

„Mikroskopie“ Bd. 35 (1979), S. 108–115

(Zoologisches Institut der Universität Salzburg, Oesterreich)

Methylgrün-Pyronin: Seine Eignung zur supravitalen Übersichtsfärbung von Protozoen, besonders ihrer Protrichocysten¹⁾

(Methyl Green-Pyronin: Its Aptitude for Supravital Staining of Protozoa, especially of their Mucozysts)

Von Wilhelm FOISSNER²⁾

Mit 17 Abbildungen

(Manuskript eingelangt am 29. Mai 1977)

¹⁾ Mit dankenswerter Unterstützung des Österreichischen MAB-6 Programmes der UNESCO, des Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Projekt 3204), der Jubiläumsstiftung der Österreichischen Nationalbank und der Gesellschaft zur Förderung der Hochschule für Bodenkultur.

²⁾ Dr. Wilhelm FOISSNER, Zoologisches Institut der Universität Salzburg, Akademiestraße 26, A-5020 Salzburg (Austria).

Zusammenfassung

Es wird eine einfache Methode zur supravitalen Übersichtsfärbung von Protozoen mit Methylgrün-Pyronin beschrieben. Folgende Zellorganellen können gut differenziert werden: Makronucleus blaugrün oder rot; Mikronucleus blaugrün, selten rot; Nucleolen rosa oder ungefärbt; Cytoplasma und Nahrungsvakuolen abgestuft rosa; Trichocysten hellblau, meist ungefärbt. Besonders geeignet ist diese Methode zur Untersuchung der Protrichocysten. Die Analyse von über 30 Ciliaten-Arten ergab, daß sich rot, blau und nicht anfärbbare Protrichocysten unterscheiden lassen. Daraus kann auf eine unterschiedliche chemische Zusammensetzung dieser Organellen bei verschiedenen Ciliaten-Gruppen geschlossen werden. Die Sekretion und Quellung der Protrichocysten wird bei 8 Ciliaten-Arten beschrieben und mikrographisch dokumentiert.

Summary

A simple method for supravital staining of protozoa with Methyl Green-Pyronin is described. Following cell organelles are well differentiated: macronucleus blue-green or red; micronucleus blue-green, rarely red; nucleoli pink or unstained; cytoplasm and food vacuoles gradated pink; trichocysts light blue, often unstained. This method is especially well suited for mucocyst staining. The investigation of more than 30 species of Ciliata showed that red stained, blue stained and unstained mucocysts can be distinguished. This implies a different chemical composition of the mucocysts in different groups of Ciliata. The secretion and swelling of the mucocysts is described and microphotographically demonstrated in 8 species of Ciliata.

Einleitung

Für taxonomische Untersuchungen an Protozoen fehlte bisher eine Färbung, die eine rasche, orientierende Übersicht der Organisationsverhältnisse vermittelt. Zwar sind insbe-

sondere für den Kernapparat mehrere schnell und einfach ausführbare Färbungen (z. B. Methylgrün-Essigsäure, Carmin-Essigsäure, Orcein-Essigsäure) bekannt (s. KAHL, 1930–35; KIRBY, 1950; MAYER, 1956; ADAM *et al.*, 1964), jedoch ist es damit nicht immer leicht, den Kernapparat mit ausreichender Deutlichkeit zu erkennen, da das Cytoplasma im gleichen Farbton mehr oder minder stark tingiert wird. Das von mir seit zwei Jahren verwendete Methylgrün-Pyronin differenziert bei Supravitalfärbung viele Zellorganellen zufriedenstellend und ermöglicht vor allem eine klare Anfärbung der sonst schwierig darzustellenden Protrichocysten (Tektinstäbchen, Mucocysten). ALONSO (1974) hat Methylgrün-Pyronin in Verbindung mit Orange G ebenfalls mit großem Erfolg zur Differenzierung des Kernapparates von Exkonjugaten verschiedener Ciliaten eingesetzt.

Färbemethode

1. Falls das Untersuchungsmaterial nicht in größerer Menge vorliegt oder durch Kultur angereichert worden ist, entnimmt man aus der Probe einige Tiere mit einer Kapillarpipette und überführt sie mit wenig (etwa 0,02 ml) Flüssigkeit auf einen Objektträger.

2. Dem so vorbereiteten Präparat setzt man mit einer Pipette so viel 1%ige, in destilliertem Wasser angesetzte Lösung von Methylgrün-Pyronin (Chroma-Gesellschaft, D-7000 Stuttgart 60) zu, daß der Wassertropfen hellblau gefärbt erscheint. Die Farbstofflösung wird durch vorsichtiges Verrühren oder Schwenken des Objektträgers sofort mit der Probe vermischt. War das Präparat schon mit einem Deckglas bedeckt, so kann die Farbstofflösung auch am Rande des Deckglases zugesetzt und mit Filterpapier durchgesaugt werden.

3. Die Untersuchung des Präparates erfolgt unmittelbar nach Zugabe der Farbstofflösung, zuerst ohne Deckglas. Man kann so sehr schön die Abscheidung der Protrichocysten und die Bildung der Tektinhülle verfolgen. Sobald die Tiere abgestorben sind (meist nach etwa einer Minute), bedeckt man das Präparat mit einem Deckglas, damit die feinere Struktur der Protrichocysten und des Kernapparates untersucht werden können. Die Färbung ist nur etwa 5 Minuten beständig, da es mit der Zeit zu einer Überfärbung des Cytoplasmas kommt. Der Kernapparat wird bei voluminösen oder mit Nahrungsvakuolen überfüllten Ciliaten häufig erst nach leichtem Pressen der Tiere mit dem Deckglas deutlich sichtbar.

4. Färbeergebnisse: Makronucleus blaugrün oder rot; Mikronucleus blau, selten rot; Nucleolen rosa oder ungefärbt; Cytoplasma und Nahrungsvakuolen abgestuft rosa; Trichocysten hellblau, meist ungefärbt; Protrichocysten rot, blau oder ungefärbt. Die blaugrüne Färbung des Kernapparates tritt häufig nicht bei allen Tieren auf oder erst nach Pressen (siehe oben). Bei etwa der Hälfte der Tiere färbt er sich intensiv rot oder rotblau.

Ergebnisse

a) *Versuche zur pH-Abhängigkeit der Färbung:* Da nach KURNICK (1950) und SPANNHOF (1967) die Methylgrün-Pyronin-Färbung pH-abhängig ist, führte ich einige Versuche bei verändertem pH-Wert durch. Der pH-Wert der in destilliertem Wasser angesetzten Lösung beträgt etwa 3,7 (Messung mit Glaselektrode). Setzt man die Lösung in einem Puffergemisch von pH 7,0 an, so sterben die Tiere langsamer ab, und die Protrichocysten färben sich bei *Phascolodon vorticella* nur ganz schwach an (vgl. Seite 111). Der Kernapparat wird zufriedenstellend dargestellt. Mit HCl stärker angesäuerte oder mit NaOH alkalisierte Farbstofflösungen führen ebenfalls zu keinen brauchbaren Ergebnissen.

b) *Anwendungsbeispiele:* Die folgenden Ausführungen beschränken sich auf die Protrichocysten, da die Kernapparate der untersuchten Arten hinlänglich gut bekannt sind. Zum Vergleich und zur Überprüfung der Ergebnisse habe ich vor allem die grundlegende Arbeit von

SCHNEIDER (1930) herangezogen, der mit der Tuschemethode nach BRESSLAU (1928) viele Ciliaten auf ihre Fähigkeit zur Abscheidung von Tektinhüllen untersucht hat. Die Determination der Arten erfolgte nach KAHL (1930–35). Die mit einem Sternchen bezeichneten Species sind neu; ihre Beschreibung ist in Vorbereitung.

1. *Bursaria truncatella*: Bei dieser Species hat SCHNEIDER (1930) wohl eine voluminöse Hülle, nicht aber die sie bildenden Protrichocysten klar erkennen können. Mit Methylgrün-Pyronin (MP), in dem die Tiere erst nach etwa einer Minute absterben, kann man den Ausstoß und die Quellung der Protrichocysten sehr gut verfolgen. Die ruhenden Protrichocysten sind distinkt violett gefärbte, 1–2 μm lange Stäbchen (Abb. 10). Nach Zugabe der Farbstofflösung werden sie innerhalb von etwa 20 Sekunden ausgestoßen, wobei sie auf 4–7 μm Länge aufquellen, eine kommaförmige Gestalt annehmen und tiefrot gefärbt werden. Im Verlaufe der nächsten 20–30 Sekunden verlängern sie sich auf 8–15 μm und werden merkbar dünner. Die Kommaform ist aber noch erkennbar (Abb. 11, 12). Nach einer sehr groben Schätzung werden etwa 10.000 Protrichocysten ausgestoßen, die das Tier als dichte, aber nicht verschmolzene Hülle umgeben. Dies ist besonders dann klar zu erkennen, wenn man die Tiere vor Zugabe der Farbstofflösung durch leichtes Erwärmen zur Abgabe der Protrichocysten veranlaßt. Nach Anfärbung mit MP sind sie bis zu 50 μm lang, sehr dünn und bilden eine dichte, netzartige Hülle (Abb. 13). Dieser Versuch zeigt auch, daß durch die Farbstofflösung die vollständige Quellung der Protrichocysten verhindert werden kann (vgl. oben). Daß den von mir beobachteten Vorgängen aber Realität zukommt, darf man daraus folgern, daß man sie andeutungsweise auch im Phasenkontrastmikroskop verfolgen kann und sich in der älteren Literatur mehrere Hinweise auf fadenförmige Extrusome bei *Busaria* finden (siehe KÖLSCH, 1902; MAIER, 1903; SCHMÄHL, 1926), die mit Vitalfarbstoffen bzw. Eisenhämatoxylin angefärbt werden können.

2. *Nassula picta*: Diese Species sondert während des Absterbens eine sich konstant hellblau färbende, strukturlose Tektinhülle ab (Abb. 1, 2). SCHNEIDER (1930) hat bei *Nassula hesperida* prismatische Protrichocysten festgestellt, was ich bei *N. picta* auch in Opalblaupräparaten und bei *Nassula sp.* mit MP-Färbung erkannt habe. Bei *Nassula sp.* färbten sich die Protrichocysten rot.

3. *Paruroleptus caudatus*: Die Protrichocysten werden sofort nach Zugabe der Farbstofflösung als winzige (etwa 0,2–0,5 μm), unregelmäßig kugelförmige, violett gefärbte Tröpfchen abgegeben (Abb. 14), die im Verlaufe von etwa einer Minute auf 2–5 μm aufquellen und zusammenhängende, rot gefärbte Aggregate bilden (Abb. 15). Es werden keine vollständigen Hüllen gebildet. Die Tiere leben aber in einem rosa anfärbbaren Gallertgehäuse, das vermutlich durch fortlaufende Sekretion von Protrichocysten gebildet wird. Diese scheinen sehr klebrig zu sein, da sie nach dem Ausstoß, der hauptsächlich im Peristombereich erfolgt, häufig an den Membranellen der adoralen Zone haften (Abb. 14). SCHNEIDER (1930) hat bei der nah verwandten Gattung *Uroleptus* keine Protrichocysten festgestellt.

4. *Phascolodon vorticella*: Diese Art stirbt in der Farbstofflösung etwa innerhalb einer Minute ab und sondert dabei viele etwa 4 μm große, unregelmäßig prismatische Protrichocysten ab, die zu einer rosa gefärbten, sehr dünnen, membranartigen Hülle verquellen, in der häufig noch einzelne, nicht verquollene Protrichocysten erkennbar sind (Abb. 5). Durch leichten Deckglasdruck kann man die Tiere von der Hülle, die den früheren Forschern (z. B. ERLANGER, 1890; FAURÉ-FREMIET, 1924; GELEI, 1954; DINGFELDER, 1962) entgangen ist, trennen (Abb. 4).

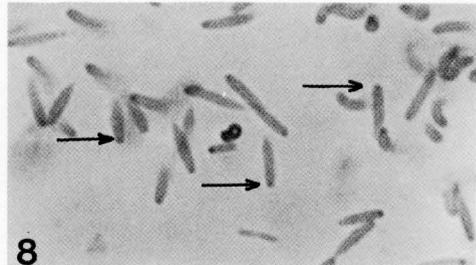
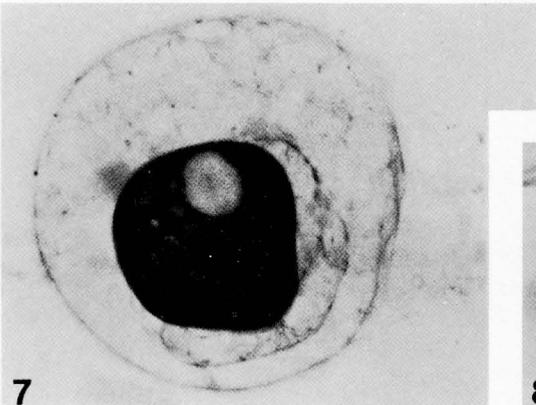
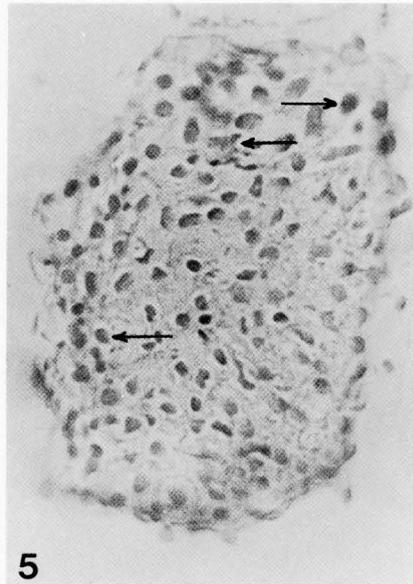
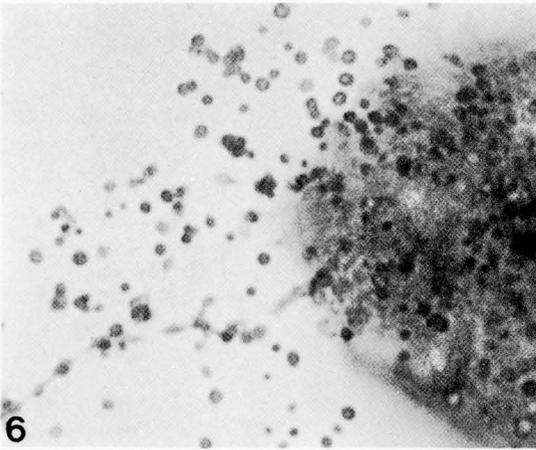
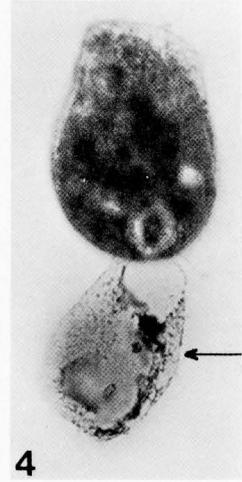
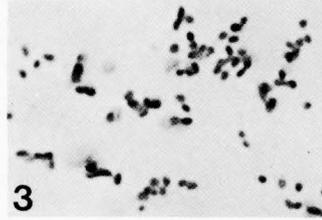
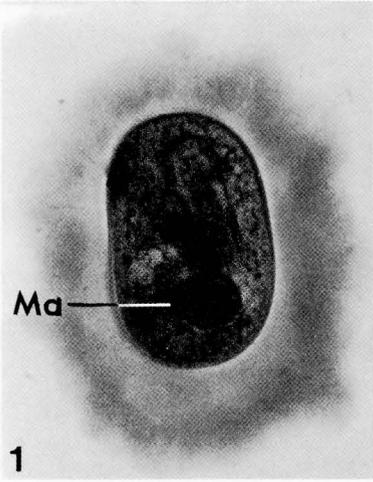
Abb. 1, 2. Die blau gefärbte Protrichocystenhülle von *Nassula picta* ist strukturlos (Abb. 2, Klammer). Der Makronucleus (Ma) ist blau, das Cytoplasma rosa gefärbt.

Abb. 3. Isolierte Protrichocysten von *Trithigmostoma cucullulus*.

Abb. 4, 5. In der membranartigen Tektinhülle von *Phascolodon vorticella* (Abb. 4, Pfeil) sind bei stärkerer Vergrößerung noch viele einzelne Protrichocysten erkennbar (Abb. 5, Pfeile).

Abb. 6, 7. Die unmittelbar nach der Sekretion unregelmäßig kugelförmigen Protrichocysten von *Platyophrya citrina* (Abb. 6) verquellen rasch zu einer voluminösen, hellblau gefärbten Hülle (Abb. 7).

Abb. 8. Am stumpfen Ende der kommaförmigen, rosa gefärbten Protrichocysten von *Urotricha farcta* befindet sich ein hellblau gefärbtes Granulum (Pfeile).



5. *Platyophrya citrina**: Nach Zugabe der Farbstofflösung, in der die Tiere mehrere Minuten überleben, werden viele plättchen- bis kugelförmige Protrichocysten ausgestoßen (Abb. 6), die rasch zu einer umfangreichen, sehr feinnetzigen, hellblau gefärbten Hülle verquellen. Nicht selten werden die Protrichocysten schubweise abgesondert, so daß das Tier von zwei Hüllen umgeben erscheint (Abb. 7). Die Cysten werden ebenfalls von einer sich blau färbenden Tektinzone umhüllt.

6. *Stentor roeseli*: Diese Species stirbt innerhalb weniger Sekunden in der Farbstofflösung ab. Die subpelliculären Granula färben sich leuchtend rot (Abb. 17), wodurch das typische Streifenmuster schön erkennbar wird (Abb. 16). Eine Hüllenbildung habe ich, so wie SCHNEIDER (1930), nur ganz selten beobachten können.

7. *Trithigmostoma cucullulus*: Ich kann die Beobachtung von SCHNEIDER (1930) bestätigen, daß diese Art viele Protrichocysten besitzt, die allen anderen Forschern entgangen sind und bisher auch elektronenmikroskopisch nicht nachgewiesen werden konnten (siehe SOLTYSŃSKA, 1971). Die Tiere sterben nach Zugabe der Farbstofflösung etwa innerhalb einer Minute ab und stoßen dabei viele etwa $0,6 \mu\text{m}$ große, unregelmäßig prismatische, intensiv violett gefärbte Protrichocysten aus (Abb. 3), die nur selten zu einer homogenen Hülle, ähnlich der von *Phascolodon*, verquellen.

8. *Urotricha farcta*: Diese Art stirbt ebenfalls rasch ab und sondert dabei viele etwa $4 \times 0,7 \mu\text{m}$ große, rosa gefärbte, spindel- bis kommaförmige Protrichocysten ab, die das Tier als dichte Hülle umgeben (Abb. 8, 9). Am stumpfen Pol jedes Stäbchens liegt ein winziges, blau gefärbtes Granulum, das SCHNEIDER (1930), mit dem meine Beobachtungen sonst übereinstimmen, nicht beobachtet hat. KRÜGER (1936) erwähnt ein ähnliches Granulum bei den Protrichocysten von *Bursella gargamella*.

9. Bei folgenden Ciliaten, bei denen SCHNEIDER (1930) Protrichocysten festgestellt hat, konnte ich sie *in vivo* zwar erkennen, aber mit MP nicht anfärben: *Colpidium campylum*, *C. colpoda*, *Cyrtolophosis mucicola* (Gehäuse aber hellblau gefärbt!), *Glaucoma scintillans*, *Litonotus fasciola* und *Oxytricha fallax*. Übereinstimmend mit SCHNEIDER (1930) stelle ich bei folgenden Arten ein Fehlen der Protrichocysten fest: *Aspidisca costata*, *A. lynceus*, *Cinetochilum margaritaceum*, *Cyclidium glaucoma*, *Euplotes affinis*, *Epalxis sp.*, *Frontonia leucas*, *Paramecium caudatum*, *P. trichium*, *Vorticella* (5 Arten) und *Chilodonella uncinata*. Keine Protrichocysten habe ich auch bei den folgenden, von SCHNEIDER (1930) nicht untersuchten Arten anfärben können, obwohl sie *in vivo* zum Teil nachweisbar sind: *Clamydonella sp.*, *Chilodontopsis depressa*, *Spathidium vermiculus*, *Tetrahymena corlissi*, *T. patula*, *T. pyriformis* und *Trochilia minuta*. Abweichend von SCHNEIDER (1930) habe ich bei *Loxodes ssp.* rot anfärbbare Protrichocysten festgestellt. Bei *Colpoda cucullus*, *C. maupasi* und *C. variabilis** habe ich ebenfalls rot anfärbbare Protrichocysten nachgewiesen.

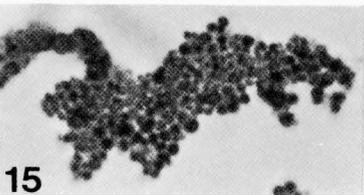
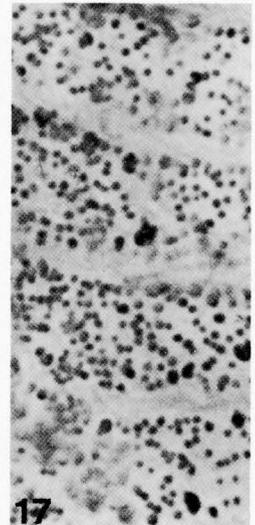
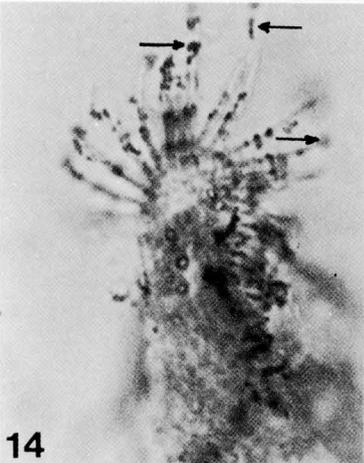
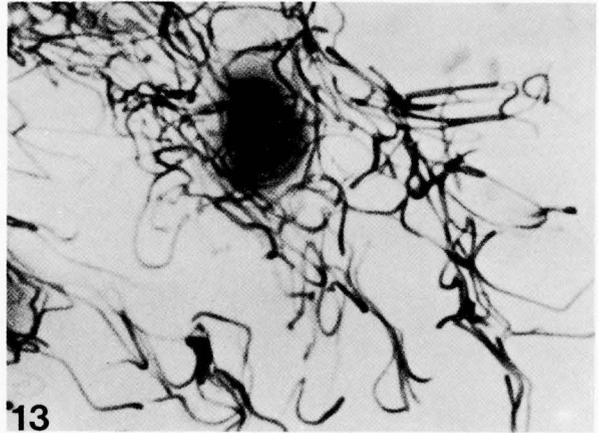
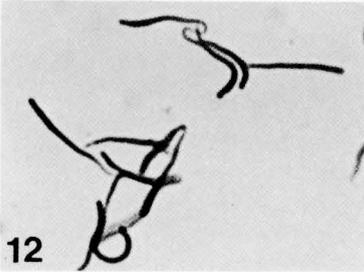
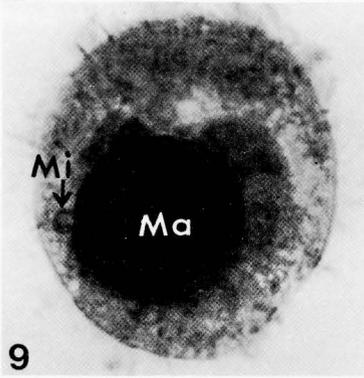
10. Vergleichsweise untersuchte ich auch andere Protozoen und einige Algen. Bei *Euglena viridis* werden die Protrichocysten scharf rot gefärbt. Bei verschiedenen Zooflagellaten und Amöben habe ich keine Hüllen festgestellt. Die Schleimhüllen einiger Desmidiaceen (*Desmidium schwartzi*, *Hyalotheka dissiliens*, *Staurastrum sp.*) färben sich hellblau, ebenso die Schleimhülle von *Hydrurus foetidus*.

Abb. 9: Der tiefblau gefärbte Makronucleus (Ma) und der hellblau gefärbte Mikronucleus (Mi) von *Urotricha farcta* heben sich deutlich vom rot gefärbten Cytoplasma ab. Die Protrichocysten sind als feiner Saum erkennbar.

Abb. 10–13: Rubende (Abb. 10), halb gequollene (Abb. 11), ganz gequollene (Abb. 12) und durch Erwärmen stark vernetzte (Abb. 13) Protrichocysten von *Bursaria truncatella*.

Abb. 14, 15: Die zuerst violett gefärbten Protrichocysten von *Paruroleptus caudatus* sind klebrig und haften an den adoralen Membranellen (Abb. 14, Pfeile). Später verquellen sie zu dunkelrot gefärbten größeren Aggregaten (Abb. 15).

Abb. 16, 17: Bei *Stentor roeseli* sind die subpelliculären Granula zwischen den Wimperreihen stark rot angefärbt.



Diskussion

Die supravitale Färbung mit MP führt in vieler Hinsicht zu einem ähnlichen Färbeergebnis wie die in der Histologie verwendete Technik (siehe ADAM *et al.*, 1964): Zellkern blaugrün (Desoxyribosenucleinsäuren), Cytoplasma und Nucleolen rot (Ribonucleinsäuren). Jedoch werden durch Pyronin auch Proteine gefärbt, wenn man nicht besondere Techniken anwendet (siehe KURNICK, 1952). Deshalb werden sich aus der supravitalen MP-Färbung keine sicheren Schlüsse über die chemische Zusammensetzung der angefärbten Strukturen ableiten lassen. Interessant ist aber, daß sich die ruhenden Protrichocysten oder die gerade quellenden häufig violett anfärben, während die vollständig gequollenen Organellen meist rot gefärbt sind. Dies könnte so wie bei der DNS und RNS mit dem unterschiedlichen Polymerisationsgrad der färbbaren Stoffe zusammenhängen (siehe KURNICK, 1950).

Neben der einfachen und raschen Durchführbarkeit dieser Färbemethode und der damit erzielten zufriedenstellenden Kern-Plasma-Differenzierung ist vor allem das unterschiedliche Färbeverhalten der Protrichocysten von Interesse. Es weist darauf hin, daß sie trotz ihres elektronenmikroskopisch sehr einheitlichen Aufbaues (siehe HAUSMANN, 1972, 1973) in cytochemischer Hinsicht bedeutende Unterschiede aufweisen, was zum Teil auch aus anderen Untersuchungen hervorgeht. So bestehen bei *Dileptus* die Protrichocysten überwiegend aus Proteinen (DRAGESCO *et al.*, 1965), bei *Balantidium* überwiegend aus sauren Polysacchariden (GRAIN, 1968) und bei *Colpidium* aus etwa gleich großen Anteilen von Proteinen und Polysacchariden (BRESSLAU, 1924). Nach dem Färbeverhalten mit MP können ebenfalls drei Gruppen, rot, blau und nicht anfärbbare Protrichocysten, unterschieden werden. Sie entsprechen aber vermutlich nicht den oben angeführten Gruppen, da es sonst unverständlich wäre, daß sich die Protrichocysten der tetrahymeniden Ciliaten (*Colpidium*, *Tetrahymena*, *Glaucoma*) nicht anfärben. Die Ursache der Nichtanfärbbarkeit ist jedenfalls nicht auf das Biotop zurückzuführen (z. B. pH-Wert des Kulturmediums), da sich bei den gleichzeitig mitgefärbten *Colpoda variabilis* oder *Bursaria truncatella* die Protrichocysten wie üblich intensiv rot anfärben. Auch nach Erwärmen, das zu einem Ausstoß der Protrichocysten führt (BRESSLAU, 1921), konnte ich sie nicht anfärben.

Im Vergleich mit den herkömmlichen Methoden zur Darstellung der Protrichocysten, nämlich Zusatz kolloidaler Tusche- und Metallösungen (BRESSLAU, 1921, 1928; SCHNEIDER, 1930) oder kleinster Latexkügelchen (WINET *et al.*, 1975), Färbung mit Vitalfarbstoffen (BRESSLAU, 1921; DRAGESCO, 1952), Silberimprägnation und Dunkelfeld- oder Phasenkontrastmikroskopie, bietet die supravitale Färbung mit MP folgende Vorteile: 1. Die verschiedenen Stadien der Ausstoßung und Quellung können ohne zusätzlichen Aufwand (Erwärmen, Zusatz von Chemikalien etc.) verfolgt werden. 2. Infolge der intensiven Färbung ist eine gute Beobachtung und photographische Wiedergabe möglich. 3. Im Gegensatz zu den Vitalfarbstoffen, mit denen häufig nur die Hülle, nicht aber die sie aufbauenden Elemente dargestellt werden können (siehe BRESSLAU, 1921), ist mit MP auch die Färbung einzelner Protrichocysten möglich. 4. Ein gewisser Nachteil ist, den allerdings auch die anderen Methoden besitzen, daß sich nicht die Protrichocysten aller Ciliaten-Arten darstellen lassen. Diese unterschiedliche Anfärbbarkeit (rot, blau, ungefärbt) gibt dafür aber einen Anhaltspunkt zu einer cytochemischen Charakterisierung.

Literatur

ADAM H. und G. CZIHAK: Arbeitsmethoden der makroskopischen und mikroskopischen Anatomie. G. Fischer, Stuttgart, 1964. 583 pp.

ALONSO P.: Differential nuclear coloration in ciliates. J. Protozool. 21, 751–754 (1974).

BRESSLAU E.: Die experimentelle Erzeugung von Hüllen bei Infusorien als Parallele zur Membranbildung bei der künstlichen Parthenogenese. Naturwissenschaften 9, 57–62 (1921).

- BRESSLAU E.: Neues über das Tektin. Verh. Dtsch. Zool.-Ges. 29, 91–94 (1924).
- BRESSLAU E.: Die Stäbchenstruktur der Tektinhüllen. Arbeiten a. d. Staatsinst. f. exp. Therapie a. d. Georg-Speyer-Hause, Frankfurt, 21, 26–31 (1928).
- DINGFELDER J. H.: Die Ciliaten vorübergehender Gewässer. Arch. Protistenk. 105, 509–658 (1962).
- DRAGESCO J.: The mucoid trichocysts of flagellates and ciliates. Proc. Soc. Protozool. 3, p. 15 (1952).
- DRAGESCO J., G. AUDERSET und M. BAUMANN: Observations sur la structure et la genèse des trichocystes toxiques et des protrichocystes de *Dileptus* (Ciliés Holotriches). Protistologica 1, 81–90 (1965).
- ERLANGER R. v.: Zur Kenntnis einiger Infusorien. Z. wiss. Zool. 49, 649–662 (1890).
- FAURÉ-FREMIET E.: Contribution à la connaissance des infusoires planktoniques. Bull. biol. France Belg. Suppl. 6, 1–171 (1924).
- GELEI J. v.: Über die Lebensgemeinschaft einiger temporärer Tümpel auf einer Bergwiese im Börzsönygebirge (Oberungarn). III. Ciliaten. Acta biol. Acad. Sci. hung. 5, 259–343 (1954).
- GRAIN J.: La genèse des mucocystes dans les formes prékystiques du cilié *Balantidium elongatum*. J. Microscopie 7, 993–1005 (1968).
- HAUSMANN K.: Cytologische Studien an Trichocysten. IV. – Die Feinstruktur ruhender und ausgeschiedener Protrichocysten von *Loxophyllum*, *Tetrabymena*, *Prorodon* und *Lacrymaria*. Protistologica 8, 401–412 (1972).
- HAUSMANN K.: Spindeltrichocysten und Mucocysten in schrägbeschateten Negativ-Suspensionspräparaten. Ext. Ann. Sta. Biol. Besse-en-Chandesse 7, 331–347 (1973).
- KAHL A.: Urtiere oder Protozoa. I. Wimpertiere oder Ciliata (Infusoria). In DAHL F., Die Tierwelt Deutschlands. G. Fischer, Jena 1930–35. 886 pp.
- G. Fischer, Jena 1930–35. 886 pp.
- KIRBY H.: Materials and methods in the study of Protozoa. Univ. Calif. Press, Berkeley 1950. 72 pp.
- KÖLSCH K.: Untersuchungen über die Zerfließungserscheinungen der ciliaten Infusorien. Zool. Jahrb., Abt. f. Morph. 16, 273–422 (1902).
- KRÜGER F.: Die Trichocysten der Ciliaten im Dunkelfeldbild. Zoologica, Stuttgart 34, 1–83 (1936).
- KURNICK N. B.: Methyl Green-Pyronin. I. Basis of selective staining of nucleic acids. J. Gen. Physiol. 33, 243–264 (1950).
- KURNICK N. B.: Histological staining with Methyl Green-Pyronin. Stain Techn. 27, 233–242 (1952).
- MAIER H. N.: Über den feineren Bau der Wimperapparate der Infusorien. Arch. Protistenk. 2, 73–179 (1903).
- MAYER M.: Kultur und Präparation der Protozoen. Keller, Stuttgart 1956. 83 pp.
- SCHMÄHL O.: Die Neubildung des Peristoms bei der Teilung von *Bursaria truncatella*. Arch. Protistenk. 54, 359–430 (1926).
- SCHNEIDER W.: Die Verbreitung des Tektins bei den Ciliaten. Arch. Protistenk. 72, 482–537 (1930).
- SOŁTYŃSKA M. S.: Morphology and fine structure of *Chilodonella cucullulus* (O.F.M.). Cortex and cytopharyngeal apparatus. Acta Protozool. 9, 49–82 (1971).
- SPANNHOF L.: Einführung in die Praxis der Histochemie. G. Fischer, Jena 1967. 172 pp.
- WINET H. und A. R. JONES: Mucocysts in the heterotrich ciliate *Spirostomum*. J. Protozool. 22, 293–296 (1975).

Allen Mikrophotographien liegen Präparate zugrunde, die nach der hier beschriebenen Methode angefertigt worden sind.

