
HET BEPALEN VAN DE SOORTENSAMENSTELLING EN ABUNDANTIE VAN FYTOPLANKTON M.B.V. DE OMKEERMICROSCOOP

1 ONDERWERP EN TOEPASSINGSGEBIED

In dit voorschrift wordt de methode voor het bepalen van de soortensamenstelling en de abundantie van fytoplankton in stilstaande en langzaam stromende zoete oppervlaktewateren beschreven zoals deze door Aqualysis wordt uitgevoerd.

De prestatie kenmerken moeten nog uitgewerkt worden.

De analyseresultaten zijn geschikt voor:

1. Toetsing ecologische toestand volgens de KRW-maatlat. Indien gedetermineerd op het niveau behorende bij de desbetreffende toetsing.
2. Het verkrijgen van een indruk van de ecologische kwaliteit.

Indien gedetermineerd tot op soortniveau (voor zover mogelijk).

2 BEGINSEL

Deze analyse wordt gebruikt voor watermonsters uit oppervlakte water gefixeerd met Lugol. Na homogenisatie van een monster wordt een bekende hoeveelheid deelmonster overgebracht in een sedimentatiecuvet. Wanneer het plankton op de bodem van het cuvet bezonken is, wordt het fytoplankton volgens een beschreven telstrategie gedetermineerd en geteld. Tenslotte wordt voor elk taxon de dichtheid in cellen per milliliter berekend uit het aantal getelde cellen, het volume van het deelmonster en het onderzochte deel van het cuvet. Essentieel voor deze methode is een goede, volgens het toeval, verdeling van de algen over de cuvetbodem.

3 CHEMICALIËN EN REAGENTIA

- Basische Lugol (Boom: Lugoloplossing, globale fytoplanktonanalyse)
- Verdunningsvloeistof; leidingwater met basische Lugol 4 ml / liter leidingwater (cognac kleur)
- Immersie-olie, viskeuze olie voor olie-objectieven
- Natriumthiosulfaat (een overmaat aan Natriumthiosulfaat in leidingwater opgelost)
- Azijnzuur 99-100%

4 TOESTELLEN EN HULPMIDDELEN

- Omkeermicroscop volgens NEN-EN 15204 (helderveld);
- Plan objectief 4x en/of een UPlanFI objectief 10x (overzichtsobjectieven);
- Olie immersie-planapo objectieven met een vergroting van 20x en 60x;
- Lange werkafstand condensor NA van 0,55;
- Breed beeld oculairen 10x met gekalibreerde oculairmicrometer;
- Bezinkcuvet, inhoud 2,3ml, hoogte 18mm, doorsnede 12mm, met bodemdikte van 0,15 – 0,17 mm;
- Bezinkcuvet, inhoud 1,25ml, hoogte 10mm, doorsnede 12 mm, met bodemdikte van 0,15 – 0,17mm;
- Bezinkcuvet, inhoud 0,50ml, hoogte 4mm, doorsnede 12 mm met bodemdikte van 0,15 – 0,17mm
- Dekglasjes 18 x 18mm (dikte 0,17mm);

- Pipetteerapparaat diverse volumina 0.2 -1 ml, 1- 20 ml met bijbehorende pipettips;
- Pipettip (gekalibreerd) met afgesneden punt waardoor een aanzuigopening ontstaat met een doorsnede van 3-4 mm;
- Strawpipet (rietpipet) 1 ml met bijbehorende rietjes met minimale aanzuigopening van 3 mm;
- Geïsoleerde sedimentatie box (tempex doos met deksel);
- Petrischaal met vochtige tissue;
- Glazen 50 ml potjes met dop
- Handtelltje;
- Penseeltje
- Afwasmiddel
- Koelkast (temperatuur 2 – 8 °C)
- Koelcel (temperatuur 2 – 8 °C)
- Digitale camera met bijbehorende software
- Digitaal telformulier fytoplankton
- Determinatieliteratuur
- Excelbestand : Determinatieafspraken Fytoplankton Aqualysis
- Fotoreferentie database fytoplankton

5 BEHEER PROGRAMMA'S

5.1 Beheer telformulieren

Jaarlijks wordt aan het begin van het teljaar een recente TWN-lijst gekoppeld aan het digitale telformulier. Aan het eind van het teljaar wordt de naamgeving van de gevonden en getelde taxa gecontroleerd aan de hand van een dan recente TWN-lijst. Eventuele veranderingen in naamgeving van de gerapporteerde soorten worden aangepast. De digitale telformulieren met de, op het moment van opgeleverde data, geldende TWN-lijst worden 5 jaar gearchiveerd.

5.2 Determinatieliteratuur

Voor de determinatie van het fytoplankton is de literatuur zoals aangegeven wordt in de TWN-lijst leidend, en zoveel mogelijk verwerkt in het bestand Determinatieafspraken Fytoplankton Aqualysis

5.3 Beheer fotoreferentie database

Foto's van taxa die tijdens de analyse aandacht verdienen worden opgeslagen en 1 of 2x per jaar gecontroleerd en besproken met een externe expert. Interessante foto's en foto's van voor ons, nieuwe taxa worden, voorzien van de onderstaande informatie, in de database opgeslagen. De foto database dient als referentie collectie en bevat alleen gevalideerde foto's.

Alle foto's hebben (in de toekomst) de volgende omschrijving in onderstaande aangegeven volgorde:

Taxonnaam, initialen externe expert, monsterlocatie, monsterdatum, initialen fotograaf, grootte taxa (µm).

Voorbeeld: Plagioselmis nannoplanctica IB 2voss50 20200626 ESB 6µm

Waarbij:

1. de taxonnaam de werknaam is (zie Determinatieafspraken Fytoplankton Aqualysis bestand) en de grootte van het taxon de gemeten grootte (µm) die voor het taxon belangrijk is. Dit kan de lengte (L), breedte (B), diameter (D) of lengte stekel etc. zijn.

2. Indien de grootte van het taxon in de foto weergegeven is, hoeft de grootte niet ook in de omschrijving van de foto opgenomen te worden.

Vaak wordt van een taxon meerdere foto's genomen. Indien dat gebeurt, wordt de omschrijving van de foto aangevuld met een a, b etc. achter de initialen van de fotograaf.

De foto database wordt één maal per vijf jaar opgeschoond

Foto's die niet (meer) voldoen worden in de archief-fotodatabase opgeslagen totdat ze eventueel verwijderd worden.

5.4 Beheer Determinatieafspraken Fytoplankton Aqualysis bestand

In dit bestand worden, afgezien van interne werkafspraken en veranderingen in determinatie inzichten, ook opmerkingen opgenomen die ter sprake komen bij de terugkomdagen met een externe specialist. De veranderingen worden met een jaaraanduiding, eventueel met vermelding van de juiste literatuur en/of een toelichting opgenomen. Het bestand wordt in ieder geval voor het begin van het nieuwe analysejaar bijgewerkt.

6 ANALYSE MONSTER

Na monstername wordt het monster direct in het veld geconserveerd met 1ml basische Lugol per 250 ml monster. Bij binnenkomst op het laboratorium worden de monsters ingeboekt door de afdeling monsterontvangst en in de uitzoekruimte van hydrobiologie in de koelkast (temperatuur tussen 2°C en 8°C) gezet. Door de fytoplanktonanalisten wordt de fixatie gecontroleerd en indien nodig wordt er extra Lugol toegevoegd aan het monster. De monsters worden op een lijst aangetekend en verdeeld over kratten die in de koelcel (temperatuur tussen 2°C en 8°C) staan. De kratten zijn voorzien van de naam van het betreffende waterschap. Indien er monsters van een waterschap uitbesteed worden, staat de naam van het waterschap en de omschrijving 'uitbesteding' op de krat.

Indien er vraag is naar het verder door determineren van centrale diatomeeën worden de monsters van locaties waarvan bekend is dat er bloeien van centrale diatomeeën voor kunnen komen gehomogeniseerd waarna de helft van het monster in een nieuwe monsterfles overgebracht wordt en aangezuurd wordt met 250 µl Azijnzuur tot een pH van ongeveer 4. NEN 9407.

7 WERKWIJZE

7.1 Acclimatiseren

Om een onregelmatige bezinking van plankton en andere deeltjes te voorkomen, moeten alle gebruikte vloeistoffen en materialen op dezelfde omgevingstemperatuur zijn. Monsters worden daarom 3 dagen voor analyse weggezet op een donkere plaats bij eenzelfde temperatuur. Plaats monsters die net uit de koelcel komen eerst apart in het donker voordat ze bij de werkvoorraad op kamertemperatuur worden weggezet.

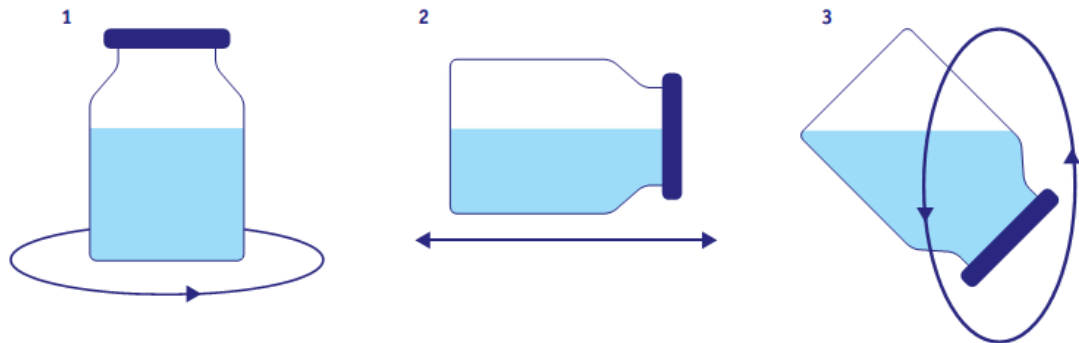
Monsters mogen nooit in het licht bewaard worden.

7.2 Homogeniseren

Om de monsters goed te kunnen homogeniseren mogen de monsterpotten voor niet meer dan 80% gevuld zijn.

Homogeniseer het monster gedurende 30 seconden door de fles op verschillende manieren te kantelen en te roteren. Doe dit voorzichtig zodat kolonies niet uit elkaar vallen. Indien na het inzetten blijkt dat algen in vlokken detritus verborgen blijven waardoor ze niet goed geteld

kunnen worden, zet dan nogmaals een deelmonster in. Maar schud deze keer langer en intensiever.



Figuur 1: Drie wijzen waarop fytoplankton monsters geschud dienen te worden voor het verkrijgen van een homogene verdeling van alle deeltjes (Bron: Handboek Hydrobiologie, Bijkerk 2010).

7.3 Inzetten van het monster

Bij de telling wordt gestreefd naar een dusdanige dichtheid aan waarnemingen per beeldveld dat deze goed te tellen en te determineren zijn. Als richtlijn wordt aangehouden: minimaal 2 waarnemingen per beeldveld bij een vergroting van 200x en maximaal 20 waarnemingen per beeldveld bij een vergroting van 600x.

- Check of de in te zetten cuvetten schoon zijn door ze tegen het licht te houden en te kijken of het glas schoon is..
- Etiketteer het cuvet met de unieke gegevens van het monster en het ingezette volume. Zet het cuvet in een petrischaal in de sedimentatie box. Plaats een vochtige tissue in de petrischaal
- Pipetteer zoveel verdunningsvloeistof in het cuvet dat wanneer het deelmonster in het cuvet gepipetteerd wordt er een kleine meniscus/bolling op de vloeistof staat.

Voor het pipetteren van fytoplanktonmonsters worden pipettips met wijde opening gebruikt. Druk de tip stevig aan de pipet. (Mocht er na het opzuigen van het monster vloeistof uit de pipetpunt druppelen, verwissel de pipettip of druk de pipettip opnieuw aan de pipet.) Druk de zuigerstang van de pipet tot aan het doordrukpunt, steek dan de pipetpunt 2 tot 3 cm onder het vloeistofoppervlak en zuig het deelmonster rustig op. Til de pipet rustig en rechtstandig uit het monster. (Let op eventuele aanhangende druppels aan de schacht van de pipettip en strijk deze zonodig af.) Vul het cuvet zonder uitblazen van de pipettip. Houd de punt rechtstandig in het cuvet onder het oppervlak van de draagvloeistof en druk rustig en gelijkmatig het deelmonster uit de pipetpunt, verbreek hierna rustig en rechtstandig het contact met het vloeistofoppervlak. Handboek Hydrobiologie 2010, bijlage 14-4.

- Homogeniseer het monster in de monsterfles
- Neem direct na het homogeniseren een deelmonster uit de fles. Indien er minimaal 1 ml gepipetteerd wordt, wordt de Strawpipet gebruikt. Ligt de te pipetteren vloeistof tussen 0.2 en 0.5 ml, gebruik dan de pipet voor kleine volumina met een afgesneden pipettip (H4).
- Leg de deksel voorzichtig op de doos en laat de algen in de meniscus bezinken (circa 20 minuten).
- Dek het cuvet af met een dekglas door deze met een vloeiende beweging op het cuvet te leggen waarbij de gehele opening in een keer wordt bedekt, zorg ervoor dat er geen luchtballen onder het dekglas gevangen worden.
- Dek de petrischaal af. Sluit de sedimentatiedoos af met de deksel en laat het monster minimaal 4 uur per cm cuvethoogte maar bij voorkeur de hele nacht staan.

7.4 Controle inzetten

- Indien bij aanvang van de analyse blijkt dat er toch zodanig grote luchtbellen ontstaan zijn, dat het een goede analyse verstoord, zet het deelmonster opnieuw in.
- Controleer voor aanvang van de analyse of het bezonken deelmonster goed telbaar is.
- Check hiervoor met een lage vergroting (100x) of alle deeltjes bezonken zijn en de deeltjes regelmatig verdeeld zijn over de cuvet bodem. Check tevens of er te veel organisch materiaal of veel grote detritus vlokken in het monster aanwezig zijn waarin algen verborgen liggen en of de dichtheid aan waarnemingen goed is.
- Indien er nog drijvende of niet bezonken algen (bijv. blauwalgen) in de vloeistof kolom voorkomen, laat het monster dan langer bezinken of zet het monster in met een hogere concentratie Lugol.
- Zet het deelmonster opnieuw in wanneer het ongeschikt is. Wanneer 0.2 ml ingezet deelmonster nog teveel algen bevat, maak dan een verdunning.

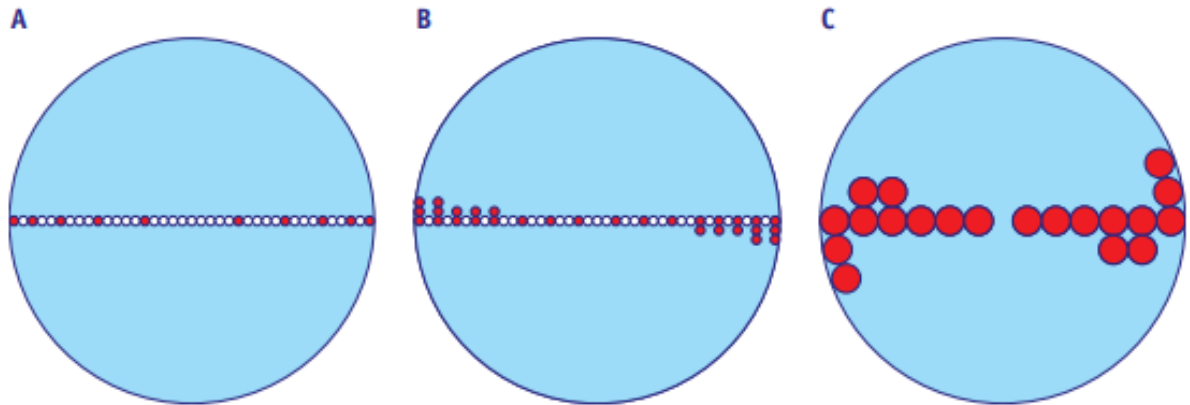
Voor het inzetten van een verdunning wordt 1 ml van het gehomogeniseerde monster overgebracht in een glazen potje (H4). Pipetteer hier, afhankelijk van de gewenste verdunningsfactor een aantal ml verdunningsvloeistof bij. Sluit het potje met de dop en homogeniseer het verdunde monster. Zet van dit verdunde monster 1 ml in. Vermeld de verdunningsfactor op het etiket.

7.5 Analyse

Tel en determineer fototrofe en mixotrofe algen (algen in het bezit van chlorofyl-A). De kleinste taxa die meegeteld worden, zijn organismen van één micrometer. Streef naar minimaal 200 waarnemingen of tel maximaal 50 beeldvelden.

Determineer zoveel mogelijk tot op soort, maar houd hierbij rekening met de doelstelling en het verlangde determinatieniveau. Indien algen niet tot op soort niveau gedetermineerd kunnen worden, worden ze op een hoger niveau gedetermineerd. Voor de naamgeving is de TWN – status 10 leidend. Gebruik voor de determinaties de aanwezige literatuur, de fotoreferentie database en het determinatie fytoplankton bestand. Van de voor ons nieuw gedetermineerde taxa worden foto's gemaakt, die door een externe expert worden gevalideerd.

- Maak een soortenlijst. Gebruik hiervoor de 200x en 600x vergroting en noteer de gedetermineerde taxa in het telformulier.
- Begin daarna met de telling.
- Noteer bij de telling het aantal waarnemingen en het aantal cellen per waarneming. Het aantal cellen van kolonies kan worden geschat door een klein deel zo exact mogelijk te tellen en dat te vertalen naar de gehele kolonie.
- Tel de algen in een beeldveld. Verdeel de beeldvelden volgens onderstaande segmenten en spiegel het segment in de tegenover liggende helft van het cuvet volgens figuur 2. Tel zoveel beeldvelden die nodig zijn om een representatief beeld van het monster te krijgen.
- Tel de kleine en /of veel voorkomende algen met de grote vergroting (600x). Tel 2x 5 beeldvelden (figuur 2A) of bij een lage dichtheid van de algen, 2x 15 beeldvelden (figuur 2B).
- Indien kleine taxa zeer talrijk in het monster aanwezig zijn, kan er voor gekozen worden om een deel van het beeldveld te tellen bijvoorbeeld 2x 5 halve beeldvelden. Dit kan alleen als het beeldveld duidelijk verdeeld kan worden in delen, bijvoorbeeld met een oculair micrometer.



Figuur 2: Vaste keuze van te onderzoeken beeldvelden over twee tegenover elkaar liggende taartpunten. De rood gekleurde beeldvelden worden onderzocht. (Bron: Handboek Hydrobiologie, Bijkerk 2014 hoofdstuk 7B).

- Tel voor de grotere en / of minder talrijk voorkomende taxa 2x 10 beeldvelden bij de kleinere vergroting (200x) volgens figuur 2C.
- De taxa die wel in de soortenlijst maar niet in de telling gevonden zijn, worden als 0-soort gerapporteerd.
- Teken het monster na analyse af op de aftekenlijst.
- Indien na de telling blijkt dat er een bloei van centrale diatomeeën opgetreden is, is het maken van een diatomeeënpreparaat een mogelijkheid. Zie hiervoor NEN 9407, paragraaf 13.

8 SCHOONMAKEN CUVETJES

Maak na de analyse de cuvettes schoon door ze leeg te maken en te spoelen met kraanwater, maak de onderkant (olie) schoon met een druppel afwasmiddel, poets en spoel af met kraanwater.

Draai het cuvet om en maak met een daarvoor gereserveerde penseel, met draaiende bewegingen het cuvet schoon om de algen die aan het glas kleven, los te krijgen. Spoel na goed na met kraanwater. Spoel zowel de binnen- als de buitenkant na met demiewater en laat het cuvetje omgekeerd drogen in de daarvoor bestemde petrischalen.

9 BEREKENING

Per taxon wordt de dichtheid bepaald door het aantal cellen/ml te berekenen volgens onderstaande formule:

$$\text{cellen/ml} = \frac{n * 100}{f_{\text{cuvet}} * V_{\text{deelmonster}}}$$

$$f_{\text{cuvet}} = b * \frac{\text{opp}_{bv}}{\text{opp}_{cuv}} * 100\%$$

waarin:

n = aantal getelde cellen van een taxon

f_{cuvet} = deel van het cuvet dat geteld is. Vermenigvuldigd met het aantal

		getelde beeldvelden
Vdeelmonster	=	Deel van het monster dat geanalyseerd wordt
b	=	aantal getelde beeldvelden
oppbv	=	berekende oppervlakte van een beeldveld
oppcuv	=	berekende oppervlakte van het cuvet

Per taxon wordt tevens het aantal waarnemingen/ml berekend volgens bovenstaande formule waarbij: n = aantal getelde waarnemingen van algen

10 CONTROLE EN VERWERKING VAN GEGEVENS

De digitale fytoplanktontellijst wordt na de analyse in concept opgeslagen. Na ongeveer 50 monsters worden de gemaakte foto's van de voor ons nieuwe taxa en de foto's van taxa waarover twijfel bestaat van een juiste determinatie, besproken met een externe expert. De gevalideerde foto's worden in de foto database gezet en de tellijsten worden indien nodig bijgewerkt. Nieuwe inzichten/determinatie afspraken worden in de afsprakenlijst opgenomen. Na deze validatiestap worden de tellijsten vrijgegeven. De data worden vervolgens in de database (Dawaco) opgeslagen.

11 AFSTEMMING ANALISTEN

Tussen de analisten onderling vindt afstemming plaats door tijdens het determineren te overleggen "en bij elkaar te kijken". Verder wordt de informatie en de gevalideerde foto's afkomstig van de terugkomdagen bij de externe expert binnen 3 weken in een overleg besproken. De daaruit voortvloeiende afspraken worden in de afsprakenlijst bijgehouden.

12 AFVAL EN RESTMATERIAAL

De met Lugol gefixeerde monsters worden na de rapportage periode met Natriumthiosulfaat geneutraliseerd en door de gootsteen gespoeld.

13 METHODE/CLAIM

1. NEN 9407: 2020 Water – Bepaling van de taxasamenstelling aan dichtheid van fytoplankton in oppervlaktewater met behulp van een omkeermicroscop
2. NEN-EN 15204:2006 Water quality – Guidance standard for the routine analysis of the phytoplankton abundance and composition using inverted microscopy (Utermöhl technique)
3. Handboek Hydrobiologie (2014), hoofdstuk 7 en werkvoorschrift 7B.
4. TWN-lijst
5. Referenties en matlatten voor natuurlijke watertypen voor de Kaderrichtlijn Water 2021-2027, versie juni 2020, publicatienr. 2018-49.
6. Omschrijving MEP en matlatten voor sloten en kanalen voor de Kaderrichtlijn Water 2021- 2027, versie juni 2020, publicatienr. 2018-50.

14 NORMEN EN VERSCHILLEN SPV EN NORMEN

Dit SPV is gebaseerd op NEN 9407: 2020 Water – Bepaling van de taxasamenstelling aan dichtheid van fytoplankton in oppervlaktewater met behulp van een omkeermicroscop. Het SPV wijkt af van deze NEN in paragraaf 9.2 Telstrategie waarin minimaal 200 waarnemingen geteld worden in maximaal 200 beeldvelden. Het SPV schrijft voor dat er gestreefd wordt naar het tellen van 200 waarnemingen in maximaal 50 beeldvelden, waarbij een zo goed mogelijk beeld van het monster weergegeven wordt.

Dit SPV is tevens gebaseerd op NEN-EN 15204:2006 Water quality – Guidance standard for the routine analysis of the phytoplankton abundance and composition using inverted microscopy (Utermöhl technique).

Het SPV wijkt af van NEN-EN 15204:2006, paragraaf 7.3.2.4 in de wijze waarop coenobiums, kolonies en filamenten geteld worden. Voor de telling wordt de methode in NEN 9407: 2020 paragraaf 9.2. aangehouden.