

Stephanie [REDACTED]

David [REDACTED]

BTA-UH 1

Gruppe A

Protokoll über das

„Mikroskopieren von *Allium cepa*“

das Mikroskop und seine Möglichkeiten

Botanisches Praktikum

Berufskolleg Kartäuserwall

Kartäuserwall 30, Köln

bei Dr. Klaus Fuisting

Theorie

1. Strahlengang im Mikroskops

Das Mikroskop ist ein in ein Stativ eingebautes Linsensystem, mit dem man Objekte sichtbar machen kann, die jenseits des Auflösungsvermögens des menschlichen Auges liegen (z.B. Mikroorganismen, Zellen und einzelne Zellbestandteile). Hierzu wird das Licht einer im Mikroskopfuß befindlichen Lampe durch die *Leuchtfeldlinse* und zwei verstellbare Blenden (erst die *Leuchtfeld-*, dann die *Aperturblende*) geschickt. Im *Kondensator* wird das Licht so gebündelt, dass es in genau einem Punkt des Objektes scharf ankommt. Das *Objektiv* erzeugt vom Objekt dann ein reelles, vergrößertes, seitenverkehrtes und umgedrehtes Zwischenbild vom Objekt. Dieses Zwischenbild wird vom *Okular* im *Tubus* noch einmal vergrößert und aufgerichtet. Es entsteht im Auge ein virtuelles Endbild.

2. Kenngrößen des Mikroskops

a) numerische Apertur A

Sie entspricht der Lichtstärke eines Objektivs und ist ein Maß für seine Leistungsfähigkeit. Die numerische Apertur ist das Produkt des *Brechungsindex n* des lichtbrechenden Mediums zwischen Objekt und Objektiv und dem Sinus des *Öffnungswinkels α* des Objektivs = $\sin \alpha$:

$$A = n \cdot \sin \alpha$$

Der Brechungsindex spielt zum Beispiel eine Rolle bei den Ölimmersionsobjektiven. Hier befindet sich zwischen Objekt und Objektiv keine Luft mehr, sondern ein Tropfen Öl. Und Öl hat einen höheren Brechungsindex als Luft. Die numerische Apertur und somit auch das Auflösungsvermögen eines solchen Objektivs sind daher höher.

b) Auflösungsvermögen d

Das Auflösungsvermögen eines Mikroskops hängt ab von der *numerischen Apertur A* und der *Wellenlänge λ* des verwendeten Lichts:

$$d = \lambda / n \cdot \sin \alpha$$

Je kürzer die Wellenlänge bzw. je höher die numerische Apertur ist, desto besser ist das Auflösungsvermögen eines Mikroskops.

c) Gesamtvergrößerung V_{ges} .

Die Gesamtvergrößerung eines Mikroskops berechnet man aus dem Produkt der Eigenvergrößerungen des verwendeten Okulars und Objektivs. Hat man ein Okular mit einer 10x-Vergrößerung und ein Objektiv mit einer 100x-Vergrößerung, so ist das gesehene Bild 100fach vergrößert. Die *förderliche Gesamtvergrößerung* - also die, bei der die Bildqualität noch nicht leidet - beträgt grob das 500- bis 1000fache der numerischen Apertur.

d) Linsenfehler

Es gibt zwei Arten von Linsenfehlern. Bei der *sphärischen Aberration* wird das Licht im Randbereich der Linse weniger stark gebrochen als im Zentrum. Durch eine Planlinse kann man diesen Fehler beheben = *Planobjektive*. Bei der *chromatischen Aberration* wird Licht unterschiedlicher Wellenlänge unterschiedlich stark gebrochen. Durch aufwendige Behandlungsverfahren kann man auch diesen Fehler teilweise (*Achromat*) oder auch vollständig (*Apochromat*) korrigieren. Kombinationen aus beiden Fehlerkorrekturen nennt man dann Planachromate bzw. Planapochromate. *Fluoritobjektive* sind (qualitativ und preislich) ein Mittelding aus Planobjektiven und

Achromaten.

3. Köhlersche Beleuchtung = Grundeinstellung

Bei falscher Einstellung des Mikroskops wird das Präparat nicht gleichmäßig ausgeleuchtet. Es entstehen sogenanntes Falschlicht, Reflexionen und eine unnötig starke Belichtung. Um dies zu korrigieren hat Prof. August Köhler 1893 die „Köhlersche Beleuchtung“ entwickelt, durch die diese Fehler behoben werden.

Hierzu fokussiert man zuerst das Präparat scharf, schließt dann die Leuchtfeldblende bis sie im Gesichtsfeld erscheint und verstellt dann die Höhe des Kondensors so, dass die Ränder der Blende scharf abgebildet sind. Abschließend wird die Blende wieder soweit aufgezo-gen, dass ihre Ränder gerade hinter den Gesichtsrand verschwinden. Diese Einstellung ist Grundvoraussetzung für jede Arbeit mit dem Mikroskop. Sie muss für jedes Objektiv wieder neu eingestellt werden.

4. Phasenkontrast

Das Phasenkontrastverfahren ist eine Methode, um sehr kontrastarme Objekte kontrastreicher darstellen zu können. Hier wird das ungestreute Licht um etwa $\frac{1}{4}$ Wellenlänge in seiner Phase verschoben, was zur Interferenz = charakteristische Überlagerungserscheinung des Lichts mit dem gestreuten Licht führt.

Hierzu wird bei völlig geöffneter Aperturblende eine *Ringblende* im Kondensator angebracht, sodass das Objekt in einem hohlen Lichtkegel beleuchtet wird. In der Bildebene der Ringblende befindet sich ein *Phasenring* (im Objektiv), dessen aufgedampfte dunkle Schicht einerseits die Phase des Lichts verschiebt, andererseits die Amplitude leicht moduliert. Das führt dazu, dass das Auge ein Hell-/Dunkelbild wahrnimmt.

Bevor man diese Methode entwickelt hat, hat man in Fällen mit wenig Kontrast mit dem *Dunkelfeld* gearbeitet. Hierbei gehen aber viele Strukturen verloren. Heute arbeitet man fast nur noch mit Phasenkontrast oder mit der

5. Polarisation

Natürliches Licht einer normalen Lampe weißt keine bevorzugte Schwingungsebene auf. Es ist unpolarisiert. Linear polarisiertes Licht gewinnt man mit Hilfe von Polarimetern, die nur Lichtwellen in der passenden Lage durchlassen.

Viele chemische Stoffe sind in der Lage, die Schwingungsebene des Lichtes zu drehen, z.B. die asymmetrischen C*-Atome der Kohlenhydrate. Sie sind *optisch aktiv* oder polar. In der Polarisationsmikroskopie werden Strukturen unterschiedlichen Drehvermögens sichtbar gemacht.

In einem Polarimeter wird mit einem 1. Polarfilter = *Polarisator* zwischen Lampe und Objekt eine bestimmte Wellenlänge herausgefiltert. Ein 2. Polarfilter = *Analysator* befindet sich um genau 90° verschoben oberhalb des Objekts. Ist die betrachtete Substanz optisch aktiv, so dreht sie die Schwingungsebene des gefilterten Lichtes. In der Ausgangsposition des Analysators sieht man nichts, dreht man ihn aber ein klein wenig, werden die aktiven Substanzen hell leuchtend sichtbar.

6. Färbemethoden

a) *Neutralrot*

Neutralrot ist ein Farbstoff, mit dem man die *Vakuole* einer Zelle anfärben kann. Es ist in alkalischer Lösung ein ungeladenes, lipophiles Teilchen, das durch Plasmalemma und Tonoplasten diffundieren kann. In saurem Milieu wird es jedoch zum Kation und

hydrophil. Es erhält einen Wassermantel. So kann es nicht mehr durch die Membranen diffundieren. Es sitzt in seiner eigenen „*Ionenfalle*“ fest.

Zum Färben zieht man einen Tropfen Lösung unter einem Deckglas mit Präparat durch und wartet, bis sich die Vakuole gut angefärbt hat. Dann zieht man solange Wasser unter dem Deckglas durch, bis aller überschüssige Farbstoff entfernt ist und nur noch die Vakuolen rot erscheinen.

b) Methylgrün

Mit diesem Farbstoff kann man *Zellkerne* grün anfärben. Man verfährt hierzu genauso wie oben schon beim Neutralrot beschrieben.

7. *Allium cepa* (Küchenzwiebel)

Die Zwiebel an sich ist eine Anpassung an die geophytische Lebensweise mehrjähriger Pflanzen, die ausschließlich mit unterirdischen Organen überwintern, während alle oberirdischen Teile absterben.

Bei der Küchenzwiebel gehen die fleischigen, übereinandergreifenden Zwiebelschalen aus dem Blattgrund abgestorbener Laubblätter hervor. Es handelt sich also um *Metamorphosen des Blattes*. Der Spross ist zu einer scheibenförmigen Achse verkürzt, auf der die Blätter aufsitzen. In den Achseln der Zwiebelschalen liegen Achselknospen, die zu Beginn einer neuen Vegetationsperiode austreiben. Die in ihnen *gespeicherten Reservestoffe* werden dabei aufgebraucht. Bei der Küchenzwiebel dient der eingelagerte Zucker als Energiespeicher. Die trockenen Hüllblätter schützen die Zwiebel nach außen vor Mikroorganismen und Verdunstung. Und die Schärfe schützt vor „Fressfeinde“.

Das Zwiebelblatt besteht aus *Mesophyll*, welches in der inneren Krümmung von der *oberen Epidermis*, in der äußeren Krümmung von der *unteren Epidermis* begrenzt ist. Die Zwiebelzelle an sich ist relativ kontrastarm. Sie besteht hauptsächlich aus Vakuolen, in denen die Reservestoffe eingelagert sind. Mit Hilfe der unterschiedlichen Mikroskopier- und Färbeverfahren kann man die einzelnen Bestandteile der Zellen jedoch recht gut betrachten.

8. Mikrophotographie

Bei der Photographie mikroskopischer Präparate sollte man folgende Punkte beachten:

- Das Mikroskop muss erschütterungsfrei aufgestellt werden!
- Präparate in flüssigen Medien sollten so dünn wie möglich sein (dann sind sie auch unempfindlicher gegen Erschütterungen)!
- Die gesamte Optik muss sauber und staubfrei sein!
- Für gleichbleibende Qualität sollte man immer dieselbe Filmsorte und dasselbe Labor benutzen!
- Das Mikroskop muss korrekt gekühlt sein!
- Um Erschütterungen beim Auslösen zu vermeiden, sollte man einen Selbstausröser verwenden!

Da Kunstlichtfilme nur schwer zu bekommen und zudem ziemlich teuer sind, kann man Mikrophotos auch mit normalen *Tageslichtfilmen* herstellen. Bei Tageslichtfilmen muss man jedoch darauf achten, einen Tageslicht- bzw. *Konversionsfilter* (Blaufilter) zu verwenden. Damit wird die Farbtemperatur der Mikroskoplampe an die des Filmes angepasst.

Durchföhrung

Stücke der Zwiebelepidermis werden nach den oben beschriebenen Methoden vorbereitet und mikroskopisch untersucht. Das Ergebnis wird mit Photos dokumentiert.

Ergebnis
siehe Photos