

Mikroskopie (Wien), 41, 26–29 (1984)
Verlag Fromme & Co., Wien (Oesterreich)

Mikroskopie

Short Technical Communication

Institut für Zoologie der Universität Salzburg, Oesterreich

Remalanechtoliv B: Ein Textilfarbstoff zur Darstellung der corticalen Plattengrenzen von *Euplotes* (Protozoa, Ciliophora)¹⁾

(Remalanechtoliv B: a textile dye for staining the margins of the cortical plates of *Euplotes* (Protozoa, Ciliophora)

Von Hans OPITZ²⁾ und Wilhelm FOISSNER³⁾

Mit 4 Abbildungen

(Manuskript eingelangt am 28. November 1983)

¹⁾ Mit dankenswerter Unterstützung des Projekts P5226 des Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung.

²⁾ Hans OPITZ, Neukoppel 23b, D-2000 Hamburg 62 (BRD).

³⁾ Univ.-Doz. Dr. Wilhelm FOISSNER, Institut für Zoologie der Universität Salzburg, Akademie-
straße 26, A-5020 Salzburg (Austria).

Zusammenfassung

Mit einigen Textilfarbstoffen (Remalanechtoliv B, Remalanblau RR, Irgatronmarineblau RL, Cibalanorange RL, Ortolanrot G) ist eine Färbung der corticalen Plattengrenzen von *Euplotes* möglich. Ein sehr ähnliches Muster, das Silberliniensystem, zeigt sich nach Imprägnation mit Silbernitrat. Ob mit beiden Methoden dieselben Strukturen dargestellt werden, ist jedoch ungewiß, da bei vielen anderen Ciliaten-Arten kein dem Silberliniensystem ähnliches Muster mit diesen Farbstoffen sichtbar gemacht werden kann. Methode: fünf Minuten fixieren in Alkohol-Formaldehyd, fünf bis dreißig Minuten färben in alkoholischer Remalanechtoliv-B-Lösung.

Summary

Some textile dyes (Remalanechtoliv B, Remalanblau RR, Irgatronmarineblau RL, Cibalanorange RL, Ortolanrot G) stain the margins of the cortical plates of *Euplotes*. A very similar pattern, the silverline system, is demonstrable by silver nitrate impregnation. However, it is uncertain, if both methods stain the same structures because these dyes do not reveal a pattern similar to the silverline system in many other ciliate species. Method: fix cells in an alcohol-formaldehyde mixture for 5 min. and stain in an alcoholic solution of Remalanechtoliv B for 5–30 min.

Einleitung

Erste systematische Versuche über die Eignung moderner Textilfarbstoffe zur Färbung von Ciliaten führte OPITZ (1977) durch. Sie zeigen, daß mit vielen derartigen Farbstoffen befriedigende Supravitalfärbungen möglich sind, die einen raschen Einblick in die Organisation der Tiere ermöglichen. Auch in der histologischen Technik wurden sie bereits mit Erfolg erprobt (z. B. BEDRICK, 1964 und 1968), konnten die konventionellen Färbemethoden bisher jedoch nicht verdrängen. Eine besondere Gruppe sind die anionischen Metallkomplexfarbstoffe, die Säuregruppen im Molekül besitzen und zur Färbung von Wolle, Seide und

Polyamidfasern verwendet werden. Das bekannteste Beispiel ist das Alizarin, das mit Metallsalzen Farblacke bildet (ADAM und CZIHAK, 1964). Später konstruierte man Farbstoffe, in deren Molekülen ein Metallatom – meist Chrom – eingebaut ist. Das Metall kann mit einer oder zwei Farbsäuren verknüpft werden: Metallkomplexfarbstoffe 1 : 1 und 1 : 2 (RATH, 1963). Bei systematischen Versuchen stellten wir fest, daß sich mit den 1 : 1 Farbstoffen vorwiegend der Zellkern, mit gewissen 1 : 2 Farbstoffen aber auch Strukturen färben, die bisher nur mit Silbernitrat befriedigend dargestellt werden konnten.

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. Fixierung der Tiere durch Zugabe eines etwa gleich großen Tropfens Alkohol-Formol und fünf Minuten. Herstellung des Fixiergemisches: Zu 90 ml 50%igem Äthanol gibt man 10 ml Formaldehyd (ca. 37%ig; handelsübliche Konzentration).

3. Dem so vorbereiteten Präparat setzt man einen kleinen Tropfen (0,01 bis 0,02 ml) 1%ige Remalanechtoliv-B-Lösung zu und vermischt die Lösungen gut mit einem Glasstäbchen. Herstellung der Farblösung: 0,2 g Remalanechtoliv B extraconc. (Hoechst AG; Reg. Nr. DYIX 602/4) werden in 10 ml 96%igem Äthanol gelöst und die Stellsalze durch Filtration entfernt. Anschließend auffüllen auf 20 ml mit destilliertem Wasser. Die fertige Lösung soll pH 5 bis 6 besitzen. Wäßrige und/oder alkalische Lösungen sind ungeeignet.

4. Nach zwei bis fünf Minuten legt man ein Deckglas (18 × 18 mm) auf. Die Färbung ist nach fünf bis dreißig Minuten abgeschlossen, am besten ist sie meist fünfzehn bis dreißig Minuten nach der Zugabe der Farbstofflösung. Die Reagenzien bzw. die Lösungsmittel sind dann bereits etwas verdunstet, wodurch die Tiere abgeflacht werden, was insbesondere für die Mikrophotographie von Vorteil ist.

5. Färbeergebnis: Alle Strukturen werden in unterschiedlich intensiven olivgrünen Tönen dargestellt. Zuerst färben sich meist die Cilien, Basalkörper und Cirren (Abb. 1), nach fünf bis zwanzig Minuten auch die corticalen Plattengrenzen der Pellicula von *Euplotes* und das Cytoplasma (Ab. 2, 4). Versuche zur Herstellung von Dauerpräparaten blieben bisher erfolglos.

Diskussion

Ähnliche, meist aber weniger eindeutige Resultate geben noch folgende Farbstoffe: Remalanechtblau RR (Hoechst AG; Reg. Nr. DYID 502), Irgatronmarineblau RL (Ciba-Geigy), Cibalanorange RL (Ciba-Geigy) und Ortolanrot G (BASF; Reg. Nr. 17T 7036). Keine Erfolge brachten die Lanacron-, Erionyl- und Irgalanfarben (Irgalan Gelb 2GL 250 % KWL, Irgalanorange RL 250, Irgalan Bordeaux EL, Irgalan Grau BL 200 % KWL, Lanacron Bordeaux S-B, Lanacron Marinablau S-G, Erionyl Schwarz R). Der Grund dafür ist unbekannt, da die Firmen die Zusammensetzung und die Wirkungsweise der Farben aus verständlichen Gründen nicht bekannt geben.

Das bemerkenswerteste Ergebnis unserer Versuche ist die Anfärbung einer netzartigen Struktur in der Pellicula von *Euplotes*. Sie entspricht morphologisch dem nach Silbernitratimprägnation erkennbaren Silberliniensystem (vgl. Abb. 3 mit Abb. 4). Dennoch kann daraus nicht geschlossen werden, daß in beiden Fällen dieselbe Struktur dargestellt wird, da viele Versuche, die Silberlinien anderer Ciliaten (*Dileptus* sp., *Colpoda* spp., *Bursaria* sp., *Chilodonella uncinata*, *Microthorax* sp., *Tetrahymena* sp., *Colpidium* spp., *Paramecium* spp.,

Frontonia sp., *Lembadion* sp., *Cyclidium glaucoma*, *Vorticella* spp., *Blepharisma* sp., *Oxytricha* sp., *Stylonychia* sp.) mit den oben angeführten, für *Euplotes* geeigneten Farbstoffen anzufärben, erfolglos blieben. Lediglich bei *Paramecium*, *Frontonia* und *Lembadion* konnte häufig das dem indirekt verbindenden Silberliniensystem ähnliche Leistenmuster der Pellicula angefärbt werden.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen einen besonderen Feinbau der Pellicula von *Euplotes*. Sie besteht aus in Form und Größe häufig artspezifischen Platten, an deren Rändern dreieckförmige Septen ausgespart sind (FOISSNER, 1978; HAUSMANN und KAISER, 1979). In diesen Septen befindet sich eine Fibrille, an der bei Versilberung das Silber angelagert wird (FOISSNER, 1978). Dieses Fibrillennetz konnte neuerdings mit verfeinerten Methoden noch deutlicher dargestellt werden (GRIM et al., 1980; BÖHM und HAUSMANN, 1981). Ob es diese Fibrillen sind, die sich mit den Metallkomplexfarbstoffen färben, oder andere, bisher unbekannte Elemente, kann zur Zeit nicht entschieden werden. Jedenfalls sind diese Ergebnisse ein weiterer Hinweis darauf, daß die „Silberlinien“ der Ciliaten eine morphologisch und chemisch heterogene Population corticaler und subcorticaler Strukturen sind (FOISSNER, 1981).

Literatur

- ADAM H. und G. CZIHAK: Arbeitsmethoden der makroskopischen und mikroskopischen Anatomie. G. Fischer, Stuttgart 1964. 583 pp.
- BEDRICK A. E.: Milling red SWB: a textile dye for staining epithelial intercellular bridges. *Stain Technol.* **39**, 33–38 (1964).
- BEDRICK A. E.: Rapid one-solution differential staining with textile dyes: Pontacyl dark green B and pontamine fast scarlet 4BA. *Stain Technol.* **43**, 321–328 (1968).
- BÖHM P. und K. HAUSMANN: Cytochemical investigations of the alveolar plates of the Euplotidae (Ciliophora, Hypotrichida). *Protoplasma* **106**, 309–316 (1981).
- CORLISS J. O.: Silver impregnation of ciliated protozoa by the Chatton-Lwoff technic. *Stain Technol.* **28**, 97–100 (1953).
- FOISSNER W.: *Euplotes moebiusi* f. *quadricirratu*s (Ciliophora, Hypotrichida) I. Die Feinstruktur des Cortex und der argyrophilen Strukturen. *Arch. Protistenk.* **120**, 86–117 (1978).
- FOISSNER W.: Das Silberliniensystem der Ciliaten: Tatsachen, Hypothesen, Probleme. *Mikroskopie* **38**, 16–26 (1981).
- GRIM J. N., K. R. HALCROW und R. D. HARSHBARGER: Microtubules beneath the pellicles of two ciliate protozoa as seen with the SEM. *J. Protozool.* **27**, 308–310 (1980).
- HAUSMANN K. und J. KAISER: Arrangement and structure of plates in the cortical alveoli of the hypotrich ciliate, *Euplotes vannus*. *J. Ultrastr. Res.* **67**, 15–22 (1979).
- OPITZ H.: Moderne Textilfarbstoffe in mikroskopischen Farbfixiergemischen. *Mikrokosmos* **4**, 119–122 (1977).
- RATH H.: Lehrbuch der Textilchemie. Springer, Stuttgart und Berlin 1963. 771 pp.

Abb. 1, 2, 4: Färbung der Infraciliatur der Ventralseite (Abb. 1) und der corticalen Plattengrenzen der Dorsalseite (Abb. 2, 4) von *Euplotes patella* mit Remalanechtoliv B.

Abb. 3: Silberliniensystem der Dorsalseite von *Euplotes patella* nach Imprägnation mit Silbernitrat (Methode nach CORLISS, 1953).

