

Probenahme und Aufbereitung

Probenahme

Auswahl der Probestelle

Die Stellen der Probenentnahme sollen in freifließenden Abschnitten liegen. Staubereiche und künstlich stark aufgeweitete oder vertiefte Bereiche sind zu meiden, da sich dort die Fließgeschwindigkeit oft erheblich verlangsamt, was zu Einschichtungen oder zur Sedimentation des Phytoplanktons führen kann. Die Beprobung von Brücken ist zulässig, sofern die strömungszugewandte Seite gewählt wird.

Folgende Gewässerbereiche sind für Probestellen **nicht** geeignet:

- künstliche Staubereiche in Zusammenhang mit Wasserkraftanlagen, Pegeln oder Schleusen
- Gewässerabschnitte direkt unterhalb von Staustufen
- vertiefte Bereiche wie z. B. Hafenbecken oder tiefe Schifffahrtrinnen (Faustregel: ungeeignet, wenn um mehr als ein Drittel vertieft gegenüber der "normalen" Tiefe)
- künstlich aufgeweitete Bereiche (Faustregel: ungeeignet, wenn auf mehr als das Doppelte aufgeweitet gegenüber der "normalen" Breite)

Beprobungstermin

PhytoFluss 2.2: Für jedes Untersuchungsjahr ist eine monatliche Beprobung des Phytoplanktons im Zeitraum April bis Oktober durchzuführen, so dass mindestens sechs Termine in die biologische Bewertung eingehen.

Für Nährstoffe und weitere Begleitparameter wird eine 14-tägige Beprobung empfohlen.

PhytoFluss 5.0: Für jedes Untersuchungsjahr ist eine monatliche Beprobung des Phytoplanktons im Zeitraum März bis Oktober durchzuführen. Es sollten mindestens vier Termine im Zeitraum Mai bis September liegen und letztlich mindestens sechs Termine für die biologische Bewertung zur Verfügung stehen.

Eine 14-tägige Beprobung wird für die Chlorophyll-a-Bestimmung und für die Nährstoffe empfohlen.

Probenahme

Die Proben sollten in der Strommitte mit einem Wasserschöpfer (Ruttner- oder Van-Dorn-Fallschöpfer) in der Regel aus einer Tiefe von 0,5 m entnommen werden. Dies kann z. B. von einer Brücke aus auf der strömungszugewandten Seite geschehen. Es werden keine Planktonnetze verwendet.

In langsam fließenden Fließgewässern kann es zu horizontalen Einschichtungen des Phytoplanktons im Wasserkörper kommen.

Bei sichtbaren Aufräumungen von Algen und einer Sichttiefe unter 1 m wird eine zweite Probe von

der Gewässeroberfläche entnommen und mit der Probe aus 0,5 m zu einer Mischprobe vereint.

PhytoFluss 2.2: Aus der Wasserprobe werden für das PhytoFluss-Verfahren mindestens **zwei Teilproben** entnommen:

1. **Chlorophyll a-Probe:** 1-2 Liter für den Parameter Chlorophyll-a-Gehalt in PET-Flaschen (Anteil grüner Algenfarbstoffe). Die Proben müssen dunkel und kühl ins Labor transportiert werden.
2. **Phytoplanktonprobe:** Die Phytoplanktonproben zur späteren mikroskopischen Analyse werden direkt vor Ort in 100ml- oder 250 ml-Klarglas-Enghalsflaschen abgefüllt und sofort mit einer jodhaltigen Lösung (Lugol'sche Lösung) fixiert (Abb. 1). Bei gekühlter und luftdichter Lagerung sind sie mindestens für ein halbes Jahr haltbar.

PhytoFluss 5.0: Aus der Wasserprobe sind für das PhytoFluss-Verfahren mindestens **drei Teilproben** zu entnehmen:

1. **Chlorophyll a-Probe:** 1-2 Liter werden für den Parameter Chlorophyll a-Gehalt (Anteil grüner Algenfarbstoffe) unfixiert in PET-Flaschen abgefüllt. Der Transport ins Labor muss dunkel und kühl erfolgen. Es sollte sichergestellt sein, dass Proben noch am selben Tag zur Filtration im chemischen Labor eingehen.
2. **Phytoplanktonprobe:** Die Phytoplanktonprobe zur späteren mikroskopischen Analyse wird direkt vor Ort in 100 ml-Klarglas-Enghalsflaschen abgefüllt und sofort mit einer jodhaltigen Lösung (Lugol'sche Lösung) fixiert bis sie cognacfarben ist (Abb. 1). Bei gekühlter und luftdichter Lagerung sind sie mindestens für ein halbes Jahr haltbar. Diese Probe wird nach Aufbereitung im Umkehrmikroskop mit der Utermöhl-Technik analysiert.
3. **Diatomeenprobe:** Diese Planktonprobe soll für die Herstellung eines Diatomeenpräparats (Kieselalgen) zur Verfügung stehen.
Variante "Alkoholprobe" (empfohlen): 0,9 Liter Probe wird in eine 1 Liter Kautexflasche gefüllt und mit 96%igem Ethanol/Isopropanol im Verhältnis 1:9 fixiert. Weitere Behandlung und Fixierung im Labor beachten.
Variante "Lugolprobe": 200 ml Probe wird mit handelsüblicher Lugol-Lösung (versetzt mit Natriumacetat s.u.) in 250 ml-Weißglas-Enghals-Flaschen fixiert (ca. 4 ml) bis die Probe cognacfarben ist. Bei gekühlter und luftdichter Lagerung ist sie mindestens für ein halbes Jahr haltbar.

Alle Proben werden mit Etiketten beschriftet, welche jeweils den Namen des Messortes, den Gewässernamen, das Datum und möglichst auch eine fortlaufende Labornummer angeben.

Es sollte sichergestellt sein, dass die Proben noch am selben Tag zur Filtration im Labor eingehen.

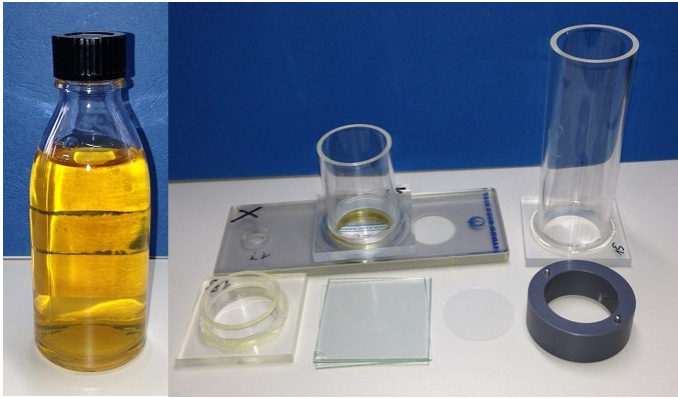


Abb. 1: Links: Glasflasche mit Lugol-fixierter Probe; Rechts: geeichte Absetzkammer mit verschiedenen großen Aufsätzen (Foto: IGB).

Aufbereitung der Proben

Bearbeitung der Chlorophyll-a-Proben im Labor

Die Chlorophyll a-Konzentration (Chl a) einer Wasserprobe ist spektralphotometrisch zu messen. Sie korreliert mit der Biomasse des enthaltenen Phytoplanktons, da alle Arten dieses Pigment zur Photosynthese nutzen. Die Chlorophyll a-Konzentration wird für das PhytoFluss-Verfahren als Kenngröße für die Biomasse des Phytoplanktons verwendet.

Die Wasserproben müssen noch am Probenahmetag mit einer Vakuumpumpe auf einen Glasfilter filtriert werden (Abbildung 2). Der Filtrerrückstand enthält die Algen und deren Pigmente.



Abb. 2: Laboreinrichtung zur Filtration von Chlorophyll-a Proben auf Glasfaserfilter (Foto: IGB)

Die Bestimmung der Chlorophyll a-Konzentration nach der Norm (DIN 38409-H60 2019) beruht auf der ethanolischen Heißextraktion aus dem Filtrerrückstand und der anschließenden Absorptionsmessung bei 665 nm, wobei auch Phaeopigmente (Abbauprodukte des Chlorophyll) mit erfasst werden. Nach quantitativer Überführung des Chlorophyll a in Phaeopigmente mittels Ansäuern wird eine erneute Messung bei 665 nm durchgeführt. Eventuell auftretende Trübungen werden durch Messungen bei 750 nm korrigiert. Aus den photometrischen Analyse-Ergebnissen kann der Chlorophyll a-Wert nach DIN (mit Phaeophytinabzug) errechnet werden:

$$\text{Chl a DIN} = \text{Gesamtpigment} - (\text{Phaeophytin}/1,7)$$

Die Angabe der Pigmentkonzentrationen erfolgt üblicherweise in $\mu\text{g/l}$.

Für **PhytoFluss 2.2** werden die photometrischen Analyseergebnisse mit einer speziellen Formel als Gesamtpigment verrechnet (Gesamtpigment = Chl a korrig. (DIN) + (Phaeo/1,7).

Aufbereitung der Phytoplanktonprobe (Utermöhl-Methode)

Ziel der mikroskopischen Analyse sind die taxonomische Bestimmung sowie repräsentative Vermessungen der Algenzellen zur Ermittlung des Biovolumens der Phytoplanktontaxa. Dies erfolgt an speziellen Umkehrmikroskopen nach dem genormten "Utermöhl-Verfahren" (DIN EN 15204). Dafür werden die Phytoplankter einen Tag zuvor in Absetzkammern angereichert (s. Abb. 1).

In einem definierten Volumen der Lugol-fixierten Probe werden die Taxa bestimmt und gezählt. Der Volumenbezug dient der Rückberechnung auf die im Gewässer herrschende Algendichte "Biovolumen/Liter". Anschließend wird ihr Verdrängungsvolumen, das sogenannte Biovolumen, unter Berücksichtigung ihrer unterschiedlichen Größen und Formen berechnet. Weitere Festlegungen, wie etwa zur mikroskopischen Bearbeitung und Auswertungsstrategie, wurden u. a. von Nixdorf et al. (2010) getroffen.

Da die Zellkonzentration in Abhängigkeit von der Artenzusammensetzung und der Saison sehr stark schwanken kann, sind Orientierungswerte zur Auswahl des benötigten Absetzvolumens hilfreich. So sollten zum Beispiel bei Chlorophyll-a-Konzentrationen der Probe zwischen 5-10 µg/l ein 10 ml Kammeraufsatz genutzt werden, bei geringeren Konzentrationen der 25 ml- oder sogar 50 ml-Aufsatz.

Aufbereitung der Diatomeenprobe (pelagische Diatomeen) für PhytoFluss 5.0

Variante "Alkoholprobe": Das Probenmaterial für die Untersuchung der planktischen Diatomeen muss im Labor 2-3 Tage in der Kautexflasche absedimentieren. Der Überstand wird anschließend zu ca. 98% vorsichtig mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Der aufgeschüttelte Rückstand wird in dicht schließende Flaschen abgefüllt und mit 96 %igem Ethanol/Isopropanol im Verhältnis 1:5 nachfixiert. Ein Gesamtvolumen von 100 ml Diatomeensuspension ist ausreichend. Die Probenflaschen sind zu beschriften (Messstellennummer, Gewässername, Messstellenname, Datum). Zur taxonomischen Bestimmung muss ein Diatomeenpräparat mit Probenaufschluss mittels Wasserstoffperoxid angefertigt werden (s. Nixdorf et. al. 2010; S. 14-15).

Variante "Lugolprobe": Sind nur Lugol-fixierte Proben verfügbar, muss das jodhaltige Fixierungsmittel vor dem Aufschluss der Diatomeen folgendermaßen ausgewaschen werden: Nach gründlicher Suspendierung wird eine Teilprobe aus der Probenflasche in ein Becherglas entnommen, sodass etwa 50 ml als Rückstellprobe in der Probenflasche verbleiben. Die Probe im Becherglas wird 24 Stunden zur Absedimentierung des Planktonmaterials stehen gelassen. Am nächsten Tag wird der Überstand bis zu 1 cm über dem Boden entnommen und das Becherglas danach mit Leitungswasser auf 200 ml aufgefüllt. Dieser Auswaschvorgang wird noch 2 x wiederholt. Am dritten Tag kann die Probe zur Analyse aufgeschlossen werden (Nixdorf et. al. 2010).

In den nach dem Probenaufschluss erstellten Streupräparaten müssen je 200 Objekte auf Artniveau bestimmt werden. Die Zählungen müssen in den gleichen Größenklassen wie die quantitativen Auszählungen in den Utermöhl-Kammern stattfinden. Nachdem aus den

Schalenpräparaten die prozentualen Artenzusammensetzungen je Größenklasse ermittelt sind, können diese auf die quantitativen Zählungen aus der Utermöhl-Kammer übertragen und die Größenklassenbiovolumina durch die Artenbiovolumina ersetzt werden (Mischke 2005, Nixdorf et al. 2010).