

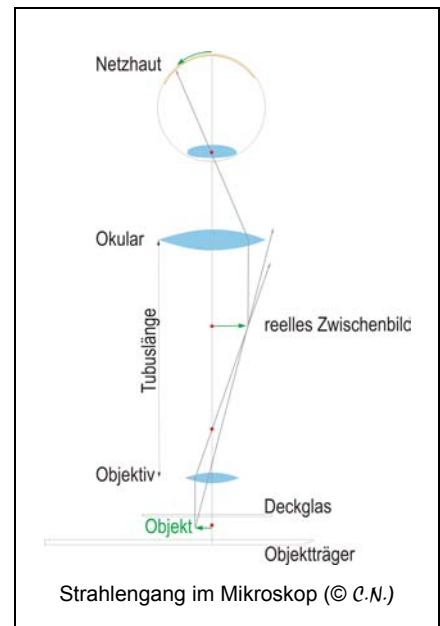
# 1. Mikroskopie

## 1.1. Zur Vorbereitung:

1 Bevor mit dem Mikroskopieren begonnen werden kann, müssen die wesentlichen Teile und Bedienungselemente des verwendeten Mikroskops bekannt sein (siehe Abbildung rechts). Jeder Mikroskoptyp ist ein bisschen anders zu bedienen, man sollte sich daher jedes mal mit der Funktionsweise vertraut machen, vor allem bei Grob- und Feintrieb.

2 Der Arbeitsplatz muss sauber und zunächst leer sein. Für das Arbeiten soll nur das unbedingt benötigte Material mitgenommen werden:

- Laborjournal, Schreibzeug
- fettfrei gereinigte Objektträger, Deckgläser (18\*18mm)
- Mikroskopierbesteck (Präpariernadeln, Impfösen und sonstiges Material für sterile Arbeitsschritte). Eine kleine, längliche Glasschale zum Ablegen von Präpariernadeln, Impfösen oder sonstigem Besteck ist sehr nützlich, ev. Teclubrenner
- Filterpapier, ev. Küchenrolle zum Unterlegen bei Färbemethoden



### 1.1.1. Die Bedienung des Mikroskopes:

Gute Mikroskope sind Präzisionsgeräte, deren optische Systeme sehr empfindlich auf unsachgemäße Behandlung reagieren. Bevor man also beginnt zu Mikroskopieren sollte man sich auf jeden Fall mit den Bedienungselementen vertraut machen (z.B. in welche Richtung bewegt sich der der Objektstisch wenn man den Grob/Feintrieb benutzt).

Es kommt vor allem darauf an, nichts mit Gewalt zu versuchen und die Frontlinse der empfindlichen Objektive nicht zu zerkratzen. Man stellt daher zunächst den Objektstisch ganz nach unten und schwenkt das kleinste Objektiv in den Strahlengang.

1 Grundeinstellung:

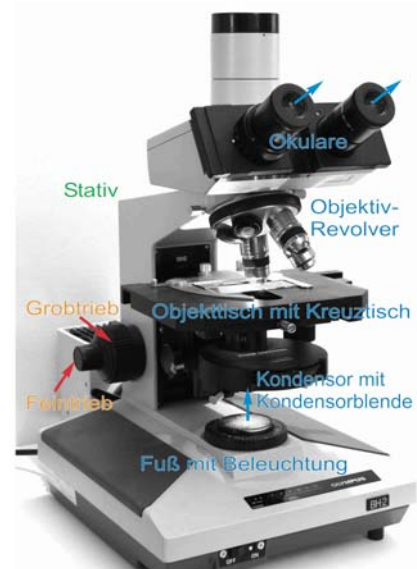
*Objektstisch ganz unten, kleinstes Objektiv im Strahlengang.*

Zum Üben aller weiteren Schritte organisiert man sich am besten ein einfaches Präparat (z.B. Trockenpräparation eines Haares,

2 Kondensator zunächst ganz oben, Kondensiorblende ganz zu

3 Objekt im Kreuztisch einspannen

4 Objektstisch langsam mit dem Grobtrieb hinauffahren und gleichzeitig durch das Okular schauen. Sobald ein Bild erkennbar wird, nur mehr den Feintrieb verwenden bis das Bild scharf ist. Falls nichts zu finden ist, kann man auf den Deckglasrand versuchen scharf zu stellen



Oft findet man ein Objekt erst, wenn man mit der Kreuztischeinstellung hin- und herfährt und auf einmal einen „Schatten“ vorbei huschen sieht.

Auf diesen kann man sich dann bei der Scharfstellung konzentrieren.

*Wenn man nichts findet keinesfalls ein stärker vergrößerndes Objektiv einschwenken !*

Prinzipiell kann man auch nach dem Einlegen des Präparates den Objektstisch ganz nahe an das kleinste Objektiv heranführen und von dieser Stellung ausgehend versuchen scharf zu stellen. Der Vorteil dabei ist das sichere Vermeiden eines Zusammenstoßes zwischen Objektivfrontlinse und Präparat.

5 Jetzt kann die Kondensorblende in der Öffnungsweite und der Kondensor selbst in der Höheneinstellung so eingestellt werden, dass das Bild an Genauigkeit (siehe Auflösung 1.2.2.) und Klarheit gewinnt (keine Beugungsmuster mehr, aber trotzdem guter Kontrast).

6 Untersuche dann die Wirkung des Kondensors und der Kondensorblende mit Hilfe eines kleinen Papierstückchens (die Weite des Lichtkegels wird durch die Blendenstellung beeinflusst). Dabei bleibt der Objektstisch nach unten gestellt. Verschaffe Dir einen Überblick über die Bildentstehung anhand der nebenstehenden Zeichnung und überlege, welche Faktoren für die Bildentstehung wesentlich sind (Helligkeit, Kontrast, Schärfentiefe).

7 Wenn ein Präparat gut eingestellt ist und ein deutliches, scharfes Bild sichtbar ist, nur dann kann zu einem stärker vergrößernden Objektiv gewechselt werden. Dazu muss der Objektivrevolver vorsichtig in Richtung des nächst-stärkeren Objektivs verdreht werden ohne dabei am Grob- oder Feintrieb zu drehen.

→ *Beachte dass ein stärker vergrößerndes Objektiv nur sinnvoll ist , wenn man auch was sieht !!!!*

8 Wenn man die Beobachtung beendet dreht man mit dem Grobtrieb den Objektstisch hinunter und entnimmt danach das Präparat.

Das Lichtmikroskop ermöglicht Beobachtungen am lebenden Objekt. Bedenkt man diese Tatsache, so versucht man in erster Linie das eingestellte Objekt zu beobachten und „jagt“ nicht nach dem höchsten, möglichen Vergrößerungsmaßstab (1:1600). Starke Vergrößerungen sind nur bei ruhigen und sehr dünnen Objekten sinnvoll ! Es ist zu bedenken dass die Schärfentiefe bei starker Vergrößerung immer geringer wird und das Auflösungsvermögen durch die Lichtwellenlänge und numerische Apertur des Objektivs begrenzt ist (siehe 1.2.2. ).

Bei lebenden Präparaten sollte man stets nach folgenden Merkmalen suchen:

1 die Zellwand bzw. die Begrenzung der Zelle nach außen:

Zellwände sind aufgrund der Dicke des Materials stärker Licht-brechend als das Cytoplasma; Zellmembranen sind selbst nicht erkennbar, jedoch das unterschiedliche Aussehen von Zellinhalt und Umgebung der Zelle.

2 Der Zellkern (bei Eukaryonten):

Wenn man einmal eine klar begrenzte Zelle erkannt hat kann man sich auf die Suche nach dem Zellkern begeben. Blende und Kondensor einstellen! Der Zellkern ist meist oval und sieht wie eine Scheibe aus, die etwas dichter strukturiert ist als das umgebende Cytoplasma. Man beobachtet kleine Granula, die kaum Brown'sche Molekularbewegung zeigen.

Der Zellkern liegt in Pflanzenzellen meist von einer großen Vakuole verdrängt an der Zellwand. Sein Aussehen ist daher je nach Beobachtungswinkel mehr oder weniger zur Ellipse verzogen. Durchschärfen (mit dem Feintrieb die verschiedenen Schärfenebenen beobachten) !

**3** Organellen:

Am auffallendsten sind sicherlich die Chloroplasten in grünem pflanzlichem Material.

**4** Bewegungen:

Plasmaströmungen (gerichtet, kontinuierlich) im Gegensatz zur Brown'schen Molekularbewegung (ungerichtet, chaotisch, Temperatur-abhängig)

### **1.1.2. Dokumentation:**

Die Protokollierung mikroskopischer Beobachtungen erfolgt in der Regel durch Zeichnungen auf glattes Papier zunächst mit einem feinen Bleistift. Beim Anfertigen der Zeichnungen soll folgendes beachtet werden:

- nicht zu dick zeichnen (Radieren ist möglich !)
- zuerst ein Übersichtsbild anfertigen
- Detailzeichnungen immer mit einem Hinweis versehen, um welches Detail der Übersichtszeichnung es sich handelt
- Das gezeichnete Bild soll vom Größeneindruck ebenso groß erscheinen wie das Bild im Mikroskop (man kann sich behelfen indem man einen Kreis zeichnet der den Blickfeld im Mikroskop entspricht).
- Es sollen keine Details gezeichnet werden, die nicht zu erkennen sind, sondern nur das was man auch tatsächlich gesehen hat.
- Eingestellte Vergrößerung dazuschreiben und beschriften

### **1.1.3. Entsorgung der Präparate:**

Da es unter den mikroskopischen Präparaten auch Objekte gibt, die möglicherweise pathogen sind, müssen Deckgläser und Objektträger dekontaminiert werden: Deckgläser in den „Biohazard“ Abfall, Objektträger in eine Desinfektionslösung (DanKlorix1:40/Spülmittel). Verunreinigungen am Mikroskop selbst werden unter Aufsicht mit Hilfe von Desinfektionslösung entfernt.

## **1.2. zu den optischen Eigenschaften:**

### **1.2.1. Die Vergrößerung :**

Der Vergrößerungsfaktor für ein mikroskopisches Bild ergibt sich aus Objektivvergrößerung x Okularvergrößerung. Die Leistung eines Mikroskops beurteilt man nicht nach der erreichbaren Vergrößerung, sondern nach seinem Auflösungsvermögen:

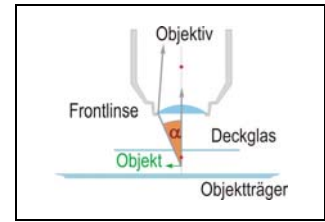
### **1.2.2. Das Auflösungsvermögen:**

Das Auflösungsvermögen wird besser, je kürzer die Wellenlänge des verwendeten Lichtes ist und je mehr Licht vom Objektiv eingefangen werden kann. Als Wert gibt man einfach die Auflösungsgrenze ( $d$ ) an, jener Abstand in einem Objekt, bei dem 2 Punkte gerade noch als getrennt wahrgenommen werden können.

Ein gutes Auflösungsvermögen bedeutet also eine kleine Auflösungsgrenze und ein kleiner Wert für  $d$ .

Diese Distanz ist abhängig von der Lichtwellenlänge  $\lambda$  und der numerischen Apertur des Objektivs.

*Auflösungsgrenze*  $d = \frac{\lambda}{A_{Obj}}$



Die numerische Apertur eines Objektivs gibt an, wie gut der „Einblick“ eines Objektivs auf das Objekt ist. Je weiter der Lichtkegel ( $\alpha$ ) ist, der nach dem Objekt, noch in das Objektiv eintreten kann und dort zur Bildgebung genutzt werden kann, desto besser.

*numerische Apertur*  $A = n \times \sin \alpha$

$n$  ist in diesem Ausdruck der Brechungsindex des Objektivglases und  $\alpha$  der  $\frac{1}{2}$ Winkel der Spitze des Lichtkegels, der vom Objektiv erfasst werden kann (je größer  $\alpha$  desto größer auch der  $\sin \alpha$  und damit umso besser). Sehr gute Objektive erreichen eine nA von bis zu 1,3. Dabei ergibt sich für blaues Licht (ca. 450nm) eine Auflösungsgrenze von 346nm oder 0,35 $\mu$ m. Damit lassen sich Bakterien gut erkennen, die innere Struktur von Zellorganellen aber nicht mehr.

Je höher die numerische Apertur (im Bild rechts z.B. 0,85) und je kleiner die Lichtwellenlänge, desto kleiner ist die Auflösungsgrenze und umso besser daher das Auflösungsvermögen (bei guten Objektiven 1,30).

*180 / 0.17*  
*EF*  
*63 / 0.85*

*Objektivtype*  
*63-fache Vergrößerung / numerische Apertur*



Vergrößerung: Objektivvergrößerung x Okularvergrößerung

Die Objektivdaten lesen sich wie folgt:

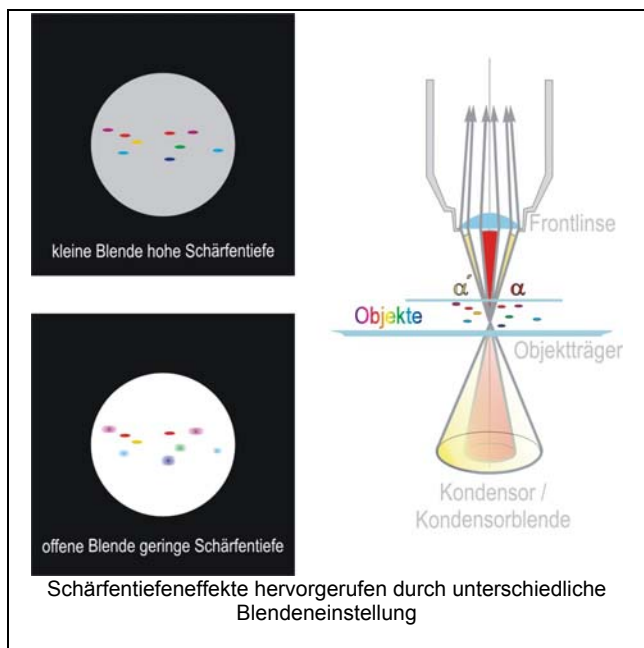
Durch die physikalischen Regeln begrenzt, ergibt sich für das Lichtmikroskop eine sinnvolle Maximalvergrößerung von ca. 1300fach bei einer sehr guten optischen Konstruktion.

**1.2.3. Die Kondensoreinstellung:**

Mit Hilfe des Kondensors wird das möglichst parallele Licht aus der Beleuchtungseinrichtung an das verwendete Objektiv angepasst und am Objekt gebündelt werden.

Je nach Mikroskoptyp gibt es unterschiedlich gebaute Kondensoren. In Forschungsmikroskopen ist die optische Konstruktion des Kondensors mindestens so aufwendig wie jene der Objektive. Da der Kondensor das Licht auf dem Objekt bündeln soll kann er in der Höhe verschoben werden und sollte so eingestellt sein, dass eine möglichst gleichmäßige und möglichst helle Ausleuchtung des Blickfeldes erreicht wird.

Die Kondensorblende regelt die Form des Lichtkegels, der auf den Objektträger trifft.



Je kleiner die Blende, desto spitzer wird dieser Lichtkegel. Ein spitzer Lichtkegel bedeutet:

- in der mikroskopischen Abbildung entsteht ein sehr kontrastreiches Bild, das eher an ein Schattenspiel erinnert
- eine verminderte Auflösung (siehe 1.2.2.  $\alpha$  wird kleiner).
- eine Zunahme der Schärfentiefe weil gebündelteres Licht zu deutlicherer Projektion der Umrisse führt.

Eine hohe Schärfentiefe bedeutet, dass im Objekt mehrere Ebenen gleichzeitig nahezu scharf abgebildet werden. Das ist selten wünschenswert, da Objekte, die sich vielleicht gar nicht nahe sind, trotzdem gleichzeitig scharf gesehen werden, weil sie übereinander liegen. Man sieht in so einem Fall „zu viel auf einmal“ (im Bild oben sind Objekte der Ebene A und B dann gleichzeitig scharf).

Ein weiterer Nachteil einer zu klein eingestellten Blende sind die Beugungserscheinungen die vor allem an scharfen hell / dunkel Grenzen auffallen.

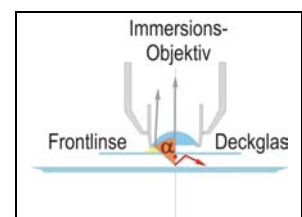
#### **1.2.4. Die Köhler'sche Beleuchtungseinrichtung:**

Bei guten Mikroskopen gibt es bei der Beleuchtungseinrichtung nicht bloß eine Lampe sondern ein Linsensystem, das dem Kondensor einen nahezu parallelen Lichtstrahl liefert. Es besitzt als typisches Merkmal eine sogenannte Leuchtfeldblende, mit der der Durchmesser des Lichtstrahls verändert werden kann. Mit seitlichen Stellschrauben kann er in die Mitte des Sehfeldes zentriert werden.

Um richtig zu "Köhler" legt man ein einfaches Präparat auf den Objektstisch, stellt mit dem Grobtrieb scharf und schließt die Leuchtfeldblende (nicht zu verwechseln mit der Kondensorblende!) bis der Lichtstrahl ganz dünn ist. Den Kondensor verstellt man dann in der Höhe soweit, bis die Umrisse dieser Leuchtfeldblende sichtbar werden, ohne den Objektstisch zu verändern. Dabei sind diese Umrisse nur mit auffallenden Farbbrändern zu sehen während das Objekt im Präparat nach wie vor scharf abgebildet wird. Ist das erreicht, kann man die Leuchtfeldblende gerade so weit öffnen, dass das Blickfeld vollständig ausgeleuchtet ist. Das Mikroskop ist dann für die Beobachtung vorbereitet. Gutes "Köhler" ist die Voraussetzung, dass das Auflösungsvermögen voll genutzt werden kann ! Nach jedem Objektivwechsel muss die Köhlereinstellung kontrolliert und eventuell angepasst werden.

#### **1.2.5. Beobachtung mit Hilfe von Immersionsobjektiven:**

Für starke Vergrößerungen benutzt man Objektive die eine kurze Brennweite besitzen. Damit ausreichend Licht in das Objektiv gelangen kann, muss der Lichtkegel der aus dem Kondensor kommt möglichst weit sein ( $\alpha$  groß). Ab einem bestimmten Winkel kommt es aber zur Totalreflexion an der Grenze zwischen Deckglas und Luft. Dieses Licht wäre dann für die Abbildung verloren. Befindet sich Öl zwischen Deckglas und der Frontlinse des Objektivs kann diese Totalreflexion verhindert werden. Damit kann die numerische Apertur des Objektivs zur Gänze genutzt werden und man erreicht ein höheres Auflösungsvermögen (Wird ein Immersionsobjektiv ohne Öl verwendet sieht man alles nur sehr verschwommen, falls man überhaupt scharf stellen kann).



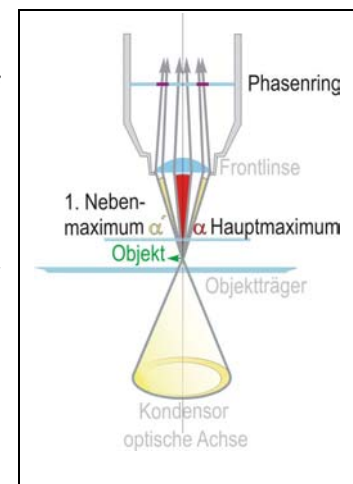
#### **Einstellung:**

- Man mikroskopiert wie gewohnt zunächst mit der geringsten Vergrößerung bis man als nächstes Objektiv jenes mit der Zusatzbezeichnung „Oel“ oder „Oil“ in den Strahlengang drehen müsste.
- Scharfeinstellung jetzt nicht mehr verändern und erst wieder benutzen, wenn das Ölobjektiv eingeschwenkt wurde!

- Man schwenkt dann zunächst das zuletzt verwendete Objektiv aus dem Strahlengang, ohne jedoch gleich das Immersionsobjektiv (Oil) in den Strahlengang zu geben.
- In dieser Zwischenstellung, während kein Objektiv auf das Objekt gerichtet ist, gibt man einen kleinen Öltropfen eines speziellen, sehr saubern Immersionsöls direkt auf das Deckglas an jene Stelle, die sich in der Mitte des Kreuztisches befindet. Direkt im Strahlengang befindet sich dann der Öltropfen.
- Nun kann man vorsichtig und ganz langsam das Immersionsobjektiv in den Strahlengang schwenken, wobei man besonders darauf achten muss, das Deckglas mit der Frontlinse nicht zu rammen. Das Öl soll langsam zwischen Deckglas und Frontlinse des Immersionsobjektives gleiten, damit keine Luftblasen im Öl eingeschlossen werden, denn die stören die Abbildungsqualität.
- Sobald das Objektiv eingerastet ist wird *nur mehr mit dem Feintrieb scharf gestellt*.
- Die Entnahme des Präparates vom Objektisch erfolgt erst nachdem der Tisch abgesenkt wurde.
- Nach der Benutzung wird das Immersionsobjektiv mit einem weichen Taschentuch abgetupft. Dieser Vorgang wird mit etwas Xylol im Tuch wiederholt.

### 1.2.6. Der Phasenkontrast

Lichtwellen werden an Kanten gebeugt. Deutlich zu beobachten ist dies z.B. an einem sehr kleinen Loch in einem schwarzen Karton, oder im Mikroskop bei kleiner Blende an einem scharf abgegrenzten Objekt. Der Schattenbereich wird durch das gebeugte Licht heller und im Hellen sieht man dunkle Linienmuster. Jedes Objekt im Strahlengang eines Mikroskops ruft also Beugungsmuster hervor und man erkennt dieses Beugungsmuster normalerweise nur wenn das Objekt eine sehr deutliche und regelmäßige Struktur hat, wie zum Beispiel ein Haar, oder ein Gitternetz. Bei normalem Licht lassen sich die Beugungsmuster schwer erkennen, weil sie vom Hauptmaximum überstrahlt werden. Im Fall einer ringförmigen Lichtquelle (Ringblende im Kondensator) treten die Beugungsmuster aber ringförmig um den zentralen Lichtkegel auf und nehmen im



Objektiv deutlich sichtbar einen anderen Weg. Bei einer ringförmigen Lichtquelle sieht man daher bei einem Gitternetz als Objekt rund um das mittlere, helle Beugungsbild mehrere schwächer Bilder dieses Gitternetzes. Die Anzahl der Bilder ist von der Symmetrie des Gitternetzes abhängig. Die nächstgelegenen, um das Hauptbild angeordneten Bilder gehören zum 1. Nebenmaximum. Der optische Trick bei der Phasenkontrast-Mikroskopie besteht nun darin, die Lichtquelle ringförmig zu gestalten und in den Lichtweg des 1. Nebenmaximums im Objektiv eine Schicht einzubringen, in der das 1. Nebenmaximum um  $\lambda/2$  relativ zum Hauptmaximum verschoben wird, bevor es durch das Linsensystem wieder mit dem Hauptmaximum zum Bild überlagert wird. Bei der Überlagerung (Interferenz) von Haupt- und Nebenmaximum ist das Nebenmaximum dann phasenverschoben und ein heller Hintergrund wird deutlich dunkler.

Jedes Phasenkontrastobjektiv hat seinen eigenen Phasenring und benötigt im Kondensator die dazu passende Ringblende. Man muss also immer die richtige Phasenblende einstellen.

Durch den Phasenkontrast wird bei ungefärbten Objekten eine wesentliche Kontraststeigerung erreicht, Bakterienzellen werden deutlich sichtbar. Gefärbte Objekte eignen sich nicht gut für die Beobachtung im Phasenkontrast, da die Helligkeitsunterschiede zu stark werden.

### 1.2.7. Das Dunkelfeld

Bei der Dunkelfeldmikroskopie wird das direkte Licht durch eine Ringblende ausgeblendet, sodass kein direktes Licht ins Objektiv gelangt. Es gelangen nur die vom Objekt reflektierten Lichtanteile ins Objektiv, der Hintergrund bleibt dunkel. Das Dunkelfeld kann nur bei Vergrößerungen bis ca. 600-fach verwendet werden, weil die Lichtausbeute zu gering wird und die starken Streueffekte das Bild verfälschen.

Im Dunkelfeld lassen sich aber Strukturen beobachten, die kleiner sind als das Auflösungsvermögen, weil die von ihnen reflektierten Lichtstrahlen zwar kein Bild ergeben können, aber als Lichterscheinung vor dem dunklen Hintergrund dennoch auffallen (so wie ein Leuchtturm, der nur anhand des Lichtes das von ihm ausgeht, gesehen wird und nicht als Turm selbst). Bei vielen Mikroskopen kann bei geschickter Kondensoreinstellung ein Dunkelfeld erzeugen indem man einen etwa 1,5cm großen Kreis aus schwarzem Papier auf die Öffnung der Beleuchtungseinrichtung legt, sodass nur mehr ein etwa 3mm breiter Lichtring zum Kondensator gelangt.

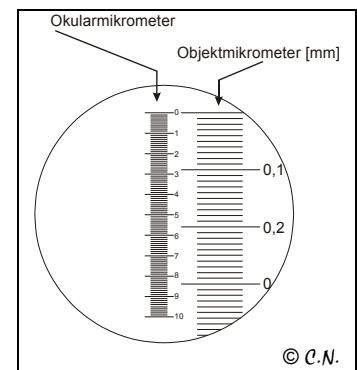
### 1.3. Größenmessung

Um in mikroskopischen Präparaten Längen messen zu können muss für jedes verwendete Objektiv ein Okularmaßstab geeicht werden. Dies geschieht mit Hilfe eines Objektmikrometers und eines Messokulars (Okularmikrometer).

Beim Objektmikrometer handelt es sich um einen Objektträger, der auf einer 2mm langen Strecke eine fein eingeritzte Maßeinteilung trägt und der statt eines Präparates auf den Objektisch gelegt wird.

Diesen Objektmikrometer betrachtet man bei verschiedenen Vergrößerungen durch das Messokular, das eine Skala von zumeist 100 Teilstrichen besitzt. Diese Skala wird nun mit Hilfe des Objektmikrometers kalibriert:

Man sucht zunächst die Skala des Objektmikrometers bei der geringsten Vergrößerung und bringt sie auf der 0,0-Linie mit der 0-Linie des Okularmaßstabes zur Deckung. Wie im Bild oben gezeigt kann man dann die Längenwerte den Okularzeilen zuordnen. In obigem Beispiel entsprechen daher 100 Teilstriche im Messokular etwa 0,358 mm. Das Verfahren wird für alle anderen Objektive außer dem Immersionsobjektiv wiederholt. Für künftige Größenmessungen benötigt man nur mehr das Messokular und die gefundenen Umrechnungsfaktoren.



### 1.4. Zur Protokollierung im Laborjournal:

**Die wesentlichen Arbeitsschritte müssen während der Labortätigkeit protokolliert werden !**

Das genaue Schema ist im Kapitel 0, „Laborordnung“ angegeben. Man kann schon vor Beginn der Arbeiten die ersten Punkte niederschreiben (als Vorbereitung) !

Werden weiterführende Arbeiten später erledigt muss im Protokoll auf die entsprechenden Seiten verwiesen werden.

Nochmals zur Orientierung:

**1) Titel: (daneben Datum !)**

z.B. mikroskopische Untersuchung von Gewässerproben 22.1.2008

**2) Aufgabenstellung:**

z.B: „Untersuchung der Teichwasserprobe: lange Lacke –25-04-2007-A im Hellfeld“, oder Beobachtung der Plasmolyse eines Blättchens von *Rhodo spathacea* bei Verwendung von Salzlösungen unterschiedlicher Konzentration und Zusammensetzung“).

### 3) Prinzip:

Hellfeldmikroskopie, z.B. Trockenpräparation

### 4) Literatur:

Jede möglicherweise verwendete oder verwendbare Literatur wird hier vollständig angegeben: Autor, Titel, Auflage, Seiten, Verlag, Erscheinungsjahr

### 5) Materialien:

kurze Materialienliste, bei Verwendung von speziellen Chemikalien oder Reagentien auch Rezeptur, bzw. Hersteller und Chargen-Nummern.

### 6) Durchführung :

Kurzform, Stichworte, es ist bei der Protokollierung aber darauf zu achten, dass alle für ein erfolgreiches Arbeiten notwendigen Details angegeben werden:

### 7) Ergebnisse:

unter der Überschrift Ergebnisse werden alle gefundenen Daten, sowohl Rohdaten als auch die Rechengänge zu daraus abgeleiteten Daten protokolliert. Sie bilden die Grundlage der Auswertung. Hier befinden sich die Zeichnungen, die makroskopische und mikroskopische Beurteilung

### 8) Diskussion und Auswertung:

die zuvor aufgelisteten Ergebnisse werden interpretiert. Im Normalfall führt dies zu einem Vergleich der erhaltenen Daten zu einem abschließenden Kommentar über die durchgeführte Arbeit, deren Erfolg und eventuelle Hinweise oder Tipps für zukünftige Arbeiten

## **1.5. Empfehlenswerte Präparate**

### **1.5.1. / 1. Präparat: Haare von verschiedenen Tierarten:**

Trockene Präparation eines Haares (Wurzel, Spitze) wie es z.B. bei der Waren-Eingangskontrolle oder in der Gerichtsmedizin wichtig sein kann.

# zur trockenen Präparation nimmt man einen sauberen, fettfreien Objektträger, schneidet das zu untersuchende Haar auf etwa 1cm zurecht, legt es auf den Objektträger und legt ein Deckglas darüber.

# Beachte die richtige Einstellung von Kondensator und Kondensorblende! Man beginnt wie üblich bei der kleinsten Vergrößerung und kann nachdem man mit dem Grobtrieb scharf gestellt sich einen Überblick verschafft hat zur nächsten Vergrößerung übergehen indem man einfach das nächstgrößere Objektiv in den Strahlengang bringt und anschließende nur mehr mit Hilfe des Feintriebes scharf stellt.

# Von der Seite kann ein kleiner Wassertropfen unter das Deckglas gesaugt werden, das Trockenpräparat wird zum Nasspräparat. Das Haar verändert sich (Quellung), die optischen Effekte (Beugung, Farbe) verändern sich.

#### Zu beobachten und protokollieren:

*Interessant ist der Vergleich von tierischem und menschlichem Haar ! Schärfentiefe; Beugungerscheinungen (bei stark abgeblendetem Kondensator)*

### **1.5.2. / 2. Präparat: Stärke aus verschiedenen Getreidearten:**

trockene Präparation verschiedener Stärkearten.

zu Beachten: zum Mikroskopieren der Stärke genügt ein kleines Spatelspitzerl, das Pulver soll fein verteilt werden, so dass man nur eine dünne Körnenschicht sieht.

Falls möglich, kann man die verschiedenen Stärketypen im polarisierten Licht untersuchen: Dazu legt man in den Filterhalter des Kondensors ein Polarisationsfilter und hält mit der Hand zwischen Auge und Okular ein weiteres Polarisationsfilter. Wenn man es dreht wird der Hintergrund dunkler und kann bei gekreuzten Pol-Filtern die kristallinen Eigenschaften der Stärke beobachten (in Kristallen wird die Ausrichtung des polarisierten Lichtes verändert).



Zu beobachten und protokollieren:

Unterschiede in der Form der Körner, im Schichtaufbau und Größe; in manchen Stärkeformen gibt es Risse, in wässriger Suspension kann es zur Quellung der Körner kommen.

**1.5.3. / 3.Präparat: Hefesuspension:**

# das Präparat ist umso besser, je dünner es ist !

# zur nassen Präparation wird ein Tropfen der Hefesuspension auf der Arbeitsfläche auf einen sauberen Objektträger gebracht, danach setzt man schräg am Rand des Tropfens ein Deckglas an und senkt es mit Hilfe einer Präpariernadel langsam ab, bis die gesamte Flüssigkeit zwischen Deckglas und Objektträger möglichst ohne Luftblasen verteilt ist.

# überstehende Flüssigkeit wird mit einem saugfähigen Papier abgesaugt (danach in Biohazard) bis das Deckglas durch Kohäsion fest am Objektträger haftet (Kipptest !) Wenn der Objektisch ganz nach unten gestellt und das kleinste Objektiv in den Strahlengang gebracht ist, legt man den Objektträger mit der Hefeprobe mit der Deckglasseite nach oben auf den Objektisch und justiert das Objekt im Strahlengang.

Beginnend bei der kleinsten Vergrößerung geht man bis zur größtmöglichen Vergrößerung, die ohne Verwendung von Immersionsöl möglich ist, weiter.

Es sollen Übersichts- und Detailzeichnungen angefertigt werden, man beachte die genaue Beschriftung ( Gesamtvergrößerung, Datum, Probe, Beobachtungen ).

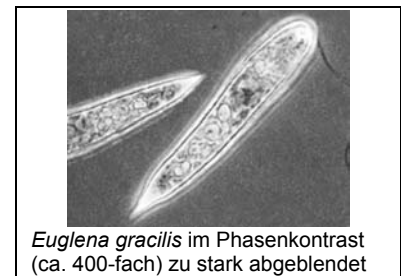
Zu beobachten und protokollieren:

Zellkerne; deutliche und stark lichtbrechende Zellwand; Sprossung

**1.5.4. / 4.Präparat: einfache Gewässerprobe:**

Bis zum diesem Mal mitzubringen:

Teichwasser mit Sedimenten, grünen Pflanzenteilen (Stengel von Süßwasseralgen) oder Steinen von denen ein Belag abgekratzt werden kann. Zu protokollieren sind die Uhrzeit, der Ort und die Durchführung der Entnahme.



Präparationstechnik :

Die mitgebrachte Teichwasserprobe wird systematisch untersucht:

1) Geruch, Aussehen (z.B. Farbe), Trübungen, makroskopisch erkennbares Getier, Sand, Steinchen, etc.

2) Die Objektnahme erfolgt im Laufe dieser Einheit von mehreren Stellen der Probe, also vom Sediment, eventuell herumschwimmende Tierchen fangen, Zupfpräparate von Pflanzenteilen usw.

3) Falls die ersten Zeichnungen halbwegs gelungen sind, kann begonnen werden, in den aufliegenden Katalogen nach den beobachteten Arten zu suchen (z.B. Leben im Wassertropfen).

Viele der Mikroorganismen in solchen Gewässerproben sind äußerst flink und können daher nur schwer beobachtet werden.

Man muss dabei damit rechnen, dass nicht die gesamte biologische Vielfalt, die es gibt in diesen Büchern abgebildet sein kann, sondern man in vielen Fällen nur einen Hinweis erhält zu welcher Familie oder Gattung ein bestimmter Organismus gehören kann.

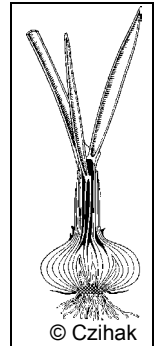
Zu beobachten und protokollieren:

Organismenvielfalt; Gewässergütemabschätzung nach Leitorganismen

### 1.5.5. / 5.Präparat: *Allium cepa*, Zwiebelschalenepidermis:

Aufgaben: „Die Suche nach dem Zellkern“ Beobachtung der Plasmaströmungen.

Von einer frischen Küchenzwiebel entfernt man die äußersten trockenen Schalen und schneidet mit einem scharfen Skalpell ein etwa 7x7mm großes, quadratisches Segment aus. Von der konkaven Innenseite der Zwiebelschale lässt sich mit einer Pinzette eine einschichtige Epidermis abziehen, die man mit Hilfe von Präpariernadeln ausgerollt in den kleinen Tropfen physiologischer NaCl-Lösung auf dem Objektträger bringt und mit dem Deckglas einschließt. Überschüssige Flüssigkeit saugt man mit einem Filterpapier ab, bis das Präparat dünn genug ist.

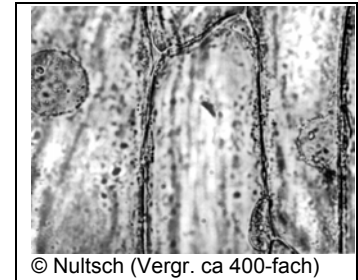


© Czihak

Man sucht nach Zellkernen und versucht eine Stelle zu finden, an der möglichst keine störenden Strukturen über oder unter den Epidermiszellen liegen. Wenn man genau beobachtet, sieht man nach einiger Zeit Plasmaströmungen, die zum Teil in Form von Hecht'schen Fäden sich auch durch den Vakuolenraum erstrecken.

Falls das Präparat schon längere Zeit gelegen ist, ist eventuell auch das ER in Form von klaren schlauchartigen Gebilden erkennbar. Bei guten Mikroskopen erkennt man auch sog. Tüpfel, kleine „Löcher“ in der Zellwand, die benachbarte Zellen miteinander verbinden.

Da die Beobachtungszeit durchaus sehr lange sein kann, muss man darauf achten, dass das Präparat nicht austrocknet und hin und wieder von der Seite Wasser zugeben. Hecht'sche Fäden erkennt man am besten in der Nähe des Zellkerns oder an den schmalen Enden. Man muss immer wieder Durchfokussieren um eine im Raum befindlichen Struktur auch erkennen zu können.



© Nultsch (Vergr. ca 400-fach)

#### Versuch: Plasmolyse:

Zunächst werden NaCl-Lösungen folgender Konzentrationen hergestellt:

1,0%; 1,4% und 1,6%

Man präpariert die Innenepidermis einer roten Zwiebel und hält mehrere saugfähige Papierstreifen bereit. Das Präparat sollt zunächst in Wasser angefertigt werden. Es folgt die Suche nach einer geeigneten Zelle und Beobachtung, ob sie lebt (Plasmaströmung, wie sieht der Kern aus?). Danach gibt man einen kleinen Tropfen der 1%igen Salzlösung auf eine Seite an das Deckglas und saugt von der anderen Seite mit dem Papier ab. Dabei sollte man darauf achten, dass das Deckglas nicht aufschwimmt und das Präparat verrutschen könnte. Nachdem die osmotischen Verhältnisse sich in der Umgebung der Zelle geändert haben, beobachtet man deren Verhalten und wiederholt nach einiger Zeit die Prozedur auch bei den Salzlösungen höherer Konzentration. Die Zellmembran, das Plasmalemma löst sich schließlich bei einer bestimmten Salzkonzentration von der Zellwand um sich den osmotischen Verhältnissen anzupassen und das Zellvolumen zu verkleinern. Ist man bei der höchsten Salzkonzentration angelangt, so ist die beobachtete Zelle am weitesten geschrumpft (wenn sie lebt). Der Prozess kann dann wieder umgekehrt werden, man muss aber aufpassen, dass man langsam genug vorgeht, denn sonst hält die Plasmamembran dem osmotischen Stress nicht stand und die Zelle platzt auf (osmotischer Schock).

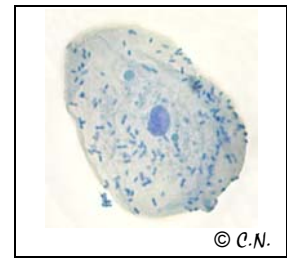
Die unterschiedlichen Plasmolysestadien sollen zeichnerisch zu dokumentiert werden.

#### Zu beobachten und protokollieren:

*Zeichnungen verschiedener Pflanzenzellen; eindeutige Beschriftung und Vergrößerungsfaktor! Übersichtszeichnungen und Detailzeichnungen; bei einem dünnen Objekt kann nach Einschulung auch die Ölimmersion verwendet werden kann. Manche Präparate werden besser mit der Zeit, daher ausdauernd beobachten! Plasmolysestadien*

### 1.5.6. / 6.Präparat: Mundschleimhaut:

Mit Hilfe einer sterilen Holzspatel oder eines sterilen Zahnstochers schabt man von der Mundschleimhaut etwas Material ab und bringt es auf einem Objektträger in einen kleinen Tropfen physiologischer (0,9%ig) Kochsalzlösung. Man verteilt die Zellen möglichst dünn und gibt das Deckglas drauf. Zunächst sind die Zellen ungefärbt zu beobachten, danach kann man etwas Methylenblau (1%ige Lösung in H<sub>2</sub>O) durch das Präparat saugen, wobei die Zellen getötet werden, der Kern aber deutlich abgefärbt wird. Durch die Färbung mit Methylenblau werden auch die bakteriellen Begleiter unserer Mundschleimhaut sichtbar ! Man kann sie daran erkennen, dass sie nur außerhalb der Zelle zu sehen sind (beim Durchschärfen).



Wegen der guten Präparierbarkeit (einzelne Zellen sichtbar) und dem Detailreichtum empfiehlt es sich dieses Präparat auch bei höherer Vergrößerung mit Hilfe einer Ölimmersion zu beobachten:

Zu beobachten und protokollieren:

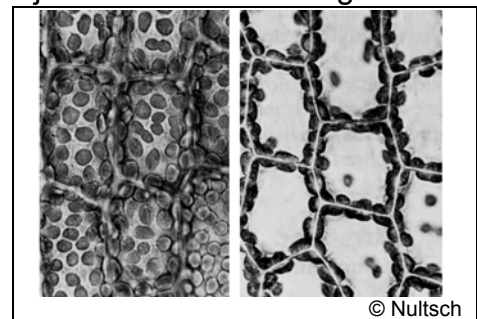
*Zellkern; Organellen; Bakterien an der Zelloberfläche; falls möglich Größenmessung ! Zellverbände*

### 1.5.7. / 7.Präparat: Moosblättchen

Wegen des einschichtigen Blattaufbaus bei Moosen, eignen sich deren Blätter besonders, um den Aufbau von photosynthetisch aktiven Pflanzenzellen zu sehen: Man kann dazu Zupfpräparate von diversen Blattmoosarten wie z.B. *Funaria hygrometrica* anfertigen und am Rand der Blättchen mikroskopieren.

Lohnend ist die Beobachtung der Chloroplasten, die sich je nach Lichtmenge in der Zelle unterschiedlich orientieren können. Wenn die Pflanze teilweise beschattet wurde findet man sie breit Tellerförmig in den Zelle liegen, bei Starklicht jedoch in Profilstellung.

Pflanzen schützen sich ganz allgemein vor zu großem Lichteinfall, da es ihnen nicht möglich ist, über eine bestimmte Umsatzrate hinaus die Lichtenergie zur Assimilation zu nutzen. Vielmehr nehmen dann Effekte wie Photooxidation sowie Strahlungsschäden zu (Blätter von Tropenpflanzen drehen sich bei zu hoher Lichtintensität auch quer, aber nicht nur, um Wasserverluste in der Mittagshitze zu vermeiden).



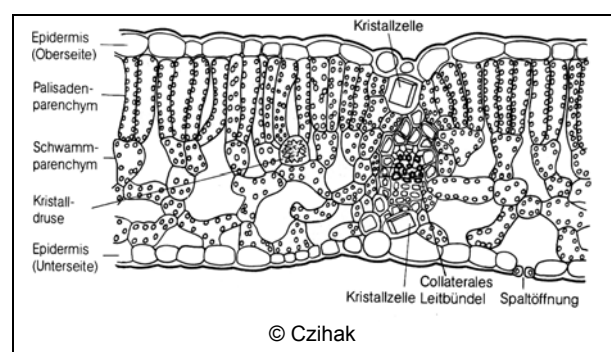
Zu beobachten und protokollieren:

*Unterscheidung von verschiedenen Teilen des Blattes; Zeichnungen von Schnitten durch die Blattgefäße (Leitbündel); Plasmaströmung*

### 1.5.8. / 8.Präparat: Blattquerschnitt und Epidermis (mit Stomata):

Mit Hilfe einer scharfen Rasierklinge oder eines Skalpells präpariert man von einem frischen, grünen Blatt die Ober- bzw. Unterseite als möglichst dünne Schicht. Am besten erreicht man dies, indem man das Blatt auf ein kleines Stück Küchenrolle legt, beides über einen Finger rollt und durch leichtes Anschneiden der Oberfläche die oberste Zellschicht verletzt (*ohne sich dabei in den Finger zu schneiden !!!*).

An der angeschnittenen Stelle kann man, wenn ein nicht zu dünnes Blatt verwendet wurde, mit einer feinen Pinzette die oberste(n) Zellschicht(en) abziehen und auf einen mit Wasser benetzten Objektträger bringen.



Zu beachten sind die unterschiedlichen Gewebetypen, die sich in Anzahl und Anordnung z.B. der Chloroplasten deutlich unterscheiden. Man findet Epidermiszellen, Spaltöffnungen, Schwamm- und Palisadenparenchym, Leitbündel mit ihren unterschiedlichen Zell- und Gefäßtypen. Das Schwamm- und Palisadenparenchym ist wegen der hohen Anzahl an Chloroplasten pro Zelle optisch sehr dicht man muss also gut darauf achten möglichst dünne Präparate anzufertigen!

Unterscheidung der Stomata von ein- bzw. zweikeimblättrigen Pflanzen !

Zu beobachten und protokollieren:

*Unterscheidung der verschiedenen Blattgewebe; Schnitte durch die Blattgefäße (Leitbündel); Palisaden- und Schwammparenchym; Stomata. Auf klar begrenzte Zellen achten !*

### **1.5.9. / 9.Präparat: Teichwasserprobe, erste limnologische Prüfung**

Für die Charakterisierung eines Gewässers (limnologische Untersuchung) ist es notwendig, von den verschiedenen Zonen (Ufer, Sand, Boden, Pflanzenteile) Proben zu nehmen und die darin vorkommenden Mikroorganismen, vor allem die Protisten zu bestimmen (Protozoa und einzellige Algen). Viele der Urtierchen eignen sich als Indikatororganismen. Allerdings muss besonderer Wert darauf gelegt werden, dass die Zeichnungen genau sind und kleine Merkmale der Form, der Wimpern, oder Mundöffnungen dargestellt werden.

Eine Größenmessung ist bei solchen Präparaten auch sehr hilfreich.

Als Ergebnis gelten die Zeichnungen der gefundenen Mikroorganismen, welche Mikroorganismen gefunden und identifiziert werden konnten (möglichst viele verschiedene), welcher Güteklasse die Wasserprobe zuzuordnen ist (siehe Kosmos, „Leben im Wassertropfen“) und welche Erfahrungen bei der Handhabung des Mikroskops gemacht wurden (ev. Tipps und Anregungen). Man sollte nach Leitorganismen suchen und diese auf jeden Fall zeichnen. Beobachtungen zum Verhalten (Bewegung, Reaktionen auf Reize etc.) können auf den Zeichnungen durch Pfeile oder Beschreibungen protokolliert werden.

### **1.5.10. / 10.Präparat: Untersuchung der Mitosestadien**

Zur Vorbereitung legt man eine gesunde Küchenzwiebel auf die Öffnung eines mit Wasser teilweise gefüllten Marmeladeglases. Man soll darauf achten, dass die Wurzelplatte der Zwiebel sich etwa ½ cm oberhalb der Wasseroberfläche befindet, ohne diese jedoch zu berühren.

Man lässt die Zwiebel in dieser Anordnung bei Raumtemperatur etwa 5-7 Tage lang stehen und beobachtet ob sich Wurzeln bilden.

Wenn sich Wurzel gebildet haben, trennt man mit einem Skalpell an einer der Wurzelspitzen ein etwa 5mm langes Stückchen ab, schneidet es der Länge nach noch einmal durch und legt es auf einen Objektträger. Man tropft nun etwas Karminessigsäure dazu und erhitzt bis von der Wurzel Bläschen aufsteigen (Vorsicht dass der Objektträger nicht springt ! ). Die Essigsäure verdampft, die Färbelösung wird konzentrierter und sollte immer wieder ergänzt werden. Das Präparat darf nicht austrocknen, die Wurzelspitze wird dann mit dem Deckglas gequetscht. Mit 1,2%iger NaCl-Lösung kann man vor dem Quetschen noch spülen um die rote Hintergrundfarbe zu entfernen. Die Zellen sind im Zustand kurz vor dem Absterben „festgehalten“. Das Präparat kann in Kanadabalsam eingeschlossen werden, ist aber nicht sehr lange haltbar.

#### **Karminessigsäure:**

45ml Eisessig + 55mL ddH<sub>2</sub>O mit 5g Karmin am Rückfluss 45min lang kochen lassen, filtrieren und in dunkler Flasche aufbewahren

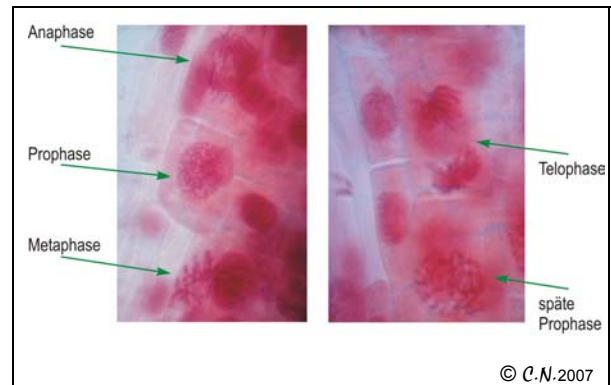
Vor allem etwas oberhalb der Wurzelspitze sind die Zellen recht kurz, dort findet Zellteilung statt und man kann dort daher die unterschiedlichen Teilungsstadien am ehesten finden. Ältere Zellen, die sich näher bei dem Zwiebelkörper selbst befinden zeigen nur mehr Streckungswachstum.

Im Präparat fallen zunächst die dunkelrot gefärbten Kerne auf, man sollte besonders auf deren Struktur achten: die Prophase ist an der etwas größeren Struktur im Zellkern erkennbar (die Chromatidenfäden sind kondensiert, treten deutlich hervor und geben dem Zellkern ein „knäuelartiges“ Aussehen).

Man soll versuchen, sich den Ablauf der Zellteilung anhand der Momentaufnahmen im Präparat vorzustellen. *In vivo* dauert der Vorgang der Chromosomentrennung selbst nur

ein paar Sekunden, sie ist eigentlich nur ein Schlusspunkt für viele Prozesse die sich vor der räumlichen Teilung der Zelle ereignen müssen (siehe Zellzyklus) .

Mögliches anderes Präparat : Staubfadenhaare von *Tradescantia virginica*



Zu beobachten und protokollieren:

gefärbtes Präparat des Vegetationskegels einer Zwiebelwurzel  
Genauere Zeichnungen von den unterschiedlichen Teilungsstadien und Zuordnung.

## 1.6. Literatur:

Biologie der Pflanzen, P.H.Raven et al. (WdeG)  
Mikrobiologisch-botanisches Praktikum; Nultsch (Thieme ISBN-10: 3134403110)  
Biologie; Czihak (Auflage ca.1986)  
Das Lichtmikroskop; Gerlach (Thieme, ISBN-10: 3135303020)  
Das große Buch der Mikroskopie; Kremer, (Kosmos-Verlag, 2002)  
1x1 der Mikroskopie; Kremer, (Kosmos-Verlag, 2001)

Internet:

<http://www.denniskunkel.com> auf der „education“-site finden sich gute links zum Thema Mikroskopie.

<http://www.cellsalive.com> gute site für die Grundlagen, schöne Animationen

## 1.7 Zusammenfassung:

- ✚ Mikroskopische Präparate sollen dünn sein, um ein übersichtliches Bild zu bekommen
- ✚ Jedes mikroskopische Präparat wird zunächst bei der geringsten Vergrößerung betrachtet. In der Folge geht man schrittweise vorsichtig zu höheren Vergrößerungen.
- ✚ Das Lichtmikroskop dient vor allem der Beobachtung lebender Mikroorganismen bis zu 1600-fachen Vergrößerung
- ✚ Für eine optimale Auflösung sollte der Strahlengang eines Forschungsmikroskops gut justiert und der Kondensor in der richtigen Höhe eingestellt sein (Köhler).

- ✚ Die Kondensorblende dient der Kontrast- und Schärfentiefeanpassung. Der Winkel des austretenden Lichtkegels wird auf das verwendete Okular abgestimmt.
- ✚ Die numerische Apertur ist abhängig von dem Brechungsindex des verwendeten Glases und der optischen Konstruktion. Je höher die numerische Apertur, desto besser ist das Auflösungsvermögen.
- ✚ Die Auflösungsgrenze ist von der Wellenlänge des verwendeten Lichtes und von der numerischen Apertur des Objektivs abhängig.
- ✚ Die Gesamtvergrößerung ergibt sich aus der Objektivvergrößerung  $\times$  Okularvergrößerung
- ✚ Immersionsobjektive ermöglichen Vergrößerungen bis an die Grenze des Auflösungsvermögens; zwischen Objektiv und Deckglas wird Öl eingebracht, das eine Totalreflexion verhindert. Die numerische Apertur des Objektiv kann dadurch voll genutzt werden.
- ✚ Im Hellfeld wird das Objekt von unten durchstrahlt, dieses Licht gelangt vollständig zum Okular. Der Kontrast ist eher schwach, oft werden Färbungen genutzt, um den Kontrast zu verstärken.
- ✚ Die Phasenkontrastmikroskopie eignet sich vor allem zur kontrastreichen Beobachtung lebender, schwach gefärbter Objekte. Bakterien sind besonders leicht zu erkennen.

## 1.8. Schnelltest

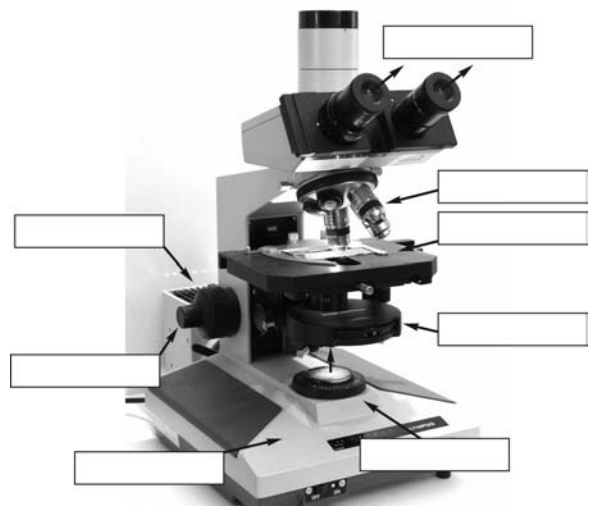
- 1) Welchem Zweck dient das Okular eines Lichtmikroskopes ?
  - a) der Kontraststeigerung
  - b) dem Sammeln des vom Kondensator reflektierten Lichtes
  - c) zur Bildprojektion im Auge
  - d) dem Schutz des Auges vor Kontamination
  - e) der Schärfenregulation bei hohen Vergrößerungen
- 2) Welche dieser optischen Eigenschaften beeinflusst der Kondensator
  - a) Die Schärfe der Abbildung
  - b) Die Auflösung eines Objektivs
  - c) Die Schärfentiefe
  - d) Die numerische Apertur
- 3) Eine hohe Schärfentiefe in einem Bild bedeutet ....
  - a) die gleichzeitig scharfe Abbildung von verschiedenen Ebenen in einem Objekt
  - b) wie tief in das Objekt scharf gestellt werden kann
  - c) eine kleine Öffnung der Kondensorblende
  - d) eine große Öffnung der Kondensorblende
  - e) gleichzeitig das auffällig Werden von Beugungserscheinungen an scharfen Konturen
  - f) das auffällig Werden von Brechnungserscheinungen an scharfen Konturen
- 4) Das Auflösungsvermögen eines Lichtmikroskopes bei einem bestimmten Objektiv ergibt sich aus:

a) 
$$d = \frac{\lambda}{\text{Vergr.}_{\text{Obj.}}}$$

b) 
$$d = \frac{\lambda}{A_{\text{Obj.}}}$$

c) 
$$d = \frac{cm}{\lambda_{\text{Obj.}}}$$

- 5) beschrifte die gekennzeichneten Teile des Mikroskopes



- 6) die numerische Apertur eines Objektivs ist abhängig von ....
- a) seiner optischen Konstruktion und Brennweite
  - b) dem Brechungsindex des verwendeten Glases
  - c) dem Einfallswinkel  $\alpha$  des ins Objektiv einfallenden Lichtes
  - d) der Tubuslänge
- 7) Womit kann man beim Mikroskopieren die Bildqualität verbessern?.
- a) Feintrieb
  - b) KondensorhöhenEinstellung
  - c) Kreuztisch
  - d) Grobtrieb
  - e) Kondensorblende
  - f) Objektivrevolver

1 c  
2 b,c  
3 a,c,e  
4 b  
5 ----  
6 a,b,c  
7 a,b,e