

ZEISS Axio Lab.A1

Gewässeranalyse mit dem Lichtmikroskop

ZEISS Axio Lab.A1

Gewässeranalyse mit dem Lichtmikroskop

Autoren: Dr. Alexandra Jeuck, Prof. Dr. Hartmut Arndt
Allgemeine Ökologie, Institut für Zoologie,
Universität zu Köln, Deutschland

Dr. Thorsten Kern
Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland

Datum: Mai 2018

Einleitung

Die Güte von Gewässern ist ein Thema, das in nahezu jedem gesellschaftlichen System eine Rolle spielt. Daher werden Oberflächengewässer aller Art hinsichtlich ihrer Qualität und Nutzbarkeit untersucht. Die im Wasser lebenden Organismen sind leicht zu gewinnen und von hohem Wert als Indikator. Sie lassen durch ihre Spezialisierung auf Umgebungsbedingungen schnelle und nachhaltige Rückschlüsse zu. Die mit dem bloßen Auge nicht wahrzunehmenden Organismen lassen sich mit Routinemikroskopen schnell, preiswert und sicher erkennen und bestimmen. Der Aufbau eines derartigen Gewässermonitorings sei am Beispiel von Berliner Flusswasser dargestellt.

Wissenswertes über Einzeller (Flagellaten und Ciliaten)

Flagellaten (Abbildung 1) sind Einzeller mit einer oder mehreren Geißeln. Ciliaten (Abbildung 2) sind bewimperte und meist etwas größere Einzeller. Beide gehören zur eukaryotischen Organismengruppe der Protisten.

Sie besitzen einen echten Zellkern und zahlreiche Unterfunktionen. Sie treten in vielfältigen, morphologischen Ausprägungen auf. Teilweise entdeckt man Hunderte von ihnen innerhalb eines einzigen Wassertropfens. Seit einigen Jahrzehnten ist bekannt, dass diese Protisten einen enormen Beitrag zur Reduktion von Bakterien innerhalb der mikrobiellen Schleife leisten können, da sie sich heterotroph von Bakteri-

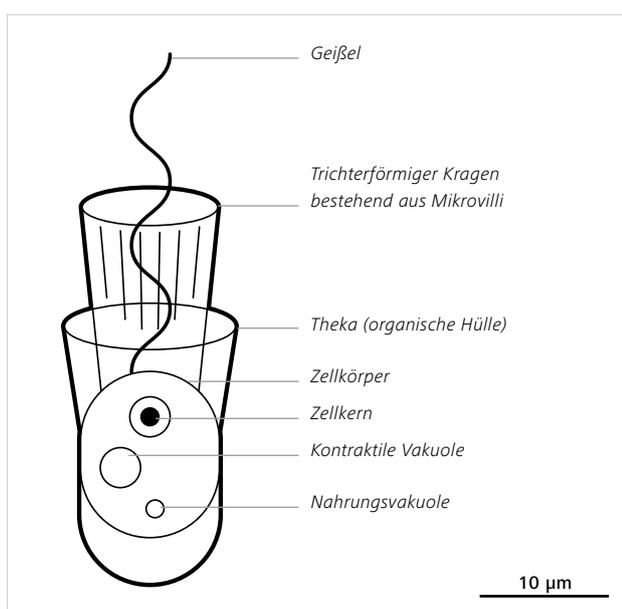


Abbildung 1 Flagellat am Beispiel des Choanoflagellat (Schema)

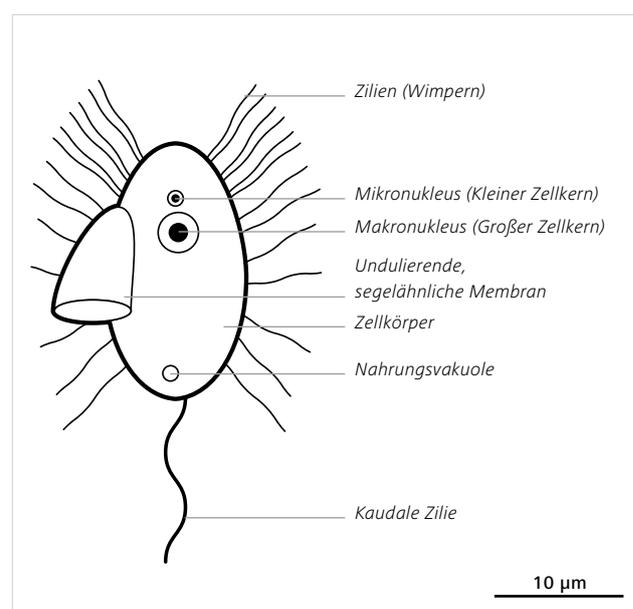


Abbildung 2 Ciliat

den nachhaltigen Gewässerschutz in Deutschland, gefördert vom Bundesministerium für Bildung und Forschung), innerhalb dessen Probenahmen bundesweit an verschiedenen Fließgewässern (Spree-Havel-System in Berlin, der Ruhr in Nordrhein-Westfalen, den Flüssen Rhein und Mosel in Rheinland-Pfalz sowie den Flüssen Isar und Ilz in Bayern) durchgeführt werden. Im Berliner Stadtgebiet (Spree-Havel-System) werden Beprobungen u.a. in Zusammenarbeit mit Wasserforschungsinstituten, den betroffenen Gesundheits- und Umweltbehörden, sowie den Wasserver- und Abwasserentsorgungsbetrieben (u.a. Kompetenzzentrum Wasser gGmbH, Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berliner Wasserbetriebe) durchgeführt. Ziel des „FLUSSHYGIENE“-Verbundvorhabens ist es, erweiterte Erkenntnisse über Eintrag und Dynamik hygienischer Belastungen in Fließgewässern zu erlangen.

Probenahme, Präparations- und Bestimmungstechnik

Methodisch wird bei der Lebenduntersuchung von Protisten so vorgegangen, dass an den jeweiligen Gewässern Wasserproben mit einem Ruttner-Schöpfer genommen werden (z.B. drei Replikate à 100 ml ungefiltertes Wasser für die Analyse der heterotrophen Flagellaten). Diese werden anschließend gekühlt und lichtgeschützt bis zur mikroskopischen Lebenduntersuchung aufbewahrt. Diese Lebendanalyse sollte so schnell wie möglich innerhalb einer Stunde nach



Abbildung 6 Routinemäßige, parallele Lebendbestimmung und -zählung von Protisten.



Abbildung 5

Probenahme erfolgen, um das Risiko des Absterbens sowie mögliche Interaktionen der Organismen so gering wie möglich zu halten. Zur mikroskopischen Bestimmung werden daraufhin z.B. jeweils mehrere Parallelen einer 5 – 10 µl Wasserprobe auf einen Objektträger gegeben. Zwei Deckgläser links und rechts daneben sowie ein drittes Deckglas auf dem Tropfen verhindern ein Zerdrücken der Organismen. Die heterotrophen Flagellaten werden mit 200 – 400facher



Abbildung 7 Verschiedene heterotrophe Flagellaten (*Bicosoeca lacustris* und *Monosiga* sp.) nutzen die Hülle der Kieselalge *Asterionella* als Substrat. Lebendaufnahme im Phasenkontrast

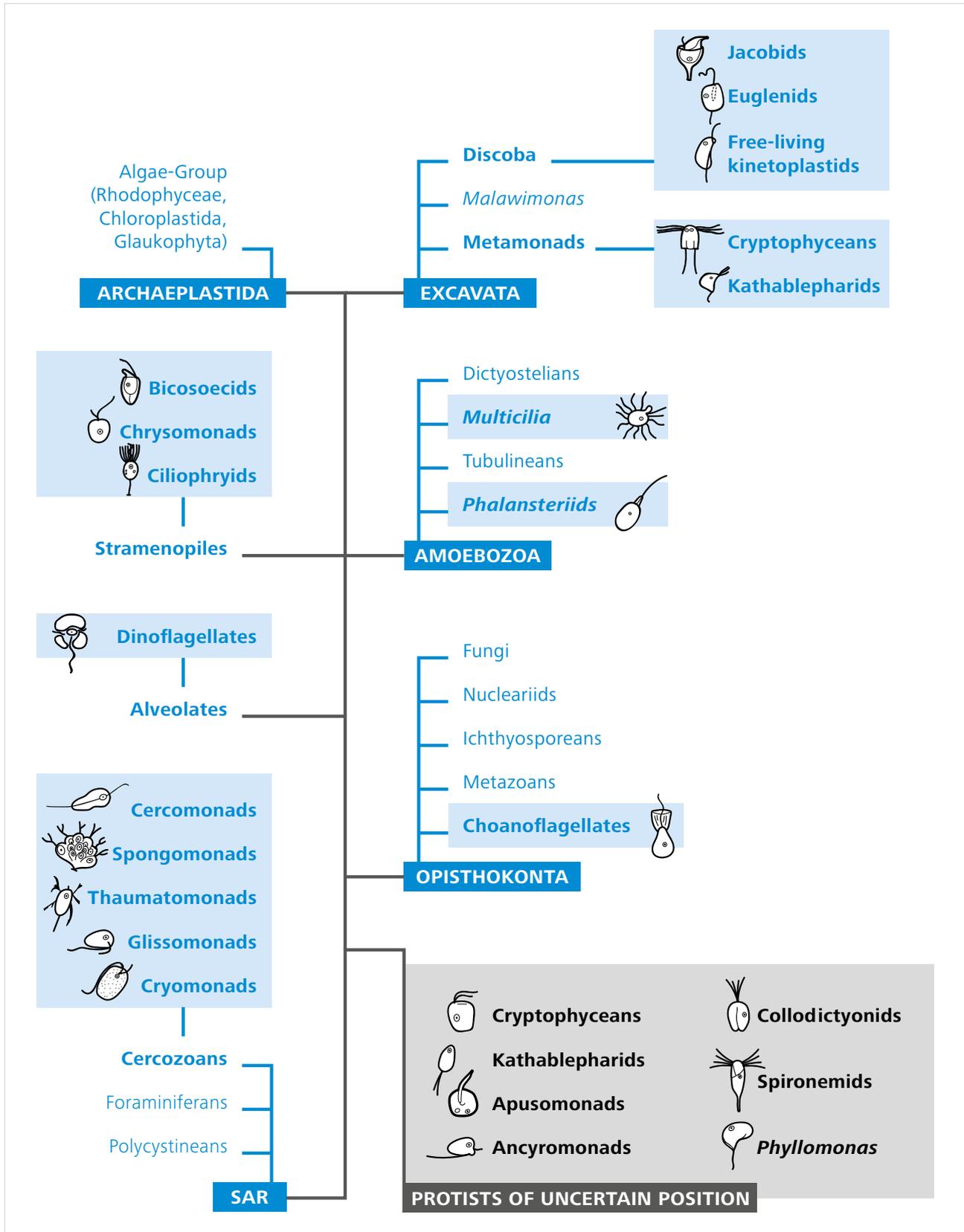


Abbildung 8 Schematische Darstellung des Stammbaums der heterotrophen Flagellaten (siehe Bestimmungsschlüssel von Jeuck und Arndt 2013) mit exemplarischen Vertretern zur Veranschaulichung der Formenvielfalt innerhalb dieser Protistengruppe.

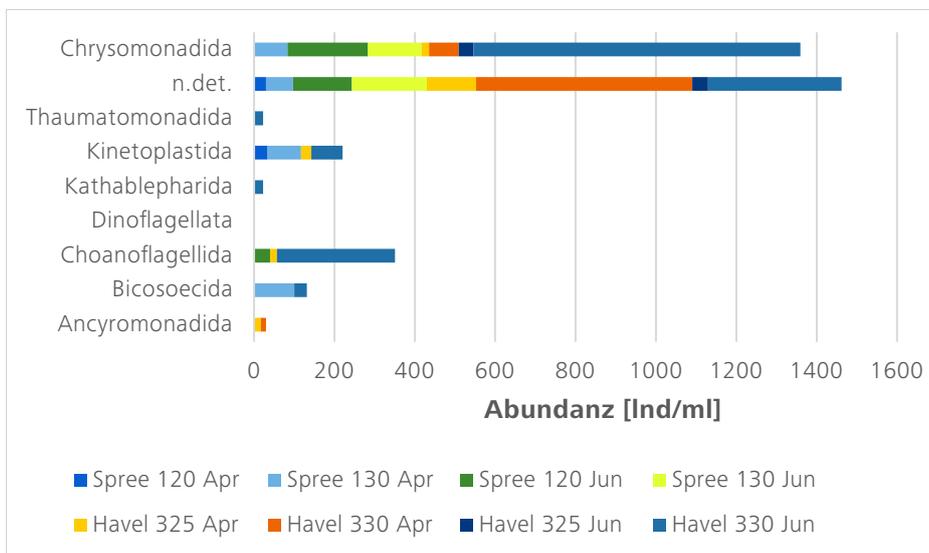


Abbildung 9 Exemplarische Ergebnisse von zwei Lebendzählkampagnen am Spree-Havel-System im April und Juni 2016. Probenahmestellen: Spree 120 = Spreetunnel, Spree 130 = Baumschulenweg, Havel 325 = Pichelsee, Havel 330 = Höhe Grunewaldturm.



Abbildung 10 ZEISS Axio Lab.A1

Vergrößerung und unter Zuhilfenahme des Phasenkontrastes lebend untersucht (Abb. 5 bis Abb. 7). Der Phasenkontrast ist unerlässlich für die Erkennung von Geißelform, -bewegung und sonstigen speziellen Zellbestandteilen (Kragen, Lorica, Ejektisomen etc., Abb. 7). Bei der Bestimmung der Flagellaten wird auf spezielle Bestimmungsliteratur zurückgegriffen (z.B. Jeuck und Arndt 2013, Abb. 8).

Anschließend werden die bestimmten und gezählten Protistenzahlen auf einen Milliliter hochgerechnet, um Abundanz und Diversität abschätzen zu können. Anhand der gefundenen Flagellatengruppen können Rückschlüsse auf die Elimination bezüglich pathogener Keime getroffen werden (Abb. 9). Manche Organismen (z.B. Kinetoplastiden) nehmen weniger Bakterien pro Zeiteinheit auf als andere (z.B. Choanoflagellaten mit ihrer starken Strudelbewegung und recht großem Kragen), vgl. Boenigk und Arndt 2000 und Abb. 8 für die äußerlichen Unterschiede).

Lichtmikroskopische Gewässeruntersuchungen von lebenden Einzellern können durch Bestimmung von Abundanz, Biovolumina, jeweiligen Fraßtypen und unter zur Hilfenahme von abiotischen und biotischen Parametern und Bakterienabundanz erste Näherungswerte zur Abschätzung von

bakterieller Konsumption / Protisten-Grazing im jeweils untersuchten Gewässer bieten. Diese Konsumptionsraten bieten die Möglichkeit, Handlungsempfehlungen zur Förderung der gewässerinternen Eliminationsleistung für potentielle Krankheitskeime aufzustellen, die dann auch auf andere Gewässertypen übertragbar sein können.

Fazit

Je mehr gelöstes organisches Material (DOM) und Bakterien sich in einem Gewässer befinden und/oder von außen z.B. durch Starkregenereignisse und dadurch bedingte überlaufende Kanalisationen in ein Gewässer eingetragen werden, desto mehr Protisten können teilweise nachgewiesen werden. Protisten ernähren sich von Bakterien, die wiederum DOM aufnehmen, also von deren Verfügbarkeit abhängen. Unter Einsatz von einfacher, routinemäßig nutzbarer Optik können diese kleinen, in ihrer ökologischen und evolutionären Bedeutung stark unterschätzten Organismen schnell bestimmt und gezählt werden. Durch die Nutzung von leicht zu bedienenden Lichtmikroskopen können wichtige Aussagen über die Güte von Gewässern getroffen und neue Erkenntnisse für potentielle Maßnahmen zu ihrer Verbesserung gewonnen werden.

Empfohlene Mikroskopische Ausrüstung

Die typischen Kontrastverfahren am Mikroskop für aquatische Organismen sind Hellfeld, Phasenkontrast und Dunkelfeld. Mit ZEISS Axio Lab.A1 und einem achromatisch – aplanatischen Universalkondensator können diese leicht eingestellt werden. Die Größe der Protisten liegt zwischen 1 und 150 µm und kann daher gut mit 10×, 20× und 40× Objektiven erfasst werden. Um die Zilienmerkmale sicher bestimmen zu können, ist auf eine gute optische Korrektur (z.B. N-Achroplan Objektive) zu achten. Phasenkontrast ist essentiell in der Charakterisierung, werden doch die Zellbestandteile visualisiert. Mit dem Differentiellen Interferenzkontrast (DIC) kann man noch tiefere Einblicke in das Zellinnere gewinnen, da auch feine Zellbestandteile kontrastiert werden können.¹

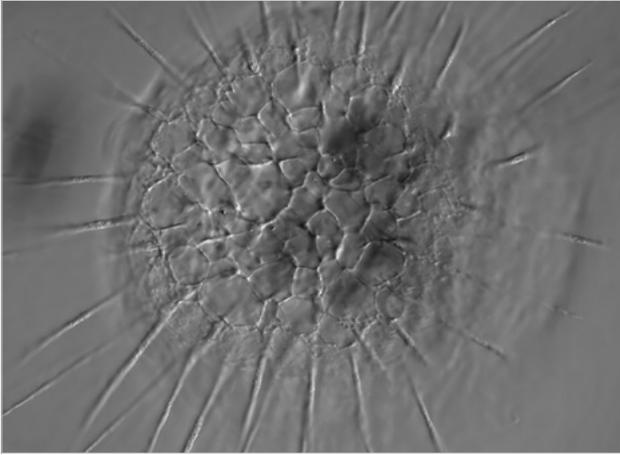
¹ Zu Choanoflagellaten: Einzeller des Jahres 2017: <http://www.protozoologie.de/EinzellerdesJahres2017.html>

Das einen aquatischen Organismus durchströmende Licht, erfährt zum Teil an einigen Zellbestandteilen gegenüber dem unbeeinflussten Licht eine sogenannte Phasenverschiebung der Lichtwellen. Der „Phasenkontrast“ im Mikroskop vergrößert diesen Abstand der Wellenfronten indem er das Beleuchtungs- und gebeugte Licht aus dem Präparat durch einen sogenannten Phasenring im Objektiv leitet. Kommt es im Idealfall zu einem Versatz von $\lambda/2$, dem Auslöschungskriterium der Interferenz, tritt als maximaler Kontrast Schwarz auf. (Lit.) Anders beim DIC Verfahren – hier wird der Beleuchtungsstrahl durch ein Prisma unterhalb der optischen Auflösung in zwei leicht phasenverschobene Strahlen getrennt. Werden diese nach Passage der Zellorganellen wieder vereinigt, werden die feinen Phasenunterschiede der Organellen als ein virtuelles Relief Bild sichtbar. Hierfür kann z.B. ein AxioScope.A1 als Stativ eingesetzt werden. (LIT).

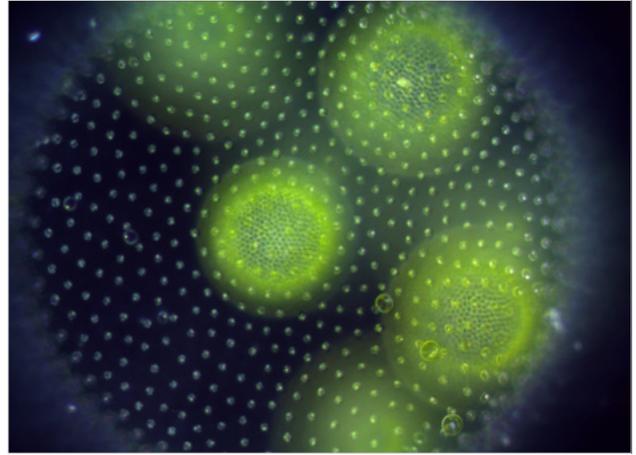
Literatur:

- [1] Arndt, H., Dietrich, D., Auer, B., Cleven, E., Gräfenhan, T., Weitere, M., Mylnikov, A. (2000) Functional Diversity of Heterotrophic Flagellates in Aquatic Ecosystems. In Leadbeater BSC, Green JC (eds) *The Flagellates*. Taylor & Francis, London, 240–268.
- [2] Azam, F., Fenchel, T., Field, J. G., Gray, J. S., Meyer-Reil, L. A., Thingstad, F. (1983) The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine Ecology Progress Series* 10: 257–263.
- [3] Boenigk, J., Arndt, H. (2000) Comparative studies on the feeding behavior of two heterotrophic nanoflagellates: the filter-feeding choanoflagellate *Monosiga ovata* and the raptorial-feeding kinetoplastid *Rhynchomonas nasuta*. *Aquatic Microbial Ecology* 22: 243–249.
- [4] Deng, L., Krauss, S., Feichtmayer, J., Hofmann, R., Arndt, H., Griebler, C. (2014) Grazing of heterotrophic flagellates on viruses driven by feeding behaviour. *Environmental Microbiology Series* 6: 325–330.
- [5] Jeuck, A., Arndt, H. (2013) A short guide to common heterotrophic flagellates of freshwater habitats based on the morphology of living organisms. *Protist* 164: 842–860.
- [6] Richter, D. J., King, N. (2013) The genomic and cellular foundations of animal origins. *Annual Review of Genetics* 47: 509–537.

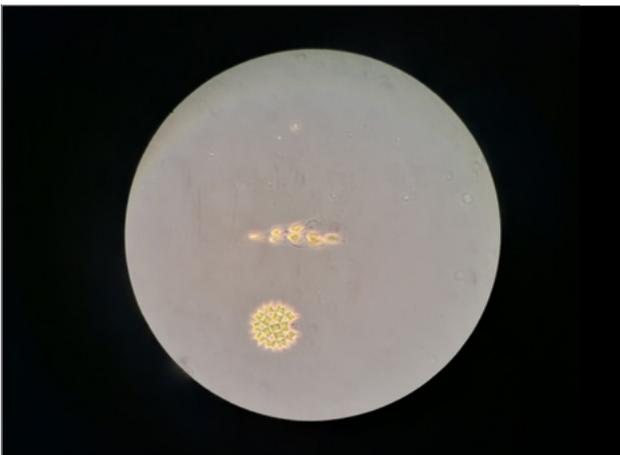
Anhang



Sonnentierchen *



Volvox *



Grünalge „*Pediatrum duplex*“ (dt. „Durchbrochenes Zackenrädchen“) und Goldalge „*Dinobryon sociale*“ (dt. „Becherbäumchen“), 400x, PH **



Nauplius Larve (nicht weiter spezifizierbare Larve verschiedener Ruderfußkrebse); 400x, PH **



Larven vom Wasserfloh „*Daphnia longispina*“, 100x, DF **



Larve vom Wasserfloh „*Daphnia longispina*“ mit Muttertier, 100x, DF **



Larve vom Wasserfloh „Daphnia longispina“ mit Muttertier, 100x, HF **



Wasserfloh „Daphnia longispina“ allein, 40x, PH **



Wasserfloh „Daphnia longispina“ allein, 40x, HF **



Nauplius Larve und Wasserfloh „Daphnia longispina“ im DF, 40x **



Nauplius Larve und Wasserfloh „Daphnia longispina“ im HF, 40x **



Nauplius Larve und Wasserfloh „Daphnia longispina“ im PH, 40x **

* Mit freundlicher Genehmigung: Dr. K. Kirchhoff, OHG Monheim, Deutschland

** Mit freundlicher Genehmigung: P. Mühlhoff, Georg-August-Universität Göttingen, X-LAB, Deutschland



Carl Zeiss Microscopy GmbH
07745 Jena, Germany
microscopy@zeiss.com
www.zeiss.com/axiolab



Nicht alle Produkte sind in jedem Land erhältlich. Die Verwendung von Produkten für medizinische Diagnosen, Therapien oder Behandlungen unterliegt möglicherweise lokalen Beschränkungen. Nähere Informationen erhalten Sie bei Ihrem ZEISS Vertriebsmitarbeiter.
DE_41_013_158 | CZ 06-2018 | Änderungen in Ausführung und Lieferumfang sowie technische Weiterentwicklung vorbehalten. | © Carl Zeiss Microscopy GmbH