

# Probenahme und Aufbereitung

## Probenahme

### Beprobungszeitraum

Für die See-Bewertung mit Phytoplankton sind mindestens sechs Probenahmen pro Jahr im Zeitraum April bis Oktober vorzusehen. Darunter sollten mindestens vier Termine in der Vegetationsperiode von Mai bis September liegen.

### Auswahl der Probestelle

Über dem tiefsten Punkt des Sees sollen von einem Boot aus mit einem Wasserschöpfer Planktonproben entnommen werden. Zum Auffinden der richtigen Stelle sind Tiefenkarten wichtig. Vor jeder Untersuchung sollte eine Überprüfung mit Echolotung oder Lotung und ggf. GPS erfolgen. Für Langzeituntersuchungen ist eine Bojen-Markierung zu empfehlen.

## Probenahme

### Wasserschöpfer

Optimal ist die Verwendung eines Tiefen-Integralschöpfers, welcher beim Durchfahren der Wassersäule kontinuierlich und automatisch eine Mischprobe der gesamten Wassersäule entnimmt. Alternativ können Punktproben, je nach Tiefe des Sees in Schritten von 1 m (polymiktische Seen) oder maximal 2 Metern (tiefe Seen) zu einer Mischprobe vereinigt werden. Hierzu sind verschiedene Wasserschöpfer wie Röhren- oder Schlauch-Sampler (s. Abb. 1) geeignet.

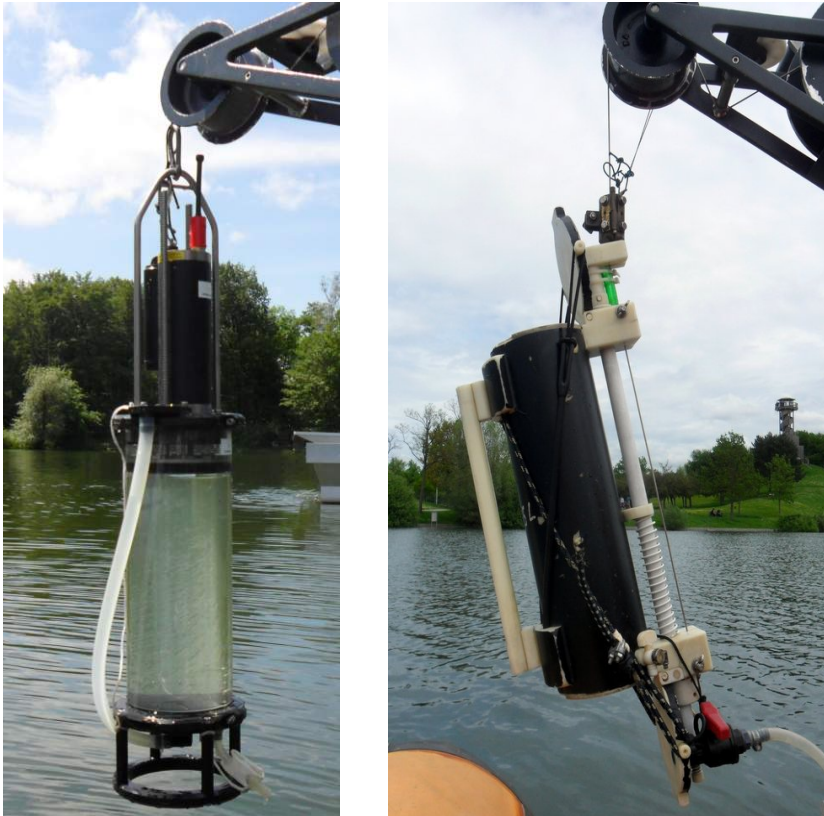


Abb. 1: Links: Tiefenintegrierender Probennehmer. Rechts: Friedinger-Schöpfer zur Entnahme von Tiefenstufenproben (Fotos: Eberhard Hoehn)

## Tiefenprofil

Vor der Probenahme ist festzustellen, welchem Schichtungstyp das zu untersuchende Gewässer zugeordnet wird, da sich die Probenahme bei geschichteten (di- und monomiktischen) und weitgehend ungeschichteten (polymiktischen) Seen unterscheidet. Ein See gilt als geschichtet, wenn mit regelmäßigen Temperaturmessungen im Tiefenprofil und Jahresgang eine durchgehende Schichtungsperiode von mehr als drei Monaten festgestellt wurde.

Vor Beginn der Probenahme wird die Sichttiefe mit einer weißen Scheibe (Secchi-Scheibe) gemessen, für die nach ISO 7027-2:2016 ein Durchmesser von 20 cm empfohlen wird (für sehr hohe Sichttiefen > 10 m können größere Scheiben verwendet werden). Sie wird an einem Maßband so lange in die Tiefe abgelassen bis sie gerade nicht mehr sichtbar ist und dann wieder angehoben bis man die Scheibe gerade wieder erkennt. Aus diesen beiden Werten wird ein Mittelwert gebildet. Die so ermittelte Tiefe ist die sogenannte Secchi-Sichttiefe. Zur Ausschaltung von störenden Reflektionen sowie bei bewegter Wasseroberfläche ist zur Verbesserung der Erkennbarkeit der Scheibe ein Secchiskop – eine Sichteröhre mit Glasboden - zu verwenden. Der Tiefenbereich bis zur 2,5fachen Secchi-Sichttiefe ist der Bereich, in dem das Phytoplankton gut wachsen kann. Er wird als euphotische Zone, seine untere Grenze als euphotische Tiefe bezeichnet.

Anschließend werden mit Messsonden in festen Tiefenschritten (0,5 oder 1 m) zumindest die Temperaturwerte ermittelt. Weitere relevante Sondenparameter sind Sauerstoffgehalt, elektrische

Leitfähigkeit, pH-Wert, Redoxpotenzial und Chlorophyll-a-Konzentration. Es können Tiefenprofile erstellt werden, anhand derer eine Temperaturschichtung, Sauerstoff-Defizite oder Tiefenchlorophyll-Maxima (DCM = deep chlorophyll maximum) festgestellt werden können.

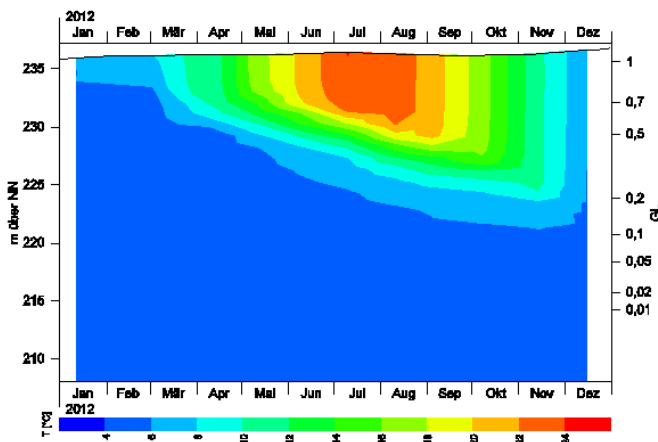


Abb. 2: Isoplethendarstellung der Temperatur aus regelmäßig gemessenen Tiefenprofilen in einem temperaturschichteten See. Linke y-Achse m ü. NN, rechte y-Achse Seevolumen in Gigalitern (GL), (Foto: LBH Freiburg).

## Probenahme polymiktische Seen

Ungeschichtete oder polymiktische Seen sind über das ganze Jahr hinweg bis zum Grund durchmischt. Lediglich in stabilen Wetterlagen können kürzere Phasen der Temperaturschichtung auftreten. In polymiktischen Seen erfolgt die Probenentnahme stets aus der gesamten Wassersäule bis etwa 1 m über Grund, maximal bis in eine Tiefe von 6 m. Trifft man den See z. B. im Hochsommer in einer Phase mit Temperaturschichtung an, so wird die Probenahme dennoch unverändert durchgeführt.

## Probenahme geschichtete Seen

In geschichteten Seen ist die "richtige" Probenahmetiefe differenzierter zu ermitteln:

Um in geschichteten Seen die Mächtigkeit der oberen durchmischten Schicht, des Epilimnions, festzustellen, wird das Temperatur-Tiefenprofil herangezogen. Wenn sich die Temperatur in der Tiefe schnell abkühlt und die Temperaturänderung  $1^{\circ}\text{K}$  pro Meter überschreitet, liegt eine sog. Sprungschicht vor. Die Zone bis zur Sprungschicht wird als Epilimnion bezeichnet, die Zone der starken Temperaturänderung als Metalimnion und die kühle, in der Temperatur wieder konstantere, darunter liegende Schicht als Hypolimnion.

Während der Vollzirkulation mit Temperatúrausgleich bis zum Grund - meist im Zeitraum von Herbst bis Frühjahr - soll die Probe aus der durchmischten Schicht bis zur mittleren Tiefe des Sees stammen, jedoch bis maximal 10 m Tiefe, in sehr tiefen Seen mit maximal 20 m Tiefe.

Während der Phase der Temperaturschichtung sind folgende Fälle zu unterscheiden:

- In eher trüben Seen ist das Epilimnion zu beproben. Die euphotische Zone oder -Tiefe (2,5fache Secchitiefe) liegt innerhalb des Epilimnions.
- In klaren Seen, in denen die euphotische Zone über das Epilimnion hinausgeht und in die Sprungschicht oder sogar ins Hypolimnion hineinragt, muss die Wassersäule bis zur euphotischen Tiefe beprobt werden.

Es gilt also: Die "tiefere" Kenngröße (Epilimniontiefe oder euphotische Tiefe) gibt die Probenahmetiefe für die Mischprobe an.

Es ist darauf zu achten, dass die Probenahme nicht in ein sauerstoffreies, durch Schwefelwasserstoffbildung oder Nährstoffrücklösung geprägtes Hypolimnion hineinreicht und mindestens einen Meter darüber endet. Ausgeprägte Tiefenchlorophyll-Maxima sollen ebenfalls erfasst werden. Um diese festzustellen, muss allerdings eine Chlorophyll-Sonde (Fluoreszenzsonde) im Einsatz sein. Diese und weitere Details sowie Spezialfälle der Probenahme sind in der Methodenbeschreibung von Nixdorf et al. (2010) und der Europäischen Norm DIN EN 16698 differenziert beschrieben.

Aus der so gewonnenen Mischprobe wird in der Regel sowohl die Phytoplanktonprobe als auch die chemische Probe für die Chlorophyll a-Bestimmung und ggf. weitere chemische Parameter (z. B. Gesamtphosphor) entnommen.

### **Konservierung und Weiterbehandlung der Proben**

Die Phytoplanktonproben zur späteren mikroskopischen Analyse werden direkt vor Ort in 100 ml- (bei eu- bis hypertrophen Seen) oder 250 ml (bei oligo- bis eutrophen Seen) Klarglas-Enghalsflaschen abgefüllt und sofort mit einer jodhaltigen Lösung (Lugol'sche Lösung) fixiert (Abb. 3). Bei gekühlter und luftdichter Lagerung sind sie mindestens für ein halbes Jahr haltbar.



Abb. 3: Glasflasche mit Lugol-fixierter Probe (Foto: IGB).

Für die Chlorophyll-a-Bestimmung sind 1-2 Liter Probenwasser in PET-Flaschen abzufüllen und dunkel und kühl ins Labor zu transportieren. Es sollte sichergestellt sein, dass die Proben noch am selben Tag zur Filtration im chemischen Labor eingehen. Mittels Filtration über Glasfilter erhält man einen sog. Filtrerrückstand, welcher das Phytoplankton enthält.

### **Aufbereitung**

## Chlorophyll-a-Proben

Die Chlorophyll-a-Konzentration einer Wasserprobe ist spektralphotometrisch zu messen. Sie korreliert mit der Biomasse des enthaltenen Phytoplanktons, da alle Arten dieses Pigment zur Photosynthese nutzen.



Abb. 4: Laboreinrichtung zur Filtration von Chlorophyll-a Proben auf Glasfaserfilter (Foto: IGB).

Die Bestimmung der Chlorophyll-a-Konzentration nach der Norm (DIN 38409-H60 2017) beruht auf der ethanolischen Heißextraktion des Filtrerrückstands einer Wasserprobe und der anschließenden Absorptionmessung bei 665 nm. Hier werden Phaeopigmente – photosynthetisch nicht mehr wirksame Abbauprodukte des Chlorophylls - miterfasst. Nach Überführung des gesamten Chlorophyll-a in Phaeopigmente durch Ansäuerung wird eine erneute Messung bei 665 nm durchgeführt. Somit kann rechnerisch auf die ursprüngliche Chlorophyll-a-Konzentration der Wasserprobe rückgeschlossen werden. Im Messwert des Chlorophyll-a nach DIN sind die Phaeopigmente nicht mehr enthalten.

## Aufbereitung der Phytoplanktonprobe nach der Utermöhl-Methode

Ziel der mikroskopischen Analyse ist die Bestimmung des Biovolumens des Phytoplanktons. Die Analyse des Phytoplanktons erfolgt an einem Umkehrmikroskop. Dafür werden die Phytoplankter einen Tag zuvor in Absetzkammern angereichert (s. Abb. 5).

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  $\mu\text{g/l}$  ein 10 ml Kammeraufsatz genutzt werden, bei geringeren Konzentrationen der 25 ml- oder sogar 50 ml-Aufsatz.



Abb. 5: Geeichte Absetzkammer mit verschiedenen großen Aufsätzen (Foto: IGB).

### Aufbereitung der planktischen Kieselalgen (Diatomeenpräparat)

Ein Großteil der planktischen Kieselalgen kann mit der Utermöhl-Methode nicht bis auf die Art bestimmt werden. Solche Kieselalgentaxa werden zunächst in Größenklassen-Kategorien gezählt, für die repräsentative Biovolumina errechnet werden. Die innerhalb einer Größenklasse vorkommenden Arten können in einem speziellen Diatomeenpräparat bestimmt werden, und das im Utermöhlpräparat ermittelte Biovolumen wird dann auf die gefundenen Arten verteilt.

Zur Anfertigung eines Diatomeenpräparats muss ein Teil der Planktonprobe – je nach Planktondichte 500 oder 1.000 ml Probenwasser - durch Membranfilter filtriert werden. Diese können luftgetrocknet bis zur weiteren Aufbereitung in Tüten aufbewahrt werden.

Die Filter werden mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{KMnO}_4$  aufgeschlossen. Der Filterrückstand mit den Diatomeen löst sich dabei vollständig ab. Die so gewaschenen Membranfilter können dann verworfen werden. Die Proben werden durch Zentrifugation aufkonzentriert und mehrmals gewaschen. Der Aufschluss wird in beschriftete Schnappdeckelgläschen überführt und nach der Objektträgerpräparation zur Langzeitkonservierung durch Zugabe von 30prozentiger Formaldehydlösung fixiert.

Das aufgeschlossene Probenmaterial wird auf fettfreie Deckgläschen aufgetropft bis diese vollständig benetzt sind und anschließend zum Trocknen über Nacht aufbewahrt. Nachdem das Diatomeen-Material getrocknet ist, werden die Objektträger mit je einem Tropfen Naphrax versehen und darauf Deckgläschen aufgelegt. Zum Austreiben des Lösungsmittels werden die Präparate mit einer Heizplatte auf ca.  $80^\circ\text{C}$  erhitzt bis das Naphrax ca. 5-10 Sekunden lang Blasen wirft. Zum Abkühlen werden die Präparate erschütterungsfrei auf einer waagerechten, ebenen Oberfläche gelagert.