

Die Seite für den Pilzmikroskopiker

9. Folge: Die Wirkungsweise optischer Kontrastverfahren und ihre Eignung für die Pilzmikroskopie.

von Hans-Dieter Zehfuß, Pirmasens

Das durch ein mikroskopisches Präparat geleitete Licht besteht - je nach Präparat in unterschiedlicher Zusammensetzung und Gewichtung - aus 4 Komponenten, nämlich: aus Intensität (Helligkeit), Farbe, Phase (Zusammenhang mit der Wellenstruktur des Lichts) und Schwingungsrichtung. Davon sind für das menschliche Auge nur die ersten beiden wahrnehmbar, während die beiden letzteren weitgehend unsichtbar bleiben.

Um nun in Farbe und Struktur zunächst einförmig erscheinende, monochromatische mikroskopische Präparate besser differenzieren zu können, bedient man sich bei der Durchlichtmikroskopie verschiedener Färbemethoden.

Dabei darf nicht außer Betracht bleiben, dass bei der Einwirkung der Färbemittel und Reagenzien auf die Gewebeproben chemisch-physikalische Prozesse ablaufen, infolge derer eine Beeinträchtigung des Materials stattfindet, die sich u.U. auch in einer Veränderung von Formen und Volumenmaßen niederschlagen können (siehe die Zuschrift von H.O. Baral & G. Marson in *Der Tintling* 3/2001). Dieses Phänomen ist zumindest bei einigen Ascomyceten erkannt und untersucht worden. Das Resultat sind Vorschläge für die Anwendung „schonenderer Behandlungsmethoden“.

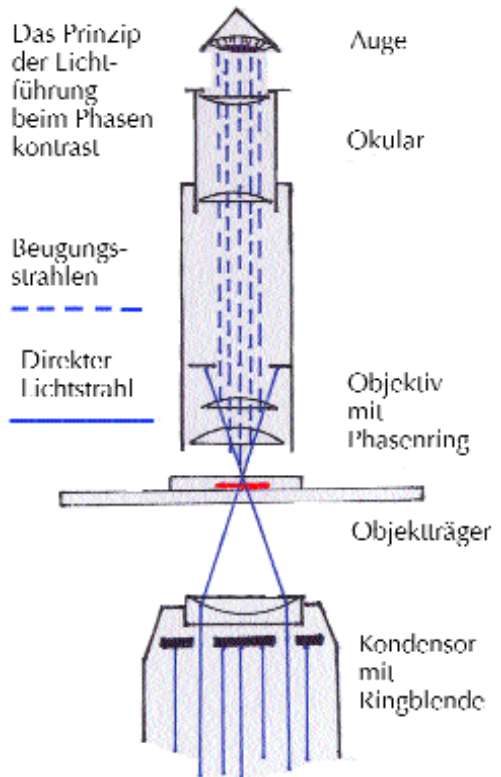
Ohne Beeinträchtigung für die Präparate bleiben optische Kontrastverfahren, die allesamt den Zweck haben, die dem menschlichen Auge zunächst nicht wahrnehmbaren Anteile des Lichtes in gut sichtbare Farben und/oder Strukturen umzuwandeln. Solche Kontrastverfahren sind:

- a. die Polarisationsmikroskopie,
- b. die Fluoreszenzmikroskopie,
- c. die Dunkelfeldmikroskopie,
- d. die schiefe Beleuchtung,
- e. Phasenkontrast-Verfahren,
- f. Interferenzkontrast-Verfahren.

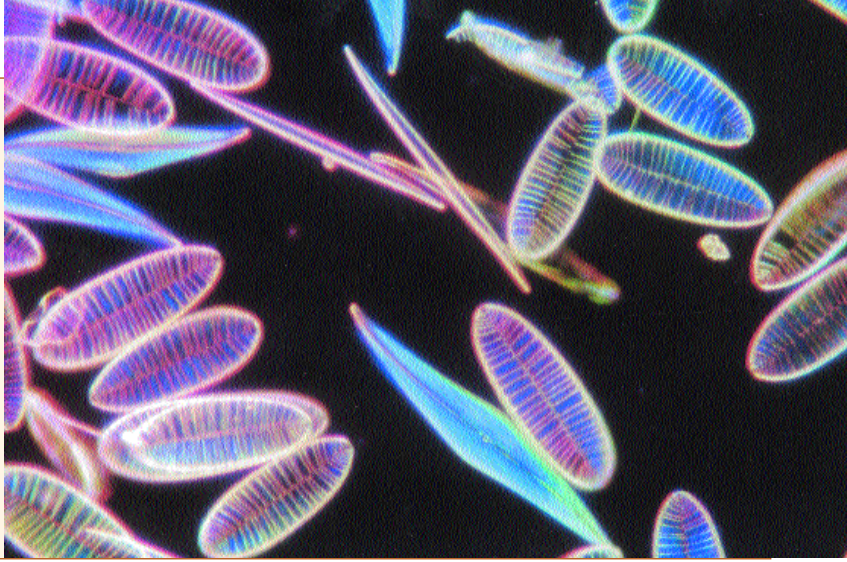
Nicht alle Methoden sind jedoch für die Pilzmikroskopie geeignet oder von Vorteil. Man-

che sind nicht oder nur bedingt einsatzfähig. Andere, wie speziell die Polarisations- und Fluoreszenzmikroskopie stellen besondere Anforderungen an den stofflichen Aufbau des Gewebes, bei manchen liegt mehr der ästhetische Effekt, den sie gewähren im Vordergrund als die Erkenntnissteigerung etc.

Die einzelnen Verfahren sollen kurz angesprochen und auf ihre Einsatzmöglichkeiten bei der Pilz-Mikroskopie eingegangen werden. Nur die Methoden, welche nach der Erfahrung des Verfassers für die mikroskopische Untersuchung von Pilzen im Sinne der Erkenntnisgewinnung und -vermehrung sinnvoll einsetzbar sind und bei denen die erforderliche Geräteausstattung für die Mehrzahl der Interessierten erschwinglich ist, sollen näher besprochen und in ihrer Bedeutung diskutiert werden.



Test-Diatomeen, wie sie zur Prüfung des Auflösungsvermögens von Mikroskop-Objektiven eingesetzt werden. Die ovalen Gebilde sind *Surirella gemma* Ehrenberg, die u.a. zur Prüfung von Öl-Immersionsobjektiven genommen wird. Polarisations-Aufnahme.



Teil 1: Polarisations- Fluoreszenz- und Dunkelfeldmikroskopie

Bei dem Polarisations-Verfahren werden die zunächst nicht wahrnehmbaren, unterschiedlichen Schwingungsrichtungen des Lichtes in un-

terscheidbare Intensität und Farben umgewandelt. Dafür ist Voraussetzung, dass unterhalb des Kondensors ein Polarisator und im Strahlengang zwischen Objektiv und Okular der erforderliche Analysator positioniert wird. Ein Lambda-Blättchen kann oberhalb des Polarisators eingeschoben werden, was für freudig-farbige Bilder sorgt. Für alles gibt es von den Mikroskop-Herstellern spezielle Haltevorrichtungen.

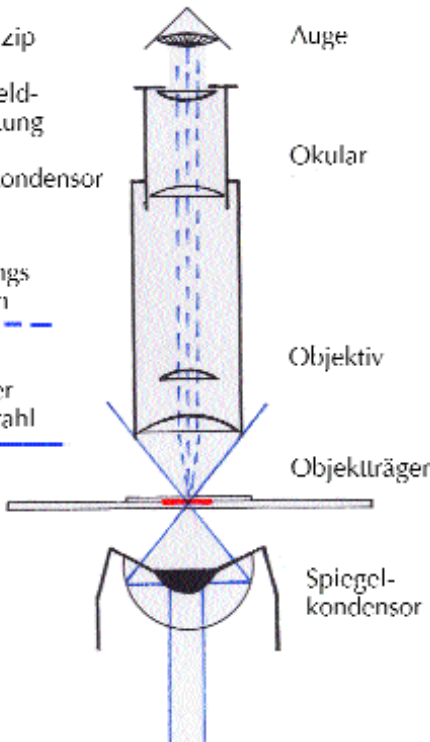
Polarisations- und Fluoreszenzmikroskopie setzen besondere Gegebenheiten im stofflichen Aufbau des Gewebes voraus. Bei der Polarisationsmikroskopie müssen bestimmte wichtige Gewebeteile (wie z.B. Zellwand-Baustoffe und Stützgewebe der Pflanzen) polarisierende Eigenschaften aufweisen.

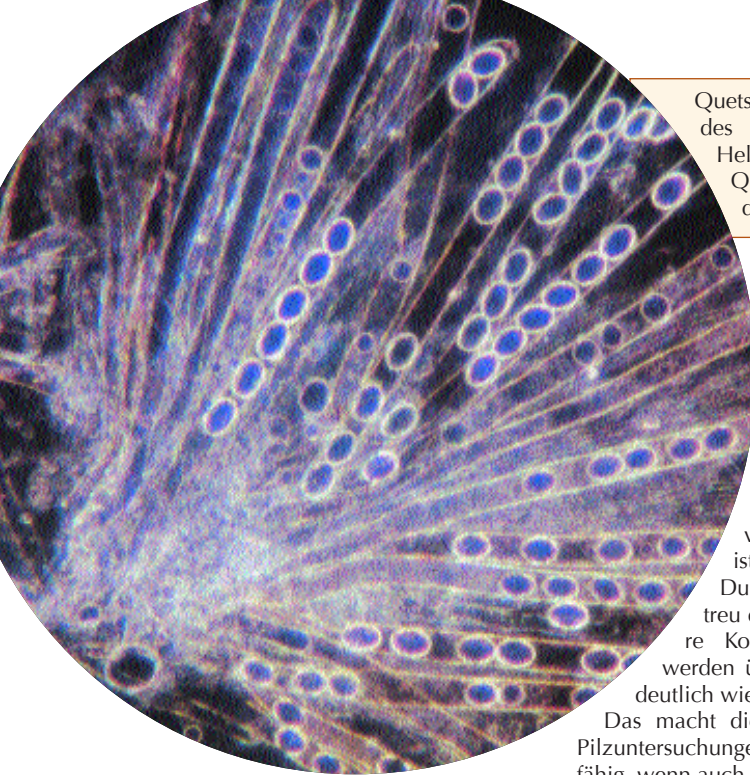
Für den Einsatz der Fluoreszenzmikroskopie ist Voraussetzung, dass auf Anregungen, die von hoch-energetischen Lichtquellen ausgehen (UV-Strahlung), bestimmte Zellstrukturen ein sichtbares Licht abgeben (Primärfluoreszenz). Die aber ist in der Biologie selten. Man kann bei Pflanzenzellen aber ein Fluoreszieren erreichen, wenn man die Präparate mit besonderen Farbstoffen (z.B. Acridinorange) anfärbt. Von Pilzen ist mir derartige bisher nicht bekannt. Chitin, der Zellwand-Baustoff der Höheren Pilze, hat von Natur aus weder polarisierende noch fluoreszierende Eigenschaften. Somit sind diese beiden Mikroskopiertechniken für den Pilz-Mikroskopiker relativ uninteressant.

Das Prinzip der Dunkelfeldbeleuchtung mit dem Spiegelkondensator

Beugungsstrahlen

Direkter Lichtstrahl





Quetschpräparat vom Hymenium des Hochgerippten Becherlings *Helvella acetabulum* (L. : Fr.) Quél.) präpariert in Wasser, dargestellt im Dunkelfeld.

Dunkelfeldmikroskopie

Für Untersuchungen im Dunkelfeld ist - will man es ordentlich machen - ein Dunkelfeld-Kondensator notwendig. Das ist ein sogenannter Spiegelkondensator, der in seinem Innern einen Spiegel besitzt, welcher das Beleuchtungslicht so umlenkt, dass es als ein flacher Hohlkegel die Objektebene schneidet, aber nicht in das Objektiv fällt. Befindet sich kein Objekt im Strahlengang, geht das Licht am Objektiv vorbei und das Sehfeld bleibt dunkel. Daher rührt die Bezeichnung Dunkelfeld.

Befindet sich jedoch ein Objekt im Strahlengang, wird ein Teil des Beleuchtungslichtes abgelenkt, wovon ein Teil in das Objektiv gelangt.

(Voraussetzung dazu ist noch, dass die Objektivapertur kleiner ist als die innere Grenzapertur des Kondensators.) Zur Entstehung des Dunkelfeld-Bildes trägt also nur das gebeugte Licht bei. Da für eine objektgetreue Abbildung der volle Lichtstrom der Mikroskopleuchte von unerlässlicher Bedingung ist, werden die Objekte im Dunkelfeld nicht völlig objektgetreu dargestellt. Es leuchten nur ihre Konturen auf; Innenstrukturen werden überhaupt nicht oder nur undeutlich wiedergegeben.

Das macht die Dunkelfeldmikroskopie für Pilzuntersuchungen nur sehr bedingt einsetzbar, wenn auch wie das beigegebene Bild verdeutlicht, besonders bei Ascomyceten bestehend schöne Bilder entstehen können.

Mikro-Bastler erzeugen einen Dunkelfeld-Effekt dadurch, dass sie die Mitte der Licht-Austrittslinse am Kondensator durch einen Hell-Dunkelfilter (dunkler Punkt in transparentem Feld) fast ganz abdecken. Man kann die Sache aber auch weiter treiben und an Stelle des Hell-Dunkelfilters ein Zweifarbenfilter in Komplementärfarben (z.B. blauer Punkt in orangem Feld) einsetzen. Man erzielt dadurch die sogenannte Rheinberg-Beleuchtung, bei welcher transparente Objekte in der Farbe der helleren Farbe vor einem Hintergrund in der dunkleren (gelb vor blau) farblich differenziert abgebildet werden.

Teil 2: Schiefe Beleuchtung und Phasenkontrast

Mit dem Einlegen einer Scheibe mit exzentrisch angebrachtem Loch in den Filterhalter am Kondensator wird eine schiefe Beleuchtung erzeugt. Das Prinzip ist, dass das noch durchfallende Licht dann durch den Kondensator schräg über das Präparat hinweg gelenkt wird. Die Aperturblende muss dazu vollständig geöffnet sein und eine Beachtung des Köhlerschen Beleuchtungsprinzips ist wichtig.

An der dem Licht zugewandten Seite des Präparates wird die Auflösung gesteigert, während sie auf der abgewandten Seite vermindert wird. Ein Nebeneffekt bei der schiefen Beleuchtung ist, dass bei plastischen Objekten durch Schattenwurf die Oberflächenstruktur besonders deutlich hervortritt und damit der Eindruck von Dreidimensionalität entsteht.

Die schiefe Beleuchtung wurde früher in der Lichtmikroskopie vielfach angewendet. Mit dem Aufkommen des Phasenkontrast- und speziell der Interferenzkontrast-Verfahren hat sie ihre Bedeutung jedoch verloren. Sie wurde nur deshalb hier angesprochen, weil hin und da in der (vorwiegend älteren) Literatur noch auf sie hingewiesen wird. Für Mikrobastler bleibt die schiefe Beleuchtung allemal interessant, weil sie zuweilen überraschende Bildeindrücke hervorbringt.

Das Phasenkontrastverfahren

Das Phasenkontrastverfahren stellt lichtoptisch quasi eine Erweiterung der Schiefen Beleuchtung dar.

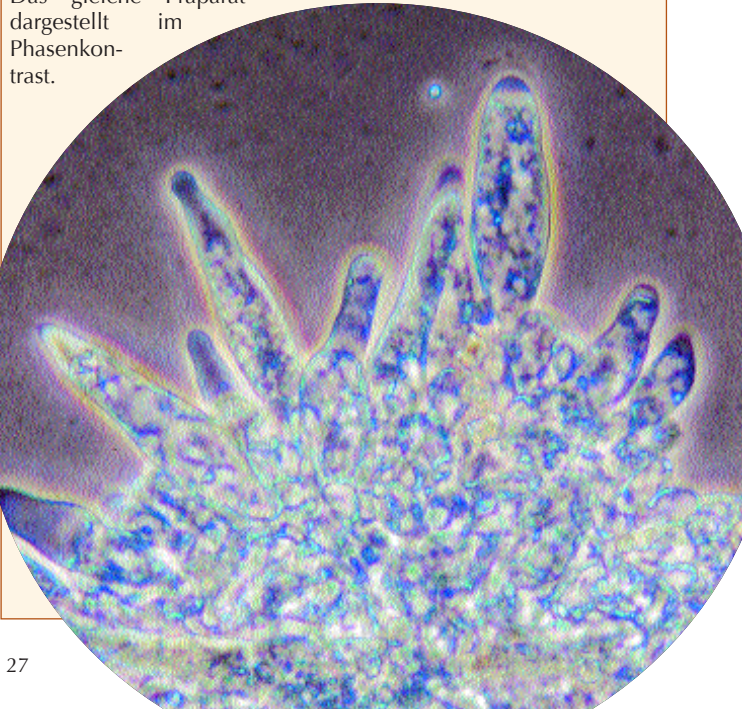
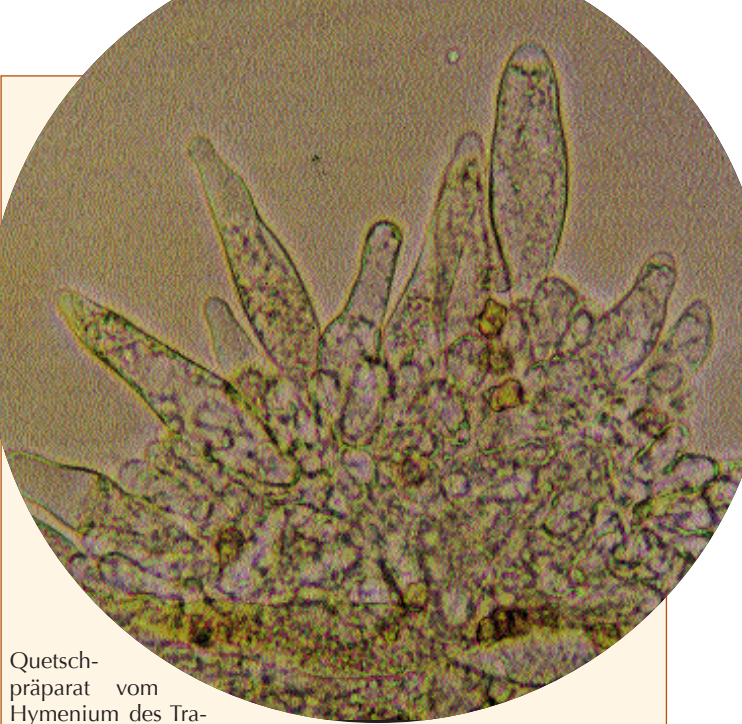
Dabei wird die unsichtbare Lichtkomponente Phase in unterschiedliche Helligkeit umgewandelt. Hierzu wird der Hauptstrahl des von der Mikroskopleuchte kommenden Lichtes durch eine Ringblende unterhalb des Kondensators soweit ausgeblendet und so abgelenkt, dass verbleibende Reststrahlen auf den in der hinteren Brennebene von Phasen-Objektiven installierten Phasenring treffen, wo sie zum Teil absorbiert werden. Somit können kaum noch direkte Strahlen in das Auge gelangen.

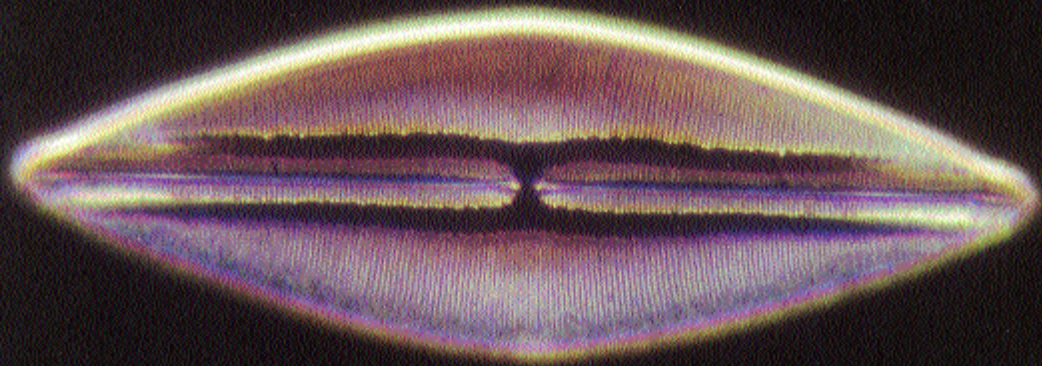
Die in dem Präparat entstehenden Beugungsstrahlen gelangen dagegen ungehindert in das Auge.

Gleichzeitig tritt eine Phasenverschiebung innerhalb der Beugungsstrahlen auf. Beides zusammen bewirkt, dass im Mikroskop zuvor unsichtbar gebliebene Hell-Dunkelstrukturen vor einem

Quetschpräparat vom Hymenium des Trapezsporigen Risspilzes (*Inocybe subcarpta* Kuehn. & Bours.), ungefärbt, präpariert in Wasser, dargestellt im normalen Durchlicht. Das Präparat wirkt etwas flau und kontrastarm. Es unterscheidet sich nur wenig von dem Untersuchungsmedium.

Das gleiche Präparat dargestellt im Phasenkontrast.





Die Test-Diatomee *Navicula lyra* Ehrenberg, die zum Prüfen von Mikroskop-Objektiven (besonders Phasenkontrast-Objektiven) mit der Numerischen Apertur 0.65 genommen wird. Bringt das Objektiv die erwartete Leistung, müssen winzige, perlschnurartigen Zellen zwischen den Querrippen im Bildfeld sichtbar sein. Dargestellt im Differential-Interferenz-Kontrast.

dunklen Hintergrund deutlich werden. Dabei treten speziell bei dickeren Objekten um Einzelstrukturen herum teilweise kräftige Halo-Säume auf, was in Quetschpräparaten fast immer der Fall ist.

Ringblende und Phasen-Objektive müssen aufeinander abgestimmt sein, weshalb sich in speziellen Phasenkontrast-Kondensoren auf Revolverseiben eine ganze Reihe solcher Ringblenden befinden, die wahlweise zu den adäquaten Objektiven zugeschaltet werden können.

Bei der Pilz-Mikroskopie bietet das Phasenkontrast-Verfahren, speziell bei Gewebe-Untersuchungen gewisse Vorteile. An meinem Mikroskop weisen das 25-er und das 40-er Objektiv Phasenringe auf. Die Objektive (Plan-Achromate Phaco) sind bei geringen Einschränkungen in ihrer Leistung (die für die Praxis praktisch ohne Belang sind) wie normale Durchlicht-Objektive einsetzbar. Bei der Arbeit kann ich, falls mir dies erforderlich oder interessant erscheint, für beide Objektive dieselbe Ringblende in eine spezielle Halterung am Kondensor einsetzen. Dies erleichtert zum einen die Arbeit sehr, zum anderen ersparte es mir Kosten für einen speziellen Phasenkontrast-Kondensor.

Für den Umgang mit Pilzsporen im Abwurf- und Quetschpräparat, halte ich das Phasenkontrastverfahren für unbedeutend, ja wegen der angesprochenen Halosäume sogar störend; speziell beim Messen der Sporen.

Der Halo-Effekt beim Phasenkontrast

Ein Nachteil der Phasenkontrastabbildung ist der Halo-Effekt, eine lichthofartige Erscheinung um dunkle Bilddetails sowie dunkle Säume um helle Details. Er kommt dadurch zustande, dass sich gebeugtes und direktes Licht in der Praxis nicht völlig trennen lassen.

Dieser Halo-Effekt tritt besonders an flächenhaften Objektdetails auf. So ist z.B. der Rand eines höherbrechenden, flächigen Objektdetails bei positivem Phasenkontrast außen von einem hellen Lichthof, innen von einem dunklen Saum umgeben. Bei negativem Phasenkontrast sind die Verhältnisse umgekehrt. Der innere Bereich erscheint in derselben Intensität wie die Umgebung.

Da die Grenzen zwischen hellem und dunklem Halo bei den meisten biologischen Objekten nicht mit der Objektbegrenzung identisch sind, gibt das Phasenkontrastmikroskop solche Objekte nicht ganz größengetreu wieder. Bei Objektmessungen muss man mit einem Fehler von der Größe der Halobreite rechnen.

Aus: Determann & Lepusch: Das Mikroskop und seine Anwendung. Broschüre herausgegeben von der Firma E. Leitz, Wetzlar.

Grafik der rechten Seite: Aufbau und Funktion eines Wollaston-Prismas für das Interferenzkontrast-Verfahren

Teil 3: Das Interferenzkontrast-Verfahren

Die Interferenzkontrast-Mikroskopie vermittelt zwischen der klassischen Hellfeld- und der Phasenkontrast-Mikroskopie. Aufbau und Lichtführung in einem Interferenzkontrast-Mikroskop sind so kompliziert, dass sie sich vereinfacht nicht darstellen lassen. Für Interessierte wird deshalb hier eine Beschreibung wiedergegeben, die ich der Broschüre „Das Mikroskop und seine Anwendung“ der Firma Leitz, Wetzlar entnehme: Zum Verständnis der Interferenzkontrast-Mikroskopie ist eine vorherige Erklärung von Aufbau und Funktion eines Wollaston-Prismas (= Doppelpisma) erforderlich. Dieses besteht aus zwei miteinander verkitteten, doppeltbrechenden Prismen, deren kristallografische Achsen einen rechten Winkel bilden. Die eine Achse liegt in der Zeichenebene, die andere steht senkrecht dazu (siehe Skizze). Außerdem liegen beide Achsen parallel zur Ein- und Austrittsfläche des Doppelpismas. Fällt ein Lichtstrahl senkrecht auf das Wollaston-Prisma, so wird dieser in zwei senkrecht zueinander polarisierte Strahlen zerlegt. Liegt der Zerlegungspunkt in der Mitte der Trennfläche (wo also beide Prismen gleich dick sind) dann sind die aus dem Wollaston-Prisma austretenden Strahlen in Phase. Liegen die Zerlegungspunkte seitlich davon, so tritt ein Gangunterschied zwischen den beiden senk-

recht zueinander polarisierten Teilstrahlen auf. Bringt man das Doppelpisma zwischen zwei Polarisatoren, so kann man im monochromatischen Licht eine Serie von geradlinigen Interferenzstreifen beobachten. Im Weißlicht erscheinen zwischen zwei gekreuzten Polarisatoren die Interferenzstreifen farbig.

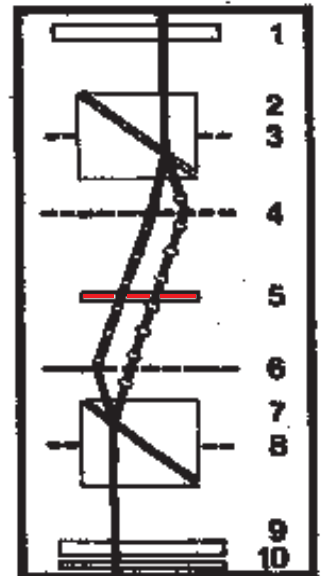
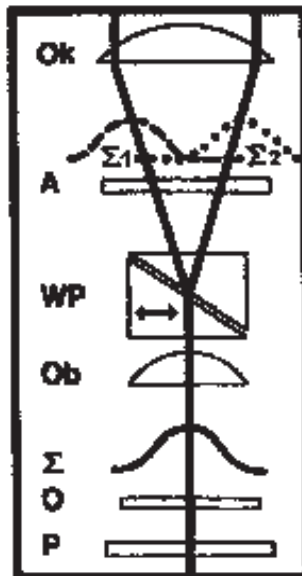
Nach diesen einleitenden Erklärungen lässt sich das Grundprinzip des Interferenzkontrast-Verfahrens besser verstehen (siehe hierzu die Skizze). O sei das Objekt, das von einer ebenen Welle durchstrahlt wird. Diese Welle wird beim Durchgang durch das Objekt deformiert. Die neue Wellenfront sei S.

Das Wollaston-Prisma hinter dem Objekt O spaltet die Welle S in die beiden Teilwellenzüge S1 und S2 auf, die nach Durchsetzen des Analysators A miteinander interferieren, so dass in der Zwischenbildebene Intensitäts- und Farbunterschiede sichtbar werden.

Diese Anordnung erfordert eine sehr kleine Beleuchtungsapertur, wodurch das Auflösungsvermögen erheblich reduziert wird. In der Praxis benutzt man daher eine Anordnung gemäß der beigefügten Skizze, bei der die Beleuchtungsapertur nicht eingeschränkt wird und die trotzdem einen homogenen Bilduntergrund ermöglicht.

P = Polarisator
 O = Objekt
 Ob = Objektiv
 WP = Wollaston-Prisma
 A = Analysator
 Ok = Okular

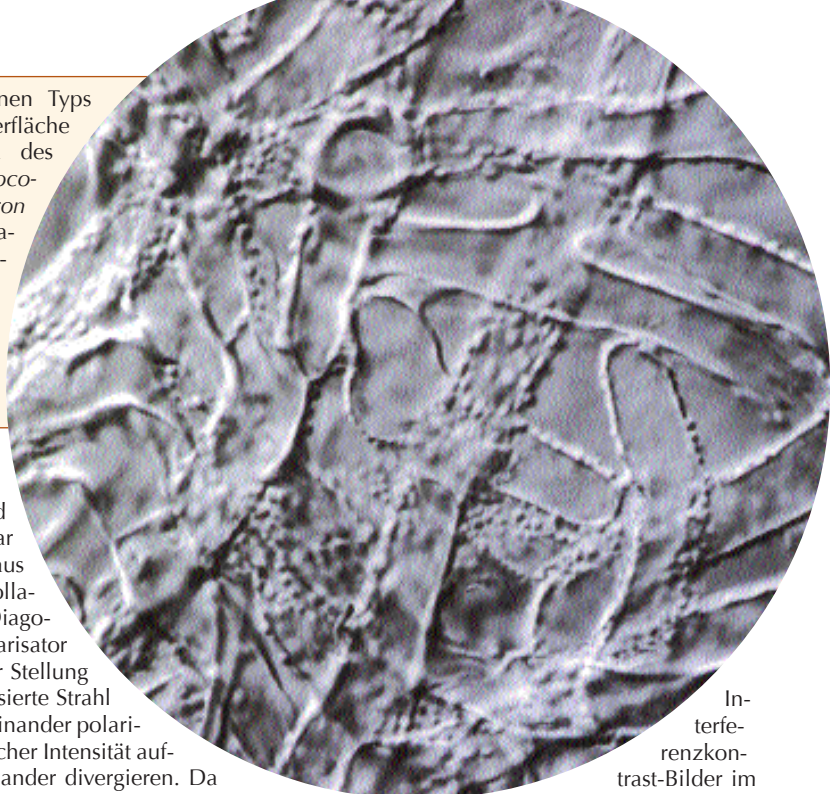
1 = Analysator
 2 = Oberes Wollaston-Prisma
 3 = Hintere Brennebene d. Objektivs
 4 = Objektiv
 5 = Objekt
 6 = Kondensator
 7 = Unteres Wollaston-Prisma
 8 = Brennebene des Kondensators
 9 = Lambda/4-Plättchen
 10 = Polarisator



Hyphen verschiedenen Typs aus der Manteloberfläche der Ectomykorrhiza des Rotfußröhrlings (*Xerocomus chryserion* (Bull.) Quél.), präpariert in einem hyalinen Medium, dargestellt im Interferenzkontrast.

Foto: Prof. Dr. Reinhard Agerer

Das von der Lichtquelle kommende natürliche Licht wird vom Polarisator linear polarisiert. Von dort aus gelangt es zum Wollaston-Prisma, das in Diagonalstellung zum Polarisator orientiert ist. In dieser Stellung wird der linear polarisierte Strahl in zwei senkrecht zueinander polarisierte Teilstrahlen gleicher Intensität aufgespalten, die voneinander divergieren. Da der Divergenzpunkt in der Brennebene des Kondensors liegt, wird die Winkelaufspaltung im Wollaston-Prisma zur lateralen Aufspaltung im Objektivraum. Demzufolge durchsetzen die Teilstrahlen das Objekt an zwei verschiedenen Punkten und werden dort auch in ihrer Phase unterschiedlich beeinflusst. Die Größe der Aufspaltung ist so gewählt, dass sie unterhalb des Auflösungsvermögens des Mikroskops liegt. Daher entsteht kein sichtbares Doppelbild im Mikroskop. Das Objektiv bringt beide Teilstrahlen in seiner hinteren Brennebene zur Vereinigung. Dort liegt auch das zweite Wollaston-Prisma, welches die beiden Teilstrahlenbündel räumlich wieder zusammenführt. Ohne dieses Wollaston-Prisma würden die Teilstrahlen hinter dem Vereinigungspunkt wieder divergieren. Sie durchsetzen jetzt den Analysator und können nun, auf eine gemeinsame Schwingungsrichtung gebracht, interferieren. Die Interferenzfarbe bzw. Intensität in jedem Punkt des Bildes hängt dabei von dem Phasenunterschied der beiden Teilstrahlenbündel und damit von der Dicke und Brechzahl der beiden Objektpunkte ab. Die Richtung der Bündelaufspaltung erscheint im Bild wie die seitliche Beleuchtung eines Reliefs.



Interferenzkontrast-Bilder im

Mikroskop, wie im fotografischen Bild vermitteln den Eindruck einer Dreidimensionalität, die aber in Wahrheit gar nicht vorhanden ist. Die abgebildeten Präparate sehen dabei aber irgendwie „natürlicher“ aus, weil eben der normalsichtige Mensch an dreidimensionale Bilder und nicht an Schnittbilder gewohnt ist. Betrachtet man Mikro-Aufnahmen in Veröffentlichungen neueren Datums, so findet man zunehmend solche Interferenzkontrast-Aufnahmen wiedergegeben. Sie enthalten jedoch häufig keine Informationen, die nicht auch durch den Einsatz herkömmlicher Techniken zu erzielen wären. Deshalb werden Interferenzkontrast-Mikroskope mehrheitlich bei luxurierenden Mikroskopikern, die sich ihr Hobby etwas kosten lassen wollen, auf Interesse stoßen, weil die Preise für solche Geräte je nach Hersteller zwischen 5 000.— und 10 000.— Euro liegen.

Ich selbst bin noch nicht soweit. Infolgedessen musste ich mir die beigefügte Beleg-Aufnahme bei dem Vorsitzenden der Deutschen Gesellschaft für Mykologie, Herrn Prof. Reinhard Agerer aus München erbeten, dem für sein Entgegenkommen an dieser Stelle herzlich gedankt sei.