

WERKVOORSCHRIFT 7B ANALYSE VAN FYTOPLANKTON IN OPPERVLAKTEWATER

7B.1 Doel en toepassingsgebied

Dit werkvoorschrift heeft betrekking op fytoplankton uit zoete tot brakke, stilstaande en stromende wateren. Het bevat richtlijnen voor het analyseren van fytoplanktonmonsters en het verwerken van de verzamelde gegevens en de vastlegging van metagegevens. Ten slotte geeft het adviezen voor de kwaliteitszorg voor deze analyse.

De beschreven methode is bedoeld voor de volgende toepassingen:

- beoordeling ecologische toestand volgens de KRW-maatlat (Evers & Knobens 2007, Evers *et al.* 2012, Van der Molen & Pot 2007a en 2007b, Van der Molen *et al.* 2012);
- beoordeling ecologische kwaliteit volgens EBeo (STOWA 2006).

Opmerking

Dit werkvoorschrift is niet van toepassing op zogenaamde quick scan analyses van blauwalgen voor vaststelling van de zwemwaterkwaliteit.

7B.2 Beginsel

Uit een goed gemengd, Lugolgeconserveerd monster van oppervlaktewater neemt men een deelmonster van een bekend volume. Dit deelmonster brengt men over in een sedimentatiecuvet. Na bezinking telt en determineert men de chlorofyl-a bevattende algen met behulp van een omgekeerd microscoop. Hierbij noteert men het aantal waarnemingen en het aantal cellen per onderscheiden taxon. Bij draden en kolonies waarvan het aantal cellen moeilijk precies te tellen is, maakt men een zo goed mogelijke schatting van het aantal cellen. Tenslotte berekent men voor elk taxon de dichtheid in cellen per milliliter monster, uit het getelde aantal cellen, het onderzochte deel van het cuvet en het volume van het deelmonster.

7B.3 Normen

Onderdelen van dit voorschrift zijn gebaseerd op de volgende normen:

NEN-EN 14996:2006

Water quality - Guidance on assuring the quality of biological and ecological assessments in the aquatic environment (Richtlijn voor de kwaliteitsborging van biologische en ecologische beoordelingen in het aquatische milieu) - juni 2006.

NEN-EN 15204:2006

Water quality - Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy (Utermöhl technique) (Richtlijn voor het tellen van fytoplankton met behulp van omgekeerde microscopie (Utermöhl-techniek)) - september 2006.

Verder is rekening gehouden met het volgende voorstel voor een norm:

N108:2008/03/30

Water quality - Phytoplankton biovolume determination by microscopic measurement of cell dimensions (draft proposal for CEN/TC 230) - maart 2008.

7B.4 Termen en definities

De in dit voorschrift gebruikte termen en definities zijn verklaard in [bijlage 1](#). Zie ook de normbladen NEN-EN 14996 en NEN-EN 15204.

7B.5 Chemicaliën

Voor het microscopisch analyseren van monsters heeft men de volgende chemicaliën nodig:

- a immersie-olie: middelmatig visceuze olie voor olie-immersie-objectieven zonder PCB's of epoxyhars (voor toelichting zie [bijlage 12](#));
- b verdunningsvloeistof: leidingwater waaraan Lugol is toegevoegd met eenzelfde dosering als bij fytoplanktonmonsters (voor bereiding zie [bijlage 12](#)).

7B.6 Apparatuur en hulpmiddelen

Voor het microscopisch analyseren van monsters heeft men de onderstaande apparaten en hulpmiddelen nodig:

- a omkeermicroscop: zie [bijlage 16](#);
- b pipettips: voor gebruik met onderstaande volumepipetten en met een zodanig afgesneden tip dat de opening een diameter heeft van ca. 3 mm (zie [bijlage 14](#));
- c sedimentatiecuvet: met een bodemdikte van 0,15-0,17 mm; zie [bijlage 17](#));
- d volumepipetten: om volumina te kunnen pipetteren van 0,2 tot 5,0 ml of meer (afhankelijk van cuvette type), met een bekende afwijking.

Alleen voor het concentreren van monsters:

- e bovenweger: met een weegvermogen tot minimaal 2000 gram en een afwijking van $\pm 0,1$ gram
- f maatcilinder: van 1 liter met een maatstreepverdeling van 10 ml
- g monsterflesjes: van 50 ml of 100 ml inhoud, met een dop en inlay die een waterdichte en gasdichte afsluiting waarborgen en bij voorkeur van bruin glas.

7B.7 Voorbehandeling

Acclimatisatie

- 1 Zorg dat het monster, de verdunningsvloeistof en de sedimentatiecuvetten op gelijke temperatuur zijn. Dit bevordert een gelijkmatige verdeling van deeltjes over de cuvetbodem en voorkomt condensvorming op het dekglas. In de praktijk is kamertemperatuur het gemakkelijkst.
- 2 Neem het monster minimaal één dag vóór het inzetten uit de koeling en zet het weg bij kamertemperatuur, bij voorkeur in een donkere kast.
- 3 Zet monsters bij voorkeur niet langer dan een week buiten de koeling.

Homogenisatie

Voor men een deelmonster neemt moet het monster zo goed geschud zijn dat alle algen en andere deeltjes van de flesbodem zijn losgekomen en volledig gemengd zijn. Alleen dan kan men een representatief deelmonster onttrekken.

- 1 Schud het monster gedurende minimaal dertig seconden op drie verschillende wijzen (zie [bijlage 13](#)).

Tip

Vierkante monsterflessen en de opeenvolgende schudbewegingen voorkomen het ontstaan van een kolk, die leidt tot een onvolledige menging van deeltjes.

Verdunning

Verdun het deelmonster als het pipetteren van 0,2 ml per cm² cuvetbodemoppervlak leidt tot een dichtheid van meer dan veertig te tellen algen per beeldveld. Verdun een deelmonster op de volgende wijze.

- 1 Doe 1 ml van het gehomogeniseerde monster in een reageerbuis;
- 2 Voeg hieraan 4 ml (vijf keer verdund) of 9 ml (tien keer verdund) verdunningsvloeistof toe;

- 3 Sluit de reageerbuis af met parafilm en meng de vloeistof goed;
- 4 Noteer de verdunningsfactor achter het monsternummer in het labjournaal of in het databestand van metagegevens.

Let op

We bevelen aan om een deelmonster te verdunnen en niet het gehele monster.

Opmerking

In plaats van vijf of tien keer verdunnen, kan men naar behoefte ook een andere verdunning maken. Bepaal voor een andere verdunning de verdunningsfactor, $F_{\text{verdunning}}$, uit de verhouding tussen het volume gepipetteerd deelmonster, $V_{\text{deelmonster}}$, en het totale volume na verdunning in de buis, $V_{\text{deelmonster}} + V_{\text{verdunningsvloeistof}}$:

$$F_{\text{verdunning}} = V_{\text{deelmonster}} / (V_{\text{deelmonster}} + V_{\text{verdunningsvloeistof}})$$

Concentratie

Concentreer het monster als het volledig afvullen van het sedimentatiecuvet met een deelmonster, leidt tot gemiddeld minder dan twee algen per beeldveld. Als het monster veel andere deeltjes bevat (detritus, slib), is concentreren niet of slechts in beperkte mate mogelijk. Concentreer het monster volgens één van onderstaande twee werkwijzen.

A Met behulp van een maatcilinder:

- 1 bepaal het beginvolume van het monster, V_{begin} , met behulp van een maatcilinder en noteer dit op het etiket van de fles en in het labjournaal of databestand van metagegevens;
- 2 giet het monster terug in de monsterfles en zet deze weg op een trillingsvrije plaats in het donker, gedurende minimaal vier uur per centimeter waterkolomhoogte in de fles (dus minimaal vier dagen bij een literfles van twintig centimeter hoog);
- 3 draai de fles dagelijks een kwartslag met een kort rukje maar zonder hem op te tillen, om eventueel aan de wand hechtende algen weer los te maken;
- 4 hevel of zuig de bovenstaande vloeistof af tot op ca. 5 cm boven de bodem van de fles;
- 5 homogeniseer het residu in de monsterfles en het bepaal het eindvolume van het monster, V_{eind} , met een maatcilinder; noteer dit volume op het etiket van de fles en in het labjournaal of databestand van metagegevens;
- 6 bepaal de concentratiefactor, $F_{\text{concentratie}}$, uit de verhouding tussen het beginvolume vóór afheveling, V_{begin} , en het eindvolume na afheveling, V_{eind} :

$$F_{\text{concentratie}} = V_{\text{begin}} / V_{\text{eind}}$$

B Met behulp van een bovenweger:

- 1 zet het monster in de monsterfles weg op een trillingsvrije plaats in het donker, gedurende minimaal vier uur per centimeter waterkolomhoogte in de fles (dus minimaal vier dagen bij een literfles van twintig centimeter hoog);
- 2 draai de fles dagelijks een kwartslag met een kort rukje maar zonder hem op te tillen, om eventueel aan de wand hechtende algen weer los te maken;
- 3 zet de fles zonder dop voorzichtig op een bovenweger en noteer het gewicht, G_{begin} , in het labjournaal of databestand van metagegevens;
- 4 laat de fles op de bovenweger staan en hevel of zuig de bovenstaande vloeistof af tot op ca. 5 cm boven de bodem van de fles;

- 5 noteer het gewicht na afheveling, G_{eind} , in het labjournaal of databestand van metagegevens (dus het gewicht van fles zonder dop met het geconcentreerde monster);
- 6 homogeniseer het geconcentreerde monster en giet het over in een kleiner monsterflesje;
- 7 zet de lege, oorspronkelijke monsterfles zonder dop op de bovenweger en noteer het gewicht, G_{fles} ;
- 8 bepaal de concentratiefactor, $F_{\text{concentratie}}$, uit de verhouding tussen het gewicht vóór afheveling, G_{begin} , en het gewicht na afheveling, G_{eind} , beide verminderd met het gewicht van de lege fles, G_{fles} :

$$F_{\text{concentratie}} = (G_{\text{begin}} - G_{\text{fles}}) / (G_{\text{eind}} - G_{\text{fles}});$$

- 9 noteer de concentratiefactor op het etiket van het kleine monsterflesje en in het labjournaal of databestand van metagegevens.

Let op

We raden aan om het gehele monster te concentreren en niet een deelmonster.

7B.8 Inzetten

- 1 Etiket teer het cuvet met gegevens van het monster.
- 2 Breng in het cuvet zoveel verdunningsvloeistof aan dat het cuvet met het te pipetteren deelmonster geheel zal worden afgevuld.
- 3 Homogeniseer het monster in de monsterfles.
- 4 Neem direct daarna met een volumepipet een toereikende¹ hoeveelheid deelmonster uit de monsterfles en breng dit over in het cuvet.
- 5 Dek het cuvet af met een dekglasje en zorg ervoor dat geen luchtbellen onder het dekglas gevangen blijven.
- 6 Zet het cuvet voor sedimentatie weg op een trillings- en tochtvrije plaats bij kamertemperatuur, gedurende minimaal vier uur per centimeter cuvethoogte.

Tip

Maak gebruik van temperatuurgeïsoleerde sedimentatieruimten wanneer gedurende een etmaal temperatuurschommelingen optreden van meer dan 2 °C (bijvoorbeeld met tempex beklede kistjes).

Tip

Zet de cuvetten aan het eind van de dag in voor analyse op de volgende dag. Dan kan sedimentatie overnacht plaatsvinden.

Opmerking

Kleine kolonies van sommige algen kunnen ook na vier uur sedimentatie door het cuvet gaan bewegen, op het moment dat de microscoop lamp wordt aangezet. Dit verschijnsel lijkt zich vooral voor te doen in monsters uit zwak brakke tot brakke wateren. Een volledige afvulling van het cuvet en afdekking van het cuvet met een glasplaatje kunnen dit enigszins verminderen, maar een nauwkeurige telling is onder deze omstandigheden vaak niet goed mogelijk. Maak in dit geval een zo goed mogelijke schatting en geef in de resultaten aan dat de aantallen van de betreffende algensoorten geschat zijn in verband met 'drift'.

¹ Toereikend is een hoeveelheid groter dan 0,2 ml per cm² cuvetbodem, die een werkbare dichtheid van deeltjes op de cuvetbodem geeft. Werkbaar is een gemiddelde dichtheid tussen omstreeks twee en veertig deeltjes per beeldveld. Optimaal is een dichtheid tussen tien en twintig deeltjes per beeldveld (met deeltjes bedoelen wij algen, slibdeeltjes, detritus e.d.).

7B.9 Bepaling

Telstrategie

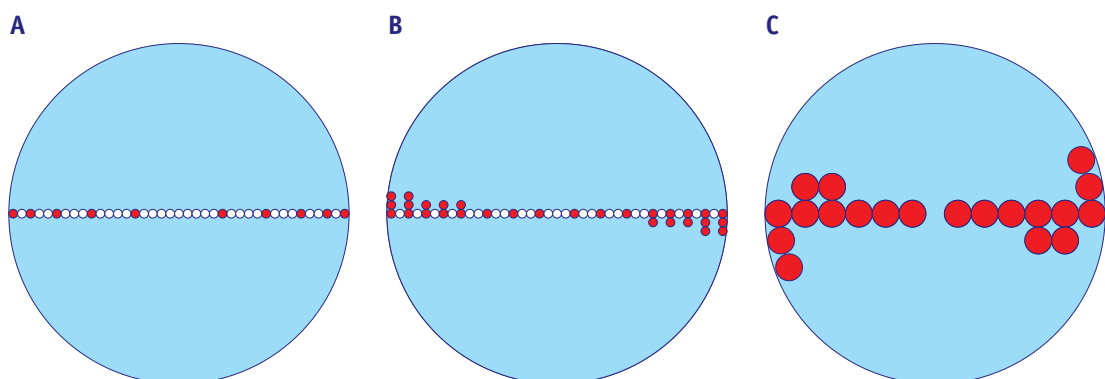
De telstrategie die wij in dit werkvoorschrift beschrijven is effectief voor een representatieve beschrijving van de soortensamenstelling (inclusief de soorten die relatief schaars zijn maar veel bijdragen aan het chlorofyl-a-gehalte). De achtergrond van deze strategie en de betrouwbaarheid van de abundantiebepaling staan in [bijlage 18](#).

Werkwijze

- 1 Kijk voor de telling met een zwakke vergroting het cuvet door om te zien of de algen gelijkmatig (volgens toeval) verdeeld zijn over de cuvetbodem. Is de verdeling ongelijkmatig (bijvoorbeeld een ophoping van algen langs de rand, in het centrum, of aan één kant van het cuvet), dan moet het monster opnieuw worden ingezet.
- 2 Tel alleen fototrofe en mixotrofe algen (algen in bezit van chlorofyl-a).
- 3 Noteer bij de telling het aantal waarnemingen en het aantal cellen per waarneming en vermijd het tellen van individuen² (zie [paragraaf 7.3.3](#)).
- 4 Verdeel de telling over drie fasen, die elk uit één of meer stappen kunnen bestaan (zie [tabel 7B.1](#)). De fasen en stappen verschillen in de sterkte van de gebruikte vergroting en de grootte van het onderzochte volume.
- 5 Verzamel per stap minimaal tien waarnemingen van de meest talrijke soort. Soorten waarvan voldoende waarnemingen zijn verzameld, of die te klein zijn om bij een zwakkere vergroting te kunnen zien, hoeven niet meer te worden geteld in een volgende stap.
- 6a Bij gebruik van een rechthoekig cuvet: tel random beeldvelden.
- 6b Bij gebruik van een rond cuvet: tel beeldvelden in segmenten (taartpunten) van het cuvet, waarbij de beeldvelden verdeeld worden over twee tegenover elkaar liggende taartpunten (zie [figuur 7B.1](#)).
- 7 Neem bij de telling de hieronder gemaakte opmerkingen 1 t/m 7 ter harte.

Fig 7B.1 Vaste keuze van te onderzoeken beeldvelden

Vaste keuze van te onderzoeken beeldvelden verdeeld over twee tegenover elkaar liggende taartpunten; de rood gekleurde beeldvelden worden onderzocht: A) vergroting 600x; twee keer vijf beeldvelden worden onderzocht, B) vergroting 600x; twee keer vijftien beeldvelden worden onderzocht, C) vergroting 200x; twee keer tien beeldvelden worden onderzocht. De schets met beeldvelden is gebaseerd op het werken met ronde cuvetten met een inwendige diameter van 1,25 cm, bij vergrotingen van 200x en 600x.



² Het tellen van individuen is een vorm van gegevensverwerking tijdens de gegevensvererving, die leidt tot informatieverlies, onvergelijkbare resultaten en minder interpretatiemogelijkheden.

Tabel 7B.1 Telstrategie voor bepaling soortensamenstelling en abundantie

FASE	OMSCHRIJVING	WERKWIJZE
1	Soortenlijst	Stel een soortenlijst op door globale scanning van het cuvet bij een sterke en een zwakke vergroting, bij voorkeur 200× en 600×.
2	Telling van relatief talrijke, veelal kleine soorten	Gebruik hierbij zo mogelijk een levend monster. Onderzoek een aantal beeldvelden bij een sterke vergroting van bijvoorbeeld 600×: <i>stap 1</i> onderzoek enkele beeldvelden (minimaal vijf) voor de zeer talrijke soorten; <i>stap 2</i> onderzoek enkele tientallen beeldvelden (bijvoorbeeld dertig) voor de talrijke soorten.
3	Telling van relatief minder talrijke tot zeer schaarse, grotere soorten	Onderzoek een geheel of een deel van het cuvet bij een zwakke vergroting van bijvoorbeeld 200×: <i>stap 3</i> onderzoek ca. acht beeldvelden voor de minder talrijke soorten; <i>stap 4</i> onderzoek ca. twintig beeldvelden voor de vrij schaarse soorten; <i>stap 5</i> onderzoek een half cuvet voor de schaarse soorten; <i>stap 6</i> onderzoek een heel cuvet voor de zeer schaarse soorten.

Opmerking 1

Niet alle zes stappen in tabel 7B.1 zullen voor elk monster doorlopen moeten worden. Dit hangt af van de abundanties van de afzonderlijke soorten in het monster en van het aantal waarnemingen dat men minimaal per soort wil verzamelen. Om een betrouwbare indruk te krijgen van de abundantieverhouding tussen de soorten, zijn minimaal tien waarnemingen van de meest talrijke soort in de stap voldoende.

Opmerking 2

De kleinste algen die als zodanig herkend zouden moeten kunnen worden, zijn algen met afmetingen van 1 à 2 µm (bijvoorbeeld de groenalg *Choricystis hindakii* en losse cellen van de blauwalg *Aphanothece*). Tel talrijke soorten in een relatief klein volume (= klein deel van het cuvet) en minder talrijke soorten in een relatief groot volume (= groot deel van het cuvet of meerdere cuvetten) en pas de gebruikte vergroting aan op de dichtheden per beeldveld van de betreffende soorten en op hun afmetingen (herkenbaarheid). Bij een zwakke vergroting worden kleine soorten gemakkelijk over het hoofd gezien, wanneer de hoeveelheid deeltjes in het beeldveld hoog is.

In plaats van beeldvelden kunnen ook delen van beeldvelden geteld worden, mits deze delen reproduceerbaar afgebakend kunnen worden met behulp van een raster, kader of kruis in de optiek. Het tellen van beeldvelddelen is aan te bevelen bij een hoge dichtheid van, veelal uiterst kleine, algen.

Opmerking 3

Men moet het gebruik van grootteklassen goed afstemmen op het gebruik van taxonomische categorieën. Het heeft geen zin om onder de naam *Cyclotella* sp. wel de cellen groter of gelijk aan 10 µm te tellen, maar niet de cellen kleiner dan 10 µm. Maak dan de indeling *Cyclotella* ≥ 10 µm en Centrales < 10 µm (of volgens de TWN-naamgeving: Coscinodiscophyceae < 10 µm).

Opmerking 4

Bij het scannen van banen (transecten) in plaats van beeldvelden (in de stappen 5 en 6), kunnen soorten die aan de buitenzijden van de baan liggen (tegen de rand van het beeldveld) over het hoofd gezien worden. Een hulpmiddel om dit te voorkomen is een oculair met een rechthoekig veld, ruim binnen de begrenzing van het beeldveld. Alleen de soorten binnenin de rechthoek worden geteld.

Opmerking 5

Algen kunnen gedeeltelijk buiten het beeldveld liggen. De vraag is dan, tellen we deze mee en zo ja, hoe. In het algemeen kan men het volgende uitgangspunt hanteren voor losse cellen, kolonies en filamenten: alleen meetellen als het zwaartepunt in het beeldveld ligt. Wanneer het monster veel filamenten of kolonies bevat is het niet handig om voortdurend te moeten bepalen of het zwaartepunt binnen het beeldveld ligt. De telling wordt hierdoor teveel gestoord. Men kan dan kiezen om de filamenten of kolonies die in de ene helft van het beeldveld 'over de rand' liggen wel mee te tellen en die in de andere helft niet (zie ook NEN-EN 15204). Een alternatief is om alleen dat deel van de draad of kolonie mee te tellen, dat binnen het beeldveld ligt. Een eventuele berekening van de gemiddelde grootte van filament of draad is bij deze werkwijze natuurlijk niet meer zinvol.

Opmerking 6

Wanneer men de afzonderlijke cellen bij een zwakkere vergroting moeilijk kan onderscheiden, kan men deze cellen niet goed tellen. Men moet dan een schatting van het aantal maken.

Filamenteuze algen

Bij draadvormige (filamenteuze) algen zoals *Planktothrix agardhii*, bepaalt men de gemiddelde lengte van één cel bij een sterke vergroting. Tijdens de telling meet men dan de lengte van de filamenten. Uit deze lengte en de gemiddelde lengte van één cel, kan men vervolgens het aantal cellen per filament berekenen. Als er veel draden aanwezig zijn, is het meten van elke draad afzonderlijk erg tijdrovend. Bovendien verstoort men door het meten en de daarmee samenhangende verschuiving van het beeldveld de nauwkeurigheid van de telling zelf. Beter in zo'n geval is om per soort eerst het aantal filamenten te tellen. Daarna bepaalt men per soort de gemiddelde lengte van een filament op basis van een meting van minimaal dertig filamenten. Hieruit kan men vervolgens de totale filamentlengte per soort berekenen en tenslotte, uit de gemiddelde cellengte, het totale aantal cellen.

Grote kolonies

Bij grote kolonies van bijvoorbeeld *Microcystis*, schat men de hoeveelheid cellen door eenheden van 10 of 100 cellen 'af te passen' en dit aantal met twee te vermenigvuldigen wanneer men slechts één helft van de kolonie telt. NB. een *Microcystis*-populatie kan in het monster voor meer dan de helft van zijn biovolume bestaan uit losse cellen. Ook deze cellen moeten worden geteld, gewoonlijk in een kleinere fractie en met een sterkere vergroting dan de kolonies. Een alternatieve mogelijkheid voor het bepalen van de hoeveelheid *Microcystis* is om een representatief deel van het monster te behandelen met KOH (zie bijlage 20). Hierdoor vallen de kolonies uit elkaar in losse cellen, die vervolgens nauwkeuriger geteld kunnen worden dan de cellen in de oorspronkelijke kolonies.

Opmerking 7

In sommige monsters kunnen vlokjes met algen aanwezig zijn. Vaak zijn dit flagellaten die moeilijk door schudden te resuspenderen zijn. Door een deelmonster te behandelen met ultrasone trillingen (zie bijlage 20), lukt het soms om deze vlokjes uit elkaar te laten vallen. Lukt dit niet, probeer de algen in de vlokjes dan zo goed mogelijk te determineren en te tellen en onderzoek voldoende vlokjes voor een betrouwbare dichtheidsbepaling (minimaal tien).

7B.10 Biovolumebepaling

Bepaal het biovolume van de alg op één van de volgende werkwijzen.

- A** Snel en globaal, door gebruik te maken van een standaardlijst van soortspecifieke, gemiddelde biovolumina per cel:
- 1 gebruik een standaardlijst die is goedgekeurd door het Planktonoverleg Nederland of een expert (zie [bijlage 2](#));
 - 2 bereken het biovolume per taxon (in mm^3/l) door het celvolume voor dat taxon in de standaardlijst te vermenigvuldigen met zijn dichtheid in cellen per l, berekend uit de telling;
 - 3 wanneer het taxon niet in de standaardlijst staat: bereken het biovolume van dat taxon volgens de onderstaande [werkwijze B](#)).
- B** Meer nauwkeurig, door de cellen in het monster te meten en het biovolume te berekenen via soortspecifieke, geometrische formules:
- 1 bepaal welke geometrische vorm het best overeenkomt met de vorm van de betreffende alg. Maak hierbij gebruik van [bijlage 19](#), van het overzicht van geometrische vormen per geslacht in de ontwerpnorm N108 (2008), in Thomsen (1992) voor marien fytoplankton of in andere werken die door het Planktonoverleg Nederland geaccepteerd zijn;
 - 2 meet de bij de geometrische vorm behorende dimensie(s) op bij de betreffende alg;
 - 3 bereken het volume volgens de formule die hoort bij de gekozen geometrische vorm, met gebruikmaking van de gemeten dimensie(s).

Opmerking 1

Er zijn veel standaardlijsten beschikbaar met gemiddelde biovolumina per cel van fytoplanktonsoorten. Sommige lijsten geven ranges.

Opmerking 2

Sommige soorten kunnen sterk verschillen in afmeting, in de loop van het seizoen en tussen wateren. Dit geldt vooral voor kiezelalgen en groenalgen. In het algemeen is de groottevariatie van cellen van blauwalgen en goudalgen veel beperkter. Wel kan de lengte van blauwalgdraden en het aantal cellen in kolonies sterk verschillen.

Opmerking 3

In veel gevallen kan men niet alle (en bij sommige soorten nooit alle) dimensies tegelijk zien en opmeten. Gebruik dan voor de 'onzichtbare' dimensie een schatting, die gebaseerd is op metingen aan exemplaren waar deze dimensie wel zichtbaar was. Leg een lijst aan van soortspecifieke dimensies en verhoudingen tussen deze.

7.11 Determinatie

Het determineren

- 1 Ga bij de naamgeving uit van de TWN-lijst.
- 2 Gebruik bij de determinatie eerst de in [bijlage 30](#) genoemde, noodzakelijke determinatieliteratuur.
- 3 Gebruik, zeker in het begin, de volledige determinatietabel om tot een soort te komen.
- 4 Bij twijfel over de keuze in de determinatietabel moeten beide mogelijkheden gevolgd worden; één van de twee blijkt dan vaak de meest waarschijnlijke.
- 5 Raadpleeg altijd de soortbeschrijving en controleer de zekerheid van de determinatie aan de hand van de habitustekeningen, de afmetingen en de milieuvoorkeur. De vondst van een acidofiele soort in een voedselrijke laagveenplas is niet heel waarschijnlijk.

- 6 Beoordeel de bijzonderheid van de waarneming aan de hand van de verspreidingsindicatie in de flora. Is de soort algemeen, of zeldzaam.
- 7 Maak gebruik van de aanvullende determinatieliteratuur, wanneer de alg niet helemaal overeenkomt met de beschrijving en afbeeldingen in de noodzakelijke literatuur.
- 8 Wanneer de soort niet met zekerheid kan worden vastgesteld, determineer dan tot het eerstvolgende, hogere taxonomische niveau waarover wel zekerheid bestaat (meestal het geslachtsniveau).
- 9 Laat de volgende waarnemingen controleren door een expert ([bijlage 2](#)):
 - a soorten die niet met zekerheid gedetermineerd kunnen worden en een aandeel in de abundantie hebben van méér dan 10%;
 - b soorten die met aanvullende literatuur op naam zijn gebracht en niet uit Nederland bekend zijn;
 - c soorten die in Nederland bekend staan als zeer zeldzaam of uitgestorven.

Speciale technieken voor het determineren

Voor een goede determinatie van algen kan het nodig zijn om details van de celwand beter zichtbaar te maken. Bijvoorbeeld de plaatstructuur bij dinoflagellaten, of het streepjespatroon op het kiezelschaaltje bij kiezelwieren. Methoden om de zichtbaarheid van deze details te verbeteren zijn beschreven in [bijlage 20](#).

7B.12 Rapportage

Bij de analyse worden metadata vastgelegd die nodig zijn voor de interpretatie van de analyseresultaten (zie [hoofdstuk 2](#) voor het begrip metadata). Met deze data moeten de eigen resultaten vergeleken kunnen worden met resultaten van anderen en zo nodig omgezet kunnen worden naar resultaten van anderen. De metadata worden gekoppeld aan het unieke *monsternummer*.

Leg op het lab onder het monsternummer (of LIMS-nummer) de volgende gegevens vast op een laboratoriumformulier, in het LIMS-systeem, of in een andere database:

- naam van de analist;
- datum van de analyse;
- gehanteerde analysemethode;
- eventuele verdunnings- of concentratiefactor;
- eventuele afwijkingen van de gebruikelijke werkwijze (bijvoorbeeld gebrekkige conservering);
- eventuele bijzonderheden van het monster die de resultaten kunnen hebben beïnvloed (bijvoorbeeld hoge dichtheid groot zoöplankton);
- gebruikte determinatieliteratuur;
- analyseresultaten per monster met per soort aantal waarnemingen en cellen en grootte onderzocht volume deelmonster in ml;
- van soorten die bij de telling vaker dan éénmaal zijn waargenomen en niet (met zekerheid) op naam gebracht konden worden: een beschrijving in de vorm van een afbeelding (tekening, foto) en afmetingen (lengte, breedte, diameter).

7B.13 Kwaliteitszorg

Kwaliteitszorg op het gebied van de analyse moet:

- de betrouwbaarheid van de analyse bevorderen;
- de vergelijkbaarheid van de analyseresultaten bevorderen.

Eerstelijnscontrole

De eerstelijnscontrole is bedoeld om fouten in de uitvoering van de analyse te voorkomen. Voor onderzoek van fytoplankton betekent dit:

- werk volgens dit voorschrift;
- werk met een goede microscoop en een gekalibreerde oculair-micrometer;
- gebruik de standaardnaamlijst (TWN);
- documenteer te onderscheiden taxa in de vorm van een geannoteerde soortenlijst met afbeeldingen (tekeningen en/of foto's) van elk taxon;
- gebruik actuele determinatieliteratuur;
- laat onzekere determinaties controleren door een expert. Hieraan kunnen kosten verbonden zijn. Een lijst van hiervoor beschikbare experts staat in [bijlage 2](#);
- archiveer het monster voor een periode van tenminste vijf jaar voor eventuele controle op een later tijdstip;
- hou 'voeling' met de betrouwbaarheid van de telmethode, door tijdens de telling te toetsen op reproduceerbaarheid. Vergelijk tijdens de telling het aantal waarnemingen per beeldveld. Of, als beeldvelden worden onderzocht in twee segmenten van het cuvet, vergelijk voor de talrijkste soort het aantal waarnemingen in het ene segment, met het aantal waarnemingen in het andere segment. Zit er veel verschil tussen, of valt de variatie binnen de verwachting (zie [bijlage 18](#)).

Tweedelijnscontrole

De tweedelijnscontrole is bedoeld om de reproduceerbaarheid van onderzoeksresultaten binnen één laboratorium te testen. Voor de analyse van fytoplankton betekent dit:

- laat minimaal eens per jaar eenzelfde monster in duplo analyseren door alle, voor fytoplanktonanalyse bevoegde analisten;
- zorg voor een goede, interne opleiding van nieuwe collega-analisten.
- toon bijzondere vondsten aan collega's;
- raadpleeg collega's bij onzekerheid over een determinatie.

Zie [bijlage 21](#) voor een statistische toetsing van de resultaten van tweede-lijnscontroles.

Derdelijnscontrole

De derdelijnscontrole is bedoeld om de betrouwbaarheid en reproduceerbaarheid van analyseresultaten tussen laboratoria te testen. Voor onderzoek van fytoplankton betekent dit:

- doe jaarlijks mee aan interlaboratoria ringonderzoeken (derde-lijnscontroles), wanneer bruikbare ringonderzoeken georganiseerd worden (zie [bijlage 2](#) voor suggesties);
- maak gebruik van email of discussiefora om collega-analisten te informeren over de ontdekking van bijzondere vondsten, (mogelijk) nieuwe soorten e.d.; stuur zo mogelijk een foto mee en vraag om commentaar;
- sluit je aan bij een landelijk overleg van collega-analisten en bespreek bijzondere vondsten, nieuwe literatuur en problemen uit de praktijk op het gebied van bemonstering, analyse en determinatie (zie [bijlage 2](#) voor adressen);
- neem deel aan nationale of internationale discussiefora die communiceren via internet (zie [bijlage 2](#)).

7B.14 Literatuurverwijzingen

- Evers CHM & Knoben RAE (red) (2007) *Omschrijving MEP en maatlatten voor sloten en kanalen voor de Kaderrichtlijn Water*. Rapport 2007-32b, Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer, Utrecht. 144 pp.
- Evers CHM, Knoben R & van Herpen FCJ (red) (2012) *Omschrijving MEP en maatlatten voor sloten en kanalen voor de Kaderrichtlijn Water 2015-2021*. Rapport 2012-34, Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer, Amersfoort.
- NEN-EN 14996 (2006) *Water quality - Guidance on assuring the quality of biological and ecological assessments in the aquatic environment*. Nederlands Normalisatie-instituut, Delft. 14 pp.

- NEN-EN 15204 (2006) *Water quality - Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy (Utermöhl technique)*. Nederlands Normalisatie-instituut, Delft. 42 pp.
- N108 (2008) *Water quality – Phytoplankton biovolume determination by microscopic measurement of cell dimensions*. German draft proposal for CEN/TC 230WG 2/TG 3, d.d. 30 maart 2008.
- STOWA (2006) *Handboek Nederlandse ecologische beoordelingssystemen (EBeo-systemen). Deel A. Filosofie en beschrijving van de systemen*. Rapport 2006-04, Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer, Utrecht. 255 pp.
- Thomsen HA (ed) (1992) *Plankton i de indre danske farvande*. Havforskning fra Miljøstyrelsen. Miljøstyrelsen Miljøministeriet, Copenhagen. 331 pp.
- Van der Molen DT & Pot R (red) (2007a) *Referenties en maatlatten voor natuurlijke watertypen voor de Kaderrichtlijn Water*. Rapport 2007-32, Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer, Utrecht. 362 pp.
- Van der Molen DT & Pot R (red) (2007b) *Referenties en maatlatten voor natuurlijke watertypen voor de Kaderrichtlijn Water. Aanvulling kleine typen*. Rapport 2007-32 Aanvulling, Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer, Utrecht. 166 pp.
- Van der Molen DT, Pot R, Evers CHM & van Nieuwerburgh LLJ (red) (2012) *Referenties en maatlatten voor natuurlijke watertypen voor de Kaderrichtlijn Water 2015-2021*. Rapport 2012-31, Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer, Amersfoort.

