

Fluoreszenzmikroskopie in der Humusmikromorphologie

U. BABEL

Institut für Bodenkunde und Waldernährung der Universität Göttingen, D.B.R.

I. EINLEITUNG

Die Fluoreszenzmikroskopie macht im Bodendünnschliff viele organische Gemengteile sichtbar oder identifizierbar, die mit anderen Mikroskopbeleuchtungen kaum zu finden sind. Daher werden im folgenden Grundlagen, Technik und Anwendungsmöglichkeiten der Fluoreszenzmikroskopie in der Humusmikromorphologie dargestellt. Für die Anwendungsmöglichkeiten werden Ergebnisse aus verschiedenen Einzeluntersuchungen gegeben.

Es wird über Direktbeobachtungen der Eigenfluoreszenz organischer Gemengteile berichtet. Die Untersuchungen wurden an normalen Polyester-Dünnschliffen geführt, wie sie allgemein in der Bodenmikromorphologie gebräuchlich sind. In einigen Fällen wurden auch Dünnschnitte oder Streupräparate benutzt.

Die *Sekundärfluoreszenz*, also die Fluoreszenz nach Anfärbung mit Fluorochromen, wurde an Dünnschliffen noch nicht erprobt. Dagegen hat sie bekanntlich in der Bodenmikrobiologie seit Strugger [25] eine weite Verbreitung gefunden. Pauli [19, 21], arbeitete mit Acriflavin zur Untersuchung der Zersetzung von Pflanzenresten; bei der mikroskopischen Direktuntersuchung zeigte sich nur ein undeutlicher Unterschied in der Anfärbung frischer und zersetzter Gewebe.

Die *Primärfluoreszenz* organischer Gemengteile wurde bisher in einigen Fällen bei der Zersetzung von Pflanzenresten untersucht. Pauli [20] fand in Streupräparaten von sich zersetzenden Pflanzenresten Strukturen mit Primärfluoreszenz ähnlich der Primärfluoreszenz des frischen Materials. Babel [2] untersuchte die Änderung der Ligninfluoreszenz bei der Zersetzung verholzter Gewebe in Dünnschnitten. Jabłoński [13] und Altemüller und Banse [1] machten ähnliche Untersuchungen an Dünnschliffen.

Über fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von Kohle-Dünnschliffen berichtet Jacob (1964): An fluoreszierenden Strukturen fand er Reste von Korkgeweben, von cutinhaltigen Geweben, von Sporen, Pollen, Algen und verholzten Geweben. Auch extrahierbare Bitumina zeigten Fluoreszenz. Melhuish [17] nutzte die makromorphologisch sichtbare Fluoreszenz von Wurzelanschnitten für Wurzelzählungen an Bodenanschliffen aus.

II. GRUNDLAGEN DER ANWENDUNG DER FLUORESZENZMIKROSKOPIE IN DER HUMUSMIKROMORPHOLOGIE

Zusammenfassungen über Grundlagen und Anwendungen der Fluoreszenzmikroskopie in der Biologie und in der Technik geben Price and Schwartz [23], Perner [22] und Haitinger [11].

Eine Einführung in die Erscheinungen der *Fluoreszenz frischer pflanzlicher Gewebe* geben Klein und Linser [14]. Sie fanden, daß im allgemeinen die Cuticula weißlich fluoresziert, die Epidermis hellblau, Rindenparenchym grün oder braun, Bastbündel blau, Xylem violett, blau oder grünlich, Mark- und Blattparenchym violett. Im speziellen Fall können die Fluoreszenzfarben und auch die Fluoreszenzintensitäten dieser Gewebe stark vom Normalfall abweichen (vgl. auch Abb. 1). Korkmembranen fluoreszieren blau [16]; diese Fluoreszenz bleibt auch nach Extraktion der Wachse erhalten; ihre stofflichen Ursachen sind nicht bekannt. Mit der Differenzierung der Gewebe nimmt im allgemeinen ihre Primärfluoreszenz zu [29]. Auch viele tierische Gewebe zeigen Primärfluoreszenz [18].

Die Fluoreszenz von Geweben wird oft durch geringe Mengen oder Spuren von *organischen Stoffen*, die in Cytoplasma, Vakuole oder Zellwand enthalten sind, hervorgerufen. Umfangreiche Tabellen von fluoreszierenden Pflanzenstoffen gibt Goodwin [9]. Man findet Fluoreszenz in den verschiedensten Stoffklassen. Am bekanntesten ist die Rotfluoreszenz des Chlorophylls. Zu den fluoreszierenden Alkaloiden gehört das Berberin, das dem Holz von *Berberis* gelbe Fluoreszenz gibt. Für die Humusforschung besonders interessant ist die Fluoreszenz von zahlreichen Stoffen, die bei der Ligninzerersetzung auftreten oder als Bausteine von Huminsäuren vorkommen können: Ferulasäure, Zimtsäure, Protocatechusäure, Benzoesäure, Chinone; Phenylalanin, Flavone, Kaffeesäure. — Die Blaufluoreszenz lignifizierter Zellwände ist eine Eigenschaft des Lignins, sie ist auch an dem Ligningerüst, das nach Rotfäule der Zellwände zurückbleibt, und auch an Ligninextrakten zu beobachten und ermöglicht die quantitative histophysikalische Bestimmung des Lignins [24].

Die meisten organischen Stoffe, welche fluoreszieren, enthalten π -Elektronensysteme [26]. Danach fluoreszieren die meisten aromatischen Verbindungen und andere Verbindungen mit konjugierten Doppelbindungen. Die Fluoreszenz der Aromate kann durch verschiedene Substituenten am Benzolring, u.a. —COOH, aufgehoben werden. Oft ist Fluoreszenzfarbe und -intensität vom Dissoziationszustand abhängig und damit vom pH. Von Einfluß sind auch Verunreinigungen. Insbesondere können durch Schwermetallionen, Halogenionen, Chlor u.a. andere Formen der Energieabgabe aus den angeregten Elektronensystemen ermöglicht werden als Lichtemission: Es tritt Fluoreszenzlöschung auf. Bei hohen Konzentrationen treten Wechselwirkungen zwischen den Molekülen oder Ionen des

fluoreszierenden Stoffe selbst auf, die zur Konzentrationslöschung führen können.

Trotz dieser störenden Einflüsse und trotz der Tatsache, daß die Fluoreszenz vieler Gewebe- und Zellteile nur durch geringe Mengen fluoreszierender Stoffe, deren chemische Natur gar nicht bekannt ist, zustande kommt, sind Fluoreszenzerscheinungen an organischen Humusgemengteilen ein gut brauchbares Merkmal, welches in vielen Fällen immer wieder bestimmten morphologischen und chemischen Teilen zugeordnet werden kann.

Immerhin ist denkbar, daß in den ungeordneten Stoffgemischen der humifizierten organischen Gemengteile und auch in den ungeordneten Zuständen der Huminstoffmakromoleküle oft die Möglichkeit besteht, die durch Lichtabsorption gewonnene Energie anders als durch Lichtemission abzugeben, daß also Fluoreszenzlöschung oder ähnliche Vorgänge dafür verantwortlich sind, daß humifizierte organische Gemengteile und Huminstoffe im allgemeinen nicht fluoreszieren.

III. TECHNIK DER FLUORESZENZMIKROSKOPISCHEN UNTERSUCHUNG VON HUMUSDÜNNNSCHLIFFEN

A. DAS MIKROSKOP

Der spezifische Vorteil der Fluoreszenzmikroskopie gegenüber anderen Mikroskop-Beleuchtungen ist, daß die untersuchten Strukturen als Selbstleuchter vor dunklem Untergrund erscheinen: Dadurch wird der Nachweis fluoreszierender Strukturen sehr empfindlich.

Theoretisch sollte das Maximum des Erregerlichts möglichst nahe dem Maximum der Fluoreszenzanregungskurve eines Stoffes liegen. In den Untersuchungen, über die hier berichtet wird, wurde mit einer Quecksilberdampf-Höchstdrucklampe (Philips CS 150 W) gearbeitet. Nach der Charakteristik der Lampe und des verwendeten Erregerlichtfilters 2 mm UG 1 wurde als Erregerlicht vor allem das Licht der Quecksilberlinie 366 nm verwendet. Als Sperrfilter diente das Sperrfilter 470 (Firma Leitz), mit dem insbesondere für die Mikrofotografie die besten Erfahrungen gemacht wurden.

Die *Beleuchtung* kann in verschiedener Weise geführt werden. Im allgemeinen am besten bewährt sich an Humus- und Bodendünnschliffen die einfachste Beleuchtung, nämlich die mit einem lichtstarken *Hellfeld-Durchlicht*-Kondensator. Dabei zeigt der Untergrund noch eine geringfügige Resthelligkeit, die durch nicht ganz vollkommene Filterung zustandekommt. Durch die Beleuchtung mit *Dunkelfeldkondensator* erhält man einen fast völlig schwarzen Untergrund. Dies ist bei Bodendünnschliffen jedoch gewöhnlich von Nachteil, weil dadurch alle nicht fluoreszierenden Gemengteile verschwinden und die Lokalisierung der fluoreszierenden Teile erschwert wird. Auch bei *Auflicht* läßt sich Hellfeld- von Dunkelfeldbeleuchtung unterscheiden [10]. Erprobt wurde Auflicht-Dunkelfeld

(Ultropak von Leitz); damit wurde ein noch dunklerer Untergrund als mit Durchlicht-Dunkelfeld erhalten. Ein Vorteil der Auflichtfluoreszenz-Untersuchung wird oft darin gesehen, daß man stärkere Fluoreszenzintensitäten erhalten könne, da nicht wie bei Durchlicht auf dem Wege durch das Objekt das anregende Licht und das Fluoreszenzlicht absorbiert werden können. Jacob (1964) hat Braunkohlenschliffe deshalb mit Auflichtfluoreszenz untersucht. An den untersuchten 15 bis 30 μ dicken Vestopalschliffen von Humus- und Mineralböden wurde aber kein derartiger Vorteil der Auflichtfluoreszenz beobachtet.

Um nicht-fluoreszierende Strukturen neben den fluoreszierenden sichtbar zu machen, lassen sich *Kombinationsbeleuchtungen* einführen.

In letzter Zeit ist die Methode der *Phasenkontrast-Fluoreszenz* bekannt geworden, welche allerdings bei Verwendung von Durchlichtfluoreszenz einen eigenen Kondensator erfordert, bei Auflichtfluoreszenz Möglichkeit der Auflicht-Hellfeldbeleuchtung (z.B. Opak-Illuminator von Leitz, [10]; Leitz-Fluoreszenzopak, [28]).

An Humusdünn Schliffen erprobt wurden einige andere Kombinationen. Von Vorteil und ohne Aufwand ist manchmal die einseitige Auflichtbeleuchtung neben Durchlichtfluoreszenz. Gute Bilder erhält man auch bei Dunkelfeldbeleuchtung mit Glühlampe und Auflichtfluoreszenz (siehe Abb. 7).

Es sind Objektive mit möglichst hohen Aperturen zu verwenden, um große Lichthelligkeiten im Bild zu erhalten (siehe die zitierte Literatur über Fluoreszenzmikroskopie und Walter [28]).

Die *Fluoreszenzfarbe*, die in den Präparaten beobachtet wird, wird bei gleicher Anregungsbeleuchtung natürlich vom Sperrfilter beeinflusst. Das verwendete Sperrfilter 470 ist schwach gelb, blaue Fluoreszenzfarben werden dadurch geschwächt und etwas nach grün verschoben. Die Fluoreszenzfarben von Humusgemengteilen werden außerdem — wie die Beobachtungen ergeben haben bei Auflicht- wie bei Durchlichtfluoreszenz — durch Absorption an farbige Humussubstanzen abgeschwächt und in Richtung auf deren Farbe, also im allgemeinen nach gelb oder braun verändert (vgl. Abb. 1). Dieser Einfluß läßt sich ausschalten durch Behandlung mit Natriumhypochlorit, welche auch am Vestopal-Dünn schliff möglich ist [3]: Durch Natriumhypochlorit werden die farbigen organischen Stoffe entfärbt und gelöst, die fluoreszierenden Strukturen, die fast immer Zellwandreste sind, werden aber nicht beeinflusst.

Quantitative fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurden bei histochemischen Arbeiten entwickelt. Es werden Relativwerte der Fluoreszenzintensität und damit Relativwerte der Verteilung des fluoreszierenden Stoffs bestimmt [24]. Van Gijzel [8] hat Fluoreszenzspektren von Pollenkörnern verschiedenen Alters aufgenommen.

B. DAS PRÄPARAT

Die Untersuchungen wurden überwiegend an Bodendünn schliffen mit dem Polyester-Harz Vestopal als Einbettungsmittel geführt. Das gehärtete

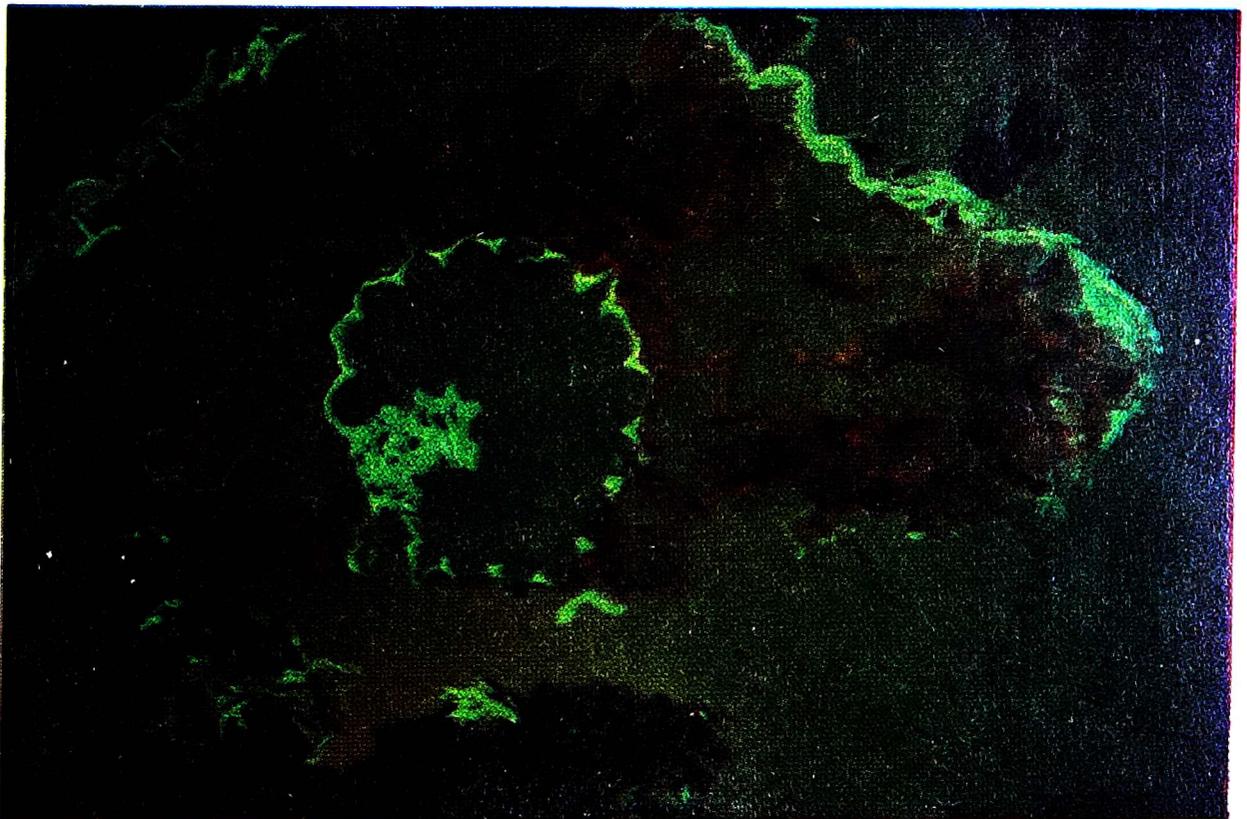


Abb. 1. Rest einer Fichtennadel der F-Schicht von Fichtenmoder, (2 cm Tiefe. — Vestopal-Dünnschliff, UV-Fluoreszenz, Hellfeld-Durchlicht-Kondensor, Sperrfilter 470, nat. Bildhöhe 450 μ . Schliff von E. Geyger). Fluoreszenz: Epidermis-Reste stark blaugrün. Assimilationsparenchym sehr schwach grünlich, meist durch Lichtabsorption an die im Hellfeld gelbbraunen Blattbräunungsstoffe abgeschwächt und nach schmutzig-braun verändert; fleckenweise erscheint das Assimilationsparenchym ziemlich stark rötlich; Endodermis stark blaugrün; Xylemreste stark blau; Vestopal (teils durch Eigenfluoreszenz, teils durch Resthelligkeit des Untergrunds) graugrün, stellenweise innerhalb der Nadel und am unteren Bildrand durch organische Stoffe der Nadel rötlich. — Bemerkung: Die blauen Farben sind auf der Fotografie etwas nach grün verschoben.

Kunstharz Vestopal fluoresziert in den Bodendünnschliffen gewöhnlich sehr schwach. Es stört bei Fluoreszenzuntersuchungen nicht.

Dagegen stört die Vestopal-Fluoreszenz bei Anschliffen sehr stark: Alle nicht ganz an der Oberfläche liegenden Teile sind stark verschleiert.

Es finden sich aber immer wieder Schliffe oder Partien von Schliffen gerade bei Humusproben, in denen Vestopal schwache bis mittlere grau-blaue Fluoreszenz zeigt. Fluoreszierende Höfe finden sich um manche Pflanzenreste. Diese Erscheinung wurde gelegentlich dann beobachtet, wenn durch Fehler bei der Präparation Luftblasen eingeschlossen sind. Dem entspricht Fluoreszenz des Vestopals am Rande des Deckglases. Dies hängt offenbar mit einer verzögerten Härtung des Vestopals zusammen, wie sie allgemein an den der Luft ausgesetzten Oberflächen der Tränklinge und nicht selten bei Humusproben, insbesondere von schwach zersetztem Material, beobachtet werden kann. Daher wurde die Änderung der Fluoreszenz während der Härtung untersucht. Nicht polymerisiertes Vestopal fluoresziert bei 30 μ Schichtdicke schwach, während der Härtung nimmt die Fluoreszenz langsam ab. (Dies ist strukturchemisch verständlich: Bei der Polymerisation des Vestopal-Styrol-Gemisches werden die konjugierten Doppelbindungen des Styrols und der Dicarbonsäure-Bausteine, die die Ursache der Fluoreszenz sind, geöffnet.) Danach scheint die Ursache der gelegentlich zu findenden Vestopalfluoreszenz eine Störung der Polymerisation zu sein, die entweder durch Luftzutritt oder durch Verunreinigungen mit Stoffen, die aus dem Humus extrahiert wurden, bedingt sein kann.

Störend sind in manchen Präparaten sehr kleine, stark blau aufleuchtende irreguläre Strukturen im Vestopal oder an den Oberflächen von Mineralkörnern. Wie diese Erscheinungen zustandekommen, die auch von Jacob (1964), beobachtet wurden, ist nicht genau bekannt. Sicher gehen sie ebenfalls auf Fehler im Präparat, wahrscheinlich auf Haarrisse und Streuungserscheinungen an diesen zurück.

IV. EIGENFLUORESZENZ ORGANISCHER GEMENGTEILE IN VESTOPAL-SCHLIFFEN VON BÖDEN

Hier wird ein kurzer Überblick zur Morphographie der fluoreszierenden Gemengteile gegeben. (Umfassende Beschreibungen der organischen Bodengemengteile gibt Babel [6]).

Den Ausführungen dieses und des folgenden Abschnitts liegen Untersuchungen an der Schliffsammlung des Verfassers zugrunde, in der Humusprofile von allen mitteleuropäischen Humusformen außer solchen von intensiv landwirtschaftlich genutzten Standorten erfaßt sind. Soweit die Ausführungen nicht durch Abbildungen oder Tabellen belegt sind, werden sie während der Tagung durch Farbdiapositive illustriert.

Zunächst sei bemerkt, daß gelegentlich auch mineralische Bodengemengteile mit Eigenfluoreszenz beobachtet werden. Insbesondere Tonsubstanz, welche Orientie-

rungsdoppelbrechung zeigt, hat oft grünliche bis gelbe Fluoreszenz von mittlerer bis ziemlich starker Intensität. Bekannt ist, daß Calcite häufig fluoreszieren, was durch Beimischung von verschiedenen Ionen ins Gitter aber auch durch Gehalt an Bitumen hervorgerufen sein kann.

Pflanzen- und Tierreste zeigen, solange ihre Strukturen gut erkennbar sind, Fluoreszenzfarben und -intensitäten etwa entsprechend den frischen Geweben, oft freilich abgeschwächt oder durch die Absorption des Fluoreszenzlichts an gefärbten Humusstoffen verändert (vgl. Abb. 1), die Chlorophyll-Fluoreszenz ist aber verschwunden. Farblose Teile werden durch Fluoreszenzuntersuchung deutlich sichtbar und oft identifizierbar; in dieser Beziehung ist die Fluoreszenzbeleuchtung gewöhnlich jeder anderen Mikroskopbeleuchtung überlegen.

In einem Fall konnte der Rest einer Enchytraee, erkennbar an der Blaufluoreszenz der Borsten, im Schliff gefunden werden, der auch bei Phasenkontrastbeleuchtung nicht zu identifizieren war. Die Blattbräunungsstoffe [6] fluoreszieren gewöhnlich sehr schwach bis undeutlich. An Stellen, wo sie im Hellfeld-Durchlicht sehr schwach gefärbt sind, zeigen sie aber manchmal stärkere blassgelbe oder rötliche Fluoreszenz. Dies wurde besonders deutlich bei Fichtennadeln der oberen F-Schicht, nie aber an solchen der tieferen Horizonte beobachtet.

Es ist wahrscheinlich, dass die Fluoreszenz von chemisch nicht veränderten Stoffen des Zellinhalts kommt. Insbesondere die Gerbstoffe zeigen oft Fluoreszenz. Mit zunehmender Dunkelung der Blattbräunungsstoffe würden diese Stoffe zunehmend verändert (vgl. Teil VB). Dass Stoffe, die bei der Humifizierung neu gebildet werden, Träger der Fluoreszenz sind, erscheint nach den mikromorphologischen Beobachtungen weit weniger wahrscheinlich.

In der *organischen Feinsubstanz* treten zahlreiche fluoreszierende Gemengteile auf, die ebenfalls in vielen Fällen im Hellfeld-Durchlicht kaum sichtbar sind (z. B. Abb. 5 und 6). Meist sind die Zellwände oder deren relativ wenig veränderte Reste Träger der Fluoreszenz.

Sie enthalten in der Regel noch Zellulose. Trotzdem können sie mit gekreuzten Polarisatoren meist nur undeutlich gesehen werden: Es sind oft nur sehr kleine Teile, die häufig in stark gefärbten organischen Substanzen oder in ebenfalls doppelbrechenden mineralischen Gefügepartien eingeschlossen sind. Gerade bei solchen Teilen wird der spezifische Vorteil der Fluoreszenzuntersuchung, nämlich ihre hohe Empfindlichkeit bemerkbar. Die Blattbräunungsstoffe oder andere gefärbte und natriumhypochloritlösliche Strukturen fluoreszieren auch in den Teilen der Feinsubstanz meist nur sehr schwach, oft gar nicht. (Dies wurde eindeutig durch Natriumhypochlorit-Behandlung der Dünnschliffe und Fotografien vor und nach der Behandlung festgestellt).

Kleine Gewebestücke zeigen Gelbfluoreszenz oder häufiger Blaufluoreszenz. Sie sind in Horizonten des Auflagehumus wie des Mineralbodens verbreitet. Die blau fluoreszierenden Teile stammen gewöhnlich von Rindenparenchym oder vom Kork der Wurzeln. Dies ist aus ihrer Fluoreszenzfarbe, aus ihrer Gewebestruktur und aus ihrer Vergesellschaftung mit gut erkennbaren Wurzelresten zu erkennen (vgl. Abb. 2). Sehr häufig sind *kleine Zellwandreste*, auch diese oft von Wurzeln stammend. (Bei

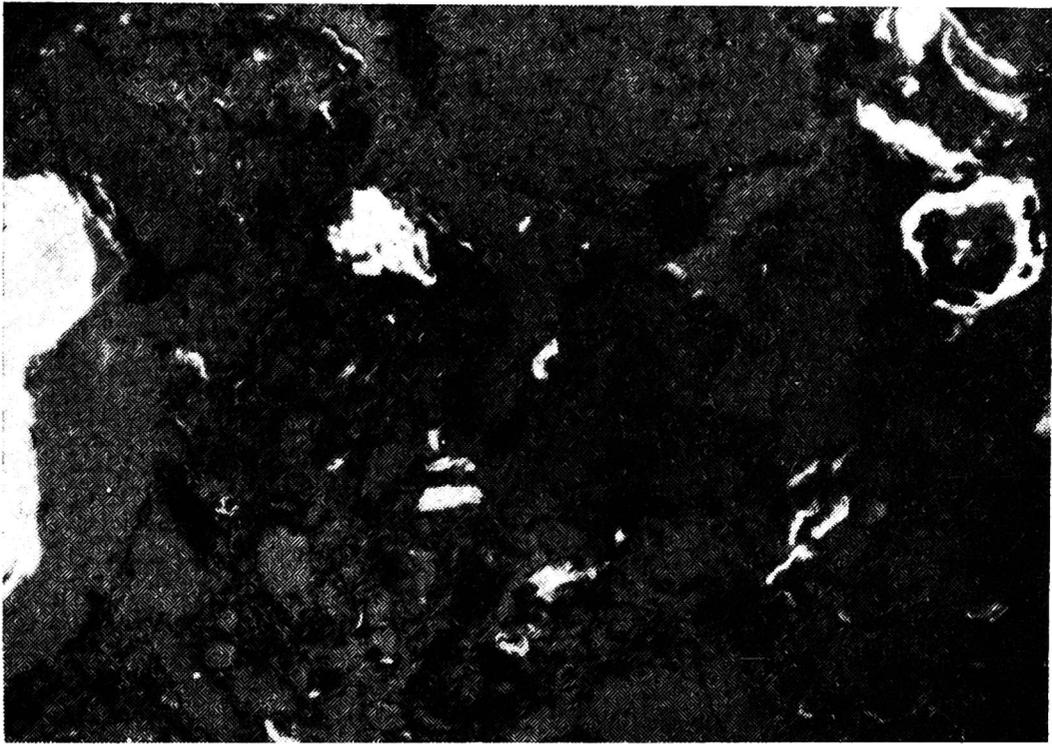


Abb. 2. Wurzelreste in Mull, A_h , schwach pseudovergleyte Braunerde (2 cm Tiefe. — Technische Daten wie Abb. 1). Links ein größerer Wurzelrest, Mitte oben ein Gewebestück von Wurzelkorkgewebe, außerdem kleine Zellreste innerhalb des mineralischen Gefüges, überwiegend von Wurzelkork (Fluoreszenzfarbe: grünlich-blau).

Abb. 3 und 4 handelt es sich um Wurzelhaare einer frischen Wurzel). Zu den fluoreszierenden organischen Gemengteilen gehören auch viele hyaline *Pilzhypfen* (Fluoreszenzfarben blau oder gelb).

Auffallend sind in manchen Böden, gehäuft in feuchten bis nassen organischen Auflagen, wenigzellige abgeschlossene Körper, die wahrscheinlich Pilzsporen sind. Für ihre Identifizierung müßte am Streupräparat gearbeitet werden. Nach Strugger [25] lassen sich an Bodensuspensionen leicht Algen infolge der roten Primärfluoreszenz des Chlorophylls erkennen.

Bei der Untersuchung des H_2 -Horizonts eines Buchen-Rohhumus im Streupräparat (vgl. Babel, 1965) zeigten etwa 90% der nicht natriumhypochloritlöslichen Teile Fluoreszenz (Tab. 1). Die Deutung ihrer histologischen Herkunft wurde durch ihre Fluoreszenzeigenschaften erleichtert.

Organische Gemengteile, deren Substanz in Lösung und weiter als über μ -Distanzen verlagert worden sind, wie sie manchmal in Feuchtmoder, öfter in Torfen und B_h -Horizonten von Podsolen auftreten, fluoreszieren nicht. Die Deutung ihrer histologischen Herkunft wurde durch ihre Fluoreszenzeigenschaften erleichtert.

Auftreten von umschriebenen organischen Gemengteilen, die im Zustand der frischen Pflanze nicht fluoreszieren, wurde nie mit Sicherheit beobachtet. Die Blattbräunungstoffe [6] fluoreszieren nicht.

In Fichten-Nadeln der oberen F-Schicht wurden allerdings im Assimilationsparenchym, wo es im Hellfeld nur schwach gefärbt ist, oft Partien von blaßgelber,

selten von rötlicher, schwacher bis mittlerer Fluoreszenz gefunden. Diese sind vielleicht Resten der Zellinhaltsstoffe zuzuordnen und nicht — wie gewöhnlich — den Zellwänden. Ob es Zersetzungsneubildungen sind, wäre noch zu untersuchen.

Bei Fichten- und anderen Nadelresten der oberen F-Schicht wurden außerdem im Vestopal *diffuse Fluoreszenzfärbungen* gefunden, die wahr-

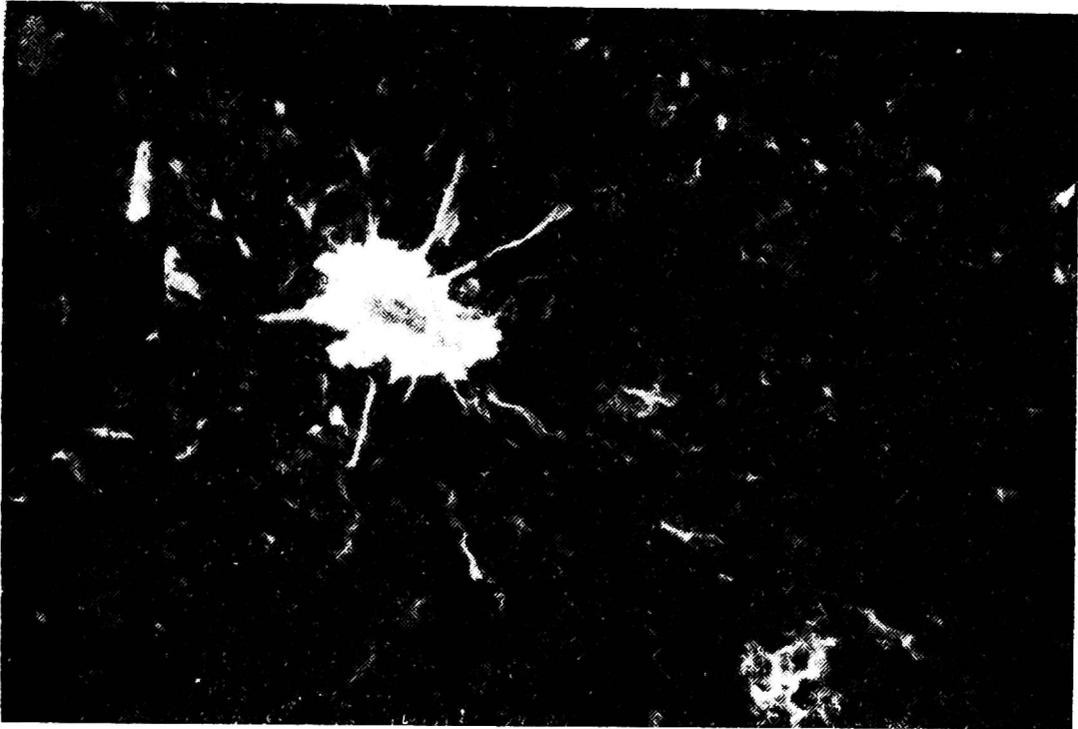


Abb. 3. Deformierter Wurzelquerschnitt mit Wurzelhaaren (von *Silene acaulis*?) in der H-Schicht von grauer alpiner Polsterreidsina. (5 cm Tiefe. — Technische Daten wie Abb. 1). Die Wurzelhaare durchziehen das Losungsgefüge, welches an fluoreszierenden Teilen sonst nur noch sehr wenige bläuliche Zellwandreste enthält. Fluoreszenzfarben: Rindenparenchym der Wurzel und Wurzelhaare grünlich-gelb, Zentralzylinder weiß und bläulichgrün.

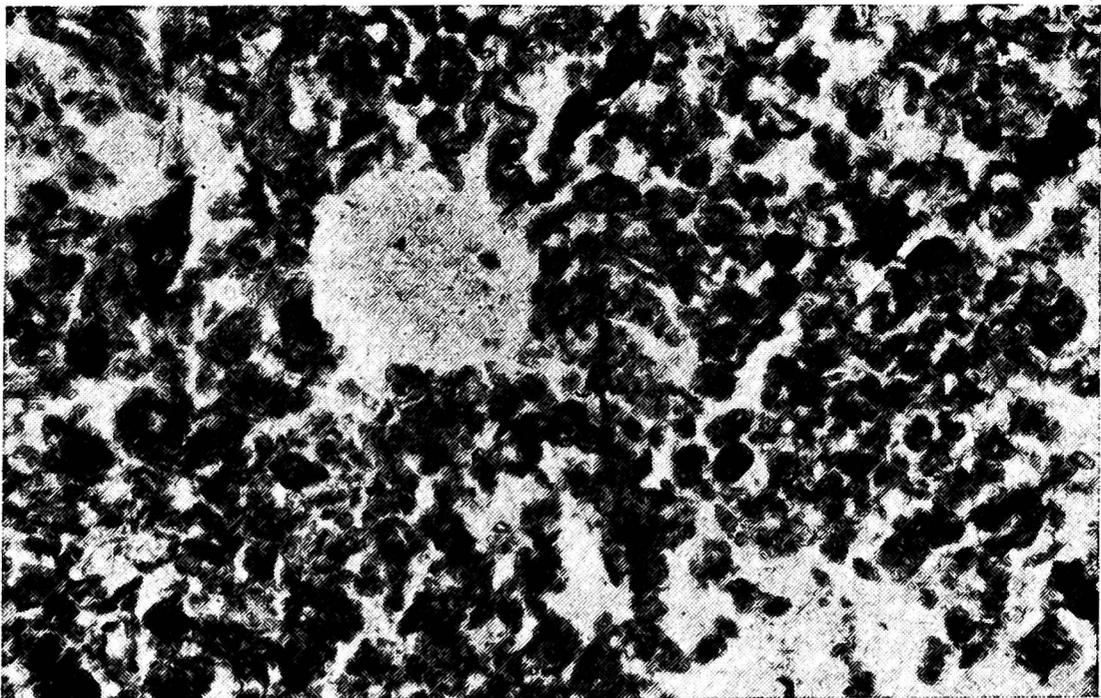


Abb. 4. Wie Abb. 3. Durchlicht-Hellfeld. Die Wurzel ist undeutlich, die Wurzelhaare innerhalb des Losungsgefüges sind nicht zu erkennen.

scheinlich nicht durch Polymerisationsstörungen des Vestopals verursacht sind (vgl. Abschn. III), sondern durch Eigenfluoreszenz von im Vestopal gelösten Humusstoffen. In manchen Fällen ist freilich kaum zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu entscheiden. Die Erscheinung tritt in morphologisch gut erhaltenen Nadelresten auf mit im Hellfeld-Durchlicht mittlerer Färbung des Assimilationsparenchyms durch Blattbräunungstoffe. Sie wird in den Hohlräumen im Assimilationsparenchym (Interzellularen) beobachtet. Es handelt sich um schwache bis ziemlich starke

Tabelle 1. Fluoreszenz der in Natriumhypochlorit unlöslichen Teile aus dem H₂-Horizont eines Buchenrohhumus [4] und aus Fluoreszenz und Struktur abgeleitete Deutung ihrer histologischen Herkunft

Fluoreszenz	Anteil an der Probe (%)	Struktur	Deutung
Kräftig weißblau	15	langgestreckte Zellen, einzeln oder in kleinen Verbänden, z. T. Spiralverstärkungen	meist Sklerenchym und Xylem-Reste (Lignin-Fluoreszenz!)
Kräftig weißblau	10	parenchymatische oder prosenchymatische, auch kollenchymatische Zellen, meist in kleinen Verbänden	wenigstens z. T. aus Wurzeln
Kräftig weißblau	2	feinzerteilte Gewebereste	wie vor, wohl nach Sekundärfraß
Kräftig weißblau	selten	Doppelhaare von Buchenblättern	
Schwach bläulich	selten	Spaltöffnungszellen von Buchenblättern	
Schwach bläulich	25	sehr feine Gewebe- oder Zellstücke	aus verschiedenen Geweben (meist von Wurzeln?), nach Sekundärfraß
Schwach gelblich	25	wie vorher	wie vor (mehr von Blättern), oft von Epidermen und Cuticulen (?)
Schwach bis mittel gelblich	10	kleine und mittelgrosse Gewebestücke aus isodiametrischen Zellen	
Kräftig gelb	2	größere Zellwandreste	(Epidermen?)
Kräftig gelb	selten	Pollen	
Nicht fluoreszierend	10	opake Teile	

rötliche Fluoreszenz (Abb. 1). Dieses Verhalten wurde in den meisten Fichten-Modern in verschieden starker Ausprägung gefunden, aber stets nur bei einem kleinen Teil der Nadeln. Jene konnten im Hellfeld-Durchlicht morphologisch von denen ohne diese Rotfluoreszenz nicht unterschieden werden. In tieferen Teilen der Profile wurde die Erscheinung nicht gefunden. Es handelt sich offenbar um Substanzen, die während der Nadelzersetzung nur relativ kurzlebig auftreten. Vielleicht entsprechen sie fluoreszierenden Humusfraktionen, welche als Vorstufen angesehen werden [30]. Eingehende Untersuchungen, insbesondere wieder darüber, ob es sich um Zersetzungsneubildungen handelt, auch ob Chlorophyll-Derivate, Harze oder Gerbstoffe eine Rolle spielen, stehen noch aus.

Über das intermediäre Auftreten von fluoreszierenden Stoffen bei der Zersetzung von Wurzeln, die ebenfalls in Dünnschliffen untersucht wurden, berichtet Jabłoński [13].

V. EIGENFLUORESZENZ ORGANISCHER GEMENGTEILE ALS HILFE BEI DER UNTERSUCHUNG BODENDYNAMISCHER PROZESSE

A. VERBREITUNG FLUORESZIERENDER TEILE IN VERSCHIEDENEN BODENTYPEN UND HUMUSFORMEN

Die Verbreitung der im vorigen Abschnitt besprochenen fluoreszierenden Gemengteile steht im Zusammenhang mit dem *Bodentyp*, wie Tabelle 2 für fluoreszierende kleine Stücke von Geweberesten und für fluoreszierende Zellwandstücke zeigt.

In geringen Mengen oder vereinzelt treten diese Teile aber in allen humusbeeinflussten oder durchwurzelten Bodenhorizonten auf. (In Tab. 1 und 2 und in den folgenden Textangaben sind nur solche Bodenhorizonte berücksichtigt, in denen im Hellfeld höchstens geringe Mengen von organischer Feinsubstanz erkennbar sind, also F- und H-Horizonte nicht).

Unschärf sind dagegen die Beziehungen zwischen der Verbreitung beider Gruppen von Gemengteilen und der *Humusform*. Große Mengen der kleinen Gewebereste (Teile A) sind in Böden mit allen terrestrischen Humusformen gleich verbreitet, sie wurden in einem Drittel bis der Hälfte der Profile gefunden (untersucht wurden Mull, Moder, Rohhumus, mullartiger Moder (Kubiëna)); in Anmoor sind sie vielleicht seltener (große Mengen nur in 2 von 13 Profilen). Diese gleichmäßige Verbreitung überrascht: Wegen der völlig verschiedenartigen Einmischungs- und Zersetzungs Vorgänge waren gute Unterschiede erwartet worden. Offenbar wird im Moder die schwächere Einmischung von organischer Substanz in den A_h durch langsamere Zersetzung kompensiert.

Die Unschärfe kommt zum Teil aber auch daher, daß in der Auswertung auch tiefere Profilteile erfaßt wurden, welche bei der Ansprache der Humusform nicht berücksichtigt werden.

Tabelle 2. Auftreten von grossen Mengen fluoreszierender Gewebe- und Zellwandreste in Mineralbodenhorizonten verschiedener Bodentypen (alle Profile aus Mitteleuropa)

Bodentyp	<i>n</i>	A absolut (%)	a absolut (%)
Braunerde + Parabraunerde	26	12 (46)	3 (12)
Pseudogley + Stagnogley	8	3 (38)	3 (38)
Podsol	7	2 (29)	3 (43)
Rendsina + Pararendsina	14	1 (7)	0 (0)
Ranker	3	1 (33)	0 (0)
Gley	5	1 (20)	0 (0)
Anmoor	9	2 (22)	0 (0)

n — Zahl der untersuchten Profile, A — Zahl der Profile mit vielen fluoreszierenden kleinen Stücken von Geweberesten, a — Zahl der Profile mit vielen fluoreszierenden kleinen Zellwandresten.

Eine Differenzierung zwischen Mull, Moder und Rohhumus ergibt sich laut Tabelle 3, wenn man die Tiefe mit berücksichtigt: In Mull kommen große Mengen der Teile A nur in den oberen 8 cm vor, bei Rohhumus nur tiefer als 8 cm, Moder und mullartiger Moder (Kubiëna) nehmen eine Mittelstellung ein. (Die Verbreitung der Teile A als Merkmal bei der Feingliederung zwischen Mull und Moder zu verwenden, könnte in zukünftigen Arbeiten versucht werden).

Tabelle 3. Auftreten von grossen Mengen von fluoreszierenden Geweberesten in oder unter den wichtigsten terrestrischen Humusformen

Humusform	<i>n</i>	A	A
		0-8 cm	unter 8 cm
Mull	20	5	0
Moder	16	5	1
Rohhumus	4	0	2
Mullartiger Moder	7	2	1

n und A — siehe Tabelle 2.

Die Verbreitung kleiner Zellwandreste (Teile a) ist in Mull, Moder und Rohhumus ebenfalls gleichmäßig; große Mengen von ihnen fehlen aber in mullartigem Moder (7 Profile untersucht) und im Anmoor (13 Profile).

Eine voll befriedigende Deutung dieser Ergebnisse könnte erst nach Untersuchung ausgewählter Profilvereihe gegeben werden. Die weite Verbreitung der Teile a in Podsol, Pseudo- und Stagnogley ist aber zweifellos eine Folge der Hemmung der Zellulosezersetzung in diesen Böden; die Häufigkeit der Teile A in Braunerde und Parabraunerde ist wenigstens zum Teile eine Folge der guten Durchwurzelung dieser Böden. Die Unterschiede in der Tiefenfunktion der Teile A in den terrestrischen Humusformen sind ebenfalls mit verschiedenartiger Durchwurzelung zu

erklären: Unter Rohhumus treten öfters in mittleren Profilabschnitten nährstoffreichere und daher stärker durchwurzelte Horizonte auf, während die Feindurchwurzelung unter Mull in Tiefen unter 8 cm nie sehr hohe Dichten erreicht, (mineralische Grünlandböden wurden nicht untersucht).

B. ZERSETZUNG DER PFLANZENRESTE

Beim Absterben von Geweben können fluoreszierende Polyphenole aus der Vakuole mit Eiweißen des Plasmas reagieren; unter Umständen ändert sich dabei die Fluoreszenzfarbe [12, 15].

Über allgemeine Abnahme der Eigenfluoreszenz der Pflanzenreste im Laufe der Zersetzung wird von verschiedenen Seiten berichtet [1, 2, 13].

Morgenroth [18] fand Abnahme der Eigenfluoreszenz von Zooplankton bei Sauerstoffzutritt während der Zersetzung, nicht aber bei Fäulnis. Jacob (1964) beobachtete Abnahme im Laufe der Inkohlung.

Dafür sind drei Ursachen denkbar: Abbau der fluoreszierenden Stoffe (so beim Ligninabbau von Babel [2] nachgewiesen), Entfernung der fluoreszierenden Stoffe und — als Beobachtungsfehler — Absorption der Fluoreszenzstrahlung durch neugebildete gefärbte organische Stoffe. Die letzte Ursache ist zweifellos in vielen Fällen gegeben. Sie dürfte auch oft die Änderungen der beobachteten Fluoreszenzfarben bewirken.

So hat van Gijzel [7, 8] an fossilen Pollen und Jacob (1964) an fossilen Brennstoffen eine Rotverschiebung der Fluoreszenzfarben mit dem Alter festgestellt.

An Cuticulen und Cuticularschichten von Buchenblättern konnte nachgewiesen werden, daß, solange die Blattreste noch gut erkennbar sind, auch noch bei Blattresten aus der oberen H-Schicht, die blaue oder gelbe Fluoreszenz nicht wesentlich abnimmt, (Untersuchungen nach Behandlung mit Natriumhypochlorit).

C. ERHALTUNG DER ZELLULOSE

Wie durch ihre Doppelbrechung an Streupräparaten nachgewiesen, enthalten die meisten fluoreszierenden Teile Zellulose; Ausnahmen sind viele der oft vorkommenden cutinhaltigen Reste (Tabelle in Babel [4]). (Herkunft aus cutinhaltigen Gewebeteilen kann im eingedeckten Dünnschliff oft aufgrund der Morphologie ausgeschlossen werden.) — Auftreten zahlreicher fluoreszierender Teile in Schliffen, z. B. im H-Horizont von Moder (Abb. 5 und 6) kann also als Hinweis langer Erhaltung von Zellulose in diesen Profilen gewertet werden (vgl. [20]). (Die Fluoreszenz der Zellulosewände wird dabei von kleinen Mengen verschiedenartiger, im einzelnen nicht untersuchter Substanzen hervorgerufen, die offenbar bei der Zersetzung der Gewebe nicht entfernt werden).

D. VERLAGERUNGSVORGÄNGE

Fluoreszenz von aus der Lösung neugebildeten organischen Teilen, wie sie in Torfen und als Hüllen um die Quarzkörner in Podsol-B_n-Horizonten auftreten, wurde nie beobachtet. Fluoreszierende organische Teile sind, wie in Abschn. IV gezeigt wurde, praktisch immer Reste von Organismenstrukturen. Das Auftreten zahlreicher fluoreszierender Teile in mineralischen Bodenhorizonten (vgl. Tab. 3) bedeutet also, daß dort eine Verlagerung organischer Substanz in den Mineralboden in großem Umfang in fester Form verläuft.

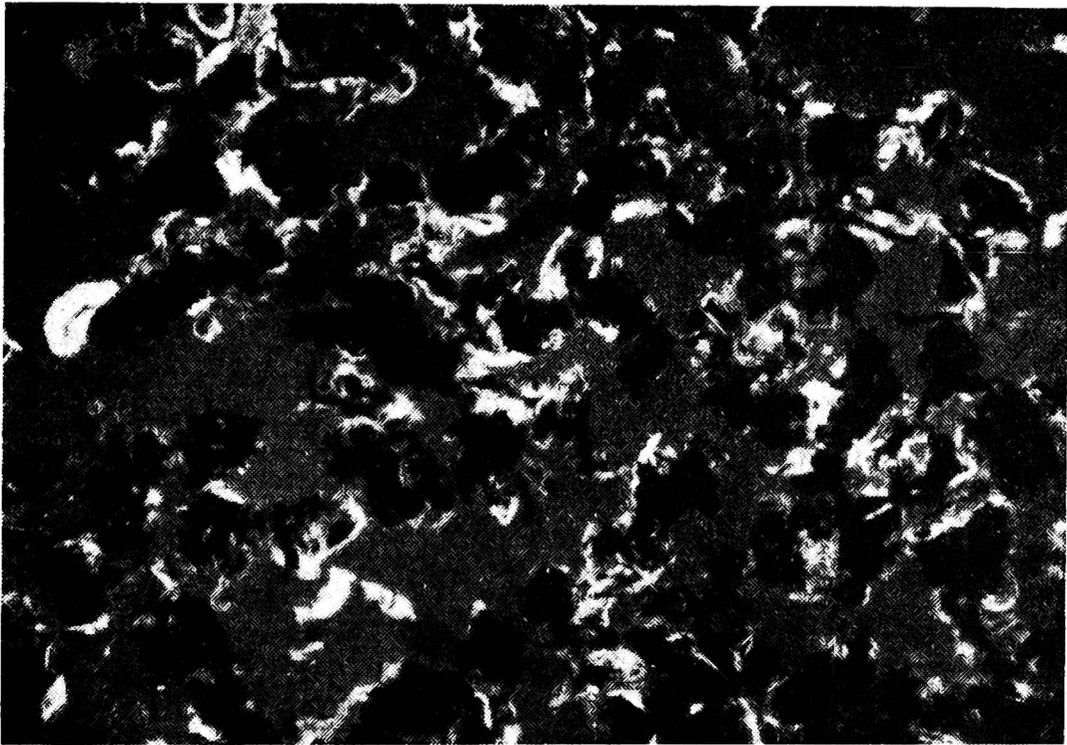


Abb. 5. Fluoreszierende Zellwandreste und sehr kleine Gewebereste im H₁-Horizont von Fichtenmoder (4 cm Tiefe. — Technische Daten wie Abb. 1). Die Aggregate sind vorwiegend Reste von Enchytraeen-Lösungen.

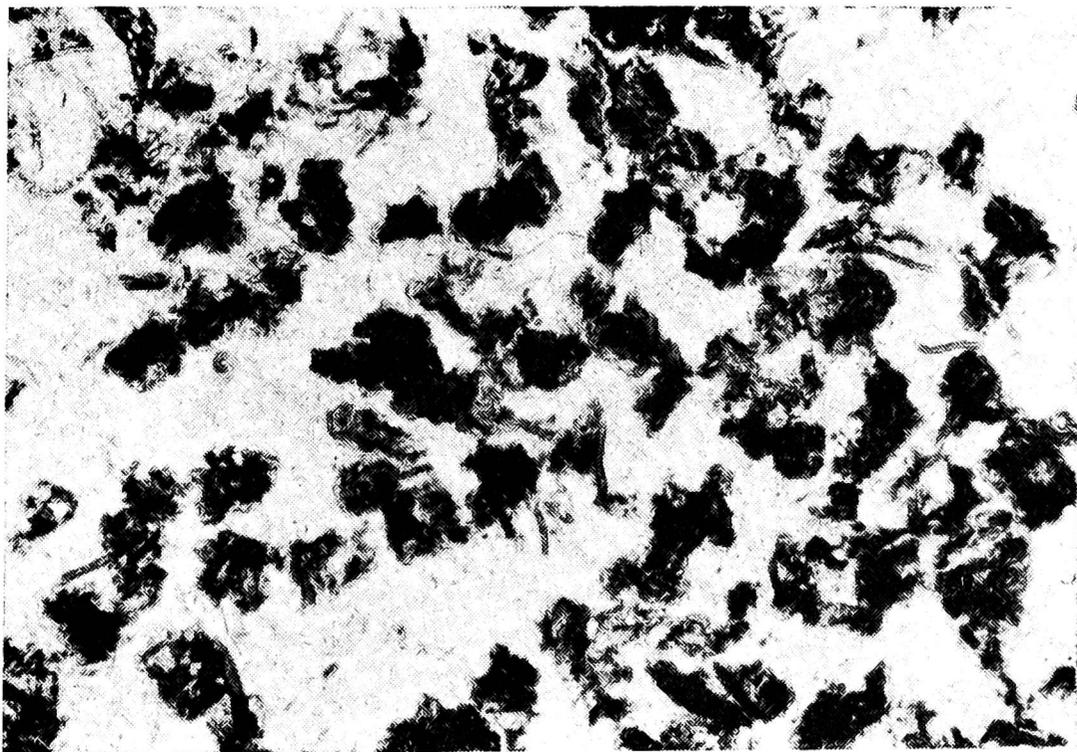


Abb. 6. Wie Abb. 5. Durchlicht-Hellfeld.

An einer Profilreihe auf Flugsand (von Mull bis Rohhumus) ließ sich die Verschiedenartigkeit der Einmischungsvorgänge organischer Substanzen in den Mineralboden bei den verschiedenen Humusformen zeigen: Im Mull (A_h , 3 cm Tiefe) traten gleiche Mengen von schwach gelb fluoreszierenden wie von mittelblau fluoreszierenden kleinen Gewebestücken in der Feinsubstanz auf. Beide Gemengteilgruppen waren im Hellfeld-Durchlicht wegen der starken Färbung des Materials nur in günstigen Situationen zu erkennen. Im Rohhumus (ebenfalls A_h , 3 cm Tiefe) traten nur mittelblau fluoreszierende Gewebestücke und zwar in etwas geringeren Mengen auf. Vergleichende Untersuchungen ergaben, daß die schwach gelb fluoreszierenden Teile überwiegend Blattreste, die blau fluoreszierenden Wurzelreste waren; (Gelbfluoreszenz der Blattreste teilweise durch Cutin, teilweise durch Blattbräunungsstoffe). Interessant war nun, daß ein drittes Humusprofil, das im Gelände zunächst als ein dem Mull nahestehender Übergang zwischen Mull und Moder angesehen worden war, in bezug auf diese Merkmale dem Rohhumus näher stand; dieser Befund entsprach dem Ergebnis der Untersuchung der Farben der Feinsubstanz im Hellfeld. (Diese und weitere zugehörige Profilreihen sollen in einer Arbeit über die Humusform Sandmull eingehender untersucht werden).

Wo fluoreszierende organische Teile zusammen mit mineralischer Feinsubstanz auftreten, können sie als Indikatoren für Vermischungs- und Verlagerungsvorgänge der mineralischen Substanz dienen. In den AP- und P-Horizonten von Pelosolen treten fluoreszierende Teile von Wurzelresten nur innerhalb der in Rissen oder Röhren eingeregelter Tonsubstanz auf, nicht im Innengefüge der Aggregate. Eine homogene Verteilung zeigen fluoreszierende Teile dagegen im A_h -Horizont von Mull. Dort wurden sie innerhalb der dichteren Gefügepartien in der gleichen Häufigkeit und Ausbildung gefunden wie in den hohlraumreichen Partien; (Beobachtungen an verschieden weit verdichteten Enchytraeenlosungsgefügen in Löß, siehe Babel [5]). Das zeigt, daß hier die Zeit, in der das ganze Bodenmaterial immer wieder aufgearbeitet und umstrukturiert wird, kürzer ist als die Zeit der Zersetzung dieser Zellwandreste. Ähnlich wie am obigen Beispiel des Pelosols können fluoreszierende Zellwandreste die Vorgänge der mechanischen Verwitterung bei Sandstein zeigen. Abb. 7 zeigt in 30 cm Tiefe die Hüllen aus Ton und Eisenoxiden um die Quarzkörner. Nur in den äußeren Partien dieser Hüllen oder in freiliegenden Feinsubstanzpartien sind fluoreszierende Zellwandreste enthalten. Die inneren Partien der Hüllen sind danach offenbar von der mechanischen Verwitterung noch nicht erfaßt worden. In 15 cm Tiefe sind nur in geringem Umfang noch Hüllen ohne fluoreszierende Teile zu finden. In 3 cm Tiefe ist die mineralische Feinsubstanz überwiegend von den Quarzkörnern gelöst und enthält in der für Mull typischen homogenen Verteilung fluoreszierende Zellwandreste (Abb. 8).

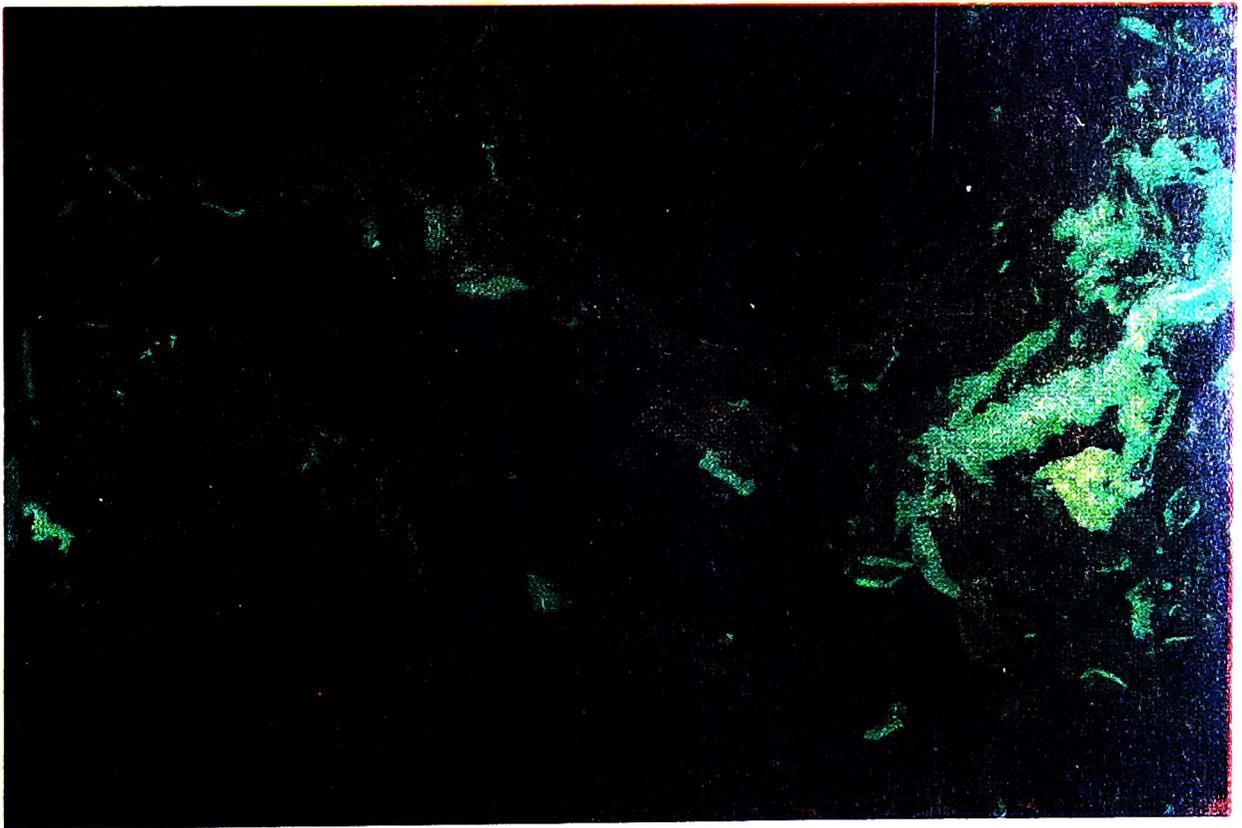


Abb. 7. Fluoreszierende Gewebe- und Zellwandreste im A_0B_0 -Horizont einer Sandmullbraunerde (30 cm Tiefe. — Auflichtfluoreszenz kombiniert mit Durchlicht-Dunkelfeld-Beleuchtung; sonst technische Daten wie Abb. 1). Die bläulich fluoreszierenden Teile stammen von Wurzeln. Die durch Dunkelfeld erhellen nicht fluoreszierenden mineralischen Teile erscheinen grünlichgelb bis rotbraun. Die inneren Partien der Feinsubstanzhüllen der Quarze enthalten keine fluoreszierenden Teile (besonders deutlich in der unteren Bildhälfte), sind also nicht in die aktuelle Bodendynamik einbezogen.

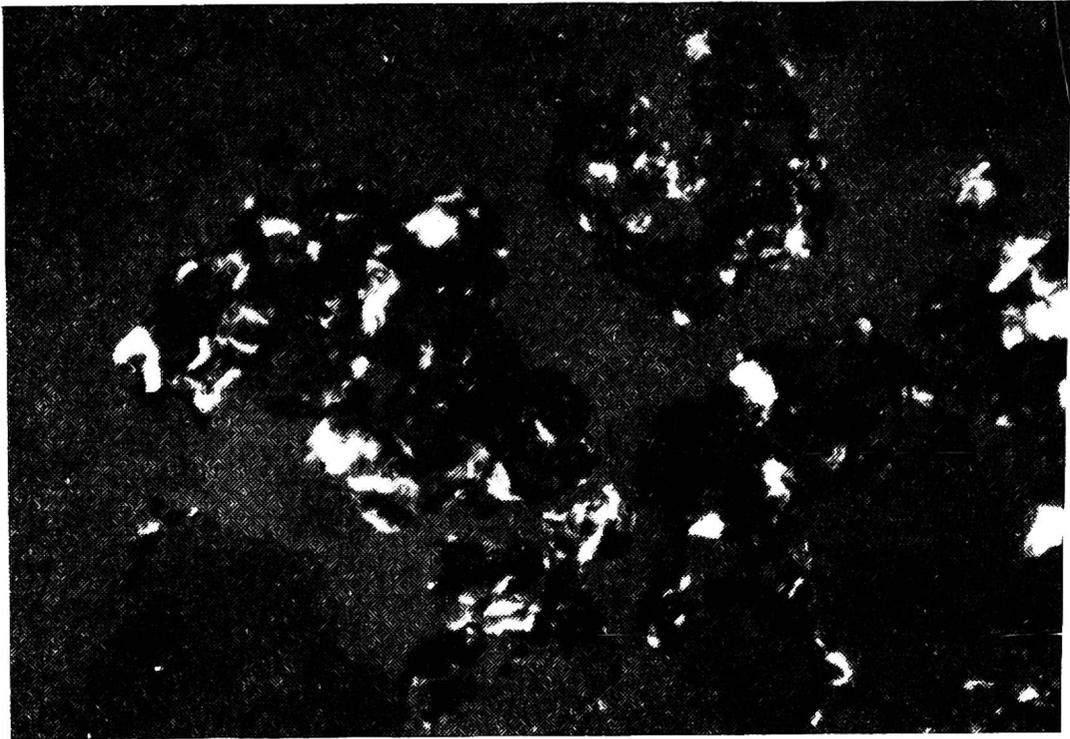


Abb. 8. Fluoreszierende Zellwandreste im A_h -Horizont einer Sandmullbraun-
erde (2 cm Tiefe, dasselbe Profil wie Abb. 7. — Technische Daten wie Abb. 1).
Die Quarzkörner haben keine oder nur locker aufliegende Hüllen, in die
fluoreszierende organische Teile homogen eingemengt sind.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Bodendünnschliffen ist ein gutes Hilfsmittel für die *Morphographie der organischen Substanz* des Bodens. Durch Eigenfluoreszenz werden viele Gewebe- und Zellwandreste sichtbar und identifizierbar. Es handelt sich dabei um Gewebereste von oberirdischen Teilen und Wurzeln, um Zellwandreste aus diesen Teilen, um hyaline Hyphen sowie um spezielle Bildungen wie Pilzsporen, seltener um Tierreste. Fluoreszenz von organischen Neubildungen der Humifizierung wird nur äußerst selten beobachtet. Die gemengteanalytische Untersuchung fluoreszierender Gemengteile kann beitragen zur Kenntnis von *Morphologie und Chemie der Zersetzung* von Pflanzenresten, insbesondere von Lignin- und Zelluloseabbau. Bei gefügeanalytischen Untersuchungen sind fluoreszierende Gemengteile als *Indikatoren* physikalischer Verwitterungsvorgänge sowie biologischer *Verlagerungs- und Vermischungsvorgänge* verwendbar.

In den ersten Abschnitten werden die botanischen und physikalisch-chemischen Grundlagen zur Fluoreszenzmikroskopie organischer Bodengemengteile behandelt sowie die Techniken der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung von Kunstharzdünnschliffen von Böden.

LITERATUR

1. Altemüller H.-J., Banse H. J., 1964. Die Bedeutung der Mikromorphologie hinsichtlich der organischen Düngung. In A. Jongerius (editor): Soil Micromorphology. Proc. 2nd Int. Working Meeting Arnhem, p. 467-476.
2. Babel U., 1964. Dünnschnittuntersuchungen über den Abbau lignifizierter Gewebe im Boden. In A. Jongerius (editor): Soil Micromorphology. Proc. 2nd Int. Working Meeting Arnhem, p. 15-22.
3. Babel U., 1964. Chemische Reaktionen an Bodendünnschliffen. Leitz-Mitteilungen 3, 12-14.
4. Babel U., 1965. Humuschemische Untersuchung eines Buchen-Rohhumus mittels mikroskopischer Methoden. Mitt. Ver. forstl. Standortskunde 15, 33-38.
5. Babel U., 1968. Enchytraeen-Lösungsgefüge in Löß. Geoderma 2, 57-63.
6. Babel U. (im Druck). Micromorphology of Soil Organic Matter. In J. Gieseking (editor): Monographs in Soil Science. Vol.: Soil Organic Matter. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
7. van Gijzel P., 1961. Autofluorescence of some fossil pollen and spores. Proc. K. Nederlandse Akademie Wetenschappen, Amsterdam, Sect. B 64, No. 1, p. 56-63.
8. van Gijzel P., 1966. Die Fluoreszenz-Photometrie von Mikrofossilien mit dem Zweistrahl-Mikroskopphotometer nach Berek. Leitz-Mitt. III/7, 206-214.
9. Goodwin R. H., 1953. Fluorescent substances in plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 4, 283-304.
10. Grehn J., Kornmann H., 1965. Kontrastfluoreszenz mit Opak-Illuminator. Leitz-Mitt. III/4, 108-111.
11. Haitinger M., 1959. Fluoreszenzmikroskopie. 2. Aufl., 168 p., Leipzig.
12. Hölzl J., Bancher, E., 1958. Fluoreszenzmikroskopische Studien an der Kartoffelknolle. 1. Mitt.: Die Primärfluoreszenz der Eiweißkristalle. Protoplasma 50, 297-302.
13. Jabłoński B., 1963. Die Anwendung von mikroskopischen Bodenschliffen bei Untersuchungen über die Zersetzung von Pflanzenresten im Boden (polnisch). Roczniki gleboznawcze 13, 1, 35-50.
14. Klein G., Linser H., 1930. Fluoreszenzanalytische Untersuchungen an Pflanzen. Österr. Bot. Z. 79, 125.
15. Krasavtsev O. A., 1962. Fluoreszenz von holzigen Pflanzenzellen im gefrorenen Zustand. Fiziol. Rastenij 9, 359-367.
16. Mader H., 1954. Untersuchungen an Korkmembranen. Planta 43, 163-181.
17. Melhuish F. M., 1968. A precise technique for measurement of roots and root distribution in soils. Ann. Bot. 32, 125, 15-22.
18. Morgenroth P., 1963. Fluoreszenzanalytische Untersuchungen tierischer organischer Substanzen in rezentem und fossilem Zustand. Mikroskopie 18, 193-209.
19. Pauli F. W., 1958. Fluorochrome adsorption studies on decomposing plant residues. Dissertation Univ. Oranje-Freistaat Potchefstroom.
20. Pauli F. W., 1960. The fluorescence microscope in humus research. Mikroskopie 15, 139-142.
21. Pauli F. W., 1961. Fluorochrome adsorption studies on decomposing plant residues. I: Decomposition studies. South Afr. J. Agric. Sci. 4, 123-134.
22. Perner E. S., 1957. Die Methoden der Fluoreszenzmikroskopie. In H. Freund (Hrsg.): Handbuch Mikr. Technik I/1, S. 357-431.
23. Price G. R., Schwartz S., 1956. Fluorescence Microscopy. In: G. Oster and A. W. Pollister: Physical techniques in biol. research, Vol. III, p. 91-148, New York.
24. Ruch F., Hengartner H., 1960. Quantitative Bestimmung der Lignin-Verteilung

- in der pflanzlichen Zellwand. Festschrift A. Frey-Wyssling, Beih. Zeitschr. d. Schweizerischen Forstvereins 30, 75-92.
25. Strugger S., 1949. Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie. Hannover.
 26. Tausch W., 1964. Grundlagen der Fluoreszenzmessung. Zeiß-Informationen 54, 111-116.
 27. Walter F., 1964. Über die Fluoreszenzmikroskopie mit markierten Proteinen. Leitz-Mitt. II/7, 207-215.
 28. Walter F., 1968. Eine Auflicht-Fluoreszenz-Einrichtung für die Routinediagnose. Leitz-Mitt. IV/6, 186-187.
 29. Yos D. A., 1956. Die Fluoreszenz differenzierten und nicht differenzierten Pflanzengewebes im nahen Ultraviolett. Proc. Iowa Acad. Sci. 63, 292-302.
 30. Ziechmann W., Pawelke G., 1959. Zur Methodik der Huminsäureuntersuchung. Landw. Forschung 12, 17-20.

Fluorescence microscopy in humus micromorphology

S u m m a r y

Fluorescent microscopic research of soil thin sections is a good assistance for the morphography of the organic substances of the soil. Many tissue and cell wall residues become visible and identifiable through primary fluorescence. Concerned are mostly tissue residues of surface parts and roots; cell wall residues of these parts; hyaline hyphae, as well as special structures such as fungus spores and more seldom, animal residues. Fluorescence of organic particles newly formed by humification is very seldom observed. Analytical research of fluorescent components can add to the knowledge of the morphological and chemical decomposition of plant residues, especially the lignin and cellulose decomposition. In fabric-analytical research, fluorescent components can be used as indicators of physical decay processes as well as biological displacement and mixing processes.

In the first parts, the botanical and physical-chemical bases of fluorescent microscopy of organic soil components were dealt with, as well as the techniques of fluorescent microscopic research of synthetic resin thin sections of soils.