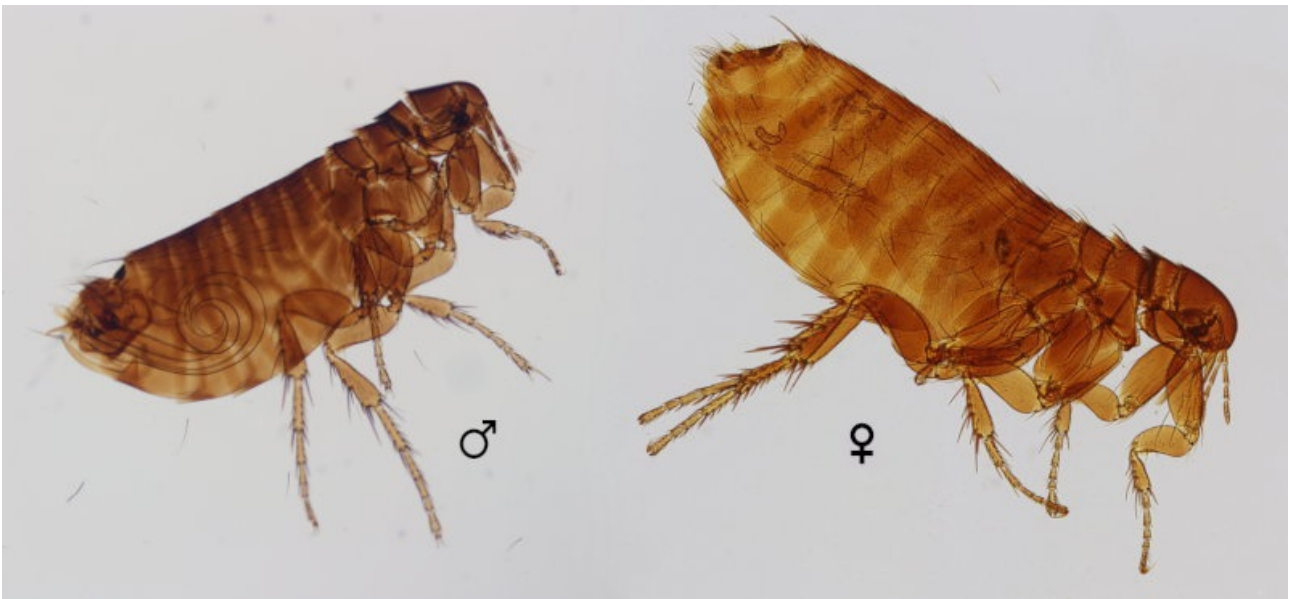


Präparation von Flöhen

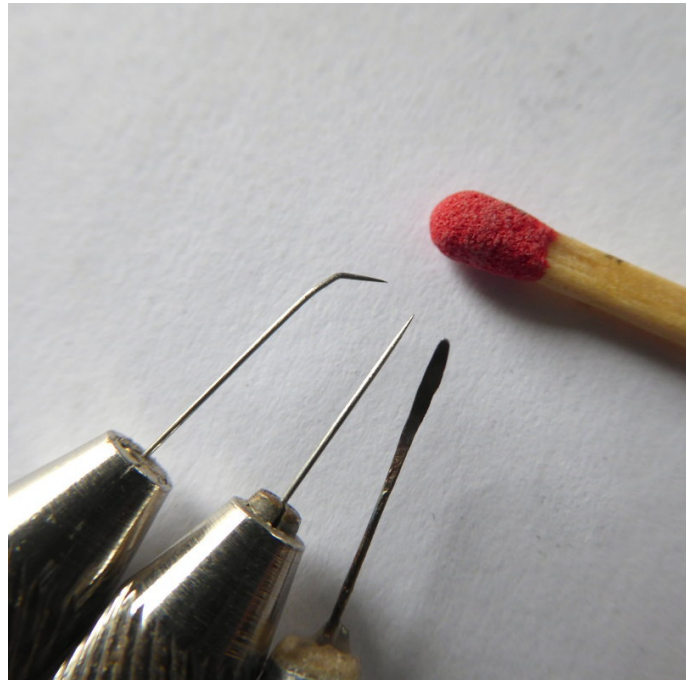
durch Mazeration in Natronlauge



1 Werkzeuge, Chemikalien und Hilfsmittel

1.1 Werkzeuge

Um die notwendigen Manipulationen an den Flöhen vornehmen zu können, werden besonders feine **Präpariernadeln** benötigt. Gut geeignet sind Insektennadeln der Größe „000“, die, auf die richtige Länge gekürzt (Saitenschneider), in einen Ösenhalter eingespannt oder in einen Holzgriff befestigt werden. Ferner wird ein sehr feiner Spatel benötigt, mit dem man den Floh festhalten und drücken kann, ohne ihn zu beschädigen. Eine Stecknadel wird dazu ausgeglüht und mit einem Hammer auf einer Stahlunterlage platt „geschmiedet“. Mit einer feinen Feile oder auf sehr feinem Schleifpapier wird sie abgerundet und mit einer feinen Zange etwas abgewinkelt.



Ferner benötigt man mehrere **Pipetten**, die entsprechend der Verwendung (farblich) gekennzeichnet werden. Es wird mindestens eine Pipette je Chemikalie benötigt.



Natürlich werden **Objektträger** und **Deckgläser** benötigt. Am besten eignen sich runde Deckgläser mit 15 bis 18mm Durchmesser.

Um die verschiedenen flüssigen Chemikalien auf die Flöhe einwirken zu lassen, werden kleine Gefäße benötigt. Bewährt haben sich **Schnappdeckelgläser** mit 5 bis 10ml Inhalt oder Kunststoffphiolen mit 1,5 bis 2 ml Inhalt. Diese Behälter kennzeichnet man farblich genauso wie die Pipetten. Auf dem **farbigen Kleband** vermerkt man mit einem **Permanent-Marker** die Konzentration.

Zum Kochen der Flöhe in Natronlauge benötigt man ein **Reagenzglas** und einen **Reagenzglashalter** sowie einen **Brenner** oder alternativ eine Kerze.

Zum Schutz vor Verätzungen werden eine **Schutzbrille** und **Schutzhandschuhe** benötigt.

Eine **Petrischale** oder ein anderes nicht zu hohes Gefäß wird benötigt, um die Flöhe aus dem Reagenzglas herausgießen zu können. Mit einem kleinen **Glasstab** tropft man das Harz auf.

1.2 Chemikalien

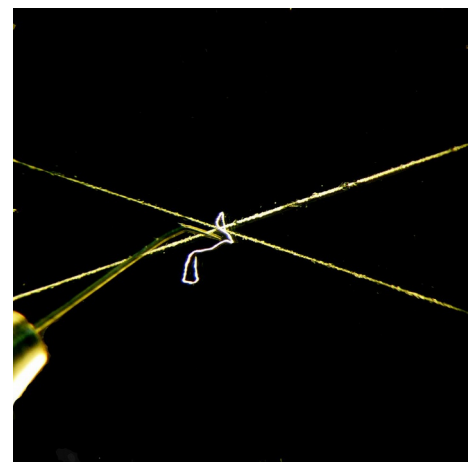
Benötigt werden:

- Aquadest. oder demineralisiertes Wasser
- Ethanol (wasserfrei, vergällt), für verdünnte Anwendungen kann Brennspiritus genutzt werden
- Natronlauge 10% oder Kalilauge 10%
- Xylol
- Malinol (Harz mit Xylol als Lösungsmittel)

1.3 Stereomikroskop

Für das Arrangieren der Flohbeine und für das Finden und Entfernen von Luftblasen und Staubfusseln ist ein Stereomikroskop unerlässlich. Es werden Vergrößerungen von 5x bis 10x benötigt.

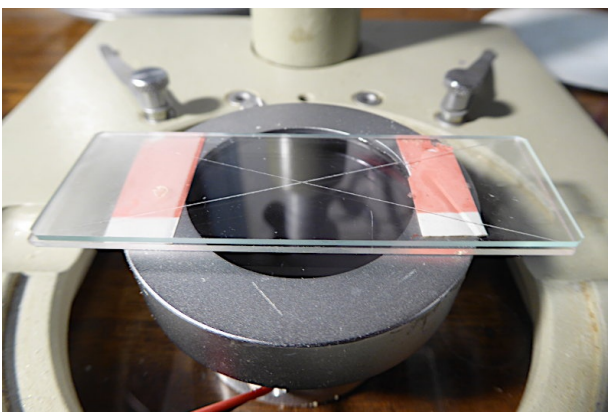
Für das Auffinden von Staubfusseln ist eine Durchlichtbeleuchtung mit linearen Polarisationsfiltern sehr praktisch. Vor das Objektiv und auf die Lichtquelle wird jeweils ein Polfilter platziert, wovon einer drehbar sein muss. Meist ist das bei dem Filter auf der Lichtquelle am einfachsten zu realisieren.



Entfernen eines einzelnen großen Staubfussels über der Zielmarke mit einer Präpariernadel zwischen gekreuzten Polfiltern

1.4 Zielmarke

Um den Floh oder andere Objekte mittig auf dem Objektträger zu platzieren, kann man einen Objektträger mit einem Diamantstift oder einer Hartmetallnadel und einem Lineal derart ritzen, dass



Objektträger auf der "Zieleinrichtung" über dem Polarisationsfilter auf einer LED-Lichtquelle

die diagonal gegenüber liegenden Ecken miteinander verbunden sind. So entsteht eine Art Zielkreuz. Dieser Objektträger wird mit etwas doppelseitigem Klebeband über dem Polfilter fixiert. Darauf wird der eigentliche Objektträger deckungsgleich gelegt und das einzuschließende Objekt kann leicht über der Zielmarke abgelegt werden. Wenn die Vergrößerung des Stereomikroskopes es zulässt, dass man auch das Deckglas vollständig sieht, kann man auch dieses danach ausrichten.

2 Konservierung

In **Ethanol 70%** (keine höhere Konzentration, nicht in ISO oder Methanol, sonst werden die Flöhe hart und brüchig)

Achtung! Flöhe neigen etwas dazu sich mit ihren Krallen ineinander zu verhaken. Ideal ist die getrennte Aufbewahrung. Wenn genügend Material zur Verfügung steht, kann man aber durchaus mehrere Flöhe in einem Gefäß gemeinsam konservieren und der nachfolgenden Behandlung unterziehen.

3 Präparation

3.1 Mazeration

In **NaOH-Lösung 10%** 1..2 Tage einweichen lassen, **10min. kochen** im Reagenzglas (Achtung: Siedeverzug. Immer ein Stück Zahnstocher mit kochen, Brille tragen und Reagenzglasöffnung vom Körper weg halten), Abgießen in Petrischale,

3.2 Spülen

NaOH, abpipettieren, Flöhe mit **Aqua dest.** betropfen und mit Pipette aufnehmen, um in Aqua dest. + wenige Tropfen HCl zu spülen, um Kristallbildungen aufzulösen und zu neutralisieren. Ca. 1h,

Dann mit **reinem Aqua dest.** nochmal gründlich nachspülen z.B. über Nacht.

3.3 Alkoholreihe

Alkoholreihe ca. **50% - 60% - 70%** Ethanol

Da die Flöhe nicht mit hohen Ethanolkonzentrationen in Berührung kommen sollen, wird die Lösung, in der die Flöhe schwimmen, abpipettiert und die nächst höhere Konzentration aufgegossen. Die Flöhe verbleiben also immer im gleichen Gefäß, nur die Lösung wird gewechselt. Das minimiert die Gefahr, die Tiere zu beschädigen. Wenn die einzelnen Konzentrationen frisch hergestellt wurden, müssen sie gut geschüttelt werden. Erst wenn keine Schlieren mehr zu sehen sind, darf die Lösung zu den Flöhen gegossen werden. Jede Konzentrationsstufe soll jeweils mindestens eine Stunde einwirken. Es passiert jetzt nichts mit den Insekten, außer dass ihnen langsam das Wasser entzogen wird. Sie bleibt weich und sind gut konserviert, so dass eine längeres Verweilen in diesen Lösungen nicht schadet.

3.4 Arrangieren und Härten

Den Floh wird mit einer weiten Pipette oder einer sehr weichen Federstahlpinzette auf einem Objektträger gebracht. Den 70%-ige Alkohol zieht man mit einem saugfähigen Papier ab, achtet aber darauf, dass der Floh nicht austrocknet. Wenn erst einmal Luft in die Körperhöhle gelangt ist, ist sie nur sehr schwer wieder zu entfernen. Unter dem Stereomikroskop auf einem Objektträger arrangieren. Die Beine werden mit einer sehr feinen Präpariernadel und einem feinen Spatel zurechtgelegt. Dazu mit dem Spatel den Floh halten und mit der Nadel die Körperteile bewegen.

Wenn alles gut arrangiert ist, wird ein Deckglas aufgelegt und mit einer Pipette etwas reiner Alkohol oder Brennspiritus an den Rand des Deckglases gegeben, damit er darunter gezogen wird. Der Floh bleibt ca. 5min im hochprozentigen Alkohol unter dem Deckglas (ggf. verdunstenden Alkohol ersetzen). Danach ist er gehärtet. Ab jetzt muss man sehr vorsichtig mit dem Floh umgehen. Er wird mit einer Pipette und Ethanol vom Objektträger in ein Schnappdeckelglas gespült.

3.5 Entwässern

Der Brennspiritus wird abpipettiert und durch **wasserfreien Ethanol** (z.B. von KREMER-Pigmente wasserfreier Ethanol, vergällt) ersetzt. Ca. 1..2 Stunden zur Not auch über Nacht einwirken lassen und mindestens einmal wechseln. Das ist der einzige Schritt der Alkoholreihe, an dem wirklich wasserfreier Alkohol benötigt wird. Alle vorherigen Schritte können mit billigerem Brennspiritus realisiert werden.

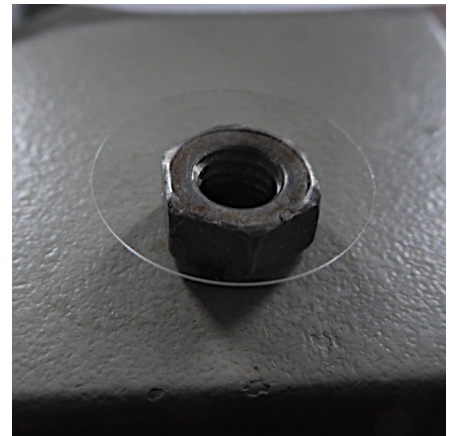
3.6 Intermedium

Ethanol absaugen und durch **Xylol 100%** ersetzen. Nach ca. 1 h noch einmal wechseln.

3.7 Eindecken in Malinol

Einen Objektträger reinigen und zwischen gekreuzten Polfiltern unter dem Stereomikroskop auf Staub kontrollieren. Das Gleiche macht man mit einem runden Deckglas. Wenn es sauber ist, wird es auf einer Erhöhung (z.B. einer Schraubmutter) abgelegt, wo es später gut mit einer feinen Pinzette wieder gegriffen werden kann.

Einen Floh aus dem Xylol heraus pipettieren und mittig auf den Objektträger platzieren. Überschüssiges Xylol wieder einsaugen. Floh mittig ausrichten und eventuell vorhandene



Rundes Deckglas auf einer Schraubenmutter abgelegt

Staubfusseln mit der Präpariernadel

entfernen. Den Floh nicht austrocknen lassen, aber direkt vor dem Aufbringen des Harzes das überschüssige Xylol mit einem Papier absaugen. (z.B. kleinen Streifen Linsenpapier, mit denen gut verpackte Objektträger getrennt werden.)

Mit kleinem Glasstab einen Tropfen Malinol auf den Floh tropfen. Das Xylol in und auf seinem Körper sorgt dafür, dass das Harz sich blasenfrei anlegt.

Danach: Kontrolle auf Staub und Luftblasen. Wenn solche vorhanden sind, werden sie mit einer Präpariernadel an den Rand des Tropfens gezogen. Den Floh sollte man in die Mitte des Tropfens schieben, damit er



Deutlich sieht man die Hautbildung des Harzes beim Einstechen der Präpariernadel zum Entfernen von Staub.

beim Auflegen des Deckglases nicht an dessen Rand gedrängt wird.

Ein Tropfen Xylol auf das Deckglas geben. Dieses mit der Pinzette fassen und mit einem Papierstreifen den Tropfen so abziehen, dass nur ein dünner Film von Xylol auf dem Deckglas verbleibt. Dieses mit der nassen Seite auf den Malinol-Tropfen legen. Wenn das Deckglas trocken aufgelegt wird, legt es sich nicht so gut an, denn das Malinol bildet schnell eine zähe Haut. Diese bewirkt beim Auflegen oft eine Blasenbildung. Andererseits soll das Harz nicht zu sehr verdünnt werden, denn es braucht ohnehin sehr lange zum Trocknen. Das Deckglas vorsichtig andrücken z.B. mit den feinen Spitzen der Pinzette, mit der es aufgelegt wurde. Darauf achten, dass sich das Harz gleichmäßig verteilt. Lieber etwas Malinol am Rand herausdrücken, als dass der Rand nicht richtig benetzt ist. Beim Trocknen schrumpft das Harz und zieht sonst Luft unter das Deckglas.

3.8 Trocknung und Reinigung

Das fertige Präparat soll mindestens 3 Tage auf der Heizung oder einer Heizplatte bei maximal 60 Grad trocknen. Danach kann das überschüssige Harz am Rand des Deckglas entfernt werden (optional, nur aus ästhetischen Gründen). Das geht am besten mit einer Lanzettnadel. Ist etwas Harz auf das Deckglas gelangt, muss dieses zuerst entfernt werden, weil das Deckglas nach dem Entfernen des überstehenden Harzes oft wieder leicht beweglich ist. Das Harz trocknet sehr langsam. Auf den OT oder Deckglas verbliebene Harzreste kann man vorsichtig mit einem Wattestäbchen entfernen, das mit etwas Xylol benetzt wurde. Aber hierbei muss man sehr sparsam vorgehen, um das schon verfestigte Harz am Rande des Deckglas nicht zu sehr anzulösen. Ich rolle darum das benetzte Wattestäbchen vor dem Reinigen kurz über ein Stück Küchenrolle. Deckgläser reinigt man in kreisenden Bewegungen des Wattestäbchens von der Mitte zum Rand.

Nach der Reinigung kann das Präparat beschriftet werden, muss aber weiter waagerecht gelagert und getrocknet werden. Das kann auf einer Heizung oder Heizplatte erfolgen. Bei Zimmertemperatur ist das Harz erst nach ca. 6 Monaten ausgehärtet. Optimal ist bis dahin eine waagerechte Lagerung auf einer Präparatetafel, die gut belüftet aber zum Staubschutz mit einem Papier bedeckt ist. Fehlt der Platz für eine derartige Lagerung kann man die Präparate nach ca. 2 Wochen in eine Präparatebox einsortieren, die dann aber so gestellt wird, dass auch hier die Präparate waagerecht liegen, damit das Deckglas sich nicht der Schwerkraft folgend verschiebt. In einer Präparatebox kann aber das Lösungsmittel nicht so gut verdunsten, was den Prozess des Aushärtens weiter verzögert.

4 Literatur:

CAMPBELL, James D.: [How to Mount Your Flea](#) – a guide to the preservation, preparation, clearing and mounting of Siphonaptera