

Pilzwachstum mit einer preiswerten und leicht herzustellenden Mikroskopkammer beobachten

Hans Halbwachs

Danzigerstr. 20, D - 63916 Amorbach

halbwachs@mykologie-bayern.de

Submitted 01.01.2012

Halbwachs, H. (2012) – Pilzwachstum mit einer preiswerten und leicht herzustellenden Mikroskopkammer beobachten. Mycol. Bav. 13: deutsche online-Version)

Schlagnworte: Mikrokammer, Zellebene, lebende Zellen, mikroskopische Beobachtung, Mykologie, Pilze

Zusammenfassung: Mikrokammern sind ein Werkzeug um mikrobielle Lebensweisen bzw. das Verhalten von Organismen auf zellulärer Ebene zu beobachten.

Die hier vorgestellte Mikrokammer ist - im Gegensatz zu früheren Konstruktionen - eine kostengünstige, robuste, leicht herstellbare und einfache Lösung, mit der verschiedenste Experimente mit lebenden Zellen unter mikroskopischer Beobachtung zu gestalten sind. Sie kann auf einfache Weise aus leicht erhältlichen Teilen gebaut werden.

Drei Jahre mykologischer Untersuchungen haben die die Eignung für Forschungszwecke nachgewiesen. Das Gerät ist für besonders für professionelle und Amateurmykologen von Interesse, aber auch für Forscher anderer Disziplinen.

Einführung

In Zeiten, in denen molekulare Methoden die biologische Forschung dominieren, scheinen in vivo Untersuchungen von Entwicklungsaspekten oder Wechselbeziehungen auf Zellebene nicht mehr zeitgemäß zu sein. Molekulare Techniken sind allerdings nicht immer anwendbar, beispielsweise bei morphologischen Veränderungen während des Lebenszyklus von Pilzen unter verschiedenen Bedingungen. Solche Untersuchungen gelten immer noch als anspruchsvoll und aufwändig.

Für Herausforderungen wie diese bieten mikroskopierbare Mikrokammern eine Lösung. Die biologische und medizinische Forschung setzt sie seit vielen Jahren ein. Allerdings hatten die Konstruktionen einige Nachteile mit Blick auf Kosten, Ausgereiftheit, Haltbarkeit, Bedienbarkeit und Anpassbarkeit (BARTNICKI - GARCIA & LIPPMAN 1966, FEDERLIN ET AL. 1971, FEDER 1981, FANTINI ET AL. 1987, HILL 1995, FOCHT 1996, FRIEDMAN ET AL. 2002, HAUSEN & RIEBESELL 2002).

Experimente in der mikrobiellen und mykologischen Forschung erfordern manchmal eine fortlaufende Beobachtung von Zellen, die verschiedenen Behandlungen unterworfen werden. Typische Beispiele sind Untersuchungen über Hyphenwachstum, Sporenkeimung oder auch Lebensbedingungen von Protozoen. Deshalb müssen Mikrokammern folgende Eigenschaften aufweisen:

- Volumen < 500 µl
- Definierte Kammerdicke ((0,4 - 1 mm)
- sterilisierbar
- einfach zu befüllen (unter sterilen Bedingungen)
- beschickbar mit flüssigen, gasförmigen und (kleinen) festen Stoffen
- geeignet für mikroskopische Vergrößerungen bis zu 1000X (Ölimmersion)

Es ist außerdem zu wünschen, dass ein solches Gerät einfach herzustellen und billig ist.

Konstruktion und Herstellung

Die neue Mikrokommer besteht nicht viel mehr als aus einem herkömmlichen Objektträger für die Mikroskopie, einem Deckglas und einer Silikondichtung (Abb. 1)

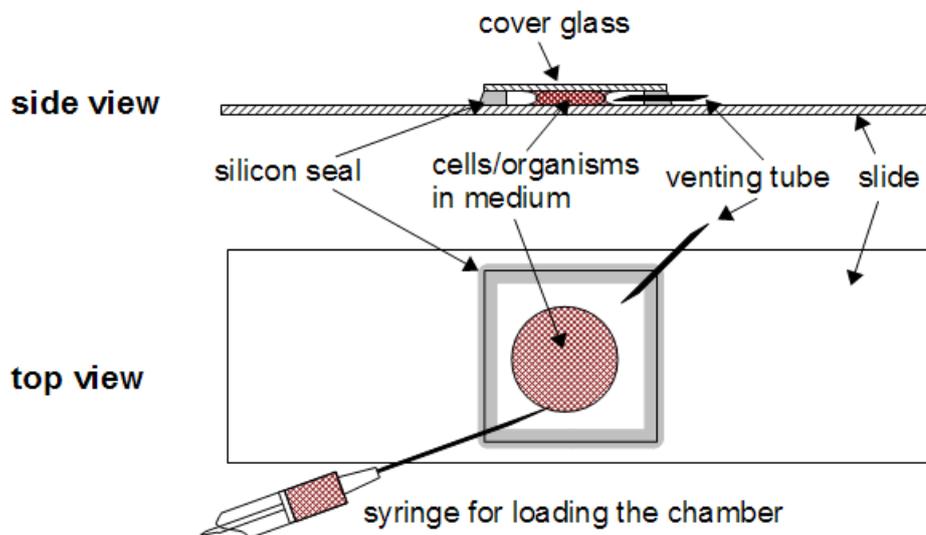


Abb. 1: Konstruktion der Mikrokommer

Benötigt werden folgende Teile und Hilfsmittel:

- Teile für die Kammer
 - Objektträger, 76 × 26 mm
 - Deckglas, z.B. 18 × 24 mm
 - Lüftungsröhrchen: 10 mm Abschnitt einer Injektionsnadel von 0,6 mm Durchmesser für eine Kammer von 1 mm Dicke, der mit einer Nadelfeile o.ä. abgetrennt wird
- Hilfsmittel für den Zusammenbau
 - Aceton zum entfetten des Objektträgers und des Deckglases
 - transparente Silikon-Dichtmasse (Essigsäurebasis), abgefüllt in eine 5 ml Einwegspritze (Luer-Konus)
 - eine kleine Montageplatte (ca. 150 × 50 × 10 mm) mit dem Umriss des Deckglases, die z.B. an einer Tischkante montiert ist
 - 2 Klammern
 - 2 Abstandstreifen aus Fühlerlehren (siehe Anhang); die Dicke der Streifen bestimmt die Dicke der Kammer, z.B. 1 mm
 - 1 Hart-PVC-Block (ca. 10 × 30 × 85 mm)

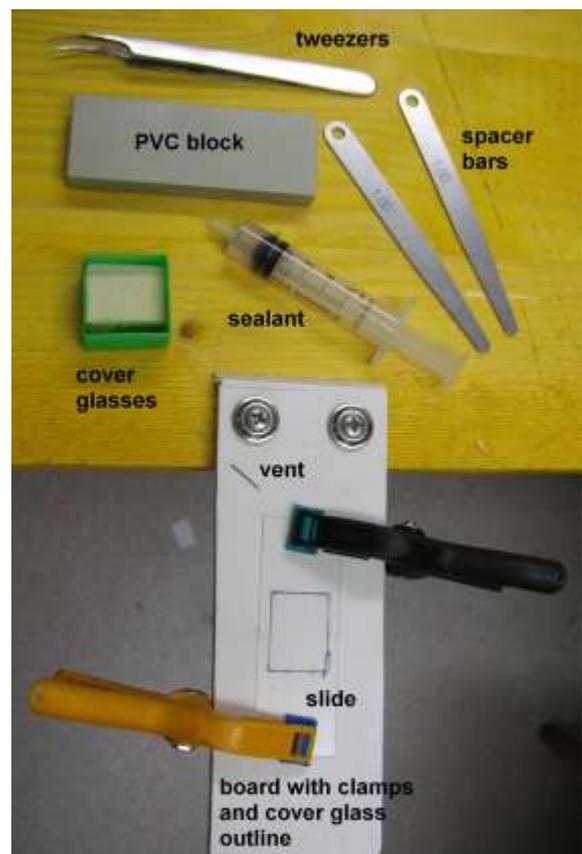


Abb. 2: Teile für die Mikrokommer

Der Zusammenbau erfolgt in folgenden Schritten:

1. Objektträger und Deckglas entfetten (nur wenn nötig, Deckgläser sind gewöhnlich fettfrei)
2. Objektträger auf Montageplatte positionieren und mit Klammern fixieren (Abb. 2)

3. Silikon in einem etwa 2 mm starken Strang entlang der Innenseite der Deckglasmarkierung auftragen (Abb. 3)
4. Lüftungsröhrchen mit einer feinen Pinzette in eine Ecke platzieren und herunterdrücken
5. Deckglas auf das Silikon legen und Position justieren
6. Klammern entfernen und Abstandstreifen links und rechts vom Deckglas auflegen (Abb. 4)
7. PVC-Block kurz mit Gefühl auf die Anordnung drücken (Abb. 5), um die Kammer zu versiegeln und die Kammerdicke gemäß der Abstandstreifen einzustellen; PVC-Block und Abstandstreifen wieder entfernen
8. Mikrokammer mindestens 18 Stunden aushärten lassen und bei ca. 150 °C für 1 Stunde sterilisieren (Backofen genügt); dies entfernt gleichzeitig Polymerisatorreste (Essigsäure)

Der Zusammenbau dauert weniger als zwei Minuten, Material und Teile kosten weniger als 0,50 Euro, einschließlich der anteiligen Kosten für die Montagehilfsmittel.

Proben werden mit 0,5 oder 1 ml Einwegspritzen, bestückt mit Injektionsnadeln mit einem maximalen Durchmesser von 60% der Kammerdicke durch Einstechen in die Silikondichtung in die Kammern injiziert. So ist für eine 1 mm Kammer eine Nadel von 0,4 mm eine sichere Wahl.



Abb. 3: Silikonstrang und Lüftungsröhrchen



Abb. 4: Abstandstreifen



Abb. 5: Kammer mit PVC-Block abdichten und einstellen

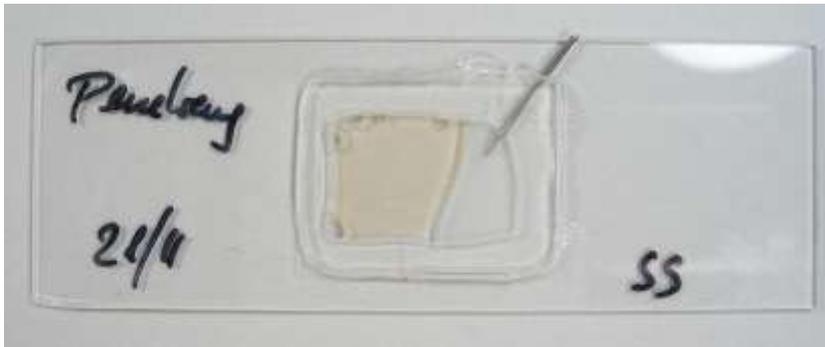


Abb. 6: Kammer, befüllt mit einer Sporensuspension



Abb. 7: In die Kammer eingebrachtes Wurzelfragment

Ergebnisse und Diskussion

1 mm Mikrokammern wurden über drei Jahre in etwa 75 Versuchen zur Sporenkeimung in flüssigen und halbflüssigen Medien eingesetzt, wobei sich die Kammern als haltbar und leicht zu handhaben erwiesen. In dieser Zeit gingen lediglich zwei Deckgläser bei zu hastigem Durchstechen der Silikondichtung mit einer 0,6er Nadel zu Bruch, um Abschnitte von Haarwurzeln (Abb. 7) einzuschleusen. Mit den empfohlenen 0,4er Nadeln ist es nie zu Beschädigungen gekommen.



Abb. 8: Keimende Spore von *Armillaria borealis* (400×)



Abb. 9: Sklerotien eines DSE (Dark Septate Endophyte) (1000×)

Die mikroskopischen Untersuchungen fanden überwiegend mit 400-facher Vergrößerung statt (Abb. 8). Für weitergehende Überprüfungen wurde ein Ölimmersionsobjektiv (1000-fach) eingesetzt, mit meist guten Ergebnissen. Nur Objekte, die sich am Boden der Kammer befanden, erschienen wegen des darüber anstehenden Mediums und enthaltener Partikel trüber. Obwohl nicht getestet, ist zu erwarten, dass die Kammern auch für Mikroskope mit Heiztisch geeignet sind.

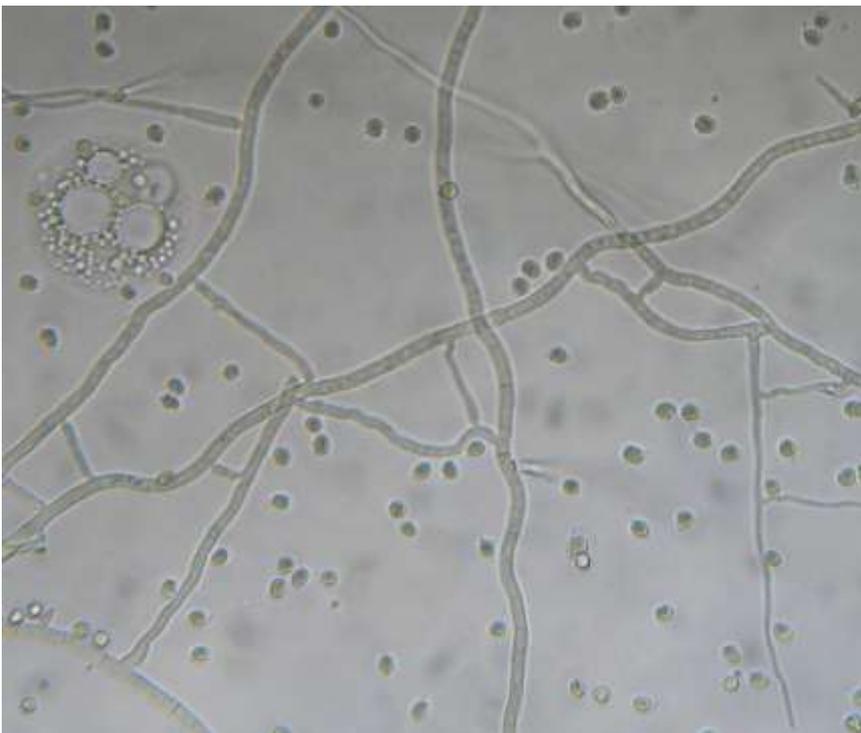


Abb. 10: In einer Basidiosporen-Suspension tauchen Ascomyceten auf (400×)

Die Kammern könnten theoretisch nach Durchspülen mit Reinigungsmitteln und destilliertem Wasser und erneuter Sterilisation wieder benutzt werden. Da aber die Herstellung der Kammern nur wenig Geld, Aufwand und Zeit erfordert, ist dies nicht sinnvoll.

Die Kammer kann für Vorführungen und Lehrzwecke benutzt werden, v.a. in Verbindung mit Mikroskop-Projektion. Durch seine Einfachheit und Erschwinglichkeit ist das Gerät außerdem für Amateure attraktiv.

Fazit: Die hier vorgestellte Mikrokammer erfüllt alle Anforderungen. Die Konstruktion ist flexibel und kann an verschiedenste Versuchsanordnungen angepasst werden, die z.B. mit elektrischen Impulsen mit Hilfe von Elektroden arbeiten, Gasdurchfluss erfordern oder die Entnahme von Kammerinhalt vorsehen.

Literatur

BARTNICKI-GARCIA, S. & E. LIPPMAN (1966): Liberation of protoplasts from the mycelium of phytophthora. Journal of General Microbiology 42: 411-416

FANTINI, E., ATHIAS, P., COURTOIS, M. & A. GRYNBERG (1987): A simple gas-flow chamber for cultured cell electrophysiology in a controlled atmosphere. Pflügers Archiv - European Journal of Physiology 409: 632- 634

FEDER, W.A. (1981): Bioassaying for ozone with pollen systems. Environmental Health Perspectives 37: 117-123

FEDERLIN, K., MAINI, R.N., RUSSELL, A.S. & D.C. DUMONDE (1971): A micro-method for peripheral leucocyte migration in tuberculin sensitivity. Journal of Clinical Pathology 24: 533-536

FOCHT, D.C. (1996): Live-cell microscopy: environmental control for mammalian specimens. Nature Biotechnology 14: 361-362

FRIEDMAN, A.L., GONGAWARE, S.J. & A.H. GOUGH (2002): Environmental chamber for the analysis of live cells. U.S. Patent 6,365,367

HAUSEN, P. & M. RIEBESELL (2002): A simple flow-through micro-chamber for handling fragile, small tissue explants and single non-adherent cells. Methods in Cell Science 24/4: 165-168

HILL, D.R. (1995): Means and method for microbiological growth and in situ observation with microscopes. U.S. Patent 5,417,576

Anhang

Material, Teile und Hilfsmittel können häufig von Lieferanten "um die Ecke" bezogen werden, meist sogar im Online-Handel.

Posten	Lieferant	Anmerkungen
Objektträger, Deckgläser, Einwegspritzen, Injektionsnadeln	Laborhandel, Medizinhandel, Apotheken usw.	
Montageplatte (beschichtete Spanplatte, PVC o.ä.)	Baumärkte, online	
Silikon-Dichtmittel	In kleinen Mengen: Bastelläden, online	Wird als Kleber für Styropor in Tuben verkauft; prüfen, ob der Kleber auf Essigsäurebasis arbeitet*
Abstandstreifen: aus Fühlerlehren, z.B. für die Prüfung von Zündkerzen	Baumärkte, Auto-Ersatzteile, online	www.reluctantmechanic.com/using-tools/thickness_gauge.php
Hart-PVC-Block	online, manchmal auch in Baumärkten	Auch Teflon, Polypropylen oder andere, wasserabstoßende Materialien sind geeignet
Klammern	Baumärkte, online	Werden als Leimzwingen verkauft

*der Kleber riecht deutlich nach Essig

Eine Zusammenstellung der Mikrokammern, die auf dem Markt sind, bietet Olympus an:
<http://www.olympusfluoview.com/resources/specimenchambers.html>