

Heft 3 95. Jahrgang Mai 2006

www.elsevier.de/mikrokosmos

ISSN 0026-3680



MIKROKOSMOS Herausgegeben von Klaus Hausmann (Berlin) v.i.S.d.P. Redaktionsassistentin: Renate Radek (Berlin)

Mitteilungsorgan für den Arbeitskreis Mikroskopie im Freundeskreis Botanischer Garten Köln, Arbeitskreis Mikroskopie im Naturwissenschaftlichen Verein zu Bremen, Berliner Mikroskopische Gesellschaft e.V., Deutsche Mikrobiologische Gesellschaft Stuttgart, Mikrobiologische Vereinigung im Naturwissenschaftlichen Verein zu Hamburg, Mikrobiologische Vereinigung München, Mikroskopische Gesellschaft Wien, Mikroskopische Arbeitsgemeinschaft der Naturwissenschaftlichen Vereinigung Hagen e.V., Mikroskopische Arbeitsgemeinschaft Hannover, Mikroskopische Arbeitsgemeinschaft Minfranken, Mikroskopische Arbeitsgemeinschaft Stuttgart, Mikroskopische Gesellschaft e.V.

Imhalt

Artikel		Rubriken
129	Lebenskünstler an Hauswänden und Baumrinden: Aeroterrestrische Mikroalgen Siegfried Hoc	132, 160 Nachrichten
133	Mikrotektonik – Die Verformung von Gesteinen im Dünnschliff betrachtet	144, 152, 172, 175, 186 Kurze Mitteilungen
	Jan Pleuger und Horst Wörmann	141, 187 Buchbesprechungen
145	Mikroskopische Analyse des Insektenabdomens am Beispiel der australischen Feldgrille <i>Teleogryllus commodus</i> <i>Robert Sturm</i>	142, 168 Aus der Industrie
153	Hoch gestapelt – tiefenscharf: Anwendung aktueller Software zur Verarbeitung von Bilderstapeln Gard Günthar	169 Mikro-Kids
161	Calciumoxalat-Kristalle in Pflanzen Teil 2: Entwicklung und Musterbildung	190 Aus den Arbeitsgemeinschaften
173	Ebernara Schnepf Raphidiophrys elegans – Ein Kolonie bildendes Sonnentierchen Bernd Walz	191 Mikro-Markt
176	Monochromatische Achsenbilder <i>Hinrich Husemann</i>	
183	Konkurrenz für Deckglas & Co. – Neue Methoden der Kombination von Zellkultur und Mikroskopie <i>Elias Horn</i>	

Im elektronischen MIKROKOSMOS-ARCHIV www.elsevier.de/mikrokosmos werden mit Erscheinen dieses Heftes drei Artikel über Methoden der Mikrophotographie aus dem Band 44 (1954/55) wiedergegeben.

Das jeweils neueste Inhaltsverzeichnis können Sie jetzt auch kostenlos per e-mail (ToC Alert Service) erhalten. Melden Sie sich an: www.elsevier.de/mikrokosmos

Indexed in: Bibliography and Index of Geology (also known as GeoRef)/Biological Abstracts/Chemical Abstracts/Excerpta Medica/Scopus/Zoological Records

Mehr Informationen zum MIKROKOSMOS und anderen Zeitschriften finden Sie im Internet: www.elsevier.de

Umschlagabbildung: Mylonit aus der Aduladecke, polarisiert mit Lambdaplatte. Siehe Artikel J. Pleuger und H. Wörmann, S. 133–141.

Lebenskünstler an Hauswänden und Baumrinden: Aeroterrestrische Mikroalgen

Siegfried Hoc

Jeder hat schon die grünen, manchmal rotbraunen oder gelblichen, oft gesprenkelten Anflüge an verschiedenen Unterlagen im Freien wahrgenommen. Unter dem Mikroskop entpuppt sich dieser Belag als winzige Grünalgen. Taxonomisch gehören sie verschiedenen Arten, Gattungen und Familien an, und sie sind nach morphologischen Merkmalen sehr schwer oder gar nicht zu bestimmen. Nur eine sehr gute Mikroskopoptik und Mikrotechnik können helfen, wenige Formen taxonomisch einzuordnen. Erst in der Kultur gewachsen, offenbaren viele dieser Mikroalgen ihre morphologischen Eigenheiten. Von den zahlreichen Arten sollen hier nur wenige, mikroskopisch gut unterscheidbare Arten vorgestellt werden.

assaden, Mauern und Dachbedeckungen aller Art, Holzplanken und -pfähle sowie die Rinde von Laubbäumen, ja sogar Kunststoffplatten im Freien, zeigen regelmäßig einen Algenbelag, der nicht selten so mächtig ist, dass man von einer so genannten Biokruste spricht. Vor allem die Wetterseite der Gebäudewände und Mauern, also die Nord/Nordost- und die West/Nordwest-Seite sind in der Regel mit den Algenanflügen geschmückt. Und besonders betroffen sind Wärme gedämmte Hausfassaden, denn infolge der reduzierten Wärmeabgabe trocknen die Außenwände langsamer ab, und es kann sich ein Feuchtigkeitsfilm lange halten. Auch die niedrige Wärmespeicherfähigkeit der verwendeten Dämmmaterialien trägt dazu bei: Durch Abkühlung in der Nacht unter die Lufttemperatur kann sich Tauwasser bilden. Der Feuchtigkeitsfilm ist nämlich ein ökologischer Schlüsselfaktor für die Besiedlung mit aeroterrestrischen Mikroalgen. In der Literatur werden sie auch als aerophile Algen bezeichnet.

Für die Bauwirtschaft können die Mikroalgen zum Problem werden, denn sie verursachen auch Biokorrosion. Sie scheiden organische Säuren aus und überführen Metallionen wie Calcium- und Magnesiumionen in Komplexverbindungen, die leicht löslich sind. Die Verwitterung wird dadurch beschleunigt.

Feucht und trocken, heiß und kalt

Die aeroterrestrischen Mikroalgen sind extremen Lebensbedingungen ausgesetzt, von Regennässe bis völliger Trockenheit, von frostiger Kälte bis hohen Temperaturen. Nicht selten beträgt an exponierten Standorten die über das Jahr gemessene Temperaturdifferenz mehr als 50 °C. Die Energiequelle der assimilierenden Algen ist zwar das Sonnenlicht, ein Überangebot an Sonnenstrahlen kann aber auch zu einer Blockade der Photosynthese führen und den Photosyntheseapparat sogar schädigen. Es sind vor allem die UV-B-Strahlen (280 bis 315 nm), die dafür verantwortlich sind. Sie können Wachstum und Reproduktion der Algen zum Erliegen bringen.

Hohe Biodiversität

Schabt man von einem der grünen Anflüge etwas ab, schwemmt das Material in Wasser auf und betrachtet diese Suspension unter dem Mikroskop, so wird man in der Mehrzahl der Proben die Grünalge *Apatococcus lobatus* (Abb. 1) vorliegen haben. Früher wurde diese Art unter dem Gattungsnamen *Pleurococcus* geführt. Typisch für diese Alge sind die meist aus vier Zellen bestehenden Zellpakete. Genetische Analysen haben gezeigt, dass es sich aber nicht nur um eine Art, sondern um mehrere Arten handelt, und auch die Gattung *Desmococcus* beteiligt ist. Morphologisch sind die einzelnen Arten aber nicht zu differenzieren.

Findet man in der *Apatococcus*-Aufschwemmung fadenförmige Grünalgen, so handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um eine Art der Gattung *Klebsormidium*. Auffällig sind die zum Schutz vor Austrocknung stark verdickten Zellwände (Abb. 6).

Jeder, der sich mit Algen beschäftigt, denkt beim Anblick von grünen, kugeligen Algenzellen zunächst an *Chlorella*. Darunter ist *Chlorella vulgaris* die Mikroalge schlechthin. In diese Gruppe gehören aber mehrere Gattungen und viele Arten, die sich morphologisch durch Gestalt (kugelig, ellipsoid, eiförmig) und durch Form und Anordnung ihres Chloroplasten geringfügig unterscheiden. So spricht man von Morphotypen. Neben *Chlorella*, wie *C. angustoellipsoidea* (Abb. 3) und *C. luteoviridis* (Abb. 4) gehört auch die kokkale Grünalgen-Gattung *Coccomyxa* (Abb. 2) hier hinein. Ihre Zellen sind oft mit einer zarten Gallerthülle ausgestattet.



Abb. 1–7: Aeroterrestrische Mikroalgen (Grünalgen). Abb. 1: Apatococcus lobatus. – Abb. 2: Coccomyxa. – Abb. 3: Chlorella angustoellipsoidea. – Abb. 4: Chlorella luteoviridis. – Abb. 5: Coenocystis. – Abb. 6: Klebsormidium mit stark verdickten Zellwänden. – Abb. 7: Trebouxia mit sternförmig gelappten Chloroplasten (Abb. 6 und 7 aus Kasten et al., 2005).

Eine weitere häufige aeroterrestrische Mikroalge ist *Stichococcus*. Ihre tonnenförmigen Zellen können sich zu Zellfäden aufreihen. Immer wieder findet man auch die relativ großen kugeligen Zellen der Gattung *Trebouxia* mit ihren sternförmig gelappten Chloroplasten (Abb. 7) und die ellipsoiden Zellen von Arten der Gattung *Coenocystis* (Abb. 5). Das Besondere der Trebouxiales ist ihr Hang zur Symbiose mit Pilzen. *Trebouxia* ist die häufigste Flechtenalge. In Flechten ist sie der Symbiosepartner von Ascomyceten und liefert als Photobiont die Assimilationsprodukte.

Kulturverfahren und Mikroskopie

Die wenigen und schlecht erkennbaren morphologischen Merkmale der nur einige Mikrometer großen aeroterrestrischen Mikroalgen, von denen viele Gattungen bekannt sind, aber noch viele mehr vermutet werden, werden meistens nur in Kultur charakteristisch ausgeprägt und sind erst dann auch mikroskopisch erkennbar. Starke Vergrößerungen mit einem hoch auflösenden und kontraststarken, 60fachen Objektiv (Apochromat) oder mit Ölimmersions-Objektiven und Differentialinterferenzkontrast-Verfahren sind dabei hilfreich. Als Kulturmedium verwende ich ein schräg in einem Reagenzglas erstarrtes Agarmedium, das auf 40 g Agar-Agar 1 Liter Mineralsalzlösung enthält. Diese setzt sich zusammen aus 11 bidestilliertem Wasser, 100 mg Kaliumbiphosphat (KH₂PO₄), 10 mg Calciumchlorid (CaCl₂), 40 mg Magnesiumsulfat (MgSO₄ + 7 H_2O), 15 mg Kochsalz (NaCl) und 4 mg Eisenchlorid (FeCl₃ + 6 H_2O). An Vitaminen werden 1 mg Cobalamin (Vitamin B12), 2 mg Biotin und 20 mg Vitamin B₁ (Thiamin-HCl) zugesetzt. Um den Kulturboden herzustellen, löst man die 40 g Agar-Agar in einem Liter der Lösung durch Erhitzen in einem Dampftopf auf. Von dem flüssigen Substrat gießt man jeweils soviel in sterilisierte (im Backofen bei 200 °C erhitzte) Reagenzgläser, dass rund ein Drittel des Röhrchens gefüllt ist. Man verschließt mit einem ebenfalls im Backrohr sterilisierten Wattepfropfen und lässt in Schräglage den Agarboden erstarren, so dass eine mehrere Quadratzentimeter große Fläche entsteht. Auf diese Fläche werden die zu kultivierenden Algen mit einer durch Ausglühen mit einem Spiritusbrenner sterilisierten Drahtöse aufgebracht. Ideal dafür ist eine Platindrahtöse (Impföse), wie sie in der Bakteriologie verwendet wird. Direktes Sonnenlicht und zu helles Licht ist den Kulturen nicht zuträglich. Am besten gedeihen sie, leicht abgeschirmt, an einem Nordfenster.

Dank

Ich danke Herrn Prof. Dr. Thomas Friedl (Albrechtvon-Haller-Institut, Abteilung Experimentelle Phykologie und Sammlung von Algenkulturen, Universität Göttingen, Untere Karspüle 2, 37073 Göttingen) für die Algenkulturen mit determinierten Mikroalgen. Die Mikroaufnahmen stellte Josef Häckl, Brucker Straße 15A, 82275 Emmering, her.

Literaturhinweise

- Ettl, H., Gärtner, G.: Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1995.
- Friedl, Th.: Die Systematik und Stammesgeschichte der Grünalgen – Eine Herausforderung für die Molekularbiologie. BiuZ 28, 246–258 (1998).
- Friedl, Th.: Systematics of green lichen phycobionts: phylogenetic analysis of ribosomal RNA coding regions. J. Phycol. Suppl. 31, 4 (1996).
- Friedl, Th.: Systematik und Biologie von *Trebouxia* als Phycobiont der Parmeliaceae. Inaugural-Dissertation, Bayreuth 1989.
- Gärtner, G.: Zur Taxonomie aerophiler grüner Algenanflüge an Baumrinden. Berichte des naturwissenschaftlich-medizinischen Vereins Innsbruck 81, 51–59 (1994).
- Kasten, U., Schumann, R, Häubner, N., Friedl, Th.: Lebensraum Fassade: Aeroterrestrische Mikroalgen. BiuZ 35, 20–30 (2005).
- Kremer, B. P.: Grüne Algen auf Baumrinden Ausgedehntes Problem. Mikrokosmos 87, 25–28 (1998).
- Kremer, B. P.: Rindenbewohnende Grünalgen Leben in Licht und Luft. Mikrokosmos 86, 135–141 (1997).

Verfasser: Dipl. Biol. Siegfried Hoc, Mikrobiologische Vereinigung München e.V., Donaustraße 1a, 82140 Olching

Naghright

11. Internationale Mikroskopie-Tage vom 3. bis 5.11.2006 in Hagen

Mit der 10. Tagung ist Schluss ..., hatten Gerhard Göke, Jürgen Stahlschmidt und Andreas Koch, die Veranstalter der Mikroskopie-Tage in Hagen, beschlossen. Es kam dann aber alles ganz anders: Gerhard Göke erlebte nach schwerer Krankheit die Veranstaltung in 2004 leider nicht mehr und am Ende der 10. Mikroskopie-Tage bedrängten mich die zahlreichen Teilnehmer und ließen mir keine andere Wahl, als die Durchführung der 11. Mikroskopie-Tage zu versprechen. Somit ergibt sich in diesem Jahr eine weitere, stolze Jubiläumszahl: "20 Jahre Mikroskopie-Tage in Hagen" vom 3. bis zum 5. November 2006.

Wieder ist es gelungen, namhafte ausstellende Firmen und fachlich hervorragende Referenten für die Veranstaltung zu gewinnen und so ein interessantes Programm zu gestalten. Der Themenrahmen ist wie immer breit gefächert und folgt weiter der Idee der Veranstaltungsgründer, Mikroskopiker unabhängig von ihrem Fachgebiet einzuladen und ihnen im Umgang mit dem Mikroskop und seinen Nebenapparaten sowohl Grundlagen als auch neueste Entwicklungen auf dem Gebiet der Mikroskopie näher zu bringen. Zwischenzeitlich wurde der Themenrahmen um präparative Methoden der Planktologie und verwandte Gebiete erweitert.

Wir hoffen, dass wir die Zahl von 160 Teilnehmern aus Deutschland, den Niederlanden, Frankreich, der Schweiz und Österreich in diesem Jahr wieder erreichen, vielleicht sogar steigern. Ständig gestiegene Teilnehmerzahlen sprachen bisher für das Konzept.

Wie seit vielen Jahren findet die Veranstaltung auch diesmal wieder im Stadtzentrum von Hagen im Saal und Foyer der Südwestfälischen Industrie- und Handelskammer zu Hagen statt. Dieser Tagungsort ist vom Hauptbahnhof aus in wenigen Gehminuten zu erreichen, und alle öffentlichen Nahverkehrsmittel halten in unmittelbarer Nähe.

Die Tagungsgebühr liegt mit 85 Euro – bei frühzeitiger Anmeldung 70 Euro – weit unter dem üblichen Standard vergleichbarer Tagungen, da nur eine reine Kostendeckung erreicht werden soll. Neben den Profis wollen wir auch den ernsthaften außerberuflichen Mikroskopikern ermöglichen, die Veranstaltung mit vertretbarem Kostenaufwand zu besuchen. Die Wochenendlage unserer Veranstaltung ist ebenfalls eine Konzession an den Teilnehmerkreis. Selbstverständlich erhalten alle Teilnehmer die (heiß begehrte) umfangreiche Tagungsmappe mit Informationen und Beiträgen der Referenten. Zwischenzeitlich wurde von den Vorträgen der zurückliegenden Mikroskopie-Tage eine CD erstellt, die vor Ort käuflich zu erwerben sein wird.

Ein Programmpunkt, den die Teilnehmer immer wieder besonders schätzen, ist der Tagesausklang freitags und samstags in geselliger Runde. Hier bieten sich die Möglichkeiten persönlicher Kontaktaufnahme und die Vertiefung der Fachfragen mit Teilnehmern und Referenten.

Die Veranstalter hoffen auf eine rege Teilnahme und freuen sich schon auf die gemeinsamen Stunden. Das Programm und die Anmeldebedingungen können im Internet unter www.mikroskopie-hagen.de eingesehen werden oder bei Herrn Andreas Koch, Ruhrallee 16, 58313 Herdecke, Tel./Fax: 023 30/91 61 10 angefordert werden.

Jürgen Stahlschmidt, Naturwissenschaftliche Vereinigung Hagen e.V.

Mikrotektonik – Die Verformung von Gesteinen im Dünnschliff betrachtet

Jan Pleuger und Horst Wörmann

Die mikroskopische Betrachtung von Gesteinsdünnschliffen ist eine für Strukturgeologen und Petrologen unverzichtbare Methode, Aufschlüsse über Mineralinhalt, genetische Beziehungen der einzelnen Mineralphasen und deren Verhalten während der strukturellen Entwicklung des Gesteins zu erlangen.

m folgenden Beitrag soll an Beispielen aus der Untersuchung alpiner Gesteinsformationen gezeigt werden, wie sich die Verformung von Gesteinen aus mikroskopischen Beobachtungen erschließen lässt.

Geologische Übersicht

In der Umgebung des Passo del San Bernardino (Graubünden, Schweiz) sind in enger Nachbarschaft verschiedenste metamorphe Gesteine aufgeschlossen (Pleuger et al., 2003; Abb. 1). Die West- und Zentralalpen sind das Ergebnis einer Annäherung und schließlichen Kollision der europäischen und der adriatischen Platte. In der Oberkreide (vor etwa 100 Millionen Jahren) wurden Europa und Adria durch einen Ozean getrennt. Dieser Ozean enthielt noch eine kleine kontinentale Insel, den Briançonnais-Mikrokontinent, der wahrscheinlich ein nordöstlicher Ausläufer des iberischen Kontinents war. Sukzessiv wurden die nördlicheren Einheiten unter die im Süden befindliche adria-

Abb. 1: Tektonische Übersichtskarte der östlichen Zentralalpen, verändert nach Spicher (1980). Die Koordinatenangaben im Rahmen beziehen sich auf das Schweizer nationale Koordinatensystem, die gestrichelten Linien zeigen den ungefähren Verlauf des Profils (Abb. 2) an. CB Straße Chur–Bellinzona – Lugano, NB Spur der Faltenachsenebene der Niemet-Beverinfalte.

Mikrokosmos 95, Heft 3, 2006 www.elsevier.de/mikrokosmos

Abb. 2: Geologisches Profil nach Schmid et al. (1996) zu Abbildung 1. Der Profilverlauf ist Abbildung 1 (gestrichelte Linien im Rahmen) zu entnehmen. NB Faltenachsenebene der Niemet-Beverinfalte.

tische Platte subduziert. Teile der betroffenen kontinentalen und ozeanischen Einheiten wurden als tektonische Decken von der versinkenden Platte abgeschert und an die Front der adriatischen Platte angelagert. Daher sind die Decken von oben nach unten gemäß ihrer ursprünglichen geographischen Position von Süden nach Norden gestapelt (Abb. 2).

Im hier vorgestellten Gebiet vertritt die Tambodecke mit Para- und Orthogneisen das Brianconnais, darunter folgen in der Misoxer Zone Gneislamellen und Metasedimente, deren Herkunft ebenfalls im Brianconnais zu suchen ist, hauptsächlich aber kreidezeitliche Sedimente und Metabasalte des ursprünglich nördlich des Brianconnais gelegenen nordpenninischen Ozeans. Zuunterst liegt die vom äußersten europäischen Kontinentalrand stammende Aduladecke, die überwiegend von Para- und Orthogneisen aufgebaut wird, aber auch Marmorlinsen, metamorphe Basalte (teilweise als Eklogit) und Peridotit, das Hauptgestein des Erdmantels, enthält. Die Deckenstapelung und nachfolgende Verfaltung dieser Einheiten fand im Wesentlichen vor etwa 50 bis 30 Millionen Jahren (mittleres Eozän bis unteres Oligozän) statt.

Alle Einheiten haben im Laufe der Plattenkollision mehrere Deformationsphasen erfahren (Schmid et al., 1996; Pleuger et al., 2003). Ab etwa 50 Millionen Jahren vor heute (Ma v.h.) wurde in der Tambodecke während der ersten Deformationsphase, der Ferreraphase, eine durchgreifende Schieferung angelegt. Diese Schieferung entstand durch nordvergente Scherbewegungen, das heißt, jeweils höhere Partien des Deckenstapels bewegten sich bezüglich tieferer nach Norden. Die Schieferung der Ferreraphase ist auch in der Misoxer Zone stark ausgeprägt und verläuft dort parallel zu den lithologischen Grenzen. Gleichzeitig wurden die Gesteine isoklinal verfaltet; das bedeutet, dass die

Schenkel einer Falte ungefähr parallel zueinander sind. Die Schieferung der Ferreraphase lässt sich bis in die Aduladecke verfolgen, wo sie ebenfalls das dominante Strukturelement ist und parallel zu den lithologischen Grenzen verläuft. Obwohl sich also makroskopisch die Strukturen der drei Einheiten (Tambodecke, Misoxer Zone, Aduladecke) weitgehend gleichen, beweisen radiometrische Altersdatierungen und petrologische Untersuchungen, dass die Aduladecke eine von den darüber liegenden Einheiten sehr verschiedene Entwicklung genommen hat: Die höchsten Drücke wurden erst etwa 40 Ma v.h. erreicht und liegen zwischen 12 kbar im Norden und 32 kbar im Süden, die etwa 110 km Tiefe entsprechen. Sie übersteigen die von der Tambodecke maximal erreichten 12 kbar bei weitem. In der Aduladecke führten die nordvergenten Scherbewegungen (hier Zapportphase genannt) zu einer Exhumierung (Hebung bezüglich der Geländeoberfläche) bis zu etwa 7 kbar, entsprechend ungefähr 25 km Tiefe. Erst in späten Stadien der Ferrera- und Zapportphase nahmen also Tambodecke, Misoxer Zone und Aduladecke unmittelbar übereinander Platz und vereinigten sich in einer einzigen nordvergenten Scherzone.

Ab etwa 35 Ma v.h. wurden die nordvergenten Bewegungen durch eine ostvergente Scherung abgelöst (Niemet-Beverinphase), die zu einer großräumigen Rückfaltung der nordpenninischen Einheiten um die nördliche Stirn der Tambodecke führten (Abb. 2). Die Intensität der Deformation verklingt allerdings nach unten, so dass in der Aduladecke makroskopisch keine Spuren der Niemet-Beverinphase zu erkennen sind.

Spätere Deformationen beschränken sich auf moderate, kleinskalige Faltungen, von denen die Geometrie des Deckenstapels kaum verändert wurde, sowie die Anlage spröder Verwerfungen.

Zur Orientierung der Proben

Aus dem strukturellen Inventar eines Gesteines lassen sich die Geometrie der Verformung ebenso wie die Richtungen von Einengung und Streckung ableiten. Im Falle der hier besprochenen Proben ist - zumindest im Maßstab eines Handstückes oder Dünnschliffes - das Gestein meist ungefaltet. Verkürzung und Streckung der Gesteine sind fast ausschließlich durch plastische Zerscherung entstanden, während der überwiegende Teil des Mineralbestandes rekristallisiert ist. Solche Gesteine nennt man Mylonite. Alle hier besprochenen Mylonite zeigen auf der senkrecht zur Einengungsrichtung angelegten Schieferung eine durch eingeregelte Mineralkörner oder Kornaggregate gebildete Lineation, die in Streckungsrichtung der Scherung orientiert ist (Abb. 3). Die Bestimmung des Schersinnes geschieht anhand bei der Scherung ebenfalls entstandener asymmetrischer Mikrostrukturen, daher sind alle Schliffe parallel zur Streckungslineation und senkrecht zur Schieferung (Abb. 4) geschnitten. Um die Dünnschliffbefunde zu einer regionalen Rekonstruktion der kinematischen Entwicklung zusammenfassen zu können, sind in allen Fällen die geographische Orientierung von Schieferung und Streckungslineation mit dem Kompass eingemessen und auf den Handstücken markiert worden.

Präparation der Dünnschliffe

Die Dünnschliffe sind in konventioneller Weise präpariert worden. Mit einer Diamanttrennscheibe sind aus den Handstücken Klötzchen mit einer Grundfläche von in der Regel etwa 45×25 mm herausgeschnitten worden. Auf den Oberseiten wurden die geographischen Orientierungen markiert. Unterseits wurden die Klötzchen mit Siliziumkarbidpulver feiner Körnung angeschliffen und anschließend mit einem Zweikomponenten-Epoxydharz (Araldit) auf die 48 × 28 mm großen Objektträger geklebt. Nach Übernehmen der Orientierungsmarkierungen wurde jeweils der Hauptteil des Klötzchens möglichst dicht entlang des Objektträgers abgeschnitten. Die Präparate wurden anschließend mit einer Flächenschleifmaschine bis zu einer Dicke von etwa 70 µm, alsdann auf Glasplatten mit Siliziumkarbidpulver in schrittweise verringerter Körnung per Hand bis auf etwa 25 um abgeschliffen. Die Kontrolle der

Abb. 3: Blick auf eine während der Zapportphase angelegte Schieferungsfläche in einem Kalifeldspat-Augengneis der Aduladecke nahe des Passo del San Bernardino. Die deutliche Streckungslineation verläuft auf der Schieferung von links unten nach rechts oben.

Abb. 4: Schematische Darstellung zur Orientierung der Handstücke und der Dünnschliffe. Im Gelände werden geeignete Strukturelemente, meistens Schieferung und Streckungslineation, mit dem Kompass eingemessen. x, y und z sind die Hauptachsen der Verformung; x ist die Richtung der größten Streckung, z die Richtung der stärksten Verkürzung; y ist die intermediäre Richtung, die senkrecht auf x und z steht. Die Dünnschliffe werden im Allgemeinen parallel zur Streckungslineation (x) und senkrecht zu Schieferung (x-y-Ebene = Ebene senkrecht zu z) geschnitten, also in der x-z-Ebene.

Schliffdicke erfolgte dabei anhand der Interferenzfarben bestimmter Minerale, hauptsächlich Quarz und Hellglimmer. Schließlich wurden mit UV-Kleber (Loctite) Deckgläschen auf die Präparate aufgebracht.

Aufnahme der Präparate

Die Befunde wurden mit einem Zeiss Axioskop mit der Kamera MRc5 dokumentiert. Mit einem Objektiv Neofluar 2,5×/0,075 und einem Kameraadapter 0,63× lassen sich Gesichtsfelder von maximal 5,3 mm \times 4 mm aufnehmen, größere Flächen werden mit dem vorhandenen Gerät nicht ausgeleuchtet. Von Bild übergreifenden Objekten wurden deshalb bis zu sieben überlappende Einzelbilder angefertigt, die mit dem Panorama-Programm Panavue® (Lange, 2003) zu einem hoch auflösenden Übersichtsbild pixelgenau zusammengesetzt wurden. Leider können die beschriebenen Strukturen bei der Umsetzung der Farbbilder in druckgeeignete Graubilder nicht mehr so gut anhand ihrer Farbabstufungen erkannt werden. Die Selbstherstellung von Schliffen (Schrodt, 2002) und die eigene Beobachtung im Mikroskop ist deshalb immer lohnend.

Mikrostrukturelle und petrologische Betrachtung der Dünnschliffe

Die hier beschriebenen Dünnschliffpräparate zeigen die mikrostrukturellen und lithologischen Eigenarten der wichtigsten im Bereich des Passo del San Bernardino anstehenden Deckenkomplexe. Alle hier besprochenen Proben aus der Aduladecke zeigen makroskopisch ausschließlich das strukturelle Inventar der Zapportphase. Diese Verformung fand während der Exhumierung der Gesteine aus der Eklogitfazies (im Probennahmegebiet ca. 20 kbar/ 600 °C) durch die Amphibolitfazies bis in die höhere Grünschieferfazies (ca. 7 kbar/450 °C) unter nachlassenden Metamorphosebedingungen statt. Infolge der gründlichen Mylonitisierung sind jedoch fast ausschließlich die zuletzt in der Grünschieferfazies angelegten Strukturen erhalten.

Die Probe A45 (Abb. 5) ist ein sehr aluminiumreicher Metapelit mit den Aluminium betonten Mineralphasen Disthen und Staurolith (Al₂[O/SiO₄] bzw. (Fe,Mg)₂Al₉[O₄(O,OH)₄/ ((Si,Al)O₄)₄]). Granat ist in zwei Generationen im Dünnschliff zu erkennen. Die Umrisse von Mineralkörnern können unterschiedlich sein. Die Begriffe xenomorph und hypidiomorph beschreiben den Umriss eines Mineralkorns, das gar nicht, beziehungsweise nur zum Teil, von kristallographisch charakteristischen Flächen begrenzt ist (wie idiomorphe Kristalle). Der ersten Generation gehören bis Millimeter große xenomorphe Körner (a) an, die vor der Zapportphase, womöglich gar präalpin entstanden sind. Kleinere, hypidiomorphe Körner (b) gehören zur zweiten Generation. Sie sind deutlich zonar gebaut, wobei die einschlussfreien Säume in Streckungsrichtung stärker entwickelt sind, entweder, weil die Granatkörner synkinematisch (während einer Verformung) gewachsen sind, eher aber, weil der retrograde Abbau von Granat zugunsten von Staurolith und Biotit (in sehr geringem Maße auch Chlorit) während der Zapportphase jenen bevorzugt entlang der Einengungsrichtung angriff. Weitere Hauptgemengteile sind neben Quarz (c), Hellglimmer (d, wahrscheinlich teilweise Paragonit, NaAl₂[(OH)₂/Si₃AlO₁₀]) und Disthen (e), die beide streng in die Schieferung eingeregelt sind. Der Disthen ist randlich ebenfalls retrograd etwas korrodiert, metastabil jedoch in großem Maße vorhanden und verhält sich während der Deformation passiv, ist also präkinematisch (vor einer Verformung gebildet). Staurolith (f) ist an seiner oft fast idiomorphen Kornform als spätkinematisches Produkt zu erkennen. Ebenso wie einige der Biotitkörner überwächst er den Granat. Dank der großen Variabilität der Mineralparagenesen in Metapeliten lassen sich aus diesen Beziehungen zwischen den beschriebenen Mineralen und den Strukturen der Zapportphase deren Druck- und Temperaturbedingungen für Probe A45 recht eng eingrenzen. Da sich der unterhalb etwa 7 kbar zu erwartende Abbau von Paragonit zu Plagioklas gemäß der qualitativen Reaktion Paragonit + Granat + Quarz \rightarrow Plagioklas + Staurolith + H₂O nicht vollzog, sind 7 kbar als Druckminimum anzunehmen. Der Abbau von Staurolith zugunsten von Chloritoid (Staurolith + Granat + $H_2O \rightarrow$ Chloritoid + Quarz) fand ebenfalls nicht statt, hingegen ersetzt Chlorit in geringem Umfang Biotit (Granat + Biotit + $H_2O \rightarrow$ Hellglimmer (Muskowit) + Chlorit + Quarz). Dies muss bei Temperaturen um 500 °C und Drücken erwartet werden, die die oben als Minimum angenommenen 7 kbar nicht wesentlich überschreiten (Nagel et al., 2002).

Unter den gleichen Bedingungen bildete sich das Gefüge der Probe A48 (Abb. 6). Das Gestein besteht ganz überwiegend aus Quarz, daneben aus Hellglimmer und retrograd größtenteils zu Chlorit umgewandeltem Granat. Die streng eingeregelten Hellglimmerkristalle bilden die Schieferungsebene des Gesteins. Infolge dynamischer

Abb. 5: Probe A45. Metapelit aus Quarz, Hellglimmer und Granat. a Größere, xenomorphe Granatkörner der ersten Generation; b Kleinere, hypidiomorphe Granatkörner der zweiten Generation; c Quarz; d Hellglimmer; e Disthen; f Staurolith. Plan-Neofluar 2,5×/0,075, Hellfeld. Längere Bildkante 5,32 mm.

Rekristallisation zeigt auch das Quarzgefüge eine deutliche Regelung. Die mittelbare Ursache dafür ist, dass sich die intrakristalline Deformation in Quarzkristallen nur gemäß weniger verschiedener Gleitsysteme vollziehen kann, die jeweils durch eine bestimmte kristallographische Gleitfläche und -richtung definiert sind. Welche dieser Gleitsysteme aktiv sind, hängt von verschiedenen Einflussgrößen ab, im Wesentlichen aber von der Temperatur. Die Scherverformung quarzreicher Mylonite wird besonders von denjenigen Kristallen aufgenommen, die hinsichtlich der unter den gegebenen Bedingungen aktiven Gleitsysteme günstig orientiert sind. Bei der dynamischen Rekristallisation wachsen diese Kristalle entweder durch Korngrenzenwandern auf Kosten weniger günstig orientierter Körner, oder es bilden sich in größeren Körnern Subkörner, die zunehmend in eine verformungsgeeignete Lage rotieren.

In Probe A48 (Abb. 6) sind verschiedene Anzeiger der dynamischen Rekristallisation während der Zapportphase zu erkennen:

- Die relativ homogene Korngröße von Quarz (a) ist hauptsächlich die Folge des Korngrenzenwanderns. Die Korngrenzen verlaufen einerseits vorzugsweise parallel zur Schieferung, andererseits aber, wahrscheinlich vor allem dank des zusätzlichen Einflusses von Subkornrotation, von links oben nach rechts unten.
- Viele der Quarzkörner löschen als Folge der intrakristallinen Verformung ungleichmäßig (undulös) aus.
- Schließlich sind die überwiegend mittelgrauen Interferenzfarben des Quarz auf eine starke Vorzugsorientierung der kristallographischen Achsen und diese wiederum auf das oben beschriebene Wirken der Gleitsysteme zurückzuführen.

Abb. 6: Probe A48. Mylonit aus der Aduladecke. Links ist Nordwesten (338°). Quarz-Grundmasse (a) mit zwei randlich chloritisierten Granat-Porphyroklasten (b). Bei der Scherung wurden im Bild oben liegende Partien nach links verschoben (linkssinniger Schersinn). Plan-Neofluar 2,5/0,075. Längere Bildkante 5,32 mm. Polarisationsfilter, Polarisator um 30° aus der Kreuzstellung gedreht, Lambdaplatte.

Abb. 7: Probe A120. Rechts ist Nordwesten (296°). Scherbänder (a) versetzen die Hauptschieferung (b) in einem Mylonit (rechtssinniger Schersinn). Längere Bildkante 7,73 mm. Plan-Neofluar 2,5×/0,075. Hellfeld. Zusammengesetzt aus vier Einzelbildern.

Sowohl die kristallographische Vorzugsorientierung als auch die der Korngrenzen im Sinne einer schrägen Foliation zeigen an, dass die Scherung linkssinnig war, das ist in geographischen Koordinaten nordnordwestvergent. Dieser Schersinn wird durch zwei im Bildausschnitt erkennbare asymmetrische Granatporphyroklasten (präkinematische, größere Mineralkörner in einer verformten feineren Grundmasse; b) bestätigt, die nun allerdings retrograd fast vollständig zu Chlorit umgewandelt sind. Im Gegensatz zum Quarz verhielt sich der Granat verformungsresistent und rotierte daher passiv. Aus Schichtsilikaten bestehende Fortsätze der Porphyroklasten parallel zur Schieferung sind als Folge eines komplexen Fließmusters um die Porphyroklasten asymmetrisch ausgebildet; in Fällen wie hier linkssinniger Scherung läuft jeweils der linke Fortsatz in einem höheren Niveau aus als der rechte.

Neben asymmetrischen Porphyroklasten sind vor allem Scherbänder als zuverlässige Schersinnindikatoren wichtig. Sie entwickeln sich besonders in glimmerreichen Myloniten, also vorzugsweise in Paragneisen. Scherbänder sind kleine Abschiebungen, an denen sich zumeist während später Stadien einer mylonitischen Verformung die Scherung lokalisiert. Die Aufnahme von Probe A120 (Abb. 7) zeigt mehrere dieser Scherbänder (a), die, da die Scherung rechtssinnig war, von links oben nach rechts unten verlaufen. Die beiden größten sind im linken unteren Bildteil und etwas rechts oberhalb der Bildmitte zu sehen. Zwischen den beiden Scherbändern dreht sich die Hauptschieferung (b), die ursprünglich waagerecht verläuft (im Bild links oben), um einen kleinen Winkel gegen den Uhrzeigersinn. An den Scherbändern biegt sie in diese ein, weshalb die Hauptschieferung in einem gleichmäßig von Scherbändern durchsetzten Gestein in kleinem Maßstab gefaltet ist. Im Unterschied zu einer gewöhnlichen Faltung jedoch, deren Faltenachsen senkrecht zur Einengung des Gesteins verlaufen, ist hier die Schnittlinie von Scherbändern und Hauptschieferung senkrecht zur Streckungsrichtung. In Probe A120 tritt entlang der Scherbänder stets Chlorit statt Biotit auf, der unter höheren Temperaturen stabil und entlang der Hauptschieferung noch reichlich vorhanden, obwohl auch dort teilweise durch Chlorit ersetzt ist. Das zeigt, dass die Scherbänder relativ spät während der Zapportphase gebildet wurden, und dass im Verlauf derselben die Temperatur nachgelassen hat.

Probe A30 (Abb. 8) stammt aus der Misoxer Zone, die eine andere tektonische Entwicklung als die Aduladecke genommen hat. Die Misoxer Zone besteht neben Grünschiefern, ehemaligen Basalten des nordpenninischen Ozeans, vorwiegend aus Bündnerschiefern; das sind dessen kreidezeitliche Sedimente, die meistens ungefähr zur Hälfte aus Kalzit bestehen. Jedoch schwankt der Kalzitgehalt stark. In den

Abb. 8: Probe A30. Kalkschiefer (Bündnerschiefer) der Misoxer Zone. Rechts ist Süden (190°). a Hauptschieferung der Ferreraphase. b Ältere Schieferung. c Albitporphyroblast, links und rechts mit einschlussfreiem Anwachssaum. d Im Druckschatten des Albitporphyroblasten ausgefällter Quarz. e Südvergente Falten der Niemet-Beverinphase. Plan-Neofluar 5×/0,15. Längere Bildkante 2,78 mm. Polfilter gekreuzt, Lambdaplatte.

Extremen können die Sedimente unreine Marmore oder, wie im hier gezeigten Fall, kalzitfreie Glimmerschiefer sein. Die horizontal verlaufende Schieferung, nach Geländebeobachtungen diejenige der Ferreraphase, ist durch Hellglimmer und dunkles Pigment dekoriert (a) und trennt von Hellglimmer und Quarz dominierte Bereiche (b), in denen eine ältere Schieferung durchschnittlich etwa vertikal verläuft, aber stellenweise deutliche Falten nachzeichnet, deren Schenkel scharf in die jüngere Schieferung einbiegen. Die ältere Schieferung ist wahrscheinlich in früheren Stadien der lang anhaltenden Ferreraphase gebildet und verfaltet worden. Eine durch dunkles Pigment (Graphit?) und längliche Quarzkörner gezeichnete Internschieferung im Kern eines in der Bildmitte befindlichen verzwillingten Albitporphyroblasten (syn- bis postkinematisch gewachsener Kristall, der größer ist als die Mineralkörner der Grundmasse; c) ist ähnlich wie die ältere Schieferung in dessen Umgebung orientiert, so dass die Albitsprossung wahrscheinlich nach Bildung dieser Schieferung stattfand. Vieles spricht dafür, dass Drucklösung, insbesondere von Quarz, wesentlich zur Bildung der jüngeren Schieferung beigetragen hat. Voraussetzung dafür ist die Anwesenheit einer fluiden Phase an den Korngrenzen, die je nach Orientierung der Kornkontakte zwischen Hellglimmer und Quarz letzteren in unterschiedlichem Maße gelöst hat. Begünstigt ist die Lösungsfähigkeit dort, wo die Kornkontakte etwa senkrecht zur Einengungsrichtung des Gesteins verlaufen, also in den Faltenschenkeln der älteren Schieferung. Während sich dort das schlechter lösliche Material, hauptsächlich Hellglimmer, passiv anreicherte, wurde das gelöste SiO₂ abgeführt und im Druckschatten der Albitporphyroblasten parallel zur jüngeren Schieferung als Quarz wieder ausgefällt (d). Da auch der Albitporphyroblast selbst einschlussfreie Anwachssäume parallel zur jüngeren Schieferung hat, lässt sich mutmaßen, dass nicht allein Quarz beziehungsweise SiO₂ an den Lösungs- und Ausfällungsprozessen beteiligt war. Die jüngere Schieferung selbst ist in kleine, geographisch gesehen südvergente Falten gelegt (e). Diese sind parasitäre Strukturen höchster Ordnung zur megaskaligen Niemet-Beverinfalte, das heißt, sie sind gleichzeitig mit dieser entstanden und haben die gleiche Orientierung der Faltenachsen, Achsenebenen und Vergenz. Während die Niemet-Beverinfalte eine Wellenlänge von mehr als 10 km hat, haben die Mikrofalten in Probe A30 Wellenlängen von etwa 200-300 µm, sind also um acht Größenordnungen kleiner! Dennoch lässt sich über die im Gelände zu beobachtenden Parasitärfalten geringerer Ordnung, die Wellenlängen von einigen dm bis in den km-Bereich haben können, der genetische Bezug zwischen kleinsten und größten Falten erkennen. Vergleicht man die Mikrostrukturen der Probe A30 aus der Misoxer Zone mit denen der Proben aus der Aduladecke, so fällt auf, dass sich zumindest die späten Mikrostrukturen der Ferreraphase unter deutlich geringerem Metamorphosegrad gebildet haben als die der makrostrukturell gleich ausgebildeten Zapportphase.

Abb. 9: Probe A135. Misoxer Zone. Quarzgeröll in feinkörniger Quarz/Hellglimmer-Grundmasse. Längere Bildkante 8,14 mm. Plan-Neofluar 2,5/0,075, Polfilter gekreuzt, Lambdaplatte. Zusammengesetzt aus sieben Einzelbildern.

Diesen Befund bestätigt Probe A135 (Abb. 9), die ebenfalls aus der Misoxer Zone im Val Vignun stammt. Das entsprechende Handstück war ursprünglich ein Konglomerat, also ein mehr oder weniger feinkörniges Sediment, in dem gerundete Quarzschotter steckten. Geschüttet wurde dieses Sediment wahrscheinlich im Bereich des Brianconnais-Mikrokontinents. Während der Ferreraphase wurde das Gefüge des feinkörnigen Sedimentanteils völlig ausgelöscht. Im Bereich der Matrix (Grundsubstanz) ist der Quarz vollständig dynamisch rekristallisiert, daneben tritt feinkörniger Hellglimmer als Hauptgemengteil auf. Quarz und Hellglimmer der Gesteinsmatrix zeigen Ansätze einer mylonitischen Zerscherung mit Bildung einer Schieferung. Diese Scherung war jedoch nicht intensiv genug, auch die Gerölle zu zerlegen. Obwohl innerhalb des elliptischen Gerölls in der Bildmitte kleinere Quarzkörner entlang der Korngrenzen größerer Körner gewachsen sind. sind diese ebenso wie die charakteristische Eiform des Gerölls noch intakt.

Zwar liefern neuere technische Analysemethoden besonders hinsichtlich petrographisch wichtiger Fragestellungen nach Druck, Temperatur und Gesteinschemie längst genauere Ergebnisse als die polarisationsmikroskopische Betrachtung von Gesteinsdünnschliffen. Deren Bedeutung liegt jedoch darin, dass sie zugleich den Blick auf die Ergebnisse intrakristalliner Deformation (und damit mittelbare Schlüsse auf Prozesse atomaren Maßstabs), die strukturelle Entwicklung eines Gesteins und die Bedingungen, unter denen diese stattgefunden hat, gestattet.

Die hier vorgestellten Beispiele mögen zeigen, wie sich die mikroskopischen Untersuchungsergebnisse zusammen mit genauen geologischen Geländebeobachtungen in Beziehung zu großräumigen Faltungen und Scherungen der Gesteinseinheiten setzen lassen. Somit ist die Dünnschliffmikroskopie ein unverzichtbares Mittel, um die Mechanik tektonischer Prozesse in krustalem Maßstab zu verstehen.

Literaturhinweise

Empfehlenswertes, weiterführendes Lehrbuch:

- Passchier, P. W., Trouw, R. A. J.: Microtectonics. Springer Verlag, Berlin 1998.
- Lange, N.: Mikropanoramen. Mikrokosmos 92, 133-137 (2003).
- Nagel, T., de Capitani, C., Frey, M.: Isograds and P-T evolution in the eastern Lepontine Alps (Graubünden, Switzerland). Journal of Metamorphic Geology 20, 309–324 (2002).
- Pleuger, J., Hundenborn, R., Kremer, K., Babinka, S., Kurz, W., Jansen, E., Froitzheim, N.: Structural evolution of Adula nappe, Misox zone, and Tambo nappe in the San Bernardino area: Constraints for the exhumation of the Adula eclogites. Mitteilungen der österreichischen geologischen Gesellschaft 94, 99-122 (2003).
- Schmid, S. M., Pfiffner, O. A., Froitzheim, N., Schönborn, G., Kissling, E.: Geophysical-geological transect and tectonic evolution of the Swiss-Italian Alps. Tectonics 15, 1036–1064 (1996).
- Schrodt, J.: Die Herstellung von Gesteinsdünnschliffen mit einer Kombinationsmaschine. Teil 1 und 2. Mikrokosmos 91, 25–35 und 115–126 (2002).
- Spicher, A.: Tektonische Karte der Schweiz. Schweizerische geologische Kommission, Bern 1980.

Verfasser: Dipl.-Geol. Jan Pleuger und Dr. Horst Wörmann, Geologisches Institut der Universität Bonn, Nußallee 8, 53115 Bonn

Buchbesprechung

Cypionka, H.: Grundlagen der Mikrobiologie. 3. überarbeitete und erweiterte Auflage, Springer-Verlag, Heidelberg 2006, 301 Seiten, 128 Abbildungen, 36 Tabellen, broschiert, € 24,95, ISBN 3-540-24084-5.

Wer anständig und mit vertretbarem Aufwand seine Vordiplomsprüfung in Mikrobiologie schaffen will, der knöpfe sich "den

Cypionka" vor, doch man kann ihn auch dem Oberstufenlehrer empfehlen, der ab und zu etwas Mikrobiologie in seinen Leistungskurs schmuggeln möchte... stand an dieser Stelle (Mikrokosmos 93, S. 189, 2004) über die 2. Auflage dieses Lehrbuchs. Das gilt auch für die dritte. Das Buch ist mittlerweile fest etabliert und vor allem im Grundkurs zu einem bevorzugten Einstieg in die Mikrobiologie für diejenigen geworden, die zum Beispiel "der Brock" schon seiner schieren Fülle wegen entmutigt. Der Preis ist (immer noch) akzeptabel, wohl nicht zuletzt, weil nach wie vor auf teure Farbfotos im Buch verzichtet wird. Diese kann man sich, ebenso wie Fragen und Antworten, das Glossar und Leserkommentare auf den Webseiten www.grundlagen-der-mikrobiologie.de und www.mikrobiologischer-garten.de anschauen.

Rupert Mutzel, Berlin

Aus der Industrie

Invertiertes Fluoreszenz-Phasenkontrast-Mikroskop eignet sich für zahlreiche Anwendungen

Moderne Fluoreszenzmikroskope arbeiten nach dem Auflicht-Prinzip; das Präparat wird somit von oben durch das Objektiv beleuchtet. Bei zahlreichen Anwendungen sind jedoch zusätzliche Untersuchungen nach dem Durchlichtverfahren oder sogar die Kombination von beiden Verfahren gefragt. Mit Hilfe des invertierten Fluoreszenz-Phasenkontrast-Mikroskops Biozero lassen sich derartige Untersuchungen in kürzester Zeit vornehmen.

Die Fluoreszenzmikroskopie stellt eine hocheffektive Methode der Lichtmikroskopie zur Untersuchung von Euzyten, Protozyten, Mitochondrien, Proteinen, Molekülen, Allergenen, Bakterien, Mykosen (Pilze), Apoptosen, Tumoren und anderen biologischen Strukturen beziehungsweise Vorgängen dar. Bei der Absorption von Licht einer bestimmten Wellenlänge (Anregungslicht) ist bei verschiedenen Molekülen eine gleichzeitige Emission von Licht mit größerer Wellenlänge zu beobachten. Dieses Verhalten (Absorption von kurzwelligem Licht, Emission von langwelligem Licht) wird als Fluoreszenz bezeichnet. Bei modernen Fluoreszenzmikroskopen arbeitet man in der Regel mit dem Auflichtverfahren, da hier die Fluoreszenzen heller im mikroskopischen Bild erscheinen und das Anregungslicht noch besser eliminiert werden kann. Allerdings erfordern manche Analysen die Anregung einer Fluoreszenz im Durchlichtverfahren. Häufig möchte man sogar zwischen beiden Verfahren innerhalb kürzester Zeit umschalten können.

Das neue, invertierte Fluoreszenz-Phasenkontrast-Mikroskop Biozero aus der Modellreihe BZ-8000 des Unternehmens Keyence, Neu-Isenburg, bietet daher sowohl das Auflicht- wie das Durchlichtverfahren und eine beliebige Kombination beider Prinzipien an (Abb. 1 und 2). Mit Hilfe von verschiedenen Spiegeln lässt sich die Auflicht- und Durchlichtbeleuchtung, deren Übertragungswege sowie das dazugehörige Vergrößerungssystem im jeweils optimalen Winkel (Patent angemeldet) so anordnen, dass ein sehr kompaktes Modell mit stufenlos einstellbarem optischen System zur Verfügung steht. Konkret bedeutet dies, dass dieses innovative Fluoreszenzmikroskop nur eine Stellfläche von 30,5 cm × 43,2 cm benötigt. Trotzdem bietet es drei verschiedene Betrachtungsarten (Hellfeld-, Fluoreszenz- und Phasenkontrastbetrachtung), zwischen denen mit einem einzigen Mausklick umgeschaltet werden kann (Abb. 3). Die sehr kompakte Konstruktion geht jedoch nicht zu Lasten der Bedienbarkeit. So weist dieses Fluores-

Abb. 1: Das neue, invertierte Fluoreszenz-Phasenkontrast-Mikroskop Biozero dürfte rasch zum neuen Standard bei der Fluoreszenz-Betrachtung werden. – Abb. 2: Das Fluoreszenzmikroskop Biozero bietet Auflicht- sowie Durchlichtverfahren und eine beliebige Kombination beider Prinzipien.

Abb. 3: Mit nur einem einzigen Mausklick lassen sich Unschärfen beseitigen und ein kontrastreiches Bild erzeugen.

zenzmikroskop einen eingebauten Dunkelraum mit integriertem X-Y-Z-Koordinatentisch sowie einen vollautomatischen Filterwechsler auf. Damit ist der Anwender in der Lage, die zu untersuchende Probe ohne störenden Einfluss von außen nach Belieben zu positionieren, mittels verschiedener Filter differenziert zu analysieren und durch Auflicht/Durchlicht unterschiedlich zu beleuchten. Der optische Zoom nutzt die volle Auflösung des Objektivs und ermöglicht dadurch Vergrößerungen bis 60fach. Mittels des integrierten Digitalzooms sind zusätzlich Vergrößerungen im Bereich von 0,5- bis 3fach möglich. Die elektronische Ansteuerung unterstützt den Benutzer bei der optimalen Einstellung und erlaubt ein schnelles Reproduzieren von Analysen. Wird die Betrachtung unterbrochen, so schließt sich automatisch die Blende für das Anregungslicht. Dadurch werden ein ungewolltes Verblassen der fluoreszierenden Probe und deren weitere Beeinflussung verhindert.

Eine möglichst vollständige Trennung von Anregungsund Fluoreszenzlicht durch das optische System stellt eine Grundvoraussetzung für eine gute Abbildung in der Fluoreszenzmikroskopie dar. Je nach Untersuchungsobjekt sowie verwendetem Fluoreszenzfarbstoff, gilt es spezielle Filtereinsätze mit geeigneten Kombinationen von Filtern und dichromatischen Spiegeln einzusetzen. Bis zu vier Filtersysteme (Erregungsfilter, Absorptionsfilter, dichroitische Spiegel) lassen sich beim Biozero vorab montieren und mittels der elektronischen Steuerung bei Bedarf aktivieren oder deaktivieren. Ein vollautomatischer Filterwechsel ist nicht nur direkt am Mikroskop, vielmehr auch über einen angeschlossenen Computer möglich.

Bei der Konstruktion des Biozero wurden zahlreiche Anwenderforderungen bestmöglich umgesetzt. So besteht das Gehäuse aus einer unteren und oberen Hälfte, die beide von einem Kühlgebläse effektiv gekühlt werden. Selbst bei einer Lichtunterbrechung bleibt der Temperaturanstieg auch innerhalb des Probenraums auf maximal 3° Celsius begrenzt. Ein spezielles Vibrationsschutzmaterial wiederum dämpft den Mikroskopteil, weswegen Vibrationen, beispielsweise vom Kühlgebläse verursacht, keinen Einfluss auf die vorzunehmenden Messungen/Analysen haben. Spezielle Füße sorgen für die notwendige Dämpfung von äußeren Schwingungseinflüssen.

Die Lebensdauer der Quecksilberlampe wurde auf 2.000 Betriebsstunden erhöht. Sie lässt sich bei Be-

darf sehr einfach austauschen. Im Gegensatz zu marktüblichen Mikroskopen müssen die Strahlachsen dazu nicht demontiert und nachher wieder montiert und neu ausgerichtet werden. Eine zusätzliche 100 W-Halogenlampe ermöglicht zudem, die Einsatzzeit der Quecksilberlampe weiter zu reduzieren, so dass diese dann noch länger haltbar ist.

Die Durchlichtbeleuchtungseinheit lässt sich einfach aufklappen, um Proben oder Objekte leichter auszutauschen. Eine eingebaute Gasdruckfeder verhindert das versehentliche Herunterfallen durch ihr Eigengewicht. Beim Hochheben der Einheit wird die Beleuchtung aus Sicherheitsgründen automatisch ausgeschaltet. Verschiedene Objektträger wie solche aus Glas, Kunststoff-Petrischalen, Multi-Well-Platten und Schalen mit Glasboden können verwendet werden.

Verschiedene Regelalgorithmen sowie Softwarefunktionen unterstützen den Bediener nicht nur höchst effizient bei den Untersuchungen, sie bieten zudem eine neue Qualität bei der Analyse und deren Visualisierung. Durch die Beseitigung unscharfer (verschwommener) Bereiche am Objektiv lässt sich der Bildkontrast verstärken, wodurch die Qualität der Bilder wesentlich erhöht wird. Die Verarbeitungsgeschwindigkeit des Modells Biozero ist etwa 30-mal höher als bei herkömmlichen Mikroskopen. Dies garantiert qualitativ hochwertige Bilder ohne Erzeugung von Artefakten. Die Unschärfereduktion kann am Bild selbstverständlich in Echtzeit durchgeführt werden.

Das neue, invertierte Fluoreszenz-Phasenkontrast-Mikroskop Biozero weist eine höhere Bildqualität als beim NN-(Nearest Neighbor-)Verfahren auf, bei dem zur Beseitigung von Unschärfen die Daten dreier unterschiedlicher Bilder entlang der Z-Achse berechnet werden. Im Gegesatz zum PSF- (Point Spread Function) Verfahren müssen die Daten nicht für jedes Objekt gesammelt werden. Es bietet eine rund 30-mal schnellere Verarbeitung als bei der iterativen Methode, bei der zur Erstellung von Bildern mit geringerem Unschärfeanteil eine graduelle Korrektur der Abweichungen vorgenommen wird.

Die Vorteile gegenüber konfokalen Mikroskopen sind ebenfalls recht überzeugend, denn das Biozero beeinflusst/beschädigt die Probe auf Grund geringerer Objekterregungen sehr viel weniger. Die gewünschte Erregungswellenlänge lässt sich zudem durch einen schnellen Filterwechsel individuell auswählen. Darüber hinaus weist es gegenüber herkömmlichen Mikroskopen ein geringeres Rauschen auf, es baut zudem sehr kompakt und ist vergleichsweise kostengünstig.

Bei Bedarf lassen sich selbst 3-D-Analysen in Echtzeit erstellen. Durch Steuerung der Z-Achse des Objekttisches zur Verschiebung der Fokusposition können Bilder verschiedener Z-Positionen generiert werden, aus denen sich anschließend ein 3-D-Bild erstellen lässt. Dank eines ausgeklügelten Algorithmus mit OpenGL² kann das 3D-Bild sehr rasch durch ein so genanntes Volume Rendering Verfahren (Visualisierung der Helligkeitsebenen von Punkten/Voxel in einem 3-D-Raum) gezeichnet werden. Obwohl dieses Verfahren sehr speicherintensiv ist, erhält der Anwender dank hoher Leistungsfähigkeit der eingebauten Grafikkarte ein schnelles, verzerrungsfreies 3-D-Ergebnis. Neben 3-D-Rotationen und beliebigen 3-D-Vergrößerungen vermag der Benutzer auch Echtzeit-Farbextraktionen sowie Echtzeit-Kontrastextraktionen an den 3-D-Bildern vorzunehmen.

Ebenso rasch und einfach lassen sich verschiedene Kameraeinstellungen vornehmen. Mit nur einem einzigen Mausklick vermag man die Kamera zu positionieren, wofür herkömmliche Fluoreszenzmikroskope in der Regel zahlreiche Arbeitsschritte benötigen. So lassen sich Bilder, die mit unterschiedlichen Betrachtungsmodi erzeugt wurden, am vierfach geteilten Bildschirm von Kanal 1 bis 4 schnell anzeigen. Durch Anklicken des jeweiligen Bildschirmabschnitts vom gewünschten Kanal ist ein rasches Umschalten innerhalb der vier Anzeigen möglich. Die Anwenderfreundlichkeit wird dadurch noch gesteigert, dass sich mehrere Bildaufnahmebedingungen gleichzeitig verändern lassen.

Zahlreiche Messfunktionen, einfache, aber effektive Bild-Farbton-, Bild-Sättigungs- sowie Bild-Helligkeitseinstellungen lassen sich ebenso komfortabel durchführen wie die Darstellung von Messlinienverläufen und diverse Statistiken. Über eine Firewire-Schnittstelle (IEEE1394) können die Daten auf einen Computer übertragen und darüber auch das neue Fluoreszenzmikroskop gesteuert werden.

Das invertierte Fluoreszenz-Phasenkontrast-Mikroskop Biozero dürfte rasch zum neuen Standard bei der Fluoreszenz-Betrachtung werden. Nicht zuletzt auf Grund der hohen Leistung, den kompakten Abmessungen und der umfassenden sowie ausgeklügelten Funktionsvielfalt. Dass dann noch der Preis stimmt, dürfte so manch schmalem Forschungsbudget sicherlich ganz gut tun.

Weitere Informationen vom Anbieter: KEYENCE Deutschland GmbH, Vertrieb/Marketing, Siemensstr. 1, 63263 Neu-Isenburg, Tel.: 061 02/368 90, Fax: 061 02/368 91 00, E-Mail: info@keyence.de, Internet: http://www.keyence.de

Dipl.-Ing. Robert Ruthenberg, PR-Referent der Firma Keyence mit eigenem PR-Büro in Nürnberg

Kurze Mitteilung

Gras fressende Dinosaurier

Silifizierte Pflanzengewebe enthalten Phytolithen (Pflanzensteine, die es auf Grund ihrer speziellen Struktur den Paläontologen ermöglichen, deren Herkunft zu bestimmen. In Indien hat man in fossilisierten Sauriern Koprolithen (Kotsteine) gefunden, die mindestens fünf verschiedene Phytolithen-Typen enthielten, welche aus bestimmten Gras-Arten stammten. Unter diesen war ein großer Formenreichtum zu beobachten, sodass man auf die Ernährungsweise der Saurier, welche Koprolithen produziert hatten, schließen kann. Auch hat man fossilierte Pollenkörner in den Koprolithen gefunden. Das alles lässt darauf schließen, dass diese Tiere in der Kreide-Zeit (60-100 Mio. Jahre vor Chr.) Gras gefressen haben! Darauf deuten auch die gefundenen Zähne mit flachen Kauflächen hin, wie sie bei den heutigen Pferden vorkommen, die auf konstanten Abrieb durch Phytolithen aus Gräsern zurückzuführen sind.

Literaturhinweise

Perkin, S.: Ansient grazers. Find adds grass to dinosaur menu. Science News 168, 323 (2005).

Prasad, V., Strömberg, C. A. E., Alimohammadian, H., Sahni, A.: Dinosaurier coprolites and the early evolution of grasses and grazers. Science 310, 1177–1180 (2005).

H. F. Linskens, Nijmegen

Mikroskopische Analyse des Insektenabdomens am Beispiel der australischen Feldgrille Teleogryllus commodus

Robert Sturm

Insekten stellen in verschiedenen biologischen Disziplinen wertvolle Modellorganismen zur stetigen Erweiterung des Grundlagenwissens dar. So spielten etwa für den Fortschritt in der Genetik Kreuzungsexperimente mit der Taufliege *Drosophila melanogaster* eine wichtige Rolle, und auch die Erkenntnisse in der Zellbiologie und Histologie beruhen zu einem nicht unwesentlichen Teil auf Experimenten mit diversen Insektenarten. Orthopteren (Geradflügler) wie die australische Feldgrille *Teleogryllus commodus* werden ob ihrer einfachen Züchtbarkeit und Haltung häufig für den zoomorphologischen Unterricht einerseits und entomologische Forschungen andererseits herangezogen, wobei gerade im Bereich der Insektenentwicklung und -histologie noch zahlreiche unbeantwortete Fragen bestehen. Der vorliegende Beitrag soll einen anatomisch-histologischen Einblick in das Abdomen (Hinterkörper) der australischen Feldgrille mit seiner zum Teil durchaus komplexen Organanordnung geben. Besondere Rücksicht wird dabei auf die geschlechtsspezifischen Unterschiede des Reproduktionsapparates genommen, welcher in den hintersten Segmenten des Abdomens lokalisiert ist.

rillen sind aus systematisch-zoologischer Sicht den Orthoptera und in dieser Gruppe wiederum der Ordnung der Ensifera (Langfühlerschrecken) sowie der Familie der Gryllidae zuzuordnen. Ihre Verwendung als Modellorganismen in diversen biologischen Disziplinen wurde in den letzten Jahrzehnten nicht zuletzt auch dadurch forciert, dass sie mit relativ geringem Aufwand in hoher Zahl herangezüchtet werden können und - was ebenfalls nicht unwesentlich erscheint - sehr leicht zu halten sind, da sie keine hohen Ansprüche in Bezug auf ihre Ernährung stellen. Die Haltung der Tiere erfolgt zumeist je nach Verwendungszweck entweder in verschließbaren Plastikbehältern (L \times B \times H: 50 \times 30 \times 20 cm) oder in Glasgefäßen von hinreichender Größe (mindestens 5 Liter Volumen). Als Nahrung gelten neben frischem Salat, welcher täglich gewechselt werden sollte, auch Trockenfutter (z.B. Rattendiät Altromin 1222), Quark für eine rasche Gewichtszunahme der Tiere sowie Wasser, welches in Form angefeuchteter Wattepads verabreicht wird.

Biologie der australischen Feldgrille

Die australische Feldgrille Teleogryllus commodus hat in den vergangenen Jahrzehnten neben dem Heimchen Acheta domesticus vermehrt Eingang in die wissenschaftliche Forschung gefunden (z.B. Sturm 2002, Sturm und Pohlhammer 2000), wobei das Hauptaugenmerk auf die Klärung reproduktionsbiologischer Fragen gelegt wurde. Der natürliche Lebensraum der Grille erstreckt sich über weite Teile Australiens und Neuseelands, während das Tier in unseren Breiten aufgrund der zu starken jahresund tageszeitlichen Temperaturschwankungen nicht in der freien Natur angetroffen werden kann und demzufolge auf entsprechend klimatisierte Bereiche (25 °C, 60% Luftfeuchte) beschränkt bleibt. Im Labor pflanzt sich Teleogryllus commodus über das gesamte Jahr hinweg fort, wobei ein einzelnes Weibchen eine durchschnittliche Lebensdauer von 40 Tagen besitzt und innerhalb seiner fortpflanzungsaktiven Periode bis zu 1.000 Eier ablegen kann. Die Embryonal- und Larvalentwicklung dauern zusammengenommen etwa drei Monate. Die Larvalphase durchläuft dabei mehrere (in der Regel 10 bis 12) Häutungsstadien, die mit einer sukzessiven Größenzunahme des Tieres einhergehen, und endet schließlich mit der Adultoder Imaginalhäutung, aus welcher das voll ausdifferenzierte Adulttier resultiert. Die Geschlechtsaktivität startet im Allgemeinen erst einige Tage nach der Adulthäutung, da einzelne Teile des Reproduktionsapparates noch nicht voll entwickelt sind. In freier Wildbahn treten jene im Spätherbst abgelegten Eier in ein Ruhestadium (Diapause) zur Überdauerung des Winters ein und setzten die Embryogenese nach Beendigung der kühleren Jahreszeit fort.

Insektenanatomie

Nun stellt die Mikroskopie von Insekten eine faszinierende Disziplin nicht nur für den Fachmann, sondern auch für den Laien dar, weil ein genaueres Studium dieser Tiergruppe den anfänglichen Eindruck von nicht allzu hoch entwickelten Organismen auf deutliche Art und Weise widerlegt. Insekten gelten, gerade was ihre Sinnesleistungen betrifft, als eine der fortschrittlichsten Tiergruppen überhaupt – nicht zuletzt diente das optische Sinnessystem der Stubenfliege Musca domestica als Grundlage für das Orientierungssystem von Mittel- und Langstreckenraketen. Diese Komplexität setzt sich den inneren Aufbau der Tiere betreffend fort und erreicht vor allem beim männlichen und weiblichen Reproduktionsapparat einen Höhepunkt. Im vorliegenden Beitrag soll ein mikroskopischer Einblick in das Abdomen der australischen Feldgrille Teleogryllus commodus gewährt werden, wobei dem Verdauungstrakt mit seinen zahlreichen Einzelkomponenten einerseits und dem Reproduktionsapparat andererseits besonderes Augenmerk geschenkt werden soll.

Präparation der Tiere für die mikroskopischen Untersuchungen

Die Präparation von Insekten für wissenschaftliche Untersuchungen hängt in ihrer Komplexität von der Art der Untersuchungsmethode ab. Für die Auflichtmikroskopie, welche Erkenntnisse über die Lage und Form einzelner Organe bringen soll, sind nur wenige Schritte der Vorbereitung notwendig. Die Tiere werden zuerst in einem CO_2 -Strom betäubt und anschließend dekapitiert. Die Fixierung der Insektenkörper erfolgt in 70% igem Ethanol über einen Zeitraum von einigen Tagen. Nach diesem Schritt können Thorax und Abdomen problemlos mit einer scharfen Rasierklinge median – also in der Körpermitte – geschnitten und die jeweiligen Schnitthälften unter dem Mikroskop im Detail betrachtet werden.

Als wesentlich komplexer erweist sich die Präparation des Abdomens für die Durchlichtmikroskopie, welche erste Aufschlüsse über die zelluläre Struktur einzelner Organe geben kann. Hierfür ist es nämlich notwendig, histologische Schnitte von hinreichender Qualität zu erzeugen, was zum Teil langwierige Fixier-, Einbettungs- und Färbeprozesse erfordert. Analog zur Präparation für die Auflichtmikroskopie werden ausgewählte Tiere (es werden generell nur wenige Grillen für derartige Untersuchungen benötigt) im CO₂-Strom narkotisiert und dekapitiert. Daraufhin erfolgt die Entwässerung der Objekte in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Fixierung in Bouin-Lösung. Zur Herstellung der orientierten Schnitte mit Hilfe des Mikrotoms erfolgt eine Einbettung des Objektes in einer Harzmischung, deren Konsistenz je nach kutikularem Anteil der Epidermis und der inneren Organe variiert werden muss. Bei starken kutikulären Strukturen empfiehlt sich ein härteres Einbettungsmedium zur Erzielung optimaler Schnittresultate. Die erzeugten Schnitte werden der Reihe nach auf einem Glasobjektträger mit einer Größe von 76×26 Millimeter aufgebracht und in weiterer Folge wiederum von dem bei der Mikroskopie störend wirkendem Einbettungsmedium durch ein entsprechendes Lösungsmittel befreit. Für die Färbung der Gewebsschnitte wird je nach Fragestellung eine spezifische Prozedur (z.B. Goldner oder Azan) durchgeführt. Abschließend werden die Schnitte mit Canada-Balsam (Lichtbrechung n = 1,56) und einem Deckglas versehen.

Ergebnisse der Auflichtmikroskopie

Die Resultate der auflichtmikroskopischen Fotodokumentation sind in der Abbildung 2 zusammengefasst, wobei das Hauptaugenmerk des Interesses hier vor allem auf den Verdauungs- und Reproduktionstrakt, wie sie typischerweise im Hinterleib der Grille angetroffen werden können, gerichtet wurde. Zur Unterstützung der nachfolgenden Erläuterungen dienen die Zeichnungen in Abbildung 1, welche die jeweiligen Organanordnungen und -morphologien in zum Teil vereinfachter Art und Weise wiedergeben sollen.

Betrachtet man nun die Abbildung 2 etwas mehr im Detail, so lässt sich im Wesentlichen eine innere Zweigliederung des Hinterleibes vornehmen. Zum einen wird dieser Körperabschnitt nämlich durch den an Ausdehnung dominierenden Verdauungstrakt geprägt, zum anderen durch den nicht weniger imposanten Reproduktionstrakt, dessen Organe mit Ausnahme des Hodens/der Ovarien auf die hintersten abdominalen Segmente konzentriert sind. Der Verdauungstrakt sticht im Bereich des Hinterleibes hauptsächlich durch den kugelförmigen Kaumagen (Abb. 1 und 2) oder Proventriculus ins Auge, der eine dicke muskuläre Wand besitzt und an seiner Innenseite von zahlreichen Kutikulazähnchen zur effizienten Zerkleinerung der aufgenommenen Nahrung überzogen ist. An den Kaumagen schließt sich der in mehrere Abschnitte untergliederte Mitteldarm an, der - ganz ähnlich wie der menschliche Darm – der Resorption der Nahrungsbestandteile in das Mixocoel dient. Dem Mitteldarm folgt ein besonders interessantes, für Insekten geradezu charakteristisches Organ, nämlich die Malpighi-Gefäße (Abb. 1 und 2). Ihre vornehmliche Aufgabe besteht in der Rückresorption von Stoffwechselendprodukten aus dem Mixocoel und deren nachfolgenden Abgabe in den Hinterdarm - eine Funktion, welche beim Menschen vergleichsweise die Niere übernimmt. Malpighi-Gefäße werden neben den bei Würmern und Weichtieren auftretenden Protobeziehungsweise Metanephridien auch als Exkretionsorgane bezeichnet. Der Verdauungstrakt endet mit dem Hinter- oder Enddarm, der wie der menschliche Dickdarm für die Entwässerung der unverdaulichen Nahrungsreste verantwortlich zeichnet (Abb. 1 und 2).

Der Reproduktions- oder Genitaltrakt lässt sich unabhängig vom Geschlecht der Tiere in drei Hauptbestandteile untergliedern, die in ihrer Bedeutung signifikante Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen erkennen lassen. Zum einen gibt es jene Organe, die zur Bildung der Keimzellen dienen (Hoden/Ovar), andererseits die so genannten akzessorischen Drüsen (Abb. 2), deren Bedeutung in der Erfüllung

zahlreicher unterstützender Funktionen besteht, und schließlich die Keimzellen konservierenden und übertragenden Strukturen beziehungsweise Organe (Spermatophore, Receptaculum seminis, Penis, Ovipositor). Wie in Abbildung 2 dargestellt ist, nehmen beim Männchen der australischen Feldgrille die akzessorischen Drüsen volumenmäßig eine übergeordnete Stellung ein - eine Tatsache, die aufgrund der Bedeutung dieser Strukturen für die Spermatophorenbildung nicht weiter verwunderlich erscheint. Beim Weibchen hingegen treten die akzessorischen Drüsen nur noch als Rudimente mit bislang noch nicht im Detail verstandener Funktion auf, während die volumenmäßige Dominanz den Ovarien zuteil wird (Abb. 1).

Ergebnisse der Durchlichtmikroskopie

Im Rahmen der durchlichtmikroskopischen Untersuchungen am Abdomen von Teleogryllus commodus wurde der Schwerpunkt auf den Reproduktionsapparat gelegt, dessen funktionell-anatomisches Verständnis erst aus dem Schnittpräparat erlangt werden kann. Bereits in den Überblicksdarstellungen der Abbildung 3 wird die ganze Komplexität des weiblichen und männlichen Genitaltraktes deutlich, wobei die Keimzellen bildenden Organe (Ovarien/Hoden) nicht in die Abbildung miteinbezogen wurden. Hilfestellung bei der Identifizierung einzelner Strukturen soll wiederum die Abbildung 1 geben, in welcher neben der groben Morphologie des Genitaltraktes (mittlere Bildserie) auch die Form der Geschlechtsorgane selbst wiedergegeben ist. Wenn man nun beim Weibchen der australischen Feldgrille beginnen möchte, so lassen sich gewisse Teile der entsprechenden Zeichnungen in Abbildung 1 relativ leicht wiederfinden, so beispielsweise die Genitalkammer, in welcher die Befruchtung der Eier stattfindet, der unpaare Ovidukt, zu welchem die beiden lateralen (paarigen) Ovidukte bei Eingang in die Genitalkammer zusammenmünden, die terminale Papille, welche bei der Befruchtung direkt über den Eintrittsöffnungen der Eier (Mikropylen) für die Spermatozoen liegt und demzufolge eine punktgenaue Besamung bewirkt, und der Ovipositor oder Legestachel, der zum Ablegen der befruchteten Oocyten in den Boden dient. Als weitere Strukturen treten im Schnittbild sowohl der Ductus receptaculi auch die akzessorischen Drüsen auf. als

Abb. 2: Aufsicht auf das Abdomen eines Männchens der australischen Feldgrille. aD akzessorische Drüsen, Af After, Ce Cercus, Ed Enddarm, Gk Genitalkammer, Ho Hoden, Km Kaumagen, Md Mitteldarm, MG Malpighi-Gefäße, Pe Penis, Sgp Subgenitalplatte, Sp Spermatophore. Maßstrich 1 mm.

Der Ductus receptaculi bewirkt durch seine peristaltischen Bewegungen den Transport der Spermatozoen von der Spermatophore, welche während des Kopulationsaktes vom Männchen an das Weibchen übertragen wird, in das Receptaculum seminis, eine Art Vorratsbehälter für die Spermien. Bei der Befruchtung der Eizellen verläuft die Peristaltik in die umgekehrte Richtung und sorgt so für den Transport der Spermatozoen vom Receptaculum seminis zur terminalen Papille. Die akzessorischen Drüsen sind beim Weibchen nur mehr rudimentär ausgebildet, scheinen aber dennoch eine oder mehrere Funktionen zu besitzen. Die plausibelste dieser Funktionen umfasst die Herstellung eines öligen Sekretes, welches an den Eiern haften bleibt und als eine Art Gleitmittel für einen erleichterten Transport durch den Ovipositor dient. Die in Abbildung 3 gezeigten Strukturen

sind in Abbildung 4 zwecks der Darstellung zellulärer Organisation nochmals mehr im Detail gezeigt.

Die sich im Durchlicht bietende Situation bei der männlichen Grille weicht - wie schon aus den Zeichnungen vernommen werden kann relativ deutlich von jener des Weibchens ab. Zu den augenscheinlichsten Strukturen der Abbildung 3 zählen die akzessorischen Drüsen, welche - und hier liegt bereits ein wesentlicher Unterschied zum Weibchen vor - mehrere signifikante Funktionen erfüllen. Die Drüsen zeichnen für die Bildung der Spermatophore, eines Transportbehälters für die Spermatozoen, verantwortlich. Dabei handelt es sich um ein aus mehreren Schichten aufgebautes, gänzlich azelluläres (zellfreies) Gebilde. Weitere im Schnitt sichtbare Strukturen und Organe sind der Ductus ejaculatorius, entlang welchem die noch

 Abb. 1: Zeichnerische Darstellung der Anatomie des männlichen und weiblichen Abdomens der australischen Feldgrille Teleogryllus commodus.

Abb. 3: Durchlichtmikroskopische Aufnahmen des Reproduktionstraktes vom Weibchen (oben) und Männchen (unten) der australischen Feldgrille. aD akzessorische Drüsen, Ae Aedeagus, Dr Ductus receptaculi, Fg Fettgewebe, Gk Genitalkammer, vL ventraler Lobus, Op Ovipositor, tP terminale Papille, uO unpaarer Ovidukt, Vt Verdauungstrakt, Ph Phallus, Sgp Subgenitalplatte. Maßstriche 1 mm. Die Kästchen kennzeichnen die Positionen der Detailaufnahmen in Abbildung 4.

Abb. 4: Detailaufnahmen des Reproduktionstraktes vom Weibchen (A–C) und Männchen (D–E) der australischen Feldgrille. Maßstriche 0,1 mm.

gallertartige Spermatophore mitsamt ihrem Inhalt in die Genitalkammer transportiert wird, die paarig auftretenden ventralen Lobi, welche sich um die Spermatophore bis zu deren Erhärtung legen, und der aus Aedeagus und Phallus bestehende Penis, dessen Drüsen die Spermatophorengeißel bilden und dessen hauptsächliche Funktion in der Übertragung des Transportbehälters an das Weibchen besteht. In Abbildung 4 sind ausgewählte Strukturen zwecks der Darstellung zellulärer Elemente nochmals mit stärkerer Vergrößerung gezeigt.

Resümee

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Lichtmikroskopie zur Erforschung struktureller und histologischer Fragestellungen gerade im Bereich der Wirbellosenbiologie nach wie vor eine unverzichtbare Methode darstellt. Wie anhand des Abdomens der australischen Feldgrille gezeigt werden konnte, lassen sich mit relativ geringem Aufwand bereits zahlreiche Erkenntnisse über den Bau und die Funktion einzelner Organe gewinnen, was gerade für den Nicht-Experten einen Anreiz darstellen könnte, verstärkt in die Welt der Insekten einzutauchen.

Literaturhinweise

- Sturm, R., Pohlhammer, K.: Morphology and development of the female accessory sex glands in the cricket *Teleogryllus commodus* (Saltatoria: Ensifera: Gryllidae). Invertebrate Reproduction and Development 38, 13–21 (2000).
- Sturm, R.: Morphology and ultrastructure of the female accessory sex glands in various crickets (Orthoptera, Saltatoria, Gryllidae). Deutsche Entomologische Zeitschrift 49, 185–195 (2002).

Verfasser: Mag. Dr. Robert Sturm, Brunnleitenweg 41, 5061 Elsbethen, Österreich

Kurze Mitteillung

Digitale Holographie als neues Mikroskopierverfahren

Das neue Verfahren der digitalen Holographie lässt sich modular in bestehende Mikroskope integrieren. Mit dieser hoch auflösenden, nicht invasiven Methode können lebende Zellen über einen beliebigen Zeitraum aufgenommen und dreidimensional rekonstruiert werden. Spezielle Markierungen sind dazu nicht nötig. Insbesondere dynamische Prozesse wie Zellwanderungen und Zell-Zell-Interaktionen sowie Untersuchung von Wirkstoffen, welche diese Prozesse beeinflussen, können so hervorragend dokumentiert werden.

Versuchsaufbau (Abb. 1): Eine kohärente Laserlichtbeleuchtung wird modular an den vorhandenen Mikroskopkondensor eingekoppelt (inverse Durchlichtanordnung). Eine CCD-Kamera zeichnet dann das digitale Hologramm auf und leitet die Daten an einen PC weiter. Die durch das Objekt bewirkten Phasenänderungen der Lichtwellen gegenüber dem umgebenden Medium werden als unterschiedliche Bildhelligkeiten dargestellt und sind ein direktes Maß für die optische Weglängendifferenz. Die Rekonstruktion der Bilder erfolgt ausschließlich numerisch. An die mikroskopische Anordnung angepasste Algorithmen erlauben eine weitgehend automatisierte Auswertung der Messergebnisse. Verschiedene Objektebenen können aus einem einzigen Hologramm rekonstruiert werden, so dass keine zusätzlichen mechanischen oder optischen Komponenten nötig sind, um auf verschiedene Ebenen zu "fokussieren". Eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten auch in der medizinischen Diagnostik (z.B. Endoskopie, Detektion von Tumorläsionen) wird von dieser berührungsfreien, nicht invasiven Möglichkeit der Zelloberflächenanalyse profitieren.

Abb. 1: Aufbau eines modularen Systems zur digitalholographischen Mikroskopie in Durchlichtanordnung (aus Schnekenburger et al., 2005).

Literaturhinweis

Schnekenburger, J., Carl, D., Kemper, B.: Dynamische Analyse der Zellmorphologie mit digitaler Holographie. Bioforum 12, 42–44 (2005).

Renate Radek, Berlin

153

Hoch gestapelt – tiefenscharf: Anwendung aktueller Software zur Verarbeitung von Bilderstapeln

Gerd Günther

Der Wechsel vom analogen Foto auf herkömmlichem Filmmaterial zur digitalen Aufnahme wird auch bei der mikrofotografischen Dokumentation immer weiter vollzogen. Im Zuge der Digitalisierung können mit spezieller Software endlich Grenzen überschritten werden, die für die analoge Fotografie nahezu unüberwindlich waren. Die Überwindung der Grenze der geringen Tiefenschärfe ist Thema dieses Erfahrungsberichtes.

ie Tiefenschärfe von Mikrofotografien ist gemeinhin eher gering, insbesondere beim Einsatz ab 20facher Objektivvergrößerung macht sich dieser Effekt stark bemerkbar. Der Einsatz aktueller Software zur Verarbeitung von Bilderstapeln zur Erhöhung der Tiefenschärfe schafft hier Abhilfe. Der Einsatz der Software braucht jedoch nicht nur auf stärker vergrößernden Objektive bedie schränkt zu bleiben. Insbesondere mit Auflichtbeleuchtung im unteren Vergrößerungsbereich erschließen sich mit dieser Technik der Bildverarbeitung ganz neue Möglichkeiten. In den vergangenen 3-4 Jahren erschienen immer mehr Programmpakete, die auch dem nicht professionellen Anwender mit weniger prall gefülltem Budget zugänglich sind, und die hervorragende Ergebnisse zeigen. Die Programmpakete für die professionelle Bildanalyse enthalten zwar auch Module für die Erhöhung der Tiefenschärfe, allerdings liegen die Anschaffungskosten für diese Software jenseits der Möglichkeiten eines Amateurmikroskopikers.

Einsatzgebiete professioneller Programmpakete

Die Programmpakete der Firmen Media Cybernetics (Image Pro) und SIS Imaging (AnalySIS) sind in der professionellen Bildverarbeitung mikroskopischer Dokumente weit verbreitet. Die Stapelverarbeitung wird hier insbesondere zur 3D-Visualisierung in den Materialwissen-

Abb. 1: Speisemöhre (*Daucus carota* L. ssp. *sativus*), Saatgut. MicroPicS, 15 Einzelbilder. Maßstrich 0,5 mm. – Abb. 2: Klatschmohn (*Papaver rhoeas*), Saatgut. HeliconFocus, 12 Einzelbilder. Maßstrich 0,5 mm.

schaften eingesetzt, um aus einem Stapel Bilder, die aufeinander folgend in unterschiedlichen Ebenen fotografiert wurden, einen dreidimensionalen Körper zu errechnen. Beispiel: Visualisierung von Lackschäden. Die Errechnung eines scharfen Bildes aus einem Stapel teilscharfer Einzelaufnahmen größerer dreidimensionaler Objekte leistet diese Software natürlich ebenfalls. Das Institut für angewandte Botanik in Hamburg hat Saatgut (Abb. 1 und 2) sehr vieler aktueller und älterer Gemüsesorten mit Hilfe des Softwarepaketes AnalySIS dokumentiert.

Voraussetzungen für die Anwendung der Stapeltechnik

Sollen von einem Objekt mehrere aufeinander folgende Bilder unterschiedlicher Fokalebenen fotografiert werden, müssen die Objekte umso unbeweglicher sein, je mehr Ebenen aufgenommen werden. Mit viel Glück und Ausdauer kann man 3–4 Einzelaufnahmen eines Wasserflohs während einer kurzen Bewegungspause schießen. Ersatzweise kann hier auf Videosequenzen zurückgegriffen werden. Dabei kann man versuchen, durch passendes Fokussieren

Abb. 3: Stubenfliege (*Musca domestica*), Portrait. MicroPicS, 29 Einzelbilder. Maßstrich 0,5 mm. – Abb. 4: Regenbremse (*Haematopota* spec.), Portrait. HeliconFocus, 48 Einzelbilder. Maßstrich 0,5 mm.

Abb. 5: Foraminiferenskelett (*Peneroplis*). MicroPicS, 8 Einzelbilder. Maßstrich 0,2 mm. – Abb. 6: Radiolarienskelett. Photoshop manuell, 19 Einzelbilder.

bei laufender Video-Aufzeichnung entsprechende Bildsequenzen zu gewinnen. Für 30-40 Aufnahmen eines Fliegen- oder Bremsenportraits (Abb. 3 und 4) ist es leider notwendig, das Insekt abzutöten. Objekte aus der unbelebten Natur wie Mikrofossilien oder rezente Foraminiferenschalen sind unproblematisch (Abb. 5 und 6). Die Objekte sollten während der Aufnahmen ausreichend in ihrer Lage fixiert sein, sonst hat die Software später eventuell Probleme, die Ebenen zur Deckung zu bringen. Insbesondere beim Einsatz von Spiegelreflextechnik ist auf ausreichende Befestigung der Objekte auf dem Probenträger zu achten. Kleine Foraminiferenschalen oder leichte Saatgutformen wandern sonst bei jedem Spiegelschlag beziehungsweise Verschlussauslösen.

Ein Mikroskop ist dem Einsatz einer Stereolupe vorzuziehen, da häufig der Bildversatz bei Aufnahmen durch eine Stereolupe nicht ausreichend von den einzelnen Programmen korrigiert werden kann. Die Wahl mikroskopischer Kontrastverfahren ist für Zwecke der Stapelbearbeitung leicht eingeschränkt. Die Dokumentation im Hellfeld ist unproblematisch, vorausgesetzt die Aperturblende wird nicht übermäßig zugezogen. Jede Kontrastkante wird im errechneten Bild als scharf erkannt. Daher gelangen auch kleinste, unerwünschte Partikel bei entsprechender Aperturblendeneinstellung ins Endresultat. Phasenkontrast ist häufig bei räumlich ausgedehnten Objekten, die hier im Vordergrund stehen, unbrauchbar. Halo-Effekte und Überstrahlen führen zu unbrauchbaren Resultaten nach der Stapelverarbeitung. Dunkelfeldverfahren und Verwandte wie die Rheinbergbeleuchtung sind brauchbar, wenn knapp belichtet wird, um Überstrahlungen zu vermeiden. Bilder im Differentiellen Interferenzkontrast (DIC) sind ebenfalls geeignet, da mit diesem Verfahren eine optische Schnittführung realisierbar ist, sofern die Aperturblende ganz geöffnet bleibt und der Kontrast nicht zu stark eingestellt wird. Die Interpretation der gerechneten Ergebnisse mit diesem Verfahren ist jedoch schwierig. Die Auflichtbeleuchtung ist mit improvisierten Mitteln beim Einsatz niedrig vergrößernder Objektive durchaus brauchbar. Durch den großen Arbeitsabstand kann das Objekt auch ohne Auflichtilluminator gut ausgeleuchtet werden.

Die Belichtung der Einzelbilder sollte möglichst konstant sein. Manuelle Einstellung ist allen

Automatiken vorzuziehen. Geringe Unterschiede in den Einzelbildern bei verschiedenen Parametern wie Farbe oder Intensität könnten später unerwünschte Artefakte bei der Berechnung des Gesamtbildes hervorrufen. Die aktuellen Versionen der Softwarepakete können und müssen Unterschiede der Einzelbilder durch spezielle Algorithmen ausgleichen. Wenn die Einzelbilder allerdings stark unterschiedlich sind, versagt der Ausgleich. Bei der Auflichtbeleuchtung großer Objekte wie Fliegen oder Pflanzenteilen ist auf ausreichende Konstanz und möglichst gleich bleibende Entfernung der Lichtquelle vom Objekt zu achten. Lösungen mit weißen LEDs brachten hierbei gute Resultate (Abb. 7).

Eine übermäßige Schärfung oder Farbintensivierung der Kamera sollte abgeschaltet werden. Zu starke JPEG-Kompression erzeugt bei ungünstigen Objekten ebenfalls Phantomkanten. Hier sollte die beste Qualitätsstufe mit geringster Kompression gewählt werden. Ein leicht

Abb. 7: LED Auflichtbeleuchtungseinrichtung.

Abb. 8: Stockrose (*Alcea rosea*), Narbe mit Pollenkörnern. CombineZ, 9 Einzelbilder. Maßstrich 0,2 mm. – Abb. 9: Chicoree (*Cichorium intybus*), Narbe mit Pollenkörnern. HeliconFocus, 16 Einzelbilder. Maßstrich 0,5 mm.

fehlerhafter Weißabgleich kann später am Gesamtbild korrigiert werden.

Die Programmpakete im Einzelnen

Die folgende Auswahl an Software für den Zweck der Schärfentiefenerhöhung ist subjektiv und branchenüblich kurzlebig. Schnelle Updates und weitere Neuerscheinungen können kurzfristig Verschiebungen ergeben. Auch habe ich hier nur solche Software ausgewählt, mit der genügende Erfahrung gesammelt werden konnte. Die Zielgruppe für diese Programmpakete ist der Mikroskopiker, der sich mit digi-

Abb. 10: *Micrasterias rotata* (DIC). CombineZ, 11 Einzelbilder. Maßstrich 20 µm.

taler Aufnahmetechnik befasst und räumlich ausgedehnte Objekte durchgängig scharf abbilden will. Lohnende Objekte kennt sicherlich jeder, der sich mit Mikrofotografie beschäftigt. Die gesamte Bandbreite mikroskopischer Objekte wäre hier zu nennen, die Reihenfolge stellt keine Wertung dar: Mikrofossilien wie Radiolarien und Foraminiferen; rezenter Feinschill, beispielsweise Sklerite von Schwämmen oder Holothurien; Pflanzengewebe wie zum Beispiel Aerenchyme; Teile von Insekten wie Köpfe von Fliegen; kleine Pflanzenteile wie Blütenanlagen, Narben mit Pollenkörnern (Abb. 8 und 9) oder Samen; Wasserbewohner im weitesten Sinne wie zum Beispiel Zieralgen (Abb. 10).

Alle hier vorgestellten Programme laufen unter Windows, MAC-Anwender sind leider etwas benachteiligt. Sie müssen sich auf Photoshop und HeliconFocus beschränken. Die detaillierte Beschreibung von Bedieneroberflächen und Parametervariationen jeder besprochenen Software würden den Rahmen dieses Erfahrungsberichtes bei weitem sprengen. Voraussetzung ist daher, dass der Mikroskopiker sich eingehend mit der jeweiligen Software beschäftigt und die entsprechenden Anleitungen wenigstens überfliegt.

Stapeln in Photoshop

Das Photoshop-Paket der Firma Adobe ist seit Jahren der Standard in der Bildbearbeitung (Abb. 11). Prinzipiell können alle Bildbearbeitungsprogramme, die eine Ebenentechnik be-

Abb. 11: Stapeln in Photoshop: Ebenenpalette und Aktionenpalette.

herrschen, für diese Aufgabenstellung benutzt werden. Wie bereits angedeutet, kann Photoshop die Kombination der Schärfeebenen nicht selbsttätig berechnen, Handarbeit ist angesagt. Eine ähnliche Vorgehensweise ist bereits an dieser Stelle beschrieben worden (Günther, 2002). Mehr als 20 Einzelbilder sollten nicht verwendet werden. Die Übersicht geht ansonsten sehr schnell verloren. Die folgenden Bearbeitungsschritte führen meiner Erfahrung nach zu passablen Ergebnissen: (i) Aufnehmen der Einzelbilder in der richtigen Reihenfolge, das heißt das Bild mit der am weitesten vom Objektiv entfernten Fokalebene ist das unterste Bild des Stapels. (ii) Laden des untersten Bildes; dies ist der Hintergrund für alle folgenden. (iii) Nachfolgende Fokalebenen laden und jeweils zweimal als entsprechende Ebenen stapeln (STRG-A, STRG-C, STRG-V, STRG-V). (iv) Benennen wenigstens einer der doppelten Ebenen zur Orientierung. Für jeweils das untere der Doppelbilder folgende Schritte ausführen (diese Befehlsfolge wird als Aktion in Photoshop aufgezeichnet):

1. Selektiver Weichzeichner, nur Kanten, Radius circa 48, Schwellenwert circa 46, anpassen je nach Objekt (findet scharfe Kanten). 2. Helle Bereiche vergrößern, circa 3–4 Pixel (bezieht Umgebung der scharfen Bereiche ein). 3. Auswahl Farbbereich, weißen Bereich mit Pipette, Toleranz circa 2 (Auswahl dieser scharfen Teile). 4. Weiche Auswahlkante, circa 5 Pixel. 5. Auswahl abrunden, circa 3–6 Pixel (Vermeiden von pixeligen Übergängen der Ebenen, "weiche Ebenen"). <Ende der aufgezeichneten Befehlsfolge>.

Das Ergebnis ist eine Fließmarkierung der scharfen Bildbereiche mit Überlappung. Diese Auswahl wird als Ebenenmaske dem oberen identischen Ebenenbild hinzugefügt. Anschließend wird die jeweils untere Ebene wieder ausgeblendet, damit nur das jeweilige Teilbild mit aktiver Maske angezeigt wird. Die Bearbeitungsschritte werden auf alle (doppelten) Ebenen angewendet. Bei geschickter Wahl der Parameter der Filter oder der Vergrößerung der Auswahl erhält man ein durchgehend scharfes Bild. Feinkorrekturen erfolgen auf den Masken mit dem Pinsel-Werkzeug (schwarz = abdecken, weiß = durchlassen). Die Bildinformation wird nicht modifiziert. Der zeitliche Aufwand für einen Stapel mit 20 Bildern beträgt etwa 1-2 Stunden, je nach manueller Korrekturnotwendigkeit.

Stapeln mit CombineZ5

Dieses Softwarepaket ist Freeware, die Nutzung unterliegt keinen Einschränkungen. Der Autor, Alan Hadley, bietet mittlerweile die Version 5 zum Download. Programmsprache ist Englisch. Die Bedienungsanleitung ist online verfügbar, aber leider etwas umständlich zu lesen. Die aktuelle Version ist etwas bedienerfreundlicher gestaltet als die Vorgänger. Einige Eigenwilligkeiten blieben jedoch erhalten. Diese kleinen Unannehmlichkeiten sind angesichts der Resultate schnell vergessen. Durch den Einsatz "harter" Kombinationsalgorithmen, die für Makroaufnahmen optimiert waren, waren die Vorgängerversionen von CombineZ nicht für alle mikroskopischen Aufgabenstellungen optimal. Die Version 5 ist in dieser Hinsicht deutlich verbessert worden. Die Abfolge für einen Bilderstapel gestaltet sich recht simpel: Im Menüpunkt File - new werden die Bilder des Stapels ausgewählt und geladen. Es erscheint ein Statusfenster mit Anzeige der verschiedenen Aktionen, die das Programm ausführt. Ist die Ladung abgeschlossen, erfolgt die eigentliche Berechnung mit Macro - Do Stack. Nachdem die Software ausführlich berichtet hat, welche Einzelschritte ausgeführt wurden,

erscheint das Ergebnis. Die Parameter der Verarbeitungsalgorithmen können in weiten Bereichen verändert werden, vergleichbar mit den Wahlmöglichkeiten in Photoshop.

Stapeln mit HeliconFocus

Dieses Programmpaket ukrainischer Autoren um Danilo Kozub ist Shareware, nach 30 Tagen Testzeit muss man die Software für € 99 kaufen. Ein moderater Preis angesichts der Leistungsfähigkeit. Programmsprache ist Englisch. Seit Januar 2006 ist auch eine MAC-Version verfügbar. Die Vorgehensweise ist analog zu CombineZ. Zunächst werden die Einzelbilder in das Hauptfenster geladen. Sofort sieht man das oberste Bild, andere Bilder des Stapels kann man intuitiv mit der Maus aktivieren, verschieben, deaktivieren und löschen. Die wichtigen Einstellparameter sind übersichtlich in einem separaten Fenster untergebracht. Die Standardparameter für den Radius, also den einbezogenen Bereich um eine Scharfe Kante, und Smoothing, die Weichheit der Übergänge zwischen den einzelnen Ebenen, bringen bereits gute Ergebnisse. Durch die außerordentliche Geschwindigkeit des Programmablaufes macht es Spaß, schnell einmal verschiedene Parameter durchzuspielen. Für 30 Bilder mit 2000 × 3000 Bildpunkten braucht HeliconFocus etwa 2 Minuten bei einer P4 CPU mit 2,6 GHz und 500 MB Hauptspeicher. Bei gleichen Ausgangsdaten braucht CombineZ5 15 min, MicroPicS je nach Algorithmus 15-20 Minuten. Nicht nur die Geschwindigkeit ist beeindruckend, im Gegensatz zu CombineZ kann man die Entstehung des Gesamtbildes live beobachten. Besonders mit großen Bilderstapeln ist dies sehr unterhaltsam.

Stapeln mit MicroPicS

Dieses Programmpaket des Autors Dr. Bernhard Wiedemann ist wie CombineZ Freeware. Programmsprache ist Deutsch. Das Programmpaket beinhaltet sowohl Bildbearbeitung wie auch Bildverarbeitung. Ausgehend von den Grundfunktionen eines Bildbrowsers hat der Autor einige Besonderheiten realisiert. Viele Bildbearbeitungsfunktionen, die große kommerzielle Programmpakete bieten, wurden implementiert, teilweise mit erweiterter Funktionalität. So zeigt zum Beispiel die Histogrammanzeige für Einzelbilder nicht nur die Verteilung der Helligkeit als Graustufenhistogramm, sondern auch die Verteilung der Farben Rot, Grün und Blau. Funktionen wie Tonwertkorrektur, Drehen und Skalieren, Ebenenverrechnung, Pipette, Pinsel usw. sind implementiert. Daneben bietet die Software die Kombination von Schärfeebenen im halbautomatischen Modus. Zunächst werden, ähnlich wie für Photoshop beschrieben, für jedes Bild die scharfen Bereiche errechnet und eine entsprechende Maske erstellt. Die Parameter für die Erstellung der Masken sind in sehr weiten Grenzen variabel. Nach Erstellung der Masken, die die unscharfen Bereiche jedes Einzelbildes abdecken, wird in einem weiteren Schritt das Gesamtbild errechnet. Auch hier wird das Endbild live aufgebaut. Jede einzelne Maske kann manuell modifiziert werden oder auch nach Photoshop exportiert werden. In der aktuellen Version 1.8 sind verschiedene vollautomatische Varianten realisiert, bei denen die manuelle Nachbearbeitung der Masken wesentlich seltener, wenn nicht überflüssig wird. Voreingestellte Parameter führen per Mausklick zum fertigen Ergebnis. Weiterhin besteht die Möglichkeit, die Überlappung der Masken vorab zu kontrollieren. Hiermit können komfortabel Löcher in den späteren Fusionsebenen beseitigt werden. Manuellen Korrekturen steht in diesem Programmpaket ein weiter Bereich offen.

Möglichkeiten und Grenzen

Ein beliebiges Objekt kann theoretisch beliebig tief scharf gerechnet werden. Begrenzend wirken nur die technische Durchführbarkeit und die Geduld des Fotografen. Dabei sollte aber beachtet werden, dass das menschliche Auge Schärfe und Unschärfe braucht, um eine Orientierung im Raum überhaupt zu ermöglichen. Wenn alle Details scharf gerechnet werden, ist das Ergebnis ebenso irreführend und künstlich wie ein komplett unscharfes Bild. Ebenso darf der Einfluss des mikroskopischen Kontrastverfahrens nicht außer Acht gelassen werden. Stapelaufnahmen im DIC sind hinsichtlich der Interpretation der Objektähnlichkeit schwierig. Zeitweise errechnen HeliconFocus und CombineZ in Auflichtaufnahmen Bilder, die nicht der Realität entsprechen. Dies betrifft zwar nur kleine Details, sollte aber bei Interpretationen

nicht unberücksichtigt gelassen werden. Insbesondere in den Fliegenportraits lagen einige Haare der Tiere nach der Berechnung nicht in der richtigen Reihenfolge übereinander, die Algorithmen haben quasi die räumliche Anordnung anders interpretiert, als das in der Realität der Fall war. Eine befriedigende Korrektur konnte nur mit MicroPicS erreicht werden, da hier manuelle Eingriffe in die Masken möglich sind.

Fazit

Alle hier vorgestellten Programmpakete beherrschen die Verarbeitung vom Bilderstapeln zu einem tiefenscharfen Bild. In Photoshop ist dies mit erheblichem manuellen Aufwand verbunden. Die halbautomatischen Programme CombineZ und MicroPicS bieten viele Möglichkeiten, die Verarbeitungsparameter in weiten Grenzen den Ausgangsdaten optimal anzupassen. Die Rechenzeiten für größere Stapel sind bedingt durch die Entwicklungsumgebung der Programme erheblich. HeliconFocus ermutigt durch die intuitive Bedienung und die schnellen Rechenzeiten zu umfangreichen Variationen und Optimierungen, beispielsweise durch gezieltes Deaktivieren verschiedener Einzelbilder. Schlussendlich sieht man den fertigen Bildern zum jetzigen Stand der Programmpakete nicht an, mit welcher Software die Berechnung stattgefunden hat. Der Endanwender hat die Möglichkeit, jedes der angesprochenen Programme wenigstens 30 Tage zu testen und mit eigenen Daten entsprechend zu auszuprobieren.

Literaturhinweise

- Günther, G.: Hardware und Software für Mikroskopiker – Die Adaption der NIKON Coolpix 990 und die Anwendung aktueller Programme zur Bildbearbeitung. Mikrokosmos 91, 369–376 (2002).
- Lange, N.: Bildverarbeitung in der Mikroskopie Teil 2. Mikrokosmos 92, 199–206 (2003).
- Lange, N.: Verarbeitung von Fokusebenenstapeln in der Mikroskopie. Mikrokosmos 92, 305–310 (2003).
- Lange, N.: Bildverarbeitung in der Mikroskopie. Mikrokosmos 92, 79–82 (2003).
- Lüthje, E.: Auflichtmikroskopie mit optischen Veteranen. Mikrokosmos 93, 151–154 (2004).
- Lüthje, E.: Auflichtfotos mit einem alten Mikroskop. Mikrokosmos 94, 193–197 (2005).
- Mathias, A., Mathias, E.: Tiefenschärfe in mikroskopischen Bildern mittels PC. Mikrokosmos 90, 295-299 (2001).
- Schwarz, P.: Saatgutreinheit von Gemüse und Kräutern. Gemüse 38, 17–19 (2002).

Internetlinks:

Homepage CombineZ: http://www.hadleyweb.pwp.blueyonder.co.uk/ CZ5/combinez5.htm Homepage HeliconFocus : http://heliconfilter.com/pages/index.php?id=509 Homepage MicroPicS: http://www.bewie.de/ Download/MicroPicS/000_Einstieg.htm

Verfasser: Gerd Günther, Knittkuhler Straße 61, 40629 Düsseldorf; E-Mail: gerd.guenther@rp-plus.de. Mitglied im Arbeitskreis Mikroskopie im Freundeskreis Botanischer Garten Köln und Mikroskopische Arbeitsgemeinschaft der Naturwissenschaftlichen Vereinigung Hagen e.V.

Naghright

Mikroskopisch-Botanisches Praktikum in der Berliner Mikroskopischen Gesellschaft – Ein Erfahrungsbericht

Anfang des vergangenen Jahres fiel uns das Buch Mikroskopisch-Botanisches Praktikum von Gerhard Wanner in die Hände und beim ersten Durchsehen gefielen uns sofort die übersichtliche Gliederung, die leicht nachvollziehbaren Schritt für Schritt Anleitungen und die reiche Bebilderung. So wurde die Idee geboren, in der Berliner Mikroskopischen Gesellschaft mit einer Gruppe interessierter Mitglieder dieses Praktikum durchzuarbeiten. Seit August 2005 findet einmal monatlich ein Übungsabend in den Räumen des Instituts für Zoologie in Berlin Dahlem statt (Abb. 1). Dank des Thieme Verlages, Stuttgart, der die Veranstaltung mit einer großzügigen Buchspende unterstützt hat, besitzt jeder Teilnehmer ein Exemplar des Buches und kann sich so auf das nächste Thema vorbereiten und das Gesehene zu Hause noch einmal nachlesen und vertiefen.

Das Buch besteht aus einem Einführungsteil, der kurz auf das Lichtmikroskop, seine richtige Einstellung und verschiedene Kontrastverfahren eingeht, sowie eine Übersicht über die mikroskopische Praxis vermittelt. Besonderer Wert wird auf das Anfertigen eigener Zeichnungen gelegt, was unserer Meinung nach auch in der heutigen Zeit immer noch eine wertvolle Option für die Dokumentation des Gesehenen ist. Weiterhin werden das Herstellen von Handschnitten und das Färben von Präparaten abgehandelt. Auch die Übersicht über alle für das Praktikum benötigten Werkzeuge und Reagenzien empfanden wir als gut durchdacht und hilfreich. Abgerundet wird dieser erste Teil durch einen Exkurs in die Elektronenmikroskopie. Viele Abbildungen im Raster- oder Transmissions-Elektronenmikroskop ergänzen dann auch den zweiten Teil des Buches, welcher der Präparation und Mikroskopie der verschiedenen pflanzlichen Gewebe gewidmet ist.

Dieser zweite Teil ist nach den verschiedenen pflanzlichen Organen und spezifischen Geweben gegliedert. Voran ist das jeweilige Kursziel des Kapitels gestellt, welches nach *Präparation* und *Beobachtungen* unterteilt ist. Zahlreiche Zeichnungen und Fotografien veranschaulichen die Präparationsschritte und die zu beobachtenden Strukturen. Außerdem werden Hinweise gegeben, was gezeichnet werden sollte.

Diese gute didaktische Strukturierung erleichtert uns die Kursleitung, so dass wir nur noch das Pflanzenmaterial zu den Übungsabenden beschaffen müssen. Die Objekte sind bis auf wenige Ausnahmen relativ einfach zu erhalten oder anzuzüchten. Allerdings werden ein paar wenige exotischere Pflanzen benö-

Abb. 1: Präparation und Mikroskopieren mit Hilfe des "Wanner".

tigt, auf die wir ohne die freundliche Unterstützung des Reviergärtners des Botanischen Gartens Berlin wohl hätten verzichten müssen.

Die Präparation der Objekte wird an Frischmaterial vorgenommen und die Schnitte werden ausschließlich mit der Hand angefertigt, so dass ein Minimum an Ausrüstung erforderlich ist. Die Übungen sind einfach nachzuvollziehen und somit auch für unsere jugendlichen Teilnehmer geeignet. Das Herstellen eines gelungenen Präparates erfordert allerdings etwas Übung, was einem auch das beste Buch nicht abnehmen kann. Auch sollte, wie im Vorwort erwähnt, ein botanisches Lehrbuch mit herangezogen werden. Zusätzlich zum Buch ist eine CD erhältlich, auf der sämtliche Abbildungen gespeichert sind.

Nachdem wir nun etwa die Hälfte des Praktikums absolviert haben, können wir die Verwendung dieses Buches in einem Kurs zur Nachahmung empfehlen.

Martina und Günther Zahrt, Berliner Mikroskopische Gesellschaft

Calciumoxalat-Kristalle in Pflanzen Teil 2: Entwicklung und Musterbildung

Eberhard Schnepf

Im ersten dieser beiden Artikel über Oxalatkristalle in Pflanzen wurde gezeigt, wie man sie mikroskopisch identifizieren und untersuchen kann, und welche Kristalltypen und Kristallformen es gibt (Schnepf, 2006). Wie entstehen nun aber diese Kristalle und die Kristall-Idioblasten, in denen sie gebildet werden? Wie hängen die Blattentwicklung und die Kristallentwicklung zusammen? Was passiert, wenn das Blatt altert und abstirbt? Dies alles wird hier im zweiten Teil besprochen.

ie Kristallentstehung und Kristallentwicklung lässt sich besonders gut bei Pflanzen mit Raphiden beobachten, am besten nach Aufhellung mit Phenol (Schnepf, 2006). Wein, *Impatiens*-Arten und Wasserlinsen sind Pflanzen mit Raphiden und leicht zu beschaffen. Ich habe vorwiegend Blätter vom Hexenkraut, *Circaea lutetiana* (Oenotheraceae), untersucht, eine in feuchten Wäldern häufige Pflanze. Manche Details der Kristallentstehung lassen sich lichtmikroskopisch nicht, elektronenmikroskopisch nur mit Schwierigkeiten erkennen. Sie werden hier kurz referiert.

Bildung und Wachstum der Kristalle

Zellen, in denen Calciumoxalat-Kristalle gerade entstehen, findet man – von Ausnahmen abgesehen – nur in jungen Pflanzenteilen. Anfangs sind die Kriställchen so klein und zart, dass sie lichtmikroskopisch fast nur im Polarisationsmikroskop (oder im Differentialinterferenzkontrast-Mikroskop, in dem man ja auch mit polarisiertem Licht arbeitet) zu entdecken sind. Abbildung 1 zeigt das Mesophyll eines sehr jungen Blattes von *Circaea*. Die Zellen sind noch in der Teilungsphase, sind noch nicht

Abb. 1–3: *Circaea lutetiana.* Abb. 1: Sehr junges Blatt mit sehr jungem Raphiden-Idioblast. Vergr. 430fach. – Abb. 2: Sehr junges Blatt mit sehr jungen und jungen Raphiden-Idioblasten. Vergr. 430fach. – Abb. 3: Junges Blatt mit fast voll entwickeltem Raphiden-Idioblasten. Vergr. 430fach.

differenziert und meist etwa 10–15 μ m groß. Eine Zelle – ein Raphiden-Idioblast – fällt durch ihre Größe und ihren Inhalt auf. Sie misst 13 × 30 μ m, ist also doppelt so lang wie ihre Nachbarzellen, und enthält winzige, feine, nadelförmige Kristalle, welche je nach ihrer Orientierung zum polarisierten Licht hell oder dunkel erscheinen. Diese Nadeln sind individuell kaum erkennbar und scheinen noch nicht gut geordnet zu sein, was aber auch eine Folge der Präparation sein kann.

Ihre Menge nimmt schnell zu, auch ihre parallele Ordnung verbessert sich, wobei auch der Idioblast wächst (Abb. 2). Die Nadeln bilden hier nun ein Bündel, das den Idioblasten fast völlig ausfüllt. Dieser streckt sich in der Folge stark, wobei aber der Zelldurchmesser nur wenig zunimmt. Die Nadeln werden dicker und länger und sind dann auch im Hellfeld gut sichtbar (Abb. 3). Das Raphidenbündel reicht

Abb. 4 und 5: Circaea lutetiana. – Abb. 4: Ausgewachsene, aber noch nicht ganz ausdifferenzierte Raphiden-Idioblasten aus dem basalen Bereich eines 70 mm langen, voll entwickelten Blattes. Vergr. 115fach. – Abb. 5: Ausdifferenzierte Raphiden-Idioblasten aus dem apikalen Bereich des Blattes von Abbildung 4. Vergr. 115fach.

manchmal bis fast an die Endwände, ist oft aber auf den Mittelteil der Zelle beschränkt. Die nadelfreien Zellpole sind nach der Aufhellung mit Phenol meist mit einem schaumig erscheinenden Material erfüllt. Der Idioblast in Abbildung 3 ist etwa 200 µm lang und 30 µm dick. Die Mesophyllzellen haben sich hier bereits differenziert und messen im Schwammparenchym 20–25 µm, sind also weit weniger gewachsen als der Kristall-Idioblast, haben sich aber im Gegensatz zu ihm mehrfach geteilt.

Ausgewachsene Raphiden-Idioblasten sind schlauchförmig und erreichen Längen von etwa 300 μ m, wobei das Kristallbündel die Zelle oft nur halb ausfüllt. Bei jungen Idioblasten erscheint die Zellwand im gleichen Kontrast wie die Wände der Mesophyllzellen (Abb. 4). In voll entwickelten Idioblasten ist sie deutlich stärker lichtbrechend und wohl auch dicker (Abb. 5). Sie grenzen in den *Circaea*-Blättern an Schwamm- und Palisadenparenchymzellen und auch an Interzellularen.

Ähnlich wie im *Circaea*-Mesophyll läuft wohl auch die Raphiden-Entwicklung bei anderen Pflanzen ab. Drusen entstehen um eine winzige Zusammenballung von prismatischen oder plattenförmigen Kriställchen um ein anscheinend nicht kristallines Zentrum. Die Kriställchen wachsen und vermehren sich. Die Drusenzellen werden dabei oft nicht größer als ihre Nachbarzellen.

Die Kristalle entstehen fast immer in Vakuolen, und zwar nicht durch eine einfache physikalisch-chemische Ausfällung von Oxalsäure, die im Stoffwechsel wohl aus Ascorbinsäure synthetisiert wird, und Calcium-Ionen. Die Calcium-Ionen werden über die Wurzeln aufgenommen und gelangen durch Membrankanäle und -pumpen über die Plasmamembran und den Tonoplasten in die Vakuole (Franceschi und Nakata, 2005). Vielmehr scheinen spezifische Proteine dabei eine Rolle zu spielen (Li et al., 2003), ebenso wie ein Vakuolenschleim (Webb et al., 1995).

Elektronenmikroskopisch hat man gefunden, dass die Kristalle in Kristallkammern gebildet werden (Franceschi und Nakata, 2005; Horner und Whitmoyer, 1972; Kostman und Franceschi, 2000). Diese bestehen aus Membranähnlichen Strukturen in den Vakuolen, wobei es sich aber nicht um Biomembranen im engen Sinn handelt, sondern um Präzipitationsmembranen (Mazen et al., 2004), denn sie entstehen de novo und haben freie Enden (Pennisi et al., 2001b), was bei echten Biomembranen nicht vorkommt. Man nimmt allgemein an, dass die erwähnten Proteine, Vakuolenschleime und die Kristallkammern bestimmen, welcher Kristalltyp entsteht (Webb, 1999).

Fütterungsversuche mit radioaktiven Isotopen haben gezeigt, dass bei den Raphiden der Aracee *Pistia stratoides*, dem Wassersalat, Calcium anfangs überall im Raphidenbündel eingebaut wird, später nur an den Enden, und zwar an beiden Enden. Das bedeutet, dass sich anfangs die Nadeln verlängern und verdicken, später nur noch verlängern, und zwar offenbar an beiden Enden (Kostman und Franceschi, 2000). Auch bei *Pistia* ist dies so, bei der eine Raphide ein spitzes und ein breiteres Ende hat. Drusen wachsen, wie zu erwarten, an ihrer ganzen Oberfläche (Volk et al., 2002).

Kristalle in Interzellularen und in Zellwänden

Ist der gerade beschriebene Weg der einzige, der zur Bildung von Calciumoxalat-Kristallen führt? Ein Querschnitt durch den Spross vom Tausendblatt (Myriophyllum) zeigt ein für Wasserpflanzen typisches Aerenchym. Die großen Interzellularen des Luftgewebes werden durch septenartige Zellplatten voneinander getrennt An diesen Zellplatten sitzen Drusen und ragen in die Interzellularen hinein, scheinbar nicht in Zellen eingeschlossen (Abb. 6). Ein Querschnitt durch einen sehr jungen Spross zeigt aber, dass auch hier die Drusen ganz normal entstehen. Sie werden in den Vakuolen von kleinen Zellen gebildet, die den Septen aufsitzen, also in Drusen-Idioblasten (Abb. 7). Wenn sich der Spross weiter entwickelt, kollabiert diese Zelle. Nur die Druse bleibt übrig, von kaum sichtbaren Wandresten umhüllt.

Auf etwas andere Weise werden Calciumoxalat-Kristalle in Zellwände eingelagert. Abbildung 8 zeigt einen Querschnitt durch das Blatt eines Drachenbaumes (*Dracaena*). In den Außenwänden der Epidermis erkennt man die Kristalle. Pennisi et al. (2001a) klärten durch licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen, wie diese in die Zellwand gekommen sind. In einem frühen Stadium der Blattentwicklung gibt es Kristallkammern zwischen der Plasmamembran und der primären Zellwand. In diesen Kristallkammern entstehen die Kristalle. Später werden, von der Plasma-

Abb. 6 und 7: *Myriophyllum aquaticum.* Abb. 6: Ausgewachsener Spross, Querschnitt. Druse am Rand einer Aerenchym-Interzellulare. Vergr. 500fach. – Abb. 7: Junger Spross, Querschnitt. Eine Druse entwickelt sich in einer blasenförmigen Zelle am Rande eine Aerenchym-Interzellulare. Vergr. 500fach.

Abb. 8: *Dracaena cinnabarii.* Blattquerschnitt. Kristalle in der Epidermisaußenwand. Vergr. 640fach.

membran ausgehend, sekundäre Wandschichten an die Primärwand angelagert, wodurch die Kristalle in die Wand eingeschlossen werden. An den Außenwänden der sich entwickelnden Schließzellen der Spaltöffnungen fehlen die Kristallkammern. Hier gibt es dann auch keine Wandkristalle. Diese Befunde weisen auf die Bedeutung der Kristallkammern bei der Kristallbildung hin, ein Prozess, der aber immer noch nicht voll verstanden ist.

Auch die Kristalle in den Außenwänden der Blattepidermen der Eibe und anderer Pflanzen könnten auf ähnliche Weise eingelagert werden. Es ist aber nur schwer vorstellbar, dass das auch bei Kristallen in der Mittellamelle der Fall ist. Eine Übersicht über das Vorkommen von Calciumoxalat-Kristallen in Zellwänden gibt Küster (1956).

Entwicklung des Verteilungsmusters der Raphiden-Idioblasten in Blättern des Hexenkrauts

Die Entwicklung des Verteilungsmusters von Raphiden-Idioblasten soll hier an Blättern des Hexenkrautes (*Circaea lutetiana*) gezeigt werden. Maß für das relative Blattalter waren die Stellung des Blattes an der Pflanze und seine Größe. Beides ermöglicht keine ganz sichere Aussage, denn die Pflanzen können verschieden groß werden, also verschieden viele Blattpaare tragen, und die oberen Blätter erreichen nicht die Größe der unteren Blätter. Dennoch sind recht konkrete Aussagen möglich. Ein sehr junges Blatt (oberstes Blattpaar, Länge 7 mm) hatte im basalen Teil (2 mm vom Blattstiel entfernt) Idioblasten mit Raphiden nur entlang des Mittelnervs (Abb. 9). Die Nadelbündel sind schon erstaunlich groß. Die Blattspreite war weitgehend frei von Raphiden, und Seitennerven gab es hier noch nicht. Weiter vorn, in der Blattmitte, waren der Mittelnerv und die sich hier differenzierenden Seitennerven 1. Ordnung von ziemlich großen Raphidenbündeln begleitet (vergl. Zindler-Frank, 1995). In den Intercostalfeldern zwischen den Nerven gab es viele kleine und sehr kleine Raphidenbündel (Abb. 10).

Von einem 16 mm langen Blättchen stammen die Abbildung 11 aus dem basalen, Abbildung 12 aus dem mittleren und Abbildung 13 aus dem vorderen Bereich. Ein Gradient in der Raphiden-Entwicklung ist sehr deutlich sichtbar. Basal überwiegen kleine, kurze Bündel, obwohl einige größere auch schon vorhanden sind. Diese werden in der Mittelzone zahlreicher, aber es gibt auch weiterhin viele kleine Bündel. Vorn sind diese nur noch selten, größere Bündel bestimmen das Bild. Hier differenzieren sich also nur noch wenige neue Idioblasten, aber die bereits existierenden Bündel vergrößern sich. Gleichzeitig rücken die Idioblasten auseinander. Ihre Zahl pro Blattfläche nimmt ab, weil sich die zwischen ihnen liegenden zukünftigen Mesophyllzellen teilen und vergrößern.

Abb. 9 und 10: *Circaea lutetiana*. Abb. 9: Basaler Bereich eines sehr jungen, 7 mm langen Blattes. Raphiden-Bündel nur am sich entwickelnden Mittelnerv. Vergr. 140fach. – Abb. 10: Mittlerer Bereich des Blattes von Abbildung 9. Große Raphiden-Bündel nur an den sich entwickelnden Nerven, sehr kleine Raphiden-Bündel in den Interkostalfeldern der Blattspreite. Vergr. 140fach.

Neben dem Entwicklungsgradienten Blattbasis - Blattspitze gibt es einen weiteren: Blattinneres (weniger weit entwickelt) - Blattrand (weiter fortgeschritten). Die Abbildungen 11, 12 und 13 stammen von Intercostalfeldern aus inneren Bereichen der Blattspreite, wie auch die quantitativen Daten vom selben Blatt, die in Abbildung 14 dargestellt sind. Hierzu wurden die Längen der Raphidenbündel in Größenklassen aufgeteilt. Die Graphik zeigt, wie viele Bündel einer Klasse es in dem betreffenden Blattbereich gibt (Angaben in Prozent). Hinzugefügt sind Angaben über die Zahl der Idioblasten je 1 mm² Blattfläche. Abbildung 14 enthält außerdem zusammengefasst die entsprechenden Daten von mehreren, etwa 70 mm langen, weitgehend ausgewachsenen Blättern. Es ist offensichtlich, wie die Raphidenbündel von der Basis zur Blattspitze in jungen Blättern und beim Auswachsen der Blätter länger (und dicker) werden und wie gleichzeitig ihre Zahl abnimmt. Beides kompensiert sich aber mehr oder weniger, so dass sich die Gesamtmenge von kristallisiertem Calciumoxalat während der Blattentwicklung wohl gar nicht so stark verändert.

Wenn die Blätter ausgewachsen sind, gibt es kaum noch Unterschiede in der Bündellänge zwischen Spitze und Basis und in der Bündelzahl, wohl aber Unterschiede im Reifungsgrad der Idioblasten. Die Abbildungen 4 und 5 stammen von der Basis beziehungsweise Spitze eines 70 mm langen Blattes, welches wohl ausgewachsen, aber anscheinend noch nicht voll entwickelt war. In Abbildung 4 haben die Idioblasten schon ihre Endlängen erreicht, aber erst in Abbildung 5 sind sie voll ausdifferenziert, wie man am verstärkten Kontrast ihrer Zellwände sieht.

Die kleineren Blattnerven werden bei *Circaea* anders als die Hauptnerven nicht bevorzugt von Raphiden begleitet, hingegen aber der Blattrand. Hier sind sie parallel zur Kante orientiert. Blattzähne, die zu Hydathoden entwickelt sind, haben im Drüsengewebe keine Raphiden. In den Intercostalfeldern sind sie nicht geregelt ausgerichtet.

Die Entwicklung des Verteilungsmusters der Raphiden-Idioblasten zeigt sehr anschaulich, wie das Blatt wächst. Die Blattspitze entwickelt sich schneller als die Basis, der Rand schneller als die Mitte, wo die Phase von Zellteilungen und Zellwachstum später abgeschlossen ist. Neue Idioblasten entstehen da, wo sich die späteren Mesophyllzellen teilen und sich vergrößern. Dadurch entfernen sich die Idioblasten voneinander. Auf den ersten Blick scheinen die neuen Idioblasten in den sich vergrößernden

Abb. 11–13: Circaea lutetiana. Basaler Bereich eines jungen, 16 mm langen Blattes. Größere und kleinere Raphiden-Bündel. Vergr. 115fach. – Abb. 12: Mittlerer Bereich des Blattes von Abbildung 11. Mehr große und weniger kleine Raphiden-Bündel als im basalen Bereich. Vergr. 115fach. – Abb. 13: Vorderer Bereich des Blattes von Abbildung 11. Überwiegend größere Raphidenbündel. Vergr. 115fach.

Abb. 14: Circaea lutetiana. Anzahl der Raphidenbündel in den verschiedenen Größenklassen (Länge 0–20 µm, 20–40 µm, usw.) bei einem jungen, 16 mm langen Blatt im basalen (A), mittleren (B) und vorderen Bereich (C) sowie bei voll ausgewachsenen, 70 mm langen Blättern (D). Angaben in Prozent. Dazu jeweils die Gesamtzahl der Raphidenbündel pro mm².

Abb. 15 und 16: *Circaea lutetiana*. Fast voll entwickeltes Blatt. Zwei Paare von Raphiden-Idioblasten; die Partner sind jeweils etwa gleich weit entwickelt. Vergr. 140fach. – Abb. 16: Halb ausgewachsenes Blatt. Paar von Raphiden-Idioblasten mit unterschiedlich weit ausdifferenzierten Zellwänden. Vergr. 480fach.

Lücken zwischen den bereits existierenden Idioblasten gebildet zu werden. Das ist aber nicht immer so, denn es gibt dicht nebeneinander liegende Idioblasten, Idioblasten-Paare. Diese können etwa gleich alt sein (Abb. 15) aber auch verschieden weit entwickelt sein, wie die Unterschiede im Kontrast ihrer Zellwände zeigen (Abb. 16). Meist liegen sie parallel übereinander (Abb. 16), selten überkreuzt (Abb. 15). Solche Idioblasten-Paare sind in den Circaea-Blättern nicht selten. Bei der Schwertbohne Canavalia ensiformis kommen die Idioblasten, die hier Einzelkristalle enthalten, immer paarweise in der Blattepidermis vor (Frank, 1967).

Borchert (1990) versuchte, das Verteilungsmuster von Calciumoxalat-Idioblasten wie folgt zu erklären. Um einen sich entwickelnden Kristall herum verarmen die Zellen an Calcium. Deshalb entstehen hier keine neue Idioblasten. Wenn die Abstände zwischen den Calciumbindenden Idioblasten größer werden, also die Hemmhöfe auseinander weichen, gibt es Raum für die Differenzierung neuer Idioblasten. Die Idioblasten-Paare von *Circaea* und ähnliche Beobachtungen an Blättern von *Prunus virginiana* (Lersten und Horner, 2004), lassen sich aber durch die Vorstellungen von Borchert (1990) nicht erklären.

Calciumoxalat-Kristalle bei Alterungsprozessen

Wie in Teil 1 dargelegt (Schnepf, 2006), binden Calciumoxalat-Kristalle überschüssiges Calcium und machen es so unschädlich, geben es bei Bedarf auch wieder ab, was aber nur selten vorkommt. Für die Pflanze ist es also vorteilhaft, wenn bei Alterungs- und Sterbeprozessen die Kristalle nicht abgebaut werden. Mit dem Blattfall oder dem Abwurf von Borke wird diese dann von dem Ballast befreit. In einigen Fällen nimmt die Zahl und Größe der Kristalle beim Absterben des Blattes sogar deutlich zu. Das kann man beispielsweise in den Blättern des Liebstöckels (Levisticum officinale) beobachten. Bei der Küchenzwiebel entstehen die Kristalle in der abaxialen Epidermis der äußeren Zwiebelschuppen sogar erst dann, wenn die Zellen absterben und braun werden.

Eine Ausnahme von dieser Regel scheint es bei Weinbeeren zu geben. Während frische, reife Beeren zahlreiche Idioblasten mit Raphiden enthalten, findet man sie in Rosinen nur selten. Hier sind andere, unregelmäßige Kristalle häufig, die vermutlich hauptsächlich aus Zucker bestehen.

Literaturhinweise

- Borchert, R.: Ca²⁺ as developmental signal in the formation of Ca-oxalate crystal spacing patterns during leaf development in *Carya ovata*. Planta 182, 339–347 (1990).
- Horner, H. T. Jr., Whitmoyer, R. E.: Raphide crystal cell development in leaves of *Psychotria punctata* (Rubiaceae). J. Cell Sci. *11*, 339–355 (1972).

- Franceschi, V. R., Nakata, P. A.: Calcium oxalate in plants: Formation and function. Annu. Rev. Plant Biol. 56, 41–71 (2005).
- Frank, E.: Zur Bildung des Kristalllidioblastenmusters bei *Canavalia ensiformis* DC. I. Z. Pflanzenphysiol. 58, 33–48 (1967).
- Kostman, T. A., Franceschi, V. R.: Cell and calcium oxalate crystal growth is coordinated to achieve high-capacity calcium regulation in plants. Protoplasma 214, 166–179 (2000).
- Küster, E.: Die Pflanzenzelle. 3. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Jena 1956.
- Lersten, N. R., Horner, H. T.: Calcium oxalate crystal macropattern development during *Prunus virginiana* (Rosaceae) leaf growth. Can. J. Bot. 82, 1800–1808 (2004).
- Li, X. X., Zhang, D. Z., Lynch-Holm, V. J., Okita, T. W., Franceschi, V. R.: Isolation of a crystal matrix protein associated with calcium oxalate precipitation in vacuoles of specialized cells. Plant Physiol. 133, 549–559 (2003).
- Mazen, A. H. A., Zhang, D., Franceschi, V. R.: Calcium oxalate formation in *Lemna minor*: Physiological and ultrastructural aspects of high capacity calcium sequestration. New Phytol. 161, 435–448 (2004).
- Pennisi, S. V., McConnell, D. B., Gower, L. B., Kane, M. E., Lucansky, T.: Periplasmic cuticular calcium crystal deposition in *Dracaena sanderiana*. New Phytol. 149, 209–218 (2001a).
- Pennisi, S. V., McConnell, D. B., Gower, L. B., Kane, M. E., Lucansly, T.: Intracellular calcium oxalate crystal structure in *Dracaena sanderinana*. New Phytol. 150, 111–120 (2001b).
- Schnepf, E.: Calciumoxalat-Kristalle in Pflanzen. Teil 1: Darstellung, Formen und Funktion. Mikrokosmos 95, 65–73 (2006).
- Volk, G. M., Lynch-Holm, V. J., Kostman, T. A., Goss, L. J., Franceschi, V. R.: The role of druse and raphide calcium oxalate crystals in tissue calcium regulation in *Pistia stratoides* leaves. Plant Biol. 4, 34–45 (2002).
- Webb, M. A.: Cell-mediated crystallization of calcium oxalate in plants. Plant Cell 11, 751–761 (1999).
- Webb, M. A., Cavaletto, J. M., Carpita, N. C., Lopez, L. E., Arnott, H. J.: Intravacuolar organic matrix associated with calcium oxalate crystals in leaves of *Vitis*. Plant J. 7, 633–648 (1995).
- Zindler-Frank, E.: Calcium, calcium oxalate crystals, and leaf differentiation in the common bean (*Pha-seolus vulgaris* L.). Bot. Acta 108, 144–148 (1995).

Verfasser: Prof. Dr. Eberhard Schnepf, Dürerweg 11, 69168 Wiesloch

Aus der Industrie

Digitalkamera-Adapter Klu MVP für Mikroskope

War es vor einigen Jahren noch eher eine Seltenheit, so hat sie heute doch fast jeder, die digitale Consumer Kamera. Sie ist preisgünstig geworden, und dabei hat sie doch an Auflösung gewonnen. Die Übertragung der Bilder auf den Computer über USB ist mittlerweile an fast jedem Computer möglich. Windows XP erkennt die Kamera, ohne sie vorher installieren zu müssen. Die Qualität der Bilder ist bei vielen Kameras sehr gut. Für den, der auch noch seine eigenen Objektive einsetzen möchte, stehen digitale Spiegelreflexkameras zur Verfügung. Kleine Objekte können mit der Makroeinstellung mit sehr geringem Abstand aufgenommen werden. Für große Objekte steht Weitwinkel mit unendlicher Einstellung zur Verfügung.

Nur was macht der Anwender eines Mikroskops? Wie bekommt er seine Bilder in die Kamera? Es gibt Anwender, die halten die Kamera "relativ nahe" an das Okular und nehmen so Bilder auf. Das scheint bei manchen zu klappen. Im Internet gibt es Bastelanleitungen für Adapter. Die Lösung der Einschränkungen wird gleich mitgeliefert. Beispielsweise kann die Vignettierung (schwarze Ecken und Ränder) in Photoshop abgeschnitten werden. Dies ist aber keine optimale Lösung.

Es gibt mittlerweile viele Anwender von Mikroskopen, die mit dem Klu MVP Adapter von klughammer gmbh arbeiten. Dieser ermöglicht es, digitale Kameras an Mikroskope anzuschließen. Der Klu MVP Adapter zeichnet sich durch eine lichtstarke und qualitativ hochwertige Optik aus. Das Adapterset besteht aus dem Basisadapter Klu MVP, einem Kamera-Adapterring, einem C-Mount Anschlussstück und einem 23-mm- und einem 30-mm-Okular-Anschlussstück für Mikroskope (Abb. 1). Der Adapter wird an den C-Mount Adapter des Mikroskops oder, falls dieser nicht vorhanden ist, an das Mikroskopokular angeschlossen. Der Kamera-Adapterring kann schnell und einfach gegen einen anderen ausgetauscht werden, falls eine andere digitale Kamera angeschlossen werden soll.

Bei so manchem Mikroskop gelingt es leider nicht, die Okulare und den Fototubus auf die gleiche Fokusebene einzustellen. Schaut der Anwender durch das Okular, stellt das Objekt scharf und nimmt in dieser Einstellung ein Bild auf, erhält er häufig eine unscharfe Aufnahme. Also muss er immer vor der Bildaufnahme die Z-Achse nachjustieren, um ein scharfes Bild aufzunehmen. Nach der Aufnahme muss er wieder in die Ausgangsposition zurückstellen, ansonsten ist das Bild im Okular unscharf. Arbeiten mehrere Anwender an einem Mikroskop, kann es vorkommen, dass manche die Dioptrieneinstellung verändern. Auch dann ist die Parfokalität nicht mehr für jeden Betrachter gewähr-

Abb. 1: Das Adapterset der Firma Klughammer für Digitalkameras besteht aus einem Basisadapter Klu MVP mit Kamera-Adapterring, einem C-Mount Anschlussstück und einem Okular-Anschlussstück für das Mikroskop.

leistet. Ein großes Plus des Klu MVPs ist, dass der Basisadapter in der Höhe verstellt werden kann. Somit wird die Parfokalität von Fototubus/Kamera und Okular erreicht.

Das C-Mount Anschlussstück des Klu MVP mit Innengewinde am unteren Ende des Adapters erlaubt den Anschluss an einen C-Mount Mikroskop-Adapter. Dieser kameraseitige C-Mount Adapter ist mit einem Außengewinde ausgestattet. Der Durchmesser dieses Adapters ist 1 Inch (2,54 cm). Es ist empfehlenswert, für die Aufnahmen mit einer digitalen Consumer Kamera einen 1.0x Mikroskop C-Mount Adaper zu verwenden. Diese Adapter verfügen über keine zusätzliche Optik. Mit Klu MVP können Mikroskope verschiedenster Hersteller mit digitalen Kameras ebenfalls verschiedenster Hersteller kombiniert werden.

Optional ist ein Camcorder Adapterset erhältlich. Dieses beinhaltet den Camcorder-Adapter, Basisadapter Klu MVP, einen C-Mount Adapter, ein 23-mm- und ein 30-mm-Okular-Anschlussstück für Mikroskope.

Kontakt: klughammer industrie GmbH, Strassbach 9, 85229 Markt Indersdorf, Tel.: 08136 6011, Fax: 08136 7098, E-Mail: info@klughammer.de,

Internet: www.klughammer.de

Mikro - Kids

So rot wie Blut

Lutz Hartmann

Wer denkt nicht beim Erwähnen des Wortes Blut an das Märchen "Schneewittchen" der Gebrüder Grimm. Die Königin saß im Winter am Fenster an einem Stickrahmen aus schwarzem Ebenholz und stach sich in den Finger. Das Blut tropfte in den weißen Schnee. Darauf sagte sie: Hätt' ich doch ein Kind, so weiß wie Schnee, so rot wie Blut, so schwarz wie Ebenholz.

ir wissen es, wenig später wurde Schneewittchen geboren, das dann Abenteuer bei den Sieben Zwergen zu bestehen hatte. Schneewittchen hatte eine Haut, weiß wie Schnee, Lippen so rot wie Blut und Haare, so schwarz wie Ebenholz.

Wissenswertes zum Blut

Nun, das Märchen von Schneewittchen kennen wir. Alle haben es wohl früher mal gelesen oder erzählt bekommen. Aber was hat das mit unserem eigentlichen Thema, der Mikroskopie zu tun? Nun, eine ganze Menge. Mit den Haaren haben wir uns bereits in einem früheren Beitrag beschäftigt. Jetzt sollten wir uns mal das Blut etwas genauer ansehen, das der Königin von ihrem Finger in den weißen Schnee tropfte.

Jeder erwachsene Mensch verfügt etwa über 5–6 Liter Blut. Wir wissen, dass es lebensgefährlich ist, wenn man, zum Beispiel bei einem Unfall, eine größere Menge Blut verliert. Die paar Tropfen Blut der Königin, die in den Schnee tropften, waren aber sicher nicht schlimm. Was macht Blut für unseren Körper so lebenswichtig? Eş sind im Grunde recht viele Aufgaben, die ich hier natürlich nur verkürzt wiedergeben kann. Das Blut fließt ständig vom Herzen über die Adern, Venen, aber auch über die ganz kleinen Blutgefäße, die Kapillaren, zu den Organen und wieder zurück. Die "Blutpumpe", das Herz, haben wir sicher schon bei ihrer Arbeit in unserer Brust schlagen gehört.

Wozu dient das Blut nun? Eine ganz wichtige Aufgabe des Blutes besteht zunächst darin, den Sauerstoff von der Lunge zu unseren Organen zu transportieren. Im Körper bindet das Blut dann anschließend wieder Kohlenstoffdioxid (verkürzt Kohlendioxid), das dann durch die Lunge aufgenommen und anschließend ausgeatmet wird. Die zweite Aufgabe besteht darin, Nährstoffe und andere lebenswichtige Stoffe vom Darm oder anderen Organen in alle Teile des Körpers zu verteilen und natürlich Abfallstoffe abzutransportieren.

Wenn wir uns verletzt haben, erkennen wir noch eine weitere wichtige Eigenschaft des Blutes. Es hilft nämlich, eine kleinere Wunde ganz schnell wieder zu verschließen, damit wir nicht verbluten oder gar Krankheitserreger eindringen und uns schaden können. Sind diese Krankheitserreger jedoch bereits im Körper, so greifen Bestandteile des Blutes diese an, um sie unschädlich zu machen. Eine weitere wichtige Funktion des Blutes dürfen wir schließlich auf keinen Fall vergessen, es verteilt nämlich die Wärme in unserem Körper. Das Blut wird in der Leber aufgeheizt, und genau wie bei einer Zentralheizungsanlage – die allerdings mit heißem Wasser arbeitet - verteilt sich dann diese abgegebene Wärme gleichmäßig im Körper.

Wir untersuchen eine Blutstropfen

Und genau hier sind wir beim eigentlichen Ausgangspunkt für unsere mikroskopische Untersuchung angelangt. Aber wo bekommen wir nun bloß Blut her, das wir untersuchen können? Für einen Arzt ist diese Frage einfach zu beantworten. Mit einer Spritze führt er eine Blutentnahme durch. Das können wir natürlich nicht. Aber wie stellen wir es an? Nun, im Grunde müssen wir auf eine Schramme oder sonstige kleine Verletzung bei uns warten. Das ist nun nicht gerade eine sehr angenehme Sache. Mikroskopiker wie wir sind aber doch wohl eher hart im Nehmen und denken in erster Linie daran, was man mit dem austretenden Blutstropfen anfangen könnte, oder? Wenn es dann passiert, heißt es schnell sein. Es nutzt uns nämlich nichts, wenn wir erst solange abwarten, bis sich das Blut in Schorf verwandelt hat. Wir nehmen uns also einen Objektträger und fangen damit etwas frisches Blut auf.

Wer mutig ist, kann sich auch mit einer sauberen Nadel aus der Apotheke (z.B. sterile Lanzetten von Accu-Chek, Softclix) in den Finger pieken und einen kleinen Bluttropfen für die Untersuchung herausquetschen. Vielleicht erbarmt sich auch eure Mutter oder euer Vater für diese Aufgabe.

Vorweg gesagt, was wir jetzt machen, unterscheidet sich sehr von dem, wie Ärzte oder Labormitarbeiter Blut untersuchen. Die sind ja nicht neugierig zu erfahren, wie Blut unter dem Mikroskop aussieht. Sie möchten Krankheiten auf die Spur kommen und müssen deshalb viel genauer arbeiten.

Für uns reicht jedoch erst mal ein ganz einfach anzuwendendes Untersuchungsverfahren. Wir tupfen nun den kleinen Bluttropfen vom Finger auf die Mitte eines Objektträgers, beziehungsweise nehmen mit einer Pipette ein klein wenig von unserem aus der Verletzung ausgetretenen Blut ab und bringen davon nun einen kleinen(!) Blutstropfen auf den Objektträger. Darauf kommt ein Deckgläschen. Das Blut sollte nicht daneben herauslaufen. Das unterscheidet sich im Grunde nicht von dem Verfahren, wie wir andere Proben unter dem Mikroskop untersuchen und einen kleinen Tropfen Wasser dazugegeben.

Gut, schon fertig, und es kann losgehen. Zuerst schwenken wir bei unserem Durchlichtmikroskop das am wenigsten vergrößernde Objektiv ein. Das ist meist ein 4er- oder 5er-Objektiv. Jetzt stellen wir das Bild scharf ein. Leider erkennen wir jetzt, dass man zwar kleine Bestandteile im Blut ausmachen kann, aber man nicht wirklich Einzelheiten sieht. Das ist erst bei einem 40er-Objektiv richtig möglich. Das feine Regulieren der Schärfe muss hier besonders vorsichtig geschehen, da man sonst allzu leicht mit der Frontlinse dieses Objektivs auf das Deckgläschen stößt. Das Objektiv könnte so leicht beschädigt werden. Je stärker ein Objektiv vergrößert, umso geringer ist sein Abstand zum Präparat.

Abb. 1: Blut unter dem Mikroskop nach Anfärbung. Die zahlreichen roten Blutkörperchen sind in der Mitte heller als am Rand. Das dunkle runde Gebilde (oben links) ist ein angefärbtes weißes Blutkörperchen. – Abb. 2: Zeichnung der Blutbestandteile. a rote Blutkörperchen, b weiße Blutkörperchen, c Blutplättchen. – Abb. 3: Am aufgeschnitten gezeichneten roten Blutkörperchen erkennt man, dass es oben und unten in der Mitte eingedellt ist. Deshalb sehen sie im mikroskopischen Bild in der Mitte heller aus (Abb. 1) (Foto: Klaus Hausmann, Berlin; Zeichnungen: Hannelore Hartmann, Berlin).

Woraus besteht das Blut?

Nun, was seht ihr? Erstaunlich ist zunächst, dass das Blut keineswegs insgesamt rot ist. Wir erkennen viele kleine runde, rote Scheibchen, die sich in Ketten aneinanderlegen und in einer klaren, gelblichen Flüssigkeit herumschwimmen. Dies sind die roten Blutkörperchen (Abb. 1–3). Ihre Aufgabe besteht im Transport des Sauerstoffs zu den Organen des Körpers und natürlich auch im Abtransport des Kohlenstoffdioxids zur Lunge. Bei der klaren, gelblichen Flüssigkeit handelt es sich um das Blutplasma. Es ist die Grundsubstanz des Blutes und macht den größten Teil aus. Hierin werden Nährstoffe, Mineralstoffe und anderes transportiert, was für den Körper wichtig ist.

Weil der zu untersuchende Blutstropfen vergleichsweise dick ist, können sich die roten Blutkörperchen frei unter dem Deckgläschen bewegen. Vergessen wir aber nicht, die roten Blutkörperchen sind gerade mal 8 μ m (also 8/1000 eines Millimeters) breit. Hierbei überschlagen sie sich auch manchmal. Dadurch können wir erkennen, dass es sich bei ihnen nicht etwa um kleine, gleichmäßig dünne Scheiben handelt. Sie haben einen Wulst an ihrem Rand, die Mitte ist von beiden Seiten leicht eingedellt (Abb. 3).

Im Blutplasma schwimmen noch andere Blutbestandteile, die aber gar nicht so einfach auszumachen sind. Neben den roten Blutkörperchen gibt es auch noch die weißen Blutkörperchen (Abb. 1 und 2), die aber in viel geringerem Maße im Blut vertreten sind. Sie sind etwas größer als die roten Blutkörperchen und dienen der Abwehr von Krankheitserregern. Weiße Blutkörperchen sind lange nicht so gleichmäßig wie die roten Blutkörperchen geformt und sind im ganzen Körper, also nicht nur in den Blutgefäßen, anzutreffen. Sie können sich sogar aus eigener Kraft fortbewegen, anders also als die übrigen Blutbestandteile, die im Blutstrom mitgezogen werden. Ihren Namen "weiße" Blutkörperchen verdanken sie ihrem Aussehen: sie sind nämlich fast farblos. Um sie unter dem Mikroskop deutlich zu erkennen, müssen sie mit einem Farbstoff angefärbt werden (Abb. 1). Im Labor verwendet man hierfür bei Blutausstrichen ein besonderes Färbeverfahren, die Giemsa-Färbung. Für unsere Zwecke genügt es jedoch ersatzweise einen ganz kleinen Tropfen des Farbstoffs Methylenblau (Füllertinte) vorher auf einen zu untersuchenden Blutstropfen zu geben. Hierdurch werden die Zellkerne der weißen Blutkörperchen leicht blau gefärbt. Perfekt ist dieses Verfahren aber natürlich nicht. Zumindest kann man dann aber den weißen Blutkörperchen ein wenig auf die Spur kommen. Wer es ganz genau wissen möchte, kann auch einen kleinen Tropfen Essig (3%ig) auf den Blutstropfen geben. Durch den Essig verschwinden nämlich die roten Blutkörperchen und machen so die Sicht auf die weißen Blutkörperchen frei. Weitere wichtige Bestandteile des Blutes sind die Blutplättchen (Abb. 2), die bei einer Verletzung eine kleinere Wunde verschließen können. Diese sind aber so klein, dass wir sie mit unserem Mikroskop nur mit großer Mühe erkennen können.

Herstellung von Blutausstrichen

Ärzte und Labors verwenden dieses von mir beschriebene Verfahren zur Blutuntersuchung nicht, da es ihnen keine genauen Kenntnisse über Krankheiten bei ihren Patienten ermöglichen würde. Sie benutzen das so genannte Blutausstrichverfahren, das ich jetzt kurz beschreiben möchte.

Nachdem man einen Blutstropfen auf einen Objektträger (Abb. 4a) gebracht hat, nähert man sich soweit mit einem schräg gestellten zweiten Objektträger (Abb. 4b) diesem Blutstropfen (Abb. 4c), bis er mit diesem Kontakt hat. Jetzt zieht man den an der Kante verlaufenden Blutstropfen mit dem zweiten Objektträger "im Schlepp" über den eigentlichen Objektträger einfach so hinterher, bis sich das Blut über diesen fein verteilt hat. Vorher war der Blutstropfen rot, jetzt sieht man nur noch eine leicht gelbliche Flüssigkeit. Würde das Blut immer noch rot erscheinen, so wäre es nicht dünn genug verteilt worden. Diesen Blutausstrich lässt man eintrocknen, färbt ihn und untersucht ihn dann ohne ein Deckgläschen. Hierbei

Abb. 4: Blutausstrichverfahren. a und b Objektträger, c Blutstropfen.

kann ein Mediziner natürlich wesentlich mehr erkennen als bei unserem dickeren Blutstropfen. Dieses Verfahren habe ich erwähnt, damit man weiß, dass es auch noch weitere, wesentlich genauere mikroskopische Untersuchungsmethoden gibt. Später kann man es ja vielleicht ausprobieren. Zunächst reicht aber die von mir beschriebene einfache Methode aus, um einen Überblick über die Blutzusammensetzung zu erhalten.

Ich wünsche aber allen, dass wir nicht allzu viele Verletzungen erleiden, es gibt ja auch noch andere Dinge, die man untersuchen kann!

Wo man noch viel über das Mikroskopieren aber auch über das Blut und den Blutkreislauf nachlesen und erfahren kann

- Bickel, H., Claus, R., Frank, R.: Natura, Biologie für Gymnasien, Klassen 7–10. Ernst Klett Verlag, Stuttgart 2002.
- Bilsing, A., Brezmann, S., Firtzlaf, K. H., Pews-Hocke, C., Kemnitz, E.: Duden, Basiswissen Schule, Biologie. paetec Gesellschaft für Bildung und Technik, Berlin und Brockhaus AG, Mannheim 2001.
- Kremer, B. P.: 1 × 1 der Mikroskopie. Franckh-Kosmos Verlags-GmbH, Stuttgart 2005.

Verfasser: Lutz Hartmann, Brandtstr. 8, 13467 Berlin

Kurze Mitteilung

Algen und Bakterien in einem Fließwasser-Periphyton

Das epilithische Periphyton (Aufwuchs auf Steinen) ist ein echter Biofilm, der primär aus Algen und Bakterien besteht, die in eine Matrix aus Polysacchariden eingebettet sind.

Frühere Untersuchungen haben belegt, dass die bakterielle Produktion im Biofilm eines Fließgewässers an die Produktion der Algen gekoppelt ist, deren photosynthetisch hergestellte organische Verbindungen nach dem Absterben der Zellen den Bakterien zugute kommen. Bislang ist man der Meinung zugetan, dass Bakterien und Algen im Biofilm des Aufwuchses um die Nahrungsstoffe in den Fließgewässern konkurrieren. Die neuen Untersuchungen der drei kanadischen Biologinnen an 58 Stationen in 51 Flüssen und Bächen von Ontario und West-Quebec waren auf die Produktivität und die Biomasse der Algen und Bakterien gerichtet. Die Menge der Algen wurde mit Hilfe des Chlorophyll-a-Gehaltes in 95%igen Äthanolextrakten, die Biomasse durch Trocknen bei 105 °C und anschließender Verbrennung bei 550 °C ermittelt. Die Bakterienproben wurden mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) mittels eines Epifluoreszenzmikroskopes (Leitz Ortholux II) bestimmt. Dazu wurden die Proben entsprechend verdünnt und nach der Färbung mit DAPI für 5 Minuten bei einer 1250fachen Vergrößerung und mit Ölimmersion ausgezählt. Die Produktion der Bakterien und Algen wurde mit Hilfe von radioaktivem H³-Thymidin beziehungsweise C¹⁴-Bicarbonat bestimmt. Es ergab sich, dass die Hypothese, dass die Bakterien in Biofilmen mit den Algen um die Nahrungsstoffe konkurrieren, nicht zutrifft. Vielmehr leben Algen und Bakterien in Biofilmen in einer Assoziation, die beiden Organismengruppen Raum und Nahrung bietet, sodass beider Produktion instandgehalten wird.

Literaturhinweise

- Carr, G. M., Morin, A., Chambers, P. A.: Bacteria and algae in stream periphyton along a nutrient gradient. Freshwater Biology 50, 1337–1350 (2005).
- Linskens, H. F.: Biofilme. Mikrokosmos 94, 197–198 (2005).

H. F. Linskens, Nijmegen

Raphidiophrys elegans – Ein Kolonie bildendes Sonnentierchen

Bernd Walz

Sonnentierchen, Heliozoa, gehören zu den schönsten einzelligen Lebensformen, die ein Mikroskopiker bei seinen Streifzügen durch das Leben im Wassertropfen beobachten kann. Das Sonnentierchen *Raphidiophrys elegans* ist dafür bekannt, dass es Kolonien bilden kann. Eine spröde Feststellung, denn in der Realität sind diese Kolonien begeisternd schöne Strukturen.

Mikrokosmos 95, Heft 3, 2006 www.elsevier.de/mikrokosmos

bwohl Raphidiophrys elegans solitär (als einzellige Form) vorkommt, findet man diese Art häufiger als Kolonie aus sechs bis 12 Individuen. Leidy (1879) beschrieb Kolonien, die aus bis zu 38 Einzelzellen bestanden. Die hier in Abbildung 1A vorgestellte Kolonie umfasste 12 Individuen und wurde im August 2005 in der flachen Uferzone eines Sees bei Dals Rostock (Dalsland,

Abb. 1: A Raphidiophrys elegans Kolonie aus 12 Zellen, von denen jedoch nur sechs in der Fokusebene liegen. R. elegans hat sehr lange Axopodien. Der Bildausschnitt reicht nicht aus, um diese Axopodien in ihrer gesamten Länge darzustellen. B Ausschnitt aus einer R. elegans Kolonie bei höherer Vergrößerung. Die weißen Pfeile markieren die Schleimhülle, welche Zellen und verbindende Plasmastränge einhüllt. In der Schleimhülle liegen die für R. elegans typischen schuppenförmigen Spiculae.

Abb. 2: Habitusbild einer *R. elegans* Kolonie (nach Page und Siemensma).

Schweden) gefunden. Obwohl *R. elegans* nicht im *Das Leben im Wassertropfen* von Streble und Krauter (2002) berücksichtigt ist, war die Bestimmung aufgrund der charakteristischen Merkmale dieser Art dann doch unproblematisch.

Merkmale

In der Kolonie sind die Einzelzellen durch robuste Plasmastränge untereinander verbunden, die bei einem Durchmesser von 2–6 µm circa 30 µm lang sind. Das entspricht etwa dem Durchmesser einer Einzelzelle (Abb. 1B). Alle Einzelzellen der Kolonien und die Plasmabrücken sind von einer Schleimhülle umgeben, in der schuppenförmige Spiculae liegen. Diese Spiculae sind 5–10 µm lang und erscheinen in der Seitenansicht leicht gebogen mit stark umgebogenem Rand. Die Schleimhülle mit den Spiculae kann sich bis zu 30 µm an den Axopodien entlang ziehen.

Das hier abgebildete Exemplar enthielt grüne Nahrungseinschlüsse sowie rötliche oder bräunliche Granula. Rainer (1968) schreibt, dass die so häufig in R. elegans beobachteten grünen Strukturen keine echten Zoochlorellen sind. Deshalb sind auch farblose Individuen durchaus verbreitet. Die Zellen enthalten keine auffällige kontraktile Vakuole. Stattdessen wird in der Peripherie mancher Zellen eine große, klare Vakuole sichtbar, die nur gelegentlich kollabiert. Die Axopodien von R. elegans sind mit bis zu 100 µm sehr lang. R. elegans unterscheidet sich von der ebenfalls Kolonie bildenden Form R. viridis durch die langen Plasmastränge. In den R. viridis Kolonien liegen die Individuen dicht aneinander gedrängt. R. capitata, die ebenfalls Kolonien bilden kann, hat im Vergleich zu R. elegans längere, schuppenförmige Spiculae in ihrer Schleimhülle.

Kolonien

Die *R. elegans* Kolonien haben in der Regel eine unregelmäßige Form, und ihre Größe variiert natürlich mit der Anzahl der Individuen in der Kolonie (Abb. 2). Die hier beschriebene Kolonie (\emptyset ca. 200 µm) fiel durch ihre Regelmäßigkeit auf, die in Abbildung 1A durchaus erkennbar wird, obwohl bei der Aufnahme nur sechs der 12 Individuen in der Fokusebene liegen.

Bereits Leidy (1879) beschrieb, dass die Plasmastränge dynamisch ihre Länge und ihren Durchmesser ändern können, dass sie sich vom Nachbarindividuum lösen und neu ausbilden können. Abbildung 1B zeigt in den Plasmasträngen partikuläre Strukturen unterschiedlicher Größe. Bei genauer Beobachtung lebender Kolonien erkennt man, dass diese Partikel in beide Richtungen durch die Plasmastränge von Zelle zu Zelle transportiert werden.

Es blieb bis in die jüngste Vergangenheit (Rainer, 1968) unklar, ob Solitärindividuen und Kolonien wirklich zu ein und derselben Art gehören, weil sich die Struktur der Sklerite (Spiculae) in der Schleimhülle beider Formen geringfügig voneinander unterscheiden. Rainer (1968) konnte jedoch beobachten, dass sich *R. elegans* Kolonien auf Objektträgern in der feuchten Kammer nach drei Tagen in Einzelindividuen auflösten. Die typischen Koloniesklerite wurden bei diesen Einzelindividuen dann durch so genannte Solitätsklerite ersetzt.

Literaturhinweise

- Leidy, J.: Fresh-water rhizopods of North America. In: Hayden, F. V. (Ed.): Report of the United States, Geological survey of the territories government printing office, Washington, Volume 12 (1879).
- Page, F. C., Siemensma, F. J.: Nackte Rhizopoda und Heliozoea. In: Matthes, D. (Hrsg.): Protozoenfauna, Band 2. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1991.
- Rainer, H.: Protozoa, Rhizopoda, Heliozoa. Systematik und Taxonomie, Biologie, Verbreitung und Ökologie der Arten der Erde. In: Dahl, M., Peus, F. (Hrsg.): Die Tierwelt Deutschlands und der angrenzenden Meeresteile, Fischer Verlag. Lena 1968.
- grenzenden Meeresteile. Fischer Verlag, Jena 1968. Streble, H., Krauter, D.: Das Leben im Wassertropfen, 9. Auflage. Franckh-Kosmos Verlags GmbH & Co, Stuttgart 2002.

Verfasser: Prof. Dr. Bernd Walz, Siedlungsweg 3, 14469 Potsdam.

Kurze Mitteillung

Färbung von Pilzsporen

Die Sporen und Konidien der meisten Pilze haben eine dicke und widerstandsfähige Sporenwand, welche die Anfärbung mit Fluoreszenzfarben für die Beobachtung im Epifluoreszenzmikroskop behindert. Die resistenten Zellwände der Verbreitungseinheiten der Pilze schützen die Protoplasten gegen äußere (physikalische, chemische und biologische) Einflüsse. Gleichzeitig wird aber der Influx von Fluoreszenzfarbstoffen und die Emission der Fluoreszenz verhindert. Zur Verbesserung der Färbbarkeit von Konidien-Suspensionen (in auf ein Viertel verdünnter Ringer-Lösung unter Zusatz von 0,01% Antifoam A und 0,02% Tween 80) von Aspergillus fumigatus und Penicillum brevicompactum mit sechs verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (DAPI, Propidiumjodid, SYBR Green I, Fluorescent Brightener 28, Auramine O, Nil-Rot) wurden zwei neue Methoden entwickelt.

Methode 1: Zunächst wird die Sporensuspension einige Male mit der Spritze aufgesogen, um die Konidien-Ketten zu brechen. Die Konzentration sollte dann im Bereich zwischen 10⁷ und 10⁶ Konidien pro Milliliter liegen. Sodann wird der Suspension 1 oder 5% einer kommerziellen 15% igen Natriumhypochlorid-Lösung zugegeben. Diese Suspension wird fünf Minuten lang bei Zimmertemperatur inkubiert. Da aber Natriumhypochlorid die meisten Fluoreszenzfarbstoffe ineffizient macht, muss die Suspension zweimal gewaschen und bei 8000 UpM 10 Minuten lang zentrifugiert werden. Man muss dann berücksichtigen, dass die Waschprozedur zu einem gewissen Verlust der großen Konidien führen kann. Sodann werden die Konidien in Ringer-Lösung (Endkonzentration 10⁶ ml) suspendiert und sind für die Beobachtung im Epifluoreszenzmikroskop bereit. Zur Beobachtung dienen 20 µl der Suspension. Je Farbstoff wurden 1500 Konidien ausgezählt.

In einer 2. Methode wird die ungefärbte Konidiensuspension in einem Mikrowellen-Ofen (z.B. Haushaltsmodell Panasonic NN-K257-W, 400 W, 2450 MHz) 30 Sekunden lang bestrahlt. Danach werden die Proben mit den sechs verschiedenen Farbstoffen inkubiert.

Die Anfärbung war nach einer Behandlung mit 5%iger Natriumhypochlorid-Lösung besser als nach Behandlung mit 1%iger Lösung. Die beste Anfärbung ergab Auramine O (99,6% gefärbte Konidien für *A. fumigatus*; 99,8% für *P. brevicompactum*). Die Erfolge nach der Mikrowellen-Behandlung waren nicht für alle Farbstoffe gleich gut. Die Mikrowellenbehandlung war aber stets besser als die 1%ige Hypochlorid-Behandlung.

Literaturhinweis

Prigione, V., Marchision, V. F.: Methods to maximise the staining of fungal propagules with fluorescent dyes. Journal of Microbiological Methods 59, 371–379 (2004).

Monochromatische Achsenbilder

Hinrich Husemann

Die bei doppelbrechenden Objekten zwischen gekreuzten Polarisationsfiltern im mikroskopischen Bild sichtbaren optischen Effekte sind den meisten Mikroskopikern bekannt; weniger dagegen die zugehörigen Interferenzfiguren in den hinteren Brennebenen der Objektive. Sie werden auch als Achsenbilder bezeichnet und hier für monochromatische Beleuchtung anhand einiger Beispiele erläutert. Die Polarisationsmikroskopie nutzt sie zur Kristall- und Stoffanalyse. In diesem Rahmen lassen sich nur einige Grundprinzipien kurz erläutern. Bezüglich der ausführlicheren Theorie und der analytischen Anwendungen muss auf die Literatur verwiesen werden.

Transparente Körper heißen optisch isotrop, wenn in ihnen die Geschwindigkeit des Lichtes richtungsunabhängig ist und alle Schwingungsebenen möglich und gleichwertig sind. Hierzu zählen die Gase, ruhende Flüssigkeiten, spannungsfreie Gläser und die Kristalle des kubischen Systems. Letztere stellen die höchste Symmetrieklasse der Kristalle dar; ein typischer Vertreter ist Natriumchlorid NaCl (Kochsalz). Zur optischen Beschreibung genügt lediglich ein – allerdings wellenlängenund temperaturabhängiger – Brechungsindex. Wohl wegen dieser Einfachheit betrachten wir das als normal.

Die meisten Stoffe sind im festen Zustand - soweit transparent – dagegen optisch anisotrop; sie zeigen so genannte Doppelbrechung. Eintretendes Licht wird zerlegt in zwei zueinander senkrecht polarisierte Wellenzüge mit durch die innere Struktur der Körper vorgegebener Schwingungsrichtung. Sie breiten sich mit unterschiedlicher und dazu noch richtungsabhängiger Geschwindigkeit aus und können auch unterschiedlich stark absorbiert werden (auf Letzterem beruht die Wirkung der Polarisationsfilter). Zur Beschreibung des optischen Verhaltens sind bei den doppelbrechenden Substanzen nicht nur zwei Brechungsindices, sondern auch deren Richtungsabhängigkeit bezogen auf die optischen Kristallachsen sowie der Winkel zwischen letzteren - der so genannte Achsenwinkel 2V – erforderlich.

Anmerkung: Licht wird an sich nur eindeutig charakterisiert durch seine Frequenz f, denn die Lichtgeschwindigkeit v und damit auch die zugehörige Wellenlänge λ hängen vom jeweiligen Ausbreitungsmedium ab. Es gilt allgemein v = f · λ . Da Längen offenbar anschaulicher sind als Frequenzen, gibt man aber meist die zugehörige Vakuumwellenlänge $\lambda_{\rm V}$ = c/f an. Diese ist eindeutig, da c – die Lichtgeschwindigkeit im Vakuum – eine Naturkonstante ist. Für den Brechungsindex gilt n = c/v = $\lambda_{\rm V}/\lambda$. Verschiedene Ausbreitungsgeschwindigkeiten bedeuten bei gleicher Frequenz beziehungsweise Vakuumwellenlänge also unterschiedliche Brechungsindices beziehungsweise Wellenlängen.

Optisch anisotrop verhalten sich die Kristalle aller Klassen niedrigerer Symmetrie als die kubische und damit die überwiegende Mehrheit aller kristallinen Stoffe. Hier muss man außerdem noch unterscheiden zwischen so genannten einachsigen und zweiachsigen Kristallen. Zu ersteren zählen die Vertreter der hexagonalen, trigonalen und tetragonalen, zu letzteren die in der Symmetrie noch niedrigeren orthorhombischen, mono- und triklinen Kristallklassen. Zusätzlich kann in manchen Fällen noch optische Aktivität (= Drehung der Schwingungsebene des polarisierten Lichtes) auftreten. Aber auch Stoffe, die rein äußerlich nicht als kristallin erscheinen, deren submikroskopische Bausteine aber eine quasi-kristalline Ordnung (z.B. eine überwiegende Orientierung in einer Richtung) haben, zeigen Doppelbrechung. Hierzu gehören unter anderem viele Fasern und auch Folien aus Polvmeren, die bei der Herstellung gestreckt wurden (das lässt sich z.B. an Klarsichtfolien nachprüfen), konzentrierte Lösungen von Tensiden, deren Moleküle überwiegend in weitgehend geordnet gepackten Aggregaten von Micellen vorliegen; außerdem noch Gläser unter mechanischer Spannung (Spannungs-Doppelbrechung).

Untersuchungsmethoden

Das Ausmaß der Doppelbrechung – der Unterschied in den Brechungsindices – und die Achsenwinkel lassen sich mit den Messmethoden der Polarisationsmikroskopie erfassen. Da diese Werte stoffspezifisch sind, wird ihre Bestimmung in Mineralogie und Geologie zur Identifizierung kristalliner Stoffe, zum Beispiel von Mineralien, Bestandteilen von Erzen, Bodenproben und Keramiken, also zur Stoffanalyse, herangezogen.

Dieses geschieht zumeist anhand so genannter Dünnschliff-Präparate, also plan geschliffenen Proben von im Allgemeinen 20-30 µm Dicke, die in einem geeigneten Einschlussmittel auf einem Objektträger aufgebracht und mit einem Deckglas eingedeckt sind. Ihre Herstellung wird in der Literatur ausführlich beschrieben. Man untersucht sie mit zwei sich ergänzenden Methoden, der Orthoskopie und der Konoskopie. Bei beiden befindet sich das Präparat positioniert auf einem um die optische Achse des Mikroskops drehbaren Objekttisch zwischen gekreuzten Polarisationsfiltern, dem Polarisator (unterhalb des Kondensors, im Gesichtsfeld des Okulars im Allgemeinen Ost-West-orientiert, x-Achse) und dem Analysator (oberhalb des Objektivs, Nord-Süd-orientiert, y-Achse).

Orthoskopisch betrachtet man das Objekt bei möglichst geringer Beleuchtungsapertur (also eng gestellte Kondensorblende, quasi "gerade" Beleuchtung) konventionell durch das Okular (direkter Strahlengang). Durch Einschub so genannter Hilfsobjekte oder Kompensatoren wie λ -Plättchen (Rot I. Ordnung) und anderen in den Strahlengang, kann man bei Kenntnis der Dicke des Präparates aus den dabei beobachtbaren Farbänderungen näherungsweise quantitativ auf die Stärke der Doppelbrechung der untersuchten Kristalle schließen.

Konoskopisch betrachtet man die hintere Brennebene des Objektivs ("indirekter" Strahlengang). Dazu muss die diese begrenzende Aperturblende voll ausgeleuchtet, das heißt die Kondensorblende entsprechend weit geöffnet sein. Die dort sichtbaren Interferenzmuster sind die hier interessierenden Achsenbilder. Man beobachtet sie bei herausgenommenem Okular. Durch einen Diopter sieht man sie relativ klein, aber hell und scharf. In einem – für das Auge meist bequemeren – Hilfsmikroskop erscheinen sie größer, aber meist auch etwas weicher. Durch weiteres Abblenden von dessen Frontlinse erscheinen sie schärfer, aber auch lichtschwächer. Bei regulären Polarisationsmikroskopen kann man stattdessen eine so genannte Bertrand-Linse zwischen Objektiv und Okular einschalten und durch eine variable Blende das Bild des zu untersuchenden Objektes von seiner Umgebung separieren.

Einige theoretische Betrachtungen

Die Polarisationsmikroskopie und die relevanten Bereiche der Kristallphysik sind ein recht

Abb. 1: Zur Entstehung von Interferenzfarben durch Auslöschung bestimmter Wellenlängen. α Strahlwinkel zur optischen Achse des Mikroskops; d Dicke der doppelbrechenden Schicht; n', n" Bezeichnung und Brechzahlen der polarisierten Teilwellen; λ' , λ'' zugehörige Wellenlängen; O optische Achse des Mikroskops; P, A Schwingungsrichtungen von Polarisator beziehungsweise Analysator; s geometrische Weglänge des Strahls.

komplexes Wissensgebiet. Hier können nur einige grundlegende, zwangsläufig etwas vereinfachende Erläuterungen versucht werden. Theorie und praktische Anwendungen werden zum Beispiel behandelt bei Müller (1993), Puhan (1994) und Rinne-Berek (1973).

Die bei doppelbrechenden Substanzen im polarisierten weißen Licht durch den Analysator sichtbaren Farbeffekte beruhen darauf, dass aus dem kontinuierlichen sichtbaren Spektrum jeweils bestimmte separate Wellenlängen und deren benachbarte Bereiche durch Interferenz gelöscht beziehungsweise geschwächt werden. Das verbleibende Spektrum empfinden wir visuell als farblich komplementär zu deren Spektralfarben.

Abbildung 1 versucht diese für unsere Betrachtungen besonders interessierende Auslöschung zu erläutern. Beim Eintritt in eine doppelbrechende Schicht wird das vom Polarisator mit der Schwingungsebene P kommende polarisierte Licht aufgespalten in zwei senkrecht zueinander polarisierte Wellenzüge, das heißt seine Amplitude wird vektoriell verteilt auf diese beiden - vom jeweiligen Kristall vorgegebenen - Schwingungsrichtungen. Letztere sind hier im Gegensatz zur üblichen Nomenklatur einfach auch mit den zugehörigen Brechungsindices n' und n'' bezeichnet; λ' und λ'' sind die entsprechenden Wellenlängen. Da die Lichtgeschwindigkeiten und damit die Brechungsindices und Wellenlängen dort jeweils verschieden sind, resultiert beim Austritt aus der Schicht in Abhängigkeit von der zurückgelegten geometrischen Weglänge s ein so genannter Gangunterschied Γ zwischen beiden Wellenzügen. Einer der beiden eilt dem anderen voraus. Beträgt Γ ein ganzzahliges Vielfaches der zugehörigen (Vakuum-) Wellenlänge, also $\Gamma = \mathbf{m} \cdot \lambda_{v}$, mit $\mathbf{m} = 1, 2, 3...$ als Ordnung, haben beide Amplituden wieder die gleiche Orientierung wie nach dem Eintritt. Das trifft aber bei gegebener geometrischer Wegstrecke s jeweils nur für bestimmte Wellenlängen zu. In Abbildung 1a gilt für die Welle mit dem Brechungsindex n' gerade s = $4\lambda'$, für die dazu senkrecht polarisierte mit n'' gerade s = $3\lambda''$. Das Vektordiagramm in Abbildung 1b zeigt: Die dann in die Schwingungsebene A des nachgeschalteten Analysators fallenden Amplitudenkomponenten der beiden ausgetretenen Wellenzüge sind – unabhängig vom jeweiligen Winkel zwischen den Richtungen P und n' beziehungsweise n" - vom Betrag her stets gleich. Sie schwingen aber im Gegentakt und löschen einander deshalb bei Überlagerung, also durch Interferenz, aus.

Das lässt sich praktisch einfach zeigen an dem bekannten Hilfsobjekt λ , auch Rot 1. Ordnung genannt. Richtig orientiert im orthoskopischen Strahlengang zwischen Polarisator und gekreuztem Analysator, bewirkt es die bekannte rote Färbung. Mit einem kleinen Handspektroskop sieht man durch das Okular das ganze sichtbare Spektrum bis auf einen engeren, dunklen Streifen im Grünen. Dessen Schwerpunktswellenlänge ($\lambda_V = 551$ nm) wird ausgelöscht und ihre nähere Umgebung geschwächt. Die beobachtete Komplementärfarbe Rot ist also keine Spektral-, sondern eine so genannte Interferenzfarbe.

Mit größer werdender Weglänge s, das heißt zunehmender Dicke des Präparates, wird die Bedingung m = 1, 2, 3... durch eine wachsende Zahl von Wellenlängen erfüllt. Im Spektroskop zeigen sich immer mehr dunkle Linien über das ganze Spektrum verteilt. Die empfundene Färbung erscheint immer blasser und geht schließlich in Weiß über (so genanntes Weiß höherer Ordnung). Die analytische Anwendung stützt sich aber auf gute Erkennbarkeit der Interferenzfarben. Das ist der Grund für die Wahl der oben erwähnten Dünnschliffe.

Wie aus Abbildung 1c zu ersehen, hängt bei gegebener Dicke d des doppelbrechenden Mikropräparates der darin zurückgelegte Weg s vom Neigungswinkel α ab, den der jeweilige Strahl mit der optischen Achse O des Mikroskops einschließt. Mit α ändert sich deshalb auch die Wellenlänge des durch Interferenz gelöschten Lichtes. Bei konoskopischer Beobachtung – das heißt bei Beleuchtung in allen Richtungen innerhalb der Numerischen Apertur - resultieren deshalb bei weißem Licht im Achsenbild periodische Abfolgen von Linien in den Interferenzfarben. Letztere und die Reihenfolge ihres Auftretens kann man der bekannten Farbtafel von Michel-Levy entnehmen. Da sich diese so genannten Isochromaten mehr in der Farbe, weniger in der Helligkeit unterscheiden, lassen sie sich mittels Schwarz-Weiß-Fotografie, wie hier für den Druck notwendig, nicht so gut darstellen.

Beleuchtet man dagegen, wie hier geschehen, mit (näherungsweise) monochromatischem Licht, erhält man nur einen Wechsel von nicht ganz scharfen hellen (konstruktive Interferenz) einfarbigen und dunklen (destruktive Interferenz, Auslöschung) Linien. Es sind Kurven gleichen Gangunterschiedes bei der betreffenden Wellenlänge. Ihre Zahl und Dichte nimmt, wie man mit Filtern bekannter Durchlasswellenlänge zeigen kann, mit zunehmender Wellenlänge – also von violett nach rot – ab.

Zusammenfassend ergibt sich für den Gangunterschied Γ (Ableitung siehe Anhang):

$$\Gamma = s (n'' - n') = (d/\cos\alpha) \cdot (n'' - n') = m \cdot \lambda_{\rm V}$$

 Γ ist also die Differenz der für die beiden Wellenzüge wirksamen optischen Weglängen und wird im Allgemeinen wie die Wellenlängen in der Einheit nm angegeben. n" – n' ist das Ausmaß der Doppelbrechung (in der jeweiligen Ausbreitungsrichtung), d die Dicke der doppelbrechenden Schicht, α der Winkel der jeweiligen Strahlrichtung zur optischen Achse O des Mikroskops, λ_v die jeweilige Vakuumwellenlänge des Lichtes. Für m = 1, 2, 3... ergeben sich, wie oben beschrieben, durch Auslöschung die dunklen; für m = 1/2, 3/2, 5/2... die hellen Linien. Gangunterschiede aufeinander folgender Schichten können sich addieren, aber auch kompensieren; davon wird in der messenden Polarisationsmikroskopie mit der Anwendung so genannter Hilfsobjekte und Komparatoren Gebrauch gemacht. Außerdem treten sowohl in weißem als auch in monochromatischem Licht sich zum Bildrand verbreiternde schattenartige Streifen, die so genannten (Haupt-) Isogyren, auf. Sie zeigen an, wo die vom doppelbrechenden Körper zugelassenen Schwingungsebenen senkrecht auf den Durchlassebenen von Polarisator oder Analysator stehen. Hier wird das aus dem Polarisator kommende Licht gar nicht erst in die doppelbrechende Schicht eingelassen, dort sperrt der Analysator das aus letzterer austretende Licht.

Die Isogyren entspringen sozusagen in den – ebenfalls dunklen – Durchstoß-Punkten der optischen Achsen der doppelbrechenden Systeme. Diese liegen bei einachsigen Kristallen in der Mitte des Isogyrenkreuzes, bei zweiachsigen in den "Augen" des Achsenbildes. In den optischen Achsen sind die beiden Brechungsindices gleich. Aus ihrer Lage im Achsenbild lässt sich bei zweiachsigen Kristallen der Achsenwinkel 2V bestimmen.

Anmerkung: Jeder Punkt in der hinteren Brennebene des Objektivs lässt sich als Brennpunkt eines von vorn eintretenden Parallelbündels verstehen. Er steht damit für dessen Richtung beziehungsweise Numerische Apertur ($n \cdot \sin \alpha$,

Abb. 2: Monochromatische Achsenbilder von Kristallen (schematisch). A einachsig, Schnitt senkrecht zur optischen Achse; b und c zweiachsig, Schnitte senkrecht zur Halbierenden des Achsenwinkels; b Normalstellung; c Diagonalstellung; dünne Linien sind Linien gleichen Gangunterschieds; breite schwarze Streifen sind (Haupt-) Isogyren.

mit α als Winkel zwischen Parallelbündel und optischer Achse des Mikroskops). Punkte in der hinteren Brennebene stellen also Richtungen dar! Man kann ihnen Numerische Aperturen zuordnen. Sie ergeben sich aus NA(i) = a(i)/R, wobei a(i) der Abstand des betreffenden Punktes i zur optischen Achse und R der Radius der Aperturblende – die Begrenzung der hinteren Brennebene – ist (vergleiche hierzu auch Husemann, 2005).

Die Abbildung 2 zeigt zur allgemeinen Übersicht typisierte Schemata monochromatischer Achsenbilder ein- und zweiachsiger Kristalle, die allerdings eine spezielle Lage und Orientierung letzterer im Strahlengang zur Voraussetzung haben.

Monochromatische Achsenbilder

Für die reale Darstellung kontrastreicher und was vom wissenschaftlichen Standpunkt natürlich weniger von Bedeutung ist - visuell eindrucksvoller monochromatischer Achsenbilder mit vielen Linien gleichen Gangunterschiedes eignen sich statt der Dünnschliffe meist besser Streupräparate aus nicht zu kleinen Kristallen. Letztere sollten nicht viel kleiner sein als das Gesichtsfeld des jeweils verwendeten Objektivs. Eingebettet wurden sie für die hier dargestellten Bilder meist in Kanadabalsam (künstlich) oder in Glycerin. Die Zahl der beobachtbaren Linien gleichen Gangunterschiedes wächst bei gleich starker Doppelbrechung mit zunehmender Dicke der Kristalle (wirksame Weglänge s) sowie zunehmendem Winkelbereich α

Abb. 3–6: Monochromatische Achsenbilder. Dünnere Linien sind Linien gleichen Gangunterschieds; nach außen sich verbreiternde kreuzförmige Schatten sind so genannte (Haupt-) Isogyren. – Abb. 3–5: NaNO₃, einachsig. – Abb. 3: Schnitt nahezu senkrecht zur optischen Kristallachse. – Abb. 4 und 5: Kristallachse stärker gegen die Mikroskopachse geneigt. – Abb. 6: Monochromatisches Achsenbild von KNO₃, zweiachsig. Das Isogyrenkreuz ist geöffnet, nur kleiner Achsenwinkel 2V.

und damit der Numerischen Apertur NA des verwendeten Objektivs. Die hier dargestellten Bilder wurden mit Objektiven Neofluar 25/0,60, Achromat 40/0,85 und Planapochromat 40/1,0 Öl unter Verwendung eines Interferenzfilters 546 nm (grün) gemacht. Die oben skizzierten Standardbilder findet man bei realen Streupräparaten in dieser idealisierten Form nur selten, weil dazu die betreffenden Kristalle auch entsprechend orientiert liegen müssen. Das ist im Allgemeinen nur an wenigen Stellen (meist auch nur näherungsweise) gegeben. Oft legen sich außerdem viele Kristalle - bedingt durch ihren jeweiligen Habitus – auf eine bevorzugte Seite, was die Ausbeute zusätzlich verringern kann. Für anspruchsvolle Untersuchungen gibt es deshalb apparativ und finanziell aufwändige mehrachsige Universal-Drehtische (U-Tische), die eine exakte passende Positionierung der Kristalle ermöglichen.

Die Abbildungen 3, 4 und 5 zeigen als Beispiel für Achsenbilder einachsiger Kristalle solche von Natriumnitrat NaNO₃. Abbildung 3 ist nahezu senkrecht zur Kristallachse – ihr Durchstoß-Punkt ist das Zentrum des Isogyren-Kreuzes – geschnitten. In Abbildung 3 und 4 ist diese stärker gegen die optische Achse des Mikroskops geneigt (Punkte im Achsenbild stellen ja Richtungen dar). Beim Drehen des Tisches bleiben die Isogyrenkreuze erhalten; sie wandern lediglich auf einer entsprechenden Kreisbahn im Bild mit.

Anders verhält es sich bei Kaliumnitrat KNO₃ (Kalisalpeter) (Abb. 6, Achsenbild). Trotz naher chemischer Verwandtschaft ist dieses zweiachsig. Das Isogyrenkreuz ist in der gegebenen Stellung erkennbar geöffnet, wenn auch der Abstand zwischen den beiden Achsenpunkten und damit der Achsenwinkel 2V noch sehr klein sind.

Ein leicht zu beschaffendes Beispiel für zweiachsige Kristalle ist die Saccharose (Haushaltszucker) in Form von Raffinade feiner Körnung (Abb. 7, Übersichtsbild in polarisiertem Licht). Die Kristalle haben eine Dicke von etwa 0,2– 0,5 mm, circa das zehn- bis zwanzigfache eines Dünnschliffs. Sie zeigen deshalb beim Drehen in Hellstellung kaum noch Interferenzfarben (eher an keilförmigen Rändern), sondern mehr

Abb. 7: Saccharose-Kristalle zwischen gekreuzten Polfiltern.

Abb. 8–11: Monochromatische Achsenbilder von Saccharose. – Abb. 8: Normalstellung. – Abb. 9: Öffnung des Isogyrenkreuzes beim Drehen des Tisches. – Abb. 10: Diagonalstellung. – Abb. 11: Schnitt senkrecht zu einer optischen Kristallachse.

Abb. 12–14: Einfluss der Numerischen Apertur des Objektivs auf den Bildausschnitt bei gleichem Objekt. – Abb. 12: NA = 0,60. – Abb. 13: NA = 0,85. – Abb. 14: NA = 1,00.

Weiß höherer Ordnung. Die Abbildungen 8, 9 und 10 zeigen an solchen Kristallen in guter Näherung die so genannte Normalstellung und ihren Übergang in die so genannte Diagonalstellung beim Drehen des Objekttisches. Hierbei öffnet sich das Isogyrenkreuz. Aus Vermessung dieser Bilder – Abstand der beiden Achsenpole und Durchmesser der Aperturblende – lässt sich (siehe Anhang II) bei Kenntnis der Numerischen Apertur des verwendeten Objektivs (hier NA = 1,0) und des (mittleren) Brechungsindex von Saccharose (angenommen $n \approx 1,6$) deren Achsenwinkel 2V ermitteln.

Abbildung 11 zeigt einen Schnitt etwa senkrecht zu einer der beiden optischen Achsen des Saccharose-Kristalls. Die zugehörige Kristalllage war bei den benutzten Streupräparaten bevorzugt anzutreffen.

Die Abbildungen 12 bis 14 lassen am jeweils gleichen Objekt den Einfluss der Numerischen Apertur des Objektivs (und damit des oben erwähnten Bereiches des Winkels α) auf den Ausschnitt des Achsenbildes erkennen. Die Abbildungen 15 und 16 – ebenfalls wieder bei sonst gleicher Einstellung – zeigen den Einfluss der Wellenlänge auf Zahl und Abstand der Linien gleichen Gangunterschiedes (bei 486 nm sind zehn, bei 656 nm acht Linien sichtbar). Hierfür standen Interferenzfilter mit entsprechender Wellenlänge zur Verfügung.

Fazit

Mehr die phänomenologische Erscheinung der Achsenbilder, weniger eine Anwendung in der wissenschaftlichen und technischen Polarisations-Mikroskopie, stand im Vordergrund dieser Betrachtung. Dort kann man unter anderem aus ihnen erkennen, ob untersuchte Kristalle ein- oder zweiachsig sind, deren Achsenwinkel 2V bestimmen und so zu ihrer Identifizierung beitragen. Hier ging es mehr darum, anhand einfach herstellbarer Streupräparate leicht zu beschaffender kristalliner Stoffe in weißem, insbesondere aber monochromatischem Licht die Achsenbilder von Kristallen und anderen doppelbrechenden Körpern zu studieren und zu fotografieren.

Bei Beleuchtung mit weißem Licht sind die Achsenbilder oft eindrucksvoll farbig. Ihre Betrachtung sollte man deshalb nicht auslassen, zumal die Beurteilung der Farben (Anwendung der Farbtafel nach Michel-Levy) ja Grundlage

Abb. 15 und 16: Einfluss der Wellenlänge des Lichtes auf die Dichte der Linien gleichen Gangunterschiedes. – Abb. 15: $\lambda_{v} = 486$ nm (blau). – Abb. 16: $\lambda_{v} = 656$ nm (rot).

für praktische Messungen ist. Die Zahl der deutlich sichtbaren Isochromaten ist aber meist begrenzt, weil mit zunehmender Ordnung m des Gangunterschiedes Verweißlichung eintritt. Die hier für den Druck notwendige Schwarz-Weiß-Fotografie liefert leider nur wenig kontrastreiche Bilder und wurde deshalb unterlassen. Anders in monochromatischem Licht, wo am gleichen Objekt sehr viel mehr Linien gleichen Gangunterschiedes – bis zum Rand der Aperturblende - kontrastreich sichtbar sind. Mit Objektiven höherer Numerischer. Apertur ergeben sich bei nicht zu kleinen Kristallen beziehungsweise zu dünnen Schichten und genügend starker Doppelbrechung oft jedenfalls aus Sicht des Verfassers - optisch sehr eindrucksvolle Achsenbilder. Dieser mehr ästhetische Aspekt ist vom wissenschaftlichen Standpunkt gesehen natürlich nicht sonderlich von Bedeutung, könnte aber vielleicht dazu verleiten, sich einmal diesem weniger bekannten Gebiet der Mikroskopie zu nähern.

Anhang

 Zur Herleitung der Formel f
ür den Gangunterschied Γ:

Dazu sei auf Abbildung 1a verwiesen. Für den Wegunterschied bei Auslöschung gilt dort speziell s = $4\lambda' = 3\lambda''$ und damit $s/\lambda' - s/\lambda'' = 4 - 3 = 1$; allgemein $s/\lambda' - s/\lambda'' = m$, mit m = 1, 2, 3... bei Auslöschung. Da allgemein gilt $\lambda = \lambda_V/n$, ergibt sich nach Einsetzen und Umformen (s/λ_V) (n' - n'')= m. Mit $\Gamma = \lambda_V \cdot m$ folgt $\Gamma = s(n' - n'')$, die Differenz der optischen Weglängen.

II. Zur n\u00e4herungsweisen Bestimmung des Achsenwinkels 2V von Saccharose aus den Abbildungen 8–10: Die Stellungen werden der Einfachheit halber als ideal angenommen. Abstand der Pole = 2 a; Aperturblendendurchmesser = 2 R; Objektiv-Apertur NA = 1,0. Vermessung mit einfachem Lineal: a(i)/R = 0,63 (Mittelwert). Damit NA(i) = $(a(i)/R) \cdot NA(Objektiv) = 0,63 \cdot 1,0 = 0,63 =$ $n \cdot sin V. Mit n = 1,6$ (grober Schätzwert) für Saccharose ergibt sich: sin V = 0,63/1,6 = 0,394 und damit als Achsenwinkel 2V = $2 \cdot 23,2^\circ = 46,4^\circ$. Der genaue Wert ist dem Verfasser leider nicht bekannt.

Literaturhinweise

- Beyer, H., Riesenberg, H.: Handbuch der Mikroskopie. VEB Verlag Technik, Berlin 1988.
- Gangloff, P.: Die Bestimmung von Gesteinen mit Hilfe des Mikroskops. 1. Das Mikroskop. Mikrokosmos 73, 105–110 (1984).
- Gangloff, P.: Die Bestimmung von Gesteinen mit Hilfe des Mikroskops. 2. Die Herstellung von Dünnschliffen. Mikrokosmos 73, 238–245 (1984).
- Gangloff, P.: Die Bestimmung von Gesteinen mit Hilfe des Mikroskops. 3. Anleitung zur Bestimmung von Mineralien im Dünnschliff. – Teil 1 und 2. Mikrokosmos 74, 298–302, 358–366 (1985).
- Gangloff, P.: Die Bestimmung von Gesteinen mit Hilfe des Mikroskops. 4. Grundlagen der Gesteinsbestimmung. – Teil 1 und 2. Mikrokosmos 75, 135–140, 200–207 (1986).
- Gangloff, P.: Die Bestimmung von Gesteinen mit Hilfe des Mikroskops. 5. Grundlagen der Gesteinsbestimmung. Sedimentgesteine und Fossilien im Dünnschliff. – Teil 1 und 2. Mikrokosmos 75, 331–334, 360–365 (1986).
- Göke, G.: Moderne Methoden der Lichtmikroskopie. Frankh'sche Verlagshandlung, Stuttgart 1988.
- Humphries, D. W.: Methoden der Dünnschliffherstellung, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1994.
- Husemann, H.: Bestimmung Numerischer Aperturen – Teil 2: Mittels der Abbe'schen Theorie. Mikrokosmos 94, 337–344 (2005).
- Leeder, O., Blankenburg, H. J.: Polarisationsmikroskopie. VEB Deutscher Verlag f
 ür Grundstoffindustrie, Leipzig 1989.
- Müller, G., Raith, M.: Methoden der Dünnschliffmikroskopie. Verlag Sven von Loga, Köln 1993.
- Paul, H. (Hrsg.): Lexikon der Optik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2003.
- Patzelt, H.: Polarisationsmikroskopie. Ernst Leitz GmbH, Wetzlar 1974.
- Puhan, D.: Anleitung zur Dünnschliffmikroskopie. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1994.
- Rinne, F., Berek, M.: Anleitung zur allgemeinen und Polarisations-Mikroskopie der Festkörper im Durchlicht. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart 1973.

Verfasser: Dr. Hinrich Husemann, Molinder Grasweg 31, 32657 Lemgo, Tel.: 052 61/716 96

Konkurrenz für Deckglas & Co. – Neue Methoden der Kombination von Zellkultur und Mikroskopie

Elias Horn

Das klassische Deckglas und der Objektträger dominieren seit langer Zeit die mikroskopischen Untersuchungen. Heute gibt es dank neuer Entwicklungen Alternativen, die viele Experimente in der biomedizinischen Forschung erleichtern und vereinfachen.

ie Methoden der Kultivierung von Zellen in einer Zellkultur sind seit vielen Jahrzehnten bekannt und nahezu unverändert geblieben. Dennoch haben sich die Ansprüche in den vergangenen Jahren dank neuer Techniken stark gewandelt. Hoch auflösende Fluoreszenzmethoden, wie konfokale Mikroskopie, Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (FISH), 2-Photonen Anregung und Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie sind nur einige der heute weit verbreiteten Techniken der Zellbiologie und Mikroskopie. Besonders die Herstellung, Lokalisierung und Analyse von fluoreszierenden Proteinen ist seit der Entdeckung und Nutzung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) in den letzten zehn Jahren zu einem unentbehrlichen Instrument der Proteinchemie und Zellbiologie geworden (Chalfie et al., 1994).

Kunststoffe als Mikroskopieträger

Dieser Entwicklung stehen die mikroskopischen Träger, auf denen die Untersuchungen durchgeführt werden, noch nach. Der klassische Objektträger und das Deckglas sind nicht in der Lage, die stark gestiegenen Bedürfnisse des Live Cell Imaging zu erfüllen. Multi-Wellplatten aus Kunststoff stellen brauchbare Alternativen dar, sind jedoch nicht für hoch auflösende Mikroskopie geeignet.

Nach der Entwicklung geeigneter Kunststoffe wurde es möglich, Zellkulturflaschen und Petrischalen aus Kunststoff in großen Mengen herzustellen. Diese Einwegartikel sind bereits aus dem modernen Labor nicht mehr wegzudenken. Nun ist diese Entwicklung auch im Bereich Mikroskopieträger gelungen. Hier sind die Anforderungen an das Material noch größer. Der verwendete Kunststoff muss gasdurchlässig, biokompatibel und vor allem optisch hochwertig sein. Gleichzeitig soll er in einer Form vorliegen, welche Handhabung und Anwendung unterstützt.

Das in Abbildumg 1 dargestellte μ -Slide I ist eines der neuen Kultivierungssysteme aus der μ -Slide Familie der Firma ibidi. Mit diesen Produkten ist es möglich, Zellen einer Zellkultur

Abb. 1: Zellkulturträger µ-Slide I nach dem Befüllen mit Medium und Zellen.– Abb. 2: Querschnitt durch das Zellkultivierungssystem µ-Slide I.

Mikrokosmos 95, Heft 3, 2006 www.elsevier.de/mikrokosmos zu kultivieren und parallel mit einem, in der Zellbiologie üblichen, inversen Mikroskop in der gleichen Umgebung hoch aufgelöst zu beobachten.

Der Aufbau dieses Trägers vereint die gestellten Anforderungen. Ein 400 µm hoher und 5 mm breiter Kanal ist durch zwei Reservoire verbunden. Der Kanal ist in einen Kunststoffträger mit standardmikroskopischen Maßen eingebettet. Den Aufbau und die Funktionsweise beschreibt Abbildung 2 in einem Querschnitt durch den Kanal. Nachdem eine Zellsuspension eingefüllt ist, adhärieren die Zellen auf der Oberfläche und können über lange Zeiträume kultiviert, manipuliert und mikroskopisch analysiert werden.

Die deckglaskonforme Folie auf der Unterseite ist auf die Verwendung inverser Mikroskope optimiert. Die hohe Transparenz sowohl im sichtbaren Bereich als auch im UV beziehungsweise IR, die fehlende Autofluoreszenz und die geringe Doppelbrechung zeichnen den Spezialkunststoff aus.

Vorteile des Mikroskopträgers

Die Kanalstruktur des Systems hat viele optische und anwendungsrelevante Vorteile: Durch die definierten Lichtwege und den Wegfall von Menisken der Flüssigkeit an einer Grenzfläche Wasser/Luft, ist zum Beispiel Phasenkontrast über die gesamte Kanalfläche möglich (Abb. 3). Nach oben offene Gefäße lassen dies in den Randbereichen nicht zu, da durch das Hochziehen der Flüssigkeit am Gefäßrand unterschiedliche Phasendifferenzen erzeugt werden, die das mikroskopische Bild negativ beeinflussen. Zusätzlich wird der Phasenkontrast in gewöhnlichen Zellkulturflaschen oft durch Kondenswasser gestört, welches sich sehr schnell an der Oberfläche im Inneren bildet, wenn die Flasche aus dem 37 °C warmen Brutschrank genommen wird. Dieser störende Kondensations-Effekt ist in einem Kanal nicht möglich.

Weiterhin ist die Aussaat der Zellen gegenüber offenen Formen sehr homogen, da sich über jedem Punkt an der Oberfläche die gleiche Flüssigkeitsmenge befindet. Daher ist die Zellverteilung nach der Adhäsion eine exakte Projektion der Zellen auf die Kanaloberfläche. In nach oben offenen Gefäßen, wie 96-well-Platten, ist die Zellverteilung durch den Meniskus der Flüssigkeit und das Kräfteungleichgewicht sehr inhomogen. Bei Bewegungen der Zellsuspension können zusätzlich störende Muster entstehen, ähnlich dem Effekt, wenn sich Zuckerkristalle in einer Tasse beim Umrühren in der Mitte sammeln. Die attraktive Zellhomogenität und der große Phasenkontrast-Bereich sind in Abbildung 3 dargestellt.

Abb. 3: Aus 16 Einzelbildern zusammengesetztes Übersichtsbild humaner Endothelzellen (HUVEC) im Phasenkontrast. Zu sehen ist die gesamte Kanalbreite (5 mm) des µ-Slide I. Objektiv Zeiss A-Plan 5× 0.12 Ph0. Maßstabsbalken = 500 µm.

Durch das Anschließen einer Pumpe können durch den Kanal definierte Flüsse angelegt werden. Dies ist ein großer Vorteil, wenn die Wirkung der Scherkraft auf die Zellen an der Oberfläche untersucht werden soll. Der Kanal kann dann zum Beispiel ein menschliches Blutgefäß simulieren, wenn er mit Endothelzellen ausgekleidet ist (Rädler und Zantl, 2005).

 O_2 und CO_2 spielen neben der richtigen Temperatur bei der Zellkultur eine große Rolle (Lindl, 2002). Durch den Einsatz eines stark Gas durchlässigen und auch Gas speichernden Kunststoffs ist die problemlose Kultivierung von anspruchsvollen Zellen gesichert. Ein entsprechender Träger aus Glas würde Zellwachstum und -vermehrung nur eingeschränkt zulassen.

Ein weiterer Vorteil der Kanalstruktur ist das einfache Überspülen der adhärenten Zellen mit geringen Volumina. Damit können teuere Reagenzien wie Antikörper oder Fluoreszenzfarbstoffe eingespart werden. Gleichzeitig bleibt der Zellrasen beim Pipettieren und Spülen unge-

Abb. 4: Vergleich der optischen Eigenschaften in einem kleinen, offenen Kulturgefäß (links) und einem Kanal (rechts). Der Meniskus und Streulicht an Kondensationströpfchen stören den Lichtweg in der offenen Form. In der definierten Kanalstruktur treten keine Störeffekte auf.

Abb. 5: Bildbeispiele für mikroskopische Anwendungen des µ-Slide I. Maßstab je 20 µm. A HT1080 Zellen (Humane Fibrosarkomzellen), Zytoskelett (F-Aktin) Immunfluoreszenz mit Alexa Fluor 488 -Phalloidin, Zeiss Plan-Neofluar 100×/1,30. B Rat1 Zellen (Fibroblasten der Ratte), Phasenkontrast, Axiovert 25, Zeiss Achroplan 10×/0,25 Ph1. C Rat1 Zellen, DIC, Axiovert 200/LSM 510, Zeiss Plan-Neofluar 20×/0,5. D Haematococcus pluvialis, Chlorophyll-Autofluoreszenz, Carl Zeiss LSM 5 Pascal, Zeiss Plan-Neofluar 40×/1,3. E Dictyostelium discoideum (DdLimE-GFP), GFP-Fluoreszenz und Hellfeld, Zeiss Plan-Apochromat 63×/1,4 Öl.

stört. Durch das Aspektverhältnis von Höhe zu Fläche, kann mit geringen Volumina gearbeitet werden und trotzdem eine große, repräsentative Zellzahl experimentell untersucht werden. Durch die kompakte Kanalgeometrie und den Abschluss der Reservoire mit Deckeln sind die Gefahren von Kontamination minimiert und steriles Arbeiten wird erleichtert. Gleichzeitig ist die Austrocknung stark eingeschränkt, was Langzeitexperimente über viele Tage bequem möglich macht. Diese Langzeitstudien können bei entsprechender Temperierung unmittelbar auf dem Mikroskop durchgeführt werden. Abbildung 5 zeigt einige Anwendungen mit verschiedenen Mikroskoptechniken.

Die µ-Slides bieten Spielraum für viele Anwendungen in der biomedizinischen Forschung. Praktisch alle adhärenten beziehungsweise semiadhärenten Zellkulturen können kultiviert und experimentell untersucht werden. Bisher werden die Produkte erfolgreich in den Gebieten Immunologie (Schymeinsky et al., 2005), Dermatologie (Radeke et al., 2005) und in der biophysikalischen Grundlagenforschung (Mangenot et al., 2005) eingesetzt.

Literaturhinweise

- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., Prasher, D. C.: Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science 263, 802–805 (1994).
- Lindl, T.: Żell- und Gewebekultur, Spektrum Akademischer Verlag, München 2002.
- Mangenot S., Hochrein, M., Rädler, J., Letellier, L.: Real-time imaging of DNA ejection from single phage particles. Current Biology 15, 430–435 (2005).
- Rädler, U., Zantl, R.: Simulation von Blutgefäßen in Zellkultur-Biochips. Laborwelt 6, 34–38 (2005).
- Radeke, H. H., Ludwig, J., Boehncke, W.-H.: Experimental approaches to lymphocyte migration in dermatology in vitro and in vivo. Experimental Dermatology 14, 641–666 (2005).
- Schymeinsky, J., Then, C., Walzog, B.: The non-receptor tyrosine kinase Syk regulates lamellipodium formation and site-directed migration of human leukocytes. Journal of Cellular Physiology 204, 614–622 (2005).
- Verfasser: Elias Horn, ibidi GmbH, Schellingstr. 4, 80799 München, E-Mail: ehorn@ibidi.de

Kurze Mitteilung

Lokalisierung des Ölbaum-Allergens

Der Ölbaum (Olea europaea) ist in den Ländern um das Mittelmeer und in einigen Gebieten Nordamerikas eine wichtige Kulturpflanze: Sie liefert in ihren Früchten das Olivenöl. Der Baum ist aber auch eine der Hauptursachen für eine Inhalationsallergie der örtlichen Bevölkerung. Das Hauptallergen ist im Blütenstaub des Olivenbaums lokalisiert. Die Molekularbiologen haben nun den Allergologen einen großen Dienst erwiesen, indem sie das Hauptallergen, Ole e I, auf elektronenmikroskopischem Niveau lokalisiert haben. Sie haben dazu die ISH-RT-PCR-Technik (in situ hybridization reverse transcription polymerase chain reaction) benutzt. Dabei wird die messenger-RNA für das Hauptallergen spezifisch markiert, sodass es mit dem Transmissionselektronenmikroskop lokalisiert werden kann. Es hat sich aus der Untersuchung ergeben, dass die Transkripte des Allergens im Zytoplasma sowohl der vegetativen Zelle als auch der beiden generativen Zellen des Pollenkorns anwesend sind. Sie sind häufig mit den Ribosomen des endoplasmatischen Retikulums (ER) assoziiert.

Hingegen werden keine Allergene in der inneren Pollenwand (Intine), den Vakuolen, den Lipidtropfen, den Plastiden oder in den Mitochondrien gefunden. Die Proteine des Hauptallergens sind im Lumen des ERs oder im Zytoplasma vorhanden, aber auch in den submikroskopischen Räumen der Außenwand (Exine) der Pollenkörner. Diese Ergebnisse bestätigen, dass das raue ER der Ort der Synthese und der Anhäufung dieser Allergen-Proteine ist. Damit ist zum ersten Mal eine spezifische In-situ-Lokalisierung der Transkripte des Ole e I-Allergens in einem reifen Pollenkorn des Olivenbaums nachgewiesen.

Literaturhinweis

Alché, J. D., Castro, A. J., Rodriguez-Garcia. M. I.: Localization of transcripts corresponding to the major allergen from olive pollen (Ole e 1) by electron microscopic non-radioactive in situ RT-PCR. Micron 33, 33–37 (2002).

H. F. Linskens, Nijmegen

ELSE SPEK AKADE VEH

Mikrokosmos 3/2006

510543 Bibliothek des OÖ. Landesmuseums

Museumstraße 14 4020 Linz

Bestellen können Sie

- telefonisch: (0 70 71) 93 53 6
- per Fax: (0 62 21) 912 63 38
- per mail: bestellung@elsevier.de

www.elsevier.de

Ein wunderbares Mikrobenlesebuch!!

1998, 379 S., kart. € 15,-/ sFr 24,-ISBN 3-8274-0398-7

Bernard Dixon Der Pilz, der John F. Kennedy zum Präsidenten machte

In 75 eigenwilligen Porträts aus der Welt der Bakterien, Viren und Pilze gewährt dieser Band einen faszinierenden Einblick in die erstaunliche Vielfalt der Lebensweisen und Leistungen dieser unterschätzten Organismengruppe. Mann gegen Mikrobe – das Kaiserreich im Seuchenfieber

2005, 380 S., 305 Abb., geb. € 28,- / sFr 45,-ISBN 3-8274-1622-1

Johannes W. Grüntzig / Heinz Mehlhorn Expeditionen ins Reich der Seuchen

Die Anfänge der Tropenmedizin waren spannend, abenteuerlich – und: verlustreich … Jene aufregende Zeit wird in diesem ungewöhnlichen Buch wieder lebendig. Unter Auswertung von oft schwer zugänglichen Quellen gelingt es den Autoren, ein faszinierendes Panorama des medizinisch-naturwissenschaftlich motivierten Expeditionsfiebers zwischen 1870 und 1910 zu zeichnen. In diesen wenigen Dekaden vermochten entschlossene Forscher die Auslöser und Übertragungswege vieler gefürchteter Tropenkrankheiten aufzuklären – Grundlage für eine effektive Seuchenbekämpfung auch in den Mutterländern und noch heute von hoher Aktualität. **Mit Hunderten von historischen Fotos!**

n Ende ikroskops ...

300229

(6)

Jukte. jen erzählen ihre Geschichte!

2003, 256 S., 32 Abb., geb. € 20,-- / SFr 32,--ISBN 3-8274-1459-8

Elmer W. Koneman Am anderen Ende des Mikroskops

In diesem Buch kommen erstmals jene unscheinbaren Lebewesen selbst zu Wort, die wir allzu oft als schädliche Keime und Krankheitserreger abwerten. Hier nun betreten verschiedene Bakterienarten die Bühne des Ersten Außerordentlichen Bakterienkongresses. Bei Ihren Auftritten und Diskussionen offenbaren sie nicht nur ihre individuellen Eigenarten und speziellen Fähigkeiten, sondern enthüllen auch die bisher unbekannte Innensicht der Bakterienwelt.

"Nicht nur der Bakterienkongress, sondern auch dieses Buch ist außerordentlich - unterhaltsam, amüsant ... Ich habe selten ein so witziges und dennoch fundiertes Sachbuch gelesen." Mikrokosmos

Wissen was dahinter steckt. Elsevier.

Sämtliche Preise verstehen sich zzgl. Versandkosten (Im Inland: € 3,50 pro Lieferung) – Preise unter Vorbehalt.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Mikrokosmos, Zeitschrift für Mikroskopie

Jahr/Year: 2006

Band/Volume: 95_3

Autor(en)/Author(s):

Artikel/Article: <u>Mikrokosmos 95_3 1</u>