

DIN EN 15204

ICS 13.060.70

**Wasserbeschaffenheit –
Anleitung für die Zählung von Phytoplankton mittels der
Umkehrmikroskopie (Utermöhl-Technik);
Deutsche Fassung EN 15204:2006**

Water quality –
Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy
(Utermöhl technique);
German version EN 15204:2006

Qualité de l'eau –
Norme guide pour l'analyse de routine de l'abondance et de la composition du
phytoplancton par microscopie inversée (méthode d'Utermöhl);
Version allemande EN 15204:2006

Gesamtumfang 60 Seiten

Normenausschuss Wasserwesen (NAW) im DIN

Diese Norm ist Bestandteil der Reihe

Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und
Schlammuntersuchung —
Biologisch-ökologische Gewässeruntersuchung (Gruppe M)

und beschreibt das Verfahren

Anleitung für die Zählung von Phytoplankton mittels der Umkehrmikroskopie (Utermöhl-Technik) (M 41).

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 15204:2006) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 230 „Wasseranalytik“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Gremium ist der NA 119-01-03-05-06 AK „Biologisch-ökologische Gewässeruntersuchung“ des NA 119-01-03 AA „Wasseruntersuchung“ im Normenausschuss Wasserwesen (NAW).

Diese Norm wurde für die Umsetzung der Richtlinie 2000/60/EG des europäischen Parlaments und des Rates vom 23. Oktober 2000 zur Schaffung eines Ordnungsrahmens für Maßnahmen der Gemeinschaft im Bereich der Wasserpolitik¹⁾ entwickelt.

Es ist erforderlich, bei den Untersuchungen nach dieser Norm Fachleute oder Facheinrichtungen einzuschalten und bestehende Sicherheitsvorschriften zu beachten.

Bei Anwendung der Norm ist im Einzelfall je nach Aufgabenstellung zu prüfen, ob und inwieweit die Festlegung von zusätzlichen Randbedingungen erforderlich ist.

Die als DIN-Normen veröffentlichten Einheitsverfahren sind bei der Beuth Verlag GmbH einzeln oder zusammengefasst erhältlich. Außerdem werden die genormten Einheitsverfahren in der Loseblatt-Sammlung „Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung“ gemeinsam vom Beuth Verlag GmbH und von dem Wiley-VCH Verlag publiziert.

Alle für die Abwasserverordnung (AbwV) — enthalten in der neuen Verordnung zu § 7a des Gesetzes zur Ordnung des Wasserhaushaltes (WHG) über „Anforderungen an das Einleiten von Abwasser in Gewässer und zur Anpassung des Abwasserabgabengesetzes“ — relevanten Einheitsverfahren sind zusammen mit der AbwV und dem WHG und allen noch fortgeltenden Abwasserverwaltungsvorschriften als Loseblattsammlung „Analyseverfahren in der Abwasserverordnung — Rechtsvorschriften und Normen“ mit dem Ergänzungsband 1 (DIN-Normen), Ergänzungsband 2 (DIN-EN- und DIN-EN-ISO-Normen) und dem Ergänzungsband 3 (DIN-, DIN-EN- und DIN-EN-ISO-Normen) herausgegeben worden.

1) Nachgewiesen in der DITR-Datenbank, zu beziehen bei: Beuth Verlag GmbH, 10772 Berlin.

Normen oder Norm-Entwürfe mit dem Gruppentitel „*Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung*“ sind in folgende Gebiete (Haupttitel) aufgeteilt:

Allgemeine Angaben (Gruppe A)	(DIN 38402)
Sensorische Verfahren (Gruppe B)	(DIN 38403)
Physikalische und physikalisch-chemische Kenngrößen (Gruppe C)	(DIN 38404)
Anionen (Gruppe D)	(DIN 38405)
Kationen (Gruppe E)	(DIN 38406)
Gemeinsam erfassbare Stoffgruppen (Gruppe F)	(DIN 38407)
Gasförmige Bestandteile (Gruppe G)	(DIN 38408)
Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H)	(DIN 38409)
Biologisch-ökologische Gewässeruntersuchung (Gruppe M)	(DIN 38410)
Mikrobiologische Verfahren (Gruppe K)	(DIN 38411)
Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L)	(DIN 38412)
Einzelkomponenten (Gruppe P)	(DIN 38413)
Schlamm und Sedimente (Gruppe S)	(DIN 38414)
Suborganismische Testverfahren (Gruppe T)	(DIN 38415).

Außer den in der Reihe DIN 38402 bis DIN 38415 genormten Untersuchungsverfahren liegen eine Reihe Internationaler und Europäischer Normen als DIN-EN-, DIN-EN-ISO- und DIN-ISO-Normen vor, die ebenfalls Bestandteil der „Deutschen Einheitsverfahren“ sind.

Über die bisher erschienenen Teile dieser Normen gibt die Geschäftsstelle des Normenausschusses Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V., Telefon 030 2601–2448, oder die Beuth Verlag GmbH, 10772 Berlin (Hausanschrift: Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin), Auskunft.

— Leerseite —

Deutsche Fassung

Wasserbeschaffenheit —
Anleitung für die Zählung von Phytoplankton mittels der
Umkehrmikroskopie (Utermöhl-Technik)

Water quality — Guidance standard on the enumeration
of phytoplankton using inverted microscopy
(Utermöhl technique)

Qualité de l'eau — Norme guide pour l'analyse de routine
de l'abondance et de la composition du phytoplancton par
microscopie inversée (méthode d'Utermöhl)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 14. Juli 2006 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim Management-Zentrum oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

Management-Zentrum: rue de Stassart, 36 B-1050 Brüssel

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
Einleitung	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Grundlage des Verfahrens	7
5 Geräte und Konservierungsmittel	7
6 Bearbeitung der Proben	10
7 Zählverfahren	16
8 Quantitative Validierung	23
9 Messunsicherheit	26
Anhang A (informativ) Optische Merkmale von Umkehrmikroskopen	28
Anhang B (informativ) Probenbehandlung	31
Anhang C (informativ) Untersuchungsstrategien für Phytoplankton	36
Anhang D (informativ) Bestimmung	40
Anhang E (informativ) Verwendung konventioneller zusammengesetzter Mikroskope	42
Anhang F (informativ) Statistisches Vorgehen	47
Literaturhinweise	54
Bilder	
Bild 1 — Zufallsverteilung von Phytoplanktonorganismen (auf die offenen Zwischenräume achten)	15
Bild 2 — Beispiel einer Regel für das Auszählen von Zellen auf den Zählfeldrändern. Algen, die den oberen und linken Rand des Zählrasters berühren, werden nicht gezählt, die, die den unteren und rechten Rand berühren, werden gezählt	18
Bild F.1 — Darstellung der Erfassung von Algendaten für einen sequentiellen Test	49
Tabellen	
Tabelle 1 — Sedimentationszeit für mit Lugolscher Lösung konservierte Seewasserproben [12]	14
Tabelle F.1 — Höchstzulässige Streuung für eine Poisson-Verteilung (μ = Mittelwert, σ^2 = Streuung)	48
Tabelle F.2 — Multinomialer Homogenitätstest	50

Vorwort

Dieses Dokument (EN 15204:2006) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 230 „Wasseranalytik“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Februar 2007, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Februar 2007 zurückgezogen werden.

Entsprechend der CEN/CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

Einleitung

Mit der Herausgabe der Europäischen Richtlinie zur Schaffung eines Ordnungsrahmens im Bereich der Wasserpolitik (EG-Wasserrahmenrichtlinie, 2000/60/EG) besteht die Notwendigkeit eines einheitlichen Verfahrens zur Bewertung des ökologischen Zustands der Oberflächengewässer hinsichtlich Häufigkeit und Zusammensetzung des Phytoplanktons. Diesen Anforderungen soll diese Europäische Norm nachkommen und den Labors helfen, die Qualität ihrer analytischen Ergebnisse zu verbessern.

Es kann kein einzelnes Normverfahren für die Bewertung der Phytoplanktonzusammensetzung und -häufigkeit angegeben werden, da die durch die Überwachungsprogramme erfassten Fragen in ihrem Charakter unterschiedlich sind und deshalb spezifische Arbeitsvorschriften erfordern. Diese Europäische Norm hat deshalb das Ziel, eine Anleitung zu grundsätzlichen Gesichtspunkten der mikroskopischen Algenanalyse sowie zu statistischen Verfahren zur Gestaltung, Optimierung und Validierung der Verfahren und Arbeitsvorschriften zu geben. Obgleich in Anhang C erwähnt, enthält diese Anleitung kein Verfahren zur Abschätzung des Biovolumens.

WARNUNG — Anwender dieser Europäischen Norm sollten mit der üblichen Laborpraxis vertraut sein. Eine lang dauernde mikroskopische Untersuchung von Phytoplankton kann zu körperlicher Ermüdung führen und das Sehvermögen beeinträchtigen. Die ergonomischen Eigenschaften des Mikroskops sollten beachtet und der Rat eines Arbeitsmediziners hinsichtlich Gesundheit und Sicherheit eingeholt werden, um sicherzustellen, dass Risiken auf ein Mindestmaß herabgesetzt werden.

Diese Europäische Norm gibt nicht vor, alle unter Umständen mit der Anwendung des Verfahrens verbundenen Sicherheitsaspekte anzusprechen. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, angemessene Sicherheits- und Schutzmaßnahmen zu treffen und sicherzustellen, dass diese mit nationalen Festlegungen übereinstimmen.

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm legt ein Verfahren für das Standard-Sedimentationsverfahren fest, das auf dem von Utermöhl 1958 beschriebenen Test [31] beruht. Es beschreibt ein allgemeines Verfahren für die Abschätzung der Abundanz (Häufigkeit) und taxonomischen Zusammensetzung des marinen und limnischen Phytoplanktons unter Verwendung der Durchlichtumkehrmikroskopie und von Sedimentationskammern, einschließlich der vorausgehenden Schritte der Konservierung und Lagerung der Proben. Der Schwerpunkt liegt auf der Optimierung des Verfahrens für die Vorbereitung der zu mikroskopierenden Probe. Viele der allgemeinen Prinzipien können auch auf andere Techniken der Algenzählung (oder anderer Organismen) mit einem (konventionellen) Mikroskop angewandt werden; einige sind im Anhang E beschrieben. Diese Anleitung behandelt weder die Feldprobenahme noch die Analyse des Picoplanktons, noch die quantitative Analyse frei treibender Matten von Cyanobakterien (Blaualgen) noch spezifische Präparationstechniken für Kieselalgen.

2 Normative Verweisungen

Nicht anwendbar.

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

3.1

Genauigkeit

Grad der Übereinstimmung zwischen einem Ermittlungsergebnis oder Messergebnis und dem wahren Wert

3.2

Algenobjekt

Zähleinheit bzw. Kolonie einer oder mehrerer bei der Analyse des Phytoplanktons festgestellten Algenzelle(n), die nicht mit anderen (unabhängig davon sedimentierenden) Teilchen in der Probe verbunden ist bzw. sind

3.3

Nachweisgrenze

Mindestanzahl und/oder Größe eines einzelnen Taxon oder einer Gruppe von Organismen in einer Probe, die bei deren Vorhandensein mit einer vorgegebenen Wahrscheinlichkeit noch erfasst werden kann

ANMERKUNG Diese Definition ist der in der chemischen Analyse (kleinster wahrer Wert des mit diesem Verfahren nachweisbaren Parameters) verwendeten Definition analog.

3.4

Fehler

Abweichung zwischen einem Einzelergebnis und dem wahren Wert

3.5

Fixierung

Schutz vor Zerfall der morphologischen Struktur von Organismen

3.6

mikroskopisches Zählfeld

für die Zählung verwendeter optisch abgegrenzter Bereich (z. B. ein Quadrat oder Raster) innerhalb des Gesichtsfeldes des Mikroskops

3.7

Nanoplankton

kleine Algen mit einer Größe von 2 µm bis 20 µm

3.8

numerische Apertur

NA

Maß für das Auflösungsvermögen eines Objektivs, das sich aus dem Brechungsindex n des Mediums zwischen Frontlinse des Objektivs und dem Untersuchungsobjekt, multipliziert mit dem Sinus des halben Öffnungswinkels α des Objektivs ergibt ($NA = n \times \sin \alpha$)

3.9

Durchführungsmerkmal

Merkmal einer bestimmten Arbeitsvorschrift, die qualitative und quantitative Aspekte der Präzision der Daten, systematischer Kalibrierung, Empfindlichkeit des Verfahrens und Bereich der Bedingungen, unter denen ein Verfahren zufrieden stellende Daten liefert

3.10

Phytoplankton

Gemeinschaft frei schwebender, vorwiegend photosynthetischer Organismen aquatischer Systeme, einschließlich Cyanobakterien (Blaualgen) und Algen

3.11

Picoplankton

sehr kleine Algen mit einer Größe von 0,2 µm bis 2 µm

3.12

Präzision

Grad der Übereinstimmung zwischen voneinander unabhängigen Ermittlungs- bzw. Messergebnissen, die unter festgelegten Bedingungen ermittelt wurden

3.13**Konservierung**

Schutz der organischen Substanz vor Zersetzung (Abbau)

3.14**Arbeitsvorschrift**

spezifischer Arbeitsablauf eines Analysenverfahrens bezüglich des Volumens der Probe oder Teilprobe, der mikroskopischen Vergrößerung, der Anzahl auszählender Zellen, des taxonomischen Niveaus der Bestimmung usw.

3.15**Wiederholpräzision**

Präzision unter Wiederholbedingungen

3.16**Wiederholbedingungen**

Bedingungen, unter denen voneinander unabhängige Ermittlungs- bzw. Messergebnissen mit demselben Verfahren an denselben Messobjekten in demselben Labor durch denselben Bearbeiter mit derselben Geräteausrüstung in kurzen Zeitabständen ermittelt werden

ANMERKUNG Diese Definition sollte als der Fehler interpretiert werden, der bei Wiederholungszählungen derselben Probe durch denselben Untersucher in derselben Zählkammer unter Verwendung desselben Mikroskops innerhalb eines Tages auftritt.

3.17**Vergleichpräzision**

Präzision unter Vergleichsbedingungen

3.18**Vergleichbedingungen**

Bedingungen, unter denen voneinander unabhängige Ermittlungs- bzw. Messergebnissen mit demselben Verfahren an denselben Messobjekten in verschiedenen Labors von verschiedenen Bearbeitern mit unterschiedlichen Geräteausrüstungen ermittelt werden

3.19**Messunsicherheit**

dem Messergebnis zugeordneter Parameter, der die Streuung derjenigen Werte kennzeichnet, die vernünftigerweise der Messgröße zugeordnet werden könnte

3.20**Validierung**

Bestätigung durch Untersuchung und Bereitstellung eines objektiven Nachweises, dass die besonderen Anforderungen für eine spezifisch beabsichtigte Anwendung erfüllt worden sind

4 Grundlage des Verfahrens

Nach Konservierung und Lagerung, falls zutreffend, wird die Probe homogenisiert und eine Teilprobe in eine Sedimentationskammer gegeben. Nach der Sedimentation der Algen auf dem Bodenglas der Kammer werden sie mittels Umkehrmikroskopie bestimmt und gezählt.

5 Geräte und Konservierungsmittel

5.1 Probenahmeflaschen

Eine Probenahmeflasche sollte folgende Anforderungen erfüllen (die Relevanz einiger Anforderungen kann von der Dauer der Lagerung der Probe abhängen):

- Die Flasche sollte sauber und leicht zu reinigen sein; sie sollte für das verwendete Konservierungsmittel nicht durchlässig sein und nicht mit diesem reagieren;
- die Flasche sollte durchsichtig sein (so dass der Konservierungszustand und das Vorhandensein von Verklumpungen leicht geprüft werden kann), aber im Dunkeln aufbewahrt werden;
- die Kombination von Flasche und Schraubkappe sollte einen wasserdichten (um die Homogenisierung zu erleichtern) und nahezu gasdichten (zur Herabsetzung des Verdunstens auf ein Minimum) Verschluss erlauben, um lange Aufbewahrungszeiträume zu ermöglichen;
- der Flaschenhals sollte weit genug sein, um die Zählkammer befüllen zu können. Die Flasche sollte zwecks leichter Handhabung und Befüllung der Zählkammer nicht zu groß sein. Im Allgemeinen ist ein Volumen von etwa 100 ml bis 200 ml ausreichend;
- um eine Homogenisierung zu ermöglichen, sollten die Flaschen nicht vollständig mit Probenwasser gefüllt werden (vorzugsweise zu etwa 80 %).

5.2 Sedimentationskammer

Sedimentationskammern bestehen aus einer senkrechten Röhre mit einem Bodenglas, durch das der Inhalt mit einem Umkehrmikroskop betrachtet werden kann. Die Röhre wird mit einer Probe gefüllt, so dass sich die Phytoplanktonorganismen in der Probe auf dem Kammerboden sedimentieren können. Durch Verwendung eines relativ kleinen Querschnitts im Vergleich zur Röhrenhöhe kann die Probe wirksam konzentriert werden. Ein üblicher Kammertyp besteht aus 2 Teilen: einem Röhrenoberteil, das über einer Vertiefung auf ein Bodenglas gesetzt wird, wobei das Oberteil, nachdem sich die Algen auf dem Boden abgesetzt haben, beiseite geschoben und durch ein Deckglas ersetzt wird. Sedimentationskammern können quadratisch oder rund sein. Die Dicke des Bodenglases sollte 0,17 mm nicht überschreiten, da diese die Bildqualität direkt beeinträchtigt. Der Inhalt der Zählkammern sollte kalibriert sein, so dass das in ihnen enthaltene Volumen der Teilprobe bestimmt werden kann.

Die Zählkammern sollten zwischen den einzelnen Untersuchungen gereinigt und getrocknet werden. Zur Erzielung bester Ergebnisse sollte durch Auswaschen mit einem Reinigungsmittel unter Verwendung eines weichen Pinsels

oder einer kleinen Scheuerbürste gereinigt werden; anschließend sollte die Kammer mit destilliertem Wasser gespült werden. Andere Reinigungsmittel, die abhängig vom Werkstoff der Kammer verwendet werden können, sind Methanol, Ethanol (90 %), handelsüblicher vergällter Alkohol oder iso-Propanol.

5.3 Umkehrmikroskop

Durch die Verwendung eines Umkehrmikroskops können die auf dem Kammerboden abgesetzten Algen in den Brennpunkt der Objektive (Focus) gerückt werden (siehe Anhang A). Die optischen Eigenschaften des Mikroskops bestimmen das Auflösungsvermögen und so die Möglichkeiten der Algenbestimmung. Für die Phytoplanktonzählung sollte das Umkehrmikroskop mit einem Kondensor mit einer numerischen Apertur von mindestens 0,5 und Plan-Objektiven mit einer numerischen Apertur von mindestens 0,9 ausgestattet sein (siehe Anhang A). Üblicherweise wird Phasenkontrast oder Interferenzkontrast nach Nomarski für die Phytoplanktonuntersuchung verwendet. Diese Beleuchtungsverfahren erleichtern die Bestimmung von bestimmten Arten, wie Flagellaten, Diatomeen und zarten Formen wie Chrysophyceae. Im Idealfall sollte das Mikroskop mit einer (digitalen) Kamera ausgestattet sein.

Das Mikroskop sollte mit einem Binokular mit Weitfeldokularen mit 10facher oder 12,5facher Vergrößerung ausgestattet sein. Eines der Okulare sollte mit einem graduierten Okularmikrometer, das andere mit einem für die Zählung geeigneten graduierten Zählraster ausgestattet sein:

- Für das Auszählen zufällig ausgewählter Zählfelder sollte das Raster ein quadratisches Feld oder Gitter aufweisen (handelsüblich erhältlich, z. B. eine Whipple-Scheibe oder ein entsprechendes Äquivalent aus vier sich kreuzenden Linien oder
- zum Auszählen von Ausschnitten (Streifen/Transekten) oder der gesamten Kammer zwei parallel laufende Linien innerhalb des Okulars, die einen Ausschnitt bilden, vorzugsweise mit einer dritten vertikal dazu laufenden Linie, welche die beiden anderen im Zentrum kreuzt, versehen.

Das Okularmikrometer und das Zählraster müssen für jede Vergrößerung und für jedes Mikroskop kalibriert werden. Dafür wird ein Objektmikrometer mit einem kalibrierten Maßstab von 100 µm, geteilt in 10-µm-Abschnitte, durch das Okularmikrometer bzw. das Zählraster betrachtet und dazu verwendet, die Skala des Okularmikrometers bzw. die Außenmaße oder Teilung des Zählfeldes zu vermessen, so dass die Bestimmung der Zählfeldfläche ermöglicht wird.

Obwohl das Umkehrmikroskop für die Phytoplanktonzählung empfohlen wird, können unter bestimmten Voraussetzungen auch konventionelle (aufrechte) Lichtmikroskope verwendet werden (siehe Anhang E).

5.4 Konservierungsmittel

5.4.1 Saure Iod-Lösung nach Lugol [35]

100 g KI (Kaliumiodid) in 1 l destilliertem oder entmineralisiertem Wasser lösen; 50 g (kristallines) Iod hinzugeben, bis zur Lösung schütteln und 100 g Eisessig hinzugeben. Da die Lösung nahe am Sättigungsbereich liegt, sollten mögliche

Ausfällungen durch Dekantieren der Lösung vor der Verwendung beseitigt werden. Die Lugolsche Lösung kann in einer dunklen Flasche bei Raumtemperatur mindestens ein Jahr aufbewahrt werden.

5.4.2 Alkalische Iod-Lösung nach Lugol (modifiziert nach [37])

100 g KI (Kaliumiodid) in 1 l destilliertem oder entmineralisiertem Wasser lösen; 50 g (kristallines) Iod zugeben, bis zur Lösung schütteln und 100 g Natriumacetat ($\text{CH}_3\text{COO-Na}$) hinzugeben. Da die Lösung nahe am Sättigungsbereich liegt, sollten mögliche Ausfällungen durch Dekantieren der Lösung vor der Verwendung beseitigt werden.

Es wird im Allgemeinen die Verwendung von 5 ml Lugolscher Lösung je Liter Probe empfohlen. Dies hängt jedoch von der Algendichte ab: bei meso- und besonders bei oligotrophen Gewässern können u. U. 2 ml bereits eine Überfixierung bewirken, was die Algen schwer erkennbar macht; in diesem Fall sollte ein geringeres Volumen an Lugolscher Lösung verwendet werden. Im Allgemeinen sollte so viel Lugolsche Lösung zur Probe hinzugefügt werden, bis diese eine kognakartige Färbung aufweist.

5.4.3 Formaldehyd mit einem Volumenanteil von 37 %

Für eine längerfristige Lagerung sollte so viel Formaldehyd zugegeben werden, dass eine Endkonzentration von 4 % resultiert; dies sollte nur erfolgen, wenn keine erneute Untersuchung der Probe geplant ist, weil kleine, nackte Flagellaten zerstört werden. Ein weiterer Nachteil ist die rasche Entfärbung der Probe.

Die meisten Konservierungsmittel sind handelsüblich erhältlich. Zu weiteren Einzelheiten über die Verwendung unterschiedlicher Konservierungsmittel siehe Anhang B.

6 Bearbeitung der Proben

6.1 Allgemeines

Die Proben sollten in zwei Teilproben geteilt werden, wovon die erste Teilprobe konserviert und bis zur Analyse bei niedriger Temperatur gelagert wird, während die zweite, nicht konservierte Teilprobe für die Untersuchung lebenden Materials aufbewahrt wird (6.1 und 6.2). Bevor eine Teilprobe zur Analyse entnommen wird, die konservierte Probe an die Umgebungstemperatur angleichen und homogenisieren (6.3 bis 6.5). Anschließend einen Teil der Probe direkt in eine kalibrierte Zählkammer füllen (6.5 und 6.6). Die Anzahl der Phytoplanktonorganismen in einem definierten Bereich der Kammer mittels Okularrastern zählen und daraus die Konzentration der Phytoplanktonorganismen ermitteln (Abschnitt 7).

Die genaue Arbeitsvorschrift für das Auszählen kann unterschiedlich sein und zum Beispiel vom Zweck und Ziel der Untersuchung, der Art der zu untersuchenden Proben und den verfügbaren Ressourcen bzw. Geräten abhängen. Jede Arbeitsvorschrift wird mit einem eigenen Fehler verbunden sein. Deshalb ist es wichtig, jede Vorschrift vor ihrer Anwendung zu validieren (Abschnitt 8 und Anhang F).

Die genaue Analyse bestimmter Gruppen von Organismen kann eine besondere Vorgehensweise erfordern. Für (benthische) Kieselalgen ist eine Anleitung in EN 13946 und EN 14407 enthalten.

6.2 Konservierung der Proben

Die Proben sollten so bald wie möglich nach ihrer Entnahme mit dem entsprechenden Konservierungsmittel fixiert werden. Es sollten auch Lebendproben für eine Voruntersuchung der Algenflora (6.3.1) zurückbehalten werden.

6.3 Lagerung

6.3.1 Lebendproben

Lebendproben für die Voruntersuchung (7.2) sollten im Dunkeln bei einer Temperatur zwischen 4 °C und 10 °C aufbewahrt werden. Proben aus höher temperiertem Wasser müssen möglicherweise allmählich abgekühlt werden, um eine Schädigung der Phytoplanktonzellen zu vermeiden. Die Aufbewahrungszeit von 36 h bis zur Voruntersuchung sollte nicht überschritten werden.

ANMERKUNG Bei Proben mit einer sehr hohen Organismendichte, Algenblüten oder Aufrahmungen sollte einer Sauerstoffverarmung und der damit verbundenen Zersetzung vorgebeugt werden, indem diese Proben mit filtriertem (Porenweite 0,45 µm) Probenwasser der Probestelle verdünnt werden.

6.3.2 Konservierte Proben

Mit Lugolscher Lösung (oder Formaldehyd) konservierte Proben im Dunkeln bei 1 °C bis 5 °C aufbewahren. Werden die Proben innerhalb von drei Wochen analysiert, ist eine Lagerung im Dunkeln bei Raumtemperatur möglich. Zu Beginn der Lagerung sollte die Füllhöhe der Probe auf der Flasche markiert werden.

Die Aufbewahrung bei niedriger Temperatur verlangsamt die physikalischen und chemischen Prozesse, die zu einer Verschlechterung der Probequalität führen. Immer im Dunkeln lagern, um eine Oxidation durch Lichteinwirkung zu verhindern. Die Aufbewahrungszeit Lugol-fixierter Proben im Dunkeln bei 1 °C bis 5 °C beträgt höchstens 12 Monate. Längere Aufbewahrungszeiträume von mehr als einem Jahr sind nur nach Zugabe von Formaldehyd (Anhang B) möglich.

Neue Proben nach einigen Tagen auf Oxidation des Iods in der Lugolschen Lösung prüfen. Die Probe sollte eine kognakartige Färbung aufweisen. Falls nicht, soviel Lugolsche Lösung zugeben, bis die Probe diese Färbung wieder angenommen hat. Werden gut verschlossene Probenflaschen bei einer Temperatur zwischen 1 °C und 5 °C aufbewahrt, tritt keine nennenswerte Verdunstung auf.

6.4 Temperaturangleichung

Um eine gleichmäßige, zufällige Verteilung des Planktons in der Sedimentationskammer zu ermöglichen, sollten die Probe und alle verwendeten Geräte eine ähnliche Temperatur aufweisen. Üblicherweise ist eine Angleichungsdauer an die Raumtemperatur von etwa 12 h angemessen; dies hängt aber von der tatsächlichen Umgebungstemperatur und dem Probenvolumen ab.

ANMERKUNG Temperaturdifferenzen zwischen der Sedimentationskammer und der Probe führen zu Konvektionsströmungen, die, abhängig von den physikalischen Eigenschaften, unterschiedliche Auswirkungen auf das Sedimentationsverhalten der Phytoplanktonarten haben. Außerdem können sich in relativ kalten Proben Luftblasen bilden, da die Löslichkeit von Gasen mit allmählichem Temperaturanstieg der Probe abnimmt. Die Kontrolle der Temperaturangleichung ist deshalb ein wichtiger Schritt bei Phytoplanktonanalysen.

6.5 Homogenisierung der Probe

Der erste entscheidende Schritt bei der Probenvorbereitung für die mikroskopische Untersuchung ist die Homogenisierung der Probe. Während der Probenlagerung setzen sich Schwebeteilchen ab und (kleine) Algen werden durch Einbau in Detritusflocken oder durch Adhäsion an andere große Algenzellen nicht mehr erkennbar. Die Resuspension und Trennung der Teilchen kann durch möglichst vorsichtiges Schütteln der Probe erreicht werden. Dies kann von Hand oder vorzugsweise durch Verwendung eines geeigneten Schüttelgeräts erfolgen. Geräte (rotierende Taumelmischer) auf der Grundlage einer dreidimensionalen Bewegung (achtförmige Bewegung während der Rotation: Prinzip nach Paul Schatz) sind gegenüber üblichen Kreisschüttlern, die in einer Wirbelbewegung eine unvollständige Durchmischung der Wasserprobe auslösen, vorzuziehen.

Das manuelle Schüttelverfahren sollte genau standardisiert werden, um die Unterschiede zwischen verschiedenen Anwendern so gering wie möglich zu halten. Geeignet ist eine Kombination aus abwechselndem waagerechten Rollen und senkrechtem Auf-den-Kopf-Stellen der Probenflasche in einer jeweils festgelegten Anzahl und Reihenfolge.

ANMERKUNG 1 Kräftiges Schütteln kann zum Zerfall zarter Kolonien führen, was dann problematisch ist, wenn die Koloniegroße ermittelt werden soll. Entstehen viele kleine Luftblasen (was sich nachteilig auf die Sedimentation auswirkt), sollte bis zur Entnahme der zu untersuchenden Teilprobe eine Stunde verstreichen, wobei die Flasche dann vorsichtig erneut geschüttelt wird.

ANMERKUNG 2 Die Auflösung von Kolonien zur Erleichterung der Zellzählung kann durch Ultraschallbehandlung erreicht werden, wobei sorgfältig darauf geachtet wird, dass die Zellen nicht durch zu starke Beanspruchung [25], [3] oder durch Hydrolyse des Kolonieschleims [2] geschädigt werden. Im Anschluss daran kann es erforderlich sein, die Probe durch leichtes Schütteln zu homogenisieren. Einige Kolonien, z. B. *Phaeocystis*, einige Chlorophyten und koloniebildende Chrysophyceen wie *Synura* und *Uroglena* können bei der Konservierung in saurer Lugolscher Lösung innerhalb weniger Tage teilweise oder vollständig zerfallen.

6.6 Vorbereitung der Teilprobe

Nach der Homogenisierung sollte ein bekanntes Probenvolumen zum Befüllen der Zählkammer verwendet werden. Das Befüllen der Zählkammer ist ein kritischer Schritt, da er die endgültige Verteilung der abgesetzten Phytoplanktonorganismen beeinflusst. Eine zufällige Verteilung ermöglicht einfache und einheitliche Zählstrategien und statistische Verfahren zur Beurteilung der Messunsicherheit.

Die Kammer sollte vorzugsweise direkt aus der Probenflasche befüllt werden. Das genaue Volumen hängt von der Dichte des Phytoplanktons, dem Volumen der Zählkammer und deren Oberflächen-Volumen-Verhältnis ab. Für oligotrophe

Gewässer werden größere Teilprobenvolumina (bis zu 100 ml) (siehe auch B.3) erforderlich sein. Bei einer hohen Phytoplanktonbiomasse kann ein Verdünnungsschritt vorteilhaft sein, da dann die Konzentration der Phytoplanktonorganismen ausreichend erniedrigt wird, um das Verklumpen von Phytoplanktonorganismen durch Adhäsion zu verhindern und das Zählverfahren (6.6) zu optimieren. Zur Verdünnung relativ großen Volumina vorsehen (z. B. mit einem graduieren Messzylinder). Für marine Proben sollte zur Verdünnung filtriertes (0,45 µm Porenweite) Meerwasser verwendet werden.

ANMERKUNG Die Kammerhöhe sollte das 5fache ihres Durchmessers nicht übersteigen [19]. D. h. z. B., dass 100-ml-Röhren mit einem Durchmesser von 26 mm für die Zählung des Nanoplanktons und des Picoplanktons nicht geeignet sind. Werden mehr als 50 ml benötigt, ist eine Vorsedimentierung wie in B.3 angegeben ratsam.

Bei Verwendung von Pipetten mit kleinem Volumen (1 ml bis 5 ml) mit abnehmbaren Spitzen sollte das Ende der Spitze abgeschnitten werden, um die Öffnung auf einen Durchmesser zwischen 3 mm und 4 mm zu erweitern und um sicherzustellen, dass große Taxa wie *Ceratium* nicht zurückgehalten werden. Da das Abschneiden der Spitzen die Genauigkeit der Pipette beeinträchtigt, muss jede Spitze gesondert kalibriert werden.

Folgende Punkte sollten für das optimale Befüllen der Sedimentationskammern beachtet werden:

- Sicherstellen, dass alle Geräte (einschließlich Füllspitzen usw.) sich an die Umgebungstemperatur des Raumes, in dem die Untersuchungen durchgeführt werden, angleichen können. Die Umgebungstemperatur sollte so konstant wie möglich sein.
- Die Kammer sollte auf eine kleine waagerechte Ebene mit schlechter Wärmeleitung (zum Beispiel eine dünne Polyacrylplatte) platziert werden. Abwarten, bis alle Materialien die gleiche Temperatur erreicht haben.
- Entnahme einer ausreichend (falls erforderlich, verdünnter) großen Probe, um die Kammer in einem Schritt zu füllen (ohne Bildung eines Luftraums am oberen Ende).
- Falls es sich zeigt, dass viele Algenzellen durch Anhaften an Detritus nicht erkennbar sind, darf die Teilprobe durch längeres und/oder intensiveres Schütteln der Probe und eine geeignete Verdünnung verändert werden.
- Kammer mit einer Deckscheibe unter Vermeidung von Luftblasen verschließen.
- Die Sedimentation sollte im Dunklen bei konstanter, einer der Temperatur der Teilprobe ähnlichen Umgebungstemperatur erfolgen, Vibrationen vermeiden.
- Für mit Lugolscher Lösung konservierte Süßwasserproben wird eine Sedimentationszeit von mindestens 4 h je cm empfohlen [19], [20] und für mit Formaldehyd konservierte Meerwasserproben eine Sedimentationszeit von mindestens 16 h je cm [9]. Bei mit Lugolscher Lösung konservierten Seewasserproben werden folgende Sedimentationszeiten empfohlen [12]:

Tabelle 1 — Sedimentationszeit für mit Lugolscher Lösung konservierte Seewasserproben [12]

Kammervolumen ml	Kammerhöhe cm	Sedimentationszeit h
2	1	3
10	2	8
25	5	12
50	10	24
100	20	48

- Nach der Sedimentation die Röhre der Kammer mit Hilfe eines Deckglases unter Vermeidung des Einschlusses von Luftblasen abschieben. Luftblasen können durch Übersichtung mit Wasser mittels einer kleinen Tropfpipette, während des Zurückschiebens des Deckglases, beseitigt werden.
- Wenn die Kammer vollständig gefüllt und mit einem Deckglas verschlossen ist, wird ein vorsichtiges Bewegen der Zählkammer zum Mikroskop die Lage der abgesetzten Phytoplanktonorganismen nicht beeinträchtigen. In einer offenen Sedimentationskammer unterliegen abgesetzte Algen jedoch leicht Störungen, selbst wenn diese vorsichtig bewegt werden. Deshalb keine offenen Kammern verwenden.
- Selbst in einer geschlossenen Zählkammer können durch eine intensive Lichtquelle (einschließlich der des Mikroskops) sedimentierte Algen wieder aufwirbeln. Daher für jedes mikroskopische System und für jedes Verfahren prüfen, ob hierdurch die Untersuchung tatsächlich beeinflusst wird.

Wurde eine unvollständige Sedimentation beobachtet oder liegen spezifische Hinweise aus der Probenahme oder der Vorgeschichte vor, dass aufruhende Algen, wie Cyanobakterien oder z. B. die lipidhaltige Grünalge *Botryococcus*, vorhanden sind, sollte die Flüssigkeit in der oberen Röhre der Kammer bei einer geeigneten Geschwindigkeit zentrifugiert werden, um abschätzen zu können, ob die Menge der aufruhenden Algen bedeutend ist. Weiterhin beachten, dass unter bestimmten Umständen einige kleine Cyanobakteria gerade oberhalb der Ebene des Bodenglases schwebend verbleiben. Dies kann durch Fokussieren oberhalb des Bodens vor Beginn der Zählung geprüft werden. Falls erforderlich, können Gasblasen von Cyanobakterien zum Kollabieren gebracht werden; danach kann eine neue Teilprobe hergestellt werden. Das Kollabieren von Gasblasen kann einfach erreicht werden, indem die Probe in eine große Kunststoffspritze gefüllt wird, von der die Kanüle entfernt wurde, so dass eine Öffnung von 1 mm oder 2 mm Durchmesser verbleibt. Wenn die Spritzenspitze fest gegen eine Wand geschlagen und dabei der Kolben mit der Hand festgehalten wird, bringt die plötzliche Druckerhöhung in der Spritze die Gasvakuolen zum Kollabieren. Eine andere Möglichkeit ist, die Probenflasche mit einem Gummistopfen zu verschließen und dann mit einem Hammer vor-