

Kultur
und
mikrotechnische
Bearbeitung
von
Ciliaten
Anleitung
für
Amateure

Dr.G.Rosenfeldt
2016

EINFÜHRUNG

Ciliaten sind die wohl elegantesten Einzeller überhaupt - nicht nur wegen ihrer großen Beweglichkeit, sondern auch wegen ihrer zarten durchsichtigen Körper. Zugleich sind diese Organismen gegen Milieuänderungen außerordentlich empfindlich, so daß schon ihre Lebendbeobachtung Schwierigkeiten bereitet, erst recht ihre mikrotechnische Bearbeitung. Da sie weder über ein Skelett verfügen noch über eine stabile Zellwand oder Pellicula, führen so gut wie alle Umweltveränderungen zum Zerplatzen oder aber zu irreversiblen Schrumpfungen.

Diese kleine Schrift soll Amateuren helfen, sich mit Ciliaten eingehender zu beschäftigen, denn die Materialbeschaffung ist recht einfach. Zudem werden einige mikrotechnische Methoden vorgestellt, die auch ein Amateur leicht anwenden kann. Diese Methoden sind allerdings für cytologische Feinuntersuchungen ungeeignet, aber derartige Untersuchungen kommen für Amateure ohnehin nicht infrage.

1. MATERIALBESCHAFFUNG

1.1. HEUAUFGUSS

Man beschickt ein Marmeladenglas mit einem Teelöffel Gartenerde, einem linsengroßen Stück Hartkäse und etwas langsam getrocknetem Gras (Rückstand aus dem Korb des Rasenmähers), dann füllt man 5 cm hoch Leitungswasser ein (kein destilliertes Wasser!), markiert die Füllhöhe mit einem Filzstift, bedeckt die Öffnung mit einem Stück Papier und stellt das Glas bei Raumtemperatur an einen dunklen Ort, um Algenentwicklung zu unterbinden. Nach wenigen Tagen kann man reichlich Ciliaten finden, die sich vorwiegend an der Wasseroberfläche aufhalten, da Ciliaten sehr sauerstoffliebend sind. Ferner findet man sie am Boden des Gefäßes, da dort reichlich Bakterien vorhanden sind. Die hier beschriebene Kultur wird auch als „Heuaufguß“ bezeichnet.

Sinkt der Wasserspiegel durch Verdunstung, füllt man mit destilliertem Wasser auf, da andernfalls der Salzgehalt der Kultur immer weiter steigen würde.

Leitungswasser und Gartenerde liefern die notwendigen Mineralsalze und Spurenelemente, das Stückchen Käse garantiert die Entwicklung von Bakterien, von denen die Ciliaten leben.

Verwendet man frisch geschnittenes Gras, wird man wenig Erfolg haben, denn das Leitungswasser stellt für die anhaftenden Ciliaten einen massiven Milieuwechsel dar – sie sterben rasch ab. Trocknet feuchtes Gras jedoch langsam ein, bilden viele Ciliaten Cysten und gehen in einen weitgehend abiotischen Zustand über. Durch Wasser werden diese Cysten erneut zum Leben erweckt, wobei die frei werdenden Ciliaten das Wasser als „neues Milieu“ akzeptieren.

1.2. PLANKTONKULTUR

Enthält eine Planktonprobe (Netzplankton) größere Mengen Ciliaten, entnimmt man dem Probenort zusätzlich etwa 1 Liter Wasser. Man füllt mehrere Marmeladengläser mit dem mitgebrachten Wasser, setzt ein Stückchen Hartkäse zu bzw. Reiskörnchen,

die man vorher mit einer Zange zerdrückt, und gibt dann in jedes Glas einige Milliliter des Planktonkonzentrates. Da das Wasser vom Probenort stammt, wird eine Milieuänderung vermieden.

1.3. SEMI-REINKULTUR

Verwendet man Hartkäse, um die Ciliaten der Kultur mit Bakterien zu versorgen, kommt es leicht zur Ausbildung einer störenden Kahlhaut. Man vermeidet dies, indem man eine käsefreie Kultur anlegt und in einem zweiten Glas mit demselben Wasser unter Verwendung von Hartkäse Bakterien heranzüchtet. Von dem nun trüben Wasser setzt man der Ciliatenkultur von Zeit zu Zeit einige Milliliter als Nahrungsquelle zu. Da die eigentliche Kultur eiweißfrei ist, können sich die Bakterien dort nicht weiterentwickeln.

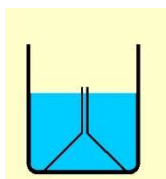
1.4. KULTURMEDIEN

Universell anwendbare Kulturmedien für Ciliaten gibt es nicht, hier hilft nur experimentieren, aber gerade das macht die Beschäftigung mit Ciliaten auch für Amateure reizvoll. Wie eines unserer Mitglieder herausgefunden hat, ist Mineralwasser der Marke VOLVIC zusammen mit einigen zerdrückten Reiskörnern für die Kultur von Paramecien gut geeignet, aber auch andere CO₂-freie Mineralwässer kommen infrage.

Ferner kann man Mineralwässern einige Milliliter „Erddekot“ zusetzen: Man kocht einige Eßlöffel Gartenerde mit 0,3 Liter destilliertem Wasser aus, läßt über Nacht absetzen und hebt den Überstand in einer gut verschlossenen Flasche im Kühlschrank auf.

Schließlich können auch wenige Flocken des Zierfischfutters TETRAMIN sowohl als Nahrung für die erforderlichen Bakterien dienen als auch, sehr fein zerrieben, als direkte Nahrung für bestimmte Ciliaten.

1.5. KONZENTRIEREN VON CILIATEN



Hierzu stellt man einen Trichter über Kopf in das Kulturglas (s.Abb.1), wobei die Flüssigkeit bis in das Rohr des Trichters reichen muß. Im Inneren des Trichters sinkt der Sauerstoffgehalt allmählich, und die Ciliaten sammeln sich im Rohr des Trichters, wo man sie mit einer lang ausgezogenen Pipette absaugen kann.

Abb.1

2. BEOBACHTEN VON CILIATEN

2.1. LEBENDBOBSACHTUNG

Ciliaten besitzen oft eine komplizierte räumliche Struktur, die man am besten bei der Lebendbeobachtung erkennt. Um die Beweglichkeit der Ciliaten herabzusetzen, setzt man der Probe einen Tropfen Gelatinelösung (2%-ig) zu. Da Gelatine osmotisch un-

wirksam ist, kommt es zu keinen Schrumpfungen. Glycerin ist dagegen völlig ungeeignet: Es wirkt wasserentziehend und die Ciliaten schrumpfen sofort bis zur Unkenntlichkeit zusammen.



FOISSNER empfiehlt folgendes Vorgehen: Man bringt einen möglichst konzentrierten Probetropfen auf einen Objektträger und fischt dann mit einer Mikropipette (Mikroskop, schwache Vergrößerung) einen oder mehrere Ciliaten aus dem großen Probetropfen heraus. Dann entleert man die Mikropipette auf einem zweiten Objektträger, wobei nur ein „Mikrotropfen“ entstehen darf. Diesen bedeckt man mit einem quadratischen Deckglas, das man zuvor an allen vier Ecken mit „Vaselinefüßchen“ versehen hat. Nun drückt man das Deckglas vorsichtig unter mikroskopischer Kontrolle mit einer Präpariernadel

schrittweise nach unten, wobei sich der Mikrotropfen immer weiter ausbreitet, ohne am Rande auszutreten (s.Abb.). Gleichzeitig werden die Ciliaten schrittweise an einem Ort fixiert und können bequem mikroskopisch untersucht oder fotografiert werden. Diese Methode ist zwar umständlicher und erfordert einiges Geschick, sie hat jedoch zwei große Vorteile: Die Ciliaten sind jetzt ortsfest fixiert, während sie nach Gelatinezusatz nach wie vor umherschwimmen; außerdem werden sie flach gedrückt, was die Beobachtung im Phasenkontrast verbessert.

2.2. TÖTEN VON CILIATEN

Die mit Abstand beste Methode ist das Räuchern mit Osmiumtetroxid (OsO_4). Man dreht den Objektträger rasch um und legt ihn dann für 30 Sekunden auf die Öffnung einer Flasche, die eine 1%-ige Osmiumtetroxidlösung enthält. Es erfolgt keine Schrumpfung, zudem wirken die Dämpfe fixierend (wichtig für cytologische Untersuchungen). Für Amateure kommt diese Methode wegen der großen Giftigkeit der OsO_4 -Dämpfe nicht infrage. Alle Arbeiten müssen unter einem sehr gut ziehenden Abzug durchgeführt werden, und auch die Lösung muß in einem Absaugschrank verwahrt werden.

Empfohlen wird auch eine 1%-ige wässrige Kokainlösung. Leider wird kein Apotheker eine solche Lösung an einen Amateur abgeben (Betäubungsmittelgesetz). Xylokain, Novokain und andere Lokalanästhetika sind übrigens wirkungslos! Früher wurden Kokainlösungen in der Augenheilkunde verwendet. Vielleicht hat der eine oder andere Glück bei seinem Augenarzt – man benötigt ja nur 10 Milliliter!

Im MIKROSKOPIE-FORUM wird Nikotinlösung empfohlen, wie man sie für E-Zigaretten verwendet. Man benetzt eine Präpariernadel mit der Lösung, taucht sie dann in die Probe, die sich auf dem Objektträger befindet, und rührt vorsichtig um. Da die Lösung auch osmotisch wirksamen Glykol enthält, nimmt man so wenig wie möglich! Nach eigener Erfahrung ist diese Methode gut anwendbar, allerdings wirkt die Lösung nicht fixierend.

3. MIKROTECHNISCHE BEARBEITUNG

3.1 FETTFREIE OBJEKTTRÄGER

Voraussetzung für die mikrotechnische Bearbeitung von Ciliaten ist die Verwendung absolut fettfreier Objektträger. Am einfachsten und zugleich am besten ist die folgende Methode:

Man entfernt von einem Hunderter-Präparatekasten aus Plastik (!) den Deckel, sägt den Kasten der Länge nach durch, so daß zwei Streifen entstehen, die jeweils 50 Objektträger fassen, und schneidet mit einer Rundsäge mehrere Löcher in den Boden. Man beschickt diese Teilkästen mit Objektträgern und unterzieht sie dann einem Waschgang in der Geschirrspülmaschine. Die Oberflächen sind nach dem Trocknen derart sauber, daß die Objektträger, wenn man sie stapelt, durch Adhäsionskräfte so fest aneinanderhaften, daß man sie kaum noch trennen kann. Man beläßt die Objektträger daher in den Kästen und bedeckt sie dann mit einem Staubschutz.

3.2. VORBEREITUNG DER OBJEKTTRÄGER

Hierzu benötigt man eine 2%-ige Gelatinelösung, die keinerlei Konservierungsmittel enthalten darf (kühl aufbewahren, bei Gebrauch ggf. erwärmen, bei Trübung neu ansetzen).

Man bringt mit einer Pipette einen winzigen tropfen in der Mitte der Objektträger auf und verreibt den Tropfen mit dem kleinen Finger auf Deckglasgröße. Dann läßt man über Nacht trocknen.

3.3. FIXIERUNG

Man bringt einen kleinen Tropfen der Ciliatenkultur auf die gemäß 3.2. vorbereiteten Objektträger. Der Tropfen soll zwar genügend Ciliaten enthalten, jedoch auch nicht zu viele, da diese sonst später verklumpen. Etwa zwanzig Individuen sind richtig. Dann läßt man langsam eintrocknen, am besten über Nacht. Hierbei sterben die Ciliaten ab, ohne jedoch ihre Form zu verlieren. Vermutlich wirkt die hauchdünne Gelatineschicht formstabilisierend.

Schließlich stellt man die trockenen Objektträger mehrere Stunden lang in Ethanol (Brennspiritus genügt), wobei der Ethanol einerseits bestimmte Zellorganellen stabilisiert (insbesondere die Zellkerne), gleichzeitig läßt der Ethanol die Gelatine gerinnen, ohne daß es zu Trübungen kommt, wodurch die Ciliaten nun fest und dauerhaft am Objektträger haften. Wenn im Bereich der aufgetragenen Ciliaten die Gelatine „verschrumpelt“, hat man zu viel Gelatine aufgetragen. Am Rande der ausgestrichenen Gelatine stören derartige Veränderungen dagegen nicht.

Die hier beschriebene „Trocknung plus Alkoholfixierung“ kommt in ganz ähnlicher Weise auch bei Blutaussstrichen zur Anwendung. Zur färberischen Darstellung der Kerne ist sie ausreichend, nicht jedoch für cytologische Feinuntersuchungen. Insbesondere treten schon während der Trocknung Vakuolen auf, die man als Artefakte betrachten muß.

3.4. FÄRBUNG

Hier zunächst die „Färbereihe“; Kommentierung s.u.

- | | |
|-------------------------------|-----------------------|
| 1. Hämatoxylin nach Mayer | 5 Minuten oder länger |
| 2. Destilliertes Wasser | kurz spülen |
| 3. Leitungswasser | 5 Minuten |
| 4. Leitungswasser | 5 Minuten |
| 5. Wässrige Eosinlösung 1%-ig | 10 – 60 sec. |
| 6. Destilliertes Wasser | kurz spülen |
| 7. Ethanol (Brennspiritus) | 1 Minute |
| 8. Isopropanol | 5 Minuten |
| 9. Toluol oder Xylol | beliebig |

Man überführt die Objektträger direkt vom fixierenden Alkohol in die Hämatoxylinlösung, ein Überfärben ist nicht zu befürchten. Die Kerne absorbieren das Hämatoxylin, werden jedoch erst dann tief blau gefärbt, wenn man die Präparate in Leitungswasser taucht („Bläuung“). Überschüssiges Hämatoxylin bildet dabei unlösliche Flocken, die das Präparat verderben. Daher muß die anhaftende Hämatoxylinlösung mit destilliertem Wasser vollständig abgespült werden. Hierbei schwenkt man den Objektträger einige Sekunden in destilliertem Wasser, jedoch nicht länger, da sonst das absorbierte Hämatoxylin ausgezogen wird.

Danach erfolgt die „Bläuung“ in Leitungswasser, wobei die Kerne tief blau erscheinen. Tritt kein Farbumschlag ein, ist das Wasser zu weich. Man setzt dann etwas Natriumhydrogencarbonat zu. Die Kernfärbung ist gegenüber allen folgenden Schritten stabil.

Bei der Färbung mit Eosin ist Vorsicht geboten. Die Ciliaten sollen nur schwach rosa erscheinen, nicht „tintenrot“.

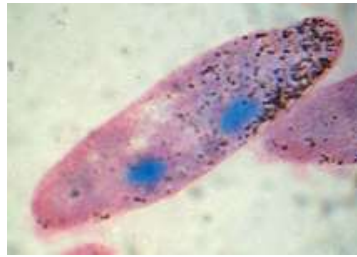
Die nun folgende Alkoholstufe dient der Entwässerung. Vorsicht: Ethanol zieht Eosin aus!

Bevor man die Objektträger in Isopropanol stellt, wischt man mit Fließpapier möglichst viel Ethanol ab, um den Isopropanol zu schonen. In Isopropanol sind alle Färbungen dann stabil.

Man kann die Präparate nun mit EUPARAL einschließen. Sicherer ist es jedoch, die Präparate in Toluol oder Xylol zu überführen (möglichst viel Isopropanol vorher abwischen!) um sie dann in MALINOL, CANADABALSAM oder CAEDAX (falls noch vorhanden) einzuschließen.

Die hier beschriebene HE-Färbung ist ziemlich narrensicher. Insbesondere die Großkerne der Ciliaten werden kontrastreich dargestellt, die Gelatine wird kaum angefärbt.

Natürlich sind auch andere Färbeverfahren möglich. Besonders einfach sind „einzeitige“ Doppelfärbungen, die für das Anfärben von Blutaussstrichen optimiert sind. Die Farblösungen können fertig bezogen werden. Man tropft die jeweilige Farblösung auf den noch ethanolfeuchten Objektträger auf, läßt einige Minuten einwirken und verfährt dann wie unter Punkt 7 bis 9 beschrieben (s.o.). Besonders günstig scheint die Färbung nach MAY-GRÜNWARD zu sein. FOISSNER empfiehlt Methylgrün – Pyronin.



Links: HE-Färbung

Rechts: MAY-GRÜNWARD

3.5. DAS SILBERLINIENSYSTEM

Bei allen Ciliaten absorbieren die Basen der Cilien Silberionen, zudem sind die Basen oft durch feine Stränge verbunden, die ebenfalls Silberionen anreichern. Man bezeichnet diese Zellstrukturen als „Silberliniensystem“. Die mikrotechnische Darstellung erfolgt in drei Schritten: Behandeln mit einer Silbernitratlösung, Belichtung, Entwicklung mit einem photographischen Entwickler. Man beachte, daß lange nicht alle Ciliaten ein gut ausgeprägtes Silberliniensystem besitzen. Besonders schöne Ergebnisse erzielt man mit Paramecien.

Arbeitsvorschrift nach KLEIN, vereinfacht

Zunächst lufttrockene Präparate von Ciliaten herstellen und mit Alkohol fixieren, wie in Kapitel 3.2. und 3.3 beschrieben.

1. Silbernitratlösung (1%-ig) auftropfen und 1 Minute vor Licht geschützt einwirken lassen. Sollten die Ciliaten fortgespült werden, muß man die Gelatine durch frisches Hühnereiweiß ersetzen.
2. Mit destilliertem Wasser etwa 3 Sekunden lang abspülen, dann an der Luft vor Licht geschützt vollständig (!) trocknen lassen.
3. Belichten (60 W Glühbirne, 15 cm Entfernung, 15 Sekunden)
4. Entwickeln unter mikroskopischer Kontrolle (Reduktionsgemisch s.u., ca. 30 Sekunden)
5. Weiterverarbeitung wie in Kapitel 3.4. unter Punkt 7 - 9 beschrieben

Reduktionsgemisch:

20 ml ULTRAFIN 1:10

plus

0,5 ml DOKUMOL unverdünnt

plus

0,5 ml NaOH, 10%-ig

Erhöht man die ULTRAFIN-Menge, werden die Präparate schwächer geschwärzt.

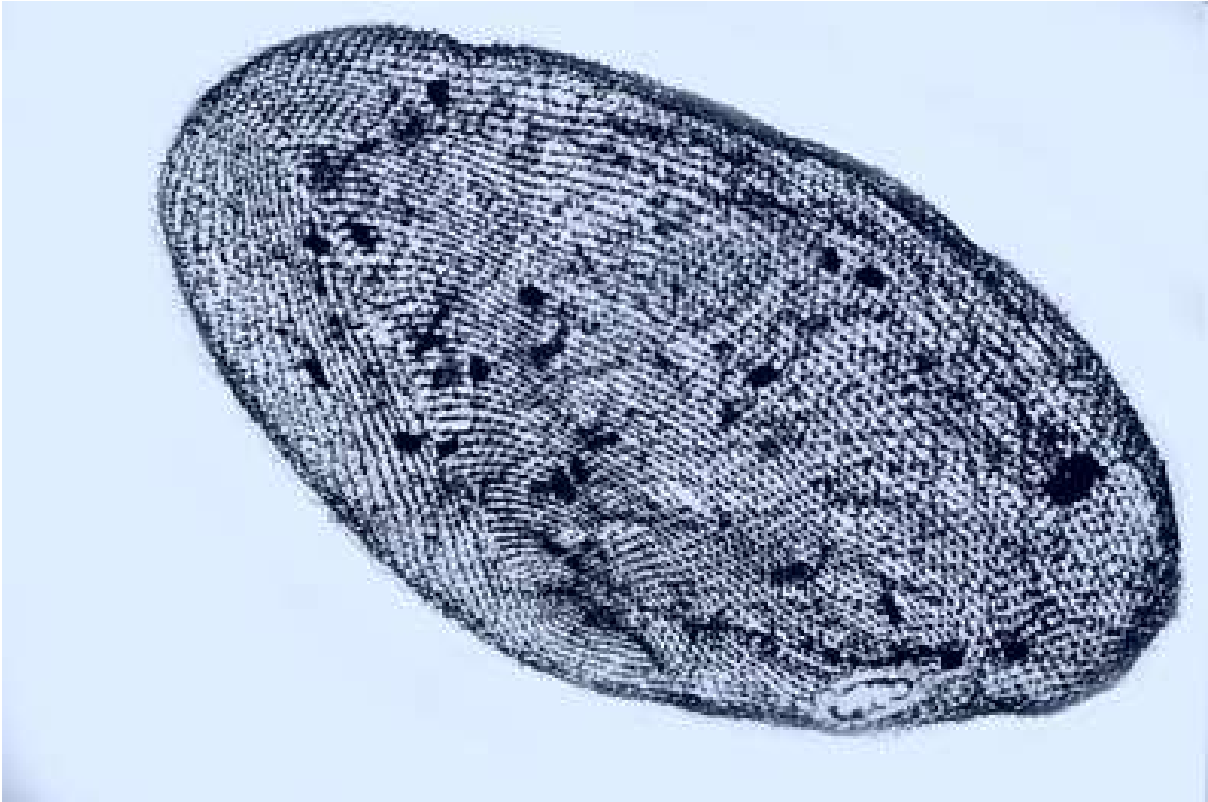
Die NaOH-Lösung kann man notfalls auch mit festem ROHRFREI ansetzen.

An Stelle der photographischen Entwickler kann man auch 1 Gramm Hydrochinon oder Methylhydrochinon („Methol“) in 100 ml Wasser suspendieren und dann so lange NaOH zusetzen, bis sich alles gelöst hat. Stark verdünnt anwenden!

Die hier beschriebene Methode ist nicht schwierig, erfordert jedoch Erfahrung.

1. Die Gelatine- bzw. Eiweißschicht muß sehr dünn sein!
2. Bei unsauberem Arbeiten bilden sich störende Niederschläge von Silberchlorid (stets destilliertes Wasser verwenden!).
3. Die Konzentration des Entwicklers und die Entwicklungszeit sind kritisch. Sehr leicht werden die Ciliaten „rabenschwarz“.

Sehr hilfreich sind die „Bemerkungen“ FOISSNERS (s.u.), die man sorgfältig studieren sollte!



Silberliniensystem

Foto: Dr.Spiekermann

3.6. Darstellung des Silberliniensystems nach KLEIN & FOISSNER

FOISSNER: „*Basic Light and Scanning Electron Microscopic Methods for Taxonomic Studies of Ciliated Protozoa*“

Europ.J.Protistol. 27, 313 – 330 (1991), November 29, 1991

Aus dem Englischen sinngemäß übersetzt von G.Rosenfeldt

1.)

5 – 10 fettfreie Objektträger mit Hilfe einer Fingerkuppe im mittleren Drittel mit einer sehr dünnen Schicht Hühnereiweiß überziehen. Mindestens eine Minute trocknen lassen.

Bemerkungen: Das Hühnereiweiß (Keimscheibe entfernen! Kein Glycerin zusetzen!) in einer offenen Weithalsflasche für wenigstens 20 Stunden stehen lassen; frisches Eiweiß liefert oft weniger zufriedenstellende Ergebnisse. Es kann dann 2 – 3 Tage lang verwendet werden, sofern man die Flasche nach Gebrauch jedes Mal fest verschließt.

Vor Gebrauch keinesfalls umrühren, vielmehr das Eiweiß mit der Fingerkuppe von der Oberfläche entnehmen.

Man fördert die Ausbreitung des Eiweißes, indem man den Objektträger vor dem Aufbringen anhaut. Die Eiweißschicht muß gleichmäßig sehr dünn sein, sie darf später die Ciliaten nicht bedecken.

2.)

Einen Probetropfen aufbringen und mit Hilfe einer Präpariernadel ausbreiten (Eiweißschicht keinesfalls berühren!) und bei Raumtemperatur trocknen lassen.

Bemerkungen: Sogar Einzelindividuen können mit einer Mikropipette aufgebracht werden. Falls erforderlich, Ciliaten durch vorsichtiges Zentrifugieren anreichern oder Probe für einige Stunden stehen lassen, worauf Sauerstoffmangel in der Probe die Ciliaten veranlaßt sich an der Oberfläche zu sammeln.

Die Menge und chemische Zusammensetzung der Probelösung wie auch Temperatur und Luftfeuchtigkeit beeinflussen das spätere Ergebnis erheblich. Daher sollten stets 5 – 10 Objektträger gleichzeitig beschickt werden um dann diese Parameter zu variieren, z.B. indem man mit unterschiedlichen Mengen destillierten Wassers wäscht oder mit frischem Kulturmedium.

Die Zellen mit destilliertem Wasser zu waschen oder den Tropfen besonders dünn auszubreiten empfiehlt sich besonders bei salzhaltigen Kulturmedien, wie Seewasser, Abwasser und Erdproben.

Trocknungstemperatur und Luftfeuchtigkeit lassen sich leicht mit einem Fön variieren.

3.)

Einige Tropfen Silbernitratlösung für etwa eine Minute auf die getrocknete Probe einwirken lassen.

Bemerkungen: Eiweißschicht keinesfalls mit der Pipette berühren.

Die Einwirkungszeit beeinflußt das Ergebnis nicht. Schon einige Sekunden genügen.

4.)

Objektträger etwa 3 Sekunden lang mit destilliertem Wasser waschen, danach abermals trocknen.

Bemerkungen: Vorsichtig waschen! Wasser auf das obere Drittel des Objektträgers aufspritzen und den Objektträger dabei schief halten, sodaß das Wasser sanft über die Probe läuft. Objektträger auch während des anschließenden Trocknens weiterhin schief halten.

5.)

Getrocknete Probe für 5 – 60 Sekunden belichten (Glühlampe 40 – 60 W, Abstand 3 – 10 cm). Hierbei entsteht ein noch unsichtbares latentes Silberbild.

Bemerkungen: Zeit und Abstand beeinflussen die Intensität des Silberbildes nach dem Entwickeln (s. nächster Schritt).

6.)

Einige Tropfen Entwickler aufbringen, 30 – 60 Sekunden entwickeln.

Bemerkungen: Aktivierung (Schritt 5), Zusammensetzung des Entwicklergemisches und das Material selbst beeinflussen die Intensität des Silberbildes und dessen Qualität. Die besten Werte für diese Parameter müssen in Vorversuchen ermittelt werden.

Ist das Entwicklergemisch richtig eingestellt, erscheint die mit Silbernitrat imprägnierte Eiweißschicht schwarzbraun.

Ist das Entwicklergemisch zu stark, erscheint dieser Teil der Eiweißschicht schwarz. In diesem Fall setzt man dem Entwicklergemisch mehr der Komponente A zu (s.u.) und/oder man reduziert die Entwicklungszeit.

Ist das Entwicklergemisch zu schwach, färbt sich die mit Silbernitrat imprägnierte Eiweißschicht nur bräunlich. In diesem Fall setzt man dem Entwicklergemisch mehr der Komponente B und/oder C zu und/oder man erhöht die Entwicklungszeit.

7.)

Entwicklergemisch abgießen, vorsichtig mit Leitungswasser 5 – 10 Sekunden spülen und Objektträger in Fixierlösung tauchen.

8.)

Objektträger nach dem Fixieren vorsichtig 5 – 10 Sekunden mit Leitungswasser spülen, dann in 96 – 100%-igen Ethanol tauchen.

Bemerkungen: Die Substanzen der Fixierlösung müssen sorgfältig ausgewaschen werden, andernfalls bilden diese Substanzen beim Behandeln mit Alkohol Kristalle, die auf dem Objektträger verbleiben und das Silberbild mit der Zeit ausbleichen.

Aber auch nicht zu lange waschen und keinesfalles destilliertes Wasser verwenden, da die Objekte sonst quellen und sich von der Eiweißschicht lösen!

Reinen Alkohol verwenden, da denaturierter Alkohol Substanzen enthalten kann, die zu einem Ausbleichen des Silberbildes führen.

Erzeugt man das Silberbild ausschließlich mit Sonnenlicht oder UV-Licht, also ohne Entwickler, bleicht das Silberbild gewöhnlich schon nach einer Woche aus.

REAGENZIENSILBERNITRATLÖSUNG

1g Silbernitrat in 100 ml destilliertem Wasser lösen. In brauner Flasche praktisch unbegrenzt haltbar.

ENTWICKLER

Stabil für 1 – 3 Tage. Muß erneuert werden, sobald die Lösung dunkelbraun erscheint und/oder sich Kristalle abscheiden.

Komponenten in angegebener Reihenfolge mischen:

Lösung A 20 ml

Lösung B 1 ml

Lösung C 1 ml

LÖSUNG A

Normaler Negativentwickler, in brauner Flasche über Jahre stabil.

Komponenten in angegebener Reihenfolge mischen:

Leitungswasser, 40o C	1000	ml
Borsäure	10	g
Borax	10	g
Hydrochinon	5	g
Metol	2,5	g
Natriumsulfit, wasserfrei	100	g

LÖSUNG B

Konzentrierter Positiventwickler, in brauner Flasche etwa 6 Monate stabil. Wird durch Luftoxidation rasch braun, was jedoch die Funktionsfähigkeit nicht beeinträchtigt.

Komponenten in angegebener Reihenfolge mischen:

Destilliertes Wasser	100	ml
Metol	0,4	g
Natriumsulfit, wasserfrei	5,2	g
Hydrochinon	1,2	g
Natriumcarbonat, wasserfrei	10,4	g
Kaliumcarbonat, wasserfrei	10,4	g
Kaliumbromid	0,4	g

LÖSUNG C

Über Jahre stabil.

Destilliertes Wasser	100	ml
Natriumhydroxid	10	g

FIXIERLÖSUNG

Über Jahre stabil.

Destilliertes Wasser	1000	ml
Natriumthiosulfat	25	g

Anmerkung Rosenfeldt: Da heute die Beschaffung von Chemikalien für Amateure recht schwierig ist, empfiehlt sich folgendes Vorgehen: Man ersteht in einer Fachhandlung für Fotografie ein Päckchen Ampullen für Negativentwicklung (Lösung A), ein Fläschchen Positiventwickler (Lösung B) und eine Tüte Fixiersalz (kein „Schnellfixiersalz“). Diese Stoffe werden in jeweils 1 Ltr Wasser gelöst (braune 1-Ltr-Flaschen, $\frac{3}{4}$ Ltr Leitungswasser einfüllen, Substanzen zugeben, dann bis zum Hals auffüllen. Kühl lagern). Für die Zubereitung von Lösung C verwendet man festes „Rohrfrei“, das nichts anderes ist als Natriumhydroxid (ggf. Aluminiumkörner vorher entfernen). Auf Lösung C kann wahrscheinlich auch verzichtet werden.

Der Einschluß der Präparate erfolgt dann in EUPARAL oder einem Kunstharz, wie z.B. MALINOL. Einzelheiten s. Kapitel 3.4., Punkt 7 – 9.