

Präparieren von Süßwasser-Diatomeen aus dem Benthos

5

Inhaltsverzeichnis

1 Geräte.....	2
2 Chemikalien.....	3
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂), möglichst konzentriert.....	4
3 Probennahme.....	5
4 Vorproben.....	5
5 Methode 1: Oxidation der Probe mit konzentrierter Schwefelsäure und Kaliumpermanganat-Lösung (H ₂ SO ₄ /KMnO ₄).....	6
6 Methode 2: Oxidation mit NaOCl-Lösung (Chlorix®).....	9
7 Methode 3: Oxidation mit Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂), anschließende Behandlung mit konzentrierter Schwefelsäure/Kaliumpermanganat-Lösung (H ₂ SO ₄ /KMnO ₄).....	11
8 Einschluß.....	11
9 Diatomeen aus dem Aufwuchs auf höheren Wasserpflanzen.....	13
10 Plankton-Diatomeen.....	14

Das folgende Dokument beschreibt (so ausführlich wie möglich) meine Methode der

Verarbeitung von Proben des Süßwasser-Benthos zu Diatomeenschalen-Streupräparaten. Ziel

- 10 der Ausarbeitung ist, eine sichere und reproduzierbare Vorschrift zur Verfügung zu stellen, die die Anfertigung von kunstlosen Streupräparaten von Süßwasserdiatomeen beschreibt.

1 Geräte

- Bechergläser, groß (250 ml – 1 Liter)
- Bechergläser, klein
- 5 • Heizplatte
- Erlenmeyerkolben (25 ml – 100 ml)
- Uhrgläser (passend auf die Öffnungen der Erlenmeyerkolben)
- Kühler oder Luftkühler
- pH-Papier (0 pH - 14pH)
- 10 • Objektträger
- Deckgläser, 18 mm Durchmesser
- Probengefäß
- Kratzer oder Löffel
- Handzentrifuge und Zentrifugengläser
- 15 • Teesieb (aus Kunststoff)
- Schutzbrille und Laborkittel (100% Baumwolle)
- Petrischalen
- Glaspipette oder Glaskolbenpipette
- Deckglaspinzette, Präpariernadeln
- 20 • Glasstab
- Balsamfläschchen
- Planktonnetz (für Diatomeen aus den Plankton)
- Objektträgerschablone

2 Chemikalien

- Schwefelsäure, 100%ig
- 5 • Kaliumpermanganatlösung, gesättigt, wässrig
- Oxalsäurelösung, gesättigt, wässrig
- destilliertes oder entionisiertes Wasser
- evtl. bidestilliertes WasserWasserstoffperoxid (H_2O_2), möglichst konzentriert
- Soda (Waschsoda aus dem Drogeriemarkt)
- 10 • NaOH-Plätzchen
- Naphrax oder ein anders Eindeckmittel, Pleurax
- Brennspritus oder Ethanol
- Wasserstoffperoxid
- Natriumpyrophosphat
- 15 • Salzsäure
- Chlorix[®]

3 Probennahme

Bei der Probennahme sollte man darauf achten, daß man nicht zu viel Sand und Schluff mit
20 sammelt, diese mineralischen Bestandteile sind bei der späteren Aufarbeitung nur schwer und
unter großen Verlusten an Diatomeenschalen wieder durch Schlämmen und Sedimentieren zu
trennen.

Man kann die Probe jetzt schon unter dem Mikroskop betrachten und überprüfen, ob überhaupt genügend Diatomeen in der Probe vorhanden sind.

- 5 Man kratzt also vorsichtig von den Steinen der Uferbefestigung oder von den Holzpfeilen des Bootssteigs eine ausreichende Menge (etwa in der Größe einer Walnuß) des bräunlichen, schleimigen Belags ab. Alternativ kann man auch mit einer Zahnbürste den schleimigen Belag von Steinen ankratzen und mit destilliertem Wasser nachspülen.

4 Vorproben

10

- Als erstes muß überprüft werden, ob nicht Kalkverbindungen (Calciumcarbonat und/oder Calciumhydrogencarbonat) in der Probe vorhanden sind. Sind Ca^{2+} -Ionen vorhanden, so reagieren diese mit den Sulfat-Ionen der nachfolgenden Aufarbeitungsschritte zu unlöslichem Gips ($\text{CaSO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$), der aus der Probe so gut wie nicht mehr zu entfernen ist. Man tropft 15 also etwas (3 - 5 Tropfen) Salzsäure, konzentrierte Salzsäure ist vorteilhaft, zu der Probe und beobachtet, ob sich Kohlendioxyd-Blasen bilden. Ist das der Fall, so säuert man die Probe mit Salzsäure kräftig an (Kontrolle mit pH-Papier) und läßt einige Zeit stehen oder kocht die Probe kurz auf. (Vorsicht, es entweichen Salzsäuredämpfe, nicht küchentauglich.)
- 20 Die Probe muß danach mit destilliertem Wasser (entionisiertes Wasser ist ausreichend) salzsäurefrei gewaschen werden. Die Probe ist dann salzsäurefrei, wenn der pH-Wert sich im neutralen Bereich (Kontrolle mit pH-Papier) befindet. Durch Zentrifugieren mit der Handzentrifuge kann man diesen Verfahrensschritt beschleunigen.
- 25 Eine gesonderte Prüfung auf Chlorid-Ionen erübrigt sich, da die Salzsäure die einzige Säure in der Probe ist. Es genügt daher gründliches Auswaschen.

5 Methode 1: Oxidation der Probe mit konzentrierter Schwefelsäure und Kaliumpermanganat-Lösung

5 **(H₂SO₄/KMnO₄)**

Bei den folgenden Arbeitsschritten sollte die persönliche Schutzausrüstung unbedingt getragen werden: Schutzbrille und Laborkittel aus 100% Baumwolle.

10 Zu der möglichst konzentrierten Probe (salzsäurefrei, ca. 10 ml – 20 ml Volumen) gibt man mit der Glaspipette oder besser einer Glaskolbenpipette langsam ca. 10 ml konzentrierte
15 Schwefelsäure. (100%ig).

Dabei ist Vorsicht angeraten. Man läßt an besten die konzentrierte Schwefelsäure an der Innenwand des Gefäßes langsam in die Lösung herunterlaufen.

20 Die organische Substanz der Probe färbt sich schwarz, die Lösung erhitzt sich stark und kann zu sieden anfangen. Nach dem Abklingen der heftigen Reaktion kann man beginnen, langsam und vorsichtig eine gesättigte Lösung von Kaliumpermanganat in Wasser unter sanftem

Umschwenken des Gefäßes (vorteilhaft ist ein Erlenmeyerkolben) zuzutropfen. Die Kaliumpermanganatlösung wird anfangs augenblicklich entfärbt, später dauert es etwas länger. Dann sollte man beginnen, die Probe vorsichtig zu erhitzen. (Vorsicht: es sind Siedeverzüge möglich, Schutzbrille, Laborkittel!) Man sollte nicht zu stark erhitzen, um zu vermeiden, daß zu viel Wasser aus der Probe verdampft, es ist nicht erforderlich, daß die Probe sprudelnd kocht.

Der ganze Vorgang (Kaliumpermanganatlösung hinzutropfen, auf das Entfärben warten, eventuell kurz erhitzen, wieder Kaliumpermanganatlösung hinzutropfen, ...) kann sich etwas hinziehen: ein, zwei oder drei Tage Dauer für die Oxidation sind nicht ungewöhnlich.

Vor allem gegen das Ende der Oxidation kann es lange (Stunden ...) dauern, bis sich die Lösung wieder entfärbt.

Der Fortschritt der Oxidation kann auch unter dem Mikroskop kontrolliert werden. (Vorsicht: konzentrierte Schwefelsäure, Deckglas benutzen.)

15

Entfärbt sich die Lösung nicht mehr, so ist die Oxidation der organischen Bestandteile der Probe beendet und man hat einen Überschuß an Kaliumpermanganatlösung in der Probe vorliegen, der durch Zugabe eines Reduktionsmittels reduziert werden muß. Als Reduktionsmittel dient eine gesättigte wäßrige Lösung von Oxalsäure. Man tropft die Oxalsäurelösung so lange zu, bis sich die Probelösung mit den nun vom organischen Inhalt befreiten Diatomeenschalen entfärbt.

20

Es sind nun, neben den vom organischen Inhalt befreiten Diatomeenschalen folgende Ionen in der wässrigen Lösung vorhanden:

25

- Sulfat-Ionen
- Protonen (H_3O^+)
- Mangan(II)-Ionen

- evtl. noch freie Oxalsäure
- Ionen aus dem ursprünglichen Probenwasser

Man wäscht mit destilliertem Wasser neutral. Dabei kann die Diatomeensuspension ruhig
5 einige Zeit stehen bleiben, damit die Fremdionen genügend Zeit haben, aus den
Diatomeenschalen heraus zu diffundieren.

Da man hier entgegen der Regel: „Gib nie Wasser zu der Säure, sonst geschieht das
Ungeheure“ arbeitet, ist Vorsicht angeraten: man gießt ja gerade das destillierte Wasser zu der
10 konzentrierten Schwefelsäurelösung. Man läßt das destillierte Wasser am Besten am Rand des
Gefäßes vorsichtig in die Suspension laufen.

Nun folgt das Übliche: Umrühren oder umschwenken, absitzen lassen, dekantieren, neues
destilliertes Wasser hinzufügen usw.

15 Die abdekantierte Säurelösung kann man nach Neutralisation mit Sodalösung im großen
Becherglas (Vorsicht, schäumt!) in den Ausguß gießen.

Man spare nicht bei der Anzahl der Neutralisationsschritte, es werden ja nicht nur die
Schwefelsäure ausgewaschen, sondern auch die Mn^{2+} -Ionen, die im fertigen
20 Diatomeenstreupräparat unschöne Kristalle von Mangansulfat bilden: also lieber einmal mehr
als einmal weniger waschen, absitzen lassen und dekantieren.

Eine Handzentrifuge beschleunigt diese Vorgänge.

25 Den letzten Reinigungsschritt kann man auch mit bidestilliertem Wasser durchführen,
manche Vorschriften sprechen auch von „in Glasgefäßen destilliertem Wasser“.

Als Endprodukt liegt idealerweise eine Suspension von schneeweißen Diatomeenschalen in destilliertem Wasser vor.

- 5 Dieses ideale Ergebnis wird aber leider sehr oft durch einen mehr oder weniger hohen Anteil an Quarzkörnchen, Textilfäden und Schluffpartikeln in der Suspension getrübt. Findet man noch viele Zellskelette von *Pediastrum sp.* in der Probe, so können nochmalige Oxydationsschritte erforderlich werden.
- 10 Daher muß man sich, am besten nach einem Probeeinschluß, entscheiden: Sind die mineralischen Verunreinigungen tolerabel oder muß man die Probe schlämmen oder sieben und so versuchen, die Diatomeen von den Verunreinigungen zu trennen.

- Diese Vorgänge sind aber immer mit einem mehr oder weniger großen Verlust an gereinigten
- 15 Diatomeenschalen verbunden.

6 Methode 2: Oxidation mit NaOCl-Lösung (Chlorix®)

- In einem YouTube-Video (Link: https://www.youtube.com/watch?v=KOFd_EDAIeQ,
- 20 <https://www.youtube.com/watch?v=qoCtfBh0IOs> und <https://www.youtube.com/watch?v=7KqIYotvcDU>) ist die Aufarbeitung einer Diatomeen-Probe mit NaOCl-Lösung in Form einer handelsüblichen Haushaltsreiniger-Lösung beschreiben.

Da der in den Videos angegebene Haushaltsreiniger aus Japan hier nicht erhältlich ist, nimmt man Chlorix®. Für einen ersten orientierenden Versuch empfiehlt sich die Verwendung einer nicht allzu wertvollen Probe.

Bitte darauf achten, daß das Chlorix® aus der blauen Flasche verwendet wird, nur diese

- 5 Lösung enthält Natriumhypochlorit.

Die Probe wurde in Zentrifugengläschen gefüllt und mit der Handzentrifuge zentrifugiert, ca. eine Minute ist ausreichend. Es setzt sich unten ein etwa 1 cm³ großer Klumpen aus Probenmaterial ab. Mit einer Einmalpipette wird nun das Zentrifugengläschen mit Chlorix® gefüllt, die Lösung wird geschüttelt.

- 10 Bitte darauf achten, daß kein Tropfen der Lösung auf die Kleidung spritzt, Chlorix® hinterläßt auf der Kleidung häßliche Bleichflecken, die nicht mehr beseitigbar sind.

Die Probe wird ca. 20 Minuten stehen gelassen, danach wird abzentrifugiert. Wenn die Probe noch sehr farbig ist, sollte man sie noch länger abstehen lassen. Aber bitte dabei vorsichtig sein, Chlorix® -Lösung ist alkalisch und es besteht die Gefahr der Zerstörung der

- 15 Diatomeenschalen. Die richtige Zeit, das Optimum zwischen Reinigungswirkung und Zerstörung, findet man durch Probieren heraus.

Die Probe wird nun mit destilliertem Wasser neutral gewaschen: Aufschlämmen, abzentrifugieren, Überstand verwerfen, erneut mit destillierten Wasser waschen usw., bis die Probe neutral reagiert. Die Kontrolle erfolgt mit pH-Papier, dabei gilt die Regel: „Lieber

- 20 einmal mehr mit destilliertem Wasser waschen als einmal zu wenig.“

Ziel ist eine schneeweiße Diatomeen-Suspension, wie nach Methode 1.

7 Methode 3: Oxidation mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂), anschließende Behandlung mit konzentrierter Schwefelsäure/Kaliumpermanganat-Lösung (H₂SO₄/KMnO₄)

5

Vor der Behandlung mit Schwefelsäure/Kaliumpermanganat kann man optional eine Bleiche der Probe mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂) durchführen, in diesem Schritt wird ein Großteil des organischen Materials der Probe oxidiert. Der anschließende Schritt mit konzentrierter Schwefelsäure/Kaliumpermanganat-Lösung (H₂SO₄/KMnO₄) ist dann nicht mehr so zeitaufwendig.

10

8 Einschluß

Die Deckgläser, beispielsweise runde Deckgläser mit Durchmesser von 18 mm, werden folgendermaßen vorbereitet:

15

Die Deckgläser liegen in Alkohol (mehrmals gewechselt, Brennspiritus), um sie zu entfetten.

Sie werden abgetrocknet und auf einer Herdplatte, beispielsweise einer Glaskeramikplatte, ca. 20 Minuten geglüht. Manche Deckgläser verziehen sich bei dieser Prozedur.

20

Nach dem Abkühlen der Deckgläser wird die Diatomeen-Suspension vorsichtig aufgetropft. Sie sollte sich auf dem gesamten Deckglas spreiten. Ist dies nicht der Fall und verläuft der Tropfen der Diatomeen-Suspension nicht richtig, so besteht die Gefahr, daß die

Diatomeenschalen im Präparat zu dicht beieinander oder gar übereinander liegen, eine Bestimmung der Arten wird dadurch sehr erschwert.

Die Deckgläser werden an einem staubfreien Ort getrocknet. Der Ort sollte auch möglichst frei von Erschütterungen sein, damit sie die Diatomeenschalen nicht zusammenballen.

5 (Petrischale mit umgekehrt aufgesetztem Deckel, Objektträger als Abstandhalter)

Nachdem die Diatomeen-Suspension auf den Deckgläsern eingetrocknet (Dauer: ca. 24 Stunden) ist, erwärmt man die Deckgläser nochmals auf ca. 100 Grad Celsius auf der Heizplatte, um die letzten Feuchtigkeitsreste aus den feinen Hohlräumen der Schalen zu
10 vertreiben und um die Diatomeenschalen leicht auf der Deckglasoberfläche anzusintern.

Man gibt nun einen Tropfen Einschlußmittel, beispielsweise Naphrax, gelöst in Toluol, auf den zuvor gereinigten Objektträger und legt das Deckglas auf. Man läßt kurz einsinken, dann legt man den Objektträger auf die warme Heizplatte. Das Lösungsmittel beginnt zu
15 verdampfen, kurz vor Ende des Verdampfens nimmt man den Objektträger von der Heizplatte und läßt abkühlen. Die Lösungsmittelblasen unter dem Deckglas sollten verschwinden.

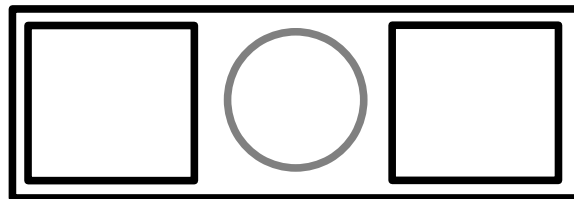
Nun sieht man, ob man mit der Größe des Einbettungsmitteltropfens richtig lag und kann gegebenenfalls beim nächsten Deckglas korrigieren.

20 Man kann auch noch einen Lackring anbringen.

Stellt man beim Durchmustern der Präparate fest, daß sehr viele Diatomeenschalen sich noch nicht getrennt haben, so kann man die Diatomeen-Suspension vorsichtig (ca. 10 Sekunden – 20 Sekunden schütteln) mit verdünnter NaOH (10 Gew.-%) behandeln, um die Schalen zu
25 trennen. Anschließend muß neutralisiert werden, am besten mit verdünnter Salzsäure.

Um anorganische, hydrophile Verunreinigungen zu entfernen, kann man die Probe mit einer Prise Natriumpyrophosphat schütteln. Anschließend wird das Natriumpyrophosphat durch mehrmaliges Waschen mit destilliertem Wasser entfernt.

- 5 Stellt man beim Durchmustern der Präparate fest, daß das Einschlußmittel in einige Diatomeenschalen nicht oder nicht vollständig eingedrungen ist, so muß man das Einschlußmittel mit dem Lösungsmittel stärker verdünnen: Naphrax mit Toluol oder Isopropanol und Pleurax mit Isopropanol.
- 10 Bitte das Etikettieren der Präparate nicht vergessen!



Ein Lackring vollendet das Präparat.

15

9 Diatomeen aus dem Aufwuchs auf höheren Wasserpflanzen

- Auf lebenden oder abgestorbenen Wasserpflanzen oder Pfählen wachsen Diatomeen und bilden manchmal einen braunen, schleimigen Belag. Die Diatomeen isoliert man durch kurzes Aufkochen des Pflanzenmaterials mit Salzsäure. (pH-Wert Kontrolle, die Lösung muß sauer sein.) Der Polysaccharid-Schleim, der die Diatomeen auf der Pflanzenoberfläche
- 20

festklebt, wird hydrolysiert und die Diatomeen schwimmen ab. Das ausgekochte Pflanzenmaterial siebt man ab (Kunststoffsieb, da Metallsiebe durch die Salzsäure angegriffen werden können, normales Haushaltssieb ist ausreichend, gründlich nachspülen.) und läßt die Diatomeen absitzen. Die Oxidation des Zellinhalts erfolgt nach den üblichen Methoden, wobei darauf zu achten ist, daß die Salzsäure durch Auswaschen vollständig entfernt wird.

10 Plankton-Diatomeen

- 10 Beim Fang von Diatomeen mit einem Planktonnetz sind die beim Planktonfischen üblichen Vorgehensweisen zu beachten: nicht zu schnell durch das Wasser ziehen, um einen Wasserstau vor der Netzöffnung zu vermeiden und auch vermeiden, zuviel Sand vom Grund aufzuwirbeln.

15

Rainer Teubner

Für ergänzende Hinweise und Korrekturvorschläge bin ich immer offen!

20

Stand: 2022-06-13