

L 521 R004		Pagina 1 van 7
Analysevoorschrift	Versie: 4	
Code: A2.118	Oppervlaktewater – Analyse van benthische diatomeeën	

auteur(s) : F.A.C. Kouwets gewijzigd : F.A.C. Kouwets autorisator: A. Veen paraaf autorisator:	datum vrijgave : 11-01-2016 beheerder : W. Wilts
---	---

A2.118	Oppervlaktewater – Analyse van benthische diatomeeën
---------------	---

Versiebeheer

versie nummer	datum vrijgave	versie nummer	datum vrijgave	versie nummer	datum vrijgave	versie nummer	datum vrijgave
1	07-01-2009						
2	19-01-2012						
3	29-01-2014						
4	11-01-2016						

L 521 R004		Pagina 2 van 7
Analysevoorschrift	Versie: 4	
Code: A2.118	Oppervlaktewater – Analyse van benthische diatomeeën	

wijzigingen in deze versie ten opzichte van de vorige versie:

N.a.v. de interne audit uitgevoerd op 10 november 2015, vastgelegd in verslag 2015.026, zijn onderstaande wijzigingen doorgevoerd in versie 4:

In H1 is expliciet verwezen naar lichtmicroscopische analyse, aangezien er ook andere microscopische technieken kunnen worden aangewend welke niet in dit voorschrift worden behandeld.

In H5 zijn etiketten toegevoegd om de objectglaasjes te labelen.

In H6 zijn kleine tekstuele wijzigingen doorgevoerd ter verduidelijking; bovendien is het aantal te tellen schaaltes van 200 op 500 gesteld conform aanwijzingen in NEN standaarden.

In H10 zijn de verwijzingen naar verouderde NEN standaarden geactualiseerd.

L 521 R004		Pagina 3 van 7
Analysevoorschrift	Versie: 4	
Code: A2.118	Oppervlaktewater – Analyse van benthische diatomeeën	

1. DOEL EN TOEPASSINGSGEBIED

Dit voorschrift heeft betrekking op benthische diatomeeën (kiezelwieren) uit het zoete oppervlaktewater¹. Het bevat richtlijnen voor het prepareren en lichtmicroscopisch analyseren van deze algen, alsmede aanwijzingen voor het verwerken van de verzamelde gegevens en opname hiervan in een (digitale) database. Het voorschrift is een eigen methode.

2. BEGINSEL

Aangroeiisel met diatomeeën op ondergedoken hard substraat of macrofyten wordt verzameld en geprepareerd (gereinigd) teneinde een representatief beeld van de aanwezige diatomeeën-biocoenose te verkrijgen. Het reinigen gebeurt met behulp van sterke zuren en oxiderende stoffen; het gereinigde materiaal wordt ingebed in kunsthars. De in de preparaten voorkomende kiezelschaaltjes worden lichtmicroscopisch geanalyseerd en de relatieve abundantie van de aangetroffen taxa wordt bepaald.

3. ANALYTISCHE KENGROOTHEDEN

n.v.t.

4. CHEMICALIËN

Voor reinigen en inbedden van het materiaal worden de onderstaande chemicaliën gebruikt:

	Stof	Kwaliteit
4.1	Demi-water	
4.2	Ethanol 96%	gedenatureerd
4.3	HCl 37%	
4.4	H ₂ O ₂ 30%	
4.5	H ₂ SO ₄ 96%	
4.6	KMnO ₄ verzadigde oplossing (7 gr per 100 ml demi-water)	
4.7	Milli-Q water	
4.8	Naphrax™	
4.9	Tolueen	
4.10	Zeepoplossing (enkele druppels op 100 ml demi-water)	

5. APPARATUUR EN HULPMIDDELEN

Voor reinigen, inbedden en analyseren van het materiaal worden de volgende apparaten en hulpmiddelen gebruikt:

L 521 R004		Pagina 4 van 7
Analysevoorschrift	Versie: 4	
Code: A2.118	Oppervlaktewater – Analyse van benthische diatomeeën	

	Hulpmiddel	Kwaliteit
5.1	Centrifuge	
5.2	Dekglasjes	Categorie 1
5.3	Digitale camera	
5.4	Glazen knikkers	
5.5	Glazen reageer(punt)buizen	dikwandig
5.6	Kookplaat	
5.7	Latex wegwerphandschoenen	
5.8	Objectglasjes (bij voorkeur met beschrijfbaar deel)	
5.9	Petrischalen	
5.10	Pincet	
5.11	Pipetten	glas en plastic
5.12	Staand lichtmicroscop (bij voorkeur voorzien van interferentie- en fase-contrast optiek)	
5.13	Strekplaat	
5.14	Verwarmingsblok instelbaar op 95°C	
5.15	Monsterflesjes	
5.16	Preparaatdozen	
5.17	Etiketten (ten behoeve van labelen objectglasjes)	

6. WERKWIJZE

6.1. Prepareren van het materiaal

De verzamelde benthische diatomeeën dienen losgemaakt te worden van het substraat en gereinigd van alle organische materiaal zodat slechts de schone kiezelschaaltjes overblijven. Hiervoor is in het verleden een aantal methoden ontwikkeld welke alle het gebruik van sterke zuren (HCl, H₂SO₄, oxaalzuur) en/of oxiderende stoffen (H₂O₂, KMnO₄) inhouden. De aard van het materiaal bepaalt dan welke methode het beste van toepassing is. Werk steeds in een zuurkast! Aandacht dient geschonken te worden aan beschadiging van het materiaal door het mechanisch losmaken van de diatomeeën van het substraat (schrappen, borstelen), de inwerking van chemicaliën of door het centrifugeren tijdens spoelstappen bij te hoge G-krachten ². Onderstaande methode geeft uitstekende resultaten bij materiaal uit (voedselrijk) oppervlaktewater.

6.1.1. Oxidatie

Het te oxideren materiaal kan bestaan uit ingevroren, natuurlijk substraat, of uit stukjes rietstengel bevestigd op een kunststof drijver (kunstmatig substraat, vervoerd en bewaard bij 1-5°C ³).

- Ontdooi ingevroren materiaal bij kamertemperatuur, en/of snijd stukjes stengel los van de drijver. Vang het materiaal van elke drijver afzonderlijk op in een petrischaal. Gebruik een pincet en voorkom aanraking (contaminatie!) met de handen. Breng de stukjes stengel afkomstig van een drijver over in een plastic verzamelbuis; materiaal van eenzelfde locatie kan worden samengevoegd.

L 521 R004		Pagina 5 van 7
Analysevoorschrift	Versie: 4	
Code: A2.118	Oppervlaktewater – Analyse van benthische diatomeeën	

- b. Voeg aan de rietstengels in de plastic verzamelbuis vervolgens 1-2 ml H_2O_2 toe, en vul de buis verder af met 10% HCl. Sluit de buis af nadat de gasontwikkeling is gestopt en schud krachtig. Laat het geheel minstens 3 dagen staan bij kamertemperatuur en schud nogmaals krachtig. De diatomeeën zullen nu allemaal losgeweekt zijn van het substraat.
Bij rietstengels gefixeerd met Lugol dient eerst het aanwezige water te worden afgecentrifugeerd (2-3 min bij 500 G) en het pellet weer toegevoegd aan de stengels in de plastic buis alvorens onderdompeling in HCl met H_2O_2 kan plaatsvinden.
Bij rietstengels gefixeerd met Formaldehyde dient eerst alle fixatief te worden uitgewassen alvorens verdere bewerking kan plaatsvinden. Spoel hiertoe ongeveer 5 maal met demiwater om de Formaldehyde te verwijderen.
[Formaldehyde geeft met HCl het uiterst kankerverwekkende bichloormethylether!]
- c. Breng 1 à 2 ml van de vloeistof (HCl met H_2O_2) met daarin de geresuspendeerde kiezelschaaltjes over in een dikwandige (punt)buis. De buizen kunnen eventueel met een glazen knikker worden afgesloten.
- d. Spoel het materiaal 3X met demi-water. Door de behandeling met HCl worden hierbij eventueel aanwezige carbonaten en ijzercomplexen (het laatste te zien aan geelkleuring van het monster) verwijderd.
- e. Voeg aan het pellet 2 ml H_2SO_4 toe om het aanwezige organische materiaal te verkolen. Incubeer de suspensie 1 uur bij ongeveer 95 °C; deze kleurt nu donker bruinzwart. Gebruik bij voorkeur het verwarmingsblok.
- f. Koel de suspensie af (eventueel in ijs) en voeg voorzichtig enkele druppels H_2O_2 toe, zoveel als nodig om de suspensie weer helder te krijgen. Incubeer het materiaal minimaal 1 uur bij ongeveer 95 °C.
- g. Indien het vermoeden bestaat dat nog niet alle organische stof is omgezet, handel dan als volgt: Voeg enkele druppels van een geconcentreerde KMnO_4 -oplossing toe, tot de gasontwikkeling (vrijwel) is gestopt en de suspensie helder blijft. (Wanneer teveel is toegevoegd wordt bruinsteen gevormd, dat in zuur milieu kan worden opgelost door nog wat H_2O_2 toe te voegen).
- h. Spoel het materiaal 5X met demi-water; bij de laatste stap eventueel met milli-Q water. Er blijft nu een vuilwit pellet van diatomeeënschaaltjes over.
- i. Maak van (een deel van) dit materiaal een verdunning in demi-water of milli-Q water, zodanig dat na resuspensie juist enige scattering (lichtverstrooiing door de kiezelschaaltjes) is te zien.

6.1.2. Inbedding

- a. Droog de met behulp van een zeepoplossing en/of ethanol zorgvuldig ontvette dekglasjes (series van minstens drie per monster) op een strekplaat bij 30-35 °C.
- b. Homogeniseer (door flink schudden) de gereinigde monsters en druppel genoeg materiaal (meest 6 tot 8 druppels) op een dekglas om het geheel te bedekken (gebruik voor elk monster een schone pipet!).
- c. Laat het materiaal trilling- en stofvrij, langzaam bij 20-35 °C indrogen (minstens 2-3 uur, zonodig overnacht), om een mooie gelijkmatige verdeling van de schaaltes op het glaasje te krijgen. Zorg dat de volgorde van de monsternummers duidelijk is: breng bijvoorbeeld een stuk tape aan vóór de strekplaat en schrijf daarop de monsternummers. Controleer na indrogen een glaasje onder het microscoop om de dichtheid te beoordelen. De schaaltes mogen elkaar niet bedekken, maar de dichtheid moet hoog genoeg zijn om een efficiënte telling mogelijk te maken. Een gemiddelde van 15 schaaltes per beeldveld bij 1000X vergroting is meestal ideaal maar een en ander is ook

L 521 R004		Pagina 6 van 7
Analysevoorschrift	Versie: 4	
Code: A2.118	Oppervlaktewater – Analyse van benthische diatomeeën	

afhankelijk van eventuele aanwezigheid van minerale deeltjes in het monster⁴; maak zonodig een nieuwe verdunning.

- d. Breng een druppel Naphrax⁵ aan op het dekglas, en laat hierop voorzichtig het – van tevoren genummerde! – objectglas zakken tot het dekglaasje aan het objectglas vastkleeft en keer het geheel snel om. Het dekglas mag hierbij niet verschoven worden (gevaar voor omrollen van schaalpjes), maar wel enigszins aangedrukt met een pincet o.i.d.
- e. Verhit de preparaten kortstondig (15-30 sec.) op een kookplaat tot het oplosmiddel (tolueen) juist verdampt is (te zien aan het stoppen van de vorming van gasbellen); te lang verhitten geeft onbruikbare preparaten.
- f. Laat de preparaten afkoelen en breng etiketten aan voorzien van in elk geval monster en/of preparaatnummer, monsterlocatie, monsterdatum en substraat. Berg de preparaten overzichtelijk op in een geschikte doos.
- g. Bewaar het resterende geoxideerde materiaal gefixeerd met ethanol in kleine, gelabelde monsterflesjes.

6.2. Analyseren van het materiaal

De analyses worden uitgevoerd op een staand (licht)microscop, naast helder veld verlichting bij voorkeur voorzien van Nomarski interferentie en/of fase contrast optiek. Werk bij het determineren met een vergroting van minimaal 1000X (100X immersie-olie objectief en 10X oculairen).

Maak voor de analyse van de diatomeeënpreparaten gebruik van de daartoe beschikbare speciale formulieren (zie bijlage 1). Stel allereerst een lijst van in elk geval de dominant aanwezige taxa op, en turf vervolgens in random gekozen beeldvelden de soortantallen van in totaal 500 schaalpjes⁶. Afhankelijk van de vraagstelling kan het preparaat voorts meer of minder uitgebreid doorzocht worden op zeldzamere taxa. De niet in de telling aangetroffen taxa krijgen op het formulier een “+”. Maak primair gebruik van de in de literatuur database opgenomen determinatieliteratuur. Maak in elk geval digitale foto's van onbekende en/of nieuwe taxa en sla deze met bijbehorende gegevens op in de database (zie onder).

7. KWALITEITSCONTROLE

7.1. Digitale database

Van de waargenomen taxa kunnen één of meer foto's in een digitale database worden opgenomen, voorzien van relevante bijbehorende gegevens als naam, monsterplaats en -datum. Deze database dient als kwaliteitswaarborging voor de determinaties.

7.2. Interne en externe controle en afstemming

Ten behoeve van de kwaliteitscontrole wordt deelgenomen aan (inter)nationale overlegstructuren en ringonderzoeken. Door contacten met experts wordt de juistheid van de determinaties gewaarborgd.

L 521 R004		Pagina 7 van 7
Analysevoorschrift	Versie: 4	
Code: A2.118	Oppervlaktewater – Analyse van benthische diatomeeën	

8. **BEREKENING VAN DE RESULTATEN**

Aantallen van de in de telling aangetroffen taxa worden omgerekend naar percentages (procentuele abundantie) aangezien meestal geen relatie met het bemonsterde oppervlak kan worden gelegd.

9. **RAPPORTAGE EN ARCHIVERING**

De analyse resultaten worden ingevoerd in het Laboratorium Informatie Management Systeem (LIMS); de papieren werklijsten worden in het laboratorium archief bewaard. Preparaten en eventuele monsterresiduen worden, voorzien van duidelijke etikettering, opgeslagen.

10. **REFERENTIES**

1. Veiligheidshandboek
2. B2.014 Bediening microscopen
3. NEN-EN 13946 Water quality – Guidance for the routine sampling and preparation of benthic diatoms from rivers and lakes (2014)
4. NEN-EN 14407 Water quality – Guidance for the identification and enumeration of benthic diatom samples from rivers and lakes (2014)

11. **BIJLAGEN**

Analyseformulier benthische diatomeeën
(het formulier is op 2 niet genummerde en niet gecodeerde pagina's bijgevoegd)

Opmerkingen:

¹⁾ Met benthische algen (fyto benthos) wordt de groep algen aangeduid welke niet vrij in het water zwevend, doch bodem- of meer algemeen substraatgebonden voorkomt. Diatomeeën vormen een belangrijke component van dit fyto benthos.

²⁾ Chemisch losmaken van de kiezelschaaltjes geniet de voorkeur boven schrapen of anderszins mechanisch verwijderen, aangezien de kiezelschaaltjes daarbij beschadigd zouden kunnen raken. Gebruik voor schrapen in elk geval steeds een nieuw scalpel. Centrifugerende bij te hoge G-krachten kan leiden tot klonteren en beschadiging van de kiezelschaaltjes, ook in de preparaten, waardoor een zekere determinatie soms niet meer mogelijk is.

³⁾ De werkwijze is afgestemd op de behandeling van rietstengels of andere helofyten als substraat; wanneer stenen zijn afgeborsteld kan het materiaal op dezelfde wijze in een centrifugebuis worden ondergedompeld in HCl met H₂O₂ zoals beschreven onder punt a, en gedurende 1 uur bij ± 95 °C worden geïncubeerd om eventueel aanwezig ijzer en calciumcarbonaat te verwijderen. Na 3X spoelen met demi-water kan verder worden gegaan bij punt e: het toevoegen van H₂SO₄.

⁴⁾ Let ook op de aanwezigheid van zandkorrels e.d.; probeer deze met een fijne prepareernaald te verwijderen aangezien het preparaat anders niet vlak wordt en lastig valt te analyseren.

⁵⁾ De viscositeit van Naphrax dient zodanig te zijn dat deze juist met een Pasteurpipet kan worden opgezogen. Verdun zonodig met tolueen (giftig!).

⁶⁾ Het totaal van 500 schaaltes is de huidige (internationale) standaard; afhankelijk van de aard van het materiaal, of de vraagstelling kan worden besloten lagere aantallen te tellen.