

Biologie AG - „Mikroskopie klassisch & digital“

ZIEL DER AG

Die AG war eingebunden in ein Kooperationsprojekt mit dem Fraunhofer IPM (= Institut für physikalische Messtechnik). Aus dessen Arbeit, die sich an der Schnittstelle zwischen Forschung und industrieller Anwendung bewegt, entstand die Idee, für Schulen ein digitales holografisches Mikroskop zu entwickeln. Als open-source-Produkt soll es mit handelsüblichen Materialien aus dem Baumarkt etc. anhand einer Anleitung leicht selbst aufzubauen sein, um damit 3-D-Bilder von Objekten zu erzeugen. Neben der Biologie-AG wurde parallel noch eine Physik-AG angeboten, die sich wie schon im vergangenen Schuljahr mit der Umsetzung dieses Projekts ebenfalls befasste. Die Aufgabe der Bio-AG war es, die Entwürfe der Py-AG für das eigentliche Mikroskopieren an geeigneten Präparaten zu testen und sich über die Erfahrungen mit der Py-AG auszutauschen.

ARBEITSBEREICHE DER AG

Diesem Ziel entsprechend hatten wir 2 große Arbeitsbereiche:

1. Sicherheit in der klassischen Mikroskopie mit dem Lichtmikroskop zu gewinnen; verschiedene Präparate mit Blick auf das holografische Mikroskop zu suchen; Techniken des Mikroskopierens zu erlernen.
2. Test des von der Physik-AG entworfenen Prototyps des holografischen Mikroskops auf seine Brauchbarkeit im Alltag in engem Austausch und Zusammenarbeit mit den Teilnehmern der Physik-AG.

KLASSISCHE MIKROSKOPIE

Zunächst befassten wir uns mit verschiedenen Färbemethoden, um unterschiedliche Strukturen in Geweben, Zellen und Zellbestandteilen sichtbar zu machen.

- Gewebe

Mit der FCA-Färbung kann man verholztes Gewebe von lebendem unterscheiden. Dafür wird vom Zweig einer Hasel eine möglichst dünne Scheibe abgeschnitten und für etwa 10 Min. in die Spüllösung 1 gelegt. Danach wird der

Schnitt für 5 Min. in die FCA Färbelösung (Fuchsin-Astrablau) gelegt und anschließend für 5 Min. in die Spüllösung 2 (Alkohol) gelegt. Die Färbung basiert darauf, dass Fuchsin sehr gut in Alkohol löslich ist. In der Färbelösung werden zunächst verholztes und lebendes Gewebe gleichmäßig gefärbt. In der Alkohollösung wird dann jedoch aus den unverholzten Teilen das Fuchsin wieder ausgewaschen, wodurch nur das Astrablau zurückbleibt, dadurch erscheinen die unverholzten Stellen blau. Aus den verholzten Stellen jedoch lässt sich das Fuchsin nicht mehr auswaschen, wodurch diese dann rot erscheinen.

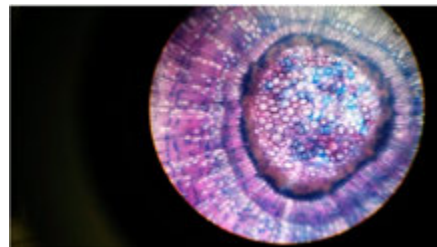


Abbildung 5: FCA-Färbung

- Zelle

Dasselbe Objekt, die weiße Küchenzwiebel, wir hatten zuerst in Wasser und danach in verschiedenen Färbelösungen betrachtet. Dazu haben wir von der Innenseite einer Schuppe der weißen Küchenzwiebel - für jede Färbelösung neu - mit Skalpell und Pinzette das nur aus einer Zellschicht bestehende Zwiebelhäutchen abgezogen und in die verschiedenen Lösungen gelegt. Ohne Färbung sieht man lediglich die Zellumrisse der Zellwände. Nach kurzer Einwirkzeit erhielten wir die folgenden Bilder:

In Karminessigsäure wurden die Zellkerne sichtbar.

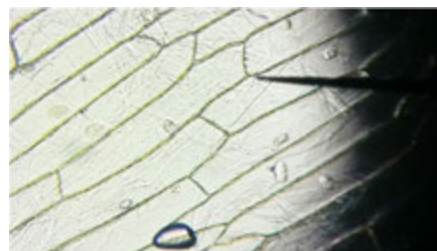


Abbildung 6: Karminessigsäure-Färbung

In Eosin wurden neben den Zellwänden und Zellkernen nun auch das Cytoplasma mit Vakuolen sowie weitere „körnige Strukturen“ (z. B. raues ER etc.) innerhalb der Zellen erkennbar.

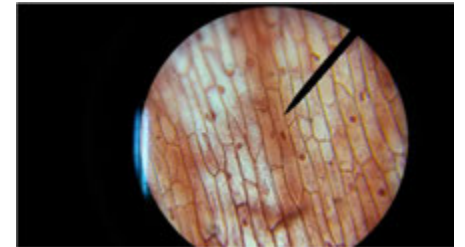


Abbildung 7: Eosin-Färbung

- Zellorganelle

Bei den Organellen haben wir uns auf die unterschiedlichen Ausbildungen von Plastiden konzentriert.

Sie können als Chloroplasten vorliegen, in denen die Pflanze Photosynthese betreibt. Da die Chloroplasten von Natur aus grün sind (Name!), ist eine Färbung nicht nötig. Wir konnten aber unter dem Mikroskop sehr schön die Plastidenbewegung sehen, d.h. das passive „Mitschwimmen“ der Chloroplasten in der Plasmaströmung, auf die wir wiederum durch die Chloroplastenbewegung indirekt erkennen konnten.

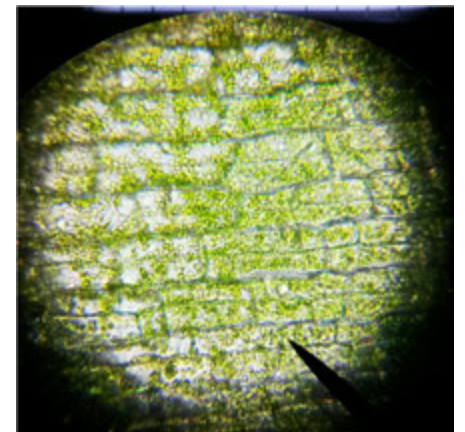


Abbildung 8: Chloroplasten

Die zweite Ausprägung der Plastiden sind die Chromoplasten, die z.B. Früchten ihre rot-orange Farbe geben. Chromoplasten können intrazellulär als kleine Körnchen = kristallös oder als Kügelchen = globulär vorliegen. Diese konnten wir im Fruchtfleisch der Hagbutte erkennen.

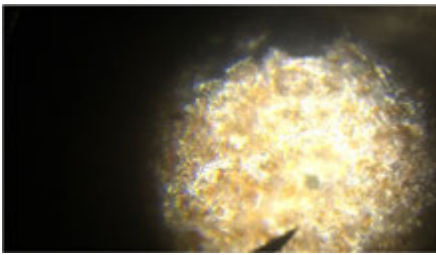


Abbildung 9: Chromoplasten

Die dritte Ausprägung der Plastiden sind sog. Amyloplasten, die den Zellen als Energiespeicher dienen. Wir fanden sie also in den Zellen der Speicherorgane, z.B. der Kartoffelknolle. Da sie farblos sind, müssen sie mit Lugol'scher Lösung mittels Saugtechnik blau gefärbt werden. Dazu wird ein Tropfen der Lösung an den Rand des Deckgläschens gesetzt und von der gegenüberliegenden Seite mit einem Saugpapier durch Kohäsion unter das Deckgläschen gezogen. So entsteht der auf dem Foto erkennbare Farbgradient.

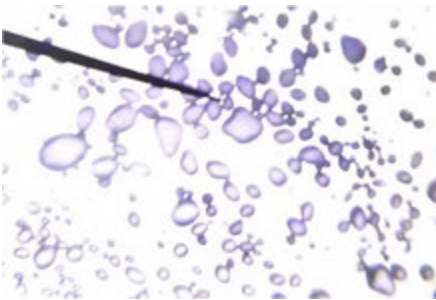


Abbildung 10: Amyloplasten - Farbgradient

Zu erkennen ist hier schon die Schichtung der Amyloplasten, die nach stärkerem Abblenden noch deutlicher wird. Die Schichtung kommt dadurch zustande, dass nach und nach neue Stärkeschichten auf die schon vorhandenen aufgelagert werden; die Auflagerung erfolgt gut erkennbar azentrisch. So erinnern die Amyloplasten etwas an Miesmuscheln.

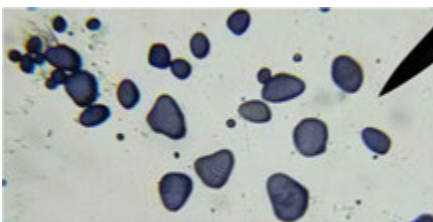


Abbildung 11: Amyloplasten – azentrische Schichtung

Die Funktion der Amyloplasten konnten wir auf dem folgenden Präparat erkennen: Es zeigt ein am Rand schon etwas raues Stärkekorn, was auf den enzymatischen Abbau der Stärke schließen lässt. Man sagt, der Amyloplast „korrodiert“. Dies ist dann der Fall, wenn die Energie für Stoffwechselaktivität benötigt wird, z.B. während der Keimung. Das Präparat stammt von einem keimenden Dinkelkorn, aus dessen Endosperm wir etwas Stärke gekratzt und mit Lugol gefärbt hatten.

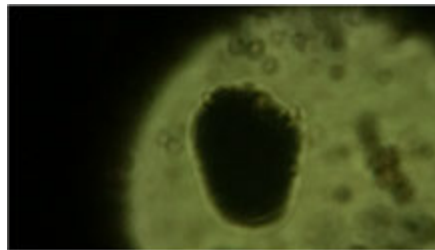


Abbildung 12: „korrodierter“ Amyloplast

Ein weiteres Organell der Untersuchung war die Vakuole und ihre Funktion in der Pflanzenzelle. Unser Objekt war die Rote Küchenzwiebel, die von Natur aus eine schön rot gefärbte Vakuole hat. Abhängig vom Verhältnis der Salzkonzentration der Vakuole zu der Salzkonzentration des Außenmediums strömt Wasser aus der Vakuole heraus (Plasmolyse) bzw. in die Vakuole hinein (Deplasmolyse). Im Zustand der Plasmolyse drückt die Vakuole wegen des Wasserverlusts nicht mehr gegen die Zellwand, die Pflanze welkt; nach der Deplasmolyse ist die Vakuole prallvoll mit Wasser und drückt gegen die Zellwand, das Blatt ist frisch. Das Foto zeigt den Übergang von Plasmolyse zu Deplasmolyse, gut zu erkennen an den unterschiedlichen Volumina der Zellvakuolen, die wir durch Saugtechnik erzeugt haben.

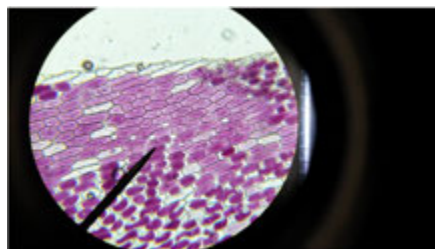


Abbildung 13: Vakuole – Plasmolyse / Deplasmolyse

HOLOGRAFISCHE MIKROSKOPIE

Nachdem wir uns ausreichend Kenntnisse und Fertigkeiten in der klassischen Mikroskopie erworben hatten, nahmen wir die Kooperation mit der Py-AG auf. Wir bekamen Informationen über den Bau und Architektur des HolMiskroks; dabei ergaben sich zunächst zwei grundlegende Fragen:

- Lassen sich Frischpräparate so fixieren, dass sie auch im waagrechten Aufbau nicht vom Objektträger fließen, z.B. durch zwei aneinander gepresste Objektträger?
- Lassen sich die optischen Einrichtungen in kurzer Zeit justieren oder benötigt man (zu) viel Zeit, bis das Mikroskop überhaupt einsatzbereit ist?

Das erste Problem konnten wir nicht zufriedenstellend lösen: Frischpräparate sinken nach unten, wenn man sie senkrecht hält, auch wenn nur wenig Wasser verwendet wird. Wir behielten uns daher mit der Anfertigung von Negativ-Präparaten. Dazu wird einfacher Bastelleim auf das Objekt aufgetragen und nach dem Trocknen als durchsichtiges dünnes Häutchen wieder abgezogen. So erhält man ein 3-D-Negativ des Objekts. Das Photo zeigt das so entstandene Negativ der Blattunterseite von *Rhoeo discolor*, auf dem schon unter dem Lichtmikroskop viele Spaltöffnungen zu erkennen sind.

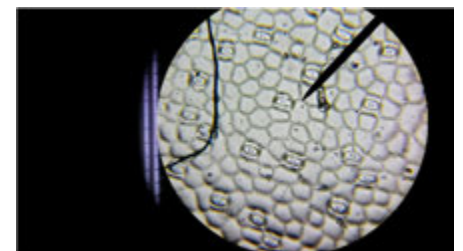


Abbildung 14: *Rhoeo discolor* - Negativpräparat der Blattunterseite

Dieses Negativpräparat kann nun problemlos senkrecht in den Strahlengang des HolMiskroks eingebracht und untersucht werden.

Nach mehreren Rechenschritten, bekamen wir in mehreren Etappen tatsächlich beeindruckende digitale 3-D-Bilder:

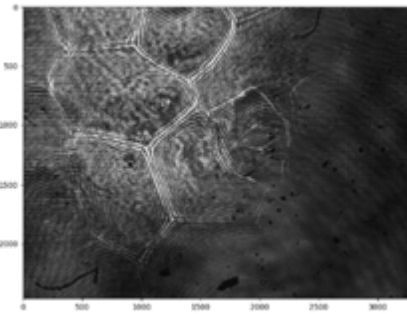


Abbildung 15: Negativpräp. - Kamerabild

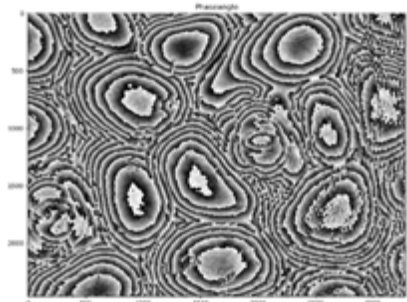


Abbildung 16: Negativpräp. - Verstetigung

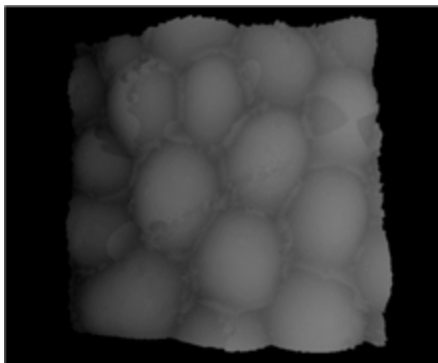


Abbildung 17: Negativpräp. – 3-D-Bild

Eine Höhenlinie entspricht einer Wellenlänge im Rotbereich, das heist ca. 650 nm = 0,65 micrometer. Das heisst der Höhenunterschied beträgt bei 4-5 Höhenlinien ca. 2-3 micrometer. Das entspricht im mittleren sowie im 3-D-Bild unten einer Wölbung.

Es ließen sich also schöne und brauchbare Ergebnisse erzielen, allerdings ist die Auswahl geeigneter Präparate eingeschränkt: Die Präparate müssen für Durchlicht geeignet sein, sie müssen trocken sein und im Wellenlängenbereich des Rot-Lasers auflösbar sein.

Das zweite Problem des selbständigen Aufbaus und der Justierung des HolMikroskops war weit schwieriger als gedacht. Hier ist Übung und eine

detaillierte Aufbaubeschreibung nötig. Das wird uns sicher im kommenden Jahr noch beschäftigen.

TECHNISCHE ERWEITERUNGEN DER AG

1. flüchtige Stoffe

Während der Arbeit mit dem Lichtmikroskop kam die Frage auf, ob sich auch flüchtige Stoffe unter dem Mikroskop betrachten lassen. In dieser Frage half uns die Kristallisationsmikroskopie weiter. Aus Pulverkaffee lässt sich so das Coffein gewinnen. Dazu haben wir 2 Objektträger auf der einen Seite mit einer Wäscheklammer fixiert, während auf der gegenüberliegenden durch den eingeschobenen Schaft einer Präpariernadel eine Öffnung entstand. Von der Seite sieht der Zwischenraum zwischen den beiden Objektträgern wie ein spitzes Dreieck aus. Auf den unteren OT haben wir einige Brösel Kaffee über einer Flamme erhitzt und so das Coffein aus dem Pulver getrieben. Das Coffein schlägt sich dann auf der Unterseite des oberen OT (kühler!) wieder nieder. Diese Unterseite haben wir dann mikroskopiert, das Coffein wird als kleine Nadeln kristallin erkennbar.



Abbildung 18: Mikrosublimation - Coffeinkristalle

2. Polarisation

Mit wenig Aufwand ließ sich aus einem einfachen Lichtmikroskop ein Polarisationsmikroskop bauen.

Dazu benötigten wir Polarisationsfolie (linear polarisierend, ca. 0,6 bis 0,8 mm dick; lässt sich leicht im Internet bestellen, kostet allerdings ca. 25 € in der

Größe 10x10 cm), Pappe, Schere und Tesafilm. Aus den Materialien haben wir einen Polarisator und einen Analysator gebaut. Der Polarisator wird direkt auf die Lichtquelle des Lichtmikroskops gelegt, den Analysator befestigen wir, indem er von hinten in den Augenschutz des Okulars gesteckt wird. So muss man das Okular nicht aus dem Tubus nehmen und kann den Analysator leicht drehen.

Das Licht verlässt als Transversalwelle die Lichtquelle. Diese Transversalwellen schwingen senkrecht zur Ausbreitungsrichtung der Welle in alle Richtungen. Der auf der Lichtquelle liegende Polarisator filtert nun Lichtwellen, die alle in derselben Richtung schwingen. Wenn man nun den Analysator um 90 Grad zum Polarisator verdreht, filtert der Analysator auch noch diese Wellen, sodass man im Mikroskop gar nichts mehr sieht; im Auge kommt kein Licht an, obwohl die Lichtquelle Licht aussendet. Das ist die Grundeinstellung des Polarisationsmikroskops.

Wenn nun aber ein Präparat auf dem Objektisch des Mikroskops liegt, wird das durch den Polarisator in derselben Ebene schwingende Licht abermals gebrochen. Wird der Analysator nun langsam verdreht, erscheinen die Objekte durch Interferenz in völlig ungewohnten Farben.

Farblose Glucosekristalle erschienen in den Farben des Regenbogens.

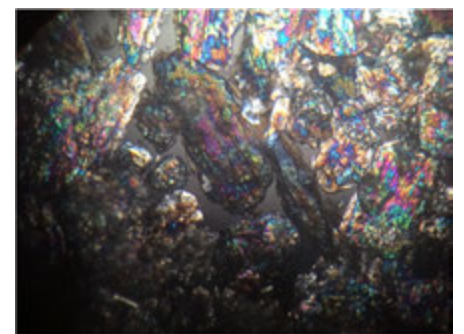


Abbildung 19: Polarisation – Glucose

Die schon bekannten Amyloplasten der Kartoffel erschienen in ganz neuem Licht!

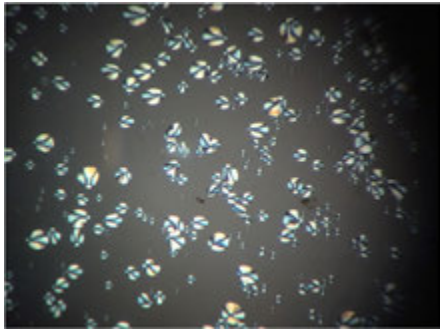


Abbildung 20: Polarisation – Amyloplasten der Kartoffel

Der kristallisierte Vakuoleninhalt im trockenen Blatt der Roten Küchenzwiebel ließ sich sehr gut erkennen.

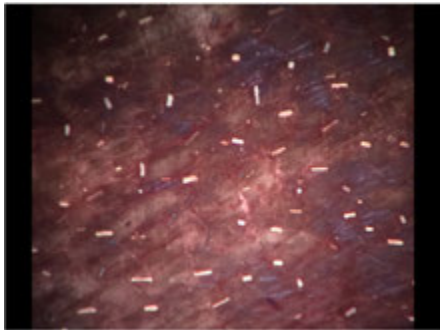


Abbildung 21: Polarisation – Rote Küchenzwiebel

In tollen Farben erschienen die Fasern an der Risskante von weißem Seidenpapier.

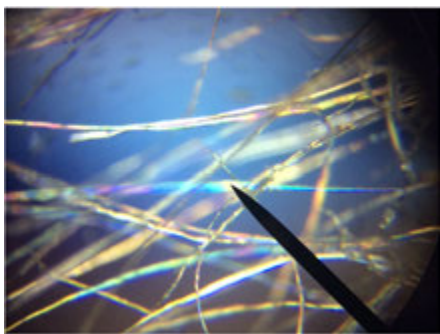


Abbildung 22: Polarisation – Seidenpapier

RÜCKBLICK UND AUSBLICK

Wir haben viel mit dem Lichtmikroskop gearbeitet und auf diese Weise viel über Objekte und Präparation im klassischen Mikroskopieren gelernt.

Interessant und völlig neu war die Erfahrung mit dem digitalen HolMikroskop. Die Zusammenarbeit mit der Py-AG und dem Fraunhofer IPM brachte einerseits sehr interessante Einblicke in die digitale und physikalische Seite der Mikroskopie,

sie brachte aber insbesondere den Eindruck einer über die Fächer hinausgehenden Zusammenarbeit, die letztendlich auch zu einem sehr schönen (Zwischen)-Ergebnis geführt hat – und im kommenden Jahr weitergeführt werden soll.

Autor: Niko Ruf