

Mikroskopieren in der Pilzkunde

JEAN-PIERRE MONTI & YVES DELAMADELEINE • ÜBERSETZUNG: N. KÜFFER

Das Gedächtnis der Pilze

(Fortsetzung von SZP 95(2) 2017)

Es ist Herbst. Im Bestimmungssaal ist eine beinahe fiebrige Aufregung zu spüren. Es sind viel mehr Pilzler da als im Frühling.

«Oh! Was für schöne Röhrlinge! Und diese Eierschwämme! Woher stammen sie?»

Aber welcher Pilzler verrät schon seine geheimen Plätzchen?!

A. Mattör und Mike O'Log breiten ihre Funde aus. Statt eine grosse Menge zu sammeln, zogen sie es vor verschiedene Arten zu pflücken, um daraus ein schmackhaftes Mischgericht zu machen: einige kleine Steinpilze, eine Handvoll Herbsttrompeten, Semmelstoppelpilze, drei Habichtspilze, einige kleine Perlpilze und zwei grosse Riesenschirmlinge. Und als Tüpfchen auf dem i noch zwei Grüne Anis-Trichterlinge, die dem Ganzen diesen unvergleichlichen frischen Anisgeschmack verleihen.

«Nein, wir können ihn leider nicht mehr durchlassen», sagt eine Kontrolleurin zu einem Pilzler, der einen Grünling (*Tricholoma equestre*, Abb. 1) essen wollte. «Man hat herausgefunden, dass er bei einigen Personen Magenprobleme verursacht. Er wurde also von der Liste der essbaren Pilze entfernt und ist nun auf derjenigen der zu meidenden Arten».

«Schade, er ist so schön!»

Fig. 1 *Tricholoma equestre*

Abb. 1 Kiefernwald-Grünling *Tricholoma equestre*



«Und vielleicht wird eines Tages sogar der Konsum von Morcheln untersagt, denn bei zu grossem Verzehr kommt es manchmal zu Vergiftungssymptomen» fährt Gaëlle, die Kontrolleurin fort.

Die Pilzler machen ein versteinertes Gesicht, keiner lacht mehr. Es scheint tatsächlich, dass in den letzten Jahren Intoleranzen in der Bevölkerung gegenüber Substanzen in Pilzen zugenommen haben.

«Einen Nebelgrauen Trichterling zu essen, ist nicht so ganz ungefährlich. Und wenn Sie schon möchten, dann schälen Sie ihn vor dem Kochen, denn es scheint, dass die unverdauliche Substanz besonders in der Huthaut vorhanden ist. Es gibt jedoch Schlimmeres. Insbesondere die Aufbewahrungsmethoden der Ernten.

«Wie viele Plastiksäcke mit halbverfaulten Pilze musste ich wegwerfen» meint Gaëlle, «und dabei gäbe es einige schmackhafte Arten, die es das ganze Jahr übergibt und die kultiviert werden: denken Sie an Seitlinge, Shiitake, Judasohren und Champignons.»

«Liebe Freunde» fängt der Präsident an, «entschuldigt, dass ich euch unterbreche, aber ich möchte euch an unsere Pilzausstellung erinnern, die in einem Monat stattfindet und euch einige Informationen dazu geben. Obwohl die Frage des Verkaufs von Pilzschnitten an der letzten Versammlung grosse Diskussionen ausgelöst hatte, machen wir ihn dieses Jahr noch. Als Neuheit werden wir eine Kinderecke einrichten und damit dem Wunsch des Verbandes nachkommen. Axel, kümmerst du dich darum?»

Axel errötet leicht, denn dies ist ein Vertrauensbeweis seitens des Präsidenten.

«Ich hoffe, dass ich es schaffen werde und ich kann auch auf die Hilfe von Mike zählen.»

In seinem Kopf beginnen bereits die Ideen für die Nachwuchsförderung zu kreisen... (Fortsetzung folgt).

Beobachtungen und Erklärungen

Die mit Abstand häufigste Fragen an Pilzler und auch unter Pilzlern, ist die nach der Essbarkeit einer Art. Früher ist man empirisch vorgegangen («try and error Prinzip»), heute ist es ein bisschen anders. Biochemische Analysen können toxische Substanzen in Pilzen nachweisen.

Seit kurzem berücksichtigt man je doch auch individuelle Unverträglichkeiten von nur wenigen Personen gegenüber allergenen Substanzen, die andere Konsumenten nicht bemerken. So wird die Liste der nicht zum Verzehr geeigneten Arten immer länger.

Schliesslich konnte auch gezeigt werden, dass toxische Substanzen ins Myzelium und dadurch auch in die Fruchtkörper eindringen können. Schon Ende des 20. Jahrhundert warnte die Société mycologique de France, dass so Vergiftungen auftreten können, sogar beim Verzehr von anerkannten Speisepilzen. Das Vorhandensein von toxischen Substanzen in der Umwelt kann also Pilze «vergiften».

In der Schweiz wird die Liste der essbaren und ungeniessbaren bzw. giftigen Pilze von der VAPKO* à jour gehalten. Sie arbeitet dabei eng mit den Tox Info Suisse* zusammen.

Mikroskopieren in der Pilzkunde

Eine kurze Einführung

Seit der Mensch Glas herstellen kann, hat er festgestellt, dass die Dinge durch dieses Material hindurchgesehen, verändert oder grösser aussehen. So entstanden Lupen. Bis zum Mikroskop dauerte es dann noch bis zum Ende des 16. Jahrhunderts, als man zwei Lupen so zusammensetzte, dass ein stark vergrössertes Bild eines Objektes entstand. Die Erfindung des Mikroskops bestehend aus einem Objektiv und einem Okular wird zwei Holländern zugeschrieben, Hans Janssen und seinem Sohn Zaccharias.

In der Pilzkunde musste man bis zum Anfang des 19. Jahrhundert warten, bis sich der Gebrauch des Mikroskops durchsetzte. Lucien Quélet (1832–1899) war einer der ersten, der davon Gebrauch machte.

Gebrauch optischer Instrumente in der Pilzkunde

Häufig ist es schwierig zu sagen, zu welcher Art oder gar zu welcher Gruppe ein Lebewesen gehört (Abb. 2 und 3). Um dieses Problem zu lösen, brauchen wir Bestimmungsschlüssel. Dabei handelt es sich um mehr oder weniger komplex aufgebaute dichotome* Fragen, die helfen einen Organismus zu bestimmen oder zumindest zu platzieren. Jede Disziplin der Biologie hat solche Schlüssel, sei es Mykologie, Botanik, Entomologie, Ornithologie oder andere.

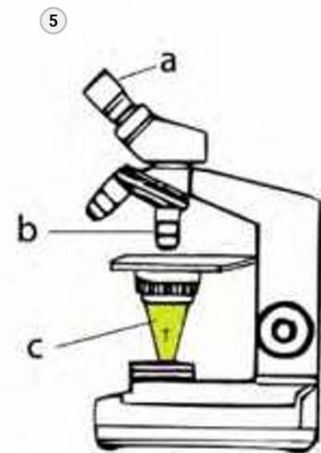
Fig. 2 Œufs de *Chrysopa viridissima* (Insecte); Fig. 3 *Mucor* sp. sur *Mycena zephyrus*
Abb. 2 Eier von *Chrysopa viridissima* (Insekt);
Abb. 3: *Mucor* sp. auf *Mycena zephyrus*



Fig. 4 Loupe binoculaire (= stéréo-microscope); a: oculaires, b: objectif double, c: préparation, d: éclairage par dessus;
Abb. 4 Binokular (=Stereolupe); a: Okular, b: Objektive, c: Präparat, d: Belichtung von oben



Fig. 5 Microscope optique; a: oculaire(s), b: objectif simple, c: éclairage par dessous;
Abb. 5 Optisches Mikroskop; a: Okular(e), b: einfaches Objektiv, c: Belichtung von unten



Leider reichen in der Pilzkunde die makroskopischen Merkmale nicht, um gewisse Arten sicher bestimmen zu können. Die Arten sehen sich oft so ähnlich, dass sie nicht nur mit ihren organoleptischen* Eigenschaften auseinandergehalten werden können. Eine mikroskopische Untersuchung bringt also grössere Sicherheit bei der Bestimmung. Manchmal allerdings sind die Fruchtkörper so klein, dass von Anfang an ein Mikroskop gebraucht wird.

Ein gutes Mikroskop ist sehr teuer. Viele Pilzvereine haben welche gekauft, um sie ihren Mitgliedern zur Verfügung zu stellen. Die Bedienung ist jedoch viel einfacher, wenn man weiss, wie es funktioniert oder Hilfe einer erfahrenen Person erhält.

Zuerst muss man zwischen Mikroskop und Lupe unterscheiden.

Die Lupe und das Binokular

Jeder Pilzler benötigt eine gute Taschenlupe mit einer zehnfachen Vergrösserung. Ein Tisch-Binokular besitzt gewisse Vorteile: man hat beide Hände frei (um beispielsweise einen Dünnschnitt zu machen), und es hält mehrere Vergrösserungen bereit (meist 4- bis 40-fache Vergrösserung). Die Belichtung kommt von oben und die beiden Objektive befinden sich nur wenige Zentimeter oberhalb des zu beobachtenden Objekts (Abb. 4). Weiterer Vorteil: das Binokular bietet ein stereoskopische Bild, d.h. beide Okulare zeigen Bilder von

unterschiedlichen Objektiven, das Bild wird somit räumlich. Unter einem Binokular kann ein Objekt ohne spezielle Präparation beobachtet werden.

Das optische Mikroskop

Dieses Instrument ermöglicht sehr grosse Vergrößerungen (meist 40- bis 1000-fach) mit einer Lichtquelle von unten, die das zu beobachtende Objekt durchdringen muss. Dieses sollte also sehr dünn sein, damit genügend Licht durchdringt und nicht zu viele (verschiedene) Zellschichten die Beobachtung stören. Ideal wäre eine einzige Zellschicht, die sind allerdings extrem dünn (gegen Tausendstel-Millimeter) (Abb. 5). Das Sichtfeld eines Mikroskops ist stark reduziert. Das Objektiv muss sehr nahe an der Probe sein. Diese muss in einer Flüssigkeit zwischen einem Objekträger und einem Deckglas liegen, um seine Dicke auszugleichen und nicht das Objektiv zu beschmutzen (Abb. 6).

Ein Präparat kann entweder mit einem sehr feinen Schnitt oder als Quetschpräparat gemacht werden. Ein Dünnschnitt hat den Vorteil, dass Lage, Struktur und Form der Zellen untereinander erhalten bleiben, jedoch den Nachteil, dass oft mehrere Zellschichten übereinanderliegen und so Klarheit und Helligkeit beeinträchtigen. Wenn es reicht mehr oder weniger isolierte Zellen zu beobachten, dann kann man ein Quetschpräparat herstellen, indem man Pilzmaterial sanft zwischen Objekträger und Deckglas zerquetscht.

Indem man den Fokus fein verändert, können verschiedene Ebenen in einem Präparat gesehen werden.

Bei einer 1000-fachen Vergrößerung muss man zwischen das Objektiv und dem Präparat einen Tropfen Immersionsöl tröpfeln, das denselben Brechungsindex* besitzt wie die Linse. So ist keine Luft mehr zwischen Objektiv und Präparat; Luft besitzt einen ganz anderen Brechungsindex als Glas. Die Schärfe des Bildes kann so deutlich verbessert werden.

Ein Mikroskop hat oft zwei Okulare, dies ändert aber nichts daran, was man sieht, denn jedes Auge erhält exakt das gleiche Bild aus dem einzigen Objektiv. Es ist einfach bequemer und weniger ermüdend nicht die ganze Zeit ein Auge geschlossen halten zu müssen. Ein drittes, vertikales Okular ermöglicht die Installation einer mit einem Computer oder einem Bildschirm verbundenen Kamera (Abb. 7).

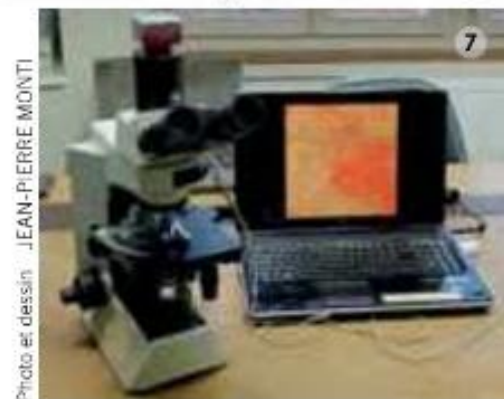
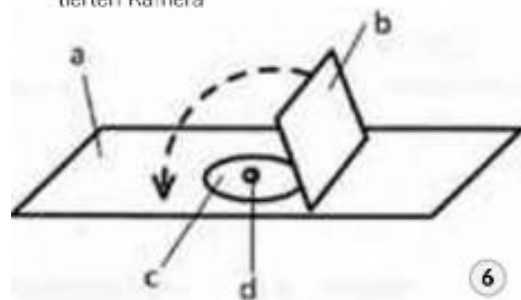
Die Vergrößerung errechnet sich aus der Multiplikation der Zahl, die auf dem Objektiv eingraviert ist und derjenigen auf dem Okular. Dies gilt sowohl für ein Mikroskop als auch für das Binokular. Beispiel: wenn auf dem Okular 10x steht und 40x auf dem Objektiv, dann beträgt die Vergrößerung $10 \times 40 = 400x$.

Eines der beiden Okulare ist justierbar, je nach Qualität oder Erfordernissen des Betrachters. Zuerst soll die Schärfe des nicht verstellbaren Okulars eingestellt werden, danach das andere Okular, da mit jedes Auge ein gleich scharfes Bild erhält. Dieser Vorgang braucht einige Zeit und personalisiert das Gerät.

Fig. 6 Préparation d'un échantillon en vue de son observation au microscope optique; a: lame porte-objet, b: lamelle couvre-objet, c: liquide de montage, d: objet;

Abb. 6 Präparat für die Beobachtung unter dem Mikroskop; a: Objekträger, b: Deckglas, c: Präparationsflüssigkeit, d: Objekt

Fig. 7 Station de microscopie munie d'une caméra; Abb. 7 Mikroskop mit einer montierten Kamera



Die Elektronen-Mikroskope

Beim Bild, das man durch ein Okular eines Mikroskops sehen kann, handelt es sich um das Licht, das durch das Präparat hindurch scheinen konnte. Die Struktur des sichtbaren Lichts erlaubt es ihm nicht durch kleine «Löcher» zu dringen, wenn diese kleiner sind als die Amplituden der Lichtwellen. Deswegen spricht man in der Mikroskopie lieber von Auflösung als von Vergrößerung. Die Grenze der Auflösung eines optischen Mikroskops wird erreicht, wenn eine 1500-fache oder höhere Vergrößerung überschritten wird (wenn der Durchmesser des «Lochs» kleiner ist als 400 Nanometer*).

In den 1930-Jahren entwickelten Max Knoll und Ernst Ruska ein Strahlenbündel, dessen Elektronen eine kleinere Amplitude als sichtbares Licht besitzen. Seit diesem Zeitpunkt gibt es Wellen, die durch «Löcher» dringen können, die um einen Nanometer gross sind. Das Transmissionselektronen-Mikroskop (TEM) war erfunden.

Gegen 1965 wurde das Rasterelektronen-Mikroskop (REM) kommerzialisiert, das auch mit einem Elektronenbündel funktioniert: Es werden Elektronen auf eine vorher mit Gold überzogene Fläche geschossen, dabei entstehen dreidimensionale Bilder. In gewisser Weise funktionieren REM wie ein Binokular.

Die Abbildungen 8-10 zeigen eine Schnalle mit Hilfe der hier vorgestellten Mikroskop-Typen.

Fig. 8 Anse d'anastomose de *Pluteus pouzarianus* vue en microscopie optique (MO)

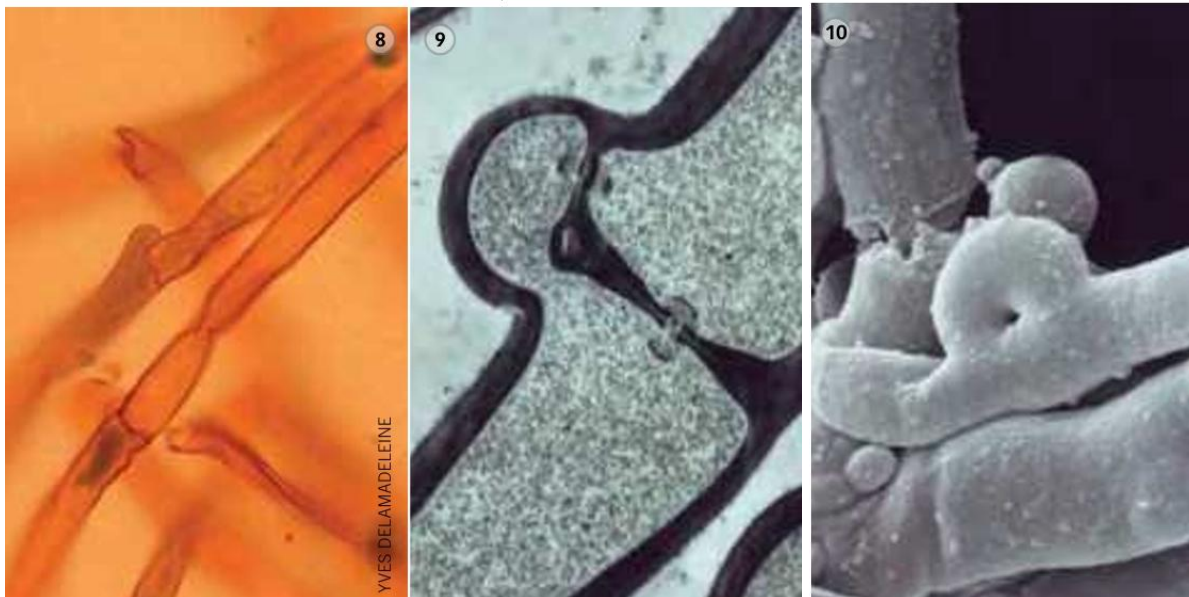
Abb. 8 Schnalle von *Pluteus pouzarianus* unter einem optischen Mikroskop

Fig. 9 Anse d'anastomose d'*Hyphodontia floccosa* vue en microscopie électronique à transmission (MET)

Abb. 9 Schnalle von *Hyphodontia floccosa* gesehen mit einem Transmissionselektronen-Mikroskop

Fig. 10 Anse d'anastomose d'*Hypochnicium sphaerosporum* vue en microscopie électronique à balayage (MEB)

Abb. 10 Schnalle von *Hypochnicium sphaerosporum* gesehen mit einem Rasterelektronen-Mikroskop (REM)



Färbemittel, die beim Mikroskopieren gebraucht werden

Verschiedene Färbemittel können eingesetzt werden, um Zellmerkmale zu betonen. Die am häufigsten gebrauchten sind: Die natürlichen Farben sieht man mit Wasser.

Mit **Ammoniak** können getrocknete Zellen wieder in ihre natürliche Form gebracht werden, beispielsweise Herbarmaterial.

Ammoniakhaltiges Kongorot ermöglicht Zellwände hervorzuheben; sie verfärben sich rötlich. So können verschiedene Zellformen besser auseinandergehalten werden, wie beispielsweise Hyphen, Schnallen*, Sporen, Basidien, Zystiden und andere.

Mit **Baumwollblau** werden Zellwände, aber auch ihre Ornamentation und ihr Inhalt gefärbt. Es hat den Vorteil, dass es während einer langen Beobachtung nicht austrocknet.

Mit **Melzers Reagens** testet man die Affinität zu Jod von gewissen Zellen oder Zellteilen. Beispielsweise spricht man von einer Spore sie sei amyloid (d.h. die gleiche Reaktion auf Jod zeigt wie Stärke), wenn sie in Melzers Reagens eine grauviolette Farbe annimmt. Eine Zelle oder ein Zellteil nennt man dextrinoid (d.h. die gleiche Reaktion auf Jod zeigt wie Dextrin*), wenn sie eine dunkelbraunrote Farbe annimmt.

Es existieren noch viele weitere Färbemittel oder Reagenzien, die in der Mykologie eingesetzt werden, nicht nur in der Mikroskopie (mikroskopische Reagenzien), sondern auch an Frischmaterial (makroskopische Reagenzien). Ihre Wirkung und Zusammensetzungen werden in zahlreichen Werken beschrieben: Kühner & Romagnesi (1953), Erb & Matheis (1982), Charbonel (1995, 2004).

Zu vermeidende Stolpersteine

- Das Deckglas nicht zerbrechen, wenn man es zu sehr auf den Objektträger drückt. Je nach Flüssigkeit kann das Objektiv nass oder gar beschädigt werden.
- Eine Luftblase nicht mit einer Zelle verwechseln.
- Das Präparat nicht eintrocknen lassen, bevor die Beobachtung fertig ist (man kann beispielsweise vorsorglich ein paar Tropfen Wasser am Rand des Deckglas tröpfeln)
- Achtung mit Sporen anderer Pilze!
- Nicht Guttulen* oder Vakuolen mit Zellen verwechseln
- Nicht unreife Basidien mit Zystiden verwechseln

Fig. 11 Disposition d'un microscope sur un téléphone portable.
Abb. 11 Mikroskop mit einem darauf montierten Mobiltelefon.



Fig. 12 Image de la surface porée de *Polyporus tuberaster* obtenue avec un microscope monté sur un téléphone portable.

Abb. 12 Bild der Porenoberfläche von *Polyporus tuberaster*, aufgenommen mit einem Mobiltelefon montiert auf einem Mikroskop



Pilzfacts

Seit kurzem gibt es auf dem Markt Mikroskope, auf denen man die Kamera eines Mobiltelefons fixieren kann (Abb. 11). Wenn ein Objekt in der richtigen Distanz von der Linse beleuchtet wird, erscheint das Bild auf dem Display und kann so gesichert werden (Abb. 12).

Es handelt sich eher um eine Lupe; die höchste Vergrößerung ist ungefähr 60-fach. Dieses Instrument ermöglicht also Grösse und Form von Pilzsporen im Feld zu bestimmen!

Allerdings kann es für Botaniker und Entomologen* nützlich bei der Bestimmung im Feld sein.

Wörterbuch

Bemerkung: In früheren Folgen erklärte Begriffe, werden nicht wiederholt.

Auflösung Fähigkeit eines optischen Instruments den Abstand zweier sehr nahe liegender Punkte zu zeigen. Er hängt von der Wellenlänge der verwendeten Strahlen ab.

Baumwollblau (oder Laktoseblau): In Milchsäure gelöstes Baumwollblau. Manchmal erhitzt man das Präparat vor der Beobachtung.

Brechungsindex Zahl, die das Verhalten von Licht beschreibt beim Durchgang von einem Material in ein anderes.

Dextrin Zwischenprodukt beim Abbau von Stärke in Glukose. Dichotom ist ein Bestimmungsschlüssel, der auf jeder Stufe immer zwei Möglichkeiten kennt.

Entomologe Biologe, der auf Insekten spezialisiert ist.

Guttule Kleines Tröpfchen einer unlöslichen Flüssigkeit in einer Zelle.

Kongorot (ammoniakhaltig) in konzentriertem Ammoniak gelöstes Kongorot. Es ist ein ausgezeichnetes Färbemittel von Zellulose (Achtung vor Flecken auf den Kleidern!)

Nanometer (Abkürzung. nm) Millionstel Teil eines Millimeters.

Organoleptisch was mit unseren Sinnen wahrnehmbar ist (Form, Farbe, Duft, Geschmack, Konsistenz, usw.)

Schnalle Auswuchs, der sich im Moment der Mitose einer dikaryotischen Zelle um eine Quersepte herum formt und die den Übergang des zweiten Zellkerns in die Tochterzelle ermöglicht.

Tox Info Suisse Schweizerisches Zentrum für medizinischen Rat und Informationen zu Vergiftungen aller Art. Telefonnummer: 145.

VAPKO Schweizerischer Verband der offiziellen Pilzkontrollorgane. Sie ist Mitglied des VSVP.