

# Anlage2

## **18.2 Anforderungen an Probenahme, Felddaten und Ermittlung der Phytoplankton-Biozönosen in Seen zur ökologischen Bewertung gemäß der EU-WRRL**

Prof. Dr. Brigitte Nixdorf, Dr. Jacqueline Rücker

BTU Cottbus, b.nixdorf@t-online.de

Eberhard Hoehn, Ursula Riedmüller

LBH Freiburg, lbh@gmx.de

Dr. Ute Mischke

IGB Berlin im Forschungsverbund Berlin e.V., ute.mischke@igb-berlin.de

Unter Mitarbeit von Dr. Ilka Schönfelder

Büro für Diatomeenanalyse, ilka.schoenfelder@t-online.de

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Teil I: Anforderungen an Probenahme, Felddaten und Ermittlung der Phytoplankton-Biozöosen in Seen zur ökologischen Bewertung im Rahmen der EU-WRRL</b> .....	<b>3</b>
1.1 Einleitung zu den Probenahmeverfahrenen.....	3
1.2 Beprobungsvorschrift Phytoplankton in Seen .....	3
1.2.1 Probenahme und Beprobungsfrequenz.....	3
1.2.2 Zeitraum der Beprobungen und Analysenumfang (Physik, Chemie).....	5
1.2.3 Entnahme und Konservierung der Phytoplanktonproben (Lugolproben).....	10
1.3 Probenahmeverfahren für Diatomeenproben (Profundal- und Pelagialdiatomeen) .....	11
1.3.1 Vorschrift zur Probenahme von Diatomeenresten im Profundalschlamm (Profundaldiatoomeen) .....	11
1.3.2 Vorschrift zur Probenahme von Diatomeen aus dem Pelagial .....	12
<b>2 Teil 2: Taxonomische Analyse und Utermöhl-Methode (Mikroskopie)</b> .....	<b>14</b>
2.1 Geräteanforderungen.....	14
2.2 Probenvorbereitung .....	15
2.3 Anforderung an die mikroskopische Auswertung von Phytoplanktonproben .....	16
2.3.1 Erstellung einer Zählliste .....	16
2.3.2 Zählstrategie für die quantitative Auswertung.....	17
2.4 Bestimmung von Zellvolumina .....	18
2.5 Berechnung der Taxabiovolumina .....	19
2.6 Diatomeenschalen – Präparate und Auswertung.....	20
2.6.1 Probenaufbereitung und Präparation der Profundaldiatoomeen .....	20
2.6.2 Aufbereitung der pelagischen Diatomeenproben .....	21
2.7 Auswertung der Phytoplanktonzählungen und biovoluminabestimmung .....	22
<b>3 Literatur</b> .....	<b>23</b>
<b>4 Anhänge</b> .....	<b>25</b>
18.2.1 Anhang 1: Hoehn, E. et al. (1998). ATT TI7 (Bestellinformation)	
18.2.2 Anhang 2: CEN – Norm-Entwurf (separate Datei)	
18.2.3 Anhang 3: Integrationsschöpfer	
18.2.4 Anhang 4: Diatomeen-Präparation nach van der Werff	

# 1 Teil I: Anforderungen an Probenahme, Felddaten und Ermittlung der Phytoplankton-Biozöosen in Seen zur ökologischen Bewertung im Rahmen der EU-WRRL

## 1.1 Einleitung zu den Probenahmenvorschriften

Der vorliegende Entwurf wurde im Rahmen des Forschungsprojektes der Länderarbeitsgemeinschaft Wasser (LAWA) zur Erstellung eines Bewertungsverfahrens anhand des Phytoplanktons für Seen (LAWA-Projekt OK 5.90) erarbeitet und soll als Planungsgrundlage für den im Jahr 2005 durchgeführten Praxistest des Bewertungsverfahrens der Seen mittels Phytoplankton in Deutschland dienen. Unter Berücksichtigung der Erfahrungen der Bundesländer wird im Folgeprojekt bis Mitte 2006 eine endgültige Verfahrensanleitung zur Probenahme und Bearbeitung der Phytoplanktonproben entstehen.

Für Deutschland existiert bislang keine einheitliche Vorgabe bzw. Normung hinsichtlich der Probenahmefrequenz, der quantitativen Erfassung und der taxonomischen Auflösung des Phytoplanktons. Eine gute Grundlage bildet die Technische Information Nr. 7 von Hoehn et al. (1998): „Erfassung und Bewertung von Planktonorganismen“ der Arbeitsgemeinschaft Trinkwassertalsperren e. V. (ATT) in Deutschland (ATT TI7, s. Anhang 1).

Der vorliegende Entwurf enthält im Teil 1 die Anforderungen

- an die Probenahme und
- und an die Erfassung der physikalischen und chemischen Begleitdaten

für die Bewertung der Seen anhand des Phytoplanktons auf der Basis der EU-Wasserrahmenrichtlinie. Diese Anforderungen berücksichtigen teilweise bereits den europäischen CEN-Norm-Entwurf „Water quality – Guidance standard for the routine analysis of phytoplankton abundance and composition using inverted microscopy (Utermöhl technique)“, prEN 15204 2005, März 2005, (s. Anhang 2). Ein zweiter Teil enthält die Vorschriften zur Phytoplanktonanalytik und Auswertung der Ergebnisse.

## 1.2 Beprobungsvorschrift Phytoplankton in Seen

### 1.2.1 Probenahme und Beprobungsfrequenz

Die Seen werden nach ihren topographischen und morphometrischen Eigenschaften entsprechend der Vorgabe der LAWA (1999) an einer oder mehreren Messstellen beprobt. Als markante Probenahmestelle wird in den meisten Gewässern die tiefste Stelle bevorzugt.

Für die Beprobung der Seen wird eine Messfrequenz von mindestens **6 x pro Jahr** vorgeschlagen. Mindestens vier der Beprobungstermine müssen in der Vegetationsperiode Mai bis September liegen. Die Tiefenverteilung des Phytoplanktons ist in Seen sehr ungleich und in einem hohen Maß von der Lichtdurchdringung (euphotische Zone) und von der Temperaturschichtung abhängig. Es wird empfohlen, die Tiefenverteilung des Phytoplanktons anhand vorheriger Tiefenchlorophyllmessungen durch eine Fluoreszenzsonde zu ermitteln.

Die Epilimniontiefe ( $Z_{epi}$ ) geschichteter Seen wird definiert als die erwärmte obere durchmischte Wassersäule mit relativ homogener Temperaturverteilung während der Sommerstagnation. Sie wird nach unten durch das Metalimnion (thermische Sprungschicht, Thermokline) begrenzt, dem Horizont mit der größten (durch Temperaturunterschiede bedingten) vertikalen Dichteänderung in einem Standgewässer (Temperaturgradient  $> 1/m$ ). Die durchlichtete Gewässerschicht, die euphotische Zone ( $Z_{eu}$ ) errechnet sich aus der 2,5 fachen Sichttiefe.

In Abhängigkeit vom Durchmischungs- und Durchlichtungsregime wird jeweils eine **Mischprobe** aus den folgenden Wasserschichten (s. Schema 1) entnommen:

- a) in **polymiktischen Seen** aus der gesamten Wassersäule bis etwa 1 über Grund, in tieferen Flachseen jedoch maximal bis in 6 m Tiefe, in 0,5–1 m-Abständen. Die theoretische Epilimniontiefe ( $Z_{tepi}$ ) ist abhängig von der Gewässerfläche und kann aus folgender mathematischer Beziehung hergeleitet werden (s. Abb. 1.1):

$$Z_{tepi} = 6,25A^{0,14} \quad (A - \text{Seefläche in km}^2)$$

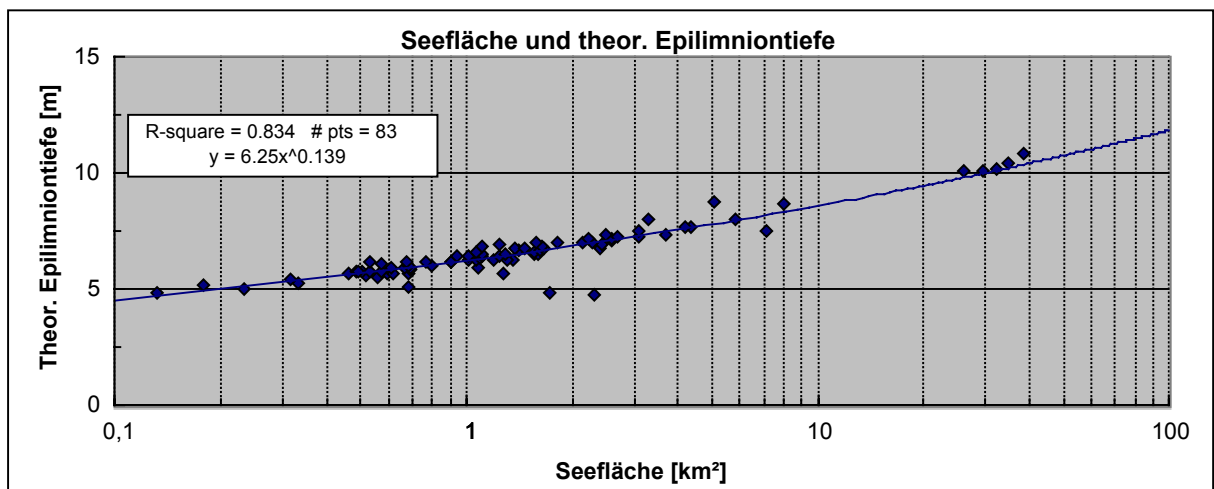


Abb. 1.1: Zusammenhang zwischen theoretischer Epilimniontiefe und Gewässerfläche

- b) in **mono- oder dimiktischen** Seen:

- während der Vollzirkulation aus der durchmischten Schicht bis zur mittleren Tiefe des Sees, jedoch maximal nur bis in 10 m Tiefe. Für besonders tiefe Seen (Bayern, Baden-Württemberg) kann bei Vollzirkulation eine gesonderte Strategie zur Probenahme festgelegt bzw. beibehalten werden (z.B. Bayern, Baden-Württemberg: 0-20 m Beprobung bzw. euphotische Tiefe).
- bei Stagnation werden zwei Zustände für die Probenahme unterschieden:

A) In trüben Seen ( $Z_{eu} < Z_{epi}$ ) wird bei Stagnation eine epilimnische Mischprobe entnommen.

B) In klaren ( $Z_{eu} > Z_{epi}$ ) Seen wird entweder eine Probe aus der euphotischen Zone, aber nicht tiefer als die Kompensationsebene ( $Z_{komp}$ )<sup>1</sup>, oder alternativ aus der epilimnischen Zone entnommen.

<sup>1</sup> Die Kompensationsebene ist die Tiefe, in der photosynthetische Sauerstoffproduktion und Sauerstoffverbrauch durch die gesamte Organismengemeinschaft ausgeglichen sind, d.h. die Sauerstoffsättigung beträgt 100%.

Erläuterung: In klaren Seen kann das Phytoplankton unterhalb der Sprungschicht ein Maximum ausbilden, was mit einer epilimnischen Mischprobe nicht erfasst würde. Die Tiefenverteilung des Phytoplanktons kann anhand vorheriger Chlorophyllmessungen durch eine Fluoreszenzsonde ermittelt werden.

Bei Schwefelwasserstoffbildung und Nährstofffreisetzungen im Hypolimnion ist wegen der Beeinflussungen (Anreicherungen) der chemischen Proben mit den freigesetzten Nährstoffen die epilimnische Mischprobe vorzuziehen oder die chemische Probenahme von der biologischen zu entkoppeln, d.h. chemische Probenahme aus dem Epilimnion; Phytoplanktonprobe aus der euphotischen Zone.

Unter Verwendung herkömmlicher Schöpfertypen (Ruttner-, Friedinger- oder Van-Dorn-Fallschöpfer, Limnos-Schöpfer) wird folgende Verfahrensweise des Mischprobenansatzes vorgeschlagen: Polymiktische Flachseen und geringe Epilimnia dimiktischer Seen (um 5 m, maximal 6 m) werden in 0,5 bis 1 m Schritten beprobt. Tiefe Seen können in Abhängigkeit von der Tiefe in 1-3 m - Intervallen beprobt werden, wobei äquidistante Abstände eingehalten werden müssen. Die entnommenen Proben aus den einzelnen Tiefenstufen werden in einem Gefäß (Kanister, Eimer) gesammelt. Zuvor muss die Gesamtmenge aller Proben, die als Mischproben über diesen Tiefenbereich abgefüllt werden sollen, bekannt sein:

Z.B. 2 L für Chlorophyll, 1 L Lebendprobe bzw. für Diatomeenpräparation, 250 mL Phytoplankton mit Lugol-fixiert, 2 L Nährstoffproben = 5,25 L Gesamtmenge, dazu sollte eine Reserve und Spülwasser in der gleichen Größenordnung eingerechnet werden, so dass mindestens 10L Probewasser entnommen werden. Dieses Sammelgefäß soll möglichst im Schatten stehen oder abgedeckt werden. Durch vorsichtiges Umrühren (Empfehlung mindestens 2minütiges Umrühren) wird die Mischprobe in dem Gefäß homogenisiert, um eine gleichmäßige Verteilung der Algensuspension zu gewährleisten. Die biologischen (Phytoplankton, Chlorophyll-a) und chemischen (Nährstoffe) Proben werden anschließend mit einem Messbecher in die einzelnen Probegefäße gefüllt. Es empfiehlt sich, das „Restwasser“ für unvorhergesehene Störfälle in das Labor zu transportieren.

Als optimale Methode wird die Mischprobennahme mit einem integrierenden bzw. summierenden Schöpfer empfohlen, weil damit die Mischprobe stufenlos genommen und somit lückenlos und zeitsparend erzeugt wird. Integralschöpfer werden von Fa. Züllig (System Schröder) oder Fa. UWITEC (Kolbenhubprinzip) hergestellt (Anhang 3). Fa. Hydro-Bios plant die Entwicklung eines elektronischen Integralschöpfers, welcher definierte Gesamtvolumina über beliebige Tiefenbereiche beprobt (s. Anhang 3). Als Alternative kann ein Rohrschöpfer (System Pauli/Pietruske, s. Anhang 3) verwendet werden, mit dem ein lückenloses Profil aus 2-m Stufen erzeugt wird. Hiefür benötigt man ein relativ großes Mischgefäß.

Die Verwendung einer Seilwinde ist hierbei für alle Schöpfertypen sehr zu empfehlen.

Eine Probenahme mit Stechrohren und Schläuchen mit Pumpen sollte wegen der schlechten Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit anderen Methoden nicht durchgeführt werden.

## **1.2.2 Zeitraum der Beprobungen und Analysenumfang (Physik, Chemie)**

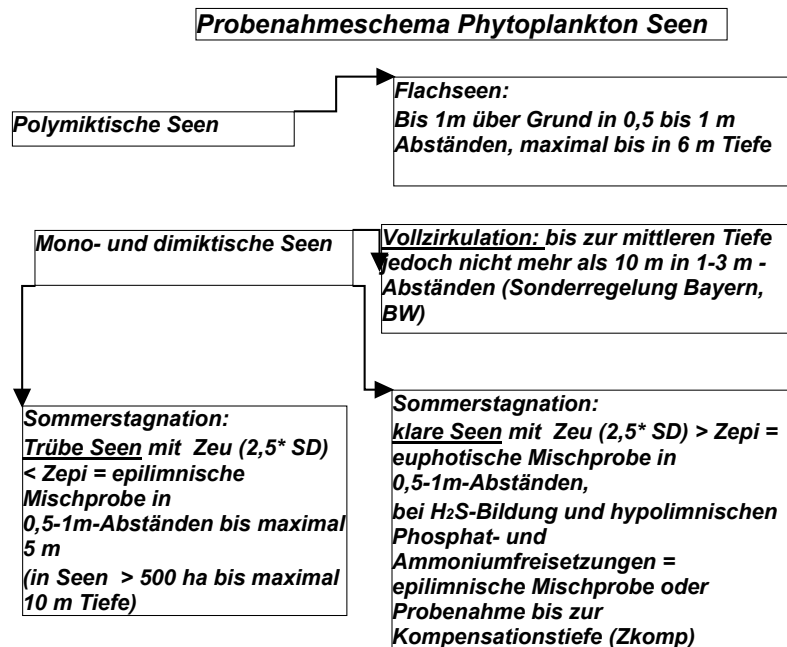
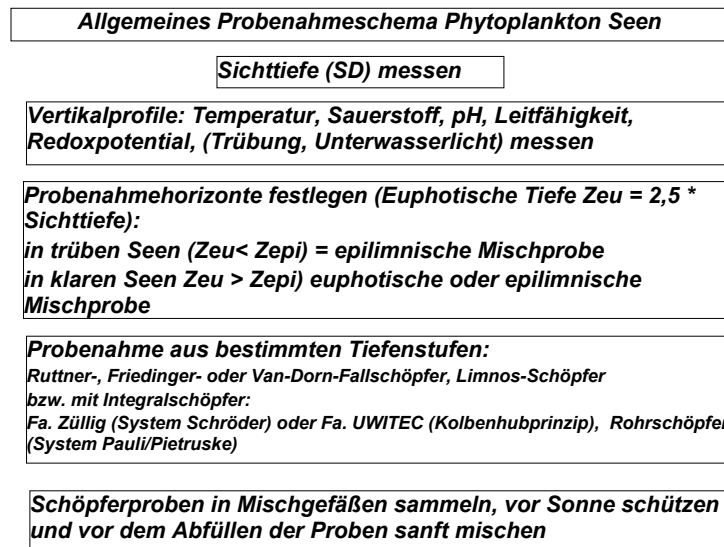
Da das Phytoplankton hinsichtlich Artenzusammensetzung und Dichte kurzfristig stark schwanken kann und in vielen Seen die hinsichtlich Störungsfaktoren empfindlichste Lebensgemeinschaft darstellt, sollte es nach Möglichkeit zumindest im ersten Bewirtschaftungszeitraum mehrere Jahre (möglichst 3-5 Jahre hintereinander) untersucht werden. Damit kann eine Einschätzung über die Schwankungsbreite dieses Parameters vorgenommen und

somit eine größere Sicherheit hinsichtlich der Bewertung und zukünftiger Entwicklungstrends erzielt werden.

Zusammen mit dem Phytoplankton sollten stets chemische und physikalische Parameter erfasst werden, um die Phytoplanktonergebnisse interpretieren zu können. In der Regel sollten vor allem der Sauerstoffhaushalt (Konzentration und Sättigung), pH-Werte, Leitfähigkeiten und das Redoxpotential im Vertikalprofil gemessen werden. Bei Anoxie im Hypolimnion ist die Erfassung der  $\text{H}_2\text{S}$ -Konzentration erforderlich. Nährstoffe, hier vor allem die gelösten anorganischen sowie die Gesamtkonzentrationen des Phosphors, Stickstoffs und Siliziums sind aus den Unterproben der Mischungsansätze (epilimnische oder euphotische bzw. Mischprobe bis zur mittleren Tiefe des Sees) zu analysieren und entsprechend der standardisierten Methoden zu erfassen. Aus der Mischprobe für die Phytoplanktonanalyse sollte ebenfalls die Chlorophyll-a-Bestimmung erfolgen (s. Tabelle 1.1).

Bei eutrophen dimiktischen Gewässern ist für die trophische Einschätzung der Seen die Kenntnis der hypolimnischen Phosphor-, Ammonium und Schwefelwasserstoffkonzentrationen von großer Bedeutung. Diese Proben sollten während der Sommerstagnation während jeder Probenahme 0,5 – 1 m über Grund genommen werden

Den Ablauf der Probenahme zeigt Schema 1.



Schema 1: Allgemeiner Ablauf der Beprobung zur Entnahme von Phytoplanktonproben in Seen (oben) und Algorithmus der Mischprobenherstellung in Abhängigkeit vom Durchmischungsregime des Sees und dem Verhältnis euphotischer ( $Z_{eu}$ ) zu durchmischter Epilimniontiefe ( $Z_{epi}$ ) (unten)

Tabelle 1.1: Physikalische und biologische Begleitparameter bei der Probenahme des Phytoplanktons in Seen

Parameter	Probestellen: tiefste Stelle im See	Methode	DIN / EN	Nachweisgrenzen	Genauigkeit
Sondenmessung: T, O <sub>2</sub>	in m-Stufen bis 20 m, unterhalb 20m: 2-4m-Stufen möglich	Tiefen-Sonden		0-35°C; 0,0 mg/L	0,1°C; 0,1mg/L
Sichttiefe		Secchi-Scheibe	EN ISO 7027: 1999	20 m	5 cm
Lichtklima: Attenuation	In Flachseen in 0,5 –1 m-Stufen In tiefen Seen in m-Stufen bis ca. 3* SD	Photonenflussdichte mit sphärischem Quantensensor			
pH, LF	Tiefensonden oder auch aus Schöpferproben möglich, im Epilimnion in m-Stufen, unterhalb Metalimnion 2-5m-Stufen möglich	Elektrometrie		pH 3-12.; 5 µS/cm	0,01 pH-Einh., 1 µS/cm
Redoxpotential	Tiefensonden oder auch aus Schöpferproben möglich, im Epilimnion und an der Grenze zur Anoxie in m-Stufen, unterhalb der chemischen Sprungsschicht 2 – 5 m - Stufen	Elektrometrie	DIN 38404 C6		1 mV
o-PO <sub>4</sub> -P	Mischproben lt. Probenahme, Hypolimnion, über Grund	Photometrie	DIN 38405 D11/ EN 1198 D11	2 µg/L	1 µg/L
Gesamt-P	Mischproben lt. Probenahme, Hypolimnion, über Grund	Photometrie	DIN 38405 D11/ EN 1198 D11	5 µg/L	1 µg/L
NH <sub>4</sub> -N	Mischproben lt. Probenahme, Hypolimnion, über Grund	Photometrie	DIN 38406 E5	5 µg/L	1 µg/L
NO <sub>2</sub> -N	Mischproben lt. Probenahme, Hypolimnion, über Grund	Photometrie	DIN 38405 D10	2 µg/L	1 µg/L
NO <sub>3</sub> -N	Mischproben lt. Probenahme, Hypolimnion, über Grund	IC	DIN 38405 D19 / EN 10304-1	0,02 mg/L	0,01 mg/L



Parameter	Probestellen: tiefste Stelle im See	Methode	DIN / EN	Nachweisgrenzen	Genauigkeit
H <sub>2</sub> S	Hypolimnion, über Grund	Photometrie??? Qualitativer Nachweis (Geruchsprobe /Bleiacetatpapier)			
Gesamt-N (Kjeldahl-N)	Mischproben lt. Probenahme, Hypolimnion, über Grund	Aufschluss unter Rückflusskühlung NH <sub>4</sub> Photometrie	EN 25663 H11	0,05 mg/L	0,01 mg/L
SiO <sub>2</sub> -Si	Mischproben lt. Probenahme, Hypolimnion, über Grund	ICP / AES	DIN 38406 E22 / EN 11885	0,05 mg/L	0,01 mg/L
Ca	Mischproben lt. Probenahme, Hypolimnion, über Grund	ICP / AES	DIN 38406 E22 / EN 11885	1 mg/L	0,1 mg/L
Mg	Mischproben lt. Probenahme, Hypolimnion, über Grund	ICP / AES	DIN 38406 E22 / EN 11885	1 mg/L	0,1 mg/L
Säurekapazität pH4,3	Mischproben lt. Probenahme, Hypolimnion, über Grund	Titrimetrie	DIN 38409 H7	0,05 mmol/L	0,01 mmol/L
Chlorophyll-a	Mischproben lt. Probenahme	Photometrie	DIN 31412 L16	0,1 µg/L	0,1 µg/L
Phytoplankton	Mischproben lt. Probenahme	ATT TI7	CEN-Entwurf	-	
Diatomeenanalyse	Aus Mischproben lt. Probenahme, regelmäßig Aus dem Profundalsediment, einmalig				

### 1.2.3 Entnahme und Konservierung der Phytoplanktonproben (Lugolproben)

Die Mischproben aus der Beprobung der einzelnen Tiefenstufen bzw. aus dem Summenschöpfer werden sanft gemischt (Rühren). Dabei ist darauf zu achten, dass jedes Umfüllen der Wasserprobe in Messzylinder und Umschütten den pH-Wert der Probe verändern kann, was zum Zerplatzen der unfixierten Zellen und zum Auseinanderfallen der Kolonien von Flagellaten und anderen sensiblen Arten führen kann. Der Inhalt des Summenschöpfers muss vor der Probenabfüllung vollständig in ein Gefäß gegeben werden, damit mögliche Schichtungen der Probe im Schöpfer beseitigt werden. Mit einem Messbecher wird eine Teilprobe aus der gut durchmischten Gesamtprobe entnommen und eine Teilmenge des Messbecherinhaltes zur Spülung verworfen. Die Flaschen werden nur bis 1-2 cm unterhalb der Öffnung bzw. zu 80-90% gefüllt, um die spätere Homogenisierung der Probe zu ermöglichen. Ein Überfüllen der Flaschen führt dazu, dass die Probe zur Teilprobenentnahme nicht homogen suspendiert (aufgeschüttelt) werden kann.

Zunächst erfolgt die Entnahme einer Probe aus der Mischprobe. Bei eu- bis hypertrophen Seen werden 100 ml Flaschen und bei oligo- bis eutrophen Seen 250 ml Flaschen verwendet. In Gewässern mit einer Sichttiefe über 10 m müssen 500 ml der Mischprobe entnommen werden. Die Probe wird in der Glasflasche mit einer alkalischen Lugolschen Lösung mit N-Acetat fixiert (mod. nach Utermöhl 1958).

Herstellung von Lugol'scher Lösung: 10 g Kaliumjodid werden in 20 ml Wasser gelöst und dazu 5 g Jod (doppelt sublimiert) hinzugegeben. Nach gänzlicher Lösung weitere Zugabe von 50 ml Wasser und 5 g Natriumazetat. Aufbewahrung in 100-ml-Enghalsfläschchen aus Neutralglas mit einem eingeschliffenen, gut passendem Glasstopfen (vgl. Anhang 1).

Es werden auf 240 ml Probe 8-10 Tropfen (ca. 0,5 ml) der konzentrierten Lugol'schen Lösung als Fixierungsmittel zugegeben und die verschlossene Flasche sanft zur Vermischung geschwenkt (cognacfarben, genaue Angaben siehe Anhang 1). Die Lugol-Proben dürfen beim Transport nicht in direkter Sonne stehen und sich nicht erwärmen.

**Hinweis zur Probenaufbewahrung:** Die lugolfixierten Phytoplanktonproben sollen in den Enghals-Glasflaschen (4°C, aber kein Frost!) und im Dunkeln nicht länger als 6 Monate bis zur Auswertung aufbewahrt werden (s. CEN-Norm-Entwurf). Der nach CEN (2005) vorgesehene Zusatz von Formaldehyd für längere Lagerzeiten kann aus Gründen des deutschen Arbeitsschutzes nicht empfohlen werden. Die Proben sollten möglichst erschütterungsfrei gelagert werden. Die Flaschen sollten wegen der Gefahr undichter Verschlüsse sowie Verringerung der Diffusion des Jod durch den Kunststoffdeckel aufrecht lagern. Wegen der Jod-Diffusion durch die Wände sowie dem damit verbundenen Verlust der Durchsichtigkeit der Flaschen dürfen keine Kunststoffflaschen verwendet werden.

Durchsichtige Flaschen sollten genommen werden, um bei Lagerung die Färbung bzw. Entfärbung der Probe leichter kontrollieren zu können. Bei Entfärbung müssen die Proben nachfixiert werden. Vorsicht, nicht zu stark nachfixieren (cognacfarben).

Es wird empfohlen, eine Lebendprobe (mind. 500 ml, kühl und dunkel halten!) zur späteren Sedimentation in Utermöhllkammern zu entnehmen, wenn diese spätestens am Tag nach der Probenahme vom mikroskopischen Bearbeiter analysiert werden kann. Die Entnahme einer Netzprobe (20-30µm) als Lebendprobe wird ebenfalls empfohlen, wenn diese spätestens am Tag nach der Probenahme mikroskopisch ausgewertet werden kann.

Lugolfixierte Netzproben (10 µm) sollten für das Erkennen von Entwicklungsstadien entnommen werden, da hierdurch seltenere Formen angereichert werden.

### **1.3 Probenahmenvorschrift für Diatomeenproben (Profundal- und Pelagialdiatomeen)**

#### **1.3.1 Vorschrift zur Probenahme von Diatomeenresten im Profundalschlamm (Profundaldiatomeen)**

##### **1.3.1.1 Probenahme**

Die Schalen der im Freiwasser, am Gewässergrund und auf Makrophyten wachsenden Diatomeen bilden wesentliche Bestandteile der sich am Seegrund bildenden Mudden. Die Mude an der tiefsten Stelle eines Sees enthält eine zumeist gut zeitlich geordnete Abfolge der Diatomeenflora des Sees. Eine Probe aus dem obersten Zentimeter des Profundalschlammes von der tiefsten Stelle eines dimiktischen Sees enthält durchschnittlich ca. 80 % planktischer Formen und ca. 20 % benthischer Formen. In polymiktischen Seen kann der Anteil benthischer Formen überwiegen.

Aus der Zusammensetzung der Diatomeenreste von Profundalproben lassen sich Rückschlüsse auf die mittleren Nährstoffkonzentrationen im Pelagial und im Benthos des Sees und damit auf die Trophie des Untersuchungsgewässers ziehen. Für die Untersuchung der Diatomeen im Profundalschlamm genügen ca. 10 ml halbflüssigen Materials (sogenannten Präsediments) von der Sedimentoberfläche. Der oberste Zentimeter integriert in etwa die Diatomeen der letzten 3 (2 - 6) Jahre. Insofern führen Probenahmen aus allen Jahreszeiten zu gleichen Ergebnissen und der Zeitpunkt der Probenahme während der Saison kann beliebig gewählt werden.

Die Probenahme erfolgt von einem Boot aus, das über der tiefsten Stelle des Sees verankert wird. Ideal geeignet zur Entnahme von Profundalproben sind Röhrensammler. Diese bestehen aus einem möglichst durchsichtigen Kunststoffrohr (Polyethylenterephthalat ("Makrolon"), PVC oder Plexiglas)), das auf mindestens 20-30 cm Länge senkrecht ins Sediment eingedrückt wird. Der Durchmesser des Rohrs sollte mindestens 4 cm betragen, damit ein möglichst großer Zentralbereich des Sedimentkerns ungestört bleibt und nicht durch Wandreibung beeinflusst wird. Entscheidend ist, dass das Kunststoffrohr vor dem Herausziehen aus dem Sediment verschlossen wird. Bei Sedimentstechern mit langen Rohren und lediglich oberseitigem Verschluss, wie sie in Flachseen zum Einsatz kommen können, ist es hilfreich, das Rohr bis in die stärker verfestigte Mude zu drücken. Diese bildet einen relativ festen Pfropfen am Boden des Rohrs und verhindert in Verbindung mit dem hydraulischen Dichtschluss der Oberkante das Herausrutschen des Sedimentkurzkerns. Die Eintauchtiefe des Rohrs in das Sediment sollte jedoch nur soweit reichen, dass ein Wasserüberstand von mindestens 3 cm über dem frischen Präsediment immer im Rohr verbleibt. Bei beschwerten Fallrohren (z.B. UWITEC-Corer der Fa. Niederreiter, Mondsee oder Piston-Corer), wie sie gewöhnlich in tiefen Seen zum Einsatz kommen, ist zusätzlich ein unterer Verschlussmechanismus wichtig, damit der Sedimentkurzkern ungestört ins Boot gebracht werden kann.

Gut geeignet sind auch kastenförmige Bodengreifer (z. B. nach Ekman & Birge), die eine repräsentative Beprobung des weichen Seegrundes über der tiefsten Stelle gestatten.

Entnommen wird eine Menge von ca. 10 ml frischen halbflüssigen Grundschlamm vom Zentrum der obersten Zentimeterlamelle des Bohrkerns bzw. der Greiferprobe. Dazu ist ein Esslöffel aus Edelstahl ideal geeignet. Steht, wie im Regelfalle, die Sedimentoberfläche nicht direkt an der Oberkante des Rohrs an, muss die Oberkante des Sedimentkerns mit größter Vorsicht langsam von unten bis zur Rohroberkante emporgedrückt werden.

Nur die ca. 10 ml der halbflüssigen Probe werden ohne zusätzliches Wasser in einen in jedem Drogeriefachgeschäft erhältlichen Polyethylen-Gefrierbeutel mit einem Fassungsvermögen von ca. 1 Liter gefüllt. Dieser wird nach dem Einfüllen der Probe fest zugeknötet, wobei möglichst wenig Luft eingeschlossen bleiben sollte. Der verknotete Beutel wird in einen zweiten gleich großen Gefrierbeutel gegeben. Bevor dieser ebenfalls verknotet wird, wird ein ca. 5 x 8 cm großes Etikett aus stabilem weißem Laserdruckerpapier mit Bleistift (Härtegrad B ist ideal) beschriftet und zwischen die beiden Beutelwände so platziert, dass es von außen möglichst lesbar ist. Auf dem Etikett notiert werden sollte der Name des Sees mit dem nächstgelegenen größeren Ort, die Probenahmetiefe, das Probenahmedatum und möglichst auch der Name des Sammlers, in der Form des nachstehenden Beispiels:

Wittwensee bei Rheinsberg (BB) Profundalschlamm aus 11,9 m Tiefe 12.03.2003 leg. G.Walter, IaG Seddin
--

#### **1.3.1.2 Proben transport und -aufbewahrung**

Die Proben sollten kühl ( $< 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) und stoßfrei in einem stabilen, innen glatten oder gepolsterten Gefäß transportiert werden. So können weit über 20 Beutel mit Proben zusammen in einem Behälter transportiert werden, die sich gegenseitig stabilisieren und schützen. Die doppelt eingetüteten, verknoteten Proben werden samt eingeschlossenem Etikett im Gefrierschrank aufbewahrt und sind darin praktisch unbegrenzt haltbar. Vor der Aufbereitung sollten sie möglichst nicht aufgetaut werden. Am zweckmäßigsten ist es, nach Entfernung der Gefrierbeutelhülle den gefrorenen Schlammwürfel direkt in das für die Probenaufbereitung mit Salzsäure vorgesehene Becherglas zu geben.

#### **1.3.2 Vorschrift zur Probenahme von Diatomeen aus dem Pelagial**

**Variante 1:** Für die Diatomeenanalyse wird zusätzlich regelmäßig eine unfixierte Probe von möglichst 1000 ml (bei eu- bis hypertrophen Seen auch weniger) mit einem Handfiltriergerät über einen Celluloseacetatfilter ( $< 4\text{ }\mu\text{m}$  Porenweite) direkt vor Ort filtriert und luftgetrocknet in einer Petrischale beschriftet aufbewahrt. Dieser Filter ist bei Raumtemperatur zu lagern. Die Diatomeenschalen können vom Filter für die weitere Präparation durch Wasser mit einer Spritzflasche abgespült werden. Steht eine Handfiltration nicht zur Verfügung, kann die Filtration im Labor durchgeführt werden, sofern dies noch am selben Tag erfolgt.

**Variante 2:** Alternativ werden 1000 ml Probe (bei eu- bis hypertrophen Seen auch weniger) ins Labor gebracht und dort auf 50-100 ml eingeeengt und anschließend mit Formalin (5 % Endkonzentration) fixiert. Diese fixierten Proben können dann bis zur Präparation der Diatomeen ca. 1 Jahr gelagert werden. Wenn eine Lebendprobe genommen wurde, kann von

diesem Material anschließend unfixiert der Aufschluss (s. Kap. 2.6) durchgeführt werden, wodurch der Einsatz von Formalin entfällt (Arbeitsschutz).

## 2 Teil 2: Taxonomische Analyse und Utermöhl-Methode (Mikroskopie)

Für das Bewertungsverfahren wird eine quantitative Bestimmung des Phytoplanktons in Sedimentationskammern mit Diametralzählung (auch Transekt- oder Streifenzählung genannt) nach der UTERMÖHL-Methode (Utermöhl 1958) an einem inversen Mikroskop gefordert.

### 2.1 Geräteanforderungen

Die mikroskopische Ausrüstung sollte mindestens folgenden Umfang haben:

- Umkehrmikroskop (s. CEN-Normentwurf) mit Objektträgertisch zur Aufnahme von Sedimentationszählkammern mit einem Durchmesser von 25-27 mm
- Fototubus mit Ausgang für Foto- bzw. Video- oder Digitalkamera
- 10- bis 12,5-fach Okulare mit einem Zählfeld oder einem verstellbaren Zählstreifen sowie mit einer feinen Messskala mit 200 Einheiten (Messokular)
- Objektive: 10-fach Phaco NA 0,25; 20- oder 25-fach Phaco, NA 0,45; 40-fach Phaco, NA 0,65 und / oder Interferenz (DIC); 100-fach Phaco. NA 1,25.
- Kondensator mit NA mindestens 0,5 und 7 mm Arbeitsabstand für Phaco-Objektive (auch für Objektiv 100 x)
- Runde UTERMÖHL-Sedimentationszählkammern mit austauschbarem Glasboden mit einer Dicke 0,16 bis 0,2 mm (z.B. Hydrobios (Abb. 2.1), Verbundkammern (Zeiss-Jena 25 mm)). Falls das Kammervolumen werksmäßig nicht angegeben ist, müssen der Kammerdurchmesser und die Kammerhöhe (mit eingebautem Bodenglas!) auf 0,01 mm mit einer genauen Präzisionsschieblehre ermittelt werden. Die Kombination verschiedener Fabrikate darf nur erfolgen, wenn der Kammer- und Röhrendurchmesser genau gleich sind. Das sich damit ergebende Sedimentationsvolumen muss dann neu berechnet werden. Für kombinierte Röhrenkammern z.B. von Hydrobios gilt das auf den Röhren angegebene Volumen nur in Verbindung mit der entsprechenden Hydrobios-Plattenkammer.



Abb. 2.1: Kombinierte Plattenkammer von Hydrobios

- Gläser zur Abdeckung der Kammer (42 mm x 42 mm und 1,2mm dick) und runde Deck-scheiben (Durchmesser 33 mm, 3 mm dick) zur Abdeckung der Sedimentationsröhren

- Runde Kammer- bzw. Röhrenaufsätze mit kalibrierten Volumen von 10 ml, 25 ml und 50 ml (Kombinationsvolumen s.o.)

## 2.2 Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung dient der erforderlichen Anreicherung der fixierten Originalprobe in einer Zählkammer, um eine ausreichende Anzahl von Zellen auf der festgelegten Zählfläche der Kammer bei optischer Vergrößerung am Umkehrmikroskop zu erhalten. Die runden Kammeraufsätze werden nach dem Sedimentationsvorgang (4 Stunden pro cm Kammerhöhe, s.a. Tab. 2.1) von der darunter liegenden Zählkammer abgeschoben.

**Tabelle 2.1:** Absetzzeit der Lugol fixierten Proben (HELCOM 2001)

Kammervolumen	Höhe der Kammer	Absetzzeit
ml	cm	Std.
2	1	4
10	2	8
25	4,5	18
50	9,5	38

Da die Zellkonzentration in Abhängigkeit von der Taxazusammensetzung, dem Gewässertyp und der Saison sehr stark schwanken kann, sind Orientierungswerte zur Auswahl des benötigten Absetzvolumens hilfreich. Die Chlorophyll a-Konzentration der Probe ist als Biomasseindikator des Phytoplanktons dazu am besten geeignet, und muss deshalb dem biologischen Bearbeiter vor der mikroskopischen Analyse übergeben werden. Die ATT T17 (Hoehn et al. 1998) bietet dazu folgenden Orientierungsvorschlag (Tabelle 2.2).

**Tabelle 2.2:** Wahl der Kammeraufsatzvolumina in Abhängigkeit von der Chl a-Konzentration

Chl a-Konzentration	Kammeraufsatzvolumen
0 – 0,5µg/l	2 x 50 ml-Kammeraufsatz
0,5 – 2 µg/l	50 ml-Kammeraufsatz
2 – 5 µg/l	25 ml-Kammeraufsatz
5 – 10 µg/l	10 ml-Kammeraufsatz
> 10 µg/l	Probe verdünnen.

Setzt man bei hohen Algendichten nur das Zählkammervolumen unverdünnt ohne Röhrenaufsatz an, muss die Gleichverteilung der Partikel geprüft werden, da diese durch Zusam-

menballung von Organismenfäden erheblich gestört sein kann. Deshalb ist für Proben, in denen fädige Algenarten (z.B. Oscillatoriales; *Aulacoseira*) häufig sind, eine Verdünnung der Probe erforderlich. Es hat sich für eine bessere Gleichverteilung bewährt, die Probe vorab in einem Messzylinder mit Gummistopfen definiert zu verdünnen (z.B. 1 Teil Probe auf 19 Teile entgastes Wasser, zur Entgasung das Wasser abkochen oder mit Ultraschall behandeln, Leitungswasser verwendbar – jedoch nicht destilliertes Wasser, da die Zellen sonst wegen des osmotischen Druckes zerplatzen). Die verdünnte, vorsichtig durch Umschwenken homogenisierte Probe wird danach wieder in einem 10 ml Kammeraufsatz zur Sedimentation angesetzt.

Cyanobakterien, z.B. *Planktothrix*, können zur Flotation (Auftreiben) neigen, wodurch bei der Utermöhl-Zählung Minderbefunde entstehen. Durch eine kurze Ultraschallbehandlung (ca. 20 sec) werden die Gasvakuolen der Zellen aufgebrochen ohne dass bereits andere Zellen zerstört werden, wodurch ein hoher Anteil aller Fäden sedimentiert.

Eine Aufkonzentration der Probe durch Zentrifugation ist für die quantitative Bestimmung nicht zu empfehlen, da es zu Verlusten durch Wandeffekte und zum Zerplatzen fragiler Algenzellen führt. Hierfür eignet sich das Verfahren der Vorsedimentation (ATT T17, Anhang 1). Die Hinweise zur Probenvorbereitung, insbesondere des Füllens der Kammern (Temperaturangleichung aller verwendeten Materialien und Proben etc.) und der Überprüfung der Partikelgleichverteilung in den abgesetzten Kammern aus dem CEN-Norm-Entwurf sowie ATT T17 müssen beachtet werden.

## **2.3 Anforderung an die mikroskopische Auswertung von Phytoplanktonproben**

### **2.3.1 Erstellung einer Zählliste**

Vorab wird eine Taxaliste erstellt, die die Zählliste vorbereitet und die dominanten Arten bestimmt. Dabei werden die Bezeichnungen und ID-Nummern der harmonisierten Taxaliste zum Phytoplankton Deutschlands verwendet. Zu verwendende Bestimmungsliteratur findet sich in Mauch et al. (2003).

Die taxonomische Differenzierung soll mindestens nach dem in der Taxaliste enthaltenen Mindestbestimmbarkeitsniveau erfolgen (Anlage 18.3), wobei darin noch unterschiedliche Bestimmungstiefen für eine Gattung angeboten werden. Um den Bestimmungsaufwand zu begrenzen, wird das höchste Bestimmungsniveau, i.d.R. die Artbestimmung, mindestens für alle biomassedominanten Taxa (Definition s.w.u.) gefordert, da diese bei der Bewertungsberechnung durch ihren hohen Dominanzwert ausschlaggebend sind. Für die subdominanten Taxa kann auch das Gattungsniveau verwendet werden, sofern in dieser Gattung keine einzelne Art als Indikatortaxa für das Bewertungsverfahren ausgewiesen wurde (s. diesbezügliche Spalten in der Taxonliste). Diese Gattungen sind durch die Spalte "Ungeeignetes Bestimmungsniveau" ausdrücklich als unzulässig gekennzeichnet. Die Zählliste sollte zusätzlich Größenklassen für solche Taxa enthalten, deren Zelldimensionen stark variieren können (z. B. *Peridinium cinctum*; s. Ausweisung in der Taxaliste), um die Berechnung des Biovolumens zu erleichtern. Für das Bewertungsverfahren werden Taxa herangezogen, die unter definierten Bedingungen der UTERMÖHL-Methode (Mindestzählfläche und –objektzahl) quan-



titativ erfasst d.h. ausgezählt wurden. Insofern ergibt sich keine vollständige Taxaliste, da immer nur ein bestimmter Flächenbereich einer Zählkammer durchmustert wird.

### 2.3.2 Zählstrategie für die quantitative Auswertung

Die Zählstrategie soll sowohl kleinzellige als auch großzellige Arten mit ähnlicher statistischer Nachweisgrenze sicher erfassen und den Zählaufwand möglichst klein halten. Um die erforderlichen Indikatortaxa sicher zu erfassen, sollen als Minimum 10 Taxa mit einer vorgegebenen Stichprobe (Objektzahl und Zählfläche) ausgezählt werden, die den Hauptteil des Gesamtbiovolumens stellen (ca. 90%). Jede biomassedominante Art stellt in der Regel mehr als 4% am Gesamtbiovolumen. Nach diesen Anforderungen ist die Zählstrategie in Anlehnung an die ATT T17 und den Anforderungen der WRRL so zu wählen, dass

- **mindestens 400 Objekte** insgesamt gezählt werden,
- mindestens die **15 - 20 biomassedominanten Arten** erfasst werden (ggf. auch weniger bei sehr artenarmen Planktonbiozönosen in ultraoligotrophen bis mesotrophen Seen jedoch mehr als 9 Taxa), die nach einer mikroskopischen Sichtung der Probe in einer Zählliste aufgestellt wurden,
- die **Auszählung bei zwei verschiedenen mikroskopischen Vergrößerungen** erfolgt: eine Auszählung bei ca. 400-facher Vergrößerung für Arten mit kleinen Zellen **mit mindestens 60 Zellen je Art** bei den (nach der Zählzahl) dominanten Arten auf einer kleinen Kammerfläche (2 Zählstreifen) und eine weitere Auszählung bei ca. 200-facher Vergrößerung auf einer großen Kammerfläche (halbe bis gesamte Kammer) für Kolonien (z.B. *Fragilaria crotonensis*) und große Panzerflagellaten (z.B. *Ceratium*) **mit mindestens 20 Zellen je dominanter Art** (nach der Zählzahl) erfolgt.
- die **Zählung der biomassedominanten Taxa mit einem weiten Größenspektrum in Größenklassen erfolgt**: Für Phytoplanktonarten, deren Individuen erheblich in der Zellgröße variieren, sollen Größenklassen ihrer größten Zelldimension (z.B. Durchmesser oder Zelllänge) im Zählprotokoll gebildet werden und die Individuen den Größenklassen bereits bei der Zählung nach Zellgröße durch die Verwendung der Messskala im Okular zugeordnet werden. Die Zellzahl und das Biovolumen der Größenklassen eines Taxons werden im Endergebnis aufsummiert und nur einer Taxon-Kennnummer zugeordnet (Ausnahme *Cryptomonas*).
- **Artbestimmung der Diatomeen anhand von extra angefertigten Schalenpräparaten**: Viele Diatomeenarten können in der Sedimentationskammer **nicht** sicher bestimmt werden. Deshalb wird der Anteil der Arten in einem Diatomeenschalenpräparat als relativer Anteil an einer Größenklasse bestimmt und anschließend dem Zählergebnis der gleichen Größenklasse proportional zugeordnet (Kap. 2.6).
- **das Biovolumen anhand von Standardzellvolumina berechnet wird**: Das Taxon-Biovolumen ergibt sich aus der Multiplikation des mittleren Zellvolumens und der Zelhäufigkeit. Das Gesamtbiovolumen stellt die Summe aller Taxa-Biovolumina pro Liter Probe dar (ohne heterotrophe Flagellaten).

Die Bestimmung der Zellhäufigkeiten erfolgt grundsätzlich auf der Basis von Einzelzellen. Dazu sind bei fädigen und bei sehr größenvariablen Formen besondere Zählstrategien erforderlich:

Fädige Taxa werden in Einheiten (z. B. 10 µm lange Stücke) gezählt. Zur Berechnung werden die Einzellängen der Trichome (Fadenstücke) aufsummiert. Dann muss die Zelllänge von mindestens 20 Zellen bestimmt werden. Aus der Fadengesamtsumme wird durch Division mit der mittleren Zelllänge die Anzahl an Einzelzellen errechnet.

Zählkategorien in Größenklassen werden für größenvariable Taxa gebildet (Beispiel“ Cryptomonas“ oder „centrale Diatomeen“). Diese Taxa sind in der Mindestbestimmbarkeitsliste extra ausgewiesen. Es ist für die einzelnen Größenklassen wie für die wenig größenvariablen Taxa erlaubt, **Standardbiovolumina** für das Zellvolumen zu verwenden, die aus eigenen Vermessungen oder aus der Literatur entnommen sind. Werden die größenvariablen Taxa nicht in Größenklassen ausgezählt, ist immer die Ermittlung des mittleren Zellvolumens durch die Vermessung von mindestens 20 Zellen je Taxon erforderlich (s. Kap. 2.4).

Die Zellzahl (Zellen/ml) ermittelt sich für jedes Taxon (ZZx) nach der Formel (ATT T17):

	Anzahl ausgezählter Zellen x Gesamtfläche der Kammer	[n x mm <sup>2</sup> ]
ZZx (n/ml) =	—————	
	Absedimentiertes Probenvolumen x ausgezählte Kammerfläche	[ml x mm <sup>2</sup> ]

Neben den mindestens 10 dominanten Taxa werden auch alle weiteren, auf der festgelegten Zählfläche ermittelten Taxa im Ergebnisprotokoll mit einer Zellzahl berechnet, auch wenn die Anzahl der ausgezählten Zellen dieser selteneren Taxa unterhalb von 20 liegt.

## 2.4 Bestimmung von Zellvolumina

Die Bestimmung des artspezifischen Zellvolumens eines Taxons, das sogenannte Verdrängungsvolumen, basiert auf der bekannten Formel-Berechnung eines geometrischen Körpers, welcher der Zellform der Art möglichst ähnlich ist. Eine umfangreiche Formelsammlung und eine Beschreibung der Vorgehensweise findet sich dazu in ATT T17 (Hoehn et al. 1998). Durch Vermessung der Dimensionsachsen von mindestens 20 Zellen der gleichen Art, der Berechnung des Zellvolumens jeder einzelnen vermessenen Zelle und einer Medianwertbildung über alle vermessenen Zellen ergibt sich das selbstermittelte Standardzellvolumen (MBV) für ein Taxon. Dieser Standardwert kann auch für weitere Termine verwendet werden. Eine Überprüfung von verwendeten Standardzellvolumina (d.h. Ergänzung von neuen Messungen und damit eine neue Medianwertberechnung) ist immer dann nötig, wenn ein Taxon über 50% das Gesamtbiovolumens bildet sowie bei allen größenvariablen Taxa. Für Letztere wird eine Zählung in Größenklassen empfohlen, wodurch eine Änderung der mittleren Zellgröße durch die unterschiedliche Zuordnung zu den Größenklassen bereits bei der Zählung erfasst wird. Für die Größenklassen kann wiederum ein Standardbiovolumen für das Klassenmittel berechnet und für alle Termine eingesetzt werden.

Die Standardvolumina für nicht sehr größenvariable Taxa können auch aus Literaturangaben von ähnlichen Gewässertypen entnommen werden (s. Geißler & Kiss 2003; Hoehn et al.

1998; Krienitz 1990; Pohlmann & Friedrich 2001; Tümping & Friedrich 1999; und Anhang 1.1). Dies ist v.a. dann zulässig, wenn bei seltenen Arten keine ausreichende Anzahl von Messungen gewährleistet ist.

## 2.5 Berechnung der Taxabiovolumina

Zur Berechnung der Taxabiovolumina (Biovolumen aller Zellen einer Art in der Probe) wird die ermittelte Zellzahl mit dem Standardzellvolumen (MBV in  $\mu\text{m}^3$ ) oder mit dem selbst ermittelten, mittleren Zellvolumen eines Taxons multipliziert.

$\text{Taxonbiovolumen [mm}^3\text{/l]} = \frac{\text{Zellzahl [n/ml]} \times \text{MBV [\mu m}^3\text{]}}{1.000.000}$
--

Folgende mathematische Zusammenhänge werden dabei zum allgemeinen Verständnis aufgeführt:

$$\mu\text{m}^3/\text{Ind.} \cdot \text{Ind./mL} = \mu\text{m}^3/\text{mL}$$

wenn dabei gelten muss:

$$\begin{aligned} 1 \text{ mm}^3 &= 1 \text{ mm} \cdot 1 \text{ mm} \cdot 1 \text{ mm} \\ &= 1.000 \mu\text{m} \cdot 1.000 \mu\text{m} \cdot 1.000 \mu\text{m} \\ &= 1.000.000.000 \mu\text{m}^3 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 1 \mu\text{m}^3/\text{mL} &= (1/1.000.000.000) \text{ mm}^3 / (1/1.000) \text{ L} \\ &= (1/1.000.000) \text{ mm}^3/\text{L} \end{aligned}$$

$$1.000.000 \mu\text{m}^3/\text{mL} = 1 \text{ mm}^3/\text{L}$$

$$\Rightarrow 10^6 \mu\text{m}^3/\text{mL} = 1 \text{ mm}^3/\text{L}$$

### Herleitung der Beziehung von Biomasse zu Biovolumen:

bei Annahme Dichte der Organismen wie Wasser =  $1,0 \text{ g/cm}^3$  (LOHMANN 1906/1908):

$$1 \text{ g} = 1 \text{ cm}^3 = 1 \text{ mL} = (10 \text{ mm} \cdot 10 \text{ mm} \cdot 10 \text{ mm}) = 1.000 \text{ mm}^3$$

$$(1/1.000) \text{ g} = 1 \text{ mg} = 1 \text{ mm}^3 = (1/1.000) \text{ mL} = 1 \mu\text{L}$$

$$1.000 \mu\text{g} = 1 \text{ mm}^3$$

$$1 \mu\text{g} = (1/1000) \text{ mm}^3 = (1/1.000) \mu\text{L}$$

$$1 \mu\text{g} = ((1.000 \mu\text{m} \cdot 1.000 \mu\text{m} \cdot 1.000 \mu\text{m}) / 1.000) = 1.000.000 \mu\text{m}^3$$

### ⇒ Biomassen- und Biovolumen-Angaben:

- ⇒ 1 µg/L            = 1 mm<sup>3</sup>/m<sup>3</sup>  
⇒ 1 mg/L            = 1 cm<sup>3</sup>/m<sup>3</sup> = 1 mm<sup>3</sup>/L

## 2.6 Diatomeenschalen – Präparate und Auswertung

Die Diatomeen sind eine wichtige Phytoplanktongruppe in Seen. Ihre Artenzusammensetzung hat einen hohen Indikationswert. Da die meisten Arten nicht in den Sedimentationskammern bestimmt werden können, müssen dazu Diatomeenschalenpräparate angefertigt werden. Rein benthische Pennales sollen bei der Bewertung des Phytoplanktons hingegen nur als Sammelgruppe eingehen, da diese bereits im Bewertungsverfahren Phyto­benthos (Aufwuchsalgen) enthalten sind. Das Diatomeenpräparat dient somit auch zur Dokumentation der Bestimmung und ggf. auch der Auszählung (s.u.) der planktischen Pennales, die bei der Zählung in der UTERMÖHL-Sedimentationskammer erfasst wurden (z.B. *Fragilaria ulna* var. *acus*), und zur Bestimmung des relativen Anteils der solitären, centrischen Diatomeen an den für die Zählung gebildeten Größenklassen.

### 2.6.1 Probenaufbereitung und Präparation der Profundaldiatomeen

Die Präparation der Diatomeenschalen erfolgt in Anlehnung an Krammer & Lange-Bertalot (1986-1991) und Battarbee (1986) durch einen heißen Sedimentaufschluss mit Salzsäure und Wasserstoffperoxid (Schönfelder 1997). Das Material wird anschließend gewaschen und zentrifugiert, eine gut durchmischte, verdünnte Suspension auf Deckgläschen gleichmäßig verteilt, im Muffelofen bei 450°C getrocknet und auf Objektträgern in Naphrax (Brechungsindex n. D. 1,69) eingebettet. Für die Auszählung und Bestimmung werden von jeder Probe 2 Streupräparate angefertigt.

Die mikroskopische Auswertung erfolgt mit einem Durchlichtmikroskop (NIKON FXA) mit differentiellm Interferenzkontrast (Nomarski DIC) bei einer Endvergrößerung von 12,5 x 60fach bzw. 12,5 x 100fach und numerischen Aperturen der Kondensoren und Objektive von 1,40. Es werden zufällig gewählte, aber sich nicht kreuzende Transekte ausgezählt. Routinemäßig werden in jeder Probe mindestens 400 Diatomeenschalen gezählt. Eine anschließende Durchmusterung jedes Präparates dient dem Nachweis weiterer Taxa, die aufgrund ihrer Seltenheit in der Routinezählung nicht gefunden werden können.

Für Routineauswertungen wird empfohlen, die benthischen Formen lediglich summarisch als „benthische Formen“ mitzuzählen. Der relative Anteil benthischer Formen in Profundalproben ist eng mit dem Anteil an Litoralfäche im See korreliert. Für weitergehende ökologische Analysen wäre eine artgenaue Bestimmung von mindestens 400 benthischen Individuen erforderlich.

Für die Determinationen werden das Bestimmungswerk von Krammer & Lange-Bertalot (1986-1991) sowie Monographien und Arneubeschreibungen der Bibliotheca Diatomologica und Iconographia Diatomologica (Lange-Bertalot, 1993; Lange-Bertalot & Metzeltin, 1996) sowie relevante Einzelveröffentlichungen (z.B. Casper et al., 1992; Klee & Steinberg, 1987; Scheffler et al., 2003; Scheffler et al., 2005) verwendet.

## 2.6.2 Aufbereitung der pelagischen Diatomeenproben

### Material und Geräte:

Zentrifuge, Temperaturregulierbare Heizplatte ( $\pm 5$  C)

Einbettungsmittel: Naphrax (da dieses Material Toluol enthält, wird Naphrax in Deutschland nicht vertrieben. Der Bezug ist nur über den Mikroskopiehandel in Großbritannien möglich z.B. [www.brunelmicroscopes.co.uk](http://www.brunelmicroscopes.co.uk).)

Objektträger und große Deckgläschen

Abzug, Chemikalien ( $H_2O_2$ , HCl-Konz.,  $K_2Cr_2O_7$  oder  $KMnO_4$ )

#### Variante 1: Anreicherung über Membranfiltration direkt nach der Probenahme

Falls direkt im Gelände ein Filterpräparat aus 1000 ml Mischprobe erzeugt wurde, werden die Diatomeenschalen von den Membranfiltern gründlich abgespült, durch Zentrifugation aufkonzentriert und die Proben mehrmals gewaschen.

#### Variante 2: Anreicherung und Konservierung mit Formalin:

1000 ml Probe (aus der Mischprobe) werden nach dem Voredimentationsprinzip (s. ATT TI7, Anhang 1) auf ca. 50 ml angereichert und in kleine Flaschen (50-100 ml) überführt und mit Formalin (Endkonzentration 5%) fixiert. Den Anreicherungsprozess sofort nach der Probenahme im Dunklen und kühl ansetzen. Von dieser fixierten Anreicherung kann dann später - entsprechend dem Ergebnis der Diatomeen in der UTERMÖHL-Zählung - nach ausgiebigem Schütteln ein Aliquot zur Präparation entnommen werden.

Die Proben aus beiden Varianten werden in Wasserstoffperoxid und mit Kaliumpermanganat als Farbkontrolle für das Vorhandensein von organischen Resten bis zur Entfärbung aufgekocht (s. KLEE & STEINBERG (1987) Kap. 3.9, entspricht der Vorschrift des Aufschlussverfahrens für Diatomeen in Anhang 4. Methode VAN DER WERFF)

Die Schalen werden in Naphrax als Streupräparat auf Objektträgern bei exakt 80 C eingebettet.

Im Schalenpräparat müssen die Diatomeen innerhalb der Größenklassen wie bei der Kammerzählung hinsichtlich Art und relativem Anteil spezifiziert werden, sofern sie nicht leicht bestimmbare Arten sind, die im UTERMÖHL-Mikroskop bestimmt werden können (s. dazu Anhang 1; Mindestbestimmbarkeitsniveau).

Die Auswertung von mindestens 400 Schalen erfolgt an einem Lichtmikroskop bei 1000-facher Vergrößerung (Objektiv 100 x). Die Auszählung erfolgt in den gleichen Größenklassen wie die quantitative Auszählung in den UTERMÖHL-Kammern am Umkehrmikroskop. Da Schalen der Centrales kleiner 5  $\mu$ m im Durchmesser infolge Ihrer geringen Größe häufig nur schwer bestimmbar sind, wird diese Größenklasse nicht nach Arten aufgeschlüsselt.

Nachdem die relative Artenzusammensetzung in den Schalenpräparaten ermittelt ist, wird das Ergebnis der taxonomischen Zusammensetzung auf die quantitativen Ergebnisse der UTERMÖHL-Zählung aus den gleichen Größenklassen übertragen. Im Endprotokoll werden die Größenklassen durch die Artbiovolumina ersetzt.

## **2.7 Auswertung der Phytoplanktonzählungen und biovoluminabestimmung**

Die Auswertung der Zählungen kann in einer dafür vorbereiteten Datei eines Tabellenkalkulationsprogramms (Excel) erfolgen, sofern die dort verwendeten Zählkategorien den vorgegebenen Taxa und Größenklassen entsprechen. Andernfalls müssen weitere Zählkategorien mit eigens bestimmten mittleren Zellvolumina angefügt werden. Die Auswertungsdatei wird im Praxistest 2005 erarbeitet und für Seen und Fließgewässer verwendbar sein.

Eine automatisierte Berechnung ist nur möglich, wenn jeder Zählkategorie eine aus der harmonisierten Taxonliste vorgegebene Taxon-Identitätsnummer zugeordnet wird. Damit erhält jedes Zählergebnis auch die DV-Nummer der Taxaliste der Gewässerorganismen Deutschlands (Mauch et al., 2003, Informationsberichte Heft 1/03, Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft) sowie die Zuordnung zum Mindestbestimmbarkeitsniveau und den Verbreitungswerten der Indikatorarten und -gruppen.

Als Zwischenergebnis erhält man eine Liste mit den Spalten: Messort; Datum; Taxon-ID; DV-Nr; Taxonname; mittleres Zellvolumen; Zellzahl (Zellen/ml); Zählkategorie, spezifisches Biovolumen.

### 3 Literatur

- Battarbee, R. W. (1986): Diatom analysis. In: Berglund, B. E. (ed.): Handbook of holocene palaeoecology and palaeohydrology, John Wiley & Sons, Chichester, New York, Toronto, Singapore, 527-569.
- Casper J., Scheffler W., Augsten K. (1992): *Stephanodiscus neoastraea* Hakansson et Hickel (Bacillariophyta, Centrales) in norddeutschen Seen und Flüssen. Arch. Protistenkd. 142, 192-206.
- CEN (2005): CEN-Norm-Entwurf „Water quality – Guidance standard for the routine analysis of phytoplankton abundance and composition using inverted microscopy (Utermöhl technique) prEN 15204 2005, März 2005.
- Geißler, U. & Kiss, L. (2003): Artendiversität und Veränderungen in der Algenflora zweier städtischer Ballungsgebiete Deutschlands Berlin und Hamburg (Diversity and dynamics of the freshwater algal flora in two urban areas of Germany Berlin and Hamburg). Nova Hedwigia Beihefte 126 .J. Cramer in der Gebr. Borntraeger Verlagsbuchhandlung. Berlin, Stuttgart. 777 S.
- HELCOM (2001): Manual for Marine Monitoring in the COMBINE Programme of HELCOM.
- Hoehn, E., Clasen, J., Scharf, W., Ketelaars, H.A.M., Nienhüser, A.E., Horn, H. Kersken, H. & Ewig, B. (1998): Erfassung und Bewertung von Planktonorganismen. ATT Technische Informationen 7 .R. Oldenbourg Verlag München. Siegburg. 151 S.
- <http://www.helcom.fi/Monas/CombineManual2/CombineHome.htm>
- Klee, R. & Steinberg, C. (1987): Kieselalgen bayrischer Gewässer. Information des Bayr. Landesamt für Wasserwirtschaft 4/87 (Loseblattsammlung).
- Krammer, K. & Lange-Bertalot, H. (1986-1991): Süßwasserflora von Mitteleuropa, Bacillariophyceae. 2/1: Naviculaceae, 1-876; 2/2: Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae, 1-596; 2/3: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae, 1-576; 2/4: Achnanthaceae, 1-437; Gustav Fischer, Stuttgart.
- Krienitz, L. (1990): Coccale Grünalgen der mittleren Elbe. Limnologia 21(1): 165-231.
- Lange-Bertalot, H. & Metzeltin, D. (1996): Indikatoren der Oligotrophie. Iconographia Diatomologica 2, Koeltz Scientific Books Koenigstein, 1-390.
- Lange-Bertalot, H. (1993): 85 neue Taxa und über 100 weitere neu definierte Taxa ergänzend zur Süßwasserflora von Mitteleuropa. Bibliotheca Diatomologica, 27, J. Cramer / Gebr. Borntraeger, Berlin, Stuttgart, 1-456.
- Lohmann, H. (1906/1908): Untersuchungen zur Feststellung des vollständigen Gehaltes des Meeres an Plankton. Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen Abt. Kiel 9: 192-194 und 10: 131-370.
- Mauch, E., U. Schmedtje, A. Maetze, & F. Fischer (2003): Taxaliste der Gewässerorganismen Deutschlands, Informationsberichte Heft 1/03. Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft. München. 388. Kostenloser download unter: [http://www.bayern.de/lfw/technik/gkd/lmn/fliesssgewaesser\\_seen/taxa/](http://www.bayern.de/lfw/technik/gkd/lmn/fliesssgewaesser_seen/taxa/)
- Padisák, J., Krienitz, L. & Scheffler, W. (1999): Phytoplankton. In: Tümpling v., W. & Friedrich, G.: Biologische Gewässeruntersuchung. Methoden der biologischen Wasseruntersuchung 2. Gustav Fischer. Jena. 35-53.
- Pohlmann, M. & Friedrich, G. (2001): Bestimmung der Phytoplanktonvolumina - Methodik und Ergebnisse am Beispiel Niederrhein. Limnologia 31: 229-238.
- Rott, E. (1981): Some results from phytoplankton counting intercalibrations. Schweiz. Z. Hydrol. 43(1): 34-62.
- Scheffler, W., Houk, V., Klee, R. (2003): Morphology, morphological variability and ultrastructure of *Cyclotella delicatula* Hustedt (Bacillariophyceae) from Hustedt material. Diatom Research, 18, 107-121.

- Scheffler, W., Nicklisch, A., Schönfelder, I. (2005, in press): Beiträge zur Morphologie, Ökologie und Biologie der planktischen Diatomee *Cyclotella comensis* Grunow. Untersuchungen an historischem und rezentem Material. Diatom Research.
- Schönfelder, I. (1997): Eine Phosphor-Diatomeen-Relation für alkalische Seen und Flüsse Brandenburgs und ihre Anwendung für die paläolimnologische Analyse von Auensedimenten der unteren Havel. Diss. Bot. 283, 1-148.
- Tümping v., W. & Friedrich, G. (1999): Biologische Gewässeruntersuchung. Methoden der biologischen Wasseruntersuchung 2. Gustav Fischer. Jena. 545. 3-437-35170-2.
- Utermöhl, H. (1958): Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. Mitt. Int. Ver. theor. angew. Limnol. 9: 1-38.
- Van der Werff, A. (1955): A new method of concentrating and cleaning diatoms and other organisms. Proc. Int. Assoc. theor. appl. Limnology 13: 276-277.



## **4 Anhänge**

**18.2.1 Anhang 1: Hoehn, E. et al. (1998). ATT T17 (Bestellinformation)**

**18.2.2 Anhang 2: CEN – Norm-Entwurf (separate pdf-Datei)**

**18.2.3 Anhang 3: Integrationsschöpfer**

**18.2.4 Anhang 4: Diatomeen-Präparation nach van der Werff**

## 18.2.1 Anhang 1: Hoehn et al. (1998). ATT T17 (Bestellinformation)

### Erfassung und Bewertung von Planktonorganismen

**Redaktion:** Eberhard Hoehn, Henk A.M. Ketelaars, Bettina Ewig

**Autoren:** Eberhard Hoehn  
LBH Limnologie-Büro Hoehn GmbH, Freiburg  
Jürgen Clasen  
Wahnachtalsperrenverband, Siegburg  
Wilfried Scharf  
Wupperverband, Wuppertal  
Henk A.M. Ketelaars  
Speicherbeckenverband Brabantse Biesbosch, NL-Werkendam  
Anita E. Nienhüser  
Bergisches Wasser und Umweltlabor der BTV-GmbH, Wermelskirchen  
Heidemarie Horn  
Sächsische Akademie der Wissenschaften, Neunzehnhain  
Helmut Kersken  
Hygiene Institut des Ruhrgebietes, Gelsenkirchen  
Bettina Ewig  
LBH Limnologie-Büro Hoehn GmbH, Freiburg

**e-Mail-Kontakt** (Erstautor): lbh@gmx.de

### Druck und Verlag:

Technische Information der Arbeitsgemeinschaft Trinkwassertalsperren e.V. Nr. 7  
2. neu bearbeitete Auflage, Arbeitskreis Biologie

ISBN 3-486-26369-2

Stichworte: Methoden, Limnologie, Planktonuntersuchungen, Trinkwasseraufbereitung

© 1998 R. Oldenbourg Verlag, München, Printed in Germany,  
Druck Center Meckenheim.

152 Seiten, 20 Abbildungen

Eine CD mit Planktonartenlisten (ca. 1.500 Arten) mit Biovolumina und Größenangaben sowie 100 ausgewählte Mikrofotografien aus Laboren der ATT liegt bei (HTML und EXCEL 5.0 für Betriebssystem Windows 3.11 oder höher)

### Zu beziehen bei:

Arbeitsgemeinschaft Trinkwassertalsperren e.V., c/o Aggerverband

Sonnenstr. 40

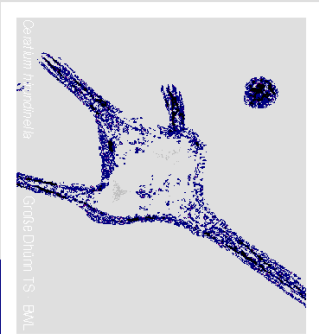
D-51645 Gummersbach

Tel. +49/(0)2261/36-0

Fax: +49/(0)2261/368210

**Preis:** innerhalb Deutschland 23,00 €

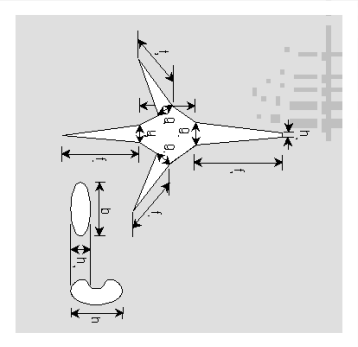
Diese nunmehr völlig neu bearbeitete Technische Information (TI) der Arbeitsgemeinschaft Trinkwassersperren e.V. (ATT) wendet sich an Fachleute in Wasser-Laboratorien und an Limnologen, die gerade auch im Rahmen der Trinkwasserüberwachung regelmäßige Planktonuntersuchungen durchführen. Sie soll zudem einen bedeutenden Beitrag zur Vereinheitlichung der in diesem Fachgebiet angewandten Methoden liefern. Das vorliegende Handbuch umfaßt alle wichtigen Methoden der Planktonuntersuchung in ausführlicher Darstellung.



Ceratium sp. (Schwefel) - Birkbeck-Diagon 15 - BML

Obwohl sich diese TI ganz überwiegend mit der Erfassung und Berechnung von Planktonorganismen befaßt, wird im Hinblick auf die biologische Untersuchung auch auf die Bestimmung von Trinkwasser-Verteilungssystemen mit Invertebraten eingegangen. Es werden die Probenahme und Fixierung der Organismen, der Transport der Proben, die Herstellung mikroskopischer Präparate sowie die für derartige Untersuchungen geeigneten Mikroskope beschrieben.

Gemessene Form	Organismus	Symbol	Berechnungsformel
Doppelkegelsumpf (Zentrum) + 4 Kege- lspitzen	Ceratium	X	$V = (\pi \cdot h \cdot g \cdot (1 + 2 \cdot Z + b^2 + 1,95 \cdot b \cdot (g + g_1) + 2 \cdot (g_1 + g_2)) + \pi \cdot h^2 \cdot (g_1 \cdot (1 + g_1) + g_2 \cdot (1 + g_2 \cdot f)))$
Eisensul (Zentrum) + Kegelsumpf + 3 Kege- lspitzen		x	$V = \frac{\pi \cdot h^2}{12} \cdot (1 + g_1 + g_2 + g_3 + g_4 + g_5) + \pi \cdot h^2 \cdot (1 + h \cdot (h_1 + h_2 + h_3 + h_4 + h_5) + \pi \cdot g_1 \cdot (1 + g_1 \cdot f_1) + \pi \cdot g_2 \cdot (1 + g_2 \cdot f_2))$



Es folgt eine Darstellung der Zähltechnik sowie der Berechnung der Organismendichte und der Biomasse. In diesem Zusammenhang wird auch auf statistische Probleme bei der Plankonzählung eingegangen. Schließlich wird die Darstellung und Auswertung der Ergebnisse anhand einiger ausgewählter Beispiele aus der Praxis beschrieben. Im Anhang finden sich Bezugsquellen für die erwähnten Gerätschaften sowie eine Literaturliste mit der erforderlichen Bestimmungsliteratur. Eine umfangreiche Planktonantafelise von Laboratorien innerhalb der ATT mit Biovolumina und Größenangaben liegt als CD bei.

# ATT Technische Informationen

Arbeitsgemeinschaft  
Trinkwassersperren e. V.  
Arbeitskreis Biologie

Redaktion:  
Eberhard Hoehn  
Henk A. M. Ketelaars  
Bettina Ewig

Erfassung  
und  
Bewertung  
von  
Planktonorganismen

Nr. 7

Oldenbourg

## **18.2.2      Anlage 1.2: CEN – Norm-Entwurf**

**Der neueste CEN-Entwurf (März 2005 = Entwurf Ö-Norm vom 01.06.2005) liegt nur als PDF-Datei vor (siehe separate Datei)**

## 18.2.3 Anhang 3: Integrationsschöpfer

### 1. Summenschöpfer System UWITEC

Der von Fa. UWITEC (Mondsee, Österreich) entwickelte Summenschöpfer arbeitet nach dem Kolbenhubprinzip. 5 L Probenmenge werden mit einem Kolben in den Schöpfer gesaugt. Der Kolben wird über Zahnräder entsprechend der abgewickelten Kettenlänge (= Absenktiefe) bewegt. Es sind 20 m (250 mL/m) oder 10 m (500 mL/m) als Arbeitstiefe möglich. Der Schöpfer kann auch hypolimnische Mischproben bilden.



Abb. 1: Summenschöpfer UWITEC, Foto R. Niederreiter

## **Bedienungsanleitung:**

**Achtung:** Niemals den kleinen Schekel am Ende der Kette entfernen - sonst ist der Schöpfer verloren, nie Gewalt anwenden beim zurückdrehen der Kette mit der Handkurbel. Vor der Probenentnahme: Transportblech (über dem Kettenspeicher) abnehmen. Durch den Transport kann es Verwicklungen in der Kette geben, deshalb sollte einmal wie nachfolgend beschrieben die Kette herausgezogen werden:

Auf das Edelstahlrohr am obersten Ende drücken und an der Schnur ziehen, dann kommt das Seilanschlussstück heraus und die Kette wird dann langsam und gleichmäßig bis zum Ende herausgezogen. Die Kette einfach auf den Boden fallen lassen, dann mit der Handkurbel die Kette wieder in den Kettenspeicher zurückkurbeln. Die Kette soll frei vom Boden über die Kante des Edelstahlrohrs in den Schöpfer laufen! Den Schöpfer hin und wieder etwas schütteln, damit sich kein "Haufen" bildet. Am letzten halben Meter darauf achten, dass die Kette nicht vorläuft (zurückhalten), weil sie sich sonst im Kettenrad verklemmt. Solange Kurbeln bis das Seilanschlussstück im Edelstahlrohr verschwindet und einrastet. Am Seilanschlussstück muss ein Seil oder ein Stück Schnur befestigt sein, sonst bekommt man es nur schwer aus dem Edelstahlrohr heraus.

### **Probenentnahme: 20 m Wassersäule mit 250 ml je Meter.**

Den Schöpfer an ein Windenseil- oder an einer Leine, welche am Boot befestigt sind anschließen (Seilanschlussstück). Dann wird der Schöpfer (oberhalb des Kolbens) befüllt: Den Schöpfer soweit ins Wasser tauchen, bis es über die seitlichen Plexiglasplatten des Kettenspeichers läuft und den weißen Knopf (Entlüftungsventil) neben der Aufhängung (Alurohr) drücken, bis der Schöpfer voll ist. Der blaue Schlauch soll aus dem Wasser ragen, damit die Luft aus dem Schöpfer entweichen kann. Jetzt wird der Schöpfer mit dem Ansaugstutzen in Höhe des Wasserspiegels aufgehängt. Dann drückt man auf das Edelstahlrohr und der Schöpfer taucht ab. Dabei wird die Kette aus dem Kettenspeicher gezogen, wodurch der Kolben proportional zum zurückgelegten Weg im Schöpfer nach oben geht.

Man spürt einen Ruck in der Kette, wenn die Tiefe von 20 m erreicht ist. Die Kette wird von Hand, oder mit einer Winde eingeholt und die Probe kann aus dem Schöpfer entnommen werden. Am besten mit einem 5 Liter Weithalskanister auf den man den Schöpfer einfach draufstellt. Durch den seitlichen Zapfen am Ansaugteil wird das Ansaugventil geöffnet und die Probe fließt in den Kanister. Dabei wieder den weißen Knopf neben der Aufhängung drücken, weil dadurch ein Belüftungsventil im Kolben geöffnet wird. Die Probe kann aber auch durch Anstecken des Schlauchstücks in die Kupplung am Boden des Schöpfers entnommen werden!

Um integrierte Proben aus größerer Wassertiefe zu entnehmen wird der Schöpfer mit einem Seil auf die gewünschte Starttiefe abgesenkt und mittels Fallgewicht (kurzes Rohrstück) ausgelöst!

### **Umrüstung : Beprobung von 10 m Wassersäule (oder weniger) mit je 500 ml je Meter:**

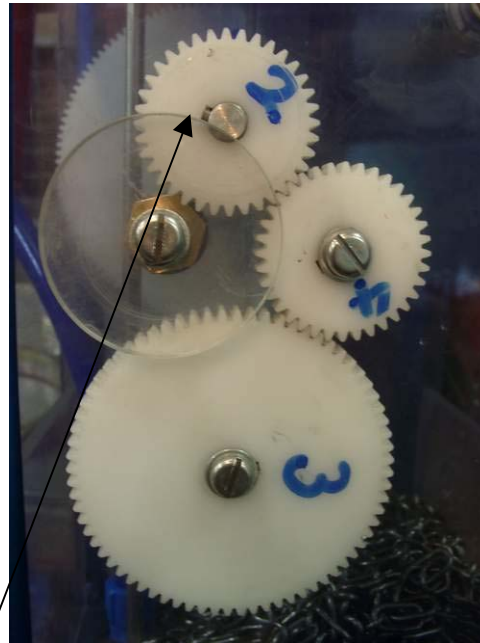
Wenn der Kolben ganz unten ist und das Seilanschlussstück eingerastet ist, wird das Zahnrad 1 (18 Zähne Messing) gegen das Zahnrad 2 (36 Zähne Kunststoff) ausgetauscht.

Plexiglasscheibe abschrauben und darauf achten, dass die kleine Passfeder nicht verloren

geht. Ersatzteil immer mitnehmen. Dann wird die Kette ausgezogen bis der Kolben ca. 2mm vor dem oberen Anschlag steht und dann wird ein kleiner Schekel in die Kette als Begrenzung eingeschraubt. Wichtig, da sonst das ganze Gewicht auf den Zahnrädern liegt und diese zerstört ! Kleinen Schekel am Ende der Kette nie entfernen!

**20m Wassersäule mit 250ml je Meter**

**10m Wassersäule mit je 500ml je Meter**



Passfeder

**Bezugsquelle:**

UWITEC

Moosbachweg 10

A-5310 Mondsee

Österreich

Tel.: 0043/6232/3946

Fax: 0043/6232/394630

e-mail: [richard.niederreiter@uwitec.at](mailto:richard.niederreiter@uwitec.at)

Internet: [www.uwitec.at](http://www.uwitec.at)



## 2. Summenschöpfer System Schröder

Der Wasserschöpfer dient der lückenlosen Entnahme von vertikalen Sammelproben von der Oberfläche bis zu Tiefen von maximal 21 m.

Der Sammler besteht im wesentlichen aus einem unten offenen und oben geschlossenen Zylinder aus organischem Glas. In diesem Zylinder befindet sich ein Hohlkörper von hyperbolischer Trichterform, der am Zylinderdach befestigt ist. Beim langsamen Eintauchen des Gerätes dringt Wasser in den Zylinder und durch ein geöffnetes Ventil in den Trichter ein. Durch die hyperbolische Trichterform erfolgt das Eindringen proportional zur Tiefe. Die eingeschlossene Luft wird ebenso in Abhängigkeit von der Tiefe komprimiert. Beim raschen Herausziehen schließt das vorbeiströmende Wasser das Ventil. Das in den Trichter eingedrungene Wasser bleibt zurück. Die im Trichter und Zylinder komprimierte Luft drückt das in den Zylinder eingedrungene Wasser heraus und strömt zum Teil selbst aus. Der Zylinder wird wegen seines Auftriebes in ein Metallgestell eingebaut (Schröder 1969).

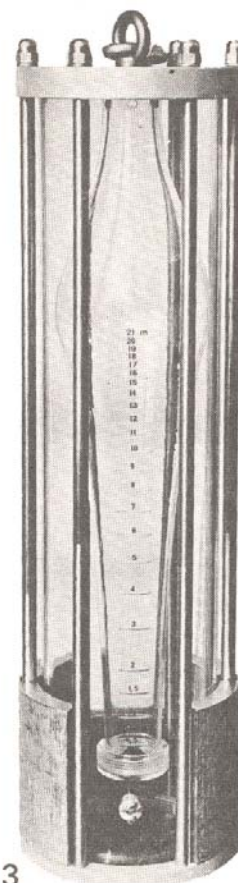
Zulässige Sinkgeschwindigkeit:  $< 1$  m/s. Hochziehen: raschmöglichst

Zur Gewinnung guter Durchschnittswerte wird das Gerät im Bereich der Probennahmestelle mehrere Male hinunter gelassen.

Entnahmevermögen pro Meter:  $40 \text{ cm}^3$ , Gewicht leer ca. 7 kg.



**Abb. 2:** (links) Züllig-Summenschöpfer (nach Schröder), Foto B. Rapp (aus Rapp 1993)



**Abb. 3**

**Abb. 3:** (rechts) Züllig-Summenschöpfer (nach Schröder), Foto Züllig (Katalog 1989)



**Literatur:**

Schröder, R. (1969): Ein summierender Wasserschöpfer. *Arch. Hydrobiol.* **66**: 241-243.

Rapp, B. (1993): Saisonale Artensukzession und Horizontalverteilung des Phytoplanktons in der Trinkwassertalsperre Kleine Kinzig (Nordschwarzwald), Diplomarbeit, Univ. Freiburg, 121 S.

**Bezugsquelle:**

Züllig AG

Rorschacherstr. 30a

CH-9424 Rheineck

Schweiz

Tel: 0041/71/886 91 11

Fax: 0041/71/886 91 66

e-mail: [info@zuellig.ch](mailto:info@zuellig.ch)

Internet: <http://www.zuellig.ch>

Züllig Deutschland GmbH

Moselstrasse 27

63452 Hanau

Telefon 06181 90 08 0

Telefax 06181 90 08 20

### 3. Summenschöpfer System Hydrobios

Fa. Hydro-Bios entwickelt z. Zt. einen sog. „intelligenten Wasserschöpfer“, der als integrierender Wasserschöpfer einzusetzen ist. Dieser arbeitet mit dem Kolbenprinzip und hat 5 L Volumen, mit einer elektronischen Steuerung, welche die Einsatzmöglichkeiten wesentlich erweitert. Die Elektronik wurde als Ableger aus den ozeanographischen Geräten von Hydro-Bios entwickelt und ist dort seit vielen Jahren dauerhaft im Einsatz.

Es kann in einem Einsatz ein integrierendes Profil bis 100 m Wassertiefe gefahren werden, es können frei wählbare Anfangs- und Endtiefen eingestellt werden, aus denen dann jeweils das ganze Volumen als Probe zur Verfügung steht.

Die gewünschte Probentiefe wird vor dem Einsatz über ein außen angebrachtes, wasserdichtes Tastenfeld eingegeben und der Schöpfer ins Wasser gelassen. Die Elektronik steuert die Probennahme druckabhängig, damit immer das gleiche Volumen über die Wassersäule aufgenommen wird. Dadurch wird die Probennahme aus verschiedenen Tiefen sehr einfach und muss evtl. auch nicht zusammengemischt werden.

Falls dauerhaft mehr oder weniger als 5 Liter Probenvolumen gewünscht sind kann der Schöpfer auch mit anderem Volumen hergestellt werden.

Ende August 2005 soll der erste Prototyp fertig sein und dann getestet werden. Ab Ende September 2005 soll das Gerät im Handel sein.



**Abb. 4:** Summenschöpfer Hydro-Bios, Bild J. v .Borries & U. Fischer

**Bezugsquelle:**

HYDRO-BIOS GmbH

Am Jägersberg 5-7

D-24161 Kiel-Holtenau

Tel.: +49-431-36960-0

Fax: +49-431-36960-21

e-mail: [u.fischer@hydrobios.de](mailto:u.fischer@hydrobios.de)

Internet: [www.hydrobios.de](http://www.hydrobios.de)

#### 4. Rohrschöpfer System Pauli

Von Pauli (Limnol. Inst. Univ. Konstanz) entwickelter Wasserschöpfer zur Gewinnung einer Mischprobe der kompletten Wassersäule. Längen in 1 m oder 2 m. Man arbeitet sich in 1-m- bzw. 2-m-Stufen von oben nach unten durch die Wassersäule und sammelt die kompletten Schöpferinhalte auf dem Boot in einem größeren Sammelgefäß (20 - 40 L). Zwei Vollgummibälle verschließen das Rohr indem sie durch ein Zuggummi auf die Rohrenden gepresst werden. Die Gummibälle werden herausgezogen und auf eine Spannvorrichtung gehängt, welche in der entsprechenden Tiefe durch ein Fallgewicht ausgelöst wird. Schöpferinhalt je nach Länge und Durchmesser des Rohres ca. 1,7-3,5 L



**Abb. 5:** Rohrschöpfer (nach Pauli), Foto S. Schmidt-Halewicz (aus Schmidt-Halewicz 1995)

#### Literatur:

Schmidt-Halewicz, S. (1995): Bedeutung des mikrobiellen Nahrungsnetzes und des Zooplanktons in nährstoffarmen Weichwasser-Stauseen unter Berücksichtigung von Trophieveränderung und Versauerung. Dissertation Univ. Freiburg. 235 S.

**Bezugsquelle:** kein kommerzieller Hersteller

Eigenbauten u. a. beim Limnologischen Institut Universität Konstanz und Institut für Seenforschung (LfU Baden-Württemberg) Langenargen

## 18.2.4 Anhang 4: Diatomeen-Präparation nach van der Werff

### Aufbereitung von Diatomeenproben nach der Wasserstoffperoxid-Methode von Van der Werff (1955)

- Material und Geräte:**
- hohe 250-mL-Bechergläser
  - 30%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
  - Heizplatte
  - Kaliumdichromat
  - HCl-Konz.
  - Tischzentrifuge
  - Schraubdeckelgläschen

#### Durchführung:

Frische oder fixierte Diatomeenproben (ca. 25 mL) werden in hohe 250 mL Bechergläser überführt. Etwa 25 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Verhältnis 1 Teilprobe + 1 Teil H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) werden zugegeben und die Proben mindestens über Nacht stehen gelassen.

Auf einer Heizplatte werden die Suspensionen zuerst 30 min bei 80 °C erwärmt, danach 3,5 bis 4 Stunden bei 100 °C. Die Temperaturangaben bezeichnen die Einstellung der Heizplatte, **nicht** die Temperatur der Flüssigkeiten in den Bechergläsern! Droht die Flüssigkeit einzukochen, so muss mit H<sub>2</sub>O verdünnt werden. Ca. alle 30 min sollten die Bechergläser für ein gleichmäßiges Abfließen der Reaktion kurz geschwenkt werden. Nach Beendigung des Kochvorgangs gibt man, noch auf der Heizplatte, pro Probe ca. eine Spatelspitze K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> zur vollständigen Oxidation zu. Hierbei empfiehlt sich diese Zugabe sehr langsam, d.h. Körnchenweise durchzuführen, da heftige Reaktionen entstehen können. Droht eine Probe überzukochen muss sie vorübergehend von der Heizplatte entfernt werden. Nach der hierbei vor sich gehenden, beendeten Farbreaktion nimmt man die Bechergläser von der Heizplatte, versetzt die Suspensionen mit etwas H<sub>2</sub>O-dest und dann mit einigen Tropfen HCl; eine weitere Farbreaktion kann stattfinden. Jetzt werden die Proben nochmals kurz erwärmt und dann endgültig zum Abkühlen beiseite gestellt. Das organische Material ist auf diese Art und Weise fast vollständig entfernt worden.

Der Inhalt der Bechergläser wird nun ca. 15 min bei 2000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und noch dreimal mit H<sub>2</sub>O-dest gewaschen und zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, die abgesunkenen Diatomeenschalen in ein Schraubdeckelgläschen überführt.

#### Literatur

Van der Werff, A. (1955): A new method of concentrating and cleaning diatoms and other organisms. Proc. Int. Assoc. theor. appl. Limnology 13: 276-277.

## Herstellen der Objektträger-Präparate nach Klee & Steinberg (1987)

- Material und Geräte:**
- Heizplatte
  - Mikropipette
  - Naphrax (Vorsicht enthält Toluol)
  - Objektträger
  - Runde Deckgläser (18 mm Ø)

### Durchführung:

Gewaschenes Material verdünnen bis es leicht milchtrüb aussieht. Ggf. mehrere Verdünnungsstufen ansetzen.

50 µL (Mikropipette) auf gut entfettetes (durch erhitzten) Deckgläschen (18 mm Ø) zügig auftropfen und 1 Stunde eintrocknen lassen.

¼ Stunde vor Fertigstellung der Präparate einen Objektträger auf einer Heizplatte bei ca. 150°C erhitzen und mit **2 Tropfen Naphrax** beschicken.

Wenn auf dunklem Untergrund der weißliche Belag nicht mehr glänzt, sind die Deckgläschen fertig. Mit einer feinen Pinzette aufnehmen und kurz auf die Heizplatte legen. Mit der beschickten Seite nach unten auf den Naphrax-Tropfen schräg aufkippen (Abzug!). Kleine Luftblasen durch Klopfen entfernen. Bei starker Blasenbildung Hitze verringern. Auf der Heizplatte erkalten lassen.

### Literatur

Klee, R. & Steinberg, C. (1987): Kieselalgen bayrischer Gewässer. Information des Bayr. Landesamt für Wasserwirtschaft 4/87 (Loseblattsammlung).