



Titel: Fytoplankton			
Dokumenttype: Teknisk anvisning	TA nr.: M09	Version: 1	Oprettet: 31.01.2015
Forfattere: Hans Henrik Jakobsen og Henrik Fossing	Gyldig fra: 31.01.2015		
	Sider: 30		
	Sidst ændret:		
TA henvisninger	M01 – M10		

0 Indhold

1 Indledning	1
2 Metode	2
2.1 Tid, sted og periode	2
2.2 Udstyr	2
2.2.1 Udstyr til brug ved indsamling	2
2.2.2 Udstyr til brug i laboratorie	3
2.3 Indsamlingsprocedure	4
2.3.1 Prøvetagning og fremstilling af blandingsprøver	4
2.3.2 Konservering og opbevaring af fytoplanktonprøver	4
2.4 Laboratorieprocedure	5
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	11
2.5 Vedligehold af instrumenter	11
2.6 Særlige forholdsregler - faldgruber	12
3 Databehandling	13
3.1 Tællestatistik	13
3.2 Beregninger	14
3.2.1 Fytoplanktonceller pr. liter	14
3.2.2 Biovolumen af fytoplankton	15
3.2.3 Kulstofbiomasse pr. individ og pr. liter beregnes	15
3.3 Data og koder	16
4 Kvalitetssikring	18
5 Referencer	19
6 Bilag	20
6.1 Kemikalier	20
6.1.1 Lugol-opløsning	20
6.1.2 Calcofluor	20
6.1.3 DAPI- og Acridin Orange-opløsninger	20
6.2 Almindelig bestemmelseslitteratur	21
6.3 Oversigt over vanskeligt bestemmelige arter	25
6.4 Geometriske formler	27
6.5 Parametre og koder	28
7 Oversigt over versionsændringer	30

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.

Udgået dokument
se senere version

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

Der skal vælges mellem følgende prøvetagningsudstyr (se også *TA M01 Prøvetagning i felten*)

- Vandhenter: Skånsom metode til indsamling af vandprøver i diskrete/adskilte vanddybder. Vandhenteren skal være rengjort – nye vandhenter syrevaskes og skylles grundigt inden brug. Ruttner- og Hjerteklap vandhenter må ikke anvendes.
- Pumpe og slangesystem: Anvendes til kontinuert indsamling af vandprøver (under langsom nedsækning) eller indsamling af vandprøver i diskrete/adskilte vanddybder (ved oppumpning af vand fra den pågældende dybde). Inden brug skal det dokumenteres, at pumpe- og slangesystemet kan indsamle vandprøver uden at påvirke hverken artssammensætningen eller celleantallet (se også *TA M01 Prøvetagning i felten*).
- Fytoplanktonslange: Skånsom metode til indsamling af integreret vandprøve fra vandsøjle. Der skal anvendes en ugiftig plastikslange (fx almindelig haveslange) med en indre diameter på 25 mm. Slangen tynges med et lod og lukkes med prop efter fyldning.

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 volumenet

Kemikalier (se 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 0,125 ml til 100 ml)
- tælleur
- 0,2 μm sortfarvet polycarbonatfiltere til epifluorescensmikroskopi
- støttefiltere, fx 65 μm celluloseacetatfiltere til at understøtte polycarbonatfilteret
- udstyr til vacuumfiltrering

Kemikalier (se 6.1):

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

2.3 Indsamlingsprocedure

2.3.1 Prøvetagning og fremstilling af blandingsprøver

Prøvetagningen kan udføres med vandhenter, pumpe og slangesystem 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 klorofylmaksimum, også en vandprøve i klorofylmaksimum til bestemmelse af dominerende arter.

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

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

Til en kvalitativ bestemmelse af fytoplanktonarterne i vandsøjlen indsamles fytoplankton ved et 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 klorofylmaksimum) skal der umiddelbart efter prøvetagningen udtages prøver til undersøgelse af fytoplankton samt andre prøver som beskrevet i *TA M01 Prøvetagning i felten*.

- 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 6.1) til en slutkoncentration på $\sim 2\%$ 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 $18\text{ }^{\circ}\text{C}$) og mikroskoperes/analyseres hurtigst muligt og senest 1 år efter prøvetagningen (se 2.4.2).

2.3.2.2 Konservering af prøver til epifluorescensmikroskopi

Blandingsprøven konserveres i

- 25 % kold glutaraldehyd til en slutkoncentration på $\sim 1\%$ glutaraldehyd (dvs. 2 ml 25 % glutaraldehyd pr. 50 ml blandingsprøve) ved brug af dispenser. Glutaraldehyden skal være frisk, dvs. benyttes inden for 1 år. Åbnede flasker skal opbevares i køleskab.

eller

- 5 % formalin til en slutkoncentration på $\sim 1,2\%$ formalin (dvs. 16 ml 5 % formalin pr. 50 ml blandingsprøve). Formaliner skal være mindre end 1 år gammel, da den bliver sur ved længere tids opbevaring.

De konserverede prøver skal opbevares mørkt og koldt ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) og mikroskoperes/analyseres hurtigst muligt og senest 14 dage efter prøvetagning (se 2.4.3).

2.3.2.3 Konservering af netprøver

Netprøverne konserveres ved tilsætning af Lugol-blanding (se 6.1), indtil prøven er lys og farvet svarende til ca. 1 ml Lugol-blanding/100 ml prøve. Den konserverede prøve opbevares mørkt og køligt (ikke over $18\text{ }^{\circ}\text{C}$).

De konserverede prøver skal opbevares mørkt og koldt (ikke over $18\text{ }^{\circ}\text{C}$) og mikroskoperes/analyseres hurtigst muligt og senest 1 år efter prøvetagningen (se 2.4.1).

2.4 Laboratorieprocedure

Laboratorieundersøgelserne 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 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.

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 2.1.3 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 1067¹, skal der rettes henvendelse om ny STANDAT-kode til STANDAT-sekretariatet ved DCE (se 3.3)

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		

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

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

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 stort til at mindst 500 celler kan optælles i hele kammeret (se 2.4.2.2).
- 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!
- Tællepladerne anses herefter under omvendt lysmikroskop (se næste afsnit).
- Tællingen skal være afsluttet senest 1 uge efter sedimentationen er afsluttet.

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

Hints:

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

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. Und-

gå 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 blandingsprøven 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 anvendt lysmikroskopi. Hvilke forstørrelser (objektiv og okular), der skal bruges ved mikroskoperingen, afhænger af celle størrelserne. Det angives i protokollen til tællingen, hvilket okular og objektiv der er brugt. Følgende kombinationer anbefales:

	Mikroplankton (>20 µm)			Nanoplankton (3-20 µm)		
	10x	16x	25x	40x	63x	32x
objektiv	10x	16x	25x	40x	63x	32x
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 gang, efter et forudbestemt mønster, således at én organisme kun tælles én gang, når flere baner tælles (*fig. 1A*).
- Optællingen af hver af de enkelte taksonomiske enheder må tidligst indstilles, når der inden for hvert niveau er optalt ≥ 50 individer i et helt antal diagonaler. Med andre ord, optællingen må ikke afbrydes 'midt i en bane', da individantallet pr. mm² af bundpladen skal kunne beregnes for at kunne relatere antallet til et volumen (se 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 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.

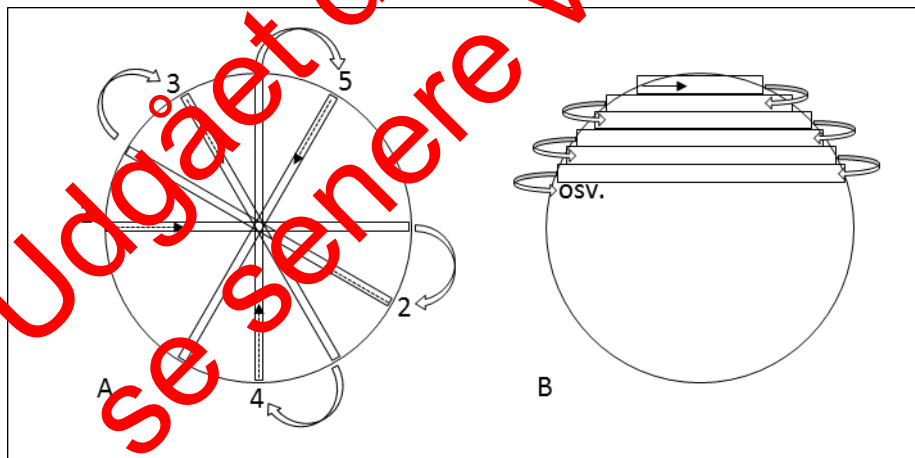
¹Som tommelfingerregel regnes de mest almindelige arter, som de arter der tilsammen skønnes at udgøre 90 % af den samlede fytoplanktonbiomasse.

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 3.2.1).

Artslisten bygger primært på netprøven og kan derfor 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 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 (blågrønalger), 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.

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*, *Gomphonema*). 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 (coenocier 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 3.2.2). Det kan være vanskeligt at fastslå, hvornår en art er almindeligt forekommende. 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 6.4).

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

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).

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 6.1) pr. 10 ml blandingsprøve eller
 - 5 µl Acridin Orange-opløsning (se 6.1) pr. ml blandingsprøve
- Efter 5 minutters farvereaktion filteres 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 vakuumpumpen 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 monteringen 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 taxonomiske 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 mdr. Prøver ældre en 1 år er stort set ubrugelige, da der løbende forgår nedbrydning af fytoplankton i prøven (HELCOM Combine 2014).

Udgået dokument
se senere version

3 Databehandling

3.1 Tællestatistik

Fytoplanktonceller ligger 'nogenlunde' jævnt/tilfældigt fordelt over hele sedimentationskammerets bund, når sedimentationen er udført korrekt (se 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:

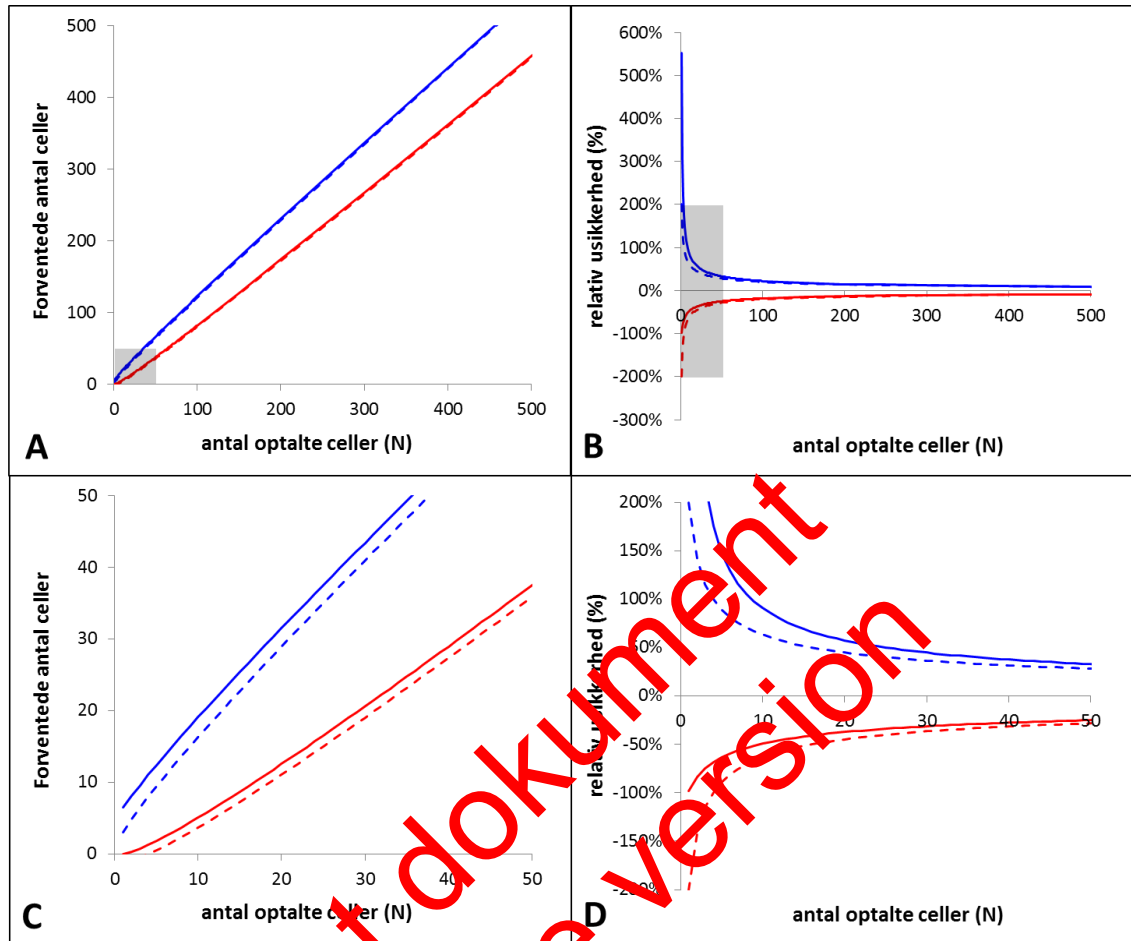
$$\text{usikkerhed (\%)} = \pm \frac{200}{\sqrt{N}}$$

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 tilnæret symmetrisk usikkerhedsgrænse (stiplet linje). A og C viser den absolute 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 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 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 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 fytoplanktonorganismerne 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.

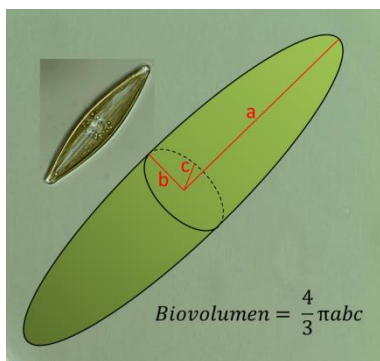
Diatoméer har en forholdsvis stor vakuole, hvor det er estimeret, at kun ca. 10 % af vakuolevolumenet repræsenterer vakuolens kulstofbiomasse, hvis vakuolevolumenet skal omregnes til kulstofbiomasse med samme kulstoffaktor, som anvendes for plasmavolumenet. Med god tilnærmelse kan

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

plasmavolumenet for diatoméer beregnes (modificeret efter Strathmann 1967):

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

En diatome, som vist på *fig. 3* med en vakuole omgivet af plasma af en tykkelse på d , har derfor plasmavolumenet $\frac{4}{3}\pi[abc - 0,9(a-d)(b-d)(c-d)]$.



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

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 *dataTA 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 til STANDAT-kode til

STANDAT-sekretariatet
DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi
Aarhus Universitet
Vejlsovej 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 STOQ 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'.

Udgået dokument
se senere version

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 (i.e. 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 cennantal 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 'tog' 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

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., Prague 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.

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. (1952) 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 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 blåviolet.

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.

6.1.3 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 of aquatic cyanobacteria. A photo guide and a synopsis of their toxicology. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. International Society of 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: 687 pp.

Hernández-Becerra, L.J., 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. Hälfte. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart: 2044 pp.

Kraberg, A., Baumann, M., Bürselen, 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: Achnanthaceae, 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). Zielonice – 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). Zielonice – 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 978-83-7326-875-2.

Popovsky, I. 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.

Snøeijs, 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.

Snøeijs, 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.

Snøeijls, 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.

Snøeijls, 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.

Snøeijls, 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.

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

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

Tikkanen, T., Wilén, T. 1992. Vassplanktonflora, Naturvårdsverket, Stockholm: 280 pp.

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

Wołowski K., Hincal 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 *table 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).

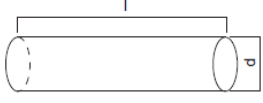
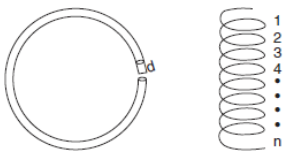
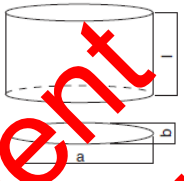
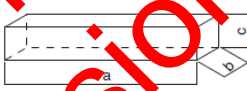
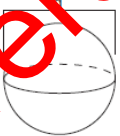
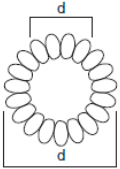
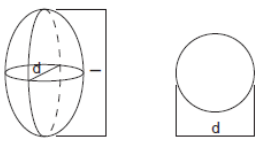
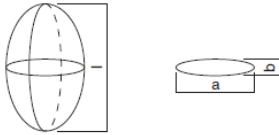
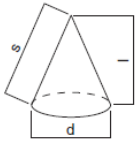
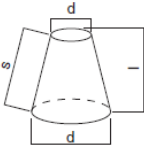
	Relativ sikker bestemmelse	Kun typiske individer kan bestemmes	Bemærkning
DIATOMEER			
Chaetoceros			
brevis		+	
constrictus		+	
danicus		+	
diadema		+	
socialis/radians		(+)	når individerne har sporer
Coscinodiscus			mange arter kræver skalpræparater
Skeletonema			
costatum		+	det kan være vanskeligt at adskille de 2 arter
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. vulgaris</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
Scripsiella			
trochoidea	+		
faeroense	+		
Scripsiella- gruppen	+		alle andre arter
Thecate dinofla- gellater			betegnelsen bruges kun, hvis det er 100 % sikkert, at arten er thecat
Athecate dinofla- gellater			betegnelsen bruges kun, hvis det er 100 % sikkert, at arten er athecat – eller angives de som dinoflagellater
Dinoflagellater spp., dvs. dinofla- gellater, der ikke kan bestemmes til slægt og hvor thec. ikke kan identificeres med sikkerhed			til denne gruppe anvendes samme kulstoffaktor som for athecate dinoflagellater

Udgået dokument
se senere version

6.4 Geometriske formler

<p>Cylinder m. cirkulært tværsnit: Volumen $V = \pi/4 \times d^2 \times l$ Overflade $O = \pi \times d \times (d/2 + l)$</p>	
<p>Skrueformer (cylinder m. cirkelformet omkreds): Volumen $V = \pi/4 \times d^2 \times \pi \times a \times n$ Overflade $O = \pi \times d \times (d/2 + \pi \times a) \times n$, n = antal skruer i tråd</p>	
<p>Cylinder m. elliptisk tværsnit: Volumen $V = \pi/4 \times a \times b \times l$ Overflade $O = \pi \times a \times b \times (a/2 \times b/2 + l)$</p>	
<p>Kasse: Volumen $V = a \times b \times c$ Overflade $O = 2(ab + ac + bc)$</p>	
<p>Kugle: Volumen $V = \pi/6 \times d^3$ Overflade $O = \pi \times d^2$</p>	
<p>Kuglekral (hul kugle): Volumen $V = \pi/6 \times (D^3 - d^3)$</p>	
<p>Rotationsellipsoide med cirkulært tværsnit: Volumen $V = \pi/6 \times l \times d^2$ Overflade $O = \pi \times l \times d$</p>	
<p>Rotationsellipsoide med elliptisk tværsnit: Volumen $V = \pi/6 \times l \times a \times b$ Overflade $O = \pi \times l \times \frac{1}{2}(a + b)$</p>	
<p>Kegle: Volumen $V = \pi/12 \times l \times d^2$ Overflade $O = \pi \times d/2 \times (d/2 + s)$</p>	
<p>Keglestub: Volumen $V = \pi/12 \times l \times (D^2 + d^2 + (D \times d))$ Overflade $O = \pi \times (D^2/4 + d^2/4 + s \times (D/2 + d/2))$</p>	

Udgæet dokument
se senere version

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 været problemer ved prøvetagningen	tekst
Gruppe 3 Planktonresultater		
Artskodenr.	STANDAT-kodenummeret	STD00135
Mnemokode-RURIN	fremgår af STANDAT-kodelisten	STD00135
Latinsk navn		tekst
Bestemmelsesikkerhed		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

Udgået dokument
se senere version

7 Oversigt over versionsændringer

Version	Dato	Emne:	Ændring:
1	31.01.2015		Første version.

Udgået dokument
se senere version