

Methode: **Polyvinylactophenol –  
Ein bewährtes Einschlußmittel für Milben**

Literatur: MIKROKOSMOS 73, 209 - 214 (1984)

Anwendungsbereich:  
Präparatesammlungen

Polyvinylactophenol wurde 1952 von K. HEINZE als Einschlußmittel für Blattläuse empfohlen (1). Die Acarologen erkannten recht bald die Eignung dieses stark aufhellenden Mittels für den Einschluß von Milben (2). W. HIRSCHMANN und O. WOELKE berichteten 1960 im MIKROKOSMOS (3) über ihre Erfahrungen mit Polyvinylactophenol (PVL) und gaben Hinweise auf die Herstellung und Anwendung des neuen Einschlußmittels. Die mit Berlese-Mischung, Faure-Lösung oder Hoyers Gemisch hergestellten Präparate sind nicht unbegrenzt haltbar, wie die noch vorhandene Sammlung von BERLESE und andere alte Sammlungen deutlich zeigen. Deshalb wurden diese Mittel bei den meisten Praktikern durch PVL ersetzt. Auch für Präparate von Kleininsekten (Flöhe, Haarlinge, Tierläuse usw.) und Körperteilen von größeren Insekten erwies sich PVL als vorzüglich geeignet. GÖKE (4) verwendete es mit Erfolg für den Einschluß stark gefärbter Crustaceen, pigmentierter Asseln, Peridineen, fossiler Pollen und chitiner Mikrofossilien. WOELKE hat im Laufe von bald 30 Jahren nicht nur zahllose Präparate von Milben, Zecken und Kleininsekten, sondern auch viele Präparate von rezenten Pollen mit PVL hergestellt. Nachdem dieses Einschlußmittel nun so lange bekannt ist und viele Erfahrungsberichte vorliegen, wurde kürzlich seine Eignung in Zweifel gezogen. Wir nehmen die hierdurch entstandene Diskussion zum Anlaß, einige Fehlerquellen aufzuzeigen, die möglicherweise bei der Herstellung der später verdorbenen Präparate nicht beachtet worden sind.

#### Die Herstellung von Polyvinylactophenol (PVL)

PVL besteht aus Polyvinylalkohol, Milchsäure, Phenol und Wasser. Polyvinylalkohol, ein weißes Pulver, ist der Festkörper des Mediums. Milchsäure wirkt stark hydrolysierend auf Eiweißstoffe. Phenol hat eine aufhellende Wirkung und zerstört gemeinsam mit der Milchsäure die organischen Farbstoffe und Pigmente. Hingegen werden erhaltungsfähige Stoffe (Chitin, Tektin und Sporopollenin) nicht angegriffen. Wasserfreies Phenol ist eine kristalline Substanz. Von Milchsäure und wenig Wasser wird die Kristallisation jedoch verhindert. Milchsäure ist sozusagen der Weichmacher im PVL und bewirkt, daß dieses Einschlußmittel stets duktil bleibt. Deshalb ist die Zusammensetzung des PVL für die spätere Haltbarkeit der Präparate sehr wichtig. GÖKE hat das Mittel nach einer bewährten Methode hergestellt, die nachfolgend beschrieben wird.

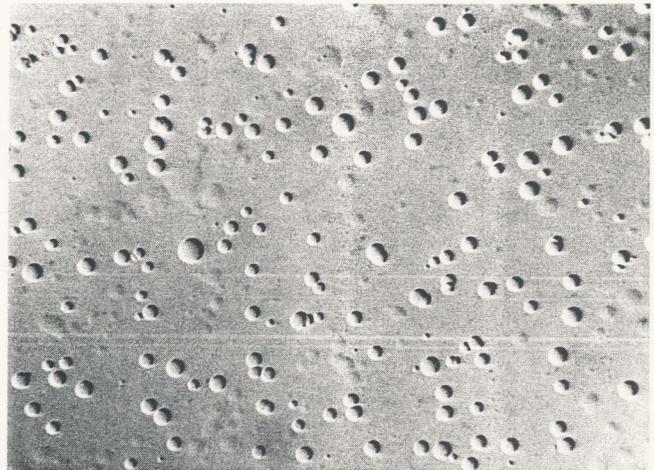


Bild 1: Entmischung von PVL (durch falsches Intermedium?). Plan-Objektiv  $40\times/0.65$ ; Projektiv 8:1; Differential-Interferenzkontrast.

#### Erforderliche Chemikalien:

Polyvinylalkohol pulv., Merck-Artikel-Nr. 821038  
Milchsäure 90%, Merck-Artikel-Nr. 366  
Phenol, Merck-Artikel-Nr. 200

Zuerst wird soviel Polyvinylalkohol-Pulver wie überhaupt möglich in heißes destilliertes Wasser eingerührt. Es entsteht eine sehr zähe, dickflüssige Masse, die solange im Wasserbad erhitzt wird, bis sie vollkommen klar ist. Fünf Teile dieser Lösung werden mit zwei Teilen Milchsäure ver-rührt, wobei das Gefäß im heißen Wasserbad bleibt. Dann gibt man zwei Teile des mit 20% Wasser verflüssigten Phenols zu. Die ganze Masse wird unter häufigem Umrühren solange im Wasserbad erhitzt, bis sie endgültig klar ist. Sie hat dann eine gelbliche Farbe und ist von honigartiger Konsistenz. Filtrieren ist überflüssig. Milchsäure greift die Haut an. Phenol wirkt stark ätzend und ist darüber hinaus ein starkes Protoplasmagift. Es wird von der Haut resorbiert und verursacht beim Einatmen unter anderem Nierenschäden (MAK-Wert  $19\text{ mg/m}^3$ ). Entsprechende Schutzmaßnahmen (Einweg-Handschu-hen, Abzug) sind zu beachten. Wichtigster Punkt bei der Herstellung von PVL ist die Einstellung eines möglichst hohen Festkörpergehaltes.

Ein ganz anderes PVL wird für Blattläuse und ähnlich zarte Objekte verwendet. Der Vollständigkeit halber soll auch diese Formulierung hier veröffentlicht werden:

In 40–60 ml destilliertes Wasser werden 10 g Polyvinylalkohol gelöst, wobei im Wasserbad erhitzt werden muß. Unter ständigem Umrühren mischt man 35 ml Milchsäure zu; dann 10 ml Glycerin. Getrennt davon löst man 20 g Chloralhydrat in 25 ml 15%igem Phenol (15 g krist. Phenol auf 100 ml Wasser). Diese Lösung rührt man langsam in das erkaltete Polyvinylalkohol-Milchsäure-Glycerin-Gemisch ein. Notfalls muß man die Masse lange schütteln und, wenn sie Trübungen enthält, über Glaswolle filtrieren. Danach kann man sie im Trockenschrank noch etwas eindicken. (Vorsicht! Die abdampfende Milchsäure korrodiert Metalle!) Dieses PVL liefert klare Bilder von zarten Objekten.

Blattläuse müssen vorher in Äthanol-Tetrachlorkohlenstoff 1+1 entfettet und dann aus Milchsäure in das Einschlußmittel gebracht werden. Ein wasserdichter Lackring ist jedoch unbedingt erforderlich, weil dieses PVL sonst schrumpft. Für Milben, Zecken, Flöhe, Mallophagen und Tierläuse bietet es keine Vorteile. Deshalb können wir hier nicht auf eine so lange Erfahrung zurückblicken wie bei dem zuerst beschriebenen PVL.

#### Zur Herstellung von PVL-Präparaten

Die Herstellung von PVL-Präparaten wurde bereits beschrieben (2, 3, 5). Einige Arbeitsschritte verdienen jedoch eine größere Beachtung. Alle Objekte werden grundsätzlich in Äthanol oder Brennspiritus getötet, fixiert und aufbewahrt. Sie werden dann in Milchsäure übertragen, in der sie je nach Art des Objektes mehrere Stunden oder sogar Tage bleiben müssen. Sehr widerstandsfähige Milben oder Zecken werden in Milchsäure erhitzt. Auf keinen Fall darf man die Objekte aus Wasser oder Spiritus, schon gar nicht aus Xylol, Toluol oder einem anderen Aufhellungsmittel in PVL einschließen. Wenn ein anderes Intermedium als Milchsäure verwendet wird, können die Druckdifferenzen zwischen Objekt und Einschlußmittel das Präparat zerstören. O. WOELKE empfiehlt folgende Methode:

Die Milben werden in Spiritus eingesammelt, dem bereits etwas Milchsäure zugesetzt wurde. Sie können darin auch lange Zeit aufbewahrt werden. Vor dem Einschluß in PVL werden sie in Milchsäure übertragen. Expeditionsmaterial erhält man häufig in Brennspiritus. Man füllt ein Reagenzglas zu etwa einem Drittel mit Milchsäure und überschichtet sie mit dem Spiritus, der die Milben enthält. Die Tiere sinken nach unten und dringen langsam in die Milchsäureschicht ein, in der sie mazeriert und aufgehellt werden. Nach einigen Tagen kann man sie in PVL einschließen. Wie bereits G. DOSSE (2) erprobt hat, ist von allen Farbstoffen das Direkttiefschwarz in PVL am haltbarsten. 30 mg Farbstoff werden in 50 ml Äthanol gelöst. Man kann die Objekte entweder in dieser alkoholischen Lösung überfärben und dann durch Erhitzen in Milchsäure differenzieren oder aber der Milchsäure etwas Farbstofflösung zusetzen und damit die Objekte durch Erhitzen im Wasserbad anfärben. Zur Konzentration des Farbstoffes und Dauer der Färbung können keine verbindlichen Empfehlungen gegeben werden. Sie richten sich nach der Art des Objektes. Was jedoch die Haltbarkeit betrifft, so

können wir sagen, daß unsere Direkttiefschwarzfärbungen auch nach 25 Jahren noch einwandfrei sind.

Die Objektträger und Deckgläser werden mit einem sauberen Leinenläppchen und einem Tropfen Sidolin geputzt. Das Sidolin nimmt dem Glas die Oberflächenspannung und verhindert die Bildung von Luftblasen beim Auflegen des Deckglases.

Von großer Wichtigkeit ist die Größe des Deckglases. Für Milben und ähnlich große Objekte verwendet man runde Deckgläser von 10 bis 12, höchstens 15 mm Durchmesser. Wenn das Deckglas größer ist und der PVL-Tropfen etwas knapp bemessen wurde beobachtet man nach einiger Zeit, manchmal erst nach Jahren, eine Wölbung des Deckglases direkt über dem Objekt. Durch den hohen Spannungsdruck zwischen Deckglas und Objektträger wird ein weiches Objekt zerdrückt und deformiert. Hingegen bewirkt ein hartes Objekt, etwa eine Zecke, die Zerstörung des Deckglases. Es ist deshalb sehr wichtig, das Einschlußmittel reichlich zu bemessen und ein möglichst kleines Deckglas zu verwenden.

Den frisch hergestellten Präparaten wird das Wasser nur ganz langsam entzogen. Man erwärmt sie mehrere Tage lang auf 40 bis höchstens 50 °C im Wärmeschrank (besser auf einer durch Thermostat gesteuerten Wärmebank, da die Milchsäure Metalle stark angreift). Zu schnelles Trocknen führt zu Artefakten, insbesondere zu Kristallbildungen im PVL. Das überschüssige, nach dem Trocknen gummiartige Einschlußmittel wird mit einer Rasierklinge bis zum Deckglasrand weggeschnitten. Dann umrandet man die Deckgläser auf der Lackring-Drehscheibe mit einem guten Deckglaslack oder einem anderen geeigneten Lack (z. B. Glassomax von Glasurit), um den Zutritt von Luftfeuchtigkeit bzw. den weiteren Verlust von Wasser zu verhindern. WOELKE empfiehlt die Verwendung von klarem Lack, um Veränderungen in den Randpartien des Deckglases besser kontrollieren zu können. Nach dem Umranden kann man die Präparate noch für einige Stunden in den Wärmeschrank bringen.

#### Zur Haltbarkeit von PVL-Präparaten

Wenn die hier beschriebenen wichtigsten Arbeitsschritte beachtet werden, bleibt die Zahl der später verderbenden Präparate sehr klein. Bei Tausenden von Präparaten, die O. WOELKE hergestellt hat, sind gelegentliche Pannen unvermeidbar. Besonders in den fünfziger Jahren wurde mit dem damals noch neuen PVL viel experimentiert. Aufgrund der MIKROKOSMOS-Beiträge zu diesem Thema haben wir unsere alten Präparate durchgemustert und nur ganz wenige gefunden, die verdorben waren. Bei einigen war die Ursache hierfür sofort klar: Zu großes Deckglas und zu wenig PVL. Andere enthielten interessante Artefakte, die sich in drei Gruppen einteilen ließen: 1. in Entmischungen, wahrscheinlich durch ein falsches Intermedium verursacht, 2. in Monokristalle und 3. in Sphärite, die um einen Kristallisationspunkt entstanden sind. Möglicherweise wurden diese Präparate bei zu hoher Temperatur getrocknet. Da sie aus den fünfziger

Jahren stammen, kann auch chloralhydrathaltiges PVL die Ursache sein. Vielleicht war auch in irgendeinem kalten Winter der letzten 25 Jahre die Zimmertemperatur längere Zeit zu niedrig. PVL-Präparate sollten nicht zu kalt gelagert werden. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Tatsache, daß viele Präparate im Laufe der Jahre immer besser geworden sind. Das gilt besonders für ursprünglich sehr dunkle Chitintteile und viele Präparate von Pollen. Wir sind der Meinung, daß PVL nicht durch Berlese-Mischung, Faure-Lösung oder Hoyers Gemisch ersetzt werden kann. Nur für Kurzzeitpräparate, die aus verschiedenen Gründen wieder geöffnet werden müssen, sind diese Mittel gut geeignet.

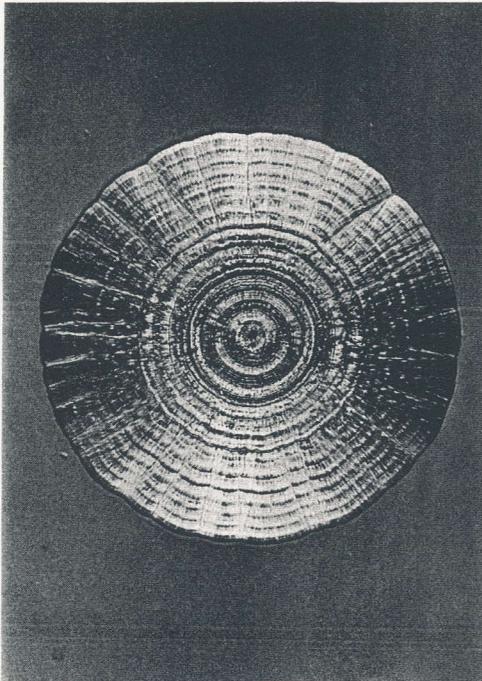


Bild 2: Sphärit im PVL (durch zu schnelles Trocknen entstanden?). Plan-Objektiv  $40\times/0,65$ ; Projektiv 8:1; Differential-Interferenzkontrast.

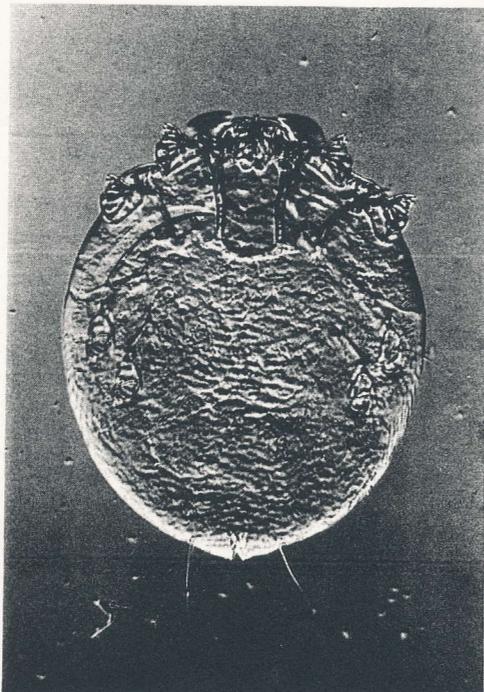


Bild 4: Kalkbeinmilbe des Haushuhns (*Cnemidocoptes mutans*). Präparat: Woelke 1958, Foto: Göke 1984. Plan-Objektiv  $20\times/0,40$ ; Projektiv 8:1; Differential-Interferenzkontrast.

#### Literaturhinweise:

1. HEINZE, K.: Polyvinylalkohol-Lactophenol-Gemisch als Einbettungsmittel für Blattläuse. *Naturwissenschaften* **39**, 285–286 (1952).
2. DOSSE, G.: Arbeitsmethoden zu morphologischen und biologischen Untersuchungen von räuberischen Milben. *Zeitschr. f. Angew. Entomologie* **40**, 155–160 (1957).
3. HIRSCHMANN, W. u. O. WOELKE: Das Präparieren von Milben. Kurzzeit- oder Dauerpräparat? Berlese-Mischung oder Polyvinylactophenol? *MIKROKOSMOS* **49**, 122–124 (1960).
4. GÖKE, G.: Methoden zur Präparation von Meeresplankton. *MIKROKOSMOS* **53**, 12–15 (1964).
5. HIRSCHMANN, W.: Milben (Acari). (In der Reihe „Einführung in die Kleinlebewelt“) Kosmos-Verlag. Stuttgart 1966. Die in dieser Arbeit veröffentlichten Mikroaufnahmen wurden von O. WOELKE nach PVL-Präparaten hergestellt, die heute noch erhalten sind.

Verfasser: Otto Woelke, Södingstr. 15, 5800 Hagen I.  
Gerhard Göke, Bahnhofstr. 27, 5800 Hagen I.

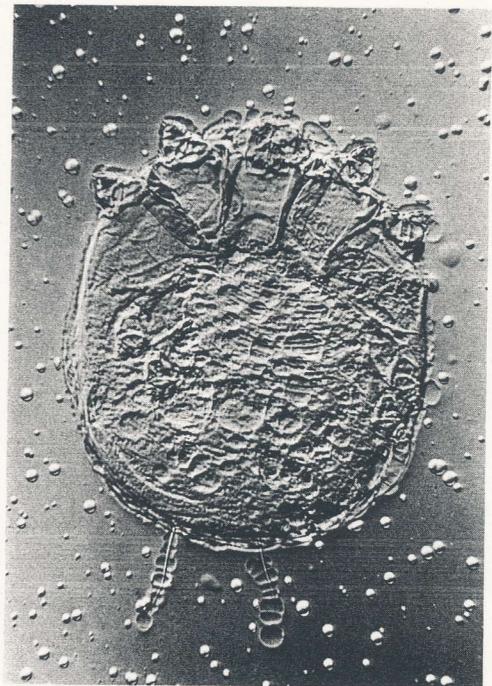


Bild 3: Kalkbeinmilbe des Haushuhns. Durch ein ungeeignetes Intermedium verdorbenes Präparat von 1958. Plan-Objektiv  $20\times/0,40$ ; Projektiv 8:1; Differential-Interferenzkontrast.

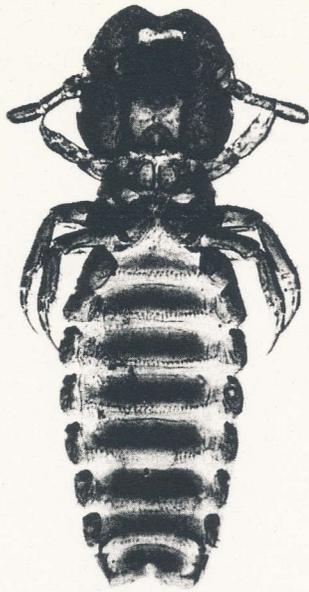


Bild 5: Haarling von einem Reh. Präparat: Woelke 1957, Foto: Göke 1984. Plan-Objektiv  $2,5 \times / 0,08$ ; Projektiv 8 : 1; Durchlicht-Hellfeld.

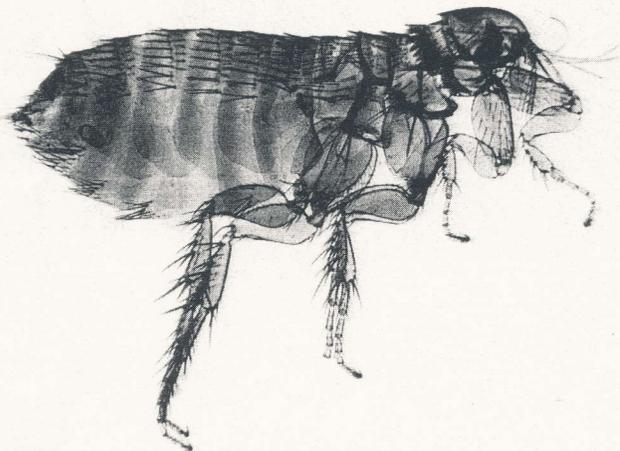


Bild 7: Floh aus einem Vogelnest. Präparat: Woelke 1956, Foto: Göke 1984. Plan-Objektiv  $2,5 \times / 0,08$ ; Projektiv 8 : 1; Durchlicht-Hellfeld.

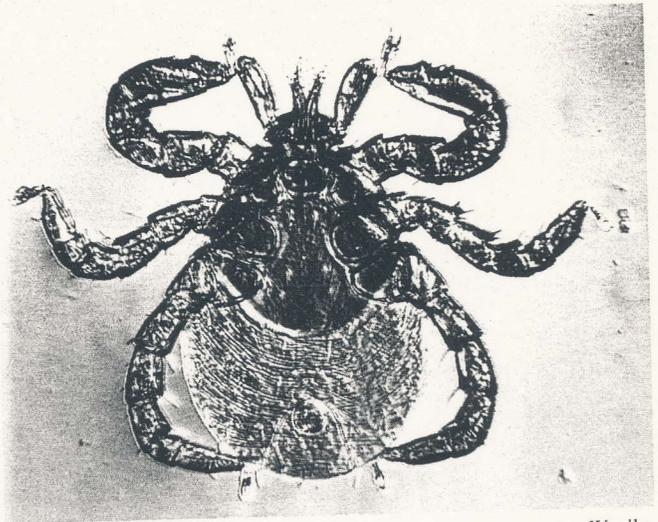


Bild 6: Holzbock (*Ixodes ricinus*). Präparat: Woelke 1958, Foto: Göke 1984. Plan-Objektiv  $5 \times / 0,10$ ; Projektiv 8 : 1, Homogene Interferenz.

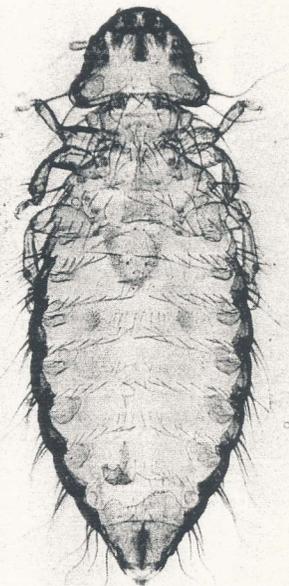


Bild 8: Federling vom Haushuhn. Präparat: Woelke 1958, Foto: Göke 1984. Plan-Objektiv  $2,5 \times / 0,08$ ; Projektiv 8 : 1; Durchlicht-Hellfeld.



Schweinelaus (*Haematopinus suis*) Präparat: Göke 1975, Foto: Göke 1984. Plan-Objektiv  $1,0 \times / 0,04$ ; Projektiv 8 : 1; Durchlicht-Hellfeld.