser	100	ccm
Aluminiumsulfat	5	g
Anthrazenblau, Teigform	0,5	g

Die Lösung läßt man 10 Minuten lang kochen, dann erkalten und filtriert nach 24 Stunden. Die Farblösung ist jahrelang haltbar.

FX Beliebig

DA Die Farblösung färbt in einigen Stunden.

DF

Wie bei allen *Becher-Farben*; Zelloidin wird von Anthrazenblau nach dieser Vorschrift kaum angefärbt.

Vorschrift II

Destilliertes Wasser	100	ccm
Aluminiumchlorid	5	g
Anthrazenblau sicc.	0,2	g

Die Mischung muß mindestens 10 Minuten kochen. Abkühlen lassen und nach 24 Stunden Filtrieren.

FX Beliebig  
FB

Die Färbung dauert bei botanischen Objekten bis 24 Stunden. Anthrazenblau sicc. standardisiert färbt williger als Anthrazenblau WR extra, aber in einem rotstichigen Ton. Die Farbe nach dieser Vorschrift löst bei den Schnitten etwa vorhandene Kalziumoxalatkristalle auf, was auf den Gehalt an Aluminiumchlorid zurückzuführen ist.

Vorschrift III

*Leunig* (38) gibt an, daß der rotviolette Ton der Anthrazenblaufärbungen in einen dunklen schwarzblauen Ton umgewandelt werden kann. Für botanische Zwecke hat sich nach *Leunig* folgendes Verfahren bewährt:

Man nimmt von der Anthrazenblaulösung 10 Tropfen, von einer 3 %igen Eisenalaunlösung 1 Tropfen und vermischt beide in einem Uhrsälchen. Diese Mischung ist 2 Stunden brauchbar. Die Färbung wird innerhalb von 1-2 Stunden erreicht. Die Farbblösung muß daher schon nach einer Stunde gewechselt werden, falls die Färbung nicht bereits genügend fortgeschritten ist. Bereits verdorbene Farbe bildet unlösliche Niederschläge in den Objekten. Nach der Färbung muß gründlich gespült werden. Bei Phanerogamschnitten kann das Holz mit Safranin gegengefärbt werden.

(38) L.Leunig, Mikrokosmos XXIX, 1935/36

**§ 152. Alizarinzyanin RR, Alizarinzyanin G.** Beide Farbstoffe sind für botanische Zwecke sehr gut brauchbar. Herstellungsvorschrift:

Destilliertes Wasser	100	ccm
Aluminiumchlorid oder -sulfat	5	g
Alizarinzyanin	0,2	g

Die Mischung muß mindestens 10 Minuten kochen. Nach 24 Stunden wird abfiltriert.

FX Beliebig.  
FB

Die beiden Farbstoffe färben schön blau. Die Sorte RR ist manchmal rotstichig, d.h. geht ins Violette. Alizarinzyanin ist empfindlich gegen Basen. Die Objekte müssen daher unter Umständen mit verdünnter Essigsäure vorbehandelt werden. Die Färbedauer ist schwankend. Sie umfaßt den Zeitraum von 5 Minuten bis einige Stunden, je nach dem Objekt. Alizarinzyanin gestattet ein nachträgliches Beizen in 1 %iger Chromsäure und gegenfärben mit Safranin.

**§ 153. Gallein nach *Becher*.** Herstellungsvorschrift:

Destilliertes Wasser	100	ccm
Kalialaun oder Aluminiumsulfat	5	g
Gallein	0,2	g

Die Mischung muß mindestens 10 Minuten kochen. Nach 24 Stunden wird abfiltriert. Die Farbe ist haltbar.

FX Beliebig.  
FB

Die Farblösung färbt sehr rasch. Oft sind die Objekte bereits nach 10 Minuten vollkommen durchgefärbt. Die Kerne sind rot gefärbt, wie bei Karmalaun. Das Plasma ist schwach gefärbt. Die Plasmafärbung kann durch Differenzieren entfernt werden.

DF Die Differenzierung ist bereits durch den Salzsäurealkohol üblicher Konzentration zu erreichen.

**§ 154. Gallozyanin nach *Becher*.** Herstellungsvorschrift:

Destilliertes Wasser	100	ccm
Chromalaun	5	g
Gallozyanin	0,15	g

Die Farblösung muß mindestens 10 Minuten kochen. Nach 24 Stunden filtrieren. Die Lösung ist nur etwa 1 Woche haltbar. Frisch hergestellte Lösungen färben am dankbarsten.

FX Beliebig.  
FB

Gallozyanin färbt innerhalb von 24-48 Stunden das Chromatin tiefblau bis schwarz.

DF Wenn nötig, wie bei Säurealizarinblau.

**§155. Naphthazarin nach *Becher*.** Vorschrift:

Destilliertes Wasser	100	ccm
Aluminiumchlorid oder -sulfat	5	g
Naphthazarin	0,1	g

Die Mischung muß 5 Minuten lang kochen. Nach 24 Stunden wird filtriert.

FX Beliebig.  
FB Die Färbung dauert 12-24 Stunden. Die Farbe ist tief schwarzblau.  
DF Überfärben tritt nicht ein. Zelloidin wird angefärbt.

**§ 156. Naphthopurpurin nach *Becher*. Vorschrift:**

Destilliertes Wasser	100	ccm
Aluminiumchlorid oder -sulfat	5	g
Naphthopurpurin	0,3	g

Die Mischung muß 5 Minuten lang kochen. Nach 24 Stunden Wird filtriert.

- FX Beliebig.  
 FB Die Färbung erfolgt in dunkelrotem Tone. Färbedauer 12-24 Stunden

**§ 157. Kernechtrot ( *Hollborn* ) *stand. Bayer*. Vorschrift:**

Destilliertes Wasser	100	ccm
Aluminiumsulfat	5	g
Kernechtrot	0,2	g

Die Mischung muß ungefähr 10 Minuten kochen. Nach 24 Stunden filtriert man ab.

- FX Kernechtrot färbt nach Chromessigsäure, Pikrinsäure und nach quecksilberhaltigen Fixiermitteln.  
 DA 2-3 Tage  
 DF Überfärbung tritt nicht ein  
 BM Kernechtrot färbt Zellkerne, Chromatophoren und verholzte Zellwände, ferner Phanerogamen und einige Algen. Bei den meisten Kryptogamen versagt es. Empfehlenswerte Gegenfärbungen sind bei cytologischen Objekten: Anilinblau, bei histologischen Schnitten: Kernschwarz, Hämatoxylin.