

Eine neue alte Methode der Paraffineinbettung

Von Klaus Henkel

Der folgende Aufsatz wurde im Dezember 2003 begonnen, die Arbeiten im April 2004 unterbrochen. Dabei ist es geblieben. Es fehlt das „Finish“, vielleicht auch der letzte sprachliche Schliff. Wenn die damalige, noch unfertige Fassung, heute, im Frühjahr 2010, auf der Homepage der Mikrobiologischen Vereinigung München e. V. veröffentlicht wird, dann deshalb, weil auch in der Amateurmikroskopie neuerdings wieder Interesse an der Verwendung von Isopropylalkohol als Intermedium bei der Einbettung besteht.

Gelegentlich stößt man in der älteren mikroskopischen Literatur auf einfache Methoden und Arbeitsverfahren und fragt sich, warum sie sich nicht durchgesetzt haben, nicht mehr angewandt werden. Großen Anteil an der Verdrängung altbewährter Methoden hat die moderne Labortechnik in der Medizin, die aus Gründen der Arbeitszeiterparnis in großen Kliniken und spezialisierten Laborbetrieben auf immer rationellere Methoden drängt. An dieser Entwicklung führt kein Weg vorbei, wenn man die Personalkosten im Griff behalten und trotzdem höheren Durchsatz erzielen will. Die Priorität der beiden Rahmenbedingungen für rationelle Laborarbeit, nämlich Arbeitszeiteinsparung und Anpassung der Prozesse an einen siebenstündigen Arbeitstag an nur fünf Wochentagen, hat immer teurere voll- und halbautomatische Einrichtungen entstehen lassen, bei denen die Kosten des Verbrauchsmaterials nur noch eine untergeordnete Rolle spielen. Manche Methoden aus den 50er und 60er Jahren setzen Handbetrieb voraus und finden allein schon deshalb keine Aufnahme mehr in moderne Fachbücher. Doch in vielen wissenschaftlichen Instituten wie auch beim Liebhabermikroskopiker stehen die Arbeitskosten nicht im Vordergrund, weil es sich um nur sporadische Abläufe mit geringen Materialmengen und niedrigem Durchsatz handelt, deren Rationalisierung schon deshalb reine Zeitverschwendung wäre, weil sie in ihrer spezifischen Problemstellung nur hin und wieder vorkommen. Im Hobbylabor liegt die Priorität meist sogar eindeutig auf der Einsparung von Verbrauchskosten und dem Vermeiden kostspieliger Einrichtungen.

Ich möchte ein Paraffineinbettungsverfahren vorstellen, das keine besonderen apparativen Voraussetzungen hat, **preiswert, einfach, schnell** und **sicher** ist. Wer Bedenken gegen die häusliche Verwendung von Xylol, Terpeneol, Methylbenzoat, Azeton, Benzol, Ethylenglykol, Tetrahydrofuran oder Dioxan hat, von denen einige widerlich riechen, andere recht giftig oder krebserregend sind, kann bei dem vorgestellten Verfahren auf- und beruhigt einatmen, denn die sind alle entbehrlich.

Wenn in den folgenden Detaildarstellungen Paraffin oder reines Paraffin erwähnt ist, so ist damit immer eine der arbeitserleichternden, **modernen Paraffinmischungen** gemeint, die aus reinem Paraffin und verschiedenen plastischen Polymeren von bestimmten Molekulargewichten bestehen. Die letzten verbessern die Einbettungs- und Schneideeigenschaften gegenüber reinem Paraffin wesentlich. Das vorherige „Altern“ des Paraffins durch starkes Erhitzen im Thermostaten, wobei giftige Dämpfe entstehen, wie auch das anschließende Filtrieren und Beimischen von Bienenwachs sind nicht mehr notwendig. Man wählt einfach eine moderne Paraffinmischung mit Schmelzpunkt zwischen 54-60°C, vorzugsweise 55- 58°C.

Das vorgestellte Verfahren ist nicht neu, sondern bewährt, aber weitgehend in Vergessenheit geraten. Doch Pfäfflin und Krauter (Mikrokosmos 1972 und 1979) sowie Romeis (16. Aufl. 1968) und Böck (Romeis 17. Aufl. 1989) sowie Adam und Czihak (1964) empfehlen es nachdrücklich als praktisch und zuverlässig. Außer einer modernen Paraffinmischung sind nur wenige Chemikalien notwendig. Entwässert wird mit Brennspritus in Stufen oder Isopropanol (2-Propanol; Isopropylalkohol). Das Intermedium besteht ebenfalls aus „Iso“ und einer Mischung von erwärmtem Iso und Paraffin. Nach dem Schneiden wird mit Xylol oder *Rotihistol* entparaffiniert, dann ist wiederum Iso an der Reihe, der zum Schluß auch zum Differenzieren und Entwässern nach der Färbung verwendet wird. Es klingt wie ein Traum: Vom Entwässern über das Einbetten, Entparaffinieren, Differenzieren, Eindecken nur Iso! Lediglich beim Entparaffinieren ist Xylol oder „Xylolersatz“ notwendig.

Sobald man erst einmal die überraschende Tatsache akzeptiert hat, daß Isopropylalkohol ein vorzügliches und fehlertolerantes Intermedium für die Paraffineinbettung ist, steht seiner vorteilhaften Anwendung nichts mehr im Wege. Ich habe das Verfahren monatelang mit botanischen Schnitten eingehend ausprobiert und bin sehr zufrieden. Aus der Literatur der sechziger und siebziger Jahre geht hervor, daß es sich auch für die Histologie ausgezeichnet eignet und sehr gut schneidbare Paraffinblöcke ergibt.

Kein Pferdefuß? Keiner, der entscheidend wäre, eher einige Randbedingungen, wie bei jedem Verfahren. Erstens muß Isopropylalkohol als Intermedium erwärmt werden. Es löst Paraffin im kalten Zustand kaum, erwärmt auf 45 Grad C. jedoch ausgezeichnet. Diese Temperatur sollte bereits für die letzte 100%-Stufe Iso gewählt

werden, 60-65° für die dann folgende mit Iso + Paraffin 1+1. Das sind Temperaturen, die nicht oder kaum höher liegen als bei der Paraffineinbettung ohnehin üblich. Für Paraffin mit einem Schmelzbereich von 55-58° stellt man den Thermostaten sowieso 3-5° höher ein, also auf 61-63°. Eine moderne Paraffinmischung ist empfehlenswert, am besten eine, die schnell in die Objekte eindringt. Alle Hersteller und Laborhandelsfirmen wie Aldrich, Roth, Leica (Jung), Mikrom, Medite etc. bieten stets auch Sorten an, die für das schnelle Eindringen ausgelegt sind. Das ist wichtig, denn Isopropylalkohol verdunstet aus Hohlräumen und Gewebsspalten rasch, das Paraffin muß also schnell nachdringen, damit keine Schrumpfungen im Objekt oder Inkonsistenzen im Paraffinblock entstehen, welche die Schneidbarkeit beeinträchtigen. Wenn besondere Objekte dem Paraffin das Eindringen erschweren und der Isopropylalkohol zu rasch verdunstet, empfiehlt sich, die Iso/Paraffin-Stufe durch eine mit Butanol/Paraffin zu ersetzen. Das **Butanol** ist nicht so flüchtig, in der Anwendung unbedenklich und ergibt ebenfalls hervorragend schneidbare Blöcke. Sollte das einmal zweckmäßig sein, so nehme man das normale Butanol (n-Butanol) anstelle des meist empfohlenen tertiären Butanols. Das letzte ist vermutlich das Intermedium mit den allerbesten Eigenschaften, jedoch ist die Handhabung umständlich, denn weil es erst bei 24-25°C flüssig wird, muß es im Wasserbad warm gehalten werden. Seine Empfehlung stammt von Donald Alexander Johansen (Plant Microtechnique, 1940), der an der Stanford University in Palo Alto / Kalifornien arbeitete. Dort liegen die normalen Tagestemperaturen höher, so daß man mit tertiärem Butanol keine Probleme hat. Hier in Mitteleuropa nimmt man besser n-Butanol. Die Butanol-Methode empfiehlt sich auch, falls der Isopropylalkohol einen zu hohen Wasseranteil hat, der ins Paraffin geschleppt würde. Es heißt zwar immer, er sei viel leichter hundertprozentig zu halten als Ethylalkohol, aber etwas hygroskopisch ist er dennoch, wenn auch viel geringer als Ethanol.

Eine außerordentliche **Arbeitsvereinfachung** läßt **Isopropylalkohol** als Auswasch- und Entwässerungsmittel zu. Wir müssen nicht stufenweise bis zum absoluten Alkohol „hochführen“, es ist sogar besser, das nicht zu tun, sondern aus 70-, 50- oder gar 40% Alkohol bzw. entsprechender alkoholischer Fixierlösung die Objekte direkt in absoluten Isopropylalkohol zu bringen. Die dabei entstehenden unvermeidlichen Schrumpfungen der Zellen und ihres Inhalts sind geringer als bei stufenweiser Anwendung von Isopropylalkohol. Zu diesem überraschenden Ergebnis kam Dr. Dieter Krauter, der langjährige Herausgeber des Mikrokosmos (Krauter, D.: Methylglykol als Entwässerungsmittel für biologische Objekte. In: Mikrokosmos 43, 1953/54, 92-94).

Wer lieber **stufenweise mit Ethylalkohol** entwässert und nur für letzte Stufe mit absolutem Alkohol den Iso verwenden möchte, kann bei botanischen Objekten und den meisten anderen bedenkenlos **Brennspiritus** in entsprechender Verdünnung nehmen. Seine Vergällung mit Methylalkohol und Pyridinbasen sind bei der Entwässerung nicht nachteilig. Die Einsparung gegenüber dem mit Petrolbenzin oder Methyläthylketon (MEK) vergällten Ethylalkohol ist jedoch gering, so daß man dieses ebenso günstig verwenden kann.

Nun noch ein Wort zu den Alkoholen **Isopropanol** und **Butanol**. Die Preislisten der Anbieter von Laborchemikalien sind oft verwirrend, weil die verschiedenen Qualitäten nicht näher erläutert und zudem in unterschiedlicher Weise beschrieben sind. Es werden drei, vier verschiedene Qualitäten mit hohen Preisunterschieden angeboten. Ein Unterschied von 15 Euro je Liter ist nicht zu vernachlässigen. Die teuersten sind analysenrein („p. a.“), sie enthalten die geringsten Wasserspuren. Für die Entwässerung von in Paraffin einzubettendem Material sind sie die geeignetsten. Der Preis ist hoch, aber der Verbrauch gering. Begnügt man sich mit weniger wasserfreien Sorten, kann es passieren, daß man jahrelang umsonst gesammelt, konserviert und registriert hat, weil die Paraffinblöcke schlecht oder überhaupt nicht schneidbar sind.

Für die ersten Prozeßstufen der Entwässerung darf es ruhig preiswerteres Isopropanol sein, aber für die beiden letzten und die Halbe/Halbe-Stufe mit Paraffin das wasserfreieste, was man bekommen kann. (Für die ersten Entwässerungsstufen genügt, wie schon erwähnt, sogar Brennspiritus.) Ich bezweifle aber, daß es zweckmäßig wäre, verschiedene Sorten von Isopropanol vorrätig zu halten.

In der folgenden detaillierten Prozeßbeschreibung kommen zwei Wärmeschränke vor. Im ersten wird Isopropanol erwärmt, später werden darin die in *Malinol* oder *Euparal* eingedeckten Mikropräparate getrocknet. Dieser Wärmeschrank kommt niemals mit Paraffin in Berührung, das ihn innen sofort mit einer ölig-schmierigen Schicht überziehen würde. Der zweite Wärmeschrank dient ausschließlich dem Durchtränken der Objekte mit Paraffin und dem Bereithalten des erwärmten Einblockparaffins. Früher nannte man eine solche Einrichtung Paraffinofen. Der beschriebene Prozeß hängt aber nicht vom Vorhandensein der Wärmeschränke ab. Es existieren praktische Vorschläge, wie man Paraffin auch ohne Wärmeschrank schmelzen und bei konstanter Temperatur halten kann. In der älteren Amateurliteratur, z. B. in Aufsätzen in der Zeitschrift Mikrokosmos, finden sich sogar Selbstbauanleitungen für Paraffinöfen.

Prozeßbeschreibung

Prozeßschritt

↷ Uhrzeit

↷

- P** **t** Die Objekte wurden bereits beim Sammeln im Feld in kleine Präparategläser mit AFE gegeben und der Plastiklamellenstopfen mit *Parafilm M* abgedichtet. Aufbewahrung 1 bis 15 Jahre. (AFE, EAF, FAE, FEA oder auch Fixiergemisch nach Johansen, Langdon, Lavdovsky, Rawlins. 90 ml Ethanol vergällt, 70%; 5 ml Eisessig; 5 ml Formol = Formalin 40%.)
- A** 21.00 Stopfen vorsichtig entfernen und das ganze Präparateglas in den Gitterkorb entleeren. Sobald die AFE-Flüssigkeit hindurchgelaufen ist, wird der Gitterkorb mehrmals auf ein Löschblatt aufgesetzt und auch die Rundwand abgetupft, um möglichst wenig AFE ins erste ISO-Bad mitzuschleppen.
(Eventuell müssen die Objekte noch mit einer scharfen, unbenützten Rasierklinge sauber beschnitten werden, damit sie im Paraffin gut ausgerichtet werden können.)
- B** Danach wird der Gitterkorb mit den noch feuchten Objekten in das erste Glas mit ISO 1 umgesetzt, wo er mit seiner Aufhängeschnur so festgeklemmt wird, daß er im oberen Bereich der Alkoholsäule hängt. Sowie der Alkohol in die Objekte eindringt, laufen die schweren Flüssigkeiten Wasser, Formol und Essigsäure nach unten ab und sammeln sich am Boden des Gefäßes. Das Präparateglas wird mit lose aufliegendem Deckel oder mit einem Stopfen verschlossen.
In diesem Bad bleiben die Objekte etwa 10 Stunden, länger schadet aber nicht.
- (B) 7.00 Die beiden Wärmeschränke W1 und W2 werden nun vorgeheizt, damit sie die für die Prozeßschritte E und F richtigen Temperaturen erreichen.
Im Wärmeschrank 1 befinden sich auch 2 Präpariernadeln, eine Federpinzette und 2 der 4 Edelstahlkasserollen für das Paraffin. Sie werden zunächst trocken bis 45° angeheizt. Die anderen beiden Kass. kommen jetzt in W2, vorwärmen auf ca. 63°
- C** 8.00 Der Gitterkorb wird in die zweite Portion ISO 2 umgesetzt (nach Ablaufen und Abtupfen). Präparateglas verschließen. In dieser Prozeßstufe ist es nicht mehr notwendig, die Objekte in eine möglichst große Menge ISO zu geben, es genügt durchaus, die Objekte reichlich zu bedecken, das ISO muß nicht höher als einen halben Zentimeter über den Objekten stehen. Doch sollte der Gitterkorb nicht auf dem Boden des Glases ruhen, sondern mindestens einen halben Zentimeter darüber.
Der Aufenthalt beträgt 2 Stunden oder mehr.
- Einfüllen der Vorratsmenge der Paraffinmischung in die größte der Kasserollen und einstellen in W2. (Muß bis 11.00 ca. 63° erreicht haben. G gelegentliche Kontrolle, wann geschmolzen.)
- (C) 9.00 Kontrolle von W1 auf korrekte Temperatur. Einfüllen ISO 3 in die kalte Kasserolle, die nicht in W1 vorgewärmt wurde. Gitterkorb aus ISO 2 abtropfen lassen, abtupfen und in ISO 3 umsetzen. Kasserolle mit Glasscheibe abdecken.
Verweildauer 1 Stunde.
In diesem und den folgenden Prozeßschritten E und F muß der Isopropylalkohol (2-Propanol) oder Butylalkohol (n-Butanol) hochgradig wasserfrei sein, damit nicht die geringste Spur Wasser ins Paraffin geraten kann.
- E** 10.00 Einfüllen ISO 4 in auf 45° erwärmte Kasserolle aus W1. Gitterkorb aus ISO 3 abtropfen lassen und sofort in ISO 4 hängen. Einige Körnchen Erythrosyn oder Eosin hinzugeben, damit die Objekte später im Paraffin gefunden werden können. Diese Farbstoffe werden beim Entparaffinieren wieder ausgewaschen.
Kasserolle in W1 stellen und mit Glasscheibe abdecken.
Verweildauer 1 Stunde.
- F** 11.00 Aus der Paraffinvorratskasserolle eine Teilmenge in auf 63° vorgewärmte Kass. gießen, ISO 4 vorsichtig darüber gießen, so daß eine Mischung 1+1 entsteht, und den Gittertrogtropfen einstellen. Mit saugfähigem Filterpapier abdecken und in W2 stellen.

Lüftungsklappe von W2 öffnen, damit der Alkohol aus dem Gemisch langsam verdunsten kann.

Verweildauer 2 Stunden.

Filterpapier zwischendurch wechseln, wenn es sich mit Paraffin vollgesogen haben sollte.

(Wenn der ISO schneller verdunstet als das Paraffin in die Objekte nachdringen kann, müssen die Prozessschritte E und F mit tertiärem oder n-Butanol anstelle des ISO ausgeführt werden. Der Butylalkohol muß analysenrein sein, damit er garantiert keinerlei Wasserspuren enthält.)

- G** 13.00 Eine Portion reines Paraffin aus Vorratskasserolle aus W2 in leere, saubere, vorgewärmte Kasserolle gießen, sofort in W2 einstellen, Gitterkorb hineinsetzen, mit Filterpapier abdecken. Alte Kasserolle aus W2 nehmen, ausgießen. Temperatur von W2 auf 60° einstellen. Verweildauer 2 Stunden.

Eventuell Vorratskasserolle mit Paraffin-Pellets nachfüllen.

Das Paraffin muß stets flüssig bleiben, sobald Objekte eingebracht sind. Erstarrt es versehentlich, darf es nicht einfach wieder geschmolzen werden, weil die Objekte dabei hart und spröde werden. Die Objekte sind vielmehr mit einem Intermedium aus dem Paraffin herauszulösen und danach von neuem mit Paraffin zu infiltrieren.

- (G) 14.30 W1 auf 56 bis 58° einregeln, damit die Ausgießform, Pinzette und Nadeln ausreichend vorgewärmt werden.
Ausgießform über Formholzklötzchen in passender Größe formen, Richtlinien anbringen, in W1 stellen.

- H** 15.00 Eine Portion reines Paraffin aus Vorratskasserolle aus W2 in leere, saubere, vorgewärmte Kasserolle gießen, sofort in W2 einstellen, Gitterkorb hineinsetzen, mit Filterpapier abdecken. Alte Kasserolle aus W2 nehmen und schnell (!) ausgießen. Verweildauer 2 Stunden.

- I** 17.00 Pinzette und Nadeln griffbereit legen, jedoch noch nicht aus W1 nehmen.
Aus Vorratskasserolle vorsichtig, ohne Luftblasen zu verursachen, Paraffin in Ausgießform geben, aus Gitterkorb Objekt mit Federpinzette entnehmen, möglichst exakt ausrichten, notfalls mit den angewärmten Nadeln zurechtrücken, eventuell weitere Objekte in Form einlegen. Evtl. weiteres Paraffin nachgießen. Schnell arbeiten!
Abkühlen lassen.
Wärmeschränke ausschalten.
Wenn Paraffin vollständig ausgehärtet und abgekühlt, aus Alu-Form nehmen, kennzeichnen, staubsicher aufbewahren.
Alle Gerätschaften reinigen.

Der Einbettungstrog

Es werden viele unterschiedliche Einbettungsgefäße in allen Größen angeboten, die modernsten aus einem speziellen Metallguß, der rasche Temperaturanpassung gewährleistet. „Keine von ihnen haben jedoch irgendeinen bedeutsamen Vorteil gegenüber einem einfachen, gefalteten Papierkästchen“, schrieb Johansen 1940. Diesen Verdacht hege ich noch heute, soweit es meine Bedürfnisse als Amateur betrifft. Die meisten Hobbymikroskopiker werden wohl anfangs vermeiden wollen, sich einen Satz metallener Einbettungströge aus Spezialmetall für mehrere hundert Euro zuzulegen. Der folgende Vorschlag für die Anfertigung von Stanniolkästchen hat sich schon hundert Jahre bewährt. Man faltet sich Kästchen aus Aluminiumfolie, und zwar nicht aus der dünnen Haushaltsfolie, sondern derjenigen aus dem Bastelladen, die erheblich steifer ist. Ihre Form erhalten die Kästchen, indem man sie über einem Formklötzchen faltet. Die Formklötzchen werden von einem Vierkantholz mit rechteckigem Querschnitt aus dem Baumarkt abgesägt. Dort bekommt man in der Bastelabteilung auch die Alu-Folie.

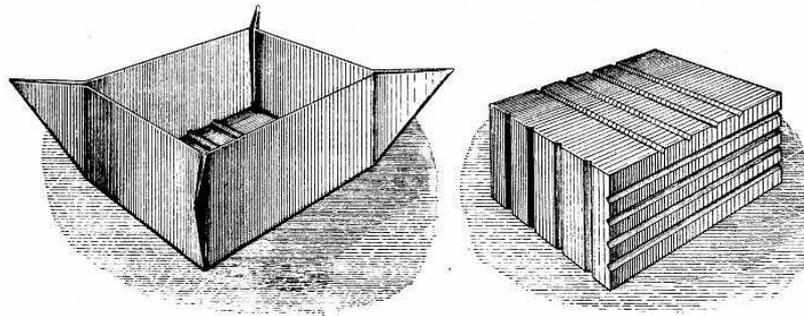


Fig. 2.

Stanniolschiffchen zum Einbetten,
natürliche Größe.

Großes Klötzchen mit
(etwas zu groben) Rillen.

Aus: Becher, S; Demoll, R.: Einführung in die Mikroskopische Technik –
für Naturwissenschaftler und Mediziner. Quelle & Meyer, Leipzig 1913.

Da die Formklötzchen von rechteckigen Leisten stammen, können wir ihre Länge so festlegen, daß wir an jedem Klötzchen drei verschieden große Grundflächen für ein Stanniolkästchen erhalten. Wenn wir dann noch Klötzchen von verschiedener Länge abschneiden und von zwei verschiedenen Leisten, stehen uns mit wenigen Klötzchen eine große Zahl unterschiedlicher Kästchengrößen und Seitenverhältnisse zur Verfügung. (Ich habe im Baumarkt folgende beiden Leisten gewählt: Querschnitt 20x15 mm und 20x30 mm. Fichtenholz. Besser wäre härteres Erlen- oder Buchenholz; gab es aber nicht.)

Objekte einlegen und orientieren

Reines, unbenutztes Paraffin aus W2 in Stanniolform gießen, ohne daß dabei Luftblasen entstehen. Eventuell Form dabei auf angewärmte Glas- oder Metallplatte stellen, damit das Paraffin nicht so rasch abkühlt und erstarrt und man Zeit gewinnt für das Orientieren der Objekte. –

Kurz auf kühle Platte stellen, wenn man eine schon erstarrte oder erstarrende Bodenschicht braucht, um Objekte darauf zu legen.

Mit erwärmtem Instrument (Objektfänger/Spatel oder Federpinzette) Objekt(e) aus Gitterkorb nehmen (Achtung: Objekte dürfen nicht erstarrt sein.) und in das flüssige Paraffin legen, mit Nadeln orientieren.

Eventuell noch Paraffin hinzugeben. – Block abkühlen lassen.

Objekte orientieren

Wer erst beim Einbetten darüber nachdenkt, wie ein Objekt für das anschließende Schneiden zu orientieren ist, hat das Spiel bereits halb verloren. Das muß bereits beim Sammeln geschehen. Als Beispiel wähle ich wieder meine pilzinferierten Phanerogamenblätter. Bevor ich aus einem infizierten Blatt ein Stück ausschneide, fertige ich eine Skizze des Blattes mit dem herauszuschneidenden Stück an, in der genau zu sehen ist, wo das Stück entnommen werden soll. Solche Ausschnitte sind rechteckig oder ungefähr quadratisch, die längste Schnittkante sollte nicht länger als 5 mm sein, weil sonst die Fixierlösung nicht schnell genug eindringt. Grundsätzlich vermeide ich den Blattrand, vielmehr schneide ich ihn in der Regel ab, damit die Fixierlösung auf allen vier Seiten gleichzeitig eindringen kann. Wenn möglich, benütze ich zum Schneiden eine frische, scharfe Rasierklinge, notfalls auch die kleine, aber scharfe Schere an meinem Schweizermesser. Im letzten Fall muß aber der Schnittrand später an allen Kanten mit der Rasierklinge begrädigt werden, denn die Schere quetscht die Randzellen, die dabei völlig zerstört und unbrauchbar oder sogar so zusammengequetscht werden, daß die Fixierlösung gar nicht ordentlich eindringen kann. Bei Laubblättern mit ihrer meist dichten und oft festen Blattoberfläche ist das sowieso problematisch, da dringt die Fixierlösung kaum durch, kann also nur an der schmalen Schnittkante aufgenommen werden.

Eine Ecke des ausgeschnittenen Blattstücks wird schräg abgeschnitten und diese Stelle in der Skizze genau markiert, damit beim Einbetten nicht lange gerätselt werden muß, welche Seite des inzwischen transparenten Objekts die Blattober- oder -unterseite ist. Die Skizze liegt beim Einbetten selbstverständlich neben dem Stan-

niolkästchen. Damit das auch noch beim Schneiden mit dem Mikrotom erkennbar ist, sind in das Formholzklötzchen sogenannte Richtlinien eingefräst. Es hängt nun ganz von der Form und Größe eines oder mehrerer Objekte ab, in welcher Lage sie einbettet werden. Jedenfalls wird das Stanniolkästchen auf derjenigen Seite, an der später das Mikrotommesser ansetzen soll, eingerillt. Man drückt einfach das Stanniol in die Richtlinien ein, damit sie sich ins Kästcheninnere vorwölben. Wenn der erkaltete Paraffinblock aus dem Stanniol herausgelöst wird, werden die Rillen im Paraffin mit schwarzer Farbe angestrichen. Es muß eine Farbe sein, die auch nach dem Trocknen elastisch bleibt und die sich gut schneiden läßt, denn sie wird ja mitgeschnitten. Früher wurde „Nubian Blacking“, eine Art Schuhcrème des feinen englischen Haushalts empfohlen. Aber es ist wohl außer Gebrauch gekommen oder heißt heute anders. Man nehme auf keinen Fall Deckglaslack, denn der wird hart und ruiniert jedes Mikrotommesser beim ersten Schneideversuch. Ich habe dieses Problem noch nicht gelöst, weil es bei meinen Blättern nicht darauf ankommt, am fertigen Schnitt die Blattober- und -unterseite an einer Markierung im Paraffinrand zu erkennen, das erkennt man bei Blättern unter dem Mikroskop sowieso. Bei anderen Objekten aber oft nicht.

Das Einbettungskästchen seitlich vor den Paraffinwärmeschrank stellen. Eine Gas- oder Spiritusflamme sollte in der Nähe aufgestellt sein, damit sie die Nadel(n) zum Orientieren des Materials erwärmt. Wenn Nadeln und Objektfänger bereits im Wärmeschrank vorgewärmt sind, ist das unnötig. Objektbehälter aus dem Wärmeschrank nehmen, aufschütteln, um die Objekte vom Boden aufzuwirbeln, und rasch ins Einbettungskästchen schütten. Weiteres geschmolzenes Paraffin nachfüllen, falls nötig; es sollte gerade genug sein, damit die Objekte ordentlich bedeckt sind. (Falls man die langsame Methode der Abkühlung wählt, sollte das Paraffin hoch genug über den Objekten stehen, damit sie nicht durch die Nabelbildung bei der Abkühlung gefährdet werden.) Überflüssiges Paraffin behindert die Kühlung der Masse.

Mit einer Nadel (evtl. kurz in der Flamme erwärmt) die einzelnen Objekte rasch zu einem ordentlichen Arrangement ordnen; Überlagerungen dabei unbedingt vermeiden und eher große Abstände zwischen benachbarten Objekten lassen.

Mancher stellt den Einbettungstrog während der Orientierung der Objekte auf eine heiße Platte. Diese Prozedur kann kaum empfohlen werden (ausgenommen bei einer Raumtemperatur unter 10°C), weil die Gefahr der Überhitzung groß ist und der Abkühlungsprozeß unnötig verlängert wird.

Rasche Arbeit und geschickte Manipulation, die man sich nach etwas Übung aneignet, sind alles, was man beim Einbetten benötigt.

Wenn der Trog zu kalt ist, kann man ihn kurze Zeit in den Paraffinschrank stellen oder rasch über die Flamme ziehen.

Abkühlen

Das Paraffin soll rasch und deshalb unter Kühlung erstarren. Von mehreren Methoden, wie das am besten zu bewerkstelligen sei, sind im Verlauf von 135 Jahren nur zwei übrig geblieben: mit und ohne Untertauchen. Das Paraffin kühlt normalerweise zuerst über dem Boden des Trogs ab. Sobald der Trog bewegt werden kann, ohne daß dabei die Anordnung der Materialstücke gestört wird, setzt man ihn in eine Schale kalten Leitungswassers (15 – 23°C) und läßt ihn schwimmen bis das Paraffin ausreichend fest ist. Bei kälterem Wasser bekommt der Block auch seitlich und unten Einziehungen, unter Umständen sogar Sprünge. Sobald sich auf der Oberfläche ein Häutchen gebildet und ausreichend gefestigt hat, taucht man den ganzen Trog unter die Wasseroberfläche. Der Trog kann unten gehalten werden, indem man ein schwereres, metallenes Skalpell quer über ihn legt.

Bei der anderen Methode wird der Trog nicht unter die Wasseroberfläche getaucht, sondern man kühlt nur mit so viel Wasser, daß es bis an den oberen Rand des Trogs reicht, dann läßt man das Paraffin langsam erstarren. Die Oberfläche des erstarrenden Paraffinblocks zieht sich bei diesem Verfahren nabelartig ein, das Blockinnere nimmt dabei eine sehr gleichmäßige Beschaffenheit von sehr guter Schneidbarkeit an. Wichtig ist allerdings, daß die Objekte vom Paraffin wirklich völlig durchdrungen sind und daß es sich bei der Paraffinmischung um eine gute Markenware handelt.

ROMEIS (16. Aufl. 1968) führt dazu aus:

„417. In früheren Auflagen habe ich ebenso wie andere Autoren empfohlen, die Form, wenn die Oberfläche des Paraffins zu einem Häutchen erstarrt ist, unterzutauchen, so daß der ganze Block von Wasser überflutet ist. ... Später machte ich jedoch immer wieder die Erfahrung, daß beim Erstarren unter Wasser die Innenteile des Paraffinblockes inhomogen, bröckelig und mit Vakuolen durchsetzt sind, Erscheinungen die sich beim Verfahren nach § 416 [siehe oben] niemals zeigen. Ich bin daher von Erstarrenlassen unter Wasser völlig abgekommen.“

Bei der zweiten Methode muß wegen der Nabelbildung der Einblocktrog hoch genug sein, damit der Nabel nicht mitten im Objekt zu liegen kommt.

Wenn das Paraffin fest genug ist, kann es aus dem Papier- oder Stannioltrog genommen werden, notfalls indem man diesen auffaltet. Aus Uhr- oder Blockschälchen oder dergleichen wird der Paraffinblock meist herauschwimmen, besonders wenn man solche Behälter vor dem Einfüllen des Paraffins hauchdünn mit Glycerin eingerieben hat. Wenn nicht, hebt man ihn mit der Skalpellspitze heraus, indem man sie dort ansetzt, wo kein Material beschädigt werden kann.

Man kühle die Blöcke stets vollständig ab, was oft bis zu einer Stunde dauern kann. Wenn möglich lasse man sie über Nacht im Wasser.

Gute Paraffinblöcke geben bei Auffallen auf den Tisch einen hellen Klang, sind auf der Schnittfläche weder milchig noch bröckelig, sollen nicht wie weißer Marmor, sondern wie weißes Porzellan aussehen.

Die fertigen Blöcke sollten sorgfältig aufbewahrt werden, auf keinen Fall herumliegen und Staub aufsammeln. Keine Blöcke aufeinander stapeln ohne ein steifes Papier oder eine dünne Pappe dazwischen.

Ein Übermaß an Paraffin sollte zuerst entfernt werden, man darf es jedoch nicht mit dem Skalpell einfach unter Druck abschneiden wollen, weil dabei oft der ganze Block mittendurch splittert und – die Tücke des Objekts macht es fast zur Regel – durch das mühsam fixierte, entwässerte, paraffindurchdränkte und eingebettete Objekt. Bewährt hat sich die Methode, mit der Skalpellspitze (Klingenrücken zum Paraffin!) oder mit einer stabilen Nadel eine Kerbe in das Paraffin graben, immer tiefer, sodann von der Gegenseite, bis das unerwünschte Stück leicht über einer Tischkante o. ä. abgebrochen werden kann. Das überschüssige Paraffin kann eingeschmolzen und immer wieder benützt werden.

Kennzeichnen, Beschriften

ISO-Prozeß

Zeitdauer in Stunden der einzelnen Prozeßschritte.

Prozeßschritt	Q	Entwässern				Intermedium		Paraffin	
		B 1 Iso 1	B 2 Iso 2	C Iso 3	D Iso 4	E Iso 5 45 °C	F Iso/Par.1+1 63 °C	G Paraffin	H Paraffin
ROMEIS, 16. Aufl.	a	1 ¹ 60 %	1 ¹ 90 %	1 100 %	1 100 %	10-60 Min 40-45 °C	0,5 - 1 50 °C	1-24 ²	1-24 ²
BÖCK , P. (=Romeis, 17. Aufl.)	b	3 75 %	6 90 %	4 100 %	4 100 %		12 ³ 60 °C	8 60 °C	
ADAM und CZIHAK ⁴	c	2-6 75 %	2-6 90 %	12-24 ⁵ 100 %	12-24 100 %		12-24 ⁶ 60 °C	2-24 ⁷	2-24
SCHULZE, GRAUPNER ⁴	d								
KRAUTER, D.	e	100 % ⁸		100 %	100 %		60 °C		
PFÄFFLIN, W.	f	60 % ⁹	90 % ⁹	100 % ¹⁰	100 % ¹⁰	1 100 %	1 65-70 °C	8 ¹¹	8
Mein Prozeß		100 %		100 %	100 %	100 %	62 °C	62 °C	62 °C
Beginn-Stunde		(-) 6-12		0	2	3	4	6	8
Dauer d. Pr.schritts		6-12		2	1	1	2	2	2

Q Quellen

- a Romeis, B.: Mikroskopische Technik. **16.** neubearb. u. verbess. Aufl. R. Oldenbourg Verlag, München, Wien 1968. S. 98 § 404.
- b Romeis: Mikroskopische Technik. **17.**, neubarb. Aufl., Hrsg. P. Böck. Urban & Schwarzenberg, München 1989. S. 124 ff.
- c Adam, H.; Czihak, G.: Arbeitsmethoden der makroskopischen und mikroskopischen Anatomie. G. Fischer, Stuttgart 1964. S 263 f.
- d Schulze, E.; Graupner H.: Anleitung zum mikroskopisch-technischen Arbeiten in Biologie und Medizin. 2. Auf., völl. neu bearb. Akadem. Verlagsgesellsch. Geest & Portig K.-G., Leipzig 1960. S. 63.
- e Krauter, D.: Das Kosmos-Mikrotom. III. Wahl der Objekte. Durchtränkung mit Paraffin oder Polyäthylenglykol. In: Mikrokosmos 68, 1979, 145.
- f Pfäfflin, W.: Paraffineinbettung über Isopropylalkohol. Ein preiswertes Intermedium. In: Mikrokosmos 61, 1972, 109 f.

Anmerkungen

- 1 15-30 min je 1 mm Objektdicke. Aufschlag wegen langsamen Eindringens in Pflanzenblätter.
- 2 je nach Größe 1-24 Stunden; 2-3mal wechseln.
- 3 Möglicherweise Druckfehler, könnte 1-2 Stunden gemeint sein, denn Böck gibt beim Iso-Verfahren für Einbettautomaten an: Iso-Paraplast 1:1 bei 50 °C „1 Std.“
- 4 Schritte A bis E: Iso- oder Normalpropanol.
- 5 2mal wechseln .
- 6 ges. bei 60 °C, 12-24 Std. Die Abkürzung „ges.“ i st unklar.
- 7 54-60 °C; 3 Stufen, je 2-24 Std.
- 8 Objekte aus 96 %igem Alkohol in 3mal gewechselten 100 %igen Isopropylalkohol bringen. – Krauter definiert die Mindestdurchtränkungszeit nach folgender Rechenformel: Halbe Kantenlänge der kürzesten Kantenlänge kK eines allseitig umspülten, quaderförmig gedachten Objekts zum Quadrat = Mindestdurchtränkungszeit t_{min} in Stunden: $t_{min} = (kK / 2)^2$.
- 9 Je mm Objektdicke mindestens 30 Min.
- 10 In absolutem Isopropylalkohol je mm Objektdicke etwa 15 Min., jedoch nicht kürzer als 60 Min.
- 11 Mit reinem Paraffin oder Paraplast; zweimal wechseln; je nach Objektgröße ca. 16 Stunden.

Vorläufig beendet und nicht weitergeführt: 6. April 2004