

Entwicklungen zu einer verbesserten Anwendung der Sporentriftmethode

Developments for a more efficient employment of the spores drifting method

M. DECHANT¹⁾

Inhalt

	Seite
1. Einleitung	160
2. Historischer Rückblick und Aufgabenstellung	160
3. Erfahrungen bei der Herstellung der Farbsporentracer	161
3.1. Lycopodiumsporen.....	161
3.2. Chemismus der Sporenfärbung	162
3.3. Färbehilfsmittel	165
3.3.1. Tenside	165
3.3.2. Farbstoffe.....	166
3.4. Durchführung der Sporenfärbung.....	166
4. Physikalische Eigenschaften der Farbsporen.....	167
4.1. Elektrostatische Aufladung der Sporen	167
4.2. Sedimentationseigenschaften sauer bzw. alkalisch behandelter Sporen...	167
5. Einspeisungsmethode für den Farbsporentracer	168
6. Probenahme der Farbsporentracer	169
7. Auswertung der Proben.....	170
7.1. Herstellung der Filterproben für die videomikroskopische Untersuchung	170
7.2. Auswertung der Membranfilterproben mittels eines neuentwickelten Farbsporenzählgerätes.....	170
7.2.1. Komponenten und Handhabung des Farbsporenzählgerätes.....	171
8. Ausblick	171
Zusammenfassung	172
Literatur	172
Summary	174
Dank.....	174

¹⁾ Dr. phil. M. DECHANT, Mandellstr. 1, A-8010 Graz; em. Chemiker der Steirischen Wasserkraft- und Elektrizitäts-Aktiengesellschaft, Leonhardgürtel 10, A-8010 Graz.

1. Einleitung

Seit nunmehr 40 Jahren hat die Triftung gefärbter Sporen in Karstgebieten immer wieder zu aufschlußreichen Ergebnissen geführt. In den letzten Jahren wurde diese Methode gegenüber anderen Markierungsmethoden weniger häufig angewendet, da bei letzteren für die Auswertung der eingesetzten Tracer durch die Verwendung automatischer Meßgeräte ein wesentlich geringerer Zeit- und Personalaufwand möglich wurde.

Da nach wie vor Interesse am Einsatz von gefärbten Partikeln bestimmter Größen als Triftkörper zur Klärung hydrogeologischer Fragen im Karstbereich besteht, war es für den Autor schon seit längerem ein Anliegen, die Methoden der Herstellung spezieller Farbsporentracer sowie die der Probenahme und vor allem der Auswertung der gezogenen Proben einer Überarbeitung zu unterziehen.

Gerade die letzte Aufgabe konnte mit Hilfe von M. DECHANT jr. (cand. ing. El.Tech.) durch die Entwicklung und den Bau eines automatischen Farbsporenzählgerätes gelöst werden.

2. Historischer Rückblick und Aufgabenstellung

Die Idee der Sporentriftmethode wurde im Juni 1956, während eines „Kombinierten Salzungs-, Färbe- und Sporentriftversuches“ im Karstgebiet des Buchkogels bei Graz geboren. Veranstatet wurde dieser Versuch vom Institut für Mineralogie und technische Geologie der Technischen Hochschule Graz. Mit der Bestimmung der Chloride zum Nachweis der eingespeisten Kochsalzlösung wurde als Chemiker der Autor beauftragt. Der Biologe A. HÖFER (1959) führte die mikroskopischen Untersuchungen auf die damals erstmalig eingespeisten natürlichen Bärlappsporen, *Lycopodium clavatum*, nach der Methode von A. MAYR (1953, 1954a, 1954b) durch. Im Zuge dieser Untersuchungen beobachtete der Autor, daß die blaßgelblichen Sporen von dem oft ähnlich gefärbten Begleitmaterial von einem Nichtbiologen nur schwer unterschieden und kaum erkannt werden können, und schlug daher vor, die Sporen anzufärben.

V. MAURIN und J. ZÖTL, die damals diesen Versuch leiteten, griffen diese Anregung auf und hatten als Hydrogeologen die bahnbrechende Idee, in mehreren Farben gefärbte Sporen an verschiedenen Örtlichkeiten gleichzeitig einzusetzen. Damit wurde in einem großen Untersuchungsgebiet eine Mehrwegmethode ermöglicht, wobei während der Versuchsdauer eintretende meteorologische Veränderungen weitgehend eliminiert werden konnten. Als Chemiker wurde der Autor mit der Aufgabe beauftragt, eine geeignete Färbemethode zu entwickeln (M. DECHANT et al., 1958).

Voraussetzung dafür war, daß beim Färbvorgang die für eine Triftung erforderlichen Eigenschaften der gefärbten Sporen den natürlichen Sporen entsprechend weitgehend erhalten bleiben sollten.

Um als hydrogeologische Tracer geeignet zu sein, sollten daher sechs Forderungen erfüllt werden:

- 1) gleiche Farbintensität „jeder“ gefärbten Spore;
- 2) Stabilität des auf die Spore aufgetragenen Farbstoffes, d. h.: keine bleibende Farbänderung durch in Abwässern enthaltene saure, basische, oxydierende, reduzierende oder oberflächenaktive Inhaltsstoffe;

- 3) Auswahl solcher Farben, die eine eindeutige Unterscheidung der gefärbten Sporen von mineralischem und pflanzlichem Begleitmaterial ermöglichen;
- 4) weitgehende Erhaltung der ursprünglichen Schweb- bzw. Sedimentationseigenschaften;
- 5) Herstellung einer Applikationsform des Farbsporenracers, die am Einspeisungsort eine Kontaminierung der damit betrauten Person und der Umgebung weitgehendst vermeidet;
- 6) Unschädlichkeit des Farbsporenracers bei unmittelbarer Aufnahme durch Mensch und Tier. Bei Verrottung der Farbsporen soll keine Belastung für die Umwelt erfolgen.

Eine erhebliche Anzahl von Einspeisungen, die wesentlich zur Deutung hydrogeologischer Aufgabenstellungen beitragen sowie die wiederholten Präsentationen der Sporenriftmethode im Testareal Lurgrotte, wie sie im zweijährigen Zyklus im Zuge der vom JOANNEUM RESEARCH Graz veranstalteten „Postgraduate-Kurse für Grundwasser-Tracer-Technologie“ demonstriert wurden, haben immer wieder zu neuen Erkenntnissen und zur besseren Anwendbarkeit der Methode geführt.

3. Erfahrungen bei der Herstellung der Farbsporenracer

3.1. Lycopodiumsporen

Zur Erinnerung: Die Sporen des *Lycopodium clavatum* (hauptsächliche Wachstumsgebiete Kanada, Rußland, in Zwergform auch in Mitteleuropa) haben die Form dreiseitiger Pyramiden, einem Durchmesser von 25–34 μm und sind mit einem Netzwerk von fünf- bis sechsseitigen Maschen, mit 3–4 μm hohen Leisten ausgestattet (F. BAUER, 1967). Aufgrund ihrer tetraedrischen Form scheinen sie in Wasser besser transportierbar als Kügelchen zu sein. Durch einen Zufall wurde diese Meinung bestätigt, vermutlich durch den Umstand, daß die gelieferten Lycopodiumsporen kein Netzwerk aufwiesen (Fig. 1). Da auf kurzem Wege das angeforderte *Lycopodium clavatum* nicht erhältlich war, mußte diese unbekannte Spezies – obgleich ohne charakteristisches Netzwerk – während eines 1995 veranstalteten „Postgraduate-Kurses“ zur Demonstration eingesetzt werden.

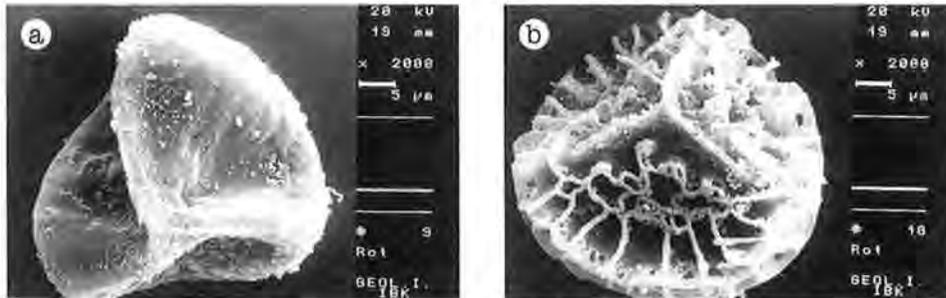


Fig. 1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme rot gefärbter Sporen. a – *Lycopodium*?, b – *Lycopodium clavatum*. (Fotos: P. HACKER, 1995.)
 REM image of red coloured spores: a – *Lycopodium*?, b – *Lycopodium clavatum*. (Fotos: P. HACKER, 1995.)

Dabei stellte sich heraus, daß sowohl Planktonnetzproben als auch Direktproben mit dem automatischen Probennehmer eine viel geringere Anzahl von gefärbten Sporen aufwies als unter ähnlichen Bedingungen in den Jahren vorher. Die Spezies stammt vermutlich aus China und konnte bisher noch nicht identifiziert werden.

3.2. Chemismus der Sporenfärbung

Für das Färben eines „Stoffes“ ist dessen chemische Zusammensetzung richtungweisend für die Wahl der Farbstoffgruppe, die chemisch mit dessen Oberfläche zur Reaktion gebracht werden soll, so daß eine „echte“ (d. h. wasserbeständige) Färbung resultiert.

Die Sporen, deren biologische Funktion, die mikroskopisch sichtbar werdende, geometrischen Formen ähnliche Gestalt und letztlich deren unglaubliche chemische Resistenz gegenüber konzentrierten Mineralsäuren hatten schon frühzeitig das Interesse zu deren Erforschung erweckt. Die ersten Berichte über die chemische Zusammensetzung der das Exosporium bildenden Exine der Pollen stammen aus dem Jahre 1814 von R. JOHN (zitiert in: J. BROOKS et al., 1971). Den Terminus „Pollenin“ für die in Sporen und Pollen enthaltene auffallend resistente Substanz führte 1829 H. BRACONNOT (in: J. BROOKS et al., 1971) ein. Im Jahre 1928 prägten F. ZETSCHKE & K. HUGGLER (in: J. BROOKS et al., 1971) den Begriff „Sporonin“ für die die Exine der Sporen des *Lycopodium clavatum* aufbauenden Substanzen. Später bezeichneten sie mit „Sporopollenin“ die nach speziellen chemischen Aufschlußverfahren resistente, Exine bildende Substanz aller pflanzlichen Pollen- und Sporenarten.

Ab 1960 beschäftigte sich unter anderen G. SHAW (G. SHAW & A. YEADON, 1964, in: J. BROOKS et al., 1971) mit der Chemie der Sporopollenine. Für *Lycopodium clavatum* wurde eine Molekularformel $C_{90}H_{144}O_{27}$ erstellt und ein Sporopolleningehalt von 23,4 % sowie ein Cellulosegehalt von 2,7 % ermittelt.

Wie auch W. KÄSS (1992) erwähnt, sind die Sporopollenine aus polymeren Carotinoiden und deren Estern aufgebaut. Diese zu den Polyterpenen gehörenden Substanzen weisen – vorwiegend langkettig in der „trans-Form“ vorliegend – eine gestreckte Konfiguration auf (Fig. 2).

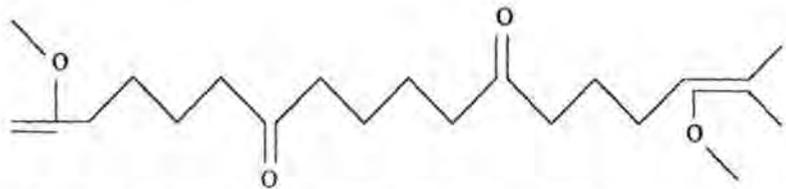


Fig. 2: Struktureinheit von Sporopollenin (G. SHAW & A. YEADON, 1964).
Sporopollenin structural unit (after G. SHAW & A. YEADON, 1964).

Daraus sind auch die schon bei den monomeren Grundbausteinen vorliegenden hohen, bei um die 190° C liegenden Schmelzpunkte zu erklären. J. BROOKS (1962) konnte Infrarotspektren vom Sporopollenin bei 450° C erstellen. Die in diesen Versuchen gewonnenen Spektrogramme unterschieden sich nicht gravierend von denen bei z. B. 180° C – ein Nachweis für deren hohe Thermostabilität.

Ergänzend zur thermischen Stabilität sei zu erwähnen, daß J. BROOKS (1962) und G. SHAW (in: J. BROOKS et al., 1971) sporopollenin-ähnliche Substanzen in 3,7 Milliarden Jahren alten Fossilien und auch in Meteoriten gefunden haben.

Die hohe mechanische und thermische Stabilität der Sporen des *Lycopodium clavatum* sind für den Hydrogeologen als Triftkörper von besonderem Interesse. Sie könnten also auch in heißen Quellen eingesetzt werden, ohne ihre charakteristische Gestalt zu verlieren.

Trotz der Resistenz gegenüber den genannten aggressiven Säuren besitzen sie eine hohe Reaktionsfähigkeit. R. BRUCE MERRIFIELD erhielt 1984 den Nobelpreis für Chemie für die Synthese von Polypeptiden mithilfe der Aminosporopollenine. Die große Oberfläche und Homogenität der Sporopollenine macht sie u. a. zum Hilfsmittel für die Ionenaustauscherchromatographie.

Diese Betrachtungen sollen dazu beitragen, die außergewöhnlich festen Bindungsarten, die in der *Lycopodium clavatum*-Spore vorliegen, zu erklären. Für den Hydrogeologen als Anwender des Farbsporencrachers ist die Qualität dieses Markierungsstoffes von entscheidender Bedeutung. Schließlich erfordert jedes hydrogeologische Untersuchungsprojekt einen erheblichen personellen und finanziellen Aufwand.

Da in Zukunft die Erkennung und Auszählung der Farbsporen nicht mehr „händisch“ mit dem Mikroskop erfolgen soll – was bisher einen hohen zeitlichen Aufwand und für diese Aufgabe spezialisiertes Personal erforderte – soll die Probenauswertung mit einem neu entwickelten, automatischen Farbsporen-Erkennungs- und Zählgerät erfolgen. Dazu müssen die Farbsporen die gleiche Farbtintensität aufweisen und die Farbtöne für das Gerät gut unterscheidbar sein (spektrale Empfindlichkeit von Auge und Gerät sind je nach Farbbereich unterschiedlich).

Die Gleichmäßigkeit der Farbstoffaufnahme, wie es dieser Naturstoff (die *Lycopodium*-Spore) zeigt, ist auf ihre Umsetzung – oder besser: die Reaktion des Farbstoffes mit dem Sporopollenin – zurückzuführen.

Die Sporenoberfläche besteht aus dem außen liegendem Exosporium und dem als Zellwand dienendem Endosporium (Fig. 3).

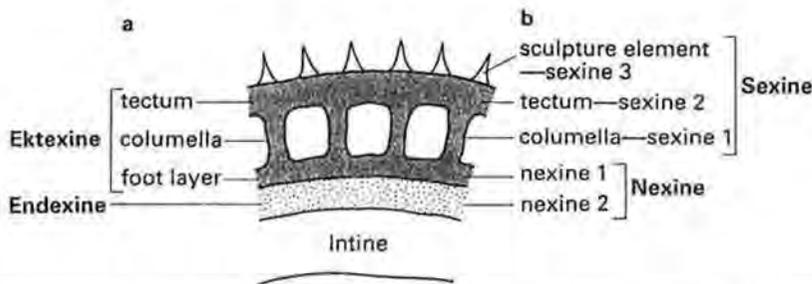


Fig. 3: Terminologie der Sporen-Zellschichten. a – definiert von I. FAEGRI (1956) und K. FAEGRI & J. IVERSEN (1964); b – modifiziert von T. REITSMA (1970).
 Terminology of spores cell layers. a – defined by I. FAEGRI (1956) and K. FAEGRI & J. IVERSEN (1964); b – modified by T. REITSMA (1970).

Das Exosporium besteht seinerseits aus Sporopollenin mit geringen Mengen von Polysacchariden, und ist teilweise mit Wachsen überzogen.

Letztere scheinen im Zuge der Vorbehandlung der Sporen mit einem Tensid für die anschließende Färbung emulgiert bzw. in Lösung gebracht zu werden.

Nach J. BROOKS (1971) erfolgt durch Oxidation von β -Carotininen (Fig. 4a) die Bildung des Sporopollenins (Fig. 4b).

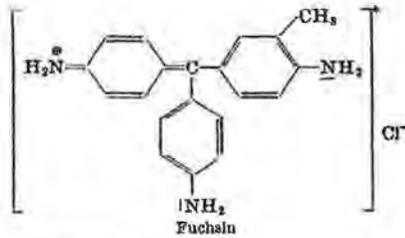


Fig. 5: Farbstoff Fuchsin (H. BAYER, 1963).
Fuchsin dyeing substance (H. BAYER, 1963).

Die durch die große Zahl von konjugierten Doppelbindungen sehr reaktionsfähigen Polycarotinoide reagieren daher unmittelbar mit dem Farbstoff-Kation und vollständig!

Ursprünglich bestand die Annahme, daß die Cellulose der Intine-Zone (also im Endosporium) mit dem basischen Farbstoff reagiert. Das wäre auch durchaus möglich, da die Cellulose von sich aus schon Carboxylgruppen aufweist, die verestert oder mit Calcium oder Natrium „neutralisiert“ sind (Fig. 6).

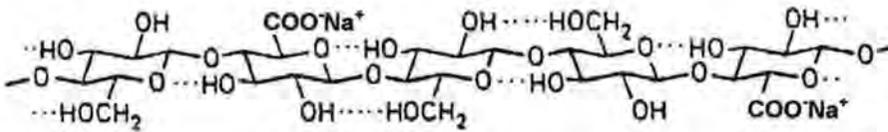


Fig. 6: Ausschnitt aus einem Cellulosemolekül mit teilweise mit Na „neutralisierten“ Carboxylgruppen (nach H. KLEINIG & P. SITTE, 1992, H. PERNDANNER & W. REIF, 1951).
Section of a cellulose molecule with carboxyle groups partly "neutralized" with Na (after H. KLEINIG & P. SITTE, 1992, H. PERNDANNER & W. REIF, 1951).

Der Reaktionsverlauf wäre demnach gleichartig denkbar. Dagegen spricht die rasche und vollständig ablaufende Reaktion mit dem Sporopollenin: Im Gegensatz zur Cellulosefärbung, wobei in der „Farbstofflotte“ immer nicht umgesetzter Farbstoff verbleibt, läuft das Filtrat bzw. das Zentrifugat nach der Färbung von Lycopodiumsporen farbstofffrei ab.

3.3. Färbehilfsmittel

3.3.1. Tenside

Um die hydrophoben Sporen benetzbar zu machen, muß die Oberflächenspannung des Wassers herabgesetzt werden. Als Tensid hat sich in der Praxis das Laborreinigungsmittel Extran-neutral (Extran MA02 neutral, MERCK Nr. 7553) bewährt. Neben geringen Mengen von Nonionics sind als Hauptbestandteil Alkyl-Arylsulfonate enthalten. Gleichzeitig stellt Extran neutral auch ein geeignetes Färbehilfsmittel dar.

3.3.2. Farbstoffe

Die basischen Farbstoffe sind im Gegensatz zur Cellulose an die Sporen sehr fest gebunden. Dies beweisen z. B. die mit Laugen farblose Leucobasen bildenden Triphenylmethanfarbstoffe (*Fuchsin*, *Malachitgrün*, *Kristallviolett*; H. BAYER, 1963).

Versuchsweise wurde auf den damit gefärbten Sporen mit 1 N NaOH (pH 14) Leucobasenbildung bewirkt, wobei ein Verblässen der Farben erfolgte. Die Festigkeit der Bindung auch dieser an die Polycarotinoide gebundenen Leucobasen zeigte sich bereits nach dem Spülen mit Wasser bis zur neutralen Reaktion: Die ursprüngliche Farbin-tensität konnte wiederhergestellt werden und bleibt letztlich erhalten.

Für eine vollständige stabile Färbung sind ausschließlich **basische** Farbstoffe geeig-net. Die besten Erfahrungen wurden bis dato mit folgenden Farbstoffen erzielt:

Azofarbstoffe:	für Gelb:	Chrysoidin-HCl, Acridingelb-HCl
	für Orange:	Acridinorange-HCl, ZnCl ₂
	für Braun :	Bismarckbraun-HCl, Vesuvin H3R
Phenacinarbstoff:	für Rot:	Safranin T-HCl
Aminotriphenylmethan-	für Grün:	Malachitgrün-HCl, Malachitgrün-Oxalat
farbstoffe:	für Rotviolett:	Fuchsin = Rosanilin-HCl
	für Blau:	Kristallviolett-HCl

3.4. Durchführung der Sporenfärbung

Für eine erfolgreiche Durchführung der Färbung ist die Einhaltung der erforderli-chen Wassermengen von Bedeutung. Da das Volumen von 1 kg Sporen ca 2,4 Liter ausmacht, ist zur Herstellung einer für die Benetzung geeigneten Suspension das dop-pelte Volumen an Wasser erforderlich. Vor dem Einbringen der Sporen ist das Was-ser mit 1 N NaOH auf pH 9,5–10,0 zu alkalisieren, hierauf 30 ml Extran-neutral zu-zusetzen. Das Einrühren sollte wegen Verstäubung mit einem Farbrührer im „Linkslauf“ bei 120–400 U/min (keinesfalls höher!) erfolgen. Während des Kochens sind 1–1,5 l Was-ser zuzusetzen, um die Bildung der Sporensuspension zu begünstigen. Erst nach voll-ständiger Benetzung „aller“ Sporen darf die Zugabe der alkoholischen Farbstoffsus-pension erfolgen.

Die Färbung erfolgt gleichfalls bei Kochtemperatur. Erst wenn „alle“ Sporen durch-gefärbt sind, darf die Fixierung des Farbstoffes mit Formalinlösung durchgeführt wer-den; dabei erfolgt meist eine geringfügige Farbvertiefung.

Es hat sich als sinnvoll erwiesen, die nicht zu dünnflüssige, eher breiige Masse mit einer hochtourigen Wäschezentrifuge (ausgerüstet mit einem staubdichten Filzsack) bis zur „optischen Trockne“ zu zentrifugieren.

Das Zentrifugat darf weder Sporen noch Farbstoff enthalten. Die zentrifugierte ge-färbte Sporenmasse hat einen Feuchtigkeitsgehalt von ca. 20 %. Sie wird am besten je nach Lufttemperatur zwei bis drei Wochen auf ungeleimtem Krepp-Packpapier ge-trocknet (M. DECHANT, 1967).

Die luftgetrockneten Sporen (Restfeuchtigkeit ca. 3 %) werden in PE-Behältern ver-packt. Um vor Ort bei der Einspeisung keine zusätzlichen Behälter (die ja dann auch gereinigt und entsorgt werden müßten) zu benötigen, sollte pro Kilogramm das fünf-fache Volumen, z. B. für 3 kg Sporen ein 15 l-Behälter verwendet werden. In den Behäl-ter wird ein Silikagel-Beutel zur Feuchtigkeitsbindung eingelegt.

Der Behälter wird mit einem Innendeckel verschlossen, dieser mit Folie verklebt oder verschweißt, ein Inhaltszettel eingelegt und mit einer Schraubkappe verschlossen, wel-

che gleichfalls versiegelt wird. Der Behälter ist außen gleichfalls mit einem Inhaltszettel zu etikettieren. Schließlich wird der Behälter mit einem PE-Übersack verschlossen.

4. Physikalische Eigenschaften der Farbsporen

4.1. Elektrostatische Aufladung der Sporen

Für den Hydrogeologen als Anwender der Sporentriftmethode haben auch die gefärbten Sporen, zwar in weit geringerem Maße als die natürlichen, ungefärbten – als Polyterpene den Harzen ähnlich – die Eigenschaft auch unter Wasser bei Reibung aneinander elektrostatisch aufgeladen zu werden, wobei hydrophobe Knollen gebildet werden. Es ist dies eine Folge des Zetapotentials und auch bei künstlichen Ionenaustauscherharzen als beachtliches technisches Problem bekannt.

Für den Hydrogeologen ist diese Eigenschaft „gut und schlecht“! Einerseits werden bei rasch fließenden Gewässern die „clods“ mit 10^2 – 10^3 Partikeln weitertransportiert und beim nächsten „Wasserfall“ mechanisch zerteilt, wobei erst jetzt der Beginn der Sedimentation der Farbsporen einsetzt. Beim Austritt sind somit höhere Sporenmenngen zur Beweissicherung zu erwarten.

Bei nur schwacher Wasserführung könnten diese „clods“ an rauen Oberflächen hängen bleiben und den Durchgang in die Länge ziehen oder erst beim nächsten größeren Gewitter u. U. weit nach Versuchsende ausgespült werden. Solche Beobachtungen wurden bereits gemacht, woraus schlüssig die Forderung erhoben werden muß, daß die Farbsporen vor der Einspeisung mit einem Tensid (z. B. Extran n) zu behandeln sind. Weiters sind jeweils mindestens einen Tag vor Versuchsbeginn Blindproben zu ziehen.

Im Verlauf der Tracervorbereitungen wurden Sporen mit und ohne Tensid-Vorbehandlung eingespeist. Die Resultate zeigen, daß einer Tensidvorbehandlung unbedingt der Vorzug zu geben ist. Dazu müssen **anionenaktive** Tenside, wie Alkyl-Arylsulfonate verwendet werden, da sie als Alkali- (meist Natrium-) sulfonate mit den in Gesteinsoberflächen vorliegenden Silikaten – Karbonaten weder Reaktionen noch Anlagerungsvorgänge begünstigen. In gewisser Weise sind sie vergleichbar mit den anionischen Markierungsfarbstoffen (Uranin, Eosin etc.), die bessere Durchgänge ermöglichen als basische, d. h. kationische Farbstoffe.

4.2. Sedimentationseigenschaften sauer bzw. alkalisch behandelter Sporen

Wie schon M. DECHANT & P. HACKER (1986) erwähnten, haben die Sporen und auch die Farbsporen die Eigenschaft im stark sauren Milieu zu schrumpfen und im stark basischen zu quellen. Sie reagieren demnach ähnlich künstlichen Ionenaustauscherharzen. So weisen säurebehandelte Sporen einen kleineren Durchmesser (–15 bis –20 %) und somit ein kleineres Volumen auf. Sie sedimentieren langsamer als unbehandelte Sporen. Bei basisch behandelten Sporen ist eine Zunahme des Durchmessers um 20–25 % zu beobachten, sie sedimentieren daher wesentlich rascher (Fig. 7).

Somit ergab sich aus einer Reihe von Sedimentationsversuchen, daß in 100 ml-Glaszylindern sauer (pH ca. 1,5) behandelte Farbsporen im Schnitt eine Sedimentationsgeschwindigkeit von ca. 100 mm pro Stunde, basisch (pH 14) behandelte von ca. 130 mm pro Stunde erlangen, letztere also um ein Drittel rascher sedimentieren.

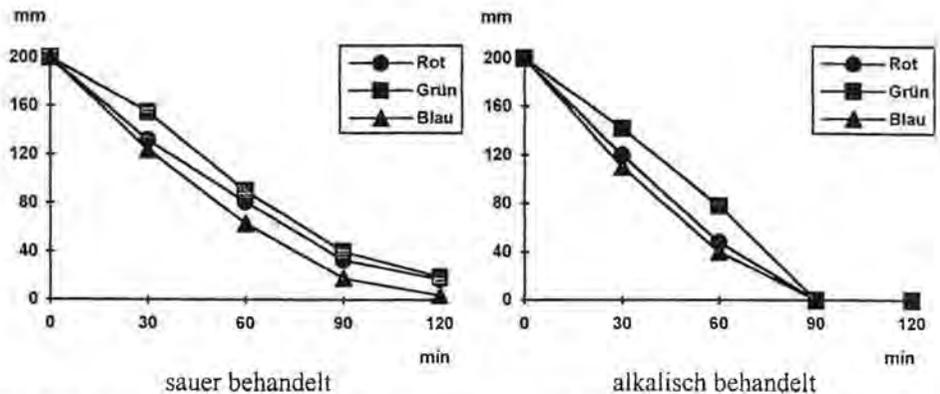


Fig. 7: Sedimentationsverhalten von Farbsporenracern (M. DECHANT & P. HACKER, 1986). Testmengen; 100 mg Farbsporen in 100 ml Wasser + pH 1,5- bzw. pH 14-Additiv; Farben: Rot, Grün, Blau.

Sedimentation properties of CSP tracers (M. DECHANT & P. HACKER, 1986). Test quantities; 100 mg CSP in 100 ml water + additive pH 1.5 resp. pH 14; colours: red, green, blue.

Bei Versuchen im Testgebiet Lurgrotte bei Graz konnten diese Erkenntnisse in der Praxis annähernd bestätigt werden. Dieses Phänomen wird noch genauer untersucht, worüber bei nächster Gelegenheit berichtet werden soll.

Nach der Probenahme zeigt sich auch, daß die Hydratation in Wasser einen Säure- bzw. Basenaustausch bewirkt und die so vorbehandelten Sporen bis zum Zeitpunkt der Probenahme ihre ursprüngliche Größe wieder erlangen.

Somit lassen sich vor Ort durch Zugabe von dem einzusetzenden Sporengewicht entsprechende Mengen von 15 %iger Citronensäure (pH 1,5) bzw. 1 N NaOH (pH 14) jeweils plus 1 %iger EXTRAN neutral Lösung saure bzw. alkalische Farbsporenracer herstellen. Der Hydrogeologe hätte auf diese Weise die Möglichkeit eine der gegenwärtigen hydrologischen Situation entsprechende „maßgeschneiderte“ Farbsporenracer-Suspension vor Ort herzustellen.

Das sogenannte „Vorausseilen“ der Sporen gegenüber suspendierten Farbstoffen und Salzen (erster Peak!) ist nach Auffassung des Autors darauf zurückzuführen, daß die Farbsporen als schwebende Partikel keinem Lösungsvorgang unterworfen sind. Das erste Auftreten des Hauptpeaks und die Anzahl der Sporen könnten demnach quantifizierende Aussagen über Längen der Passagen und Fließwassermengen zulassen.

5. Einspeisungsmethode für den Farbsporenracer

Nach Entfernen des Übersackes wird die Schraubkappe geöffnet, der Innendeckel mit einem Stanleymesser V-förmig eingeschnitten, mittels eines Trichters die verdünnte Tensid-Lösung (pro kg Sporen die dreifache Wassermenge) langsam in den Behälter gefüllt, verschraubt und vorsichtig die Flüssigkeit über der Oberfläche des Sporenpulvers verteilt.

Nach Aufnahme dieser Flüssigkeitsmenge kann der Behälter bis zu Dreiviertel mit Wasser gefüllt werden. Nach kräftigem Schütteln kann auch ein Akkurührer zu Hilfe genommen werden. Erst dann könnte gegebenenfalls entsprechend der Aufgabenstellung

die vorbereitete Menge an Citronensäure oder Natronlauge zugesetzt werden. Unter häufigem Schütteln oder Rühren sollte man diese Additive ca. eine Stunde miteinander reagieren lassen. Diese CSP-Tracersuspension wird in einem PE-Behälter auf das Vierfache verdünnt und gründlich durchgemischt (CSP = Colour Spores = Farbsporen).

Dann wird in üblicher Weise die nun fertige Sporentracersuspension über einen Siebtrichter mittels eines Schlauches kontinuierlich in die Schwinde eingebracht. Einspeisungsdauer, Verdünnungswassermenge und Schüttung sollen festgehalten werden. Bei geringer Schüttung ist mit Wasser in der Menge des Verdünnungswassers in einem Guß nachzuspülen.

Bei Einhaltung dieser Bedingungen sollte eine Kontaminierung der einspeisenden Person und der Umgebung zu vermeiden sein.

6. Probenahme der Farbsporentracer

Neben dem üblichen Planktonnetz wird ein automatischer Probennehmer eingesetzt. Der Ansaugschlauch wird mit einem für diesen Zweck entwickelten Anreicherungsgerät für Farbsporen verbunden. Dieses besteht aus zwei auf einem Gestell montierten Planktonnetzen. Das durch ein Drahtgitter gegen grobe Teile geschützte Ansaugnetz ist mit einem druckseitig schließenden Ansaugventil versehen. Letzteres – sowie das zweite Netz, das vorne im Einzugsbereich geschlossen ist – ermöglicht es, aus dem im Ansaugschlauch verbliebenen Rückspülwasser die Sporen zu sammeln und beim nächsten Ansaugvorgang der nächsten Probe zuzuführen (Fig. 8).

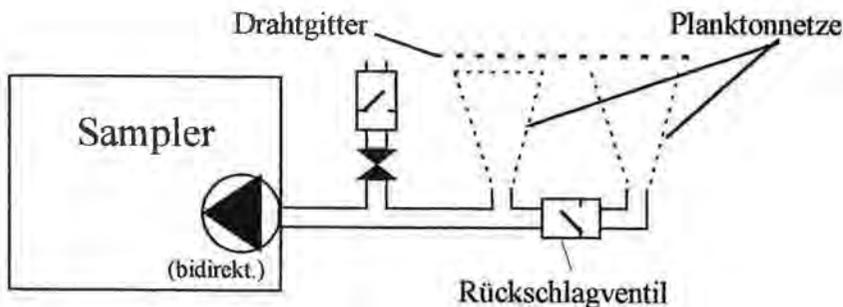


Fig. 8: Anordnung zur automatischen Probenahme mit Anreicherungsfiltergerät (M. DECHANT, 1995)
 Set scheme for automatic sampling with concentrating filter set (M. DECHANT, 1995).

Der positive Effekt besteht darin, daß bei zu erwartenden geringen Sporenmengen praktisch alle eingesaugten Sporen erhalten bleiben. Als Negativeffekt könnte eine geringfügige Verschiebung der „peaks“ auftreten.

Dieses zweite Netz kann – falls erforderlich – durch Öffnen eines Entlüftungshahnes praktisch deaktiviert werden. Jedenfalls wird durch den großen Querschnitt des Ansaugnetzes eine Anreicherung von Sporen bewirkt. Der Sampler ist mit 500 ml PE-Flaschen bestückt. Eine erprobte Einstellung ist z. B. sechs halbstündige Einzelproben in einer 500 ml-Flasche zu vereinen. Die Auswertungsintervalle betragen somit drei Stunden.

7. Auswertung der Proben

7.1. Herstellung der Filterproben für die videomikroskopische Untersuchung

Die dem Probennehmer entnommenen 500 ml Probenflaschen werden – ohne zu schütteln – durch einen Filterring, der mit einem 20 μm -Perlonnetz versehen ist, filtriert. Dadurch werden die bei der mikroskopischen Untersuchung störenden Partikel entfernt. Eine weitere Fraktionierung sowie Beseitigung der pflanzlichen Teilchen und Fasern kann durch Vorfiltration der Proben mit einem 52 μm -Netz erfolgen. Die Probenflasche wird mit einer alkalisierten Extran-Lösung ausreichend gespült, die abgesetzten Sporen auf das Perlonnetz gebracht, mit einer Spritzflasche nachgewaschen und trockengesaugt. Dabei werden die tonigen und/oder feinsandigen Anteile eliminiert. Darauf wird der Filter umgedreht und der sporenhältige Filtrerrückstand in eine SARTORIUS Membranfilterapparatur – versehen mit einem schwarzen 8 μm -Filter mit weißem Gitterraster (Durchmesser: 25 mm) – gespült.

Das Membranfilterplättchen ist somit für die weitere Untersuchung vorbereitet.

7.2. Auswertung der Membranfilterproben mittels eines neuentwickelten Farbsporenzählgerätes

Die Auswertung der Sporenproben stellt den arbeitsintensivsten Teil des Markierungsversuches dar. Bisher mußten die Filterproben von Experten mikroskopisch untersucht werden. Dies erfolgte ursprünglich im Durchlicht, seit Einführung der Filterproben im Auflicht, wobei die Sporen in Farbe und Form neben dem mineralischen und pflanzlichen und durch kommunale Abwässer eingebrachten Begleitmaterial zu unterscheiden und schließlich je nach Farbe zu zählen waren, eine Tätigkeit, die auf Dauer eine immense Anstrengung für das menschliche Auge darstellt.

W. KÄSS (1982) und W. KÄSS & B. REICHERT (1986) sind mit der Entwicklung der Fluoreszenz-Farbsporen in dieser Richtung durch Halbierung der Untersuchungszeiten beachtliche Fortschritte gelungen.

Mit dem genannten Farbsporenzählgerät soll sich die Arbeit des Anwenders bzw. des eingeschulten Prüfers auf die Einjustierung des Gerätes und gelegentliche optische Kontrollen der Erkennungs- und Zählvorgänge auf den Videomonitoren beschränken (Fig. 9).



Fig. 9: Schematische Darstellung des Arbeitsablaufes bei automatisierter Sporenzählung (M. DECHANT jr., 1995).

Schematic working procedure of automatized spore counting (M. DECHANT jr., 1995).

Die Automatisierung ermöglicht den Einschub mehrerer Filterproben und wirft den Ausdruck der Zählergebnisse nach den Farben der eingesetzten Farbsporen geordnet aus. Schließlich können nach entsprechenden Eingaben am PC die Durchgangskurven erhalten werden. Wie bereits erwähnt wurde das Farbsporenzählgerät 1995 von M. DECHANT jr. als Diplomarbeit am Institut für Elektronik/TU Graz in Zusammenarbeit mit der JOANNEUM RESEARCH Forschungsgesellschaft mbH Graz, Institut für Hydrogeologie und Geothermie, entwickelt. Der derzeitige Prototyp dieses CSP-Zählgerätes konnte an Hand von im Zuge eines Tracerversuches gezogenen Farbsporenproben mit einer 95 %igen Treffsicherheit seine Eignung unter Beweis stellen.

7.2.1. Komponenten und Handhabung des Farbsporenzählgerätes

Die gemäß Abschnitt 7.1. vorbereiteten Membranfilterplättchen werden mit einem Tropfen Wasser auf der Plexiglas-Trägerplatte fixiert, mit einer Glasplatte plangedrückt und auf dem Koordinatentisch plaziert.

Das System, das auf einem PC basiert, besteht aus drei logischen Einheiten:

Filterscanner: Diese Einheit ermöglicht das Scannen von einem oder mehreren Filtern und bietet einen Ausgang für einen Video-Kontrollmonitor zur Beobachtung der Filtersedimente. Ein eingebautes Videomikroskop produziert Bilder von der gesamten Filteroberfläche und gibt diese an die Digitalisier-Einheit weiter. Der Anwender legt die Filter auf den Koordinatentisch und fokussiert das Videomikroskop. Nach Drücken eines „Start“-Knopfes wird der Filter automatisch nach gefärbten Lycopodiumsporen abgesucht.

Digitalisier-Einheit: Diese Einheit wandelt die elektronischen Bildsignale des Videomikroskopes in digitale Informationen um und führt dabei eine äußerst schnelle Farbfilterung des Bildes durch. Die digitalen Bilddaten werden an die Bildverarbeitungssoftware weitergegeben. Der Anwender definiert zu Beginn der Probenserie Farbparameter in der Kalibrationsdatei, es können Farbparameter aus einer Reihe von Vorgaben ausgewählt und modifiziert werden.

Bildverarbeitungssoftware: Die Software zählt die Lycopodiumsporen auf dem Filter nach Farben geordnet und speichert das Zählergebnis auf einem Datenträger (Diskette, Festplatte etc.). Diese Daten können dann von einer Standardsoftware zur Weiterverarbeitung übernommen werden. Die Zählbilder werden am PC-Monitor angezeigt und der momentane Stand des Zählergebnisses ausgewiesen. Der Anwender definiert Dateinamen entsprechend den Proben (Probenahmeort, Datum, Uhrzeit etc.).

Das gesamte System besteht aus einer PC-Einsteckkarte, einer Scanner-Einheit und der nötigen Steuer- und Analysensoftware sowie einem zusätzlichen Video-Kontrollmonitor, der zur Focussierung und Kontrolle durch den Anwender dient.

Einsteckkarte und Software sind MS-DOS-kompatibel; empfohlen wird eine Konfiguration 486/50MHz mit einem freien Steckplatz, 4MB RAM und ein VGA-Graphikadapter.

8. Ausblick

In Zukunft wird die Applikation von weiteren bis dato noch nicht verwendeten Farben erprobt werden, um Farben mit einem höheren Kontrast zum Detritus und mi-

neralischen Sedimenten (z. B. Basalt u. a.) zu finden. Ebenso sollen Versuche zur automatischen Zählung von Polystyrol-Spherics (stereospheres) – wie von W. KÄSS (1992) verwendet – durchgeführt werden.

Eine weitere Verbesserung der Methode würden Messungen im Durchfluß vor Ort darstellen. Dahingehende Überlegungen und Vorversuche wurden bereits angestellt; Laborsimulationen werden in näherer Zeit die tatsächlichen Erfolgchancen zeigen.

Zusammenfassung

Die Sporenriftmethode wurde vor 40 Jahren im Rahmen eines kombinierten Salz-Farbstoff-Sporenriftversuches in einem Karst-Testgebiet in der Nähe von Graz geboren. Als derzeit einzige Mehrwegmethode ermöglicht sie es, ein großes Karstgebiet mit geringem personellen Aufwand unter gleichen meteorologischen Bedingungen zu untersuchen. Gegenüber anderen Markierungsstoffen haben Farbsporen den Vorteil als Teilchen letztlich erhalten zu bleiben, deren Farbe durch keinerlei in Wässern mögliche chemische, mechanische oder thermische Angriffe verändert wird.

Zur dauerhaften Anfärbung scheinen basische Farbstoffe am besten geeignet zu sein, da diese mit dem in den Sporen enthaltenen Sporopollenin chemisch reagieren können. Wegen ihrer charakteristischen Form, Transportierbarkeit und Sedimentationseigenschaften in den zu untersuchenden Wässern sollen ausschließlich Sporen des *Lycopodium clavatum* verwendet werden.

Die ursprünglich hydrophoben Sporen sind mit einem anionischem Tensid zu benetzen, worauf im Wasser eine durch Hydratation bewirkte langsame, annähernd linear verlaufende Sedimentation eintritt. Sie liegt bei Laborversuchen bei ca. 110 mm pro Stunde und konnte bei Triftversuchen funktionell bestätigt werden. Durch saure bzw. alkalische Vorbehandlung kann das Sedimentieren verzögert bzw. beschleunigt werden. Dadurch ist für den Hydrogeologen vor Ort noch eine zusätzliche Einflußnahme in Berücksichtigung der vorliegenden Wasserflüsse zur Erzielung deutlicherer Ergebnisse möglich.

Der Vorteil einer automatischen aber diskontinuierlichen Probenahme eines Samplers sollte durch die Entwicklung eines Sporensammelgerätes, hauptsächlich mittels eines vorgeschalteten Planktonnetzes in Anlehnung an die übliche Probenahme quasi kontinuierlich genützt werden.

Bei der Aufarbeitung der Proben wird durch „Sieben“ der Wässer eine engere Fraktionierung der Partikel ermöglicht. Somit werden die bei der videomikroskopischen Erfassung störenden Partikel weitgehend entfernt.

Die Untersuchung der Membranfilter auf Farbsporen erfolgt videomikroskopisch mit einem neu entwickelten Farbsporenzählgerät. Die Sporenriftmethode wird dadurch zu einer raschen und objektiven Methode, zeit- und personalsparend und entspricht den Anforderungen des Schutzes unserer Umwelt.

Literatur

- BAUER, F. (1967): Die Durchführung und Auswertung von Sporenriftversuchen. – In: V. MAURIN & J. ZÖTL (Hrsg., 1967): Fachtagung über die Anwendung von Markierungsstoffen zur Verfolgung unterirdischer Wässer in Graz vom 28. März bis 1. April 1966. – Steir. Beitr. z. Hydrogeologie, N. F., Jg. 1966/1967, H. 18/19, 249–266, Graz.

- BAYER, H. (1963): Lehrbuch der organischen Chemie. – 10. Aufl., 772 S., Leipzig (Hirzel Verlag).
- BRACONNOT, H. (1829): Ann. Chim. Phys., 42, 91–105.
- BROOKS, J. (1962): Some Chemical and Geochemical Studies on Sporopollenin. – In: BROOKS, J., P. R. GRANT, MARJORIE MUIR, P. VAN GIJZEL & G. SHAW (Hrsg., 1971): Sporopollenin. Proceedings of a Symposium held at the Geology Department, Imperial College, London, 23–25 September, 1970. – London/New York (Academic Press).
- BROOKS, J., P. R. GRANT, MARJORIE MUIR, P. VAN GIJZEL & G. SHAW (Hrsg., 1971): Sporopollenin. Proceedings of a Symposium held at the Geology Department, Imperial College, London, 23–25 September, 1970. – London/New York (Academic Press).
- DECHANT, M. (1959): Das Anfärben von Lycopodiumsporen. – Steir. Beitr. z. Hydrogeologie, N. F., Jg. 1959, H. 1/2 (abgeschlossen), 145–149, Graz.
- DECHANT, M. (1967): Die Färbung der Lycopodiumsporen. – In: MAURIN, V. & J. ZÖTL (Hrsg., 1967): Fachtagung über die Anwendung von Markierungsstoffen zur Verfolgung unterirdischer Wässer in Graz vom 28. März bis 1. April 1966. – Steir. Beitr. z. Hydrogeologie, N. F., Jg. 1966/1967, H. 18/19, 241–247, Graz.
- DECHANT, M. jr. (1995): Digitaler Bildspeicher mit programmierbarem Farbfilter. – Diplomarbeit am Institut für Elektronik, TU Graz (in Vorbereitung).
- DECHANT, M. & P. HACKER (1986): Neue Entwicklungen in der Methode des Sporennachweises. – In: MORFIS, A. & P. PARASKEVOPOULOU (Hrsg., 1986): Proceedings of the 5th International Symposium on Underground Water Tracing. – 149–155, Athen.
- DECHANT, M., V. MAURIN & J. ZÖTL (1958): Die Tiftung gefärbter Sporen. Eine neue Methode zur Untersuchung unterirdischer Karstgerinne. – Steir. Beitr. z. Hydrogeologie, N. F., Jg. 1958, H. 1/2 (H. 8/9 d. ges. Folge), 44–51, Graz.
- FAEGRI, K. (1956): Recent trends in palnology. – Bot. Rev., 22, 639–664.
- FAEGRI, K. & J. IVERSEN (1964): Textbook of Pollen Analysis. – 2nd edn., Oxford (Blackwell Scientific Publications).
- HOFER, A. (1959): Das Mikroskopieren der Planktonnetzproben. – In: MAURIN, V. & J. ZÖTL (1959): Die Untersuchung der Zusammenhänge unterirdischer Wässer mit besonderer Berücksichtigung der Karstverhältnisse. – Steir. Beitr. z. Hydrogeologie, N. F., Jg. 1959, H. 1/2 (abgeschlossen), 140–145, Graz.
- JOHN, R. (1814): J. Chem. Phys., 12 (3), 244–252.
- KÄSS, W. (1982): Fluoreszierende Sporen als Markierungsmittel. – Beitr. Geol. Schweiz-Hydrogeologie, 28, 131–134, Bern.
- KÄSS, W. (1992): Geohydrologische Markierungstechnik. – Lehrbuch der Hydrogeologie, Bd. 9, 519 S., Berlin/Stuttgart (Gebrüder Borntraeger).
- KÄSS, W. & B. REICHERT (1986): Tracing of Karst Water with Fluorescent Spores. – In: MORFIS, A. & P. PARASKEVOPOULOU (Hrsg., 1986): Proceedings of the 5th International Symposium on Underground Water Tracing. – 157–165, Athen.
- KÄSS, W. & R. BENISCHKE (1992): Results with Microspheres. – In: ATH (Hrsg., 1992): Transport Phenomena in Different Aquifers (Investigations 1987–1992). – 6th International Symposium on Water Tracing, Karlsruhe 1992. – Steir. Beitr. z. Hydrogeologie, Jg. 1992, 43, S. 93, Graz.
- KLEINIG, H. & P. SITTE (1992): Lehrbuch Zellbiologie. – 385 S., Stuttgart/Jena/ New York (Gustav Fischer Verlag).
- MAYR, A. (1953): Blütenpollen u. pflanzliche Sporen als Mittel zur Untersuchung von Quellen und Karstwässern. – Anz. math. natw. Kl. – Österr. Ak. Wiss., 6, Wien.
- MAYR, A. (1954a): Neue Wege zur Erforschung von Quellen und Karstwässern. – Mitt. Höhlenkomm., 153 (1) Wien.
- MAYR, A. (1954b): Hydrogeologische Studien im Dachsteingebiet. – Diss., Univ. Innsbruck.
- MOORE, P. D., J. A. WEBB & M. E. COLLINSON (Hrsg., 1991): Pollen Analysis. – 2. Aufl., 216 S., Edinburgh/Boston/Melbourne/Paris/Berlin/Vienna/Oxford (Blackwell Scientific Publications).
- PERNDANNER, H. & W. REIF (1954): Taschenbuch der Textilveredelung. – 481 S., Wien (Verlag Österreichische Textilzeitung).
- REITSMA, T. (1970): Suggestions towards unification of descriptive terminology of angiosperm pollen grains. – Rev. Paleobotan. Palynol., 10, 39–60.
- SHAW, G. & A. YEADON (1964): Grana Palynologica, 5 (2), S. 247.
- ZETSCHKE, F. & K. HUGGLER (1928): Annalen, 461, 89.

Summary

Forty years ago the Spore-Drifting Method was born during a combined "salt-color-spores" drifting trial in a karst area near Graz. At present it is the unique multiway method whereby various dyed color-spores, simultaneously applied at different points of a large karst area, make possible to eliminate meteorological alterations during the investigation.

For the hydrogeologist the color-spores as tracer particles are useful because of the following reasons:

- 1) The spores are particles, they are not soluble and finally, even the detection of only one single spore – appearing again and again – can be evaluated as a "Yes/No"-decision.
- 2) The spores may be favorable transported because of their spherical tetraedric form and the network at their surface in the water leading karst channels. It is absolutely necessary to use the spores of *Lycopodium clavatum* and no other variety of *Lycopodium*!
- 3) Under the microscope their characteristic form is easy to distinguish from accompanying stone-slack and detritus.
- 4) The color is fixed fadeless at the color-spores, because of the high power of chemical reacting of the Sporopollenin (a main component of the spores) with the cation of basic coloring matters.
- 5) The color of the Color-Spores (CSP) is therefore highly resistant against wastewater containing acid, basic, oxidating, reducing or tensid substances. Also they are heat-resistant.
- 6) The CSP-Tracer implies no danger for the environment and the suspension is so diluted that it is not visible at the sampling point.

For sampling an instrument had been developed which makes possible a concentration of the Color-Spores similar to the plankton nets, however adjustable to an automatic sampler. It is equipped with a second plankton net, but closed at the usual entrance, to collect the spores which remained in the tube, during the backspilling operation. (It is indispensable to take besides an automatic sampler a plankton net as well – one of them may fail!)

The preparation of the samples for microscopic detection had been simplified at only a few manipulations: filtering the sample through a 52 μm and a 20 μm sieve and spilling the residue with the Color-Spores at a membrane filter.

The filters are deposited on a coordinate table of the new developed CSP-Tracer Analyzer which recognizes the form and the color of the Color-Spores and also counts the spores. The CSP-Analyser stores count data on disk – diskette, from where a standard evaluation program may pick the count results. With this invention the Spore-Drifting Method turns into a quick, reliable method, relatively inexpensive and with distinctive environmental aspects.

Dank

An dieser Stelle möchte ich allen an der Problembewältigung beteiligten Instituten und deren Mitarbeitern danken. Seit nunmehr 40 Jahren konnte der Aufgabenbereich Sporenriftung in reger Diskussion mit Herrn Prof. J. G. ZÖTL, Prof. V. MAURIN und Herrn Doz. Dr. P. HACKER durch wertvolle Hinweise zum heutigen Stand gebracht werden. Weiterer Dank gebührt Herrn Prof. H. ZOJER und seinen Mitarbeitern vom JOANNEUM RESEARCH, insbesondere Herrn R. BENISCHKE, die die Infrastruktur des Institutes bereitstellten. Mein Dank gilt auch Herrn Prof. M. GAILHOFER vom Institut für Pflanzenphysiologie der Universität Graz sowie Herrn Prof. H. TEPPNER vom Institut für Botanik der Universität Graz für die hilfreiche Unterstützung. Dr. A. DRESCHER und Frau Mag. U. BROSCHE halfen bei der Recherche der biologisch-chemischen Hintergründe der *Lycopodium*-Sporen – auch ihnen sei herzlich gedankt.