

3.6. Plankton

3.6.1. Phytoplankton

3.6.1.1. Begriffsbestimmung

Phytoplankton ist die Lebensgemeinschaft der im freien Wasser lebenden pflanzlichen (photosynthetischen) Organismen, die sich aus mikroskopisch kleinen Cyanobakterien (Prokaryoten) und Algen (Protisten) zusammensetzt. Diese Gruppe kommt in nahezu allen Oberflächengewässern vor – schwebend oder aktiv beweglich.

3.6.1.2. Anwendungsbereich

Phytoplankton spielt eine entscheidende Rolle in der Primärproduktion aquatischer Ökosysteme. Wenn ein hohes Maß an Nährstoffen und Licht vorhanden ist, kann Phytoplankton hohe Populationsdichten entwickeln, dadurch die Wasserqualität negativ beeinflussen und bei der Nutzung Probleme verursachen, wie z. B. Wassertrübung und Vegetationsfärbung, Geruchs- und Geschmacksbeeinträchtigung, Verstopfung von Filtern bei der Wasseraufbereitung. Einige Arten produzieren Toxine. Deshalb ist die Kenntnis über Vorkommen und Wachstumspotential des Phytoplanktons von großem wissenschaftlichen und praktischen Interesse.

In diesem Kapitel sollen die grundlegenden Methoden qualitativer und quantitativer phytoplanktologischer Arbeit dargestellt werden. Methoden der Ermittlung von Volumen und Biomasse von Algen sind in Kap. 5. beschrieben.

3.6.1.3. Geräte und Chemikalien

Die zusätzlich zur allgemeinen Ausrüstung eines biologischen Labors notwendigen Geräte, Apparaturen und Chemikalien zur Planktonuntersuchung werden wegen der speziellen Anwendungen und Probleme bei den jeweiligen Arbeitsschritten angeben.

3.6.1.4. Probenahme

Probenahmefrequenz

Phytoplanktonorganismen können recht schnell wachsen, leben relativ kurz und sind im Wasserkörper unterschiedlich verteilt. Heranwachsende Blaualgen- und Algenpopulationen können sich in 2–3 Tagen oder noch schneller verdoppeln. Deshalb sollten Phytoplanktonproben in möglichst kurzen Intervallen genommen werden: Wöchentliche Probenahmen haben sich als geeignet erwiesen, die saisonale Dynamik adäquat zu erfassen.

Beispiel: Abb. 3.6.1.1. verdeutlicht, daß selbst in einem oligotrophen See, in dem das Phytoplanktonwachstum im Vergleich zu stärker eutrophierten Gewässern langsamer abläuft, bei monatlicher Probenahme Jahresmaxima übersehen werden können. Das Phytoplankton des oligotrophen Stechlinsees wurde 1992 und 1993 monatlich, 1994 hingegen wöchentlich untersucht. Die Trends in den epilimnischen Biomasseänderungen sind ähnlich, jedoch ist das Frühjahrsmaximum in den beiden ersten Probejahren nur andeutungsweise erfaßt worden (PADISÁK, SCHEFFLER, unveröff.).

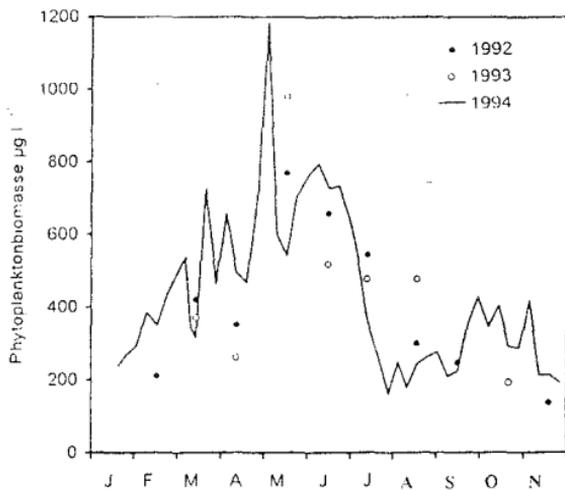


Abb. 3.6.1.1. Phytoplanktonbiomasse ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) im Stechlinsee in den Jahren 1992, 1993 und 1994. Nach PADISÁK, SCHEFFLER, unveröff.

Integrierte Probenahmen (Mischproben) sind angezeigt, wenn ein Überblick über die ganze Wassersäule oder Ausschnitte daraus von Interesse sind. Sie können mit Hilfe von röhrenartigen Wasserschöpfern oder durch Mischen von Proben aus verschiedenen Tiefen gewonnen werden. In flachen, nicht geschichteten Seen ist die gesamte Wassersäule (von der Oberfläche bis zu 20 cm über dem Sediment) zu beproben. In geschichteten Seen sind integrierte Proben des Epilimnions erforderlich, wenn $z_{eu} \leq z_{epi}$ (z_{eu} = Tiefe der euphotischen Schicht; z_{epi} = Tiefe des Epilimnions). Bei $z_{eu} \geq z_{epi}$ ist es am günstigsten, integrierte Proben aus der euphotischen Schicht zu sammeln.

Diskrete Wasserproben werden aus bestimmten Tiefen gesammelt und einzeln abgefüllt. Die Auswahl der Entnahmetiefe hängt von der Lichtverteilung und den Schichtungsverhältnissen ab. Spezielle Untersuchungsziele erfordern natürlich eine speziell ausgerichtete Probenahmemethodik, die von der hier geschilderten Vorgehensweise abweichen kann.

Probenahmegeräte und -methoden

Phytoplanktonorganismen gehören unterschiedlichen Größenklassen an (nach SOMMER 1994):

Picoplankton	0,2 - 2 μm .
Nanoplankton	2 - 20 μm .
Mikroplankton	20 - 200 μm .
Mesoplankton	200 - 2000 μm .
Makroplankton	2 - 20 mm.

Die Wahl des Probenahmegerätes sollte gut darauf abgestimmt sein, welche Größenklassen vorrangiges Interesse bei den geplanten Untersuchungen haben.

Phytoplanktonnetze werden in verschiedenen Maschenweiten angeboten. Sie dienen vorwiegend der Anreicherung von größeren Phytoplanktern. Picoplankter und einige Nanoplankter gehen durch die Maschen der Netze und sind in den Proben unterrepräsentiert. In der Regel wird für die Sammlung von Mikroplanktern (z. B. für das Anreichern von Blaualgenkolonien und -trichomen) und die darüberliegenden Größenklassen ein Netz mit 40 μm Maschenweite benutzt. Das sogenannte „Nano-Netz“ hat eine Maschenweite von 10 μm und kann kleinere Phytoplankter erfassen; natürlich wird die pro-

duktionsbiologisch interessante Gruppe der Picoplankter hiermit mehr erfaßt. Wird das Planktonnetz vom fahrenden Boot aus gezogen oder eine definierte Anzahl von Horizontal- oder Vertikalzügen vollführt, so ist zu berücksichtigen, daß eine genaue Bestimmung des Wasserdurchsatzes infolge von Rückstau nicht möglich ist. Dies kann umgangen werden, indem das Wasser erst in Kanistern gesammelt, abgemessen und anschließend durch das Netz gegossen wird. In manchen Fällen kann durch übereinandergehaltene Planktonnetze eine fraktionierte Vorfiltration direkt am Entnahmeort nützlich sein.

Wasserschöpfer erlauben wesentlich genauer, die räumliche Verteilung der Phytoplankter in definierten Bereichen der Gewässer zu untersuchen. Sie werden in verschiedenen Versionen angeboten. Am bekanntesten ist der Standard-Wasserschöpfer nach RUTNER. Der Wasserschöpfer wird an einer Leine in die gewünschte Tiefe abgesenkt und nach einer gewissen Zeit, die das Einströmen des Wassers aus dieser Zone in den Schöpfer erlaubt, durch ein Gewicht, welches an der Leine abgelassen wird, oder durch einen anderen Mechanismus geschlossen. Anschließend wird die Wasserprobe an die Oberfläche gezogen und in die Aufbewahrungsgefäße gefüllt. Im Falle einer im Labor vorgesehenen quantitativen Analyse sollten Proben unmittelbar vor Ort in Schliffflaschen mit Fixierungslösung gefüllt werden. Um ein späteres sorgfältiges Umschütten der Probe zu ermöglichen, dürfen die Flaschen nicht vollständig mit Probenwasser gefüllt sein.

Röhrenschöpfer sind eine spezielle Abwandlung der Standard-Schöpfer und werden meistens in „Eigenbau“ gefertigt. Es handelt sich vorzugsweise um Röhre aus Plexiglas oder Plastik (kein zerbrechliches Glas, Arbeitsschutz!), die wegen ihrer Handhabbarkeit nicht länger als 1,5 m sein sollten. Die einfachste Version eines Röhrenschöpfers ist ein solches Rohr mit einem Durchmesser von 0,5-1 cm, das in das Freiwasser des Untersuchungsgewässers „gestochen“, dann mit einem Finger oder einem Stopfen oben abgedichtet und aus dem Wasser gezogen wird. Auf diese Weise (nach dem Prinzip einer Pipette) kann eine integrierte Probe aus flachen Gewässern gewonnen werden. Komfortablere Versionen haben Mechanismen, welche die Röhre unten und oben abdichten, und besitzen in bestimmten Abständen Auslauföffnungen, um die „ausgestochene“ Wassersäule in definierten Portionen aus bestimmten Tiefen abzufüllen. Diese Röhrenschöpfer sollten jedoch mindestens 5 cm, besser 10 cm im Durchmesser haben, um Turbulenzen zu minimieren, die beim Eintauchen in die Wassersäule bzw. beim Abfüllen verursacht werden. Mit einem derartigen Gerät kann z. B. das Wanderungsverhalten von Phytoflagellaten untersucht werden (GERVAIS 1997).

Planktonpumpen, welche an entsprechend langen Schläuchen angeschlossen werden, können zum „Aufsaugen“ von größeren Mengen Probenwasser aus tieferen Wasserschichten dienen.

Lebendproben für morphologisch-ontogenetische oder taxonomische Untersuchungen, bei denen die genaue räumliche Verteilung im Gewässer eine untergeordnete Rolle spielt, können auch auf folgende einfache Weise gewonnen werden: Mit Hilfe eines Schöpfbechers oder einer weithalsigen Flasche an einer Schnur oder einer langen Holzstange wird die Probe vom Ufer oder besser vom Bootssteg aus geschöpft und frisch in Kanister oder Flaschen gefüllt. Diese Gefäße dürfen nur zur Hälfte gefüllt sein, nicht dem direkten Sonnenlicht ausgesetzt und müssen möglichst kühl gelagert werden, um Zersetzungsprozesse zu verhindern. Vorteilhaft ist, das Probenwasser beim Einfüllen durch ein feines Sieb oder ein grobes Planktonnetz zu filtrieren, um Detrituspartikel und Zooplankton zu entfernen. Dabei leisten selbstgefertigte Trichter aus der oberen Hälfte einer Plastikflasche beste Dienste. Ihre Öffnung wird mit einem Stück Planktongaze verschlossen, die am Gewindehals der Flasche fest verschürt wird.

3.6.1.5. Probenkonservierung und Transport

Fixierung mit Lugolscher Lösung

Lugolsche Lösung ist das bewährteste Fixierungsmittel für quantitative Phytoplanktonuntersuchungen. Es verleiht den Organismen durch Absorption von Jod eine höhere Dichte, so daß ein Sedimentieren in Planktonkammern gefördert wird.

Herstellung der Stammlösung:

20 g Kaliumjodid in 200 ml aqua dest. lösen und anschließend 10 g sublimiertes Jod hinzufügen. Die Lösung darf nicht übersättigt werden, weil sonst ausgefallene Jodkristalle bei der Untersuchung der Probe stören könnten. Eine mögliche Übersättigung kann getestet werden, indem 1 ml der Stammlösung in 100 ml aqua dest. gelöst und nach einer gewissen Sedimentationszeit überprüft wird. Sind noch Kristalle nachweisbar, muß weiteres Kaliumjodid hinzugefügt (ca. 5 g) und der Test wiederholt werden. Wenn keine Kristalle mehr erscheinen, wird die Stammlösung fertiggestellt, indem 20 ml Eisessig zugegeben werden.

Probleme:

1. Zarte Diatomeenschalen (*Rhizosolenia*, *Acanthoceras*, *Chaetoceros*) und Schuppen von Chrysoomonaden (*Mallomonas*), vornehmlich aus alkalischen Gewässern, können nach 3 Monaten aufgelöst werden. Solche Proben sollten besser bald nach Probenahme untersucht werden. Dicke Schuppen von *Mallomonas* sind nach ca. 1 Jahr aufgelöst.
2. In Wasser mit hohem Anteil organischer Masse oder hoher Algendichte wird Jod reduziert. Die Proben bleichen aus und sollten nachfixiert werden.
3. Die Lorica von *Phacotus* und Kalkkrustationen anderer Algen können nach einigen Wochen aufgelöst sein. Es empfiehlt sich, eine Parallelprobe mit neutralisiertem Formaldehyd zu fixieren.

Fixierung mit Formaldehyd

Die Fixierung mit neutralisierter Formaldehydlösung bietet die Möglichkeit, morphologische Strukturen der Phytoplankter deutlicher zu erhalten, da der Zellinhalt nicht so sehr wie mit Lugolscher Lösung durch Stärkereaktion dunkel überfärbt bzw. manche Strukturen nicht so schnell zerstört werden.

Herstellung der Fixierungslösung: 500 ml 40%iges Formaldehyd in 500 ml aqua dest. verdünnen und 100 g Hexamethylentetramin hinzufügen; nach einer Woche filtrieren. (pH = 7.3–7.9). Zur Fixierung 4 ml Formaldehydlösung auf 200 ml Probenwasser geben.

Problem: Formaldehyd sollte aus gesundheitlichen Gründen nicht eingeatmet oder mit der Haut in Kontakt gebracht werden.

Aufbewahrung der Proben

Fixierte Phytoplanktonproben werden normalerweise in Schliffflaschen aus hellem Glas aufbewahrt, damit man eventuelle Veränderungen, die eine Nachfixierung nötig machen, beobachten kann. Diese Flaschen sollten jedoch dunkel gelagert werden, da im Licht die Alterung der Probe schneller voranschreitet.

Falls Proben mit robusten Arten für lange Zeit deponiert werden sollen, empfiehlt es sich, diese in Injektionsampullen zu füllen, deren Öffnung am Bunsenbrenner dicht zugeschmolzen wird. So kann Referenzmaterial platzsparend für nachfolgende Phytoplanktologengenerationen aufbewahrt werden. Lugolfixierte Proben müssen zusätzlich mit neutralisiertem Formaldehyd (Endkonzentration 3–4 %) konserviert werden.

3.6.1.6. Untersuchungsgang

Reinigung und Präparation planktischer Diatomeen

Die zur Bestimmung planktischer Kieselalgen notwendigen Merkmale, feinste Strukturen der Kieselschalen, werden mikroskopisch nur sichtbar, wenn die Algen von ihren organischen Bestandteilen (Hüllmembran, Zellinhalt) vollständig befreit sind. Da sich solche Merkmale auch auf der Innenseite der Valven (= Schalen) befinden und nur im Rasterelektronenmikroskop (REM) erkannt werden können, ist in vielen Fällen sogar die Trennung der beiden Valven der Algen zur Identifikation notwendig. Die Reinigung kann nach zwei Methoden erfolgen. Ihre Wahl richtet sich nach dem Ziel der Untersuchung.

Reinigung durch Glühen

Die Methode wird gewählt, wenn die Algen ungeteilt in Epi- und Hypotheka untersucht werden müssen und die Erhaltung der Zellverbände und Zellkolonien notwendig ist. Für die qualitative Bestimmung im Lichtmikroskop (LM) sowie quantitative Fragestellungen ist sie zu bevorzugen. Das angereicherte Material (z. B. als Abrieb vom angefeuchteten Filter) wird mit einem kleinen Pinsel als \pm konzentrierter Tropfen auf Deckgläser (max. Stärke 0.17 mm) exponiert. Je nach Materialdicke wird eine Verdünnung mit aqua dest. angeraten sein. Die Deckgläser werden dann im Muffelofen bei 400 °C ca. 2 h geblüht. Bei kleinen und zarten Formen kann diese Zeit auf ca. 10 min reduziert werden.

Reinigung durch Kochen

Diese Methode wird angewandt, wenn die Valven der Zellen voneinander zu trennen sind. Durch Kochen des Materials können außerdem störende anorganische Beimengungen, wie z. B. Kalk, entfernt werden. Das konzentrierte, möglichst wasserfreie Material oder das Membranfilter mit dem angereicherten Plankton wird mit 30%igem Wasserstoffperoxid (H_2O_2) versetzt, erhitzt und 1–10 min gekocht. (Wegen der Gefahr des explosiven Zerfalls muß darauf geachtet werden, daß dabei das H_2O_2 nicht vollständig verkocht!) Die Länge des Kochvorgangs bis zum Sprengen der Frusteln hängt vom Material ab. Sehr zarte, schwach verkieselte Formen (z. B. kleine *Cyclotella*-Arten) benötigen nur ca. 1 min, größere Formen müssen bis 10 min gekocht werden. Als Richtwert hat sich für fast alle Planktonproben eine Kochzeit von ca. 3 min bewährt. Anschließend wird tropfenweise (Vorsicht!) 30%ige Salzsäure (HCl konz.) zugegeben, um Kalk zu entfernen. Dann wird die Probe mit aqua dest. stark verdünnt, auf einem neuen Membranfilter (Porenweite ca. 1 μ m) wieder angereichert und auf dem Filter mit aqua dest. gründlich gewaschen. Als Abrieb vom angefeuchteten Filter wird ein \pm konzentrierter Tropfen des Materials auf Deckgläser (siehe oben) exponiert.

Herstellung von Dauerpräparaten

Das gereinigte Material wird zu Dauerpräparaten verarbeitet. Es wird in das Kunstharz Naphrax (Brechungsindex $n_D = 1.69$) auf folgende Weise eingebettet: Ein fettfreier Objektträger wird mit einem kleinen Tropfen des Einschlußmediums versehen und die Deckgläser mit dem lufttrockenen Material vorsichtig in diesen eingelegt. Um das Lösungsmittel (Toluol) auszutreiben und damit das Deckglas unverrückbar zu befestigen, wird das Präparat unter Beobachtung noch einmal vorsichtig erhitzt, bis das Naphrax ca. 3 s lang Blasen wirft. Während der anschließenden schnellen Abkühlung kann das Deckglas noch gerichtet werden. Das Präparat ist nun für die lichtmikroskopische Beobachtung vorbereitet.

Bezugsquelle Naphrax: z. B. Northern Biological Supplies, 3 Betts Avenue, Martlesham Heath, Ipswich IP5 7HR, England.

Herstellung von REM-Präparaten

Soll das gereinigte Material im REM untersucht werden, erfolgt eine Aufbringung auf Deckgläser wie beschrieben. Diese werden mit Leitkohle oder Leitsilber auf spezielle REM-Objektträger montiert, mit Metallen, in der Regel mit Gold, besputtert und können dann im REM untersucht werden. Ungereinigte Schöpfproben, die mit Lugolscher Lösung fixiert sind, können im REM ebenfalls bearbeitet werden. Sie werden dazu auf Nucleoprefilter angereichert. „Nach Lufttrocknung bei Raumtemperatur wird der Filter mit einem doppelseitigen Klebeband auf dem REM-Objektträger fixiert und an zwei Randstellen mit Leitkohle oder -silber direkt mit dem Träger verbunden. Nach vollständigem Verdampfen der Lösungsmittel aus dem Leitmaterial werden die Objekte mit Gold besputtert“ (KLEE, STEINBERG 1987).

Anreicherung der Proben

Filtration

Für qualitative Phytoplanktonuntersuchungen können im Labor unmittelbar nach der Probenahme Wasserproben durch Membranfilter (Porendurchmesser 0.6–2.5 µm) angereichert werden. Es wird vorsichtig filtriert, bis kaum noch Wasser durch das Filter geht. Anschließend wird das Filtrat in wenig Originalwasser am besten in einem Blockschälchen abgewaschen und steht zur Lebenduntersuchung oder zur Fixierung zur Verfügung. Sollen Dauerpräparate z. B. von Kieselalgen angefertigt werden, kann das Filtrat auf den Filtern verbleiben (s. Reinigung und Präparation planktischer Diatomeen).

Probleme: zarte Flagellaten (*Rhodomonas*, *Cryptomonas*) können die Filterporen passieren oder zarte Zellverbände bzw. Kolonien (*Synura*, *Uroglena*) werden bei der Filtration zerstört.

Zentrifugation

Zentrifugation ist eine schnelle und bequeme Methode der Anreicherung, besonders, wenn die Arten groß und robust sind. Empfehlenswert ist eine Geschwindigkeit von $1500 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ (360 g) bei einer Zentrifugationsdauer von 15 min und einem Probenvolumen von 10–20 ml (BALLANTINE 1953). Der Konzentrationsprozeß wird gefördert, wenn der Probe ein Fällungsgagens hinzugefügt wird (0.05 ml 1%ige Aluminiumsulfatlösung pro 10 ml Probe).

Probleme: Zu schnelles Abstoppen der Zentrifuge führt zum Aufwirbeln. Blaualgen mit Vakuolen können nicht angereichert werden.

Sedimentation

Diese Methode ist langsamer als die anderen Methoden, aber schonender und genauer (LUND et al. 1958). Die Sedimentation in speziellen Kammern für die Arbeit am Umgekehrten Mikroskop ist unten beschrieben, die Konzentration für andere Untersuchungen hier.

Um Konvektionsprobleme zu vermeiden, sollte das Sedimentationsgefäß ein Verhältnis Höhe : Durchmesser von 5 nicht überschreiten (NAUWERCK 1963). Nach FURET, BENSON-EVANS (1982) ist eine Absetzzeit von 48 h bei 16 cm Säulenhöhe und 20°C akzeptabel für Lugol-fixierte Phytoplanktonproben. Sind kleine zentrische Diatomeen enthalten, ist eine Sedimentationszeit von 96 h nötig. Nach dem Sedimentieren ist der Überstand sorgfältig abzusaugen. Dazu ist ein Schlauch mit U-förmigem Ende, an der Oberfläche

der Wassersäule beginnend, vorsichtig während des Absaugens nach unten zu führen, bis ca. 90 % der Probenflüssigkeit abgeflossen sind. Die restlichen 10 % verbleiben und dienen zum Aufschütteln des Sediments.

Probleme: Vakuolenbesitzende Blaualgen (*Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*) sedimentieren nicht. Abhilfe kann geschaffen werden, indem frische Proben vor dem Fixieren randvoll in eine Plastikflasche gefüllt werden und diese fest verschlossen wird. Die Flasche wird nun mehrfach aus ca. 1 m Höhe auf eine harte Unterlage fallen gelassen. Der beim Aufprall entstehende Druck führt zum Kollabieren der Gasvakuolen.

Qualitative Phytoplanktonuntersuchungen

Zur Identifikation der Untersuchungsorganismen sollte, wenn möglich, neben fixiertem auch lebendes Material herangezogen werden, weil in konservierten Proben viele diagnostische Merkmale verlorengehen. Jede Algengruppe erfordert spezielle Vorgehensweisen und ein hohes Maß an Erfahrung. Viele Algengruppen lassen sich nur mit Hilfe des Elektronenmikroskops oder von Kulturen bestimmen. Die derzeitige Situation in der Algenkunde erfordert die Verknüpfung von Feld- und Laborbiologie sowie von klassischen und modernen Methoden. Dennoch sollte sich der Phytoplanktologe nicht entmutigen lassen, die Determination bis zur niedersten taxonomischen Kategorie anzustreben, ohne allerdings in Spekulation zu verfallen. Dies wird in vielen Fällen nicht die Stufe der Art, sondern nur die der Gattung sein können; manchmal muß notgedrungen auf solche Sammelbegriffe wie „kleine zentrische Diatomeen“ oder „grüne μ -Algen“ zurückgegriffen werden. Der Bearbeiter muß die von ihm erhobenen Befunde so genau wie möglich dokumentieren (Zeichnung, Foto, konserviertes Referenzmaterial). Leider wird die taxonomische Arbeit oft vernachlässigt, was dazu führen kann, daß ganze Zählreihen entwertet werden, weil später niemand nachvollziehen kann, welche Organismen Träger der jeweiligen Biomassemaxima waren.

Einer der am stärksten limitierenden Faktoren ist das Fehlen von modernen Bestimmungswerken. Ein breites Bild über die Situation vermittelt der Umstand, daß für die Cyanophyta immer noch GETTLER, L. (1930-1932): Cyanophyceae in: Rabenhorsts „Kryptogamenflora von Deutschland, Österreich und der Schweiz“ Bd. 14, eigentlich das „modernste“ Referenzwerk darstellt. Ein aktuelles Werk über chroococcale Blaualgen von KOMÁREK, ANAGNOSTIDIS in der „Süßwasserflora“ ist gegenwärtig in Vorbereitung. Für die anderen wichtigen Algengruppen des Phytoplanktons können die jeweiligen Bände im Rahmen der „Süßwasserflora“ (Hrsg.: EITL, GÄRTNER, HEYNIK, MOLLENHAUER, im Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, New York) sowie des „Phytoplankton des Süßwassers“ (Hrsg.: HUBER-PESTALOZZI, in der E. Schweizerbartschen Verlagsbuchhandlung, Stuttgart) empfohlen werden. In diesen Büchern sind auch nähere Hinweise zur Untersuchungsmethodik der jeweiligen taxonomischen Gruppe zu finden.

Quantitative Phytoplanktonuntersuchungen

Methode nach UTERMÖHL mit dem Umgekehrten Mikroskop

UTERMÖHL (1958) prüfte verschiedene Zähltechniken, bis er zur Erfindung seiner eigenen Zählkammer und einer Technik mit dem Umgekehrten Mikroskop kam. Seine Methode bekam die größte Verbreitung für zuverlässige Zählungen von Phytoplankton. Sie ist für alle Algen gut geeignet, einschließlich der sehr kleinen Formen. Die Proben werden mit Lugolscher Lösung fixiert und in eine Sedimentationskammer gefüllt. Die Algen sedimentieren dann auf den Glasboden der Kammer. Gezählt werden die Algen entweder in der ganzen Kammerfläche oder auf einzelnen Teilen davon.

1. Zählkammern und Sedimentationsröhren

Beides kann entweder von Optik- oder Mikroskop-Firmen käuflich erworben werden oder wird vom Untersucher selbst hergestellt. Die Zählkammern bestehen aus Tuben variabler Länge und sind mit einem Bodenglas von der Stärke eines mikroskopischen Deckglases versehen. Auch besitzen sie eine Glasplatte, um die Wassersäule zu fixieren. Die am meisten verbreiteten Kammern haben einen Durchmesser von 2,5 cm und eine Höhe zwischen 0,5 und 2 cm (= 2–10 ml). Wenn ein großes Wasservolumen zu sedimentieren ist, sind höhere Sedimentationskammern zu nutzen. Lange Tuben haben jedoch nicht genügend Platz unter dem Umgekehrten Mikroskop. Wegen des langen Lichtweges durch die Wassersäule ist auch die optische Qualität nicht ideal. Diese Nachteile können durch die Verwendung von Verbundkammern vermieden werden. Sie bestehen aus einer unteren Plattenkammer und einem beweglichen Röhrenaufsatz. Nach der Sedimentation der Algen wird dieser Röhrenaufsatz mit dem überstehenden Wasser von der Plattenkammer entfernt. Die Dichte der Algen in der Probe bestimmt die Menge des zur Sedimentation angesetzten Wassers, die Art der Zähltechnik (Felder- oder Streifenzählung, siehe unten) sowie die gewählte mikroskopische Vergrößerung.

2. Sedimentationszeit

Bevor die Proben angesetzt werden, ist ihre Anpassung an die Raumtemperatur notwendig, weil sich sonst während der Sedimentation Luftblasen in der Röhre entwickeln. Auch muß die Wasserprobe vor dem Einfüllen vorsichtig aber gut geschüttelt werden, um eine gleichmäßige Verteilung der Partikel zu erreichen. Die Kammern müssen auf eine horizontale Fläche aufgestellt werden. Direktes Sonnenlicht, Temperaturwechsel und Störungen (Vibration) während der Sedimentation müssen vermieden werden. Die Sedimentationszeit ist von der Höhe der Kammer und der Art der Fixierung abhängig. In der Literatur werden verschiedene Sedimentationszeiten angegeben (LUND et al. 1958; JAVORNICKY 1958; NAUWERCK 1963). Für Proben, die in Lugolscher Lösung fixiert sind, wird übereinstimmend eine Zeit von 3–4 h pro cm Flüssigkeitshöhe angegeben. Proben, die mit Formalin fixiert wurden, sollen eine doppelt so lange Sedimentationszeit haben (EDLER 1979). Zusammenhänge zwischen der Secchi-Sichttiefe, der Kammerhöhe und der Sedimentationszeit wurden von ROTT (1981) aufgezeigt (Tab. 3.6.1.1.).

Tab. 3.6.1.1. Zusammenhang zwischen Kammerhöhe und Sedimentationszeit. Nach ROTT 1981

Sichttiefe	Kammerhöhe	Sedimentationszeit
>2–4 m	10 cm	10–48 h
2–4 m	5 cm	5–20 h
1–2 m	2 cm	2–8 h
<1 m	0,4 cm (oder Verdünnung)	1 h

Zählmethoden

Wenn die Algen sedimentiert sind, kann die Zählung beginnen. Folgende Methoden sind am weitesten verbreitet: a) Zählung der gesamten Kammerfläche, b) Zählung in Streifen, c) Zählung in Feldern. Wenn die Algen auf der gesamten Kammerfläche gezählt werden, ist die Breite und Zahl der Zählstreifen belanglos. Werden sie auf ausgewählten Zählgebieten (Streifen oder Feldern) gezählt, müssen die Zählgebiete mit einem Okularmikrometer ausgemessen werden. (Sein Gebrauch ist in den Anweisungen für die Mikroskope beschrieben.)

1. Zählung der gesamten Zählkammer (Abb. 3.6.1.2. a):

Diese Methode ist empfehlenswert, um große und seltene Arten zu zählen (*Ceratium*, *Synura*, *Volvox* etc.). Die gesamte Fläche der Kammer wird durchmustert, und man erhält die Gesamtzahl der Organismen im sedimentierten Probevolumen.

2. Streifenzählung (Abb. 3.6.1.2. b):

Die Algen werden in Streifen gezählt, deren variable Einstellung durch Spezialokulare ermöglicht wird. Die Zählstreifen sollen den Mittelpunkt der Kammer kreuzen. Weil das Auge des Untersuchers in der Regel entweder der Zählung in vertikaler oder in horizontaler Richtung angepaßt ist, kann die entsprechende Position durch Drehung der Zählkammer erlangt werden. Jede Alge, die im Zählstreifen gefunden wird, wird gezählt.

3. Felderzählung (Abb. 3.6.1.2. c):

Alle Algen können auch auf zufällig ausgewählten Feldern gezählt werden. Bei ihrer Auswahl sollte man nicht in das Mikroskop schauen. Das Sichtfeld, welches durch das Zählgitter begrenzt ist, wird in der Regel als ein Zählfeld berücksichtigt. Ist kein Zählgitter vorhanden, wird das gesamte Sichtfeld des Okulars als Zählfeld betrachtet.

Weil die Dichte der verschiedenen Arten in einer Probe variiert, außerdem die Größendifferenz ihrer Biovolumina sehr groß ist, ist eine Kombination der Zähltechniken empfehlenswert: Zur Erfassung der großen Formen wird bei geringer Vergrößerung (bis 100fach) die gesamte Kammerfläche ausgezählt und anschließend bei hoher Vergrößerung (200-, 400-, 1000fach) eine Streifen- oder Felderzählung durchgeführt.

In den meisten statistischen Analysen der Zählung mit diesen Methoden wird eine gleichmäßige Verteilung der Algen in der Zählkammer angenommen. Leider zeigen Experimente, daß eine Konvektion in der Kammer sehr schwer zu vermeiden ist und sich nur selten alle Algen gleichmäßig auf der Bodenfläche der Kammer absetzen. Fast immer sind sie an einer Ecke der Kammer dichter als an einer anderen. Eine von der ungleichmäßigen Verteilung hervorgerufene Unter- oder Überschätzung kann durch Streifenzählung verkleinert werden. Deshalb empfehlen die Autoren die Streifenzählung, sogar bei hohen Vergrößerungen. Nach Rorr (1981) kann eine Zählung mit wenigstens 4 Zählstreifen diesen Fehler minimieren. Die Zeit für eine Zählung ist am kürzesten,

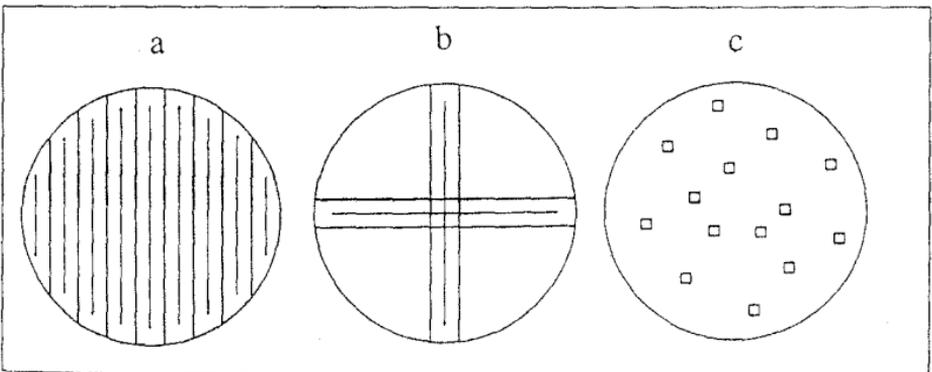


Abb. 3.6.1.2. Zähltechniken: a) Zählen der gesamten Kammeroberfläche, b) Zählen von Zählstreifen, c) Zählen von Zählfeldern.

wenn etwa 100 Zählleinheiten (Zellen, Kolonien, Fäden, Coenobien) in einem Zählgebiet abgesetzt sind. Bei mehr oder weniger Organismen verlängert sich die Zeit des Zählens. Die zur statistischen Sicherung notwendigen Zellzahlen können durch die Wahl des angesetzten Probenvolumens erreicht werden. Für kleine Formen ist eine Zählung bei 1000facher Vergrößerung und Ölimmersion angeraten, weil sie bei geringerer Vergrößerung (z. B. 400fach) leicht übersehen oder verwechselt werden können. Algen, die genau auf dem Rand des Zählgebietes liegen (Streifen oder Felder), stellen ein häufiges Problem dar: Zählt man sie, oder zählt man sie nicht? Die generelle Praxis ist die Entscheidung zwischen „aktiven“ und „inaktiven“ Rändern. Wenn im Falle der Streifenzählung die Alge quer über dem linken Rand liegt, kann sie vernachlässigt werden. Liegt sie aber über dem rechten Rand, muß sie registriert werden. Bei der Felderzählung werden zwei Seiten der Zählfläche ignoriert und zwei Seiten gezählt. Diese Methode kann jedoch bei fädigen Algen problematisch sein. Eine alternative Methode wird später beschrieben (Zählproblem 2).

Registrierung der Daten im Zählprotokoll

Phytoplanktonarten sind entweder einzellig oder kommen in unterschiedlich zusammengesetzten Zellverbänden vor (Kolonien, Coenobien, Fäden). Die Zahl dieser Zellverbände (z. B. die Zahl der *Tabellaria*-Bänder, *Scenedesmus*-Coenobien, Zellfäden) ist wichtig, um den Fehler abschätzen zu können (siehe später). Um jedoch Biovolumen und Biomasse genau zu berechnen, benötigt man die Kenntnis der Zellzahlen jeder Art.

Tab. 3.6.1.2. Protokollbeispiel

Artname	Zählergebnisse	Zellzahl oder Fadenlänge	Gezählte Einheiten	Maximaler Fehler der Schätzung
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	(110)(90)(120)(70)(20)(90)	500	6	82 %
<i>Rhodomonas</i> sp.	 	85	85	22 %
<i>Cryptomonas erosa/ovata</i>		20	20	45 %
<i>Dinobryon sociale</i>	(5)(1)(15)(7)(3)(5)(5)(2) (11)(1)(1)(2)(1)(6)(4)(9) (1)(1)(2)(4)	86	20	45 %
<i>Chrysochromulina parva</i>	 	135	135	17 %
<i>Synedra acus</i>	 	50	50	28 %
small centric diatoms	 	77	77	23 %
<i>Chlamydomonas</i> sp.		13	13	55 %
<i>Scenedesmus armatus</i>	(4)(4)(4)(4)(4)(4)(4)(4) (4)	40	10	32 %
Gesamtphytoplankton			446	9 %

2. Zählung von fädigen Formen, die über die Grenze der Zählfelder hinausgehen (z. B. bei Streifenzählung)

Eine mögliche Methode ist, die Fäden so zu zählen wie andere Algen auch: Algen, welche die linke Grenze kreuzen, werden vernachlässigt, Algen, welche die rechte Grenze überschreiten, werden in ihrer totalen Länge gezählt (Abb. 3.6.1.3. a). **Nachteile:** 1. Die Unter- oder Überschätzung der Biomasse ist besonders hoch bei Arten, die nicht sehr häufig sind und deren Fadenzahl innerhalb eines weiten Bereiches variiert. 2. Manchmal reichen die Enden der Fäden bis außerhalb des Sichtfeldes und machen die Messung schwierig. **Vorteile:** Die Zahl der Fäden ist korrekt, die Biomassewerte der einzelnen Fäden sind korrekt, und die Parameter der Populationsdynamik kann man gut abschätzen.

Die andere Methode ist die Zählung nur der Fadenteile, die genau im Zählgebiet liegen, unabhängig davon, ob die Fäden die Grenzen rechts und links überschreiten (Abb. 3.6.1.3. b). **Nachteile:** Die Fadenzahl wird überschätzt, und es ist unmöglich zu verfolgen, ob das Volumen der Fäden innerhalb einer Population unterschiedlich ist. Vorteile sind die zuverlässigen Biomassewerte und ein immer konstantes Zählfeld.

3. Die Bestimmung der Zellzahl von Arten mit kugelförmigen Kolonien (z. B. *Volvox*, *Uroglena*)

Volvox- und *Uroglena*-Kolonien sind groß, sie werden mit geringen Vergrößerungen gezählt. Die Zellzahlen in den Kolonien sind jedoch meist schwierig zu beurteilen. In solchen Fällen ist der Wechsel zur größtmöglichen Vergrößerung angeraten, bei der noch die Beobachtung eines Teils der Kolonie möglich ist, der als flach angesehen werden kann. Gezählt werden die Zellen, die sich in der Zählfläche (das ganze Sichtfeld oder eine andere exakt definierte Fläche) befinden. Die bekannte Zahl der Zellen auf diesem Teil der Oberfläche wird dann auf die gesamte Oberfläche der Kolonie kalkuliert. Zur Berechnung dient die Formel für die Kugeloberfläche. Diese Methode kann auch für verschiedene Arten der *Coccolophaeriaceae* (Cyanobacteria) verwandt werden.

4. Die Ermittlung der Artenzugehörigkeit zentrischer Diatomeen

Zentrische Diatomeen sind in der Zählkammer nur im Ausnahmefall bis zur Art zu bestimmen. Man erkennt die Einzelheiten der Schalenstruktur erst an gereinigtem Material im LM-Dauerpräparat oder im REM (Reinigung und Herstellung von Dauer- und REM-Präparaten siehe oben). Voraussetzung für die Bestimmung ist die Verwendung eines 100fachen Immersionsobjektivs hoher numerischer Apertur (> 1.0). Die Beobachtungsmethoden Hellfeld, Phasenkontrast und Differentialkontrast sind verwendbar. Im Hellfeld ist die Kontrastierung mit Schieflicht sehr zweckmäßig. Sollen von den identifizierten Taxa quantitative Aussagen gewonnen werden, z. B. Zellzahlen, so ist die Verwendung eines Gitternetzes im Okular des Mikroskops zweckmäßig. Bei einem Fehler von $\pm 10\%$ müssen je Streupräparat 400 Zellen in ihrer zufälligen Anordnung bestimmt werden (vgl. Tab. 3.6.1.4.). Es muß aber berücksichtigt werden, daß Reinigung und Präparation einen Schwund von Material verursachen können. Beispiel: Zum Vergleich wurden Diatomeenzellen (Müggelsee, Berlin; Februar 1995) in Zählkammern und als Dauerpräparat unter gleichen Bedingungen gezählt und ausgemessen (Abb. 3.6.1.4.). Die Unterschiede in der Größenklassenverteilung zeigen, daß kleinere, schwach verkielte Schalen im Dauerpräparat überproportional stärker reduziert wurden als größere. Auch ist es nicht mehr möglich, zwischen zur Zeit der Probenahme lebenden und toten Zellen zu unterscheiden.

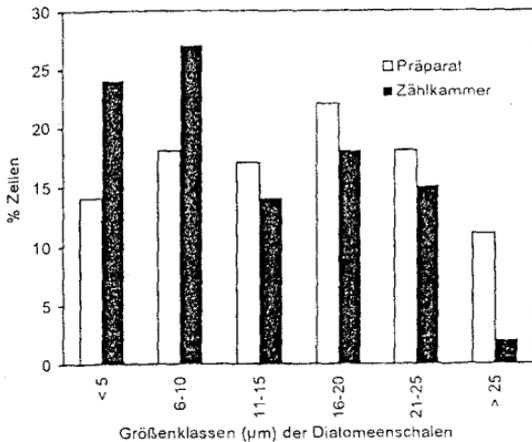


Abb. 3.6.1.4. Relative Anteile von Kieselalgen mit verschiedenem Durchmesser, ermittelt in Präparaten und Zählkammern. Müggelsee, Berlin; Februar 1995. Nach PAĐIŠÁK, HOEG, unveröff.

Berechnung der Resultate

1. Streifen-Zählung

Wenn der Radius des Bodenglases r [mm] ist, und wir n Zählstreifen mit einer Breite von a [mm] gezählt haben, dann ist die Zahl der Algen (I) im Zählfeld $I = n \cdot 2r \cdot a$. Wenn die Gesamtzahl der Algen (i) in der sedimentierten Probe (v) [ml] ist, dann ist

$$i = \frac{I \cdot r^2 \cdot p}{n \cdot 2r \cdot a} \quad [\text{Individuen} \cdot \text{Probe}^{-1}]$$

Die Berechnung für 1 Liter Probenflüssigkeit erfolgt nach folgender Formel:

$$i = \frac{1000 \cdot r^2 \cdot p \cdot I}{n \cdot 2r \cdot a} = i = \frac{1000 \cdot r \cdot p \cdot I}{2n \cdot a \cdot v} \quad [\text{Individuen} \cdot \text{l}^{-1}]$$

2. Felder-Zählung

$$i = \frac{I \cdot F \cdot 10^6}{a \cdot n \cdot v} \cdot 1000 \quad [\text{Individuen} \cdot \text{l}^{-1}]$$

mit

I = Zahl der gezählten Exemplare

F = Fläche des Bodenglases [mm^2]

a = Fläche eines Feldes [μm^2]

n = Zahl der Felder, in denen Algen gezählt wurden

v = Probenvolumen

10^6 = Umrechnungsfaktor zwischen mm^2 und μm^2

3. Andere Zählmethoden

Falls ein Umgekehrtes Mikroskop nicht zur Verfügung steht, kann auf einige andere Methoden zurückgegriffen werden. Diese Methoden sind jedoch nicht so erfolgreich wie die Arbeit mit dem Umgekehrten Mikroskop.

Haemocytometer, wie z. B. die Thomakammer, bestehen aus einem speziellen Objektträger (Zählplatte) mit eingeschiffenem Zählnetz und Deckglas. Die Arbeit mit der Thomakammer ist ausführlich bei TSCHAU-SCHLÜTER (1982) beschrieben.

Die **Kolkwitzkammer** besteht aus einer Bodenplatte mit Zählnetz und der eigentlichen 0.5 ml fassenden Planktonkammer. Da diese Füllmenge nur sehr gering ist, sollte die Planktonprobe zuvor angereichert werden, z. B. durch Sedimentation in einem Standzylinder. Die Kolkwitzkammer wird auf den Kreuztisch eines Mikroskops mit normalem Strahlengang gestellt. Da der Abstand zwischen den in der Kammer sedimentierten Planktern und dem Objektiv groß ist, können stark vergrößernde Objektive mit geringem Abstand nicht eingesetzt werden.

Die **Agarplattenmethode** kann benutzt werden, wenn kein Umgekehrtes Mikroskop oder andere spezielle Zählrüstung vorhanden ist. Dazu wird die verkonzentrierte Probe mit Ausziehtusche versetzt. Ein kleiner Tropfen (mit bekanntem Volumen) wird dann auf eine dünne Agarschicht gegeben, die auf einem normalen Objektträger aufgebracht ist.

Präparation der Agarschicht: 1 g trockenen Agars wird mit einigen ml Leitungswasser gemischt und für 6 h bei Zimmertemperatur stehengelassen. Dann wird die Mixtur zusammen mit 100 ml Leitungswasser in ein Glasgefäß mit weiter Öffnung gegeben, anschließend im Autoklaven (100 kPa Überdruck) oder im Wasserbad verflüssigt und in Petrischalen gefüllt (2–3 mm Schichtdicke). Die Petrischalen sind abzudeckeln und im Kühlschrank aufzubewahren.

Eine Teilprobe von 10–20 ml der präparierten, vorkonzentrierten und gut gemischten Wasserprobe wird mit einigen Tropfen Ausziehtusche versetzt, bis die Probe eine schwachgraue Farbe annimmt. Von dieser Mixtur werden 0.5 µl auf die Agarplatte getropft. Das Wasser wird teilweise verdunsten und teilweise in den Agar eindringen. Die Grenze des Tropfens wird durch die Tusche klar abgebildet. Nun wird die Stelle der Agarschicht, welche den Tropfen enthält, herausgeschnitten, auf einen Objektträger gebracht und mit einem Deckgläschen bedeckt. Es werden alle Individuen gezählt, da es keine gleichmäßige Verteilung der Algen auf dem Agar gibt: Kleine Zellen sind mehr auf die Randbereiche konzentriert. Wenn ein Tropfen nicht genügend Zellen enthält, sind mehrere Tropfen zu zählen, bis eine ausreichende statistische Sicherheit gegeben ist.

Bei der **Membranfiltermethode** werden 1–50 ml der Probe mit schwachem Vakuum durch ein Membranfilter (Porengröße: 0.2–0.5 µm) gesaugt. Wenn infolge der Partikeldichte der Probe (eutrophe Gewässer) nur weniger als 10 ml filtriert werden können, muß die Probe verdünnt werden, weil die Verteilung der Zellen auf dem Filter sonst ungleichmäßig wird. Nun wird ein Tropfen Cellosolv auf ein Deckglas gegeben und gleichmäßig verteilt. Das völlig trockene Filter mit der durchgesaugten Probe wird insgesamt oder zum Teil mit der das Filtrat tragenden Seite nach unten auf das mit Cellosolv (SIGMA Chemie GmbH, Deisenhofen: ethylene glycol monoethyl ether) präparierte Deckglas gelegt, ohne daß dabei Luftblasen verbleiben. Dann wird ein Tropfen Cellosolv auf die obere Seite des Filters gegeben. Dieses Präparat wird so lange getrocknet, bis das Filter transparent wird (nach ca. 1 h) und kann dann auf einen Objektträger platziert werden.

Die Zählung wird auf einer definierten Fläche des Filters durchgeführt. Diese Fläche kann sich aus einem vorgeprägtem Netz auf dem Filter ergeben oder durch eine Netzplatte im Okular des Mikroskops. Unter Vermeidung von Mehrfachzählungen einzelner Felder ist auf stichprobenartig gewählten Feldern zu zählen.

Berechnung:

$$i = \frac{I \cdot F \cdot 10^6}{a \cdot n \cdot v} = 1000 \quad [\text{Individuen} \cdot \text{l}^{-1}]$$

mit

I = Zahl aller gezählten Exemplare

F = Gesamtfläche der mit Algen bedeckten Filterfläche [mm²]

a = Fläche eines Zählfeldes [µm²]

n = Zahl der gezählten Felder

v = Volumen der filtrierten Probe [ml]

10^6 = Umrechnungsfaktor von mm² in µm²

Picoplanktonzählungen im Epifluoreszenzmikroskop

Wenn Algenzellen mit blau-violetttem Licht angeregt werden (Wellenlänge 450 nm), emittiert das Chlorophyll das absorbierte Licht bei einer längeren Wellenlänge als rote Fluoreszenz. Diese Fluoreszenz kann zur Unterscheidung von zellulärem Material und Detritus sowie zur Verdeutlichung von picoplanktischen Zellen genutzt werden. Es ist im Prinzip nicht nötig, mit lebendem Material zu arbeiten, weil auch fixierte Zellen fluoreszieren.

1. Probenvorbereitung

Es ist zwar besser, autotrophes Picoplankton (APP) lebend zu untersuchen, dennoch wird es sich aus technischen Gründen nicht immer vermeiden lassen, die Proben zu fixieren. Es wurden verschiedene Methoden beschrieben, deren Vergleich (HALL 1991) zeigt, daß Paraformaldehyd in 0,2 %iger Konzentration verbunden mit Tiefgefrieren (-20°C) die Autofluoreszenz von Chlorophyll a und Phycoerythrin erhält.

2. Geräte und Materialien

Epifluoreszenzmikroskop mit 100er Ölimmersions-Objektiv hoher numerischer Apertur, Hochdruck-Quecksilber-Lampe (50–200 W) oder Xenon-Lampe (75–150 W), 8–12.5er Okulare mit Okularmikrometer und Zählnetz, austauschbares Filter/Spiegel-Set für Grün- (ca. 500–550 nm) oder Blauanregung (ca. 420–490 nm) (vgl. MALSAAC, STOCKNER 1993)

Filtrationseinrichtung

Objektträger und Deckgläser

Nichtfluoreszierendes Immersionsöl (30%ige Glycerollösung)

Membranfilter aus Polycarbonat (Nucleopore; 0,2 µm Porendurchmesser) werden am häufigsten benutzt. Sie sind vor ihrer Verwendung zu färben (10 min mit Irgalan Schwarz, Ciba-Geigy 2 g · l⁻¹ in 2%iger Essigsäure). Alternativ können handelsübliche, vorgefärbte Filter genutzt werden. Schwarze Zellulosenitratfilter mit niedrigem Acetatgehalt sind auch verwendbar, jedoch ist ihre Oberfläche nicht so eben, was ein verstärktes Fokussieren nötig macht.

3. Arbeitsablauf

Aliquote Mengen frischen oder konservierten Probenwassers (5–25 ml aus oligotrophen bis mesotrophen Gewässern, 1–10 ml aus eutrophen Gewässern) werden durch schwarze Filter filtriert. Unter das schwarze Filter kann ein normales Membranfilter gelegt werden, das zur gleichmäßigeren Verteilung der Zellen auf dem schwarzen Filter beiträgt. Das Vakuum sollte nicht stärker als 5 kPa sein. Die ganze Filtrationsarbeit ist zügig in einem abgedunkelten Raum durchzuführen. Die Filter mit den Proben sind unbedingt vor Licht zu schützen. Unmittelbar nach der Filtration der Probenflüssigkeit sind die feuchten Filter nach Reduzieren des Vakuums vom Filterhalter zu nehmen und folgendermaßen zu bearbeiten:

Polycarbonatfilter auf einen Objektträger legen, einen kleinen Tropfen nicht fluoreszierenden Immersionsöls auf die Filteroberfläche geben und mit einem Deckglas vorsichtig abdecken, ohne daß Luftblasen entstehen. Nun kann die Probe direkt ausgezählt oder für die spätere Bearbeitung tiefgefroren werden.

Alternativ: Zellulosenitratfilter in Tropfen von 30 %igem Glycerol (ober- und unterhalb des Filters) auf einem Objektträger einlegen, mit einem Deckglas abdecken und auf das Deckglas einen Tropfen Immersionsöl geben.

Die Zählung erfolgt in einem abgedunkelten Raum, die Augen des Bearbeiters sind dunkeladaptiert. Die Lokalisierung des APP wird unter Violett-Blau-Anregung vorgenommen. Eukaryoten zeigen gewöhnlich eine tiefrote Epifluoreszenz, während kleine Cyanobakterien gelb-orange bis hellrot fluoreszieren. Der Wechsel zur Grünanregung verstärkt das Erscheinungsbild der Cyanobakterien (vgl. MALSAAC, STOCKNER 1993). Picoplanktonzellen werden nun in Abhängigkeit von ihrer Dichte auf dem gesamten oder auf Teilen des Zählfeldes gezählt. Gewöhnlich werden sie als Morphotypen bewertet. Die Zählung von 400 Einheiten erbringt eine Zählgenauigkeit von $\pm 10\%$. MALSAAC, STOCKNER (1993) empfehlen, 100–200 Zellen von jeder dominanten Form in 20–30 beliebigen Zählfeldern zu zählen, wenn die Picoplanktonabundanz sehr gering ist. Die Bestimmung der Biomasse für größere Plankter erfolgt nach der in Kapitel 5 beschriebenen Weise. Berechnung: siehe Membranfiltermethode.

Zählprobleme

1. Das schnelle Verblassen der Zellfluoreszenz namentlich in frischen Proben kann durch eine Reduzierung der Lichtintensität durch Filter im Strahlengang verlangsamt werden. Das schrittweise Abfahren des Zählfeldes in Abschnitten, die ca. 20 Zählheiten enthalten, ist hilfreich.
2. Es können auf den Proben auch nicht-biologische aber fluoreszierende Partikel vorkommen. Diese fluoreszieren jedoch greller und verblassen nicht.

Zusammenhänge zwischen APP-Dichte und -Produktion und trophischen Bedingungen, wie von STOCKNER (1991) diskutiert, werden in Tab. 3.6.1.3. zusammengestellt. Beachte: Die Zellzahl nimmt linear mit dem trophischen Status von ultra-oligotroph bis schwach eutroph zu, dann sinkt sie, und im hypertrophen Bereich ist die Zellzahl wieder sehr hoch. Dies unterstreicht, daß der quantitative Nachweis von APP eine gute trophische Indikation darstellen kann.

Tab. 3.6.1.3. Beziehungen zwischen Gesamtphosphor, Zellzahl des autotrophen Picoplanktons (APP) und Anteil des APP an der Phytoplanktonbiomasse und Primärproduktion. Angaben als Jahresmittel. Nach STOCKNER 1991

	Gesamt-P (mg · l ⁻¹)	APP-Zellzahl (Zellen · ml ⁻¹)	APP-Anteil (%) (Gesamtbiomasse/Produktion)
ultra-oligotroph	<1.5	<2 · 10 ⁴	>80 %
oligotroph	1.5–10	2 · 10 ⁴ –2 · 10 ⁵	80–55 %
mesotroph-eutroph	10–50	2 · 10 ⁵ –2.5 · 10 ⁶	55–25 %
eutroph	50–220	2.5 · 10 ⁶ –2 · 10 ⁴ (?)	25–2 %
hypertroph	>220	2 · 10 ⁴ (?)–10 ⁸	2–25 %

4. Hilfsgeräte: Zählgeräte, Computer

Im Prinzip sind Zählprotokolle handgeschriebene Dokumente. Dennoch finden weltweit für die Zählungen immer stärker mechanische oder elektronische Zählgeräte Anwendung. Sie können die benötigte Untersuchungszeit erheblich verkürzen, speziell wenn nur wenige Arten in der Probe enthalten sind. Wenn die Probe artenreich ist, sind die Zählgeräte nutzbringend bei der Zählung der dominierenden Arten einzusetzen. Zählgeräte wurden ursprünglich für die Zählung von Blutkörperchen konstruiert und sind im Handel erhältlich.

Inzwischen sind Computerprogramme für die Zählungen entwickelt worden. Eines dieser Programme wird von HAMILTON (1990) beschrieben. Nach dem Laden des Programms kann der Keyboard des Computers als mechanisch/elektronisches Zählgerät eingesetzt werden. Der Hauptunterschied zu herkömmlichen Zählgeräten besteht darin, daß mehr Arten gezählt werden können und nach der Eingabe der Parameter (Vergrößerung, Größe und Form des Zählfeldes, Volumen der sedimentierten Probe etc.) und nach Zellgrößenmessungen das Protokoll auch Angaben über Biomasse und Statistik liefern kann. Informationen auf Diskette sind auf Anfrage lieferbar (P. B. HAMILTON, Botany Division, National Museum of Natural Sciences, P. O. Box 3443, Station D, Ottawa, Ontario, Canada, KIP 6P4). Ein entsprechendes Programm bietet auch KRAMBECK (Max-Planck-Institut für Limnologie, Plön) an.

3.6.1.7. Störungsquellen

Die Störungsquellen sind im Untersuchungsgang so vielfältig und abhängig von der angewandten Methode sowie den zu untersuchenden Organismen, daß sie an den entsprechenden Stellen im Untersuchungsgang ausgewiesen wurden.

3.6.1.8. Auswertung und statistische Sicherung

Die Genauigkeit der Phytoplanktonzählungen hängt sehr davon ab, wieviel Zählseinheiten (Einzelzellen, Kolonien, Coenobien, Fäden) der jeweiligen Probe gezählt werden. Es ist ohne Relevanz, wieviel Zählfelder oder Zählstreifen gezählt werden, um die angestrebte Zahl von Zählseinheiten, die zu hoher statistischer Absicherung nötig sind, zu gewinnen. Der Zusammenhang zwischen Zahl der Zählseinheiten und maximalem Fehler (LUND et al. 1958) ist in Tab. 3.6.1.4. zusammengestellt. Der maximale Fehler der Schätzung kann nach folgender Formel ermittelt werden:

$$\text{Fehler}_{\max} = 2 \cdot (100/\sqrt{n}) \quad [\%]$$

Hierbei ist n die Zahl der Zählseinheiten. Diese Formel geht von einer Zufallsverteilung aus und hat im Prinzip ein 95%iges Konfidenzintervall.

Tab. 3.6.1.4. Beziehungen zwischen der Anzahl gezählter Einheiten und dem geschätzten maximalen Fehler. Nach LUND et al. 1958

Gezählte Zählseinheiten	Maximaler Fehler
4	± 100 %
16	± 50 %
50	± 28 %
75	± 24 %
100	± 20 %
400	± 10 %
40 000	± 1 %

Beispiel: Insgesamt sind 446 Zählseinheiten gezählt worden, welche auf 9 verschiedene Arten verteilt sind. Tab. 3.6.1.2. zeigt die Zahl der Zellen, Zählseinheiten und den maximalen Fehler der Schätzung für jede Art und für die Gesamtzählung.

In der Literatur gibt es verschiedene Empfehlungen über die Zahl der notwendigen Zählseinheiten. Es ist praktisch hoffnungslos zu versuchen, jede Art mit einer akzeptablen Fehlerwahrscheinlichkeit (20–30 %) zu zählen. Das wird dadurch erklärt, daß auch

mit einem noch so hohen Probenaufwand niemals alle im Gewässer vorhandenen Arten erfaßt werden können.

Beispiel: In 6 ml einer Wasserprobe aus dem hypertrophen Teil des Balatons (Ungarn) sind 1980 etwa 10^5 Exemplare gezählt worden (PADISÁK 1992). Das Verhältnis zwischen ausgezähltem Probenvolumen und Zahl der Arten ist in Abb. 3.6.1.5. dargestellt. Bei steigendem Probenvolumen wurden ständig weitere Taxa gefunden, was die Aussichtslosigkeit des Wunsches nach „Vollständigkeit“ illustriert.

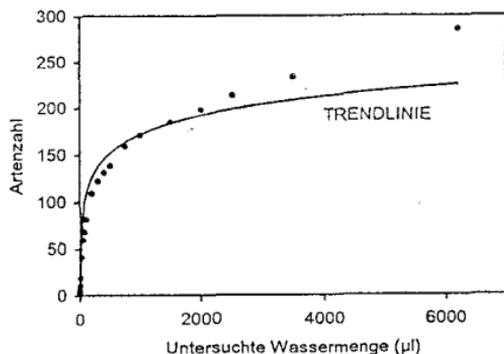


Abb. 3.6.1.5. Artenzahl in Einzeldaten (Punkte) und Trendlinie im Verhältnis zum untersuchten Wasservolumen. Nach PADISÁK 1992.

Die Erfahrung zeigt, daß kompetitive Gleichgewichtszustände im Verlauf von Phytoplanktonsuccessionen von 1–3 Arten dominiert werden (vgl. Appendix in SOMMER et al. 1993). Es kommt nur selten vor, z. B. in Phasen des Umbruchs, daß 6–8 Arten den Hauptanteil an Biomasse erbringen. Deshalb wird vorgeschlagen, 400–800 Exemplare in jeder Probe zu zählen, wobei ein maximaler Fehler für die gesamte Zählung um 7–10 % zu erwarten ist. Für die dominanten Arten ist ein maximaler Fehler von 10–20 % und für die subdominanten Arten von 20–60 % zu erwarten. Der Rest der Arten muß als ungenügend abgesichert gewertet werden (vgl. Tab. 3.6.1.2.). Dennoch ist in zahlreichen Untersuchungen die Artenvielfalt zu berücksichtigen (zum Beispiel bei Langzeituntersuchungen), weil auch seltene Arten von hoher ökologischer Bedeutung sein können. Der floristische und/oder ökologische Wert einer Art hängt nicht von ihrer aktuellen Individuendichte ab.

Wenn Aspekte der Biodiversität irrelevant sind (z. B. Phytoplanktonzählungen für ingenieurtechnische Zwecke, Kurzzeituntersuchungen in künstlichen Gewässern), kann WILÉNS (1976) vereinfachte Methode angewendet werden, bei der nur eine begrenzte Zahl an Arten (6–8), die 90 % der Gesamtbiomasse repräsentieren, in die Zählung einbezogen werden. Wenn die Zahl der gezählten Exemplare jeder dieser Arten auf ca. 60 beschränkt wird, beträgt die Fehlerwahrscheinlichkeit 26 %.

3.6.1.9. Darstellung der Ergebnisse

Exemplarische Ergebnisdarstellungen wurden bereits in den verschiedenen Kapiteln gegeben:

- Jahresgang der Biomasse oder Zellzahlen (Abb. 3.6.1.1.),
- Histogramme (Abb. 3.6.1.4.),
- Trendlinien (Abb. 3.6.1.5.)

In diesem Sinne lassen sich Zellzahlen bzw. Biomassen des Phytoplanktons wie andere Daten darstellen.

Literatur

- BALLANTINE, D. (1953): Comparison of different methods of estimating nanoplankton. - J. Mar. Biol. Ass. UK 32: 129-147.
- EDLER, L. (Ed.) (1979): Recommendations on methods for marine biological studies in the Baltic Sea. Phytoplankton and chlorophyll. - The Baltic Marine Biologists 5, Malmö, Sweden.
- FURET, J. E., K. BENSON-EVANS (1982): An evaluation of the time requires to obtain complete sedimentation of fixed algal particles prior to enumeration. - Br. Phycol. J. 17: 253-238.
- GERVAIS, F. (1997): Diel vertical migration of *Cryptomonas* and *Chromatium* in the deep chlorophyll maximum of a eutrophic lake. - Journal of Plankton Research 19: 533-550.
- HALL, J. A. (1991): Long-term preservation of picophytoplankton for counting by fluorescence microscopy. - Br. Phycol. J. 26: 169-174.
- HAMILTON, P. B. (1990): The revised edition of a computerized plankton counter for plankton, periphyton and sediment diatom analyses. - Hydrobiologia 194: 23-30.
- HUMPHRIES, S. E., F. WIDAJA (1979): A simple method for separating cells of *Microcystis aeruginosa* for counting. - Br. Phycol. J. 14: 313-316.
- JAVORNICKY, P. (1958): Die Revision einiger Methoden zum Feststellen der Quantität des Phytoplanktons. - Sb. vys. Sk. chem.-technol. Praze, Oddil faculty technologie paliv. a vody. Prague, 2: 283-367.
- KLEE, R., CH. STEINBERG (1987): Kieselalgen Bayerischer Gewässer. - Loseblattsammlung. Informationsberichte Bayer. Landesamt für Wasserwirtschaft 4/1987.
- LUND, J. W. G., C. KIPLING, E. D. LECREN (1958): The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of enumeration by counting. - Hydrobiologia 11: 143-170.
- MALSAAC, E. A., J. G. STOCKNER (1993): Enumeration of phototrophic picoplankton by autofluorescence microscopy. - In: KEMP, F., B. F. SHERR, E. B. SHERR, J. C. COLE (Eds.) Handbook of methods in Aquatic microbial ecology. Lewis Publishers, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo: 187-197.
- NAUWERCK, A. (1963): Die Beziehungen zwischen Zooplankton und Phytoplankton im See Erken. - Symb. Bot. upsal. 17 (5): 1-163.
- PADISÁK, J. (1992): Spatial and temporal scales in phytoplankton ecology. - Abstracta Botanica 16: 15-23.
- ROTT, E. (1981): Some results from phytoplankton counting intercalibrations. - Schweiz. Z. Hydrol. 43: 35-62.
- SOMMER, U. (1994): Planktologie. - Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, NY, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest.
- SOMMER, U., J. PADISÁK, C.S. REYNOLDS, P. JUHÁSZ-NAGY (1993): Hutchinson's heritage: the diversity-disturbance relationship in phytoplankton. - Hydrobiologia 249: 1-8.
- STOCKNER, J. G. (1991): Autotrophic picoplankton in freshwater ecosystems: the view from the summit. - Int. Revue ges. Hydrobiol. 76: 483-492.
- TSCHAU-SCHLÜTER, M. (1982): Ankistrodesmestest. - In: BREITIG, G., W. v. TÜMLING: Ausgewählte Methoden der Wasseruntersuchung. Bd. II: Biologische, mikrobiologische und toxikologische Methoden. - Gustav Fischer Verlag, Jena.
- UTERMÖHL, H. (1958): Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. - Mitt. int. Verein. theor. angew. Limnol. 5: 567-596.
- WILLÉN, E. (1976): A simplified method of phytoplankton counting. - Br. Phycol. J. 11: 265-278.
- ZOHARY, T., A. M. PAIS-MADEIRA (1987): Counting natural populations of *Microcystis aeruginosa*: a simple method for colony disruption into single cells and its effect on cell counts of other species. - J. Limnol. Soc. sth. Afr. 13: 75-77.