

# Probenahme und Aufbereitung

Zur Umsetzung der WRRL wurde für die Bewertung der Qualitätskomponente Phytoplankton in den Küstengewässern der Ostsee keine separate Vorschrift für Probenahme und -auswertung erstellt. Stattdessen werden bereits existierende DIN-Normen und Handlungsanweisungen verwendet. Diese gelten zwar grundsätzlich für alle Küstengewässer der Ostsee, in den Bundesländern unterscheidet sich aber deren Anwendung bzw. Umsetzung.

## Probenahmezeitpunkte

Aufgrund der hohen saisonalen Variabilität in Artenzusammensetzung und Biomasse ist für das Phytoplankton eine ein- oder zweimalige Beprobung im Jahr nicht ausreichend, um eine gesicherte Bewertung vornehmen zu können. Deshalb sollten innerhalb der Vegetationsperiode häufigere Probenahmen je Standort stattfinden.

Als Vegetationsperiode sind für die Küstengewässer Mecklenburg-Vorpommerns die Monate Mai bis September definiert, in der die relevanten Stationen bezüglich der für die Bewertung notwendigen Messgrößen monatlich beprobt werden, so dass fünf Datenpunkte für die spätere Bewertung vorhanden sind. Die Chlorophyll-a-Konzentrationen werden über diesen Zeitraum hinaus je nach Station monatlich bzw. insgesamt zehnmal pro Jahr bestimmt. Die Untersuchungen der Phytoplanktongemeinschaften erfolgt außerhalb der Vegetationsperiode zusätzlich einmal im zeitigen Frühjahr (ab März) und noch einmal im Herbst. Ein Teil der Wasserkörper wird für das Phytoplankton jährlich beprobt, der andere Teil im Zweijahresrhythmus.

Für die Ostseeküste Schleswig-Holsteins wurde die Vegetationsperiode zwischen März/April und September festgelegt. Bis zu acht Stationen werden für die Typen B3 und B4 zehn- bis zwölfmal pro Jahr beprobt. Die Anzahl der Stationen liegt nicht gleichmäßig fest, da regelmäßig Anpassungen des Überwachungsprogramms durchgeführt werden.

## Probenahmestellen

Die regelmäßig zu beprobenden Standorte in den Küstengewässern werden von den zuständigen Landesbehörden festgelegt. Die Positionen sind dabei so gewählt, dass sie repräsentativ die unterschiedlichen Wasserkörpertypen abdecken. Für die Küstengewässer Mecklenburg-Vorpommerns sind insgesamt 21 Wasserkörper ausgewiesen.

## Probenahme Phytoplankton

Die Beprobungen für das Phytoplankton werden je nach Lage der Stationen mit Schiffen, mit gecharterten Helikoptern oder an einer Mole von Land aus durchgeführt. In der Regel werden physikochemische Begleitparameter (Temperatur, Salinität, pH-Wert etc.) ebenfalls erfasst sowie Proben für die chemische Analytik (Nährstoffe) genommen.

Für die Probenahme vor Ort ist folgende Ausrüstung notwendig:

- Kühltasche/-box mit Kühlelementen
- Eimer mit Seil oder (Integral)Wasserschöpfer

- Messbecher/Messzylinder (1 l)
- Trichter
- 100-ml-Klarglasflaschen mit Schraubverschluss und Dichtung
- Lugol'sche Lösung
- Pipette
- Spritzflasche mit Aqua dest.
- Fließpapier (Küchenrolle) oder Handtuch
- Probenkanister (5 l)
- Protokollbuch oder Formular

Die Entnahme der Proben für die qualitative und quantitative Analyse des Phytoplanktons sollte bei geschichteten Wasserkörpern grundsätzlich integrierend über die euphotische (lichtdurchflutete) Zone erfolgen. Dazu sind Integralschöpfer geeignet, die kontinuierlich über die beprobte Tiefe Wasser entnehmen und so eine Mischprobe erzeugen. Eine solche Probe kann auch gewonnen werden, in dem aus verschiedenen Tiefen einzeln entnommene Wasservolumina gleicher Größe anschließend vereinigt werden. In nicht geschichteten Wasserkörpern genügt eine einmalige oberflächennahe Beprobung im Bereich bis zu 1 m Tiefe mit einem einfachen Wasserschöpfer oder Eimer. Für die späteren mikroskopischen Analysen im Labor wird aus der gut durchmischten Probe eine Unterprobe in eine 100-ml-Klarglasflasche gefüllt. Zur Fixierung der Organismen erfolgt die Zugabe von Lugol'scher Lösung (ca. 1 ml pro 100 ml Probe). Anschließend lagern die Flaschen gekühlt und dunkel bis zur Auswertung.

## Probenahme Chlorophyll-a

Für die Gewinnung der Proben zur späteren Bestimmung des Chlorophyll-a-Gehaltes wird die gleiche Integral- bzw. oberflächennah genommene PSchöpfprobe wie zum Abfüllen der Flaschen für die qualitative und quantitative Analyse des Phytoplanktons genutzt.

Für die Probenahme vor Ort ist folgende Ausrüstung notwendig:

- Kühltasche/-box mit Kühlelementen
- Eimer mit Seil oder (Integral)Wasserschöpfer
- Messbecher/Messzylinder (1 l)
- Glasfaserfilter GF/F
- Filtrationseinrichtung
- Vakuumpumpe (wenn Stromanschluss vorhanden) oder Handpumpe
- Pinzette
- Petrischalen oder Zentrifugenröhrchen
- Alufolie
- Spritzflasche mit Aqua dest.
- Fließpapier (Küchenrolle) oder Handtuch
- Probenkanister (5 l)
- Protokollbuch oder Formular

Ein definiertes Volumen der gut durchmischten Unterprobe wird mit geringem Unterdruck über GF/F-Glasfaserfilter gesaugt, so dass sich die im Wasser enthaltenen Partikel (darunter auch das Phytoplankton) auf dem Filter zu einem gut gefärbten sichtbaren Belag anreichern. Diese Filter werden in ein adäquates Gefäß (Petrischale oder Zentrifugenröhrchen) gegeben, das zum Schutz vor einfallendem Licht mit Alufolie umhüllt und tiefgefroren wird. Die so behandelten Proben lagern

dann bis zur späteren Messung im Labor.

## Quantifizierung Phytoplankton

Die Quantifizierung der unterschiedlichen Algentaxa hinsichtlich ihrer Abundanz (Anzahl von Individuen pro Volumeneinheit) erfolgt mit Hilfe der Inversmikroskopie-Technik (Abbildung 1).

Für die Analytik werden die folgenden Materialien benötigt:

- Inversmikroskop (umgekehrtes Mikroskop) mit Okularzählstreifen und -mikrometerskala
- Sedimentationskammern unterschiedlichen Volumens
- Zählsoftware oder Zählprotokoll

Je nach erwarteter Dichte des Phytoplanktons (einen Hinweis darauf gibt die Chlorophyll-a-Konzentration) wird eine gut durchmischte Probe direkt aus den Probenflaschen in eine 3-, 5-, 10-, 25-, 50- bzw. 100-ml-Sedimentationskammer angesetzt, je nach Größe mindestens 8 bis 48 Stunden zur Sedimentation waagrecht abgestellt und anschließend mit Hilfe eines umgekehrten Mikroskops ausgewertet. Dabei wird die gesamte Kammerfläche (oder definierte Teilabschnitte bei unterschiedlichen Vergrößerungen) systematisch abgefahren, die gefundenen Phytoplanktonorganismen bestimmt und in ihrer Anzahl erfasst. Die Analyse erfolgt nach der Vorschrift von HELCOM (2015), bei der für alle dominanten Taxa mindestens je 50 und insgesamt über 500 Einheiten erfasst werden sollen. Die Angabe der Abundanz für jedes Taxon erfolgte schließlich in Zellen bzw. Zähleinheiten (z. B. Fadenstücke definierter Länge, Kolonien etc.) pro Liter. Durch Aufsummieren erhält man die Gesamtabundanz pro Probe.



Abb. 1: Analyse einer Planktonprobe am Inversmikroskop mit der Online-Zählsoftware OrgaCount.

## Biovolumen Phytoplankton

Die Abschätzung des Biovolumens erfolgt gemäß DIN EN 16695 (2015-12) und der im gesamten HELCOM-Raum genutzten Taxaliste der Phytoplankton Expertengruppe (PEG) in der jeweils aktuellsten Fassung. Durch die Norm ist jeder Gattung bzw. abweichenden Art ein idealisierter geometrischer Körper zugeordnet. Entweder werden die für die Berechnung des entsprechenden Biovolumens notwendigen Dimensionen bei einer repräsentativen Anzahl von Zellen jeder Art, Gattung oder Gruppe unter dem Mikroskop mittels eines kalibrierten Okularmikrometers vermessen

(für notwendige aber im mikroskopischen Bild nicht messbare Dimensionen sind in der Norm bzw. der PEG-Liste für die relevanten Taxa entsprechende Faktoren angegeben), oder jedes Taxon wird in einer adäquaten Anzahl von Größenklassen erfasst (HELCOM Taxaliste PEG), denen entsprechend der zugeordneten Geometrie ein Standardvolumen zugewiesen ist. In beiden Fällen kann in Kombination mit der ermittelten Abundanz das Volumen jedes Taxons in der Probe berechnet werden. Die Angabe erfolgt in  $\mu\text{m}^3$  pro Liter. Durch Aufsummieren erhält man das Gesamtbiovolumen pro Probe, das in  $\text{mm}^3$  pro Liter ausgewiesen wird.

Die Ermittlung des Biovolumens erfolgt im gleichen Durchgang wie die Quantifizierung unter dem Inversmikroskop.

## Pigmentanalyse

Die Bestimmung der Chlorophyll-a- und Phaeopigment-Mengen erfolgt grundsätzlich durch Extraktion mit einem Lösungsmittel und anschließende photometrische Bestimmung der Konzentration. Einzelne Schritte in dieser Prozesskette werden von den verantwortlichen Laboratorien jedoch unterschiedlich gehandhabt (HELCOM 2015, DIN 38412-16:1985-12, BLMP 2009b, BLMP 2009c, Lorenzen 1967, Jeffrey & Humphrey 1975)).

Es sind folgende Materialien notwendig:

- Ethanol oder Aceton
- Aqua dest.
- Wasserbad
- Homogenisator
- Zentrifuge oder Filtrationseinrichtung
- Photometer und zugehörige Küvetten
- Pinzette
- Spatel
- Salzsäure
- Pipette
- Protokollbuch oder Formular

Die Extraktion des Chlorophyll-a aus den nach der Probenahme eingefrorenen und später homogenisierten Filtern erfolgt mit 70 °C heißem Ethanol oder mit Aceton. Nach einer bestimmten Extraktionszeit und der Entfernung der Filterreste durch Zentrifugation oder Filtration wird die Extinktion des Überstandes photometrisch bei der für das benutzte Extraktionsmittel spezifischen Wellenlänge des Absorptionsmaximums des Chlorophyll-a gemessen (665 nm für Ethanol, 663 nm für Aceton). Dabei wird das Chlorophyll-a als wichtigstes Photosynthesepigment zunächst als Gesamt-Chlorophyll-a inklusive der Abbauprodukte, der Phaeopigmente, bestimmt. Durch Messung bei 750 nm und Subtraktion dieses Messwertes vom Wert des Absorptionsmaximums wird eine Trübungskorrektur durchgeführt. Es erfolgt anschließend eine erneute Bestimmung der Extinktion nach Ansäuern des Extraktes mit Salzsäure, wodurch das Chlorophyll vollständig in Phaeopigmente überführt wird. Auch für diesen Schritt erfolgt eine Trübungskorrektur. Aus den Extinktionswerten der beiden Messungen (vor und nach der Ansäuerung), dem benutzten Extraktionsvolumen, dem ursprünglich filtrierten Probenvolumen und der Küvettenlänge lassen sich nun die Konzentrationen des aktiven Chlorophyll-a und der Phaeopigmente rechnerisch ermitteln und in  $\mu\text{g}$  pro Liter angeben.

