

## **Evaluation eines Flächenteilers zur Unterprobenherstellung bei Zooplanktonuntersuchungen**

*Sabine Schmidt-Halewicz<sup>1</sup>, Irina Vollmer-Graf<sup>1</sup> und Corinna Waider<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> LimSa Gewässerbüro, +schmidt-halewicz@limsa.de, <sup>2</sup> Universität Konstanz, Limnologisches Institut

**Keywords:** Zooplankton, Methoden der Limnologie, Sedimentation, Probenteilung, Flächenteiler

### **Einleitung**

Zooplankton wird üblicherweise mittels Netzzug oder mit integrierenden Schöpferfängen aus dem Gewässer in ein kleines Volumen konzentriert (Horn 1999; LUBW 2010). Damit hat der Limnologe die Möglichkeit, das Artenspektrum der Zooplanktonorganismen, Rotatorien und Crustaceen sehr gut zu erfassen, weil auch die seltenen Arten mit wenigen Individuen in kleinen Anzahlen dabei sein werden. Die Individuen-häufigen Arten sind damit in einer Probe jedoch je nach Literzahl des Filtrationsvolumens bis zu 10.000 Individuen vertreten. Da kein Bearbeiter diese Masse bewältigen kann und soll, werden die Proben einem Teilungsverfahren unterworfen, um hernach hochgerechnet zu werden auf das Ursprungsvolumen. Hierzu sind drei Methoden möglich, die unterschiedlich häufig angewendet werden. Es handelt sich hierbei um physikalisch unterschiedliche Teilungsansätze, je nachdem, ob das Volumen unter der Annahme, dass die Organismen darin gleichverteilt sind (Hensen, 1887), oder eine Fläche, auf die die Organismen zuvor gleichverteilt gefallen sind, unterteilt wird. Als dritte Möglichkeit ist eine Kompartimentierungsmethode bekannt geworden (Folsom-Teiler, Daniel & Evans, 1982), worin ein gegebener Raum halbiert wird. Diese Methoden gilt es in Ansätzen zu vergleichen, insbesondere aber die Flächenteilung genauer zu betrachten. Eine möglichst genaue und reproduzierbare Arbeitsweise, sowie Verfahren mit geringem Fehler zu verwenden, sind dabei das Ziel dieser limnologisch-methodischen Arbeit.

In dieser Arbeit wird die Überprüfung eines Flächenteilers in den Fokus gestellt, den W. Geller in den 1980er Jahren angefertigt hatte. Er wurde lediglich in Schwoerbel (1986) skizziert (siehe Abb. 1), sowie in Hoehn et al. (1998) und in der LVLim (Überarbeitung 2012) zur Verwendung vorgeschlagen, aber weder ausreichend überprüft noch publiziert. Als ersten Baustein einer Methodensammlung zu Teilungsverfahren bei der Zooplanktonaufarbeitung soll die Vorstellung einer Projektarbeit dienen, welche 2014 an der Hochschule Konstanz, Studiengang Verfahrenstechnik von Irina Vollmer-Graf vorgelegt wurde. In der Folge wurden verschiedene Verbesserungsmöglichkeiten durchgespielt, die hier ebenfalls behandelt werden.

### **Material und Methoden**

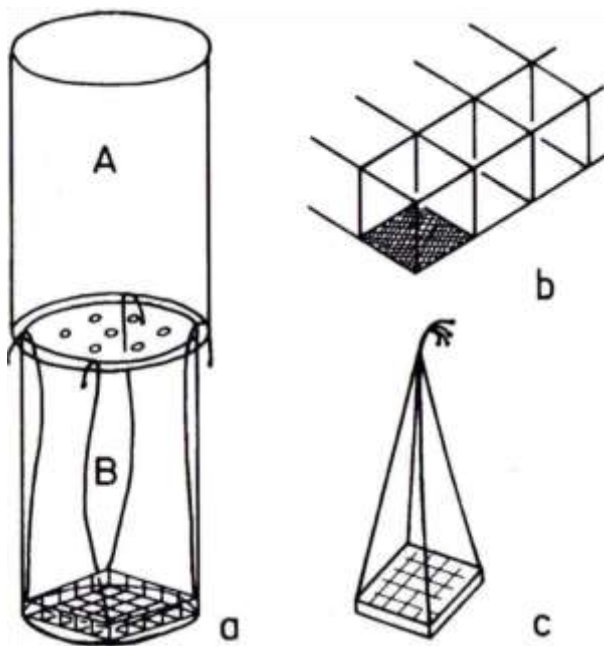
#### ***Aufgabenstellungen der Projektarbeit***

Zur Überprüfung der Funktionstüchtigkeit des Flächenteilers sollte die Anwendung von Kunstpartikeln mit größter Übereinstimmung zum Sinkverhalten von Zooplanktonorganismen verwendet werden. Hierzu wurden Partikel aus Kunststoffen angefertigt, und deren Sinkgeschwindigkeit sowie Reynoldszahl ermittelt. Mit den ausgewählten Partikeln wurde zunächst die Verteilungsüberprüfung

durchgeführt. Es wurden mehrere Einfüllkammern (Abb. 2) hergestellt, um die Einströmung zu verändern. Die Aufgaben i. E. sind wie folgt zu beschreiben:

- Überprüfung der Prozentverhältnisse nach Geller (in Schwoerbel, 1986).
- Überprüfung der Gleichwertigkeit der Teilproben untereinander, mittels Verteilung der Partikelzahlen in die Teilkammern.
- Bestimmung der Variabilität, die durch das Subsampling unter den Teilkammern entsteht.

Je 10 Versuche wurden mit 3 unterschiedlichen Einfüllkammern durchgeführt, die das Einströmen in die Sedimentationskammer beeinflussen. Hierbei wurde mit dem  $X^2$ -Test auf Unterschiede getestet. Zuletzt wurden Verbesserungsvorschläge an der Methode entwickelt und beschrieben. Deren Überprüfung in Anteilen rundet diese kurze Publikation ab.



**Abb. 1: Subsampler für Zooplanktonproben nach Geller. a Einfüllkammer. 4l, Bodenlochung von 5 mm Durchmesser (A) und Sedimentierkammer (B) mit Flächenteiler; b Teilansicht des Flächenteilers mit eingeklebter Gaze; c Flächenteiler mit Schnüren (Quelle: Schwoerbel, 1986)**

### **Verwendete Materialien und Programme**

Der von Geller gebaute Apparat (Abb. 1) wird in Schwoerbel (1986) mit folgenden Eigenschaften beschrieben:

Bodenfläche	150 cm <sup>2</sup>
Gesamtfläche des herausnehmbaren Flächenteilers:	100 cm <sup>2</sup>
Fläche einer einzelnen Teilkammer	4 cm <sup>2</sup>
der Flächenteiler erfasst	66,8 % der Probe
eine Teilkammer erfasst	2,67 % der Probe +/- 0,5%

Dabei ist eine Abweichung von 0,5% ermittelt worden. Dies entspricht einem prozentualen Anteil von 2,17 bis 3,17 % für 1 Teilkammer, egal, wo diese liegt.

Die untersuchten Einfüllkammern E1 bis E3 wurden aus 4-Liter-Dosen hergestellt und hatten folgendes Lochmuster:

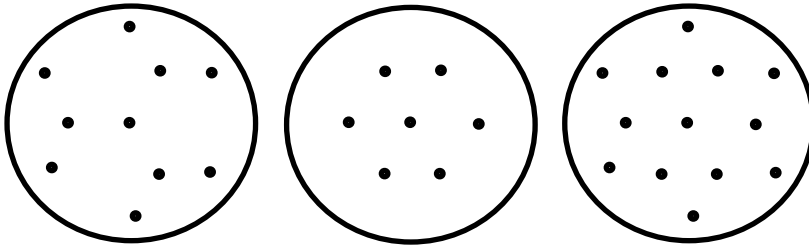


Abb. 2: Lochmuster der Einfüllkammern, links E1, Mitte E2, rechts E3

An Kunststoffpartikeln wurden solche aus Polyoxymethylen (POM) und aus Polyvinylchlorid (PVC) getestet. Zur Anwendung als Zooplankton-Ersatz kamen weiße PVC-Kunststoffpartikel in einem Größenbereich von 250 – 355  $\mu\text{m}$  und einer Dichte von 1,1  $\text{g}/\text{cm}^3$ . Ihre durchschnittliche Reynoldszahl wurde errechnet mit 0,864606, welche dem echten Zooplankton im Bereich 500-1000  $\mu\text{m}$  mit 1,161039 am nächsten kam. In diese dimensionslose Zahl fließen die Größen Sinkgeschwindigkeit, Durchmesser der Partikel, Dichte und Viskosität des Mediums (Fluid) ein (Spurk et al. 2010).

Die Durchführung der Probenteilung verläuft in folgenden Schritten:

1. Flächenteiler in Sedimentierkammer einlegen.
2. 0,5 l Wasser<sup>1</sup> als Vorlage einfüllen.
3. Probe in 4 l fassenden Rundkolben, in 2,5 l suspendieren.
4. Probe in Einfüllkammer, durchlaufen lassen.
5. Nachspülen mit 0,5 l Wasser.
6. 30 Minuten sedimentieren lassen.
7. Flächenteiler entnehmen, in mit Wasser gefüllte Schale legen.
8. Teilproben mit Pipette entnehmen und zählen.

Zur Auswertung wurden folgende Programme bzw. Geräte herangezogen: Sony Cybershot DSC-H1 zur Fotografie der Teilkammern mit den Partikeln, ImageJ 1.47 zur Partikelanzählung am Bildschirm; Excel 2010 zur Tabellenkalkulation, SigmaPlot®12 zur Datenanalyse und grafischen Aufarbeitung.



Abb. 3: Beispielansicht einer Teilkammer mit Partikeln (links) und des gesamten Flächenteilers nach kompletter Auszählung.

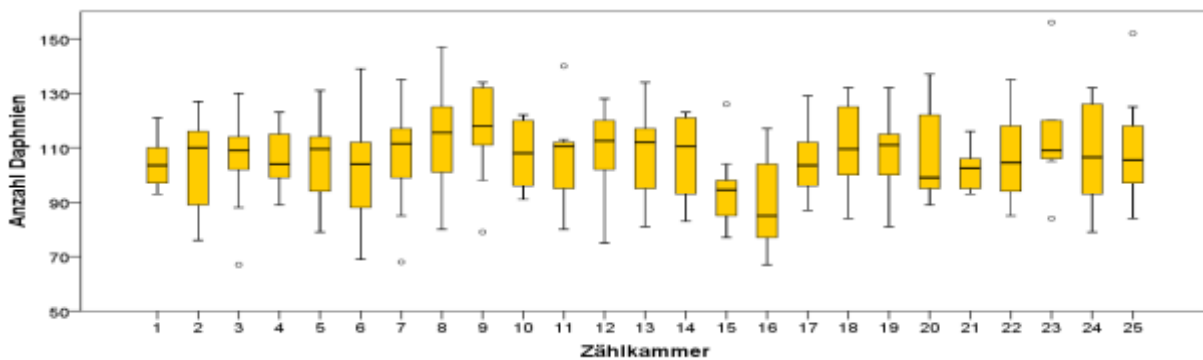
## Ergebnisse und Diskussion

Die Standardabweichung über alle 30 Versuche ergab 14,50 (9,97-20,51). Der Variationskoeffizient errechnet sich auf im Mittel 14,75% (10,03-20,74 %), niedriger als bei anderen Zählkammervergleichen (vgl. LUBW 2012, Horn 1999). Der Prozentanteil einer Teilkammer im Schnitt 2,47% - bestätigt die Angabe (Schwoerbel, 1986).

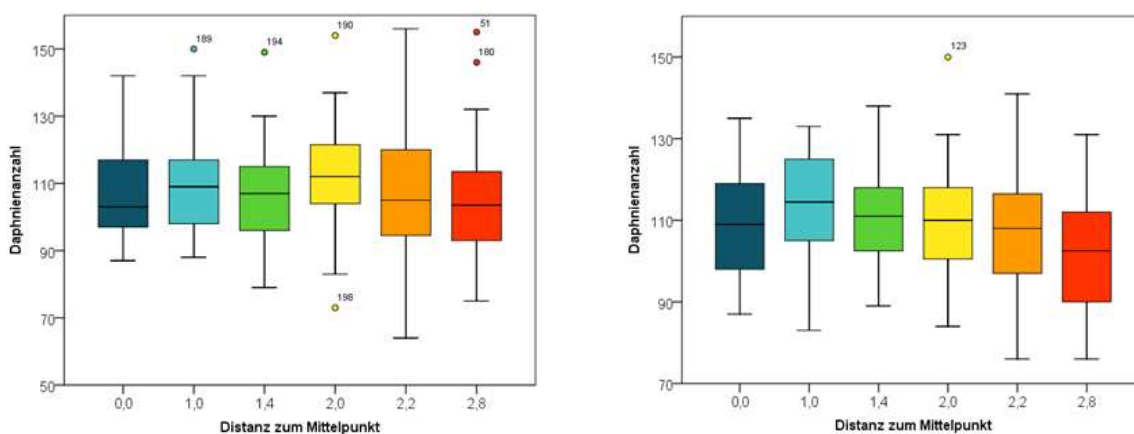
Bei den Wahrscheinlichkeiten für die Gleichverteilung sind die Aussagen anders: nur in 4 von 30 Ansätzen ist die Gleichverteilung mit >5% gegeben – jeweils in einem Ansatz mit den Einfüllkammern 1 (0,38) und 2 (0,15) und in zwei Ansätzen mit Einfüllkammer 3 (0,22 sowie 0,38).

In der Folge wurden Änderungen am Procedere von oben (Methoden) wie folgt vorgenommen:

- Eine statische Partikel- bzw. Organismen-Zahl (gegenüber den Kunstpartikeln, von denen bei jedem Durchgang welche verloren gingen, die Anzahl also leicht sank innerhalb der 10 Durchgänge).
- „Echtes“ Zooplankton wurde eingesetzt – nämlich fixierte Daphnien alle derselben Art (*D. longispina*), um das Argument, die Kunstpartikel seien evtl. nicht vergleichbar, zu entkräften.
- Ein erhöhtes Volumen von in der Summe 5 L gegenüber niedrigem Volumen von 3,5 L, in dem die Organismen sedimentieren, wurde getestet.



**Abb. 4:** Einfaktorielle Analyse von Daphnia-Anzahlen in den 25 Teilkammern, Wilcoxon/Kruskal-Wallis, keine signifikanten Unterschiede festzustellen in 3x10 Ansätzen.



**Abb.5:** Kruskal-Wallis-Test bei Abstand zum Mittelpunkt-Gruppierungen, links niedriges Volumen ( $p=0,187$ ), rechts bei erhöhtem Volumen ( $p=0,004$ )

Die Einfaktorielle Analyse der Anzahlen von Daphnien in den einzelnen Zählkammern ergab keine signifikanten Unterschiede (Abb. 4). Allerdings wird ein regelmäßiges Muster in der Belegung der Teilkammern vermutet. Diese Nicht-Gleichverteilung wird deutlicher bei Verwendung des größeren Volumens (5 L). Hierzu konnte durch Zusammenfassung der Teilkammern zu Gruppen mit gleichem

Abstand zum Mittelpunkt des Flächenteilers eine signifikante Abhängigkeit bei dem größeren Volumen festgestellt werden (Abb. 5).

Der Vergleich mit anderen Teilungsvorgängen lässt folgende Aussagen deutlich werden: die Pipette (Volumenteilung) kann zu hochsignifikanten Abweichungen insbesondere für Copepodenanzahlen und für das Volumen führen; die Genauigkeit wird schlechter mit steigender Größe der Organismen und der Öffnungsweite (Horn 1999 u.a. darin). Der Folsom-Teiler ist nur für die Zweiteilung geeignet, da der Fehler sich mit jedem weiteren Teilungsschritt fortsetzt (Daniel & Evans, 1982).

## **Zusammenfassung/Schlussfolgerungen**

- Die Variationskoeffizienten, die Standardabweichung und die Normalverteilung der Teilkammern ist bei korrekter Anwendung gut.
- Die %-Angaben von Geller in Schwoerbel (1986) (2,67 % pro Teilkammer und rund 66% im ganzen Flächenteiler) wurden validiert.
- Die Gleichverteilung in den Teilkammern liegt jedoch nur in 4 von 30 Versuchen in einer  $p > 5$  % vor.
- Die Nicht-Gleichverteilung wird deutlicher bei höherem Volumen: geringere Daphnienanzahlen sind tendenziell in den äußeren Teilkammern vorliegend.
- Ein statistischer Vergleich mit anderen Teilungsmethoden, insbesondere der volumetrischen Teilung wäre äußerst sinnvoll.

Eine Aufnahme in den Methoden katalog für Zooplankton ist sinnvoll, solange nicht nachgewiesen ist, dass andere Teilungsmethoden bessere Ergebnisse liefern.

## **Danksagung**

An Prof. Dr. D. Schwechten geht der Dank für Diskussion der Projektarbeit im Studiengang Verfahrenstechnik, an Irina Vollmer-Graf der Dank für die meisterlich fachgerechte Anfertigung. Corinna Waider danke ich für die Fortführung, die Korrekturen und die gute Zusammenarbeit.

## **Literatur**

- Daniel, W.S. und M. S. Evans (1982): A statistical analysis of subsampling and an evaluation of the Folsom plankton splitter - *Hydrobiologia* 94, 223-230
- Hensen V. (1887): Über die Bestimmung des Planktons oder des im Meere treibenden Materials an Pflanzen und Tieren nebst Anhang - *Ber. Komm. Wiss. Untersuch. Deutsch. Meere*, Kiel 12-14: 1-108
- Hoehn E., Ketelaars H, Ewig B. (1998) Erfassung und Bewertung von Planktonorganismen, 2. Auflage, ATT Technische Informationen Nr. 7 Siegburg 1998, Kommissionsverlag R. Oldenbourg München
- Horn, W. (1999) in Tümpling, W.V. und G. Freidrich (1999): *Biologische Gewässeruntersuchung*, Gustav Fischer V., Jena, 539 S.
- LVLim (Leistungsverzeichnis für Limnologie), (2012) 2. Aufl., Schmidt-Halewicz, S. , Hoehn, E. , Kasten, J. , Dembinski, M. [Red], *Gewässerökologische Untersuchungen*, Deutsche Gesellschaft für Limnologie e.V. [Hrsg.], Eigenverlag DGL in Hardegsen, 2. Aufl. ISBN 978-3-9813095-1-5
- LUBW (2010): Stich H.B., Maier G., A. Hoppe [Red], Landesanstalt für Umwelt, Messungen und Naturschutz Baden Württemberg - Projekt Zooplankton - Probenahme, Bericht 10 des Instituts für Seenforschung Langenargen
- LUBW (2012): Stich H.B., Maier G. [Red], Landesanstalt für Umwelt, Messungen und Naturschutz Baden Württemberg (2012) Projekt Zooplankton - Zählen, Bestimmen, Auswerten, Bericht 12 des Instituts für Seenforschung Langenargen
- Schwoerbel, J. (1986): *Methoden der Hydrobiologie Süßwasserbiologie*, 3. Auflage, Gustav Fischer Verlag Stuttgart, UTB
- Spurk J. H., Aksel N. (2010) *Strömungslehre, Einführung in die Theorie der Strömungen*, 8. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg

---

<sup>i</sup> Abgekochtes, abgekühltes Wasser wird verwendet, um den Gasinhalt des Wassers zu minimieren (LVLim, 2012).