

Faure's vloeistof als insluitmiddel voor microscopische preparaten van kleine insecten

door
A. REYNE

Sedert meer dan 25 jaar wordt dit middel door Nederlandse entomologen gebruikt, maar gewoonlijk ten onrechte als „vloeistof van Berlese” of kortweg als „Berlese” aangeduid. Voor zover ik weet, wordt de „vloeistof van Berlese” in de Nederlandse literatuur het eerst genoemd door WALCH (1922) in zijn studie over *Trombicula deliensis*. Het recept daarvoor ontving hij uit Japan van Prof. NAGAYO. Dit recept blijkt geheel overeen te komen met dat van FAURE (1910), nl. Arabische gom 60 g, water 100 cc, glycerine 40 cc, chloraalhydraat 100 g. Naar ik vermoed, heeft NAGAYO het recept door bemiddeling van BERLESE ontvangen en het nieuwe insluitmiddel daarom aangeduid als „vloeistof van Berlese”. Onder Berlese's vloeistof verstaat men in de microtechniek echter een ander mengsel, dat door BERLESE gebruikt werd voor het insluiten van Acari (vgl. BOLLES LEE 1928, IMMS 1929, ELTRINGHAM 1930, SWAN 1936, LANGÉRON 1942, WOMERSLEY 1943). „Faure” bevat 60 g Arab. gom, 100 cc water, 40 cc glycerine, 100 g chloraalhydraat, 1 g cocaïne-chloorhydraat en „Berlese”, 15 g Arab. gom, 20 cc water, 160 g chloraalhydraat, 10 g glucosestroop, 5 cc ijsazijn.

FAURE (1910), die aan het Botanisch Instituut te Rome werkte, geeft de bereidingswijze van zijn vloeistof, welke bovengenoemde samenstelling heeft, als volgt aan. Eerst de chloraalhydraat in gedest. water oplossen, daarna de glycerine en cocaïneverb. toevoegen en goed mengen. Eerst daarna wordt de Arab. gom (lieftst in poedervorm) toegevoegd. Na enige dagen is alles opgelost en wordt gefiltreerd. Het oplossen geschiedt bij voorkeur koud. Fixeren der objecten is niet nodig (chloraalhydraat fixeert en verdooft; R.). Alcohol-materiaal moet eerst goed uitgespoeld worden in gedest. water, daar alcohol in de gomoplossing een witte neerslag geeft.

Volgens FAURE was de vloeistof reeds door vele Italiaanse botanici en zoölogen (vooral entomologen) beproefd en hadden deze de preparaten reeds langer dan 2 jaar bewaard. Het insluitmiddel achtte hij o.a. geschikt voor kleine Arthropoden, wormen, planten-embryo's, algen en schimmels. Het fixeert goed, verandert de kleur niet en maakt de objecten doorschijnend. Na enige tijd is het zo sterk ingedikt, dat het dekglas schoon gemaakt kan worden, zodat men de preparaten ook met een olie-immersie kan onderzoeken. Voor omranden beveelt FAURE asphaltlak (bitumen) aan.

De „liquido Faure” was in Italië in de handel verkrijgbaar. Een voordeel van deze vloeistof is, dat men van levende objecten zonder verdere voorbereiding dadelijk een microscopisch preparaat kan maken. Voor plankton-preparaten bijv. werd de vloeistof zeer geprezen (vgl. Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie, 33 : 245, 1917). De details van kleurloze chitinepreparaten blijven door de lage brekingsindex voldoende zichtbaar, zodat kleuren overbodig is.

Na WALCH (1922) vond ik in de Nederlandse literatuur Faure's vloeistof weer vermeld in het proefschrift van FRANSSEN (1927), die haar (zonder er verder over uit te weiden) aanduidt als „Berlese”. Zijn promotor, Prof. ROEPKE, heeft de samenstelling daarvan in 1928 gepubli-

ceerd, nl. 12 g Arab. gom, 20 g aqua dest., 16 g glycerine (ongeveer 13 cc), 20 g chloraalhydraat, en merkt terecht op, dat dit zg. Berlese-mengsel een wijziging van Faure's vloeistof is. De samenstelling komt daarmee overeen, echter is het glycerine-gehalte verhoogd. Wanneer men bovenstaande cijfers met 5 vermenigvuldigt, komt men tot de samenstelling van FAURE (1910), maar het glycerine-gehalte is verhoogd van 40 cc tot 63 cc. Dit lijkt mij geen verbetering toe. Door het hogere glycerine-gehalte drogen de preparaten nog langzamer dan die in de oorspronkelijke vloeistof van Faure. ROEPKE geeft dan ook aan, dat de preparaten enige dagen bij 30—35° C of in een exsiccator gedroogd moeten worden en dan omrand met „Murrayite”.

Prof. ROEPKE deelde mij mee, dat hij zijn aantekeningen over dit onderwerp tijdens de oorlog verloren heeft, en niet meer kan nagaan, vanwaar het recept afkomstig is. Dr J. G. BETREM, destijds assistent bij Prof. ROEPKE, berichtte mij, dat hij het recept van de „Berlese” vermoedelijk omstreeks 1922 van Dr A. C. OUDEMANS ontvangen heeft en dat deze hem later meedeelde, dat het een wijziging van Faure's vloeistof was. WALCH (1922) zegt, dat Dr OUDEMANS zijn Acari conserveert in een mengsel, bestaande uit 10 dln ijsazijn, 30 dln glycerine en 60 dln 50% alcohol, dat hij de preparaten in glycerine-gelatine insluit en met sluitlak omrandt. WALCH heeft deze methode zelf niet beproefd, maar uit de tekeningen van OUDEMANS leidt hij af, dat de vloeistof zeer goede resultaten moet geven. Het zou dus mogelijk zijn, dat OUDEMANS door WALCH of WALCH's artikel op Faure's vloeistof is opmerkzaam gemaakt. De vloeistof was in 1922 reeds langer dan 10 jaar in gebruik en werd ook in sommige landen buiten Italië toegepast. De eerste vermelding van het gebruik van „Faure” in entomologische publicaties vond ik bij TEODORO (1911) en Foà (1912), nl. voor Cocciden en Aphiden (*Phylloxera*). In de werken over Acari van BERLESE en OUDEMANS kon ik geen aanwijzingen vinden over het door hen gebruikte insluitingsmiddel.

BOLLES LEE (1928) zegt, dat in het Brits Museum voor microscopische preparaten van kleine insecten een mengsel gebruikt wordt van de volgende samenstelling: Arab. gom 40 g, aqua dest. 50 cc, glycerine 20 cc, chloraalhydraat 50 g, en dat de oorsprong van dit insluitmiddel hem onbekend is. Blijkbaar is het een wijziging van Faure's vloeistof, waarin wat meer Arab. gom gebruikt wordt.

WALCH en BONNE-WEPSTER (1929) geven voor de „vloeistof van Berlese”, gebruikt bij het insluiten van Anophelinen-larven, hetzelfde recept aan, dat door WALCH in 1922 gepubliceerd werd. Omranden blijft te verkiezen, maar kan desnoods nagelaten worden, wanneer men 70 cc water in plaats van 100 cc neemt. SWELLENGREBEL en RODENWALDT (1932) verwijzen naar deze „für Anophelinenlarven umgearbeitete Methode von Berlese für den Einschluß zarter Insekten”. DOEKSEN (1941) gebruikte „Berlese” voor het insluiten van met melkzuur gemaceerde Thysanoptera en bedoelt daarmee het door ROEPKE (1928) gepubliceerde mengsel.

De heren G. L. VAN EYNDHOVEN, en D. HILLÉ RIS LAMBERS deelden mij mee, dat zij reeds sedert 20 jaar genoemd insluitmiddel gebruiken, resp. voor Acari en Aphiden. VAN EYNDHOVEN gebruikt een recept van Dr A. C. OUDEMANS (in litt. 29.III.1930) en sluit de preparaten af met bichroomaat-gelatine; het omranden wordt 2 x herhaald, maar is zelfs dan voor

dikkere preparaten nog niet ideaal. Zijn samenstelling wijkt af van die van HILLE RIS LAMBERS en zijn oudere preparaten (niet omrand) hebben erg geleden door indroging, zelfs wanneer de preparaten door verwarming goed hard waren geworden. HILLE RIS LAMBERS gebruikt een mengsel overeenkomende met dat van ROEPKE (1928), maar waarbij de hoeveelheid glycerine tot de helft verminderd is. Aanvankelijk omrandde hij met „Murrayite”, maar dit is overbodig, omdat de preparaten na ca. 3 maanden aan de rand voldoende gedroogd en gehard zijn. Zijn oudste preparaten zijn nog in uitstekende conditie. VAN EYNDHOVEN heeft veel tegenspoed gehad met „Murrayite”, vermoedelijk omdat bij de door hem gebruikte samenstelling de preparaten moeilijk drogen, zodat de gom in de „Berlese” zich niet verdraagt met de harsen in de „Murrayite”.

De heer HILLE RIS LAMBERS zond mij een uitvoerig artikel over de door hem gevolgde methode bij het prepareren van Aphiden voor microscopisch onderzoek, dat hij onlangs geschreven had en dat in het volgende nummer der Entom. Berichten verschijnen zal. Naar dit artikel moge ik verder verwijzen. De heer VAN EYNDHOVEN wees mij op de publicaties van OUDEMANS (1936), VITZTHUM (1943) en WOMERSLEY (1943), en verschaftte mij de daarin genoemde recepten voor het prepareren van Acari:

Uit het bovenstaande blijkt, dat het wenselijk is om preparaten, welke met de oorspronkelijke vloeistof van Faure gemaakt zijn, te omranden. Bij het gebruik van het recept-ROEPKE (1928) is dit noodzakelijk; dergelijke preparaten zijn volgens mijn ervaring na 1 jaar nog kleverig aan de rand van het dekglas. Bij het recept van HILLE RIS LAMBERS is het omranden niet meer nodig. Zelf heb ik na velerlei experimenten een vloeistof van Faure bereid, waarin de hoeveelheid glycerine nog verder gereduceerd is. De preparaten daarin zijn na een paar dagen droog aan de rand en sluiten zich zelf af evenals balsem-preparaten; zij kunnen enkele dagen later verticaal opgeborgen worden. Bij het samenstellen dezer vloeistof werd de oorspronkelijke bereidingswijze van FAURE gevolgd, maar in plaats van 40 cc glycerine slechts 25 cc genomen. Men lost in 10 cc water, 10 g chloraalhydraat (koud) op, voegt 2,5 cc glycerine toe en mengt goed. In deze vloeistof wordt 6 g Arab. gom (uitgezochte witte stukken) gebracht. Dagelijks wordt even geroerd (zeer voorzichtig, anders komen er luchtbelletjes in). Na ongeveer een week is de gom opgelost; filtreren is gewoonlijk niet nodig. Deze vloeistof, welke nu gedurende 1 jaar in gebruik is voor Cocciden-preparaten, voldoet (voor zo ver ik zie) even goed als de „Faure” bereid volgens het recept van ROEPKE of HILLE RIS LAMBERS.

Aanvankelijk meende ik, dat het chloraalhydraat (als „botanisch” bijmengsel) wel weg gelaten kan worden. Deze stof is vluchtig; kristallen van resp. 5, 5 en 6 mm bleken binnen 70 dagen geheel verdampt te zijn. Verder ontleedt het chloraalhydraat zich in het licht bij toetreding van lucht. Mengsels van gom en glycerine bleken echter niet te voldoen. Wanneer men alleen gomoplossing neemt voor de preparaten, blijkt de gom na drogen sterk te scheuren en neiging te hebben van het glas los te laten. Door toevoeging van 10% glycerine aan de gomoplossing wordt het scheuren voorkomen en hecht de gom zeer sterk aan het glas. Voegt men meer dan 15% glycerine toe, dan blijft het preparaat kleverig. Gomoplossing en gomoplossing met glycerine hebben de onaangename

eigenschap, dat ze belletjes onder het dekglas vormen, welke na enige dagen meestal in aantal en grootte toenemen. Zelfs bij toevoeging van 20 of 30% glycerine werd nog last van deze belletjes ondervonden. Wanneer men een voldoende hoeveelheid chloraalhydraat bijmengt, wordt de vorming van belletjes voorkomen. Een dikke gomoplossing met 10% glycerine bleek na toevoeging van 25 g chloraalhydraat per 100 cc reeds een bruikbaar insluitmiddel op te leveren. Preparaten daarmee gemaakt zijn na 1½ jaar nog in goede staat. Wanneer echter slechts 10—12 g chloraalhydraat werd toegevoegd per 100 cc gomglycerine, vertoonden de preparaten nog talrijke belletjes.

Chloraalhydraat werkt sterk antiseptisch. Het toevoegen van een cocaïne-verbinding, zoals FAURE deed, is dus overbodig, tenzij men cocaïne nodig acht als verdovingsmiddel bij bepaalde contractiele organismen.

De bovengenoemde recepten zijn ter wille van de overzichtelijkheid in onderstaande tabel samengevat. Opmerkelijk is, dat de acarologen (OUDEMANS, VITZTHUM, VAN EYNDHOVEN) zo veel chloraalhydraat in hun „Faure” gebruiken. Volgens VITZTHUM (1943) heeft BERLESE deze verbetering (? R.) het eerst aangebracht door in het oorspronkelijke recept de hoeveelheid chloraalhydraat te verviervoudigen.¹⁾ Naar ik vermoed, zal hierdoor de brekingsindex lager komen te liggen en zullen de objecten eerder doorschijnend worden, maar zal de houdbaarheid der preparaten geringer zijn.

Ten slotte wordt nog een tabel van de brekingsindices toegevoegd voor de ingrediënten van Faure's vloeistof en voor enige andere stoffen, die als insluitmiddel voor microscopische preparaten gebruikt worden (cijfers ontleend aan MAYER 1920 en KRAUSE 1926/27).

Samenstelling van Faure's vloeistof volgens verschillende recepten.

Recept van:	water	Arab. gom	glycerine	chloraalhydraat
FAURE (1910)	100 cc	60 g	40 cc	100 g
ROEPKE (1928)	100 „	60 „	63 „	100 „
WALCH en BONNE-WEPSTER (1929) ...	105 „	90 „	60 „	150 „
Brits Museum (BOLLES LEE 1928)	100 „	80 „	40 „	100 „
OUDEMANS (1936)	100 „	100 „	66.6 „	666 „
VITZTHUM (1943)	100 „	60 „	40 „	600 „
G. L. VAN EYNDHOVEN	100 „	150 „	60 „	600 „
D. HILLE RIS LAMBERS	100 „	60 „	32.5 „	100 „
A. REYNE	100 „	60 „	25 „	100 „

Brekingsindices

Water	1.333	Euparal (vloeibaar)	1.483
Arab. gom (vast)	1.514	Cederolie	1.504
Glycerine	1.473—	Cederolie (ingedikt)	1.515
	1.476	Venet. terpentijn (vast)	1.535—
Chloraalhydraat	1.42		1.542
Canadabalsem (vast)	1.547	Alcohol 100%	1.361
Canadabalsem (vloeibaar) ...	1.524	Glycerine-water, 1:1	1.40
Xylol	1.499	Glycerine-gelatine	1.407—
Euparal (vast)	1.535		1.447

¹⁾ In 1929 werd door VITZTHUM voor Acari nog het oorspronkelijke mengsel van FAURE (1910) aanbevolen; deze vloeistof was ook in de handel verkrijgbaar bij Grübler & Co te Leipzig (Tierwelt Mitteleuropas, 3: V 13).

Als regel kan men aannemen, dat voor ongekleurde preparaten van kleurloze chitine de brekingsindex beneden 1.5 moet blijven. Een glasstaaf, in de vloeistof geplaatst, moet duidelijk zichtbaar zijn.

Faure-preparaten bezitten tegenover balsem-preparaten het voordeel, dat ze veel vlugger te maken zijn, daar het omslachtige ontwateren en kleuren komt te vervallen. Door de lage brekingsindex zullen alle details zichtbaar zijn, terwijl in balsem-preparaten van kleurloze chitine, welke kunstmatig is gekleurd, door ongelijke verdeling der kleurstof sommige details gemakkelijk over het hoofd worden gezien. Gewoonlijk kleurt men met fuchsine (Magenta), opgelost in alcohol en differentieert met alcohol tot de kleurstof alleen tot de haren beperkt is. Belangrijke details van de cuticula, bijv. klierporiën van bepaalde structuur, welke de kleurstof niet hebben opgenomen, zijn in de balsem vrijwel onzichtbaar.

Verder is het mij opgevallen, dat in balsem-preparaten haren, welke van belang zijn voor de determinatie van het insect, niet zelden ontbreken. Vermoedelijk is dit toe te schrijven aan de xylol-behandeling, waardoor de chitine bros wordt en fijne haren afbreken en verloren gaan. Een voordeel van balsem-preparaten is zeker, dat zij zeer lang houdbaar zijn. Een met fuchsine gekleurd balsem-preparaat van *Trionymus perrisi* (Sign.), door MARCHAL in 1907 gemaakt, dat ik onlangs kon onderzoeken, was nog even goed als een vers gemaakt preparaat. Zelfs insecten, die enige millioenen jaren geleden in het fossiele hars barnsteen ingesloten werden, zijn vaak nog duidelijk herkenbaar. Voor zover de ervaring thans reikt, zullen goede Faure-preparaten zeker gedurende een mensenleeftijd bruikbaar blijven. Het gevaar van verweren der dekglazen lijkt mij groter toe dan van het bederven van het ingesloten insect.

Ten slotte zij nog opgemerkt, dat de vloeistof van Faure als insluitmiddel voor ongekleurde chitine-preparaten zeker verre te verkiezen is boven glycerine-gelatine, welke daarvoor tot in recente tijd veel gebruikt werd. De bereiding der vloeistof, zoals FAURE (1910) die aangeeft, is zeer eenvoudig en de preparaten kunnen in water gemakkelijk weer los geweekt worden, wanneer dit voor overmaken nodig is.

LITERATUUR.

- BOLLES LEE, A., 1928, *The Microtomist's Vademecum*. 9 ed. London.
 DOEKSEN, J., 1941, Bijdrage tot de vergl. morphologie der Thysanopteren. Diss. Wageningen.
 ELTRINGHAM, H., 1930, *Histological and illustrative methods for entomologists*. London.
 FAURE, G., 1910, Liquido conservatore per frammenti di organi e per piccoli organismi interi, *Annali di Botanica* 8: 63—64.
 FOÀ, A., 1912, In: B. GRASSI e.a., *Contributo alla conoscenza delle Filosserine*, Roma. p. LXXIV.
 FRANSSEN, C. J. H., 1927, *Aphis fabae Scop. en aanverwante soorten in Nederland*. Diss. Wageningen.
 IMMS, A. D., 1929, Some methods of technique applicable to entomology, *Bull. of entom. Research* 20: 165—171.
 KRAUSE, R., 1926—27, *Enzyklopädie der mikrosk. Technik*. Bd. I—III, 3te Aufl. Berlin-Wien.
 LANGÉRON, M., 1942, *Précis de microscopie*, 6e. ed. Paris.
 MAYER, P., 1920, *Zoomikrotechnik*. Berlin.
 OUDEMANS, A. C., 1936, *Archiv. f. Naturgesch.* Neue Folge 5 (3): 383.
 ROEPKE, W., 1928, Ueber die Anfertigung mikroskopischer Präparate von Blattläusen (Aphididen), *Anz. Schädlingskunde* 4: 160—161.
 SWAN, D. C., 1936, Berlese's fluid, remarks upon its preparation and use as a mounting medium, *Bull. of entom. Research*, 27: 389—391.

- SWELLENGREBEL, N. H. und E. RODENWALDT, 1932, Die Anophelen von Niederl. Ostindien, 3. Aufl. Jena.
- TEODORO, G., 1911, La secrezione della cera nei maschi della *Pulvinaria camelicola* Sign., *Redia* 7 : 352.
- VITZTHUM, H. GRAF, 1943, Acarina in : Bronns Klassen und Ordnungen des Tierreichs, 5 (IV) Buch 5 : 927—928, 931.
- WALCH, E. W., 1922, Over *Trombicula deliensis* n.sp., vermoedelijke overbrengster der pseudo-typhus, *Geneesk. Tijdschr. van Ned. Indië* 62 : 530—570.
- en J. BONNE-WEPSTER, 1929, Een eenvoudige en goede methode voor het insluiten van larven van Anophelinen, *Meded. van den Dienst der Volksgezondheid in Ned. Indië* 17 : 35—36.
- WOMERSLEY, H., 1943, A modification of Berlese's medium for the microscopic mounting of Acarina and other small Arthropods, *Trans. Roy. Soc. of South Australia* 67 : 181—182.

Summary.

Faure's fluid as a medium for microscopic mounts of small insects.

This medium has been used by Dutch entomologists for more than 25 years, first by WALCH (1922) who obtained the formula from NAGAYO in Japan under the name of Berlese's fluid. A modification of Faure's fluid (ROEPKE 1928) has been used since many years in the Entomological Laboratory of the Agricultural College at Wageningen and by other Dutch entomologists. It seems that this formula was communicated by the late Dr A. C. OUDEMANS to the laboratory at Wageningen soon after WALCH's publication of 1922.

Some other modifications of Faure's fluid are given in table I. It is remarkable that acarologists use a very large quantity of chloralhydrate (Cf. OUDEMANS, VITZTHUM, VAN EYNDHOVEN).

The present writer follows the original prescription of FAURE (1910) but uses less glycerine. (Dissolve 10 g chloralhydrate in 10 cc water, add 2.5 cc glycerine and mix. Add 6 g gum arabic, use clear, white lumps. Stir occasionally very cautiously — to avoid airbubbles —. Within a week the fluid is ready for use. All solutions are made in the cold. Filtering is not necessary). Preparations with this medium harden in a few days and can soon be stored vertically. If more glycerine is used, as in the formula of FAURE (1910) and ROEPKE (1928), the mounts dry very slowly and must be sealed.

Amsterdam-W. 1, Tesselschadestraat 22, November 1949.

Ruilrelaties. Dr H. WILCKE, Kössen (Tirol), no. 50, wenst van gedachten te wisselen over lichtvangst van Lepidoptera en Hollands materiaal te ruilen tegen Oostenrijks uit de Alpen, eventueel tegen roestvrije spelden.

Mr. Anton JELINEK, 3900 Diversey Avenue, Chicago 47, Ill., U.S.A., wenst Nederlandse Lepidoptera en „enige” Coleoptera te kopen of te ruilen.

Mr. Hiroshi INOUE, 290, Miyamae, Ôka-machi, Minami-ku, Yokohama, Japan, wenst Nederlandse Geometriden te ruilen tegen Japans materiaal. Corr. Engels. Aanbevolen, omdat onze Nederlandse collecties zeer weinig goed geëtiketteerd materiaal uit dit land bevatten.

Ik vertrouw er op, dat niemand zeer lokale Nederlandse soorten van het kaliber *arsilache-optilete* in series voor buitenlanders gaat vangen, daar ik alleen op deze voorwaarde verzoeken om ruil wil opnemen. — Lpk.