

Probenahme & Aufbereitung

Die Diatomeenuntersuchung folgt den Arbeitsschritten Vorarbeiten, Probenahme im Freiland und Aufbereitung im Labor. Das exakte Vorgehen (auch für Sonderfälle wie Talsperren) ist der aktuellen „Verfahrensanleitung für die ökologische Bewertung von Seen zur Umsetzung der EG-Wasserrahmenrichtlinie: Makrophyten und Phytobenthos (Phylib)“ zu entnehmen.

Im Folgenden ist eine Übersicht über die Arbeitsschritte bei der Probenahme und Aufbereitung benthischer Diatomeen:

Vorarbeiten*

- Festlegung der Tarnsektanzahl*
- Probenahmezeitpunkt*
- (Vor-)Auswahl der Transekte*

Probenahme im Freiland

- Auswahl der Probenahmebereiche innerhalb der Transekte
- Material für die Probenahme
- Durchführung der Probenahme:
 - von Hartsubstrat
 - von Sand/Weichsediment
 - Sonderfälle
- Fixierung der Diatomeenproben

Aufbereitung im Labor

- Präparation durch Säurebehandlung:
 - Material für die Aufbereitung
 - Probenvorbereitung
 - Kochen mit Salzsäure
 - Kochen mit Schwefelsäure
- Herstellung von Dauerpräparaten:
 - Material für Dauerpräparate
 - Auftropfen der Diatomeensuspension
 - Einbetten in Kunstharz (Naphrax)
 - Konservieren der Diatomeensuspension

Die mit * markierten Arbeitsschritte sind durch die Makrophytenuntersuchung vorgegeben. Sie werden vom Bearbeiter der Makrophytenkartierung bzw. in Zusammenarbeit mit diesem durchgeführt (vgl. 3S.2.2.1.20 im Abschnitt Makrophyten).

Die einzelnen Arbeitsschritte der Diatomeenuntersuchung können zeitlich entkoppelt erfolgen. Daher ist auf eine sorgfältige Beschriftung zu achten, die auch später eine eindeutige Zuordnung von Probengefäß, Diatomeensuspension und Dauerpräparat ermöglicht. Die

Beschriftung sollte jeweils die folgenden Informationen enthalten:

- Codierung (eindeutige Kennung, die den Bezug zu allen Begleitinformationen sowie der präparierten Probe herstellt)
- Gewässer (eindeutige Kennung)
- Probestelle/Transekt (eindeutige Kennung)
- Beprobtes Substrat
- Datum der Probenahme
- Probenehmer (auf dem Probengefäß) bzw. präparierendes Labor/Bearbeiter (auf der Diatomeensuspension) bzw. taxonomischer Bearbeiter (auf dem Dauerpräparat)

Probenahme im Freiland

Benthische Diatomeen werden gleichzeitig mit den Makrophyten bei einer einmaligen Probenahme zur Hauptvegetationszeit der Makrophyten zwischen Anfang Juli bis Mitte August erfasst. Die Diatomeenproben werden jeweils an den durch die Makrophytenuntersuchung vorgegebenen Transekten entnommen und für die Weiterbehandlung im Labor aufbewahrt.

Auswahl der Probenahmebereiche innerhalb der Transekte

Die Diatomeenprobe wird als **Mischprobe aus mindestens fünf Einzelproben** gesammelt, die möglichst weit über den bei der Makrophytenuntersuchung kartierten Uferabschnitt verteilt sind. Die Einzelproben werden im Freiwasserbereich entnommen, nicht innerhalb dichter Makrophytenbestände.

Es sind Probenahmebereiche auszuwählen, die **stabile hydrologische Bedingungen** aufweisen und in den der Probenahme vorausgegangen ca. vier Wochen ungestörte Verhältnisse für das Diatomeenwachstum geboten haben.

Der beprobte **Tiefenbereich** sollte zwischen 0,3 m und 1 m Wassertiefe liegen. Flachere Bereiche sind zu vermeiden, da hier Wellenschlag zu instabilen hydrologischen Verhältnissen und aerischem Einfluss führen kann.

Bei der Probenahme ist das **standorttypische Bodensubstrat in repräsentativen Anteilen** zu berücksichtigen. Bevorzugt werden natürliche Hartsubstrate (mittelgroße bis große Steine) besammelt, die unter normalen hydrologischen Bedingungen keiner Umlagerung unterworfen sind.

Material für die Probenahme

- Topographische Karten 1:25000 bzw. 1:50000
- Feldprotokolle ([Diatomeen](#), [Diatomen in Talsperren](#)) und Bleistifte
- Exemplar der Verfahrensanleitung
- Wathose
- Weithalsflaschen oder -gläschen

- Einige Gefrierbeutel
- Vorgefertigte Etiketten oder wasserfester Stift zur Beschriftung der Probengefäße
- Teelöffel, Spatel, Zahnbürsten o.ä.
- Ethanol 96%
- Fotoausrüstung
- ggf. Sicherheitsausrüstung

Durchführung der Probenahme

Die Bewuchsdichte des Bodensubstrats kann in verschiedenen Gewässertypen sehr unterschiedlich sein. Dichter Diatomeenaufwuchs bildet gut sichtbare braune, locker flockige oder gelee-artige Strukturen. Makroskopisch nicht erkennbarer Bewuchs kann durch Betasten der Substratoberfläche erfühlt werden.

Bei jeder Probenahme muss eine relativ große Menge an Diatomeenaufwuchs gewonnen werden. Nach Absetzen im Probengefäß sollten **mindestens 5 ml Diatomeensediment** vorhanden sein.

Die Probenahme wird auf dem Feldprotokoll dokumentiert. Eine fotografische Dokumentation der gewählten Probenahmebereiche und des bei der Beprobung von Weichsedimenten entnommenem Diatomeenaufwuchses ist hilfreich.

Probenahme von Hartsubstrat: Mindestens fünf mittelgroße bis große Steine werden vorsichtig in ihrer ursprünglichen Lage entnommen. Der Aufwuchs der Steinoberseite wird abgekratzt und in ein beschriftetes Weithalsprobengefäß überführt. Zum Abkratzen eignen sich Teelöffel, Spatel oder Zahnbürsten (aufgrund der hohen Gefahr von Verunreinigungen sind die Zahnbürsten nur einmalig zu verwenden oder zwischen zwei Proben gründlich in einem Ultraschallbad zu reinigen).

Probenahme von Sand/Weichsediment: Die Probenahme von Weichsubstrat gestaltet sich oft schwierig. Es sollte möglichst nur die oberste Schicht entnommen werden, da diese den Diatomeenaufwuchs enthält. Gelangt viel Sediment mit in die Probe, kann der Zeitbedarf für die Aufbereitung ansteigen und in der Probe verbleibende Sedimentpartikel können die mikroskopische Auswertung erschweren.

Es existieren verschiedene Verfahren, aus denen das für die Probestelle passende ausgewählt wird:

Standardmethode Sand/Weichsediment

- die obersten Millimeter Bodensubstrat eines ungestörten Bereichs vorsichtig mit dem Löffel abheben
- in ein beschriftetes Weithalsprobengefäß überführen

Besammlung mit der Hand

- bei gut entwickeltem, makroskopisch erkennbarem Diatomeenaufwuchs: braune, puddingartige oder locker flockige, voluminöse Struktur

- Hand horizontal auf das Substrat gleiten lassen
- mit einer scherenartigen Schließbewegung von Mittelfinger und Ringfinger den Diatomeenaufwuchs auf die Handfläche bringen und aus dem Wasser heben
- in ein beschriftetes Weithalsprobengefäß überführen

Beprobung mit Saugvorrichtung

- Diatomeenaufwuchs mit einer großen Spritze (Infusionsspritze) absaugen
- diese kann ggf. mit einem aufgesetzten Schlauch verlängert werden
- in ein beschriftetes Weithalsprobengefäß überführen

Beprobung mit Boot und Sedimentstechrohr

- geeignet, wenn eine Probenahme aus Tiefen > 1 m erforderlich ist (z.B. vor geschlossenem Röhrichtbestand)
- vom gewonnenen Substrat werden nur die obersten Millimeter benötigt
- mit einer Saugvorrichtung (s. o.) entnehmen
- in ein beschriftetes Weithalsprobengefäß überführen

Sonderfälle

Probenahme von Röhricht: Wenn an einem Uferabschnitt keine Probenahme von Bodensubstrat möglich ist oder zu erwarten ist, dass die vom Bodensubstrat gewonnene Diatomeenprobe keine gesicherte Bewertung ergibt, sollte zur Sicherheit eine Aufwuchsprobe von Röhricht entnommen werden. Hierzu werden an der Röhricht-Freiwasser-Kontaktzone ca. 10 senkrecht stehende, abgestorbene Röhrichthalme des Vorjahres mit gut entwickeltem Diatomeenaufwuchs ca. 30 cm unterhalb des Wasserspiegels abgeschnitten und in einen Gefrierbeutel überführt. Im Gefrierbeutel werden die Halme gegeneinander abgerieben und der halbflüssige Brei in das Probenahmegefäß überführt. Die Röhrichthalme werden verworfen.

Probenahme in Talsperren: Aufgrund der in Talsperren auftretenden Stauspiegelschwankungen muss bei der Wahl der Probenahmebereiche ggf. die Probenahmetiefe jeweils so angepasst werden, dass die Diatomeenprobe aus einem dauerhaft überfluteten Tiefenbereich mit ausreichender Lichtzufuhr stammt und in den vier Wochen vor der Probenahme immer mindestens 30 cm Wasserbedeckung aufwies. Ein Fragebogen, der zeitnah vor der Probenahme mit dem zuständigen Staumeister besprochen werden sollte, hilft bei der Wahl des Tiefenbereichs.

Fixierung der Diatomeenproben

Die Fixierung der Proben erfolgt durch die Zugabe von Ethanol. Die Ethanol-Konzentration in der Diatomeenprobe sollte bei 60% liegen.

Aufbereitung im Labor

Für die Aufbereitung der Diatomeenproben müssen ca. 12 Tage (inklusive Ruhezeiten)

veranschlagt werden. Der Diatomeenaufwuchs von Bodensubstrat wird am besten durch die Oxidation (z. B. mit starken Säuren oder Wasserstoffperoxid) gereinigt. Beim Kochen mit Salz- bzw. Schwefelsäure oder Wasserstoffperoxid werden die organischen Bestandteile der Diatomeenproben entfernt, so dass für die mikroskopische Analyse nur die Kieselsäureschalen zurückbleiben. Die Aufbereitung mit Salz- und Schwefelsäure wird hier empfohlen, da das PHYLIB-Verfahren auf Grundlage dieser Präparationsmethode entwickelt und geeicht wurde und ein hoher Reinheitsgrad der Präparate resultiert. Alternativ kann die Aufbereitung mit Wasserstoffperoxid (siehe unten) durchgeführt werden. Nach der Herstellung von Dauerpräparaten sind die Proben unbegrenzt haltbar und können am Lichtmikroskop ausgewertet werden.

Bei allen Arbeitsschritten der Aufbereitung muss sehr sauber und sorgfältig gearbeitet werden. **Alle Arbeitsgeräte (z. B. Becherzange, Siedestäbchen, Sieb, Uhrgläschen, Pipetten) sind nach Kontakt mit einer Probe gut in oder unter Leitungswasser zu reinigen**, um zu verhindern, dass Diatomeenmaterial zwischen verschiedenen Proben verschleppt wird.

Bei der Säurebehandlung und beim Herstellen der Dauerpräparate entstehen giftige Gase. Die Arbeitsschritte sind **unter einem leistungsfähigen säurebeständigen Abzug mit der gebotenen Vorsicht unter Einhaltung der Arbeitsschutzmaßnahmen durchzuführen. Schutzkleidung und Augenschutz sind obligatorisch.**

Präparation durch Säurebehandlung

Die Säurebehandlung umfasst zwei Kochvorgänge mit anschließendem Waschen der Proben:

1. Kochvorgang

mit verdünnter Salzsäure
(Dauer 30 Minuten)

Waschen und Absedimentieren der Proben
(4-mal, Sedimentationszeit je 24 Stunden)

2. Kochvorgang

mit konzentrierter Schwefelsäure
oder Wasserstoffperoxid
(20 Minuten bis zu 8 Stunden)

Waschen und Absedimentieren der Proben
(ca. 8-mal, Sedimentationszeit je 24 Stunden,
letzter Waschvorgang mit destilliertem Wasser)

Durch das Kochen mit Salzsäure werden Karbonate gelöst, die Stielchen und Gallerten der Diatomeen aufgelöst und die Diatomeenschalen vom Substrat getrennt. Zudem wird eine Gips-Bildung bei der später folgenden Schwefelsäurebehandlung vermieden. Das Kochen mit Schwefelsäure beseitigt die organischen Bestandteile.

Material für die Aufbereitung

Chemikalien

- Salzsäure 25% z. A.
- Schwefelsäure 95-97% z. A.
- Kaliumnitrat z. A.

Weitere Ausstattung

- Abzug
- Heizplatte
- Schutzkleidung (Laborkittel, Brille, säurebeständige Laborhandschuhe)
- Bechergläser (hohe Form; Fassungsvermögen mindestens 100 ml)
- Uhrgläser mit Durchmesser entsprechend den Bechergläsern
- Becherglaszange, Siedestäbchen
- ggf. Mörser und Pistille zum Zerreiben des Kaliumnitrats
- Spatel
- Kleines Kunststoffsieb mit Durchmesser entsprechend den Bechergläsern
- Universal-Indikatorpapier zur pH-Wert-Bestimmung
- Aqua dest.
- Spritzflasche
- Schraubdeckelgläschen mit Dichtung (Volumen ca. 20 ml)
- Etiketten

Probenvorbereitung

- Bechergläser mit Bleistift beschriften
- Bei einem hohen Wasseranteil die Proben zunächst 24 Stunden absetzen lassen und dann vorsichtig abdekantieren (alternativ können die Proben bis auf eine geringe Wassermenge eingedampft werden)
- Proben im Probegefäß gut aufschütteln und etwa 20 ml des Materials in das Becherglas überführen
- **Ein Teil jeder Probe wird als Rückstellprobe zurückbehalten.** Dazu wird beim Überführen des Materials in das Becherglas ein Rest (Rückstellprobe) im beschrifteten Probengefäß belassen

Kochen mit Salzsäure

- Probe mit 20 bis 40 ml verdünnter Salzsäure (25%) versetzen (Vorsicht: starke Schaumentwicklung bei stark kalkhaltigen Proben, daher die Säure schrittweise in kleinen Mengen zugeben)
- Becherglas mit einem Uhrglas abdecken und ggf. mit einem Siedestäbchen versehen
- Auf der Heizplatte bei 240 °C für 30 Minuten kochen (Vorsicht: bei hohem Sandanteil kann sich das Becherglas stark bewegen, Position ggf. mit Becherglaszange korrigieren)
- Probe erkalten lassen, grobe Reste durch ein Küchensieb absieben und Becherglas mit

Leitungswasser auffüllen

- Um Sand, Kies oder kleinere Steine zu entfernen wird die Probe stark aufgerührt und der diatomeenhaltige Überstand nach einer etwa einminütigen Sedimentationszeit vorsichtig abdekantiert (Sand und Steine sind dann zum Boden des Becherglases abgesunken, die leichteren Diatomeenschalen schwimmen noch oben)
- Waschvorgang: Probe auf etwa ein Drittel des Volumens vorsichtig abdekantieren und mit Leitungswasser auffüllen. Dieser Waschvorgang erfolgt insgesamt viermal. Die Sedimentationszeit zwischen den Waschvorgängen sollte 24 Stunden nicht unterschreiten.

(Alternativ kann die Probe zwischen den Waschvorgängen in einer Tischzentrifuge etwa zehn Minuten lang bei maximal 2000 Umdrehungen pro Minute (Upm) zentrifugiert und der Überstand etwa auf ein Drittel abdekantiert oder mit einer Wasserstrahlpumpe entfernt werden)

Kochen mit Schwefelsäure

- Probe durch Abdekantieren auf einen geringen Wasseranteil einengen und mit 20 bis 30 ml konzentrierter Schwefelsäure (95-97%) versetzen
- Becherglas mit einem Uhrglas abdecken und bei 240 °C auf der Heizplatte zum Kochen bringen
- In Abständen von etwa 20 Minuten mit dem Spatel eine Prise Kaliumnitrat zugeben bis sich die Probe entfärbt oder eine schwach gelbliche Farbe annimmt (bei einem hohen Anteil an organischem Material kann dies bis zu 8 Stunden dauern)
- Wenn das Probenvolumen zu gering wird etwas Leitungswasser mit der Spritzflasche zugeben
- Probe nach dem Farbumschlag weitere 20 Minuten auf der Heizplatte belassen
- Nach dem Abkühlen der Probe und dem Absetzen der Kieselalgen bilden diese einen weißen bis gräulichen Bodensatz
- Waschvorgang: Probe auf etwa ein Drittel des Volumens vorsichtig abdekantieren und mit Leitungswasser auffüllen (Vorsicht: Beim ersten Wässern kann es zu heftigen Reaktionen kommen). Die Sedimentationszeit zwischen den Waschvorgängen sollte 24 Stunden nicht unterschreiten. Dieser Waschvorgang erfolgt so lange, bis der Neutralpunkt erreicht ist (mit pH-Indikatorpapier prüfen, meist werden 8 Waschvorgänge benötigt). Das letzte Wässern der Probe sollte mit destilliertem Wasser erfolgen.
- Die gereinigte Probe im Becherglas durch Schütteln mischen und in ein beschriftetes Schraubdeckeldeckelglas überführen

Kochen mit Wasserstoffperoxid

Alternativ zur Oxidation mit Schwefelsäure und Kaliumnitrat kann auch Wasserstoffperoxid als Oxidationsmittel eingesetzt werden. **Vorsicht:** Der Reaktionsprozess kann sehr dynamisch verlaufen und erfordert Arbeitserfahrung und strenge Beaufsichtigung.

- Probe durch Abdekantieren auf einen geringen Wasseranteil einengen und mit 10 - 20 ml Wasserstoffperoxid versetzen
- Becherglas mit Inhalt langsam und vorsichtig auf der Heizplatte erhitzen bis

Gasentwicklung einsetzt, vorsichtig bis zum Kochen weiter erhitzen, Übersäumen verhindern

- Kochprozess ca. 15 - 30 Minuten fortsetzen, bis sich die Probe weiß bis grau entfärbt. Bei einem hohen Anteil organischer Substanzen kann der Kochvorgang bis zu einer Stunde dauern.
- Diatomeensuspension im Becherglas auf einer glatten, oxidationsbeständigen Arbeitsfläche weiter abkühlen lassen. Nach dem Abkühlen der Probe und dem Absetzen der Diatomeenschalen bilden diese einen weißen bis gräulichen Bodensatz.
- Anschließend werden die Proben zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen und der wässrige Überstand abzentrifugiert oder nach der Sedimentation des Diatomeenmaterials abdekantiert, um Reste des Wasserstoffperoxids zu entfernen. Die Sedimentationszeit zwischen Waschvorgängen sollte mindestens 24 Stunden betragen.
- Niederschlag im Zentrifugenglas bzw. Becherglas durch Zugabe von destilliertem Wasser und Schütteln gut durchmischen und in ein beschriftetes Gläschen überführen

Herstellen von Dauerpräparaten

Die Objektträgerpräparate entstehen durch Einbetten der eingetrockneten Diatomeensuspension in Kunstharz. Sie sind dauerhaft haltbar und können als Belegsammlung archiviert werden. Als Einbettmedium wird Naphrax¹ verwendet. Naphrax enthält gesundheitsschädliches Toluol, das beim Erhitzen entweicht, und sollte daher mit großer Vorsicht gehandhabt werden. Inzwischen ist Naphrax auch in Toluol-freier Form² erhältlich.

Die meisten Diatomeensuspensionen sind stark konzentriert und müssen verdünnt aufgetropft werden. Die optimale Diatomeendichte für eine sichere mikroskopische Bestimmung liegt vor, wenn die Diatomeenschalen im Dauerpräparat nicht übereinander liegen, keine Klumpen bilden und nicht von mineralischen Partikeln überdeckt werden.

¹Naphrax kann [hier](#) bezogen werden und wird vom englischen Hersteller ohne Zugabe von Toluol verschickt. Zur Verwendung muss nach Anleitung des Herstellers Toluol zugesetzt werden, wodurch eine dünnflüssige Konsistenz entsteht. Bei häufigem Gebrauch und/oder unzureichendem Verschluss wird Naphrax zähflüssig und muss durch erneute Zugabe von Toluol verdünnt werden.

² Toluol-freies Naphrax kann [hier](#) bezogen werden.

Material für die Dauerpräparate

- Deckgläser (runde Deckgläser mit 18 mm Durchmesser)
- Deckglaspinzette (oder rundgebogene Pinzette)
- Spülmittel
- Pipette(n)
- ggf. Uhrgläschen und Aqua dest.
- Objektträger

- Naphrax
- Bunsenbrenner oder Heizplatte
- Abzug
- Präparatekasten oder –mappe
- Etiketten
- Ethanol 96%
- Glycerin

Auftropfen der Diatomeensuspension

- Deckgläschen durch kurzes Eintauchen in stark spülmittelhaltige Lösung oder Alkohol reinigen
- Diatomeensuspension durch Schütteln des Schraubdeckelglases gut durchmischen
- Geringe Menge Diatomeensuspension mit einer sauberen Pipette entnehmen (aus dem oberen Bereich des Gläschens, da enthaltene Sedimentpartikel schneller nach unten absinken)
- Daraus ggf. Verdünnung herstellen: Diatomeensuspension in ein Uhrgläschen mit destilliertem Wasser (ca. 2 bis 5 ml) geben und mit der Pipette gut durchmischen
- Geringe Menge (der verdünnten) Diatomeensuspension (ca. 200 µl) mit der Pipette entnehmen und auf das Deckgläschen auftropfen (Tropfen dabei möglichst flach halten, um Konvektionen zu vermindern)
- An der Luft eintrocknen lassen (erschütterungsfrei und vor Staub geschützt)

Einbetten in Kunstharz (Naphrax)

- Objektträger durch kurzes Eintauchen in stark spülmittelhaltige Lösung reinigen und beschriften
- Mit einem Tropfen Naphrax versehen und das Deckglas mit der beschickten Seite nach unten mit einer Pinzette vorsichtig auflegen
- Um das Lösungsmittel auszutreiben über einem Bunsenbrenner bei kleiner Flamme erhitzen, bis es etwa fünf Sekunden lang Blasen wirft (Alternativ kann das Lösungsmittel bei 100°C auf einer Heizplatte ausgetrieben werden. Dabei das Deckgläschen mit der Pinzette mehrmals leicht andrücken, bis keine Blasen mehr entweichen)
- Sofort erschütterungsfrei auf einer glatten, kalten Oberfläche lagern und abkühlen lassen

Konservierung der Diatomeensuspension

- Nach Herstellung der Dauerpräparate kann die im Schraubdeckelglas verbliebene Diatomeensuspension durch Zugabe von 3 ml Ethanol konserviert werden.
- Um ein Eintrocknen der Probe zu verhindern, können vor der Einlagerung zusätzlich fünf bis zehn Tropfen Glycerin zugegeben werden.