



Titel: Fytoplankton TA09			
Dokumenttype: Teknisk anvisning	TA nr.: M09	Version: 5	Oprettet: 31.01.2015
Forfattere: Hans Henrik Jakobsen og Per Andersen	Gyldig fra: 07.04.2017		
	Sider: 32		
	Sidst ændret: 19.04.2024		
TA-henvisninger	M01 - M10, samt DT03		

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 Laboratorieprocedure.....	6
	2.4.1 Artsbestemmelse i 'netprøven'.....	6
	2.4.3 Optælling og bestemmelse af autotrofe og heterotrofe nanoflagellater.....	13
	2.4.4 Identifikation af pladestruktur hos thekate dinoflagellater	13
	2.5 Vedligehold af instrumenter.....	14
	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.....	23
	6.1 Kemikalier.....	23
	6.1.1 Lugol's-opløsning (sur).....	23
	6.1.2 Glutaraldehyd-brugsopløsning.....	23
	6.1.3 DAPI.....	23
	6.1.4 Calcofluor.....	23
	6.1.5 Solophenyl Flavine.....	24
	6.2 Almindelig bestemmelseslitteratur.....	24
	6.3 Oversigt over vanskeligt bestemmelige arter.....	28
	6.4 Geometriske formler.....	30
7	Oversigt over versionsændringer.....	31

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 plankton.

Artssammensætningen af fytoplankton bruges til vurdering af omsætningen i det pelagiske system og dermed i tolkningen af bl.a. klorofyl-, ilt- og primærproduktionsdata samt til biodiversitetsanalyser og beskrivelser af invasive arters forekomst.

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 og primærproduktion (se *TA M01 Indsamling af vand- og planktonprøver 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 før solnedgang.

2.2 Udstyr

2.2.1 Udstyr til brug ved indsamling

Vandprøver til brug for fytoplanktonundersøgelse kan indsamles med vandhenter 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's-blanding
- 25 % glutaraldehyd, analyse-ren (skal ALTID opbevares i køleskab)

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 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 eller Solophenyl Flavine til farvning af theka hos dinoflagellater under epifluorescensmikroskopi
- DAPI til farvning af heterotrofe nanoflagellater under epifluorescensmikroskopi.

2.3 Indsamlingsprocedure

2.3.1 Prøvetagning og fremstilling af blandingsprøver

Prøvetagningen kan udføres med vandhenter eller fytoplanktonslange, som beskrevet i *TA M01 Indsamling af vand- og planktonprøver 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 planktonet 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 Indsamling af vand- og planktonprøver 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 Indsamling af vand- og planktonprøver 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 prøverne opbevares ved rumtemperatur og må ikke udsættes for frost!!

2.3.2.1 Konservering af prøver til omvendt mikroskopi

Blandingsprøven konserveres i en Lugol's-blanding (se afsnit 6.1) til en slutkoncentration på ~1 % Lugol's (dvs. 1 ml Lugol's-blanding pr. 100 ml blandingsprøve).

Brug engangshandsker ved arbejde med Lugol's!

De konserverede prøver skal opbevares mørkt og køligt 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 1 % glutaraldehyd (se afsnit 6.1), der præserverer plankton. Vær opmærksom på at konservering med glutaraldehyd kan give et uønsket baggrundsskær ved epifluorescensmikroskopi (Christaki et al. 2011; Sherr et al. 1993). Dette undgås ved at opbevare glutaraldehyden under køl (>5°C) og filtrer f.eks. gennem et 2µm sprøjte filter inden brug.

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.

Der findes ingen éntydige rapporter i litteraturen omkring holdbarhed af marint plankton konserveret i glutaraldehyd. 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 6 uger.

2.3.2.3 Konservering af netprøver

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

De konserverede prøver skal opbevares mørkt og køligt 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's-konserverede prøver)
- en optælling af autotrofe og heterotrofe nanoflagellater (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's-konserverede 'netprøve' overføres til objektglas 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.
- Alle registrerede arter og artsgrupper indberettes til MST. Arter, som kun registreres i netprøven, indberettes som kvalitativ registrering.

Til artsbestemmelsen benyttes 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 artsregistret som downloades fra VanDa's artregister (*dTA03 Fytoplankton og zooplankton*)

Er det kun muligt at bestemme en art til orden/funktionel gruppe, angives højest mulige taksonomiske niveau under ordensnavnet, eventuelt med note i bemærkninger om det mest sandsynlige slægts-/artsnavn.

En række thekate dinoflagellater kan kun artsbestemmes på baggrund af deres plademønster, hvilket er vanskeligt i Lugol's-konserverede prøver, hvis ikke de farves med Calcoflour (Lawrence & Triemer 1985) eller Solophenyl Flavine (Chomerat *m.fl.* 2017) og undersøges ved epifluorescensmikroskopi (se afsnit 2.4.3 og 6.1). Calcoflour virker fint, men hvis der ikke er adgang til UV-fluorescens belysning, men adgang til blå lys (488 nm), kan Solophenyl Flavin med fordel anvendes. Derudover har Solophenyl Flavin den fordel, at præparatet ikke bleges i nær samme grad som under UV-belysning.

Findes der i forbindelse med gennemgang af prøven nye arter, familier etc., eller anvendes en "ny" navngivning, som ikke optræder i artsregistret fra VanDa, skal der rettes henvendelse om oprettelse af arten til Stancode-sekretariatet ved DCE (se afsnit 3.3).

I afsnit 6.3 findes retningslinjer for bestemmelse af almindeligt forekommende vanskelige arter. For nogle arter (slægter) med stor variation i cellediameter samt ubestemte arter er det nødvendigt at opdele i størrelsesgrupper som vist i *tabel 1*. Tabellen er baseret på kodetabel SC1091. Det anbefales stærkt kun at anvende størrelsesklasserne angivet med fed skrift, og undgå de øvrige størrelsesklasser, som formodentligt vil forsvinde i en fremtidig revision af kodetabel SC1091. Omfatter en størrelsesgruppe flere ubestemte arter, angives kun slægtsnavnet.

Tabel 1. Størrelsesgrupper der skal anvendes for arter med stor variation i cellediameter. Se "Drop Down" menu i VanDa

SC1091	Størrelse (µm)	SC1091	Størrelse (µm)	SC1091	Størrelse (µm)
0	Ej oplyst	18	250 µm	37	30-50 µm
1	2-5 µm	19	300 µm	38	50-100 µm
2	5-10 µm	20	400 µm	39	> 10 µm
3	< 10 µm	21	500 µm	40	> 30 µm
4	10-15 µm	22	20 - 30 µm	41	< 20 µm
5	10-20 µm	23	30 - 40 µm	42	> 20 µm
6	15-20 µm	24	40 - 50 µm	43	< 30 µm
7	<20 µm	25	50 - 60 µm	44	> 50 µm
8	20-50 µm	26	50 - 75 µm	45	<500 µm
9	20-100 µm	27	75 - 100 µm	46	500-750 µm
10	50 µm	28	100 - 125 µm	47	>750 µm
11	75 µm	29	125 - 150 µm	48	750-1000 µm
12	<100 µm	30	150 - 250 µm	49	>1000 µm

SC1091	Størrelse (μm)	SC1091	Størrelse (μm)	SC1091	Størrelse (μm)
13	>100 μm	31	250 - 300 μm	50	300-2000 μm
14	100 μm	32	300 - 400 μm	51	100-200 μm
15	125 μm	33	400 - 500 μm	52	100-150 μm
16	150 μm	34	> 500 μm	53	150-200 μm
17	200 μm	35	0-2 μm	54	200-250 μm

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, så 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 et stort kammer til større arter i lave koncentrationer og et lille kammer til mindre arter i store koncentrationer anbefales.
- Prøver indsamlet på stationer i åbent hav tælles altid i 50 ml sedimentationskamre og kan suppleres med andre passende sedimentationskamre. Som udgangspunkt skal prøver indsamlet i fjorde i perioden uden for de sæsonbetingede algeopblomstringsperioder tælles i 50, 25 eller i 10 ml sedimentationskamre. Sedimentationskamre med 10 ml kan være tilstrækkeligt under algeopblomstringer i fjorde, og 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 special-dækglas 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's, kan farven (jodet) reduceres ved tilsætning af små mængder af natriumthiosulfat før sedimentationen startes.

Table 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 der grundigt med varmt vand for at undgå forurening af de efterfølgende prøver. Brug evt. iblødsætning i blidt detergent (uden slibemidler). Vær opmærksom på ikke at ridse sedimentationskammeret ved rengøringen. Undgå udtørring, da fytoplanktonceller 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 fytoplanktonceller 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 taksonomiske 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, men det skal altid tilstræbes at anvende forstørrelser, der tillader højest mulige taksonomisk identifikation. Bemærk, at

kombination mellem okular og objektiver er afhængig af mikroskopets fabrikat.

Følgende kombinationer anbefales:

	Mikroplankton (>20µm)			Nanoplankton (3-20 µm)			
objektiv	10X	16X	25X	32X	63X	40X	*100X
okular	10-16	10-16	10-16	10-16	10-16	10-25	*10-25

*gælder for arbejde med fluorescensmikroskopi

- Fytoplankton bestemmes til nærmeste taksonomiske niveau (fx art, slægt, familie osv.) og optælles.
- Først tælles de arter, der skønnes at forekomme hyppigst, i hele diagonale baner, én af gangen, efter et forudbestemt mønster, så 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 hver 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. mm² bundplade 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, så én organisme kun tælles én gang. Optællingen må tidligst afsluttes, når det samlede antal celler og kolonier/cellekæder optalt overstiger 500.

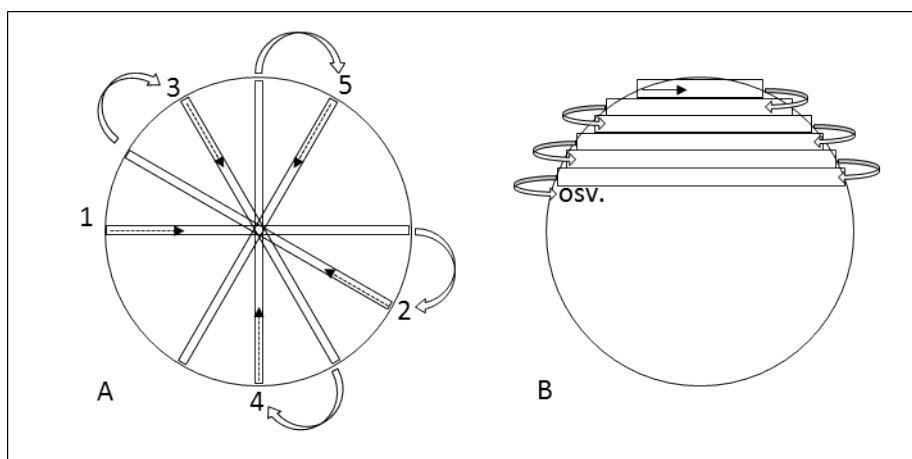
Det kan være vanskeligt at fastslå, hvornår en art er almindeligt forekommende. Som tommelfingerregel regnes de mest almindelige arter som de arter, der tilsammen udgør 90 % af den samlede fytoplanktonbiomasse. Mindre arter, som udgør en mindre del af biomassen, bør om muligt optælles til minimum 50 celler.

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 hyppigt i blandingsprøven. Disse arter skal også indberettes i VanDa ved at angive 'Artsregistrering' i feltet 'Metode til volumenbestemmelse'.

Det vil ofte forekomme, at nogle store arter som fx *Ceratium*, *Coscinodiscus* og *Noctiluca*, 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, selvom 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 (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. 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 f.eks. 10 *Skeletonema*-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). I artsregistret fra VanDa 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).

For arter, der optræder i lavt antal, dvs. arter, der ikke er almindeligt forekommende, kan der anvendes standardstørrelser for enkeltceller, baseret på historiske målinger. Denne artsliste med tilgængelige standardstørrelser rekvireres fra MST. Hvis der observeres en art, der ikke er almindeligt forekommende, men som ikke findes på listen, opmåles denne, og målingerne vil over tid kunne bidrage til fastlæggelse af en standard mellemstørrelse for den pågældende art. Artlisten er udarbejdet på historiske data, hvor cellestørrelsen er beregnet på grundlag af enkeltceller. Det betyder, at listen over standardstørrelser ikke må anvendes i tilfælde af kolonier/kædedannede arter, da de historiske data ikke har været konsekvent opmålt.

Det er vigtigt, at alle arter tilknyttes et biovolumen, da marine prøver er karakteriseret ved, at mange arter findes i lave koncentrationer, som tilsammen kan udgøre en betydelig biomasse.

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 glutaraldehydkonserverede blandingsprøve.
- Prøven farves med tilsætning af
 - 8 dråber DAPI-opløsning (se afsnit 6.1) pr. 10 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 UV lys (355-425 nm) sammen med et passende filter, der er tilpasset mikroskopering med DAPI farvede præparater. Der kan være marginale forskelle mellem mikroskopfabrikanternes filtre, og det anbefales at afsøge dette hos leverandøren.
- Autotrofe picoalger tælles med blå lys (455-500 nm), der 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.
- Autofluorescens er skrøbelig og bør tælles hurtigst muligt efter prøvetagning (< 14 dage).

2.4.4 Identifikation af pladestruktur hos thekate dinoflagellater

Denne procedure gennemføres ved brug af epifluorescensmikroskopi.

- Der udtages 5-10 ml af den Lugol's fikserede netprøve, som filtreres ned på et 0,2 µm sortfarvet polycarbonatfilter. Vakuumtrykket må ikke overstige 30 cm Hg.
- Når prøven lige akkurat er filtreret gennem filteret, og der står en smule prøve tilbage over filteret, stoppes pumpen. Prøven må ikke tørre ud! Prøven farves med tilsætning af enten

- 8 dråber calcoflour-opløsning (se afsnit 6.1) pr. 10 ml blandingsprøve, hvis observationen foretages i et epifluorescensmikroskopi med UV-belysning. Alternativt kan et godt resultat opnås ved at placere en dråbe prøve på et objektglas, dække den med et dækglas og derefter tilsættes en dråbe Calcoflour-opløsning til den ene side af dækglasset og en dråbe NaOH (af tilpas koncentration til neutralisering af pH) til den anden side.
- Tilsæt en dråbe Solophenyl Flavin-opløsning sammen med en dråbe af en mættet NaHCO₃ opløsning (se afsnit 6.1) pr. 10 ml blandingsprøve, hvis observationen foretages i et epifluorescensmikroskopi med blått lys (488 nm).
- Filteret tages af holderen, mens vakuum stadig er på, og monteres på objektglas ved brug af ikke-fluorescerende immersionsolie.

2.5 Vedligehold af instrumenter

Udover almindeligt vedligehold er der ingen instrumenter, der kræver særlig opmærksomhed i denne TA (se også *TA M01 Indsamling af vand- og planktonprøver 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's-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 2023). Arbejdet med epifluorescensmikroskop kræver en smule tilvænning, og det anbefales for den uøvede at træne et par gange med prøver der ikke skal anvendes i overvågningen.

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:

$$N - n_{ln} \leq N \leq N + n_h$$

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

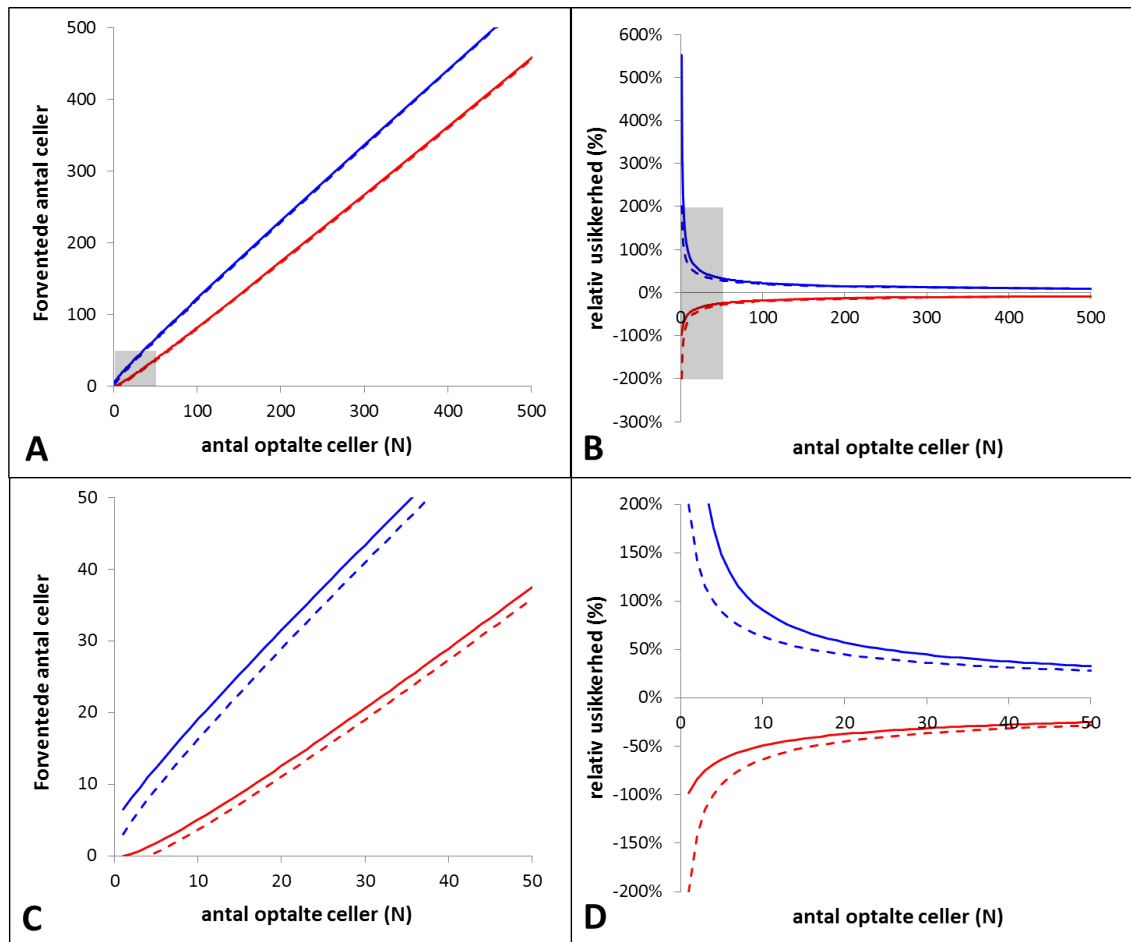
$$U(\%) = \pm \frac{200}{\sqrt{N}}$$

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'/korder, 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 artsregistret fra VanDa 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 artsregistret fra VanDa. For de arter, hvor der ikke findes volumenformler baseret på tværfurebredden alene, beregnes volumen som summen af volumener, som angivet i VanDa's artsarkiv.

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.:

$$C_b = c \cdot P_v$$

c varierer med få undtagelser mellem 0,11 og 0,13 afhængig af art (se kulstoffaktor i artsregistret fra VanDa).

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

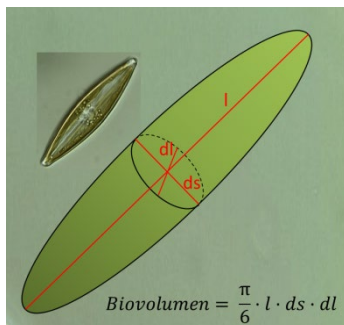
Bortset fra diatoméer, svarer plasmavolumenet hos alle fytoplanktonorganismer med god tilnærmelse til biovolumenet.

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):

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

F.eks. 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 VanDa fremgår af den datatekniske anvisninger (dTA) *DT03 Fytoplankton og zooplankton* hvor den tilknyttede kvalitetssikring er beskrevet.

Hvis der i prøverne findes nye arter, familier etc., eller anvendes en (ny) navngivning, som ikke fremgår af artsregistret i VanDa, skal der rettes henvendelse om oprettelse til Miljøstyrelsen.

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)

Miljøstyrelsen videregiver informationen til [Standcodesekretariatet](http://standcodesekretariatet), hvor nomenklaturen tjekkes og godkendes af en fagspecialist ved DCE, som tildeler et artsnummer samt StandCode kode, og arten kan oprettes i VanDa's artregister.

Enkelte specielle artsangivelser, som fx *Chaetoceros* sp. A, er ikke mere tilfaldt og der kan ikke tilknyttes kommentarer til usikkerheden på bestemmelsen af en art i VanDa. I *Bilag 6.3* 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 indberettes som 'Artsregistrering' hvorved angivelse af antal står blank i data.

4 Kvalitetssikring

Kvaliteten af fytoplanktonundersøgelserne inden indtastningen til VanDa sikres ved:

- at metodeforskrifter overholdes, såsom at antallet af individer er overholdt, den korrekte navngivning af arter er foretaget, korrekte kemikalier og koncentrationer er anvendt.
- kontrol af primærdata, herunder sikre, at enheder og artsnavne er korrekte.
- vurdering af validiteten af beregnete resultater
- Jævnlig deltagelse i workshop og interkalibrering.

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

Chomerat, N., C.M.I. Gatti, E. Nezan & M. Chinain (2017). Studies on the benthic genus *Sinophysis* (Dinophysales, Dinophyceae) II. *S. canaliculata* from Rapa Island (French Polynesia). *Phycologia* 56(2): 193-203.

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 (2023) 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.

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 epi-fluorescence 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's-opløsning (sur)

- 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 °C) og anvendes indenfor 6 måneder.
- Brugsopløsningen filtreres gennem et 0,2 µm 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 DAPI

- Fremstil en 0,1 % stamopløsning ved at opløse 1 mg DAPI pulver i 1 mL. Hvis kemikallet f.eks. kommer i en 10 µg ampul kan der fremstilles 10 mL stock. Det anbefales at konsultere den specifikke fabrikkants hjemmeside for uddybende beskrivelse. Stockopløsningen gemmes i mørke i køleskab, hvor holdbarheden er >6 måneder.
- Præparatet observeres i epifluorescensmikroskop under UV lys (UV eksitationsfilter, typisk i 355-425 nm området), hvor DNA vil fluorescere blå under et 450 – 500 nm emissionsfilter.

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's-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.

6.1.5 Solophenyl Flavine

- Fremstil en 0,1 % stock-opløsning ved at opløse 100 µg Solophenyl Flavine i 100 mL demineraliseret vand
- Præparatet observeres i epifluorescensmikroskop under blått lys (blåt eksitationsfilter, typisk i 440 nm – 490 nm området), hvor cellulose vil fluorescere grønligt under et 535 nm emissionsfilter.

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.

Komarek, J., Fott, B., 1983. Chlorophyceae (Grünalgen), Ordnung: Chlorococcales. In: Huber-Pestalozzi, G. (Ed.). Das Phytoplankton des Süßwassers. Systematik und Biologie. 7. Teil 7, 1. Häfte. 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.

Snøeijls, 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.

Snøeijls, 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.

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 et specifikt taxon, 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 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 artsregistret fra VanDa ved en liste over de til gruppen tilhørende arter adskilt med en / eller samlet under en gruppebetegnelse (fx *delicatissima*-gruppen, *Scrippsiella*-gruppen).

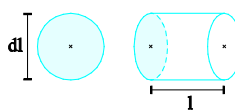
	Relativ sikker bestemmelse	Kun typiske individer kan bestemmes	Bemærkning
DIATOMEER			
Chaetoceros			
brevis		+	
constrictus		+	
socialis/radians		(+)	når individerne har sporer
Coscinodiscus			mange arter kræver skalpræparater
Skeletonema			det er ikke muligt at adskille de 3 arter – så i praksis kan anvendes Skeletonema
costatum		+	
subsalsum		+	
marinoi		+	
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			forvekslingsmuligheder i brakvand med <i>Diatoma elongatum</i> og <i>D. vulgaris</i>
nitzschioides	+		

	Relativ sikker bestemmelse	Kun typiske individer kan bestemmes	Bemærkning
DINOFLAGELLATER			
Ceratium			
macroceros	+		vær opmærksom på lighed med <i>C. tricoceros</i>
Diplopsalis-gruppen			kan ikke artsbestemmes uden detaljerede studier fx ved anvendelse af calco-fluor farvning
Heterocapsa rotundatum/ Heterocapsa minima	+	som gruppe	kan ikke skelnes på artsniveau uden calcofluorfarvning
Scrippsiella			
trochoidea	+		
faeroense	+		
Scrippsiella-gruppen	+		alle andre arter
Thekate dinoflagellater			betegnelsen bruges kun, hvis det er 100 % sikkert, at arten er thekat
Athekate dinoflagellater			betegnelsen bruges kun, hvis det er 100 % sikkert, at arten er athekat – ellers angives de som dinoflagellater
Dinoflagellater, dvs. dinoflagellater, der ikke kan bestemmes til slægt, og hvor theka ikke kan identificeres med sikkerhed			til denne gruppe anvendes samme kulstoffaktor som for athekate dinoflagellater

6.4 Geometriske formler

Cylinder

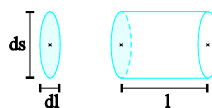
Volumen: $\pi/4 \cdot dl^2 \cdot l$



Cylinder med elliptisk tværsnit

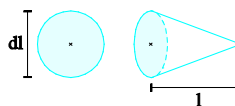
med elliptisk tværsnit

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



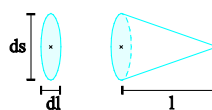
Kegle

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



Elliptisk kegle

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



Keglestub

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

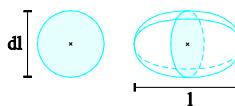
Kugle

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



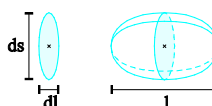
Rotationsellipsoide

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



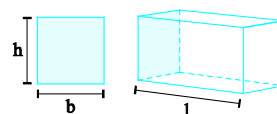
Rotationsellipsoide med elliptisk tværsnit

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



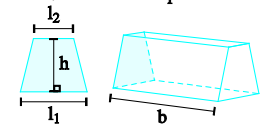
Parallelepiped

Volumen: $l \cdot b \cdot h$



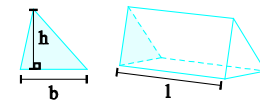
Trapezoid

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



Tresidet prisme

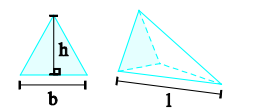
Volumen: $1/2 \cdot l \cdot b \cdot h$



Tetraeder

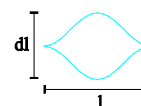
(pyramide med trekantet formet basis)

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



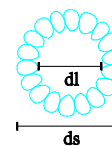
Spindelform

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



Kugleskal

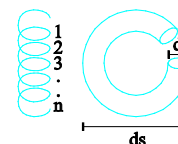
Volumen: $\pi/6 \cdot (ds^3 - dl^3)$



Skrueformer

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

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



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 felten: 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 6.4 <i>Geometriske formler.</i> Ny figur 3 indsat.

4	07.04.2017	6.1 Kemikalier	Fremstilling af brugsopløsninger af glutaraldehyd og formalin beskrevet, hhv. 6.1.2 <i>Glutaraldehyd-brugsopløsning</i> og 6.1.3. <i>Formalin-brugsopløsning</i> .
4	07.04.2017	6.1.2 Calcofluor	Ny afsnitsnummerering: 6.1.3 <i>Calcofluor</i> .
4	07.04.2017	6.1.3 DAPI- og Acridin Orange-opløsninger	Ny afsnitsnummerering: 6.1.4 <i>DAPI- og Acridin Orange-opløsninger</i> .
4	07.04.2017	6.4 Geometriske formler	Geometriske formler revideret jf. STANDCODE-liste 1050.
5	11.04.2024	generelt	TA09 er opdateret i forhold til overgangen til VanDa
5	11.04.2024	2.4 Laboratorieprocedure	Anvendelsen af formalin er fjernet
5	11.04.2024	2.4.2.1 Sedimentation af prøver i sedimentationskammer	Det tillades at anvende 10 ml sedimentationskammer i fjorde i perioden uden for de sæsonbetingede algeopblomstringsperioder
5	11.04.2024	Appendiks 6.5 Parameter og koder	Appendiks er fjernet og bør findes i datateknisk TA for fytoplankton
5	11.04.2024	6.3 Oversigt over vanskeligt bestemmelige arter	Tabellen er opdateret
5	11.04.2024	2.4.4 Afsnit om identifikation af pladestruktur hos thekate dinoflagellater	Metode er specificeret og der er tilføjet en alternativ farvning af cellulose strukturer