

DIN EN 17136

ICS 13.060.10

Einsprüche bis 2017-08-23

Entwurf

**Wasserbeschaffenheit –
Anleitung zu Feld- und Laborverfahren zur quantitativen Analyse und
Bestimmung von Makroinvertebraten aus Inland-Oberflächengewässern;
Deutsche und Englische Fassung prEN 17136:2017**

Water quality –

Guidance on field and laboratory procedures for quantitative analysis and identification of macro-invertebrates from inland surface waters;

German and English version prEN 17136:2017

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2017-06-23 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an naw@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW), 10772 Berlin, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 39 Seiten

DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17136:2017) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 230 „Wasseranalytik“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

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

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Bezeichnung des Verfahrens:

Anleitung zu Feld- und Laborverfahren zur quantitativen Analyse und Bestimmung von Makroinvertebraten aus Inland-Oberflächengewässern:

Verfahren DIN EN 17136

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 vorliegende Norm enthält das vom DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW) und von der Wasserchemischen Gesellschaft – eine Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker – gemeinsam erarbeitete Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung:

Anleitung zu Feld- und Laborverfahren zur quantitativen Analyse und Bestimmung von Makroinvertebraten aus Inland-Oberflächengewässern.

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

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

Allgemeine Angaben (Gruppe A)

Sensorische Verfahren (Gruppe B)

Physikalische und physikalisch-chemische Kenngrößen (Gruppe C)

Anionen (Gruppe D)

Kationen (Gruppe E)

Gemeinsam erfassbare Stoffgruppen (Gruppe F)

Gasförmige Bestandteile (Gruppe G)

Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H)

Mikrobiologische Verfahren (Gruppe K)

Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L)

Biologisch-ökologische Gewässeruntersuchung (Gruppe M)

Einzelkomponenten (Gruppe P)

Schlamm und Sedimente (Gruppe S)

Suborganismische Testverfahren (Gruppe T)

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: Am DIN-Platz, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin), Auskunft.

— Leerseite —

Wasserbeschaffenheit — Anleitung zu Feld- und Laborverfahren zur quantitativen Analyse und Bestimmung von Makroinvertebraten aus Inland-Oberflächengewässern

Water quality — Guidance on field and laboratory procedures for quantitative analysis and identification of macro-invertebrates from inland surface waters

ICS:

Deskriptoren

Dokument-Typ: Europäische Norm
Dokument-Untertyp:
Dokument-Stage: CEN-Umfrage
Dokument-Sprache: D

STD Version 2.8l

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Einleitung	4
1 Anwendungsbereich.....	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Grundlage des Verfahrens.....	6
5 Ausrüstung, Konservierungsmittel und Reagenzien.....	7
5.1 Siebe	7
5.2 Mikroskop	7
5.3 Konservierungs- und Fixiermittel.....	7
5.3.1 Allgemeines	7
5.3.2 Ethanol, C ₂ H ₅ OH	7
5.3.3 Formaldehyd, 37 % (Volumenanteil).....	7
5.4 Reagenzien zur Untersuchung mit Verbundmikroskopen.....	8
5.4.1 Allgemeines	8
5.4.2 Koenike-Gemisch.....	8
5.4.3 Laevulose-Sirup.....	8
6 Durchführung.....	8
6.1 Allgemeines	8
6.2 Auswahl der Konservierungsmittel.....	8
6.3 Probenverarbeitung im Gelände	9
6.4 Transport und Lagerung von Proben.....	9
7 Laborverfahren	9
7.1 Allgemeines	9
7.2 Vorbehandlung vor der Sortierung.....	10
7.2.1 Allgemeines	10
7.2.2 Vorspülen	10
7.2.3 Nachspülen.....	11
7.2.4 Dekantieren.....	11
7.2.5 Unterproben.....	11
7.3 Quantitative Sortierung	12
7.3.1 Allgemeines	12
7.3.2 Quantitative Sortierung auf einer Schale.....	13
7.3.3 Quantitative Sortierung mit einem Stereo-Zoom-Mikroskop	13
7.3.4 Durchmustern.....	13
8 Bestimmung.....	14
8.1 Allgemein.....	14
8.2 Acari.....	14
8.3 Chironomidae	14
8.4 Oligochaeta	14
8.5 Plathelminthes	14
9 Qualitätssicherung.....	15
Anhang A (informativ) Beispiele für Probenteiler und Sortierschalen.....	16
Literaturhinweise.....	18

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17136:2017) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 230 „Wasseranalytik“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

WARNUNG — Arbeiten im oder am Gewässer ist grundsätzlich gefährlich. Beim Arbeiten mit unterschiedlichen und allgemein giftigen Konservierungsmitteln sollte man vorsichtig vorgehen. Diese Norm gibt nicht vor, die mit der Anwendung des Verfahrens verbundenen Sicherheitsaspekte anzusprechen. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders entsprechende Gesundheits- und Sicherheitsvorkehrungen zu treffen und sicherzustellen, dass diese mit nationalen Bestimmungen übereinstimmen.

Einleitung

Makroinvertebraten spielen bei Gewässergütebeurteilungen eine bedeutende Rolle und sind darüber hinaus eine der biologischen Qualitätskomponenten in der EG-Wasserrahmenrichtlinie (WRRL 2000/60/EG). Makroinvertebraten bilden eine Gruppe aus unterschiedlichen taxonomischen Einheiten, für die nicht immer eine einheitlich effiziente und effektive Analyseprozedur angegeben werden kann. Beim Sammeln und Analysieren von Makroinvertebraten gibt es spezifische Probleme aufgrund des breiten Größenspektrums, dem sehr unterschiedlichen Erscheinungsbild und der verschiedenen Lebensräume der Organismen. Diese Anleitung zielt darauf ab, eine allgemeine Orientierung für die quantitative Bearbeitung von Makroinvertebraten zu liefern, um die durch die Probenbearbeitung bedingte Variationsbreite der Ergebnisse insbesondere für die WRRL und wissenschaftliche Studien im Allgemeinen zu reduzieren. Es ist nicht beabsichtigt, einen vollständigen und exakten Überblick über alle möglichen Methoden zu geben. Besondere Situationen und Untersuchungszwecke können Abweichungen, beruhend auf fachmännische Beurteilungen von skizzierten Verfahren, erfordern, doch die allgemeinen Grundsätze, die in dieser Anleitung enthalten sind, sollten immer gelten.

1 Anwendungsbereich

Diese Norm ist eine Anleitung zur Beurteilung der Abundanz und Bestimmung von Makroinvertebraten in Proben aus Binnengewässern. Das Verfahren befasst sich mit der Vorbehandlung (Reinigung), Herstellen von Teilproben, Sortierung und endgültigen Bestimmung von Organismen aus konservierten und lebenden Proben, die aus natürlichen Lebensräumen oder künstlichen Substraten stammen. Für die Erhaltung der DNA-Analyse wird eine spezifische Anleitung gegeben.

2 Normative Verweisungen

Es gibt keine normativen Verweisungen in diesem Dokument.

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

3.1

Makroinvertebraten

Wirbellose, die leicht ohne Vergrößerung erkennbar sind ($> 0,5 \text{ mm}$) und im Allgemeinen zu den Organismengruppen gehören, die mindestens eine Lebensphase auf oder im Sohlsubstrat oder in der Vegetation von Oberflächengewässern verbringen

3.2

Matrix

Bestandteile der Probe, die keine Makroinvertebraten sind

4 Grundlage des Verfahrens

Der Prozess zur Bestimmung und Beurteilung der Abundanz von Makroinvertebraten umfasst sowohl Gelände- als auch Laborarbeiten. Eine Vorbehandlung einer frischen Probe sollte im Gelände oder nach der Ankunft im Labor durchgeführt werden, um eine effiziente Analyse zu ermöglichen. Die Vorbehandlung besteht aus Spülen und Sieben, um so viel Matrix wie möglich zu entfernen. Wenn nötig, können spezifische Gruppen (Tabelle 1) direkt sortiert, entfernt und bestimmt werden. Nach der Vorbehandlung sollte die Probe sofort gekühlt und/oder durch Zugabe von Konservierungsmittel konserviert werden. Alternativ zur Kühlung oder Konservierung können die Proben auch bei $\leq -18\text{ °C}$ eingefroren werden. Einfrieren ist für Plathelminthes und Annelida nicht geeignet.

Im Labor sollte die Notwendigkeit und Auswahl einer nachfolgenden Sortierung durch visuelle Inspektion der Zusammensetzung des Matrixmaterials (Schlamm, Ton, Sand, Makrophyten) sowie der Anzahl der Organismen bestimmt werden. Ein solches Verfahren kann ein weiteres Spülen und Reinigen und/oder Unterteilen der Probe umfassen. Im Falle von konservierten Proben werden kleine Schalen in Kombination mit einem Stereo-Zoom-Mikroskop verwendet. Bei nicht konservierten Proben werden Makroinvertebraten visuell (mit bloßem Auge oder Lupe) auf einer Schale aussortiert. Organismen werden umgehend in die wichtigsten taxonomischen Gruppen eingeteilt. Danach werden die Individuen jeder Gruppe bis zum gewünschten taxonomischen Level bestimmt.

Im Allgemeinen ist die kleinste brauchbare Maschengröße für das Sammeln der Makroinvertebraten 500 μm (z. B. Proben für EN ISO 10870), da hiermit in den meisten Gewässern die Makroinvertebraten zuverlässig erfasst werden und gleichzeitig eine effektive Spülung ermöglicht wird. In spezifischen Situationen (z. B. in klaren steinigen Flüssen) kann eine kleinere Maschengröße zum besseren Erfassen kleiner Makroinvertebraten gewählt werden.

Für Proben, die für die DNA-Analyse bestimmt sind, sollte besonderes Augenmerk auf die Arbeit mit sauberen Geräten während des gesamten Prozesses gelegt werden, um das Risiko einer Kreuzkontamination während des Gelände- und Laborverfahrens zu minimieren.

Tabelle 1 — Typische taxonomische Gruppen der Makroinvertebraten

Bryozoen, Cnidaria, Porifera
Plathelminthes
Annelida (Hirudinea, Oligochaeta, Polychaeta)
Crustacea-(Decapoda, Isopoda, Amphipoda, Mysida etc.)
Diptera-(Chironomidae etc.)
Arachnida
Coleoptera
Ephemeroptera
Heteroptera
Lepidoptera
Odonata
Trichoptera
Insecta etc.
Bivalvia
Gastropoda

5 Ausrüstung, Konservierungsmittel und Reagenzien

5.1 Siebe

Jedes neue Sieb muss vor Benutzung sorgfältig auf die genaue Maschengröße geprüft werden. Falls die Maschengröße den gewünschten Qualitätsgrad nicht erfüllt, muss das Sieb vom Gebrauch ausgeschlossen werden. Vor jedem Gebrauch sollte ein Sieb auf Beschädigungen untersucht werden. Die entscheidenden kleinsten Siebe typischerweise mit Maschenweite 500 µm, die einen wesentlichen Einfluss auf die Qualität der Untersuchung haben, sollten nachvollziehbar kalibriert werden.

Für DNA-basierte Studien ist die Entfernung von größeren, sichtbaren Verunreinigungen durch Waschen der Ausrüstung mit Wasser nicht ausreichend. Stattdessen sollten die Siebe vorzugsweise mit einer geeigneten Bleichlösung vor der Beprobung einer neuen Untersuchungsstelle gereinigt werden.

5.2 Mikroskop

Für eine genaue quantitative Sortierung und die für meisten Bestimmungen wird ein einfaches Stereo-Zoom-Mikroskop (typische Vergrößerung ~10x bis 60x) benötigt. Für die Artendiagnose von spezifischen Gruppen wie Chironomidae und Oligochaeta sollte ein Verbundmikroskop (typische Vergrößerung 40x bis 400x) verwendet werden.

5.3 Konservierungs- und Fixiermittel

5.3.1 Allgemeines

Es gibt einen deutlichen Unterschied zwischen Fixierung und Konservierung. Im Allgemeinen wird die Fixierung für die morphologische Analyse angewendet, aber die Proben sollten niemals, auch nicht für kurze Zeit, in einem Fixiermittel gelagert werden. Im Rahmen der Makroinvertebraten-Analyse sind Ethanol als Konservierungsmittel und Formaldehyd als Fixiermittel traditionell die am häufigsten verwendeten Chemikalien.

5.3.2 Ethanol, C₂H₅OH

Die endgültige Ethanolkonzentration in der Probe sollte etwa 70 % betragen (≥ 80% für Proben, die für die DNA-Extraktion vorgesehen sind), um die Konservierung zuverlässig sicherzustellen. Deswegen sollte der Probe in den meisten Fällen Ethanol 96 % zugesetzt werden, um die Verdünnung durch Probenwasser zu kompensieren. Ethanol-Konzentrationen weit über 70 % lassen viele Organismen verhärten, wodurch sich diese schwer bearbeiten und bestimmen lassen. Ethanolkonzentrationen unter 70 % führen zu Gewebeabbau.

Proben von Makroinvertebraten, die für DNA-Studien oder DNA-basierte Bestimmung verwendet werden, die aber für längere Zeit vor der Analyse gelagert werden müssen (z. B. DNA-Barcodierung), sollten innerhalb von zwei Tagen nach der Probenahme in ≥ 90 % Ethanol gelegt und vorzugsweise an einem kühlen und dunklen Ort aufbewahrt werden. Bei Konzentrationen unter 80 % degeneriert sich die DNA.

5.3.3 Formaldehyd, 37 % (Volumenanteil)

Formaldehyd sollte der Probe zugesetzt werden, um eine Endkonzentration von 4 % bis 6 % zu erhalten. Es eignet sich am besten für die Fixierung von Organismen, da Beschädigungen und Schrumpfen verhindert werden. Formaldehyd ist nicht für die DNA-Analyse geeignet und Formaldehyd sollte ferner nur wenn unbedingt nötig angewendet werden, da es für den Menschen gefährlich ist. Die Fixierung mit Formaldehyd sollte auf 24 h begrenzt werden. Danach sollten die Organismen gründlich gespült und in 70 % Ethanol zur (Langzeit-)Lagerung vorbereitet werden.

Die Konservierung durch Ethanol und die Fixierung mit Formalin wirkt sich auf die Abschätzung von Biomasse aus. Obwohl der Gewichtsverlust durch Ethanol eine wesentlich größere Rolle spielt als der durch

Formalin, sind darüber von keinem der beiden Konservierungsmittel wissenschaftliche Daten verfügbar. Daher sollte vor Ermittlung der Biomasse konservierter Organismen eine Fehlerabschätzung für die jeweiligen taxonomischen Gruppen vorgenommen werden, wobei die relevanten Bedingungen für die Probenahme und Konservierung zu berücksichtigen sind.

5.4 Reagenzien zur Untersuchung mit Verbundmikroskopen

5.4.1 Allgemeines

Viele Chemikalien sind dafür bekannt die Mikroskop-Bildqualität zu verbessern, was die morphologische Differenzialdiagnose erheblich erleichtert. Koenike-Gemisch und Laevulose-Sirup sind die am häufigsten verwendeten Reagenzien. Beide Lösungen können bei Raumtemperatur für ein Jahr gelagert werden.

5.4.2 Koenike-Gemisch

Koenike-Gemisch besteht aus 50 ml Glycerin mit 30 ml Wasser und 20 ml Essigsäure. Diese Lösung kann bei Raumtemperatur für unbegrenzte Zeit gelagert werden. Koenike-Gemisch dient zur Bestimmung und Langzeitlagerung von Acari.

5.4.3 Laevulose-Sirup

Laevulose-Sirup besteht aus 25 g D(-)Fructose, die in 25 ml Wasser eingerührt werden (Magnetstab). Nach leichtem Erwärmen wird 25 ml Milchsäure hinzugegeben und erneut umgerührt. Laevulose-Sirup wird zur Bestimmung von Oligochaeta und Chironomidae verwendet.

6 Durchführung

6.1 Allgemeines

Bei der Lebendsortierung werden die Proben vorzugsweise innerhalb von 24 h (max. 48 h) sortiert und Maßnahmen zur Vermeidung von Prädation [1] sowie Absterben von Organismen durch Sauerstoffmangel ergriffen. Logistische Abwägungen und die negativen Auswirkungen von Prädation erfordern die Konservierung der Proben vor dem Sortieren. Wenn Proben konserviert werden, kann es vorteilhaft sein, bestimmte Gruppen (z. B. Plathelminthes) bereits aus der Lebend-Probe im Gelände zur Bestimmung auszusortieren, um die für einige Organismengruppen negativen Effekte einer unspezifischen Konservierung zu vermeiden.

6.2 Auswahl der Konservierungsmittel

Ethanol ist das beste universelle Konservierungsmittel. Vor der Zugabe von Ethanol sollte überschüssiges Probenwasser abgegossen werden, um die Verdünnungseffekte zu minimieren. Bei Proben mit absorbierendem Material und/oder relativ großen Organismen (z. B. wie bei zahlreichen Weichtieren) sollte das 96 %ige Ethanol einmal ausgetauscht werden, um eine Endkonzentration ($\approx 70\%$) in der Probe sicherzustellen. Der Probenbehälter sollte nicht mehr als ein Drittel mit Material gefüllt werden. Ethanol sollte zugegeben werden, bis die Probe vollständig bedeckt und der Behälter gefüllt ist, um eine Konzentration von 75 % zu erreichen. Die Ethanolkonzentration sollte regelmäßig mit einem Ethanolmeter geprüft werden. Diese Kontrolle kann am besten in einem Messzylinder durchgeführt werden.

Falls Formaldehyd zur Konservierung verwendet wird (nicht empfohlen), ist das Abgießen von Probenwasser nicht erforderlich. Üblicherweise wird 37 % Formaldehyd verwendet, um eine Endkonzentration von 4 % bis 6 % zu erhalten.

Nachdem das Konservierungsmittel zugegeben worden ist, sollte die Probe vorsichtig bewegt werden, um das Konservierungsmittel zu verteilen.