

Die Färbung der Lycopodiumsporen

Von M. DECHANT (Graz)

Die Triftung gefärbter Lycopodiumsporen hat in den letzten zehn Jahren beachtliche Verbreitung gefunden. Mit der vermehrten Anwendung ging eine ständige Verbesserung der Färbemethoden Hand in Hand. In ständiger Zusammenarbeit mit der Vereinigung für hydrogeologische Forschungen in Graz und dem Speläologischen Institut Wien haben sich viele Anregungen ergeben, die den Herstellungsgang von der ungefärbten Spore bis zum gefärbten und verpackten Produkt wesentlich beeinflußt haben. Die große Zahl von Färbungen hat mir selbst auch Gelegenheit gegeben, den Färbvorgang von zahlreichen Unsicherheitsfaktoren zu entlasten und damit jene Herstellungsbedingungen zu finden, die den Hauptanforderungen der Triftmethode an die gefärbten Sporen entsprechen, nämlich

- a) die Vollständigkeit der Färbung,
- b) die Erhaltung der Farbtintensität sowie
- c) die Wiederherstellung der ursprünglichen, natürlichen Schwebfähigkeit.

Die Vollständigkeit der Färbung kann durch die Eigenschaften der Sporen sehr beeinträchtigt werden. Die Sporen sind ein sehr leicht bewegliches, stäubendes Pulver, welches äußerst wasserabstoßend ist, jedoch einmal benetzt, zur Knöllchenbildung neigt. Daraus ergeben sich zwei Möglichkeiten einer unvollständigen Färbung, nämlich, daß nach einer abgeschlossenen Färbung noch im Raum befindliche ungefärbte trockene Sporen in das gefärbte Gut fallen und nicht mehr angefärbt werden oder daß es bei ungleichmäßiger Durchmischung und Aufschlammung der Sporen während des Färbens zur Knöllchenbildung kommt, wodurch nur teilweise gefärbte oder gar ungefärbte Sporen in der gefärbten Sporenmasse auftreten können. Wenn auch die Wahrscheinlichkeit gering ist, daß bei den großen Mengen von Lycopodiumsporen, die zum Einsatz kommen, ausgerechnet jene nicht definierbaren Sporen im Planktonnetz aufgefangen werden,

so würde diese Möglichkeit bei der geringen Anzahl der zur Beobachtung gelangenden Sporen doch einen Unsicherheitsfaktor bilden.

Die Erhaltung der Farbintensität erfordert eine feste Bindung des Farbstoffes an die Spore. Die gefärbten Sporen dürfen keinen Farbstoff an das Wasser abgeben, müssen gegen mechanische Beanspruchungen, wie sie in Gebirgsbächen auftreten können, beständig sein, auch darf durch zufließende Abwässer keine Farbstoffabnahme oder -änderung bewirkt werden. Die Farbintensität soll durch die Wahl brillanter Farbstoffe möglichst hoch sein, um eine eindeutige Unterscheidung bei der mikroskopischen Untersuchung der Planktonnetzprobe zu ermöglichen.

Die bei der Färbung auftretenden Reaktionskomponenten sind: Tenside, Farbstoffe, Lycopodiumsporen.

Als Tensid hat sich nach vielen Versuchen mit mehreren gebräuchlichen Waschmitteln „PRESTO“, ein Reinigungsmittel (Apollowerke Wien, Unilever AG), am geeignetsten erwiesen. Die Untersuchungen haben ergeben, daß nichtionische Netzmittel sowie neutrale Waschmittel, wie z. B. das Fettalkoholsulfonat „FEWA“, nur schwache, wenig dauerhafte Färbungen zur Folge haben. Die meisten Waschmittel enthalten Wirkstoffe oder Gruppen, die den Farbstoff zerstören. Daraus ergibt sich, daß die Wahl des richtigen Tensides für den ganzen Färbelauf von ausschlaggebender Bedeutung ist.

„PRESTO“ ist ein mit verschiedenen Zusatzstoffen granuliertes Fettalkoholsulfonat, welches beim Lösen im Wasser einen pH-Wert von 9 bis 10 aufweist und somit sehr stark im alkalischen Bereich liegt. „PRESTO“ scheint, wie später dargelegt wird, eine Doppelfunktion auszuüben, da es nicht allein die Oberflächenspannung des Wassers vermindert, sondern offensichtlich auch die sehr feste Bindung des Farbstoffes mit der Sporensubstanz ermöglicht.

Für die Farben Grün, Violett und Blau werden drei Triphenylmethanfarbstoffe verwendet. Malachitgrün ergibt Grün, Fuchsin Violett und Kristallviolett Blau. Für Rot eignet sich ein Phnazianfarbstoff, das Safranin, für Braun ein basischer Azofarbstoff, der je nach der Zusammensetzung aus verschiedenen braunen Mono- und Disazofarbstoffen als Bismarckbraun oder Vesuvium bezeichnet wird. Bei Braun haben wir die besten Erfahrungen mit Vesuvium H3R gemacht, einem Produkt der Farbwerke HÖCHST. Die übrigen Farbstoffe sind MERCK-Präparate. Alle genannten Farbstoffe sind färberisch den basischen Farbstoffen zuzuordnen. Interessanterweise reicht bei den Farbstoffen der Triphenylmethangruppe sowie der Phnazin-Gruppe, also für Grün, Violett, Blau und Rot, ein Gramm Farbstoff pro Kilogramm Sporen zur kräftigen Färbung aus. Hingegen muß die Konzentration des Azofarbstoffes auf das Fünffache erhöht werden, um überhaupt eine sichtbare Färbung zu geben. Sollte die Farbintensität den anderen Farbstoffen gleichen, so müßte die zehnfache Farbstoff-

menge genommen werden, also 10 g Farbstoff pro Kilogramm Sporen. Es wurde allerdings im Laborversuch bewiesen, daß bei einer derartigen Überbelastung der Spore mit Farbstoff eine Verringerung der Schwebfähigkeit auftritt.

Die gängigen Azofarbstoffe sind, wie auch das Vesuvin, von geringer Brillanz, so z. B. Ponceau-Rot, womit wegen zu geringer Farbstoffaufnahme nur sehr schwache Färbungen erzielt werden. Zur Färbung vollkommen ungeeignet sind saure Farbstoffe. Da die oben genannten Farbstoffe auch relativ billig und, was noch wichtiger ist, leicht erhältlich sind, so sind wir vorläufig bei den vorher genannten Farbstoffen geblieben. Zu den bereits vorhandenen Farbstoffen ist es andererseits schwer, einen neuen Farbstoff zu finden, der mit den übrigen beim Mikroskopieren nicht verwechselt werden kann.

Nun zu den Lycopodiumsporen selbst: Die Lycopodiumsporen sind die Sporen eines Bärlappgewächses, *Lycopodium clavatum*, einer in den Tropen heimischen Pflanze. In Zwergform kommt sie jedoch auch in der näheren Umgebung von Graz vor. Die Lycopodiumsporen sind als dreiseitige Pyramiden von 30 bis 35 μ Durchmesser mit konvex gewölbter Basis ausgebildet. Die gewölbte Grundfläche ist vollständig, die anderen Flächen bis nahe an die Kanten von einem Netzwerk von Leisten bedeckt, die 5- oder 6eckige Maschen bilden. Die Netzleisten sind etwa 4 μ hoch und von einem von Wasser nicht benetzbaren Häutchen überzogen. Dieses Häutchen besteht vermutlich aus wachsartigen Substanzen, welche bei der Behandlung mit „PRESTO“ abgelöst werden. Die eigentliche resistente Membran besteht aus einer weiteren Schicht, dem Exosporium, welches Sporonin, ein membranbildendes Polyterpen, enthält. Dieses ist völlig unlöslich in konzentrierten Mineralsäuren und Alkalilaugen und wird erst durch Oxydationsmittel angegriffen. Unter diesem Exosporium liegt das Endosporium, welches aus Zellulose besteht. Der Gesamtgehalt an Zellulose beträgt nach verschiedenen Autoren nur zirka 2,2%.

Zum Mechanismus der Färbung ist zu sagen: Fest steht, daß die Färbung mit basischen Farbstoffen nur im alkalischen Bereich möglich ist! Ein Tannieren, also Färben im sauren Bad, wie z. B. für Zellulose, ergibt kein Aufziehen der Farben. Es ist daher anzunehmen, daß das Tensid „PRESTO“ nicht nur durch Ablösen der Wachsschichte das Exosporium freilegt, sondern auch die alkalischen Komponenten des Tensides mit Carboxylgruppen Alkalisalze bilden, die mit den Farbstoffhydrochloriden reagieren. Tatsächlich reagiert auch die vorher alkalische Sporenmasse nach der Färbung neutral.

Die Übertragung des Färbevorganges vom Eprovettenversuch in Gramm-Mengen auf 10-Kilogramm-Mengen wurde hauptsächlich durch das starke Verstäuben der Sporen erschwert. Wie nachfolgend aufgezeigt werden soll, sind davon alle Arbeitsgänge betroffen.

Der Weg der ungefärbten Sporen zum gefärbten Produkt geht über folgende Phasen: Anteigen, Aufschlänmen, Kochen und Quellen, Färben, Nachbehandeln, Zentrifugieren, Trocknen und Verpacken.

Im allgemeinen werden Ansätze von 10 kg gemacht. Dazu werden in einem emaillierten Eisentopf 400 g „PRESTO“ in 25 Liter ca. 40° C warmem Wasser gelöst und 10 kg Sporen portionenweise durch Kneten mit der Hand angeteigt. Ein Rühren auch mit der langsamsten Rührvorrichtung ist wegen der großen Staubentwicklung unmöglich. Zweckmäßigerweise setzt die Person, die diesen Arbeitsvorgang durchführt, eine Maske auf, die auch über die Augen geht, da die Sporen zu schweren allergischen Schwellungen der Schleimhäute führen können. Nach diesem Anteigen wird der Topf mit dem Sporenbrei zum Sieden erhitzt. Für die nachfolgende Färbung ist es nun unbedingt erforderlich, alle durch das Anrühren verstäubten Sporen mit einem Staubsauger gründlich zu entfernen. Nicht zu vergessen ist, daß das sehr terpenreiche Sporenpulver mit offenen Flammen zu Staubexplosionen führen kann. Nun erfolgt ein starkes Eindicken des Breies durch Wasseraufnahme der Sporenmasse. Nach mehrmaliger Wasserzugabe wird schließlich die vorgeschriebene Flüssigkeitsmenge von 40 Litern erreicht, und es entsteht eine breiige Flüssigkeit. Beim Rühren steigen die nicht benetzten Lycopodiumklümpchen an die Oberfläche und müssen dort zerteilt werden. Nach zirka 1½ Stunden ist die Masse homogen geworden. Nun läßt man eine weitere Stunde kochen, wobei ständig gerührt werden muß, um ein Anbacken und Übergehen der Sporenmasse zu verhindern. Mittlerweile werden 100 g Farbstoff in 2 Liter technischem Spiritus gelöst. Die Person, die diese Arbeit durchgeführt hat, muß sich jetzt einer gründlichen Reinigung unterziehen sowie die Arbeitskleidung vollständig wechseln, damit bei der nachfolgenden Färbung keine Verseuchung mit ungefärbten Sporen auftritt. Nun werden die Flammen abgedreht und der in Spiritus gelöste Farbstoff unter Rühren in den fast kochend heißen Sporenbrei eingetragen und zirka ¼ Stunde kräftig gerührt.

Dieser Vorgang ist besonders sorgfältig durchzuführen, da davon die Vollständigkeit der Färbung abhängt. Danach setzt man 250 ml einer 30prozentigen Formaldehydlösung zu und hält eine Stunde unter weiterem Rühren mit schwach aufgedrehten Flammen die Temperatur zwischen 90° und 95° C. Dann wird der heiße, gefärbte Sporenbrei schließlich in eine mit einem Filzsack ausgekleidete Zentrifuge gegossen und zirka 15 Minuten zentrifugiert. Die Zentrifuge wird dabei mit einem Deckel verschlossen, durch den ein Eternitrohr führt, in dem eine Glühspirale eingebaut ist, welche die durch die Rotation angesaugte Luft erhitzt. Die Heizwicklung der Glühspirale hat 1000 Watt, die Zentrifuge 2860 U/min und einen Durchmesser von 23 cm.

Die gefärbten Sporen werden dabei mit der heißen Luft vorgetrocknet, enthalten jedoch noch immer zwischen 20% und 25% Wasser. Man

schüttet daher die heiße Sporenmasse nach dem Zentrifugieren auf schwach geleimtes, starkes Packpapier, welches auf hölzernen Horden liegt, so daß die Luft auch von unten zutreten kann. Bei der Endtrocknung, die als Lufttrocknung erfolgt und Wochen in Anspruch nehmen kann, ist der Wassergehalt auf 2,5—3% abzusinken. Dieser Wassergehalt ist gering genug, zu gewährleisten, daß bei dem späteren Einsatz nur eine geringe Sedimentation eintritt.

Die Verpackung der Sporen erfolgt in Plastiksäcken. Beim Einschaufeln der Sporen kommt sehr viel Luft in die Sporenmasse, die nur schwer entfernt werden kann. Diese Luft stört bei der Verpackung, da sie zum Zerplatzen der Säcke führt. Die Plastiksäcke, die speziell mit einer verengten Öffnung angefertigt werden, verschließt man mit einem breiten Tixoband. Die verschlossenen Säcke werden von den letzten Sporenresten gründlich gesäubert, die Säcke in dünnere Übersäcke gebracht und eine Etikette eingelegt, auf der das Gewicht, die Farbe, das Färbedatum und das Verpackungsdatum vermerkt sind. Auch aus diesen Übersäcken wird die Luft entfernt, und die Säcke werden mit einem Klebeband luftdicht verschlossen.

Diese zahlreichen Vorsichtsmaßnahmen haben sich als durchaus notwendig erwiesen.

Das letzte zu lösende Problem bestand darin, den an den Sporen gebundenen Farbstoff vor dem Angriff durch die zum Mikroskopieren erforderliche Kalilauge zu schützen. Bekanntlich werden die aus den Planktonnetzen erhaltenen Proben einer Behandlung mit Kalilauge unterworfen, um sie von anhaftenden Verunreinigungen zu trennen. Dabei würde infolge Leukobasenbildung eine zumindest teilweise Entfärbung der Sporen stattfinden. Es gelingt jedoch, den Farbstoff, der an die Sporenoberfläche gebunden ist, mit Hilfe einer Carbamidharzhülle zu schützen.

Dazu werden in eine Eprouvette, die zur Hälfte mit der gezogenen Probe gefüllt ist, eine erbsengroße Menge Harnstoff, zirka 1 ml Formaldehyd und 1 ml 10prozentige Kalilauge zugesetzt und die Eprouvette 10 Minuten in ein schwach siedendes Wasserbad gebracht. Dabei erfolgt ein Sedimentieren der gefärbten Sporen. Die überstehende Flüssigkeit kann nach dem Zentrifugieren leicht abdekantiert werden.

Nun wird die Probe mit einem Glasstab auf einen Objektträger gebracht, ein Tropfen 10prozentige Chloralhydratlösung und ein Tropfen konzentrierte Essigsäure zirka 3 Minuten zur Einwirkung gebracht und das Deckgläschen aufgesetzt. Bei Halbdunkelfeldbetrachtung leuchten die gefärbten Sporen strahlend auf.

Abschließend sei nochmals festgestellt, daß die Methode der Sporenfärbung an sich unkompliziert ist, daß jedoch peinlichste Sorgfalt die Voraussetzung für eindeutige Ergebnisse ist.

Summary

The use of lycopodium spores as tracers of subterranean waters required a dyeing process that was on no account to diminish the floating capacity of the spores, and at the same time to guarantee the fastness and intensity of the dye.

For more than eight years I conducted a large number of dyeings. On each of these occasions I tried to find out, by methodical investigation of the entire production process, any conditions that may affect the security factor (degree of purity) of the dyeing, a factor, which is of nature high. For this purpose it was necessary to

1. examine individually the starting materials, i. e. the soakers, the lycopodium spores and the dyes, as the colour depends to a very large extent on the composition of the tenside used, the lycopodium spores require slightly different modes of soaking according to their countries of origin, and identical tone and intensity of colour is only achieved by using unambiguously defined high-quality dyes;
2. find out all possible causes of unequal dyeing;
3. choose implements and working conditions so as to eliminate completely the contamination of spores of one colour by residues of spores dyed another colour.

Résumé

L'emploi des spores de *Lycopodium* comme moyen de traçage d'eaux souterraines exigeait une exactitude minutieuse en ce qui concerne la conservation de leur propriété de planer et de garder leur couleur.

Depuis plus de 8 ans, j'ai effectué un grand nombre de colorations tout en profitant de cette occasion pour déceler, à la suite de recherches méthodiques concernant le procédé de production, toutes les possibilités qui pourraient porter préjudice au facteur important de sûreté (degré de propreté) de la coloration.

A cet effet il fallait:

- 1° Soumettre à un examen les substances de base, les moyens de gonflement, les spores de *Lycopodium* et autres colorants.
La coloration dépend beaucoup de la composition du tenside utilisé. Les spores de *Lycopodium* nécessitent, selon le pays d'origine, un lavage différent et seuls des colorants de marque bien définis produisent la même couleur et la même intensité de couleur.
- 2° Déceler toutes les éventualités pouvant causer une coloration inégale.
- 3° Harmoniser les outils et les conditions de travail pour exclure de façon définitive toute pollution des spores d'une couleur par des restes de spores colorées d'une autre couleur.

En outre on a essayé d'élargir cette méthode par l'emploi de colorants nouveaux et de faciliter le travail au microscope ainsi que le dépouillement en augmentant l'intensité de la coloration des spores grâce à des substances appropriées.

Diskussion

H. DOMBROWSKI: Ich habe einmal mit Amidoschwarz Sporen gefärbt, allerdings nicht zu diesem Zweck und nicht in so großen Mengen. Haben Sie damit schon Erfahrung?

M. DECHANT: Wir haben auch daran gedacht, die Sporen schwarz zu färben, doch der Farbton wäre zum Mikroskopieren zu dunkel.

H. DOMBROWSKI: Darf ich gleich dazu einfügen, daß zwar die Flüssigkeit schwarz ist, daß sie aber letzten Endes einen blauen Farbton ergibt. Der Farbstoff wird nicht in Wasser gelöst (braucht nicht gekocht zu werden), sondern in Methylalkohol. Es ist ein Eiweiß- und Eiweißabbauproduktfarbstoff. Sie können Eiweißabbauprodukte noch an Sporen aus dem Miozän nachweisen. Diese Methode ist viel einfacher.

M. DECHANT: Ich habe selbst auch versucht, Sporen mit Farbstoffen, die in organischen Lösungsmitteln gelöst waren, kalt zu färben; das Verfahren wäre viel einfacher. Doch hat sich herausgestellt, daß in diesem Fall die Bindung des Farbstoffes an der Spore wesentlich schlechter ist. Bei stark verunreinigten Proben ist zudem vor dem Mikroskopieren eine Behandlung der Probe mit Kalilauge notwendig. Mit der Kalilauge werden die Huminsäuren herausgelöst und ebenso alle Verunreinigungen, die in Kalilauge löslich sind. Gleichzeitig erfolgt ein sehr rasches Sedimentieren der Sporen. Diese Behandlung mit Kalilauge führt bei kalt gefärbten Sporen zur Entfärbung.

G. MATTHES: Wir haben die Erfahrung gemacht, daß mit Bismarckbraun gefärbte Sporen in Trockenfilterpräparaten, wie sie K. EISSELE empfohlen hat, sich schlecht von Sandkörnern unterscheiden lassen. Diese Farbe ist bei Sandkörnern sehr häufig. Meine Frage ist: Gibt es einen intensiv gelb leuchtenden Farbstoff, der an Stelle von Bismarckbraun zu verwenden wäre?

M. DECHANT: Wir haben selbst schon seit längerer Zeit die Absicht, intensiv gelb zu färben. Es ist richtig, daß Sande oft eine ähnliche Färbung haben, aber es ist schon durch die charakteristische Form des Pollenkorns eine Trennung möglich.

E. SCHREINER: Es wäre interessant zu erfahren, wie diese Sporen geerntet werden?

M. DECHANT: Die Bärlapppflanzen werden getrocknet, ausgeschlagen und windgesichtet.