



Titel: Fytoplankton			
Dokumenttype: Teknisk anvisning	TA nr.: M09	Version: 4	Oprettet: 31.01.2015
Forfattere: Hans Henrik Jakobsen og Henrik Fossing	Gyldig fra: 07.04.2017		
	Sider: 34		
	Sidst ændret: 07.04.2017		
TA henvisninger	M01 – M10		

Indhold

1	Indledning	2
2	Metode	3
2.1	Tid, sted og periode.....	3
2.2	Udstyr	3
2.2.1	Udstyr til brug ved indsamling	3
2.2.2	Udstyr til brug i laboratorie	4
2.3	Indsamlingsprocedure.....	4
2.3.1	Prøvetagning og fremstilling af blandingsprøver	4
2.3.2	Konservering og opbevaring af fytoplanktonprøver.....	5
2.4	Laboratieprocedure.....	6
2.4.1	Artsbestemmelse i 'netprøven'	6
2.4.2	Artsbestemmelse af celler, optælling og opmåling	7
2.4.3	Optælling og bestemmelse af autotrofe og heterotrofe nanoflagellater	13
2.5	Vedligehold af instrumenter.....	13
2.6	Særlige forholdsregler – faldgruber	14
3	Databehandling	15
3.1	Tællestatistik	15
3.2	Beregninger.....	16
3.2.1	Fytoplanktonceller pr. liter	16
3.2.2	Biovolumen af fytoplankton.....	17
3.2.3	Kulstofbiomasse pr. individ og pr. liter beregnes.....	17
3.3	Data og koder.....	18
4	Kvalitetssikring.....	20
5	Referencer	21
6	Bilag	22
6.1	Kemikalier	22
6.1.1	Lugol-opløsning	22
6.1.2	Glutaraldehyd-brugsopløsning	22
6.1.3	Formalin-brugsopløsning.....	22
6.1.4	Calcofluor	23
6.1.5	DAPI- og Acridin Orange-opløsninger.....	23
6.2	Almindelig bestemmelseslitteratur.....	23
6.3	Oversigt over vanskeligt bestemmelige arter	28
6.4	Geometriske formler.....	30
6.5	Parametre og koder	31
7	Oversigt over versionsændringer	33

1 Indledning

Denne tekniske anvisning beskriver, hvordan fytoplankton(vand)prøver indsamles og efterfølgende håndteres/konserveres samt metoder til bestemmelse af artsammensætning, antal, biovolumen og kulstofindhold af fytoplankton.

Artssammensætningen af fytoplankton bruges ved vurderingen af omsætningen i det pelagiske system og dermed i tolkningen af bl.a. klorofyl-, ilt- og primærproduktionsdata.

Ved algeopblomstringer, hvor der fx kan observeres et dybereliggende (sekundært) klorofylmaksimum i vandsøjlen, ved forekomst af fiskedød, bunddyrdød, giftige muslinger m.m. kan det være nødvendigt at gennemføre undersøgelser med andre metoder, der ikke er omfattet af denne TA.

2 Metode

Undersøgelserne af fytoplankton omfatter en opgørelse af

- artssammensætning

og for hver enkelt art en kvantitativ opgørelse af

- antal
- biovolumen
- kulstofbiomasse

Prøvetagningen skal udføres samtidig med indsamling af ledsagende vand-kemiske parametre, bl.a. fluorescens, lyssvækkelse, klorofyl a-koncentration, primærproduktion (se *TA M01 Prøvetagning i felten*).

2.1 Tid, sted og periode

Fytoplanktonprøver kan udtages hele året i dagtimerne, dvs. i tidsrummet 1 time efter solopgang til 1 time inden solnedgang.

2.2 Udstyr

2.2.1 Udstyr til brug ved indsamling

Vandprøver til brug for fytoplanktonundersøgelse kan indsamles med vand-henter eller fytoplanktonslange (se også *TA M01 Indsamling af vand- og planktonprøver i felten*).

Øvrigt udstyr omfatter:

- net til fytoplanktonindsamling med en maskebredde på 10, 20 eller 25 μm
- prøvebeholdere af passende størrelse til blanding af vandprøver indsamlet i diskrete dybder
- glasflasker (evt. mørkebrune) med tætsluttende skruelåg (volumen afhængig af prøvestørrelse: 50-500 ml)
- dispenser med variabel indstilling af volumen

Kemikalier (se afsnit 6.1):

- Lugol-blanding
- 25 % glutaraldehyd, analyse-ren (skal ALTID opbevares i køleskab)
- 5 % formalin

2.2.2 Udstyr til brug i laboratorie

- almindelig (retvendt) lysmikroskop til observation af 'netprøve'
- omvendt lysmikroskop (dvs. mikroskop, hvor prøven kan betragtes nedefra)
- epifluorescensbelysning
- digitalt måleudstyr (fx digitalt mikroskopkamera med tilhørende software eller måleokular)
- tælleokular med tællenet
- sedimentationskamre i forskellige størrelser (fra 10 ml til 100 ml)
- tælleur
- 0,2 µm sortfarvet polycarbonatfiltre til epifluorescensmikroskopi
- støttefilter, fx 0,65 µm celluloseacetatfiltre til at understøtte polycarbonatfiltret
- udstyr til vacuumfiltrering

Kemikalier (se afsnit 6.1):

- natriumthiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
- Calcofluor
- DAPI eller Acridin Orange til epifluorescensfarvning

2.3 Indsamlingsprocedure

2.3.1 Prøvetagning og fremstilling af blandingsprøver

Prøvetagningen kan udføres med vandhenter eller fytoplanktonslange, som beskrevet i *TA M01 Prøvetagning i felten*.

Fra hver station undersøges én blandingsprøve, som til gengæld skal repræsentere hele den del af vandsøjlen, der ønskes undersøgt.

Derudover indsamles én kvalitativ fytoplanktonprøve med planktonnet og ved eventuel forekomst af et dybereliggende fluorescensmaksimum også en vandprøve i fluorescensmaksimum til bestemmelse af dominerende arter.

Blandingsprøven fremstilles, hvor vandet er indsamlet i diskrete dybder med vandhenter, ved at blande lige store dele/volumener af vandprøver fra hver dybde i en rengjort beholder. Ved brug af fytoplanktonslange tømmes indholdet direkte i beholderen (se *TA M01 Prøvetagning i felten*).

Blandingsprøven skal fremstilles, før der udtages delprøver til bl.a. fytoplankton, klorofyl og primærproduktion.

Til en kvalitativ bestemmelse af fytoplanktonarterne i vandsøjlen indsamles fytoplankton ved ét eller flere planktontræk, så det sikres, at den puljede fytoplanktonprøve giver et repræsentativt udvalg af hele vandsøjlets fytoplanktonsamfund. Prøvetagningen foretages ved at sænke fytoplanktonnettet ned til nederste prøvetagningsdybde og derefter trække det stille og roligt lodret opad. Nettet tømmes efter hvert fytoplanktontræk.

2.3.2 Konservering og opbevaring af fytoplanktonprøver

Fra blandingsprøven (og evt. prøve fra fluorescensmaksimum) skal der umiddelbart efter prøvetagningen udtages prøver til undersøgelse af fytoplankton samt andre prøver, som beskrevet i *TA M01 Prøvetagning i feltet*.

- Konserveringsmidlet (se nedenfor) doseres til prøveflasken med fx dispenser efter (blandings)prøven hældes i flasken.
- Skruelåg påsættes og flasken vendes forsigtigt flere gange, så fikseringsmidlet fordeles homogent i blandingsprøven, da der ellers er stor risiko for, at fytoplanktoncellerne bliver dårligt fikserede og holdbarheden dermed forringes.
- Transport og opbevaring af konserverede prøver skal ske mørkt og køligt, dvs. ikke over 18 °C.

2.3.2.1 Konservering af prøver til omvendt mikroskopi

Blandingsprøven konserveres i en Lugol-blanding (se afsnit 6.1) til en slutkoncentration på ~2 % Lugol (dvs. 2 ml Lugol-blanding pr. 100 ml blandingsprøve).

Brug engangshandsker ved arbejde med Lugol!

De konserverede prøver skal opbevares mørkt og køligt (ikke over 18 °C) og mikroskoperes/analyseres hurtigst muligt og senest 1 år efter prøvetagningen (se afsnit 2.4.2).

2.3.2.2 Konservering af prøver til epifluorescensmikroskopi

Blandingsprøven konserveres i enten 1 % glutaraldehyd eller 1 % formalin (se afsnit 6.1). Begge fixativer preserves plankton med samme effektivitet; men konservering med glutaraldehyd kan give et uønsket baggrundskær ved epifluorescensmikroskopi (Christaki et al. 2011; Sherr et al. 1993).

Blandingsprøver konserveres i 1 % glutaraldehyd på flg. måde:

- Blandingsprøven fikseres med 10 % glutaraldehyd (brugsopløsning, se 6.1.2) i forholdet 9:1 fx ved at tilsætte 10 ml filtreret og kold brugsopløsning til 90 ml blandingsprøve.
- Den fikserede blandingsprøve skal opbevares mørkt og koldt (4 °C) mindst 1 time før analyse for at lade glutaraldehyd penetrere cellemembraner for maksimal fiksering.

Blandingsprøver konserveres i 1 % formalin på flg. måde:

- Blandingsprøven fikseres med 37 % borax bufferet formalin (brugsopløsning, se 6.1.3) fx ved at tilsætte 3 ml filtreret og kold brugsopløsning til 100 ml blandingsprøve.

De konserverede blandingsprøver skal opbevares mørkt og koldt (4 °C). Der findes ingen éntydige rapporter i litteraturen omkring holdbarhed af marint plankton konserveret i glutaraldehyd eller formalin. Der er flere rapporter, der viser, at konserverede flagellater kan lysere inden for uger (Sherr &

Sherr 1993), og at fytoplanktonceller bleges over tid. Fytoplanktonceller risikerer derfor fejlagtigt at blive identificeret som heterotrofe celler, hvis prøven er for gammel. De konserverede blandingsprøver skal derfor mikroskoperes/analyseres hurtigst muligt efter prøvetagningen og må maksimalt opbevares i op til 6 uger.

2.3.2.3 Konservering af netprøver

Netprøverne konserveres ved tilsætning af Lugol-blanding (se afsnit 6.1), indtil prøven er lys cognacfarvet svarende til ca. 1 ml Lugol-blanding/100 ml prøve. Den konserverede prøve opbevares mørkt og køligt (ikke over 18 °C).

De konserverede prøver skal opbevares mørkt og koldt (ikke over 18 °C) og mikroskoperes/analyseres hurtigst muligt og senest 1 år efter prøvetagningen (se afsnit 2.4.1).

2.4 Laborieprocedure

Laborieundersøgelserne af fytoplankton foregår ved mikroskopering på tre niveauer:

- en kvalitativ artsbestemmelse af 'netprøven'
- en optælling af celleantal og opmåling af celler til beregning af biovolumen og kulstofbiomasse (Lugol-konserverede prøver)
- en optælling af autotrofe og heterotrofe nanoflagellater (formalin eller glutaraldehydkonserverede prøver).

En vurdering af fytoplanktonprøvens egnethed, artsbestemmelse, optælling og opmåling kræver betydelig erfaring og skal derfor altid udføres af en fytoplanktonspecialist.

2.4.1 Artsbestemmelse i 'netprøven'

- En dråbe af den Lugol-konserverede 'netprøve' overføres til objektgals og et dæksglas monteres.
- Den sedimenterede 'netprøve' gennemses under retvendt lysmikroskop, og der opskrives en artsliste over det fytoplankton, der iagttages i prøven bestemt til nærmeste taxonomiske niveau (fx art, slægt, familie osv.). På denne måde fås en oversigt over det fytoplankton, der forventes at blive optalt i blandingsprøverne.

Til artsbestemmelsen bruges nyere bestemmelseslitteratur (se afsnit 6.2). Bemærk i denne forbindelse, at det ikke altid er muligt på grundlag af lysmikroskopi at foretage en sikker artsbestemmelse. Derfor skal navngivningen altid iagttages med stor omhu.

Alle godkendte taksonomiske navne fremgår af STANCODE-liste 1067¹

¹ STANDAT-kodeliste nr. 135 anvendes, indtil STANCODE-liste 1067 er frigivet.

Er det kun muligt at bestemme en art til orden, angives arten under ordensnavnet eventuelt med note i bemærkninger om det mest sandsynlige slægts-/artsnavn, hvis det er muligt.

En række thecate dinoflagellater kan kun artsbestemmes på baggrund af deres plademønster, hvilket er vanskeligt i Lugol-konserverede prøver, hvis ikke de farves med Calcoflour og undersøges ved epifluorescensmikroskopi (Lawrence & Triemer 1985; se afsnit 2.4.3 og 6.1)

I afsnit 6.3 findes retningslinjer for bestemmelse af almindeligt forekommende vanskelige arter. For nogle arter (slægter) med stor variation i cellestørrelse samt ubestemte arter er det nødvendigt at opdele i størrelsesgrupper som vist i *tabel 1*. Omfatter en størrelsesgruppe flere ubestemte arter, angives kun slægtsnavnet.

Findes der i forbindelse med gennemgang af prøven nye arter, familier etc., eller anvendes en (ny) navngivning, som ikke optræder på STANCODE-liste 1067, skal der rettes henvendelse om ny STANDAT-kode til STANDAT-sekretariatet ved DCE (se afsnit 3.3).

Tabel 1. Størrelsesgrupper der skal anvendes for arter med stor variation i cellestørrelse.

Størrelse (µm)	STANDAT-kodeliste nr. 144	Størrelse (µm)	STANDAT-kodeliste nr. 144	Størrelse (µm)	STANDAT-kodeliste nr. 144
< 5 (2-5)	1	40-50	7	150-200	13
5-10	2	50-60	8	200-300	14
10-15	3	50-75	9	300-400	15
15-20	4	75-100	10	400-500	16
20-30	5	100-125	11	> 500	17
30-40	6	125-150	12		

2.4.2 Artsbestemmelse af celler, optælling og opmåling

Fytoplanktoncellerne artsbestemmes, tælles og opmåles i et omvendt mikroskop (Utermöhl-metoden; Utermöhl 1958) og består af følgende trin:

1. Sedimentation af prøver i sedimentationskammer
2. Artsbestemmelse og optælling af fytoplanktonceller
3. Opmåling af fytoplanktondimensioner

2.4.2.1 Sedimentation af prøver i sedimentationskammer

- Blandingsprøven tempereres, til den har samme temperatur som det lokale, hvor prøven skal mikroskoperes. Derved undgås, at der dannes luftbobler i prøven, mens den henstår til sedimentation.
- Blandingsprøven vendes mindst 50 gange med en vis forsigtighed (må ikke rystes), så fytoplanktoncellerne fordeles jævnt i vandet uden at ødelægges.
- En del af blandingsprøven 'påfyldes' et sedimentationskammer med et volumen, der er tilstrækkeligt til at mindst 500 celler kan optælles i hele kammeret, og at optællingerne opfylder betingelserne opstillet i 2.4.2.2 samt tabel 3.
- Valg af sedimentationskammer skal tilpasses efter koncentrationen af alger, således at algerne ikke ligger i lag og skygger for hinanden. Samtidigt skal der benyttes størst muligt kammer (fx 50 ml) for at sikre, at der tælles på et repræsentativt udvalg fra hovedprøven især for at sikre at større individer, der findes i lave koncentrationer, bliver ordentligt repræsenteret i kammeret. Kombinationen af stort kammer til større arter i lave koncentrationer og lille kammer til mindre arter, der forekommer i store koncentrationer, anbefales.
- Prøver indsamlet på stationer i åbent hav tælles altid i 50 ml sedimentationskamre. Som udgangspunkt skal prøver indsamlet i fjorde i perioden uden for de sæsonbetingede algeopblomstringsperioder tælles i 50 ml eller i 25 ml sedimentationskamre. Sedimentationskamre med 10 ml kan være tilstrækkeligt under algeopblomstringer i fjorde, men det kan være nødvendigt at supplere med større kamre for at sikre repræsentation af større arter, der findes i lave koncentrationer. Det betyder, at valget af sedimentationskammerstørrelse i høj grad beror på erfaring, og at det altid skal tilstræbes at minimere usikkerheden på tællingen af alle tilstedeværende arter.
- Sedimentationskammeret stilles på en vibrationsfri vandret flade (brug evt. vaterpas), så der sikres en jævn sedimentation af fytoplankton til bundpladen af sedimentationskammeret. Sedimentationen skal foregå ved konstant rumtemperatur og uden påvirkning af sollys. Den minimale sedimentationstid afhænger af kammerstørrelsen (*tabel 2*).
- Sedimentationskammeret fjernes forsigtigt samtidig med, at et specialdækglas lægges over den sedimenterede prøve, uden at der fanges luftbobler!
- Tællepladen gennemses herefter under omvendt lysmikroskop (se næste afsnit).
- Tællingen skal være afsluttet senest 1 uge efter sedimentationen er afsluttet.

Hints:

Er blandingsprøven for kraftigt farvet med Lugol, kan farven (jodet) reduceres ved tilsætning af små mængder af natriumthiosulfat før sedimentationen startes.

Tabel 2. Den minimale sedimentationstid for de mest almindelige kammerstørrelser

Kammervolumen (ml)	Kammerhøjde (cm)	Sedimentation (timer)
10	2	24
25	5	24
50	10	48
100	20	48

Efter brug skal sedimentationskammeret (specielt bundpladen) renses grundigt med varmt vand for at undgå forurening af de efterfølgende prøver. Brug evt. iblødsætning i blid detergent (uden slibemidler). Vær opmærksom på ikke at ridse sedimentationskammeret ved rengøringen. Undgå udtørring, da fytoplanktoncellerne ellers kan være meget vanskelige at fjerne. Glaspladen i bundpladen, som planktonet sedimenterer på, bør ikke genanvendes, medmindre det ved hjælp af mikroskopi kontrolleres, at pladen er helt ren og ikke indeholder rester fra tidligere sedimentation.

2.4.2.2 Artsbestemmelse og optælling af fytoplanktonceller

Tællingen af fytoplanktoncellerne skal gennemføres på en sådan måde, at det samlede biovolumen og den samlede biomasse af fytoplankton i blandingen kan beregnes. Cellerne skal derfor bestemmes til nærmeste taxonomiske niveau og tælles samtidig med, at de opmåles, som det er beskrevet i afsnit 2.4.2.3.

Fytoplanktoncellerne skal derfor ligge 'nogenlunde' jævnt og ensartet fordelt på hele sedimentationskammerets bund uden at ligge for tæt – en afgørelse som i høj grad beror på erfaring med metoden. Eksempler på tællestrategier er vist i Olrik (1991).

Optællingen af fytoplankton foretages under omvendt lysmikroskopi. Hvilke forstørrelser (objektiv og okular), der skal bruges ved mikroskoperingen, afhænger af cellestørrelserne. Det angives i protokollen til tællingen, hvilket okular og objektiv der er brugt. Følgende kombinationer anbefales:

	Mikroplankton (>20 µm)			Nanoplankton (3-20 µm)		
objektiv	10×	16×	25×	40×	63×	32×
okular	10-16	10-16	10-16	10-16	10-12,5	10-12,5

- Fytoplankton bestemmes til nærmeste taxonomiske niveau (fx art, slægt, familie osv.) og optælles.
- Først tælles de arter, der skønnes at forekomme hyppigst¹, i hele diagonale baner, én af gangen, efter et forudbestemt mønster, således at én organisme kun tælles én gang, når flere baner tælles (fig. 1A).

¹ Som tommelfingerregel regnes de mest almindelige arter, som de arter der tilsammen skønnes at udgøre 90 % af den samlede fytoplanktonbiomasse.

- Optællingen af hver af de enkelte taksonomiske enheder må tidligst indstilles, når der inden for hvert art/taksonomisk enhed er optalt ≥ 50 individer i et helt antal diagonaler. Med andre ord, optællingen må ikke afbrydes 'midt i en bane', da individantallet pr. mm^2 af bundpladen skal kunne beregnes for at kunne relatere antallet til et volumen (se afsnit 3.2.1).
- Optælles 'kun' 50 individer, resulterer det i en tælleusikkerhed på ca. 28 % (dvs. 50 ± 14), og derfor anbefales det at tælle 'så mange individer som muligt' for derved at reducere usikkerheden (se afsnit 3.1).
- Under optællingen 'konsulteres' artslisten, evt. nye arter tilføjes, ligesom ukendte arter grupperes efter størrelse.

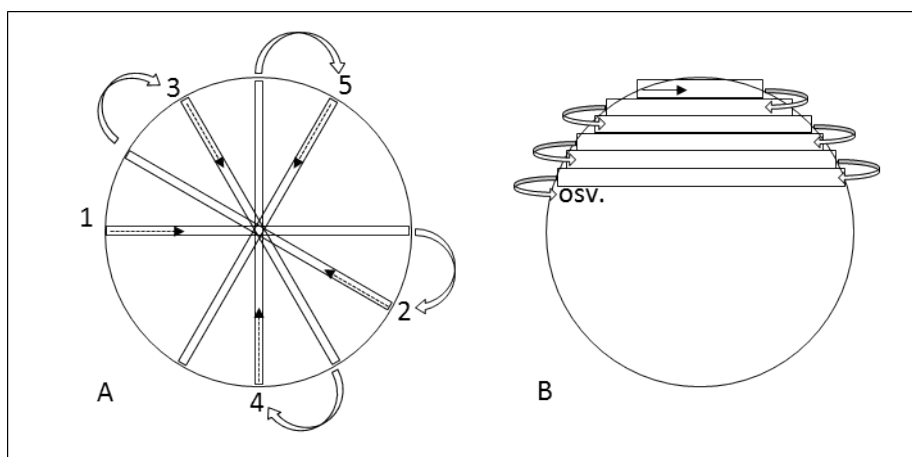
Herefter tælles de resterende arter over hele bundpladen efter et forudbestemt mønster, således at én organisme kun tælles én gang. Optællingen må tidligst afsluttes, når det samlede antal celler og kolonier/cellekæder optalt overstiger 500.

For eksempel tælles alle organismer for hver af de resterende taksonomiske enheder på bundpladens første bane/korde, herefter fortsættes optællingen i anden bane, herefter følger tredje bane og så videre, indtil alle banerne, dvs. hele bundpladen er gennemset og individerne optalt (*Fig. 1B*).

Også denne optælling af en taksonomisk enhed kan afbrydes, hvis der, efter at halvdelen af bundpladen er gennemset, er optalt ≥ 50 organismer af denne taksonomiske enhed. Bemærk, at det altid er enten en hel eller en halv bundplade, der skal gennemses, når 'de resterende arter' tælles, da det ellers ikke er muligt at relatere antallet til et volumen (se afsnit 3.2.1).

Da artslisten også bygger på netprøven, kan den omfatte arter, der ikke bliver set ved tællingen, fordi disse arter ikke optræder særligt hyppigt i blandingsprøven. Disse arter skal også indberettes ved i feltet '*antal talte*' at angive et 'blanktegn' (se datateknisk anvisning).

Det vil ofte forekomme, at nogle store arter som fx *Ceratium* spp., *Coscinodiscus* spp. og *Noctiluca* ssp., der har stor betydning for biomassen, ikke findes i et antal, der muliggør, at der kan optælles 50 individer over hele bundpladen (dvs. alle banerne) selv fra et stort prøvevolumen. Disse organismer skal alligevel optælles og måles, så biomassen kan beregnes, selv om det medfører en større usikkerhed på bestemmelsen end 28 % (se afsnit 3.1).



Figur 1. Tælle-mønstre ved optælling af fytoplanktonceller. (A) Hyppigt forekommende arter tælles på hele diagonale baner og optællingen af hver enkelt af de taksonomiske enheder må tidligst indstilles, når der inden for hver enhed er optalt ≥ 50 individer og et helt antal diagonaler. I det viste eksempel er der talt > 50 individer, efter at 5 diagonaler er gennemset og optællingen indstilles. (B) Mindre hyppigt forekommende arter tælles på tværs af bundpladens baner for hver af de taksonomiske enheder, enten til hele bundpladen er gennemset eller halvdelen, hvis der på dette tidspunkt i optællingen er optalt ≥ 50 individer inden for hver enhed. Bemærk at bredden af banerne afhænger af forstørrelsen.

Optælling og opmåling af kædedannende arter

Hos arter, der danner kæder, tælles de enkelte celler (fx alle kædedannende diatomeer). En undtagelse er trådformede cyanobakterier (blågrønner), som ikke er tydeligt celleopdelt (fx *Nodularia*). Disse tælles som tråde af varierende længde. Ved indberetning angives antal 100 μm -fragmenter talt og biovolumen pr. 100 μm -fragmenter. Det skal bemærkes, at det optalte antal celler ved optælling af koloni- eller kædedannede arter ikke indgår i det totale antal på 500 celler, der skal tælles, førend optællingen afbrydes. Det betyder, at optælling ikke må afbrydes, hvis eksempelvis 10 *Skeletonema* spp. kæder med et samlet celletal på 500 celler er optalt. I stedet indregnes de 10 kæder som 10 "celler" i det samlede antal talte celler.

Optælling og opmåling af kolonidannende arter

For arter, der danner kolonier, tælles så vidt muligt de enkelte celler, men hvis dette ikke lader sig gøre, vælges forskellige strategier afhængig af morfologi. Strategier kan være:

- Enkeltceller tælles (fx *Dinobryon*, *Uroglena*)
- Kolonierne deles op i mindre enheder, som vurderes at indeholde identiske celleantal. Antallet af celler i enheden tælles og ganges med antallet af enheder (fx arter af *Microcystis*). Er der stor variation i kolonistørrelsen, inddeles de i størrelsesgrupper. Der indberettes største lineære dimension på kolonierne, antal talte celler og biovolumen pr. celle.

- Kolonierne tælles som hele kolonier. Kolonivolumen beregnes som en kugle eller en kugleskal (fx *Aphanothece*, *Gomphosphaeria*). Er der stor variation i kolonistørrelsen, inddeles de i størrelsesgrupper. Biovolumen beregnes ved at gange kolonivolumen med en faktor. Der indberettes kolonistørrelse, antal talte kolonier og biovolumen pr. koloni.
- Kolonier med kendt celletal (coenobier af fx *Scenedesmus*) eller delkolonier med kendt celletal (fx *Merismopedia*) tælles som hele kolonier/delkolonier, og antallet ganges med antal celler pr. enhed. Der indberettes kolonistørrelse, antal talte kolonier/delkolonier, antal celler pr. enhed og biovolumen pr. celle.

2.4.2.3 Opmåling af fytoplanktondimensioner

Biovolumen af fytoplankton beregnes på basis af målinger af cellernes geometri i tre dimensioner.

For alle almindeligt forekommende arter måles dimensionerne på mindst 10 individer, og for hvert individ beregnes et biovolumen (se afsnit 3.2.2). Det kan være vanskeligt at fastslå, hvornår en art er almindeligt forekomme. Som tommelfingerregel regnes de mest almindelige arter som de arter, der tilsammen udgør 90 % af den samlede fytoplanktonbiomasse. For arter, der kun forekommer med meget få celler i den talte prøve, kan der til beregning af biovolumen anvendes dimensioner fra tidligere registreringer af arten. I STANCODE-liste nr. 1067¹ er der for hver art angivet hvilken formel, der skal bruges, og dermed hvilke dimensioner, der skal måles. For ubestemte arter vælges den geometriske form, der anses for tættest på den sande form (se afsnit 6.4).

Bemærk, at

- for flere arter af *Ceratium* er der etableret formler til beregning af volumen ud fra tværfurens bredde
- for kæde- og kolonidannende individer varierer det, hvorledes biovolumen skal udregnes og dermed også hvilke dimensioner, der skal måles (se beskrivelsen i afsnit 2.4.2.2).

¹ STANDAT-kodeliste nr. 135 anvendes, indtil STANCODE-liste 1067 er frigivet.

2.4.3 Optælling og bestemmelse af autotrofe og heterotrofe nanoflagellater

Denne procedure gennemføres ved brug af epifluorescensmikroskopi.

- Der udtages 5-10 ml af den formalin- eller glutaraldehyd-konserverede blandingsprøve.
- Prøven farves med tilsætning af
 - 8 dråber DAPI-opløsning (se afsnit 6.1) pr. 10 ml blandingsprøve
 - eller
 - 5 µl Acridin Orange-opløsning (se afsnit 6.1) pr. ml blandingsprøve
- Efter 5 minutters farverekation filtreres prøven ned på et 0,2 µm sortfarvet polycarbonatfilter understøttet af et fugtet filter (fx 0,65 µm celluloseacetatfilter). Vakuumtrykket må ikke overstige 30 cm Hg.
- Filteret tages af holderen, mens vakuum stadig er på, og monteres på objektglas ved brug af ikke-fluorescerende immersionsolie.
- Nanoplankton mikroskoperes med brug af 100 x immersionsobjektiv og 12,5 x okular, hvor den anvendte immersionsolie skal være identisk med den, der er brugt ved montering af præparatet. Der anvendes flg. lysfilter afhængig af farvemetode:
 - DAPI-farvede blandingsprøver: UV-lys (355-425 nm)
 - Acridin Orange-blandingsprøvet: blå lys (455-500 nm); ved epifluorescensmikroskopi autofluorescerer autotrofe organismer orangerødt til rødt
- Organismerne tælles normalt i diagonaler. For dominerende grupper tælles mindst 50 individer. Kan der identificeres dominerende genkendelige taksonomiske grupper (fx cryptophyceer), skal disse tælles separat. Hyppigst må organismene dog henføres til uidentificeret nanoplankton. Disse tælles som henholdsvis autotrofe og heterotrofe opdelt i de vedtagne størrelsesgrupper.
- Inden tælling kan præparatet opbevares op til 1 døgn i køleskab eller op til 14 dage i fryser.
- Prøverne bør tælles hurtigst muligt efter prøvetagning (< 14 dage).

2.5 Vedligehold af instrumenter

Udover almindeligt vedligehold er der ingen instrumenter, der kræver særlig opmærksomhed i denne TA (se også TA *M01 Prøvetagning i felten*).

2.6 Særlige forholdsregler – faldgruber

De indsamlede prøver skal opbevares mørkt og koldt (ikke over 18 °C) i glasbeholdere indtil oparbejdningen. For Lugol-fikserede prøver kan holdbarheden være begrænset, og det skal derfor jævnligt kontrolleres, om der er behov for efterfiksering, hvis prøverne opbevares mere end 2 måneder. Prøver ældre end 1 år er stort set ubrugelige, da der løbende forgår nedbrydning af fytoplankton i prøven (HELCOM Combine 2014).

3 Databehandling

3.1 Tællestatistik

Fytoplanktonceller ligger 'nogenlunde' jævnt/tilfældigt fordelt over hele sedimentationskammerets bund, når sedimentationen er udført korrekt (se afsnit 2.4.2). Cellerne er derfor Poisson-fordelt, og der kan beregnes øvre og nedre sikkerhedsgrænser på det optalte antal celler, som er asymmetriske for lave værdier af N . Ved et 95 %-konfidensinterval¹ beregnes disse grænser i absolutte tal som

$$n_h = N + 2,42 + 1,96\sqrt{N + 1,5}$$

$$n_l = N + 1,42 - 1,96\sqrt{N + 0,5}$$

hvor N er antallet af talte celler og n_h og n_l er hhv. øvre og nedre grænse for tællingen (Javornicky 1958; Lund et al. 1958). Det vil sige, at ved et 95 %-konfidensinterval ligger antallet af celler i intervallet

$$N - n_l \leq N \leq N + n_h$$

For at udregne hvor mange individer, der skal tælles af hver art/slægt for at opnå en given omtrentlig/tilnærmet (symmetrisk) usikkerhed inden for et 95 %-konfidensinterval, anvendes følgende formel:

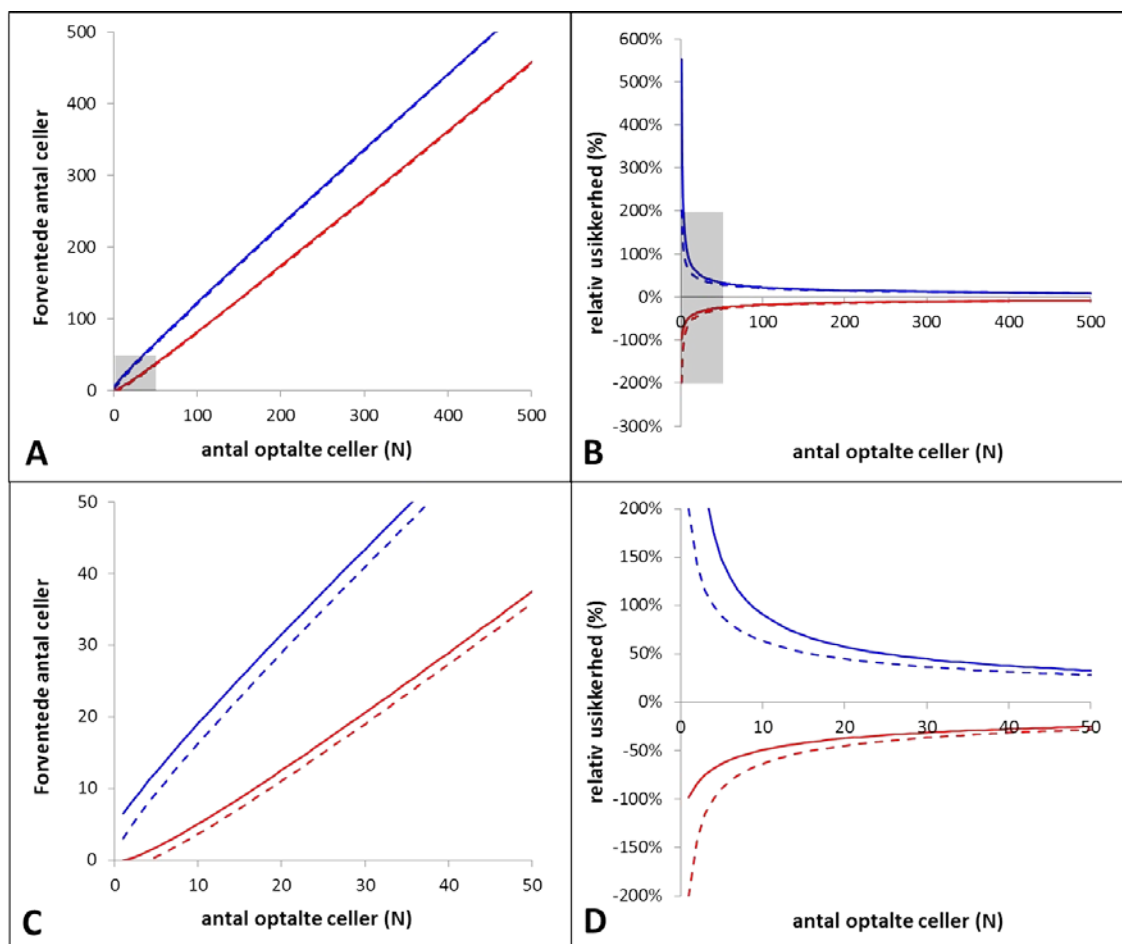
$$\text{usikkerhed (\%)} = \pm \frac{200}{\sqrt{N}}$$

hvor N er antal talte individer (*tabel 3* og *figur 2*). Hvis tælleenheden er tråde eller kolonier, er N antallet af tråde eller kolonier.

Tabel 3. Usikkerhedsgrænser ved udvalgte optællinger af fytoplankton.

optalte fytoplankton celler	usikkerhed bestemt ved Poisson-fordeling				usikkerhed tilnærmet symmetrisk			
	absolutte usikkerheds- interval		relative usikkerheds- interval		absolutte usikkerheds- interval		relative usikkerheds- interval	
N	n_l	n_h	n_l	n_h				
4	1	11	-68%	175%	0	8		±100%
10	5	19	-49%	91%	4	16		±63%
25	17	38	-34%	50%	15	35		±40%
50	37	66	-25%	33%	36	64		±28%
75	59	95	-21%	26%	59	95		±23%
100	82	122	-18%	22%	80	120		±20%

¹ Sandsynligheden for at der ved 95 ud af 100 optællinger opnås et tælleantal, der ligger i det beregnede interval.



Figur 2. Øvre (blå) og nedre (rød) usikkerhedsgrænse beregnet ved 95 %-konfidensinterval for Poissonfordeling af fytoplankton celler (fuld optrukket linje) og ved tilnærmet symmetrisk usikkerhedsgrænse (stiplet linje). A og C viser den absolutte usikkerhed, hvor C svarer til det grå udsnit af A. B og D viser den relative usikkerhed, hvor D svarer til det grå udsnit af B.

3.2 Beregninger

3.2.1 Fytoplanktonceller pr. liter

Antal fytoplankton pr. liter (N_V) beregnes ud fra antallet af optalte fytoplanktonceller eller kolonier

$$N_V = \frac{N \cdot S_{tot}}{S_b \cdot V} \cdot 1000$$

hvor N er antal talte individer, S_{tot} er arealet af sedimentationskammerets bund (mm^2), S_b er det samlede areal (mm^2) af de 'baner', hvor N individer er optalt (se afsnit 2.4.2.2), og V er sedimentationskammerets volumen (ml).

3.2.2 Biovolumen af fytoplankton

Biovolumenet beregnes i μm^3 på basis af de målte dimensioner (se afsnit 2.4.2) og de i STANCODE-liste nr. 1067¹ angivne formler eller for ubestemte arters vedkommende ved at vælge den geometriske form, der anses for tættest på den sande form evt. ved at sammensætte flere former (se afsnit 6.4).

For *Ceratium*-arterne skal tværfuremålet ganges med en faktor, som varierer fra art til art, for at beregne biovolumenet. Faktoren fremgår af STANCODE-liste nr. 1067¹. For de arter, hvor der ikke findes volumenformler baseret på tværfurebredden alene, beregnes volumen som summen af volumener, som angivet i kodelisten.

Biovolumen udtrykkes (når det er muligt) som et gennemsnit af biovolumenerne (\pm standardafvigelse og standardfejl; eng. standard error (SE)) af mindst 10 fytoplanktonceller. SE beregnes for 95 %-konfidensinterval som

$$SE = \frac{s}{\sqrt{n}} \cdot t$$

hvor s er standardafvigelsen, n er antallet af observationer og t er Student's t -værdi, der afhænger af n (brug fx tabelopslag i Excel: =T.INV.2T(0,05; n-1) til at finde t -værdien) – for $n = 10$ er $t = 2,26$ og for $n = \infty$ er $t = 1,96$.

3.2.3 Kulstofbiomasse pr. individ og pr. liter beregnes

Kulstofbiomassen (C_b) for alle fytoplanktonorganismene kan estimeres ud fra plasmavolumenet (P_v) ved en simpel multiplikation med en kulstoffaktor (c), dvs.

$$C_b = cP_v$$

c varierer mellem 0,11 og 0,13 afhængig af art (se kulstoffaktor i STANCODE-liste 1067¹).

Kulstofbiomassen angives i pg (dvs. 10^{-12}g) C μm^{-3} (biovolumen) og μg C liter⁻¹.

Bortset fra diatoméer, svarer plasmavolumenet hos alle fytoplanktonorganismer med god tilnærmelse til biovolumenet.

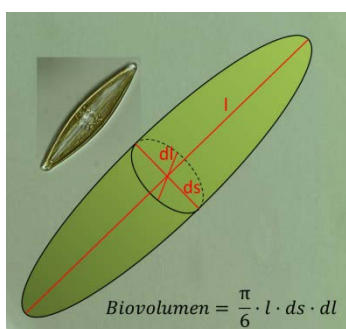
Diatoméer har en forholdsvis stor vakuole, hvor det er estimeret, at kun ca. 10 % af vakuolevolumenet repræsenterer vakuolens kulstofbiomasse, hvis vakuolevolumenet skal omregnes til kulstofbiomasse med samme kulstoffaktor, som anvendes for plasmavolumenet. Med god tilnærmelse kan plasmavolumenet for diatoméer beregnes (modificeret efter Strathmann 1967):

¹ STANDAT-kodeliste nr. 135 anvendes, indtil STANCODE-liste 1067 er frigivet.

$$\text{Plasmavolumen} = \text{biovolumen} - (0,9 \cdot \text{vakuolevolumen})$$

Eksempelvis kan plasmavolumenet af en diatome, som vist på *figur 3* med form som en rotationsellipsoide med elliptisk tværsnit (se afsnit 6.4) og en vakuole omgivet af plasma med tykkelsen p , beregnes til

$$\frac{\pi}{6} [l \cdot ds \cdot dl - 0,9(l-2p)(ds-2p)(dl-2p)]$$



Figur 3. Nødvendige opmålinger, der skal gennemføres før biovolumen kan beregnes af en diatomé (øverst til venstre) med form som en rotationsellipsoide med elliptisk tværsnit.

3.3 Data og koder

Parametre, der skal indberettes til ODA, fremgår af *Bilag 6.5*, og en udførlig beskrivelse af dataoverførsel til ODA og den tilknyttede kvalitetssikring er beskrevet i *data TA DT03 Fytoplankton og zooplankton*.

Såfremt der i prøverne findes nye arter, familier etc., eller anvendes en (ny) navngivning, som ikke fremgår af STANCODE-liste 1067¹, skal der rettes henvendelse om ny STANDAT-kode til

STANDAT-sekretariatet
DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi
Aarhus Universitet
Vejsøvej 25
8600 Silkeborg

Anmodningen skal indeholde følgende oplysninger, idet nomenklaturen skal følge www.algaebase.org

- latinske navne (slægt, art)
 - er der tale om en artsgruppe, angives hvilke arter gruppen omfatter
 - eventuelt dansk navn
- author(er)
- bestemmelsesværk
- klasse
- geometrisk formel
- ernæringsbiologi (autotrof, heterotrof, mixotrof)

¹ STANDAT-kodeliste nr. 135 anvendes, indtil STANCODE-liste 1067 er frigivet.

Efter tildeling af STANDAT-kodenummer, kan arten oprettes i STOO ved henvendelse til Danmarks Miljøportal.

Enkelte specielle artsangivelser, som fx *Chaetoceros* sp. A, er tilladte, hvis disse er inkluderet i STANCODE-liste 1067¹. I *Bilag 6.2* findes retningslinjer for bestemmelse af almindeligt forekommende vanskelige arter.

Da artslisten bygger på såvel tælleprøver som netprøver, kan den omfatte arter, der ikke bliver kvantificeret ved tællingen. Disse arter skal indberettes. I feltet antal talte angives 'blanktegn'.

¹ STANDAT-kodeliste nr. 135 anvendes, indtil STANCODE-liste 1067 er frigivet.

4 Kvalitetssikring

Kvaliteten af fytoplanktonundersøgelserne sikres ved:

- at metodeforskrifter overholdes
- kontrol af primærdata
- vurdering af validiteten af beregnede resultater
- deltagelse i workshop og interkalibrering.

Metodeforskrifterne (dvs. denne TA) overholdes bedst, hvis der udarbejdes en oversigt for, hvordan prøver skal indsamles og behandles i felten, idet vandprøver (til andre analyser) oftest indsamles samtidig med fytoplanktonprøverne (se *TA M01 Prøvetagning i felten*).

Der bør fra årets start udarbejdes en oversigt over prøvetagningsdatoer, prøvetyper og mærkning af prøver. Ved brug af konsulenter skal det sikres, at konsulenten får den nødvendige information. Beskrivelsen af hvornår og hvordan prøver og resultater udveksles, skal være entydig. Det kan være en fordel lokalt at udarbejde en følgeseddel til prøverne, hvor de oplysninger, der skal indberettes, fremgår. Det er bl.a. oplysninger om prøvetager, dybde, tidspunkt, udstyr.

Kontrol af primærdata omfatter en sikring af, at fx datoer og prøvetagningsdybder er i overensstemmelse med anden prøvetagning, der er foretaget samtidig. Det skal også kontrolleres, om celleantal og opmålte dimensioner ligger inden for et realistisk/sædvanligt niveau i forhold til tidligere resultater.

De beregnede resultater – herunder biovolumen og kulstofindhold – skal også valideres i forhold til tidligere observationer.

Kontrollen af primærdata og beregnede data udføres nemmest og bedst ved brug af computerprogrammer, som automatisk kontrollerer data i forhold til grænseværdier. Dette kvalitetstjek skal foretages hver gang, der er lagt nye data ind for et 'togt', så fejl opdages så hurtigt som muligt.

Deltagelse i workshop og interkalibrering med jævne mellemrum skal sikre, at den nødvendige ekspertise opretholdes, og eventuelle taksonomiske eller metodiske ændringer bibringes eksperterne og implementeres i prøvetagningsprogrammet.

5 Referencer

Christaki, U., Courties, C., Massana, R., Catala, P., Lebaron, P., Gasol, J. M., & Zubkov, M. V. (2011) Optimized routine flow cytometric enumeration of heterotrophic flagellates using SYBR Green I. *Limnol. Oceanogr. Methods* 9: 329-339.

HELCOM Combine (2014) Manual for Marine Monitoring in the COMBINE Programme of HELCOM - Part C: Programme for monitoring of eutrophication and its effects. Annex C-6: Guidelines concerning phytoplankton species composition, abundance and biomass pp. 310-325.

Javornicky, P. (1958) Die Revision einiger Methoden zur Feststellung der Quantität des Phytoplanktos. *Science Pap. Inst. Chemie Technl., Prage* 2, pp. 283-367.

Lawrence, F. & Triemer, R.E. (1985) A rapid simple technique utilizing Calco-fluor White M2R for the visualization of dinoflagellate thecal plates. - *Journal of Phycology* 21: 662-664.

Lund, J.W.G., Kipling, C. & LeCren, D. (1958). The inverted microscope of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. - *Hydrobiologia* 11, pp. 143-170.

Olrik, K. (1991) Planteplankton - metoder. - Miljøprojekt nr. 187. Miljøstyrelsen, 108 s.

Sherr, E. B., and Sherr, B. F. (1993). Preservation and storage of samples for enumeration of heterotrophic protists. In Kemp, P., Sherr, B.F., Sherr, E.B., and Cole, J.J., (Eds.) *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*, Lewis Publishers, Boca Raton Ann-Arbor London Tokyo. pp. 207-212.

Sherr, E. B., Caron, D. A., and Sherr, B. F. (1993). Staining of heterotrophic protist for visualization via eEpifluorescence microscopy. In Kemp, P., Sherr, B.F., Sherr, E.B., and Cole, J. (Eds.) *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*, Lewis Publishers, Boca-Raton Ann-Arbor London Tokyo. pp. 231-227.

Strathmann, R.R. (1967) Estimating the organic carbon content of phytoplankton from cell volume or plasma volume. - *Limnology and Oceanography* 12(3): 411-418.

Utermöhl, H. (1958) Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplanktonmethodik. - *Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie. Mitteilungen* 9. Stuttgart: 1-38.

Willén, T. (1962) Studies on the phytoplankton of some lakes connected with or recently isolated from the Baltic. - *Oikos* 13 (2): 169-199.

6 Bilag

6.1 Kemikalier

6.1.1 Lugol-opløsning

- 200 ml destilleret vand
- 20 g kaliumiodid (KI)
- 10 g resublimeret iod (I_2)
- 20 ml konc. eddikesyre (CH_3COOH)

Blandes i den beskrevne rækkefølge. Vær sikker på, at det forrige kemikalie er opløst, før det næste tilsættes. Opbevares i glasflaske med tætsluttende låg (se også Willén 1962).

6.1.2 Glutaraldehyd-brugsopløsning

- 25 % glutaraldehyd; $(CHO)_2(CH_2)_3$

En brugsopløsning med 10 % glutaraldehyd fremstilles på flg. måde:

- 25 % glutaraldehyd blandes med demineraliseret vand; 2:3.
- Datoen for åbningen af flasken med 25 % glutaraldehyd og datoen, hvor brugsopløsningen er fremstillet, noteres på flaskerne. Begge opløsningerne skal opbevares mørkt og koldt ($4\text{ }^\circ\text{C}$) og anvendes indenfor 6 måneder.
- Brugsopløsningen filtreres gennem et $0,2\text{ }\mu\text{m}$ filter for at frafiltrere evt. begyndende polymerisering, der kan forøge baggrundsskær ved epifluorescensmikroskopi. Det kan anbefales, at bruge et sprøjtefilter monteret på en sprøjte.

6.1.3. Formalin-brugsopløsning

- 37 % formalin; HCHO
- Borax; $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ eller $Na_2(B_4O_5(OH)_4) \cdot 8H_2O$

En brugsopløsning med 37 % formalin bufferet med borax fremstilles på flg. måde:

- $\frac{1}{2}$ liter 37 % formalin tilsættes 1 teskefuld borax og omrystes.
- Datoen for åbningen af flasken med 37 % formalin og datoen, hvor brugsopløsningen er fremstillet, noteres på flaskerne. Begge opløsningerne skal opbevares mørkt og koldt ($4\text{ }^\circ\text{C}$) og anvendes indenfor 1 år.
- Umiddelbart før brug filtreres brugsopløsningen gennem et $0,2\text{ }\mu\text{m}$ cellulose- filtre for at udgå, at borax partikler overføres til blandingsprøven. Det kan derfor anbefales at bruge et sprøjtefilter monteret på en sprøjte og tilsætte brugsopløsningen direkte til blandingsprøven.

6.1.4 Calcofluor

- Opløs 10-100 µg Calcofluor White M2R pr. ml destilleret vand.
- Undgå udfældninger af Calcofluor i præparater ved at neutralisere (pH = 7) Lugol-konserverede prøver før tilsætning af Calcofluor.
- Præparatet undersøges i epifluorescensmikroskop med UV-lys (355-425 nm), hvor cellulose vil fluorescere blåhvidt.

Calcofluor produceres bl.a. af Sigma som 'fluorescent brightener 28' med reference til Calcofluor White M2R.

Opløsningen kan holde sig i 7-14 dage (ved stuetemperatur), inden den bliver uklar.

Hint: I praksis fås et godt resultat ved at placere en dråbe prøve på et objektglas, dække den med et dækglass og derefter tilsættes en dråbe Calcofluor-opløsning til den ene side af dækglasser og en dråbe NaOH (af tilpas koncentration til neutralisering) til den anden side.

6.1.5 DAPI- og Acridin Orange-opløsninger

DAPI-opløsning

- 10 µg per 1 ml demineraliseret vand

filtreres efter opløsning gennem 0,2 µm filter. Opbevares i køleskab.

Acridin Orange-opløsning

- 80 mg Acridin Orange
- 50 ml 30 % formalin
- 450 ml demineraliseret vand

blandes og filtreres gennem 0,2 µm filter. Opbevares i køleskab.

6.2 Almindelig bestemmelseslitteratur

(se også HELCOM Combine 2014)

Balech, E. 1995. The genus *Alexandrium* Halim (Dinoflagellata). Sherkin Island Marine Station, i-iii, Ireland: 1-151.

Bérard-Therriault, L., Poulin, M, et Bossé, L. 1999. Guide d'identification du phytoplancton marine de l'estuaire et du golfe du Saint-Laurent incluant également certains protozoaires. Publ. spec. can. sci. halieut. aquat.: 128. 387 pp.

Chrétiennot-Dinet, M.-J. 1990. Atlas du Phytoplancton Marin. Volume III: Chlorarachniophycées, Chlorophycées, Chrysophycées, Cryptophycées, Euglenophycées, Eustigmatophycées, Prasinophycées, Prymnesiophycées, Rhodophycées & Tribnophycées. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris: 261 pp.

- Cronberg, G., Annadotter, H, 2006. Manual on aquatic cyanobacteria. A photo guide and a synopsis of their toxicology. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. International Society for the Study of Harmful Algae: 106 pp.
- Dodge, J. D. 1982. Marine dinoflagellates of the British Isles. Her Majesty's Stationery Office, London: 303 pp.
- Ettl H. 1983. Süßwasserflora von Mitteleuropa. CHLOROPHYTA. Teil 1: Phytomonadina. - Stuttgart- New York: 607 pp.
- Hernández-Becerril, D.U., 1996. A morphological study of *Chaetoceros* species (Bacillariophyta) from the plankton of the Pacific Ocean of Mexico. Bulletin of The Natural History Museum, London, (Botany Series) 26(1): 1-73.
- Hindák F. 1984. Studies on the Chlorococcal Algae (Chlorophyceae). III. Biologické Práce XXX. VEDA, Bratislava. 308 pp.
- Hindák F. 1988. Studies on the Chlorococcal Algae (Chlorophyceae). IV. Biologické Práce XXXIV. VEDA, Bratislava. 263 pp.
- Hindák F. 1990. Studies on the Chlorococcal Algae (Chlorophyceae). V. VEDA, Bratislava. 225 pp.
- Hindák F., 2008. Colour Atlas of Cyanophytes. VEDA, Publishing House of the Slovak Academy of Sciences, Bratislava. 253 pp.
- Hoppenrath, M. Elbrächter M., Drebes, G. 2009. Marine Phytoplankton: Selected microplankton species from the North Sea around Helgoland and Sylt. Kleine Senckenberg-Reihe 49, Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart: 264 pp.
- Horner, R. A. 2002. A taxonomic guide to some common marine phytoplankton. Biopress Ltd. 195 pp.
- Hällfors, G. 2004. Checklist of Baltic Sea Phytoplankton Species (including some heterotrophic protistan groups) - Balt. Sea Environ. Proc. No 95: 208 pp.
- Hustedt, F., 1930. Die Kieselalgen Deutschlands, Österreichs und der Schweiz mit Berücksichtigung der übrigen Länder Europas sowie der angrenzenden Meeresgebiete, Teil 1, in Rabenhorst's Kryptogamen – Flora, Akademische Verlagsgesellschaft m.b.H., Leipzig, 920 pp. (in German).
- Jensen, K. G., Moestrup, Ø. 1998. The genus *Chaetoceros* (Bacillariophyceae) in inner Danish coastal waters Opera Botanica: N133, 68 pp.
- Joosten A.M.T. 2006. Flora of the blue-green Algae of the Netherlands. The non-filamentous species of inland waters. KNNV Publishing: 239 pp.

- Komárek, J., Anagnostidis, K., 1998. Cyanoprokaryota. 1. Teil Chroococcales. In: Ettl, H., Gärtner, G., Heynig, H., Mollenhauer (Eds). Süßwasserflora von Mitteleuropa. 19/1. Gustav Fischer, Jena: 548 pp.
- Komárek J., Anagnostidis K. 2005. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Cyanoprokaryota. 2 Teil: Oscillatoriales. Elsevier GmbH, München. 759 pp.
- Komárek, J., Fott, B., 1983. Chlorophyceae (Grünalgen), Ordnung: Chlorococcales. In: Huber-Pestalozzi, G. (Ed.). Das Phytoplankton des Süßwassers. Systematik und Biologie. 7. Teil 7, 1. Hefte. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung. Stuttgart: 1044 pp.
- Kraberg, A., Baumann, M., Dürselen, C.-D. 2010. Coastal Phytoplankton. Photo Guide for Northern European Seas. Verlag Dr. Friedrich Pfeil, München: 204 pp.
- Krammer K., Lange-Bertalot H., 1986. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Bacillariophyceae. Teil 1: Naviculaceae. - Stuttgart - New York: 876 pp.
- Krammer K., Lange-Bertalot H., 1988. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Bacillariophyceae. Teil 2: Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae. - Stuttgart - New York: 596 pp.
- Krammer K., Lange-Bertalot H., 1991. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Bacillariophyceae. Teil 3: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae. - Stuttgart – Jena: 576 pp.
- Krammer K., Lange-Bertalot H., 1991. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Bacillariophyceae. Teil 4: Achnantheaceae, Kritische Ergänzungen zu *Navicula* (Lineolatae) und *Gomphonema*. - Stuttgart – Jena.
- Larsen, J., Moestrup, Ø. 1989. Guide to Toxic and Potentially Toxic Marine Algae. The Fish Inspection, Service, Ministry of Fisheries. Copenhagen: 61 pp.
- Pankow, H. 1990. Ostsee-Algenflora. Gustav Fischer Verlag, Jena: 648 pp.
- Pliński, M., Hindák F., 2010. Flora Zatoki Gdańskiej i wód przyległych (Bałtyk Południowy). Zielenice – Chlorophyta (Green Algae). Part one: Non-filamentous green algae (7/1). Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego; Ilość stron: 240 pp; ISBN 978-83-7326-736-7.
- Pliński, M., Hindák F., 2012. Flora Zatoki Gdańskiej i wód przyległych (Bałtyk Południowy). Zielenice – Chlorophyta (Green Algae). Part one: Filamentous green algae (7/2). Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego; Ilość stron: 140 pp; ISBN 978-83-7326-902-6.

- Pliński M., Komárek J. 2007. Flora Zatoki Gdańskiej i wód przyległych (Bałtyk Południowy). Sinice - Cyanobakterie (Cyanoprokaryota). Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego; Ilość stron: 154 pp; ISBN: 978-83-7326-437-3.
- Pliński, M., Witkowski A. 2009. Flora Zatoki Gdańskiej i wód przyległych (Bałtyk Południowy). Okrzemki – Bacillariophyta (Diatoms). Part one: Centric diatoms (4/1). Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego; Ilość stron: 223 pp; ISBN 978-83-7326-649-0.
- Pliński, M., Witkowski A. 2011. Flora Zatoki Gdańskiej i wód przyległych (Bałtyk Południowy). Okrzemki – Bacillariophyta (Diatoms). Part two: Pennate diatoms-I (4/2). Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego; Ilość stron: 167 pp; ISBN 978-83-7326-875-3.
- Popovsky J. 1990. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Dinophyceae (Dinoflagellida). Teil 1. - Jena- Stuttgart: 272 pp.
- Ricard, M. 1987. Atlas du Phytoplancton Marin. Volume II: Diatomophycées. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris: 297 pp.
- Rines, J. E. B., Hargraves, P. E. 1988. The *Chaetoceros* Ehrenberg (Bacillariophyceae) Flora of Narragansett bay, Rhode Island, U.S.A. Bibliotheca Phycologica 79, J. Cramer, Berlin: 196 pp.
- Snoeijs, P. (ed.) 1993. Intercalibration and distribution of diatom species in the Baltic Sea. Volume 1. The Baltic marine Biologists Publication No. 16a. Opulus Press, Uppsala, Sweden: 130 pp.
- Snoeijs, P., Vilbaste, S. (eds.) 1994. Intercalibration and distribution of diatom species in the Baltic Sea. Volume 2. The Baltic marine Biologists Publication No. 16b. Opulus Press, Uppsala, Sweden: 125 pp.
- Snoeijs, P., Potapova M.(eds.) 1995. Intercalibration and distribution of diatom species in the Baltic Sea. Volume 3. The Baltic marine Biologists Publication No. 16c. Opulus Press, Uppsala, Sweden: 125 pp.
- Snoeijs, P., Kasperoviciené, J. (eds.) 1996. Intercalibration and distribution of diatom species in the Baltic Sea. Volume 4. The Baltic marine Biologists Publication No. 16d. Opulus Press, Uppsala, Sweden: 125 pp.
- Snoeijs, P., Balashova, N. (eds.) 1998. Intercalibration and distribution of diatom species in the Baltic Sea. Volume 5. The Baltic marine Biologists Publication No. 16e. Opulus Press, Uppsala, Sweden: 144 pp.
- Sournia, A. 1986. Atlas du Phytoplancton Marin. Volume I: Cyanophycées, Dictyochophycées, Dinophycées, Raphidophycées. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris: 219 pp.

Starmach, K. 1985. Süßwasserflora von Mitteleuropa. CHRYSOPHYCEAE und HAPTOPHYCEAE. 1 Auflage. – Jena: 515 pp.

Thomsen, H. A. (ed.) 1992. Plankton i de indre danske farvande. Havforskning fra Miljøstyrelsen Nr 11/1992. Miljøministeriet Miljøstyrelsen, Copenhagen: 331 pp.

Thronsen, J., Eikrem, W. 2001. Marine mikroalger i farger. Almater Forlag AS, Oslo: 188 pp.

Thronsen J., Hasle, G.R. & Tangen, K. 2007. Phytoplankton of Norwegian coastal waters. Almater Forlag As: Oslo. 341 pp.

Tikkanen, T., Willén, T. 1992. Växtplanktonflora, Naturvårdsverket, Stockholm: 280 pp.

Tomas, C., R. (ed.) 1997. Identifying Marine Phytoplankton. Academic Press, San Diego: 858 pp.

Wołowski K., Hindák F. 2005. Atlas of Euglenophytes. VEDA, Publishing House of the Slovak Academy of Science: 136 pp.

6.3 Oversigt over vanskeligt bestemmelige arter

Et artsnavn skal kun noteres, hvis identifikationen er sikker. Kan en art ikke identificeres, men med stor sandsynlighed relateres til en specifik taxa, indikeres dette ved betegnelsen 'cf.'

Mange arter/slægter kan ikke bestemmes med sikkerhed uden nærmere undersøgelser (skalpræparater, calcofluorpræparat, elektronmikroskopi). I disse tilfælde angives arterne som fx centriske kiselalger (diatomeer) eller dinoflagellater spp. og opdelt i størrelsesgrupper (se *tabel 1* afsnit 2.4.1). Da nogle arter ligner hinanden så meget, at de ikke kan skelnes med de anvendte standardmetoder, er der oprettet en række artsgrupper.

Artsbestemmelsen må da kun ske til dette gruppeniveau, medmindre der er udført specialundersøgelser (dette skal i givet fald anføres ved indberetning af data). De påbudte artsgrupper er angivet i STANCODE-liste 1067¹ ved en liste over de til gruppen tilhørende arter adskilt med en / eller samlet under en gruppebetegnelse (fx *delicatissima*-gruppen, *Scrippsiella*-gruppen).

	Relativ sikker bestemmelse	Kun typiske individer kan bestemmes	Bemærkning
DIATOMEER			
Chaetoceros			
brevis		+	
constrictus		+	
danicus		+	
diadema		+	
socialis/radians		(+)	når individerne har sporer
Coscinodiscus			mange arter kræver skalpræparater
Skeletonema			det kan være vanskeligt at adskille de 2 arter
costatum		+	
subsalsum		+	
Thalassiosira			andre arter kræver skalpræparater
anguste-lineata	+		
nordenskoldii	+		kan forveksles med <i>T. angulata</i>
Navicula			<u>alle</u> arter kræver skalpræparater
Pseudo-nitzschia			
seriata-gruppen (pungens/seriata)	+ (> 3 µm)		de 2 grupper adskilles på cellebredden
delicatissima-gruppen	+ (< 3 µm)		
Thalassionema nitzschioides	+		forvekslingsmuligheder i brakvand med <i>Diatoma elongatum</i> og <i>D. vulgare</i>

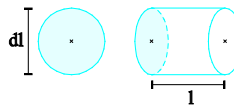
¹ STANDAT-kodeliste nr. 135 anvendes, indtil STANCODE-liste 1067 er frigivet.

	Relativ sikker bestemmelse	Kun typiske individer kan bestemmes	Bemærkning
DINOFLAGELLATER			
Ceratium			
macroceros	+		vær opmærksom på lighed med <i>C. tricroceros</i>
Diploopsis-gruppen			kan ikke artsbestemmes uden detaljerede studier
Heterocapsa rotundatu/ Heterocapsa minima	+	som gruppe	kan ikke skelnes på artsniveau uden calcofluorfarvning
Scrippsiella			
trochoidea	+		
faeroense	+		
Scrippsiella-gruppen	+		alle andre arter
Thecate dinoflagellater			betegnelsen bruges kun, hvis det er 100 % sikkert, at arten er thecat
Athecate dinoflagellater			betegnelsen bruges kun, hvis det er 100 % sikkert, at arten er athecat – ellers angives de som dinoflagellater
Dinoflagellater spp., dvs. dinoflagellater, der ikke kan bestemmes til slægt, og hvor theca ikke kan identificeres med sikkerhed			til denne gruppe anvendes samme kulstoffaktor som for athecate dinoflagellater

6.4 Geometriske formler

Cylinder

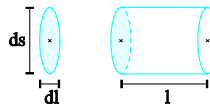
Volumen: $\pi/4 \cdot dl^2 \cdot l$



Cylinder med elliptisk tværsnit

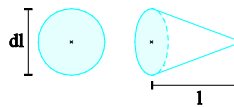
med elliptisk tværsnit

Volumen: $\pi/4 \cdot ds \cdot dl \cdot l$



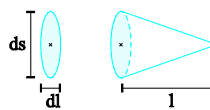
Kegle

Volumen: $\pi/12 \cdot dl^2 \cdot l$

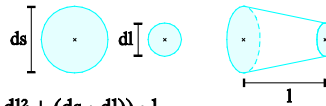


Elliptisk kegle

Volumen: $\pi/12 \cdot ds \cdot dl \cdot l$



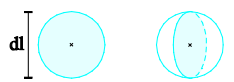
Keglestub



Volumen: $\pi/12 \cdot (ds^2 + dl^2 + (ds \cdot dl)) \cdot l$

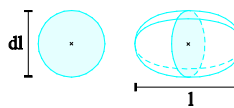
Kugle

Volumen: $\pi/6 \cdot dl^3$



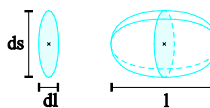
Rotationsellipsoide

Volumen: $\pi/6 \cdot dl^2 \cdot l$



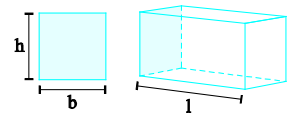
Rotationsellipsoide med elliptisk tværsnit

Volumen: $\pi/6 \cdot l \cdot ds \cdot dl$



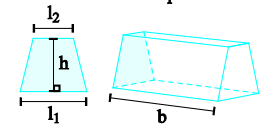
Parallelepiped

Volumen: $l \cdot b \cdot h$



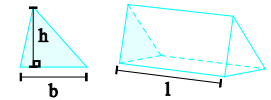
Trapezoid

Volumen: $1/2 \cdot b \cdot h \cdot (l_1 + l_2)$



Tresidet prisme

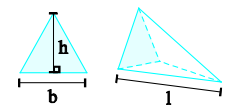
Volumen: $1/2 \cdot l \cdot b \cdot h$



Tetraeder

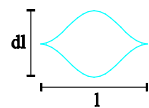
(pyramide med trekantet formet basis)

Volumen: $1/6 \cdot l \cdot b \cdot h$



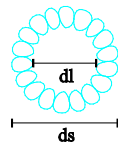
Spindelform

Volumen: $\pi \cdot 2/15 \cdot dl^2 \cdot l$



Kugleskal

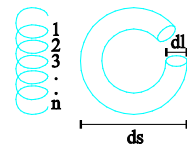
Volumen: $\pi/6 \cdot (ds^3 - dl^3)$



Skrueformer

(cylinder m. cirkelformet omkreds)
n = antal skruer i tråd

Volumen: $n \cdot (\pi/4 \cdot dl^2) \cdot (\pi \cdot ds)$



6.5 Parametre og koder

Checkliste over parametre, der skal indberettes til ODA.

STANDAT	Bemærkning	Kodeliste
Gruppe 1 Stationsoplysninger:		
Standard nøgleparametre	Se STANDAT-vejledninger	
Gruppe 2 Planktonprøveoplysninger:		
Emne	fyto eller zoo	
Laboratorium		STD00032
Prøvebearbejder	person (tælleren)	tekst
Interkalibrering	seneste dato, hvor tælleren har deltaget i interkalibrering	dato
KS-møde	KS-møder, som tælleren har deltaget i	tekst
Oparbejdet-start	datoer for start af laboratoriearbejde	dato
Valideret af	initialer	tekst
Udtagningsudstyr	vandhenter, slange	STD00024
Prøvetype	04 for blandingsprøve, 24 for blandingsprøve over springlag	STD00034
Dybde 1	gennemsnitsdybden i meter (som for vandkemi)	tal
Dybde 2	enkelte dybder i meter adskilt af blanktegn, hvis det er adskilte dybder (som for vandkemi) og interval, hvis der er brugt slange	tal
Konservering	kode for konserveringsmiddel	STD00145
Metode	kode for tællemetode	STD00018
Bemærkninger	fx hvis der har været problemer ved prøvetagningen	tekst
Gruppe 3 Planktonresultater		
Artskodenr.	STANDAT-kodenummeret	STD00135
Mnemokode-RUBIN	fremgår af STANDAT-kodelisten	STD00135
Latinsk navn		tekst
Bestemmelsesusikkerhed		STD00141
Morfologi	flagellat, koloni, cyste etc.	STD00140
Størrelsesgruppe	hvis der er talt i størrelsesgrupper: kode for denne	STD00144
Størrelsesinterval	hvis der ikke er givet en størrelsesgruppe, angives her hvilket størrelsesinterval, 'arten' dækker over i prøven; hvis koloni, men tælles som enkeltceller, angives interval for kolonistørrelse	tal
Koefficient	Koefficienten, som antal talte skal ganges med for at omregne til antal individer per liter	tal
Forstørrelse, objektiv	anvendt objektiv	tal
Forstørrelse, okular	anvendt okular	tal
Sedimentationsvolumen	i ml	tal
Enhed	ml	STD00016
Ernæringsbiologi	autotrof etc.	STD00138
Talt som	kode for enkeltcelle, koloni, filament etc.	STD00140
Antal tælleenheder	antal af ovenstående	tal
Antal målte	antal, hvorpå der er målt dimensioner	tal

STANDAT	Bemærkning	Kodeliste
Målt som	kode for enkeltcelle, koloni, filament etc.	STD00140
Dimension 1	dimension 1	tal
Standardafvigelse	beregnet standardafvigelse på målinger af dimension 1	tal
Dimension 2	dimension 2	tal
Standardafvigelse	beregnet standardafvigelse på dimension 2, eventuelt flere dimensioner efter samme form	tal
Formel	kode for volumenformel	STD00137
Biovolumen	det beregnede biovolumen pr. celle/koloni etc. skal være i overensstemmelse med ovenfor	tal
Enhed	kode – SKAL altid angives i μm^3	STD00016
Standard error	i %	tal
Plasmavolumen	beregnet plasmavolumen, kun for diatomeer	tal
Enhed	μm^3	STD00016
Kulstofberegning	kode for faktor til omregning fra volumen til kulstofbiomasse	STD00143
Bemærkning	fx tentativt navn, dårlig fordeling i kammer	tekst

7 Oversigt over versionsændringer

Version	Dato	Emne:	Ændring:
2	18.06.2015	2.2.1 Udstyr til brug ved indsamling	Brug af pumpe- og slangesystem udskrevet, og vedr. vandhenter og fytoplanktonslange henvises til <i>TA M01 Prøvetagning i feltet: pelagiale målinger</i> .
2	18.06.2015	2.3.1 Prøvetagning og fremstilling af blandingsprøver	Brug af pumpe- og slangesystem udskrevet.
3	02.03.2016	2.2.2 Udstyr til brug i laboratorie	Mindste størrelse af sedimentationskammer øget til 10 ml.
3	02.03.2016	2.4.2.1 Sedimentation af prøver i sedimentationskammer	Valg af tællekammer er præciseret.
3	02.03.2016	2.4.2.2 Artsbestemmelse og optælling af fytoplanktonceller	Præcisering af antal celler og kolonier, der skal tælles.
4	07.04.2017	2.3.1 Prøvetagning og fremstilling af blandingsprøver	Klorofylmaksimum rettet til fluorescensmaksimum.
4	07.04.2017	2.3.2 Konservering og opbevaring af fytoplanktonprøver	Klorofylmaksimum rettet til fluorescensmaksimum.
4	07.04.2017	2.3.2.2 Konservering af prøver til epifluorescensmikroskopi	Procedure for konservering i enten 1 % glutaraldehyd eller 1 % formalin præciseret.
4	07.04.2017	3.2.3 Kulstofbiomasse pr. individ og pr. liter beregnes	Beregning af plasma-volumen af en diatome er bragt i overensstemmelse med revision af <i>6.4 Geometriske formler</i> . Ny figur 3 indsat.

4	07.04.2017	6.1 Kemikalier	Fremstilling af brugsopløsninger af glutaraldehyd og formalin beskrevet, hhv. <i>6.1.2 Glutaraldehydbrugsopløsning</i> og <i>6.1.3. Formalinbrugsopløsning</i> .
4	07.04.2017	6.1.2 Calcofluor	Ny afsnitsnummerring: <i>6.1.4 Calcofluor</i> .
4	07.04.2017	6.1.3 DAPI- og Acridin Orange-opløsninger	Ny afsnitsnummerring: <i>6.1.5 DAPI- og Acridin Orange-opløsninger</i> .
4	07.04.2017	6.4 Geometriske formler	Geometriske formler revideret jf. STAND-CODE-liste 1050.