

## WERKVOORSCHRIFT 9B ANALYSE VAN KIEZELWIJEREN IN OPPERVLAKTEWATER

### 9B.1 Doel en toepassingsgebied

Dit werkvoorschrift heeft betrekking op kiezelwieren uit het aangroei van zoete tot brakke, stilstaande en stromende wateren. Het bevat op de eerste plaats richtlijnen voor het prepareren en analyseren van kiezelwiermonsters. Op de tweede plaats geeft het aanwijzingen voor het verwerken van de verzamelde gegevens en de vastlegging van metagegevens. Op de derde plaats geeft het adviezen voor de kwaliteitszorg van de analyse. De beschreven analysemethoden zijn bedoeld voor de volgende toepassingen:

- beoordeling ecologische kwaliteit volgens de KRW-maatlatten (Van der Molen & Pot 2007a en b, Van der Molen *et al.* 2012);
- beoordeling ecologische kwaliteit volgens EBeo (STOWA 2006);
- habitattyping volgens Van Dam *et al.* (1994).

### 9B.2 Beginsel

Van een aangroeimonster uit oppervlaktewater scheidt men de kiezelwieren af en verwerkt deze tot een zo zuiver mogelijke suspensie van kiezelschaaltjes. Van een deelmonster van deze suspensie maakt men een preparaat waarin de structuren van de verkiezelde schaaltes van de diatomeeën onder het lichtmicroscopisch zo goed mogelijk zichtbaar zijn. Aan dit preparaat bepaalt men de soortensamenstelling met behulp van lichtmicroscopie, op basis van een steekproef van tweehonderd schaaltes.

### 9B.3 Normen

Onderdelen van dit voorschrift zijn gebaseerd op de volgende normen:

#### NEN-EN 13946:2003

Water quality - Guidance standard for the routine sampling and pretreatment of benthic diatoms from rivers (Richtlijn voor de routinematige bemonstering en monstervoorbehandeling van bentische diatomeeën in rivieren) - juni 2003.

#### NEN-EN 14407:2004

Water quality - Guidance standard for the identification, enumeration and interpretation of benthic diatom samples from running waters (Richtlijn voor de determinatie, telling en interpretatie van monsters van bentische diatomeeën uit stromend water) - september 2004.

#### 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.

### 9B.4 Termen en definities

De in dit voorschrift gebruikte termen en definities zijn verklaard in [bijlage 1](#). Zie ook de normbladen NEN-EN 13946, NEN-EN 14407 en NEN-EN 14996.

### 9B.5 Chemicaliën

Voor de analyse van kiezelwieren heeft men de volgende chemicaliën nodig:

- a antifoam: om eventuele schuimvorming tijdens de oxidatiestappen tegen te gaan;
- b ethanol 80%: voor het conserveren van gereinigde kiezelschaaltjes en voor het schoonmaken van voorwerp- en dekglasjes;

- c immersie-olie: middelmatig visceuze olie voor olie-immersie-objectieven zonder PCB's of epoxyhars (voor toelichting zie [bijlage 12](#));
- d inbedmiddel met brekingsindex tussen 1,65 en 1,75, bij voorkeur ZRax, Naphrax, of Pleurax (zie [bijlage 12](#));
- e oplosmiddel voor inbedmiddel (bijvoorbeeld toluen);
- f water (gedestilleerd water, gedemineraliseerd water, of milli-Q);
- g waterstofperoxide 30%: voor de oxidatie van organische stof;
- h zoutzuur 10%: voor het losmaken van kiezelwieren en het oplossen van kalk en ijzerzouten; en eventueel:
- i zwavelzuur 96%: voor het verkolen van organische stof, voorafgaand aan de oxidatie; dit is een facultatieve stap.

### 9B.6 Apparatuur en hulpmiddelen

Voor de analyse van kiezelwieren heeft men de volgende apparaten, hulpmiddelen en verbruiksartikelen nodig:

- a dekglasaesjes, dikte 0,15-0,17 mm, rond (diameter 18 tot 20 mm) of vierkant (18 x 18 mm);
- b etiketten: om preparaten te etiketteren; grootte ongeveer 20 x 22 mm;
- c flesjes of buisjes van kunststof die goed afsluitbaar zijn (inhoud 2 tot 10 ml): om suspensies van gereinigde schaaltsjes in op te slaan; zogenaamde safe-lock reactievaatjes van 2 ml voldoen ook;
- d handschoenen van kunststof: als persoonlijk beschermingsmiddel (zie [hoofdstuk 4](#));
- e graveerpen: voor het merken van reageerbuisen en objectglasaesjes (als alternatief voor de watervaste viltstift);
- f hevelaar: om bovenstaand water in reageerbuisen af te hevelen;
- g kookplaat: voor het inbedden van kiezelschaaltsjes;
- h laboratoriumjas: als persoonlijk beschermingsmiddel (zie [hoofdstuk 4](#));
- i lenzenpapier
- j multi-blok heater of waterbad: voor het verwarmen van monsters tijdens de oxidatie;
- k objectglasaesjes, grootte 76 x 26 mm; handig is het gebruik van objectglasaesjes met een matte rand, waarop met potlood kan worden geschreven;
- l oppervlaktespanningsverlager: om te zorgen voor een goede spreiding van de kiezelschaaltsjes over het dekglasje (als alternatief voor 80% ethanol);
- m pasteurpipetten;
- n pincetten en prepareernaalden;
- o preparatenmappen of -dozen;
- p reageerbuisen, inhoud ongeveer 15 tot 20 ml;
- q microscoop (zie [bijlage 15 en 16](#));
- r strekplaat: voor het drogen van preparaten (een kookplaat kan ook voldoen);
- s tissues: voor het schoonmaken van hulpmiddelen zoals pincetten;
- t watervaste stift: voor het merken van reageerbuisen en objectglasaesjes; viltstift is niet altijd bestand tegen warme dampen, een beter alternatief is daarom de graveerpen.

Extra benodigd, als men kiest voor de mechanische extractie van kiezelwieren (geen voorkeursmethode):

- u diep bord: voor het verzamelen van afgeschraapt aangroeijsel;
- v scalpel: voor het afschrappen van aangroeijsel.

### 9B.7 Prepareren

Bij het prepareren onderscheiden we de volgende drie stappen:

- 1 extractie: de diatomeeën worden uit een monster losgemaakt van hun substraat en gesuspenderd in water;
- 2 oxidatie: de organische stof binnen en buiten de diatomeeëncellen wordt uit het materiaal verwijderd;
- 3 inbedding: van de resterende kiezelschaaltsjes (en overig slecht oxideerbaar materiaal) wordt een preparaat gemaakt dat optimaal geschikt is voor microscopisch onderzoek.

**Let op**

Alle stappen moeten in de zuurkast worden uitgevoerd (figuur 9B.1). Formaline, zoutzuur en de oplosmiddelen van de harsen voor het inbedden, leveren bij inademing en huidcontact gevaar op voor de gezondheid. Bovendien reageert formaline met zoutzuur onder vorming van het kankerverwekkende bis(chloormethyl)ether.

In de eerste twee stappen worden ook kalk- en ijzerzouten opgelost. Om deze vervolgens te verwijderen wordt het monster meerdere keren gewassen. Met wassen bedoelen we het uitwassen van stoffen zoals zouten of formaline uit een monster. Dit doen we door de stappen 1 tot en met 5 in het voorschrift Wassen (paragraaf 9B.7.2) minimaal drie keer uit te voeren. Twee keer wassen is beslist onvoldoende. Bij de laatste wasstap voorafgaand aan het inbedden raden we vier keer wassen aan.

Tijdens het prepareren worden monsters overgebracht in andere buizen en tenslotte op dek- en objectglaasjes. De kans op het verwisselen van monsters is hierbij reëel. Voorkom verwisselingen door een vaste werkwijze, bijvoorbeeld door de monsters steeds op numerieke volgorde af te werken (zie ook paragraaf 9B.11 Kwaliteitszorg).

**Fig9B.1 Werken bij de zuurkast**

1: buisje voor bewaren geoxideerd materiaal, 2: buisje met knikker tijdens oxidatie, 3: Multi-blok heater, 4: buisje met thermometer, 5: inbedmiddel, 6: objectglaasjes, 7: strekplaat met dekglasjes en identificatiestroom, 8: bekeglas met voor-geweekte dekglasjes, 9: hevelpompje, 10: buisjes met geoxideerd materiaal en pasteurpipetten, 11: demi-water, 12 hevel (pasteurpipet aan slang), 13: kunststof handschoen, 14 (veiligheids)bril.



### 9B.7.1 Extractie

#### Chemische extractie (voorkeursmethode)

- 1 Voorzie de buizen waarin men het substraat extraheert van monsternummers die bestand zijn tegen warme dampen, met een graveerpen of een watervaste viltstift<sup>1</sup>.
- 2 Verwijder eventuele formaline door oxidatie met peroxide of door drie maal te wassen met water<sup>1</sup>.
- 3 Dompel het substraat in de buis voor de helft onder in 10% zoutzuur<sup>2</sup>.
- 4 Sluit de buis met de schroefdop goed af en schud een aantal keren zodat al het materiaal doorweekt is met zoutzuur.
- 5 Zet de buis in een rekje en draai de dop iets los zodat vrijkomend gas kan ontsnappen.
- 6 Laat de buis met het substraat zo minimaal twee dagen staan bij kamertemperatuur, maar schud de buis af en toe (denk eraan om de dop eerst goed dicht te draaien!).
- 7 Schud de buis goed en geef grove deeltjes enkele seconden om te bezinken.
- 8 Giet de bovenstaande vloeistof met het losgeweekte aangroei over in een schone, glazen reageerbuis (dit noemen we decanteren).
- 9 Zet de reageerbuis in een rekje, dek de buis af, bijvoorbeeld met een schone knikker om invallen van andere diatomeeën en stof te voorkomen en laat het materiaal ten minste 24 uur bezinken.
- 10 Verwijder zoveel mogelijk kalk, ijzer en zoutzurestanten, door het monster in de reageerbuis drie keer te wassen volgens het voorschrift Wassen (zie [paragraaf 9B.7.2](#)).
- 11 Verwijder na de laatste wasstap zoveel mogelijk water.

#### Mechanische extractie

- 1 Voorzie de buizen waarin men het extract zal overbrengen van monsternummers die bestand zijn tegen warme dampen, met een graveerpen of een watervaste viltstift.
- 2 Giet de inhoud van het monsterpotje met (ontdooid) plantenmateriaal, ander substraat en monstervloeistof uit op een diep bord met vlakke bodem.
- 3 Schraap van riet- en soortgelijke stengels de buitenste laag af (bijvoorbeeld met een scalpel of de scherpe kant van een objectglaasje) en gooi de binnenste lagen weg.
- 4 Snijd slappe stengels en bladeren (bijvoorbeeld van vederkruid) in stukjes van circa 1 cm lang.
- 5 Meng al het afschraapsel en gefragmenteerd substraat goed en breng een deel ervan (circa 1 cm<sup>3</sup>) met een pincet over in een reageerbuis. Doe de rest van het materiaal terug in het monsterpotje.
- 6 Neem met een pipet een even grote hoeveelheid monstervloeistof uit het bord en voeg dit toe aan de reageerbuis. Doe de rest van de vloeistof terug in het monsterpotje en maak het bord en het afschraap- en snijgerei goed schoon door ze te spoelen met kraanwater en af te drogen met tissues.
- 7 Zet de reageerbuis met het monster in een rekje en verwijder eventuele formaline door oxidatie met peroxide of door drie maal te wassen volgens het voorschrift Wassen (zie [paragraaf 9B.7.2](#)). Dek de reageerbuis tussendoor af met een schone knikker om het invallen van andere diatomeeën en stof te voorkomen.
- 8 Voeg enkele druppels 37% zoutzuur toe om kalk en ijzorzouten op te lossen (pas op voor het bruisen). Vul aan met water, dek de buis af met een knikker en laat het materiaal 24 uur bezinken.
- 9 Verwijder zoveel mogelijk kalk, ijzer en zoutzurestanten, door het monster in de reageerbuis drie keer te wassen volgens het voorschrift Wassen.
- 10 Verwijder na de laatste wasstap zoveel mogelijk water.

<sup>1</sup> Wanneer men het substraat al in het veld heeft verzameld in geschikte, gelabelde buizen en het monster heeft geconserveerd door invriezen of met zoutzuur, zijn de stappen 1 en 2 niet nodig.

<sup>2</sup> Deze stap is niet nodig wanneer men het monster in het veld heeft geconserveerd met zoutzuur.

### 9B.7.2 Wassen

Voorafgaand aan het wassen moet het materiaal in de reageerbuis minimaal 24 uur hebben kunnen bezinken.

- 1 Hevel zoveel mogelijk van de bovenstaande vloeistof (het supernatant) af.
- 2 Vul de reageerbuis voor 90% met water en meng de inhoud goed.
- 3 Zet de reageerbuis in een rekje op een trillingsvrije plaats.
- 4 Dek de buis af met een knikker om het invallen van stof of andere diatomeeën te voorkomen.
- 5 Laat de buis ten minste 24 uur staan zodat alle kiezelwieren kunnen bezinken.

Per wasbeurt voert men de stappen 1 tot en met 5 minimaal drie keer uit.

### 9B.7.3 Oxidatie

Men kan kiezen tussen een methode met en zonder voorafgaande verkoling van het organisch materiaal met zwavelzuur.

#### Let op

Blijf steeds aanwezig bij de reacties en let goed op (spontaan) overkokende monsters. In sommige buisjes is de reactie zo sterk dat materiaal over kan spatten naar andere buisjes. Zet deze daarom apart totdat de intensiteit van de reactie voldoende is afgenomen. De heftigheid kan vaak worden verminderd door wat antifoam toe te voegen, of door een pasteurpipet in het buisje te zetten. Daarmee kan geroerd worden, wat de heftigheid ook tempert.

#### Met verkoling

- 1 Voeg aan de buis met monstermateriaal 2 ml 96% zwavelzuur toe en dek de buis af met een schone knikker.
- 2 Verwarm het monster een uur bij 95 °C in waterbad of multi-blok heater.
- 3 Voeg vervolgens 2 ml 30% waterstofperoxide toe en laat de buis bij 95 °C staan zo lang als nodig om de zwarte kleur te doen verdwijnen (meestal gebeurt dit binnen een uur).
- 4 Laat de vloeistof afkoelen en vul aan met water. Dek de buizen weer af met een knikker en laat 24 uur bezinken.
- 5 Was het monster minstens drie keer volgens het voorschrift Wassen; verwijder na de eerste wasstap zonnig zand, volgens het voorschrift Verwijderen van zand (paragraaf 9B.7.4).
- 6 Voeg na de laatste wasstap aan het bezinksel een klein beetje water toe (gedestilleerd water, gedemineraliseerd water, of milli-Q) om een schone, geconcentreerde suspensie van kiezelschaaltjes te krijgen (de vloeistof ziet er dan licht troebel uit).

#### Zonder verkoling

- 1 Voeg aan de buis met monstermateriaal circa 1 ml 30% waterstofperoxide toe.
- 2 Voeg vijf tot tien druppels antifoam toe wanneer schuimvorming optreedt (vaak pas tijdens stap 3), of wanneer men schuimvorming verwacht (bij een dikke laag aangroei met blauwwieren, of bij het gebruik van boomwortels als substraat).
- 3 Dek de buis af met een knikker en verwarm ongeveer vier uur bij 80 °C. Voeg druppelsgewijs waterstofperoxide toe, zolang dit leidt tot een bruisreactie<sup>3</sup>.

<sup>3</sup> Veel monsters zijn al na 1,5 uur uitgebruist, ook na het toevoegen van een paar verse druppels waterstofperoxide, maar sommige monsters blijven reageren. Na de heftige reacties kunnen deze monsters uitbruisen in de reageerbuisen, die dan aan het eind van de dag worden aangevuld met water. De volgende dag wordt dan verder gegaan met stap 4.

- 4 Verwijder na ongeveer een uur alle nog aanwezige grove stukjes materiaal (pincet na elke buis steeds goed schoonmaken!)<sup>4</sup>.
- 5 Laat de vloeistof afkoelen en vul aan met water. Dek de buizen weer af met een knikker en laat 24 uur bezinken.
- 6 Was het monster minstens drie keer volgens het voorschrift Wassen; verwijder na de eerste wasstap zand, volgens het voorschrift Verwijderen van zand (paragraaf 9B.7.4).
- 7 Voeg na de laatste wasstap aan het bezinksel een klein beetje water toe (gedestilleerd water, gedemineeraliseerd water, of milli-Q) om een schone, geconcentreerde suspensie van kiezelschaaltjes te krijgen (de vloeistof ziet er dan licht troebel uit).

### 9B.7.4 Verwijderen van zand

- 1 Vul de buis met het geoxideerde monster voor 90% met water en meng de inhoud goed.
- 2 Zet de buis in een rekje, laat de inhoud ca. vijf seconden bezinken.
- 3 Breng het supernatant onmiddellijk daarna over in een schone buis, door afzuigen, afhevelen, of voorzichtig decanteren.
- 4 Dek de buis af met een knikker om het invallen van stof of andere diatomeeën te voorkomen.
- 5 Laat de buis ten minste 24 uur staan zodat alle kiezelwieren kunnen bezinken.
- 6 Ga verder met de tweede en derde wasstap volgens het voorschrift Wassen.

### 9B.7.5 Inbedding

- 1 Zet voldoende object- en dekglasjes minimaal 48 uur voor de inbedding te week in 80% ethanol, om ze brandschoon te maken. Haal ze kort voor het gebruik uit de ethanol en leg ze te drogen op een schone tissue.
- 2 Breng op de objectglasjes een identificatiekenmerk aan, bijvoorbeeld het monsternummer, met potlood, graveerpen of viltstift<sup>5</sup>.
- 3 Maak eerst een proefpreparaat:
  - a laat met een pasteurpipet enkele druppels van de suspensie van kiezelschaaltjes op een dekglasje vallen en spreidt deze goed uit;
  - b laat de druppel opdrogen op een handwarme (ca. 45 °C) verwarmingsplaat of strekplaat;
  - c leg het gedroogde dekglasje met diatomeeën op een objectglasje;
  - d controleer in dit proefpreparaat microscopisch (kan al bij een vergroting van 200x) of de dichtheid van het materiaal goed is, of er geen klonten inzitten en of er niet te veel organisch materiaal is achtergebleven. Optimaal is een dichtheid van ongeveer vijf tot vijftien schaaltes per beeldveld bij een vergroting van 1250 - 1500x. Wanneer er veel (an)organische verontreinigingen in het materiaal zitten, is de dichtheid noodgedwongen lager;
  - e wanneer de dichtheid te groot is (schaaltjes liggen over elkaar heen), de suspensie verdunnen met water;
  - f wanneer de dichtheid te laag is (minder dan één schaalte per beeldveld), de suspensie concentreren door het materiaal te laten bezinken en iets van de bovenstaande vloeistof met een pasteurpipet af te zuigen;
  - g bij te veel organische verontreiniging moet men het materiaal nogmaals oxideren;
  - h klontering kan vaak worden opgeheven door de buis krachtig te schudden vóór het opbrengen van de suspensie op het dekglasje.

<sup>4</sup> Deze stap is niet nodig na chemische extractie.

<sup>5</sup> Als het te gebruiken dekglasje op de strekplaat óp het gelabelde objectglasje wordt gelegd is er een minimum aan etiketterwerk en minder kans op verwisseling van materiaal.

- 4 Maak zonodig opnieuw een proefpreparaat en controleer de kwaliteit hiervan, volgens de bovenstaande stap 2.
- 5 Is de kwaliteit van het proefpreparaat goed dan kan men de 'echte' preparaten gaan maken (omdat de dichtheid van de monsters kan verschillen hoeft één goed proefpreparaat niet te betekenen dat de preparaten van alle monsters goed zijn).
- 6 Leg een dekglasje op een gelabeld objectglasje en breng enkele druppels gesuspendeerde diatomeeën-schaaltjes op het dekglasje. Maak zonodig genummerde objectglasjes bij.
- 7 Droog de druppels op de verwarmingsplaat of strekplaat bij 45 °C (bij hogere temperaturen treden ongewenste stromingsverschijnselen op, waardoor de diatomeeën niet egaal over het preparaat verdeeld worden).
- 8 Breng op de ingedampde diatomeeën op het dekglasje een druppel inbedmiddel aan<sup>6</sup> en leg het dekglasje omgekeerd op het objectglas.
- 9 Verhit het objectglasje zachtjes op de kookplaat, zodat het oplosmiddel van het inbedmiddel gaat koken (tolueen kookt bij 111 °C); bij te hoge verhitting verbrandt de hars! Werk hierbij in de zuurkast. Zodra er geen belletjes meer zichtbaar zijn, het dekglasje zo nodig aandrukken en het preparaat voorzichtig af laten koelen.
- 10 Etiketteer de preparaten (zie [bijlage 11](#)).
- 11 Bewaar de preparaten bij kamertemperatuur in daartoe bestemde mappen, dozen of kastjes. Leg de preparaten horizontaal, om uitzakken op de lange duur te voorkomen.
- 12 Bewaar de suspensie desgewenst in een klein, afsluitbaar kunststof buisje (2-10 ml), voorzie dit van de juiste monstergegevens ([bijlage 11](#)) en voeg een geschikt conserveermiddel toe (bijvoorbeeld 70% ethanol). Label de monsters, het liefst ook met een etiket in het flesje, geschreven met potlood of geprint met een laserprinter op transparant papier.
- 13 Gooi de gebruikte buizen en pasteurpipetten weg. Reinig de knikkers of gooi ze ook weg.

## 9B.8 Telling

De telstrategie is afgestemd op het bepalen van het aandeel van de meest abundante soorten in een steekproef van precies tweehonderd schaaltsjes (of in speciale gevallen: een ander rond getal).

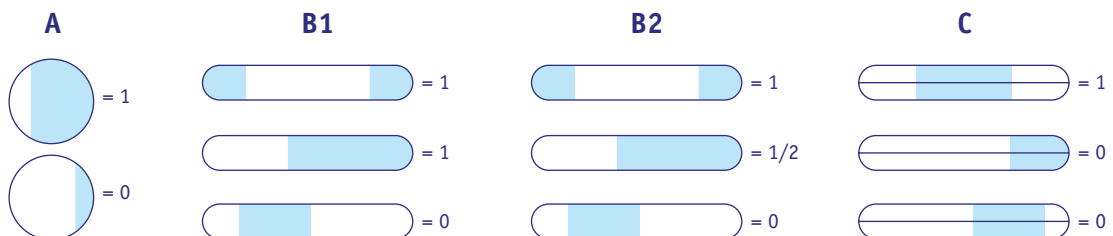
- 1 Leg een preparaat onder het microscoop en stel de belichting perfect in; bij helderveld- en fasecontrastbelichting moet men de instelling volgens het principe van Köhler gebruiken (zie [bijlage 15](#)). De optische kwaliteit is goed wanneer men de transapicale streepjes van *Frustulia saxonica* kan waarnemen.
- 2 Begin de bepaling met het opstellen van een soortenlijst door het preparaat globaal te scannen bij vergrotingen van 200x en 1000x. De soortenlijst hoeft niet uitputtend te zijn. Door deze kennismaking met het monster leer je gebroken schaaltsjes en op de zijkant liggende schaaltsjes herkennen.
- 3 Determineer en tel het door de opdrachtgever aangegeven aantal schaaltsjes, bij voorkeur precies tweehonderd, op de volgende wijze:
  - a gebruik een vergroting van minimaal 1000x;
  - b tel de schaaltsjes in minimaal tien aselekt gekozen beeldvelden of in transecten verdeeld over het preparaat. Zorg er voor dat transecten elkaar niet overlappen, zodat de schaaltsjes niet dubbel worden geteld;
  - c tel elk schaaltsje mee dat voor ten minste de helft in een beeldveld ligt, inclusief soorten die op de gordelzijde liggen (als men deze niet tot op de soort kan determineren, determineert men ze op een hoger taxonomisch niveau);

<sup>6</sup> Indien de hars te dik is, verdun het dan door een scheutje verdunningsmiddel toe te voegen (bij Naphrax is dit toluen). Als de hars met een pasteurpipet opgezogen kan worden is het dun genoeg.

- d tel gebroken schaaldelen mee, als volgt (zie [figuur 9B.2](#)):
- tel fragmenten mee die duidelijk groter zijn dan de helft van een schaalpje;
  - tel fragmenten die kleiner dan de helft van een schaalpje zijn alleen mee wanneer het centrale deel (bijvoorbeeld de rapheknop) zichtbaar is; volg voor de rapheloze schalen de strategie van [figuur 9.12 B1](#), maar als er erg veel gebroken schalen zijn die van [figuur 9.12 B2](#);
  - als het centrale deel niet te onderscheiden is van de rest van het schaalpje (bijvoorbeeld bij *Asterionella*, *Eunotia* en sommige *Fragilaria*'s), tel dan de uiteinden van de schaalpjes en deel de som hiervan door twee;
  - tel gordelbanden (bijvoorbeeld van *Tabellaria*) niet mee.
- 4 Indien bij het volledig tellen van het laatste beeldveld een groter aantal dan 200 zou worden bereikt wordt in dit veld van boven naar beneden geteld tot een totaal van 200.
  - 5 Noteer de waargenomen soorten en de getelde aantallen daarvan op de werkstaat<sup>7</sup> of voer deze direct in de computer in met daarvoor ontwikkelde programma's<sup>8</sup>;
  - 6 Verwijder na de telling met een tissue de immersie-olie van het preparaat en met lenzenpapier van het objectief.
  - 7 Bewaar de preparaten liggend in het donker, om uitzakking van hars en dekglaasje te voorkomen.

### Fig 9B.2 Tellen van gebroken schaalpjes

Gekleurde delen worden geteld voor de fractie die ernaast staat aangegeven. A: centrische schalen, B1 en B2: pennate rapheloze schalen, C: pennate rapheschalen. Naar: Schrader & Gersonde 1978.



#### Opmerking

Let bij het tellen goed op de conditie van de schaalpjes. Wanneer veel misvormde exemplaren aanwezig zijn, is het de moeite waard om de getelde aantallen per soort uit te splitsen in normale en misvormde exemplaren. Ook bijzonder hoge breukpercentages, veel gecorrodeerde (gedeeltelijk opgeloste) of opvallend kleine of zwak verkiezelde schaalpjes zijn de moeite van het noteren waard.

<sup>7</sup> De werkstaat is een formulier waarop in de eerste kolom (standaardafkortingen van) taxonnamen worden genoteerd en in de volgende kolommen ruimte is voor het turven van aantallen en het noteren van de totale aantallen per soort. In de kop worden kenmerken van het preparaat genoteerd, in elk geval preparaatnummer, monsternummer, analysedatum, monsterplaats, onderzoeker en daarnaast bij voorkeur nog projectnummer, monsterdatum en aard van het monster. Een blanco vakje van 18 × 18 mm in de kop dient als plattegrondje van het dekglas, om daar eventueel de positie van gemerkte individuen aan te geven.

<sup>8</sup> Er is een kans dat de papieren werkstaten op de lange duur niet bewaard blijven. Essentiële gegevens moeten daarom ook nog op een andere manier duurzaam worden opgeslagen.



## 9B.9 Determinatie

In de meeste gevallen kan de ervaren analist alle schaaltes determineren tot op soort of een lagere categorie, op hooguit enkele procenten na. Het streven is dat de totale procentuele abundantie van schaaltes gedetermineerd op geslachtsniveau of hoger altijd minder is dan 5%.

- 1 Ga bij de naamgeving uit van de TWN-lijst, waar mogelijk.
- 2 Baseer de determinatie op 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 plas 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 diatomee niet helemaal overeenkomt met de beschrijving en afbeeldingen in de noodzakelijke literatuur;
- 8 Vergelijk de determinaties zonedig met referentiemateriaal uit de eigen verzameling of externe bronnen;
- 9 Wanneer men de soort niet met zekerheid kan vaststellen, determineer dan tot het eerstvolgende, hogere taxonomische niveau waarover men wel zeker is (meestal geslachtsniveau);
- 10 Maak afbeeldingen van niet te determineren en bijzondere soorten.
- 11 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 5%;
  - b de meest voorkomende taxa wanneer de totale relatieve abundantie van de niet tot op soort gedetermineerde taxa meer dan 10% bedraagt;
  - c soorten die met aanvullende literatuur op naam zijn gebracht en nog niet uit Nederland bekend zijn;
  - d soorten die in Nederland bekend staan als zeer zeldzaam of uitgestorven.
- 12 Noteer op de werkstaat of in het computerbestand ook of er foto's of tekeningen zijn gemaakt van de aangetroffen taxa en bij voorkeur ook de nummers van deze documenten.
- 13 Maak notities over eventuele onzekerheden in de determinaties en geef aan hoe hiermee wordt omgegaan (bijvoorbeeld: 'ter bevestiging opgestuurd naar expert X'). Deze bijzonderheden kunnen daarnaast ook worden genoteerd in een logboek, waar de analist deze gegevens snel in kan terugvinden.

## 9B.10 Rapportage

Bij de analyse worden metadata vastgelegd die nodig zijn voor de interpretatie van de analyseresultaten (zie [hoofdstuk 2](#) voor het begrip metadata). Men kan dan bijvoorbeeld besluiten om bepaalde resultaten niet mee te nemen in een ecologische beoordeling. Tevens moet men met deze data de eigen resultaten kunnen vergelijken met de resultaten van anderen en ze zonedig omzetten 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 (werkstaat), in het LIMS-systeem, of in een andere database:

- naam van de analist;
- datum van de analyse;
- gehanteerde prepareermethode;
- gehanteerde analysemethode;

- eventuele afwijkingen van de gebruikelijke werkwijze;
- gebruikte determinatieliteratuur;
- analyseresultaten per preparaat met per taxon het aantal getelde schaaltes en eventueel het aantal waarnemingen per taxon (is doorgaans kleiner dan het aantal schaaltes);
- het totaal aantal getelde taxa in het preparaat<sup>9</sup>;
- het totaal aantal getelde schaaltes in het preparaat<sup>9</sup>;
- voor bijzondere soorten: verwijzingen naar afbeeldingen (tekening, foto), beschrijvingen van afmetingen (lengte, breedte, diameter) en geraadpleegde experts (zie [paragraaf 9B.9](#) stap 11).

#### Opmerking

Leg essentiële gegevens niet uitsluitend vast op een werkstaat, maar ook in een digitale database.

### 9B.11 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. De analist controleert zichzelf op de volgende punten:

- a prepareren;
  - werk volgens dit voorschrift;
  - controleer of de nummers van de monsters overeenkomen met die op de werklst;
  - ga na of de monsters in de juiste, numerieke of alfabetische volgorde, worden afgewerkt;
  - controleer of de buizen, dek- en objectglaasjes in bovengenoemde volgorde zijn neergelegd;
  - controleer of het overbrengen van het materiaal uit de monsterflesjes naar de buizen en van de buizen naar de dekglazen op de objectglazen ook in bovengenoemde volgorde geschiedt;
  - controleer of er bij verwarmen van de buizen geen materiaal overkookt of overspat naar andere buizen;
  - controleer of in proefpreparaten het materiaal voldoende is geoxideerd en of het goed is gespreid (er mogen geen klonten van over elkaar liggende diatomeeën zijn);
  - laat enkele malen per jaar een blanco monster meelopen en controleer de preparaten hiervan op contaminatie. Is de blanco gecontamineerd, neem dan maatregelen om dit in de toekomst te voorkomen.
- b tellen en determineren;
  - werk volgens dit voorschrift;
  - vergelijk de monstergegevens (nummer, datum, locatie e.d.) van de werkstaat met die op het preparaat;
  - verifieer de waarschijnlijkheid van waarnemingen aan de hand van de literatuur (is het voorkomen van bepaalde soorten in een monster al dan niet waarschijnlijk gezien hun ecologische preferenties);
  - raadpleeg eventueel een referentiecollectie (afbeeldingen en preparaten);
  - pleeg bij twijfel over de determinatie overleg met collega's;

<sup>9</sup> Door deze getallen vast te leggen kan men altijd controleren of de analyseresultaten bij de gegevensverwerking correct zijn verwerkt en niet verminkt. Daartoe dienen de getallen apart ingevoerd te worden en niet via een formule die deze getallen berekent uit de ingevoerde analyse-resultaten.

- controleer de handgeschreven werkstaten en de hierop gebaseerde uitvoerlijsten van de database op tel- en invoerfouten;
- analyseer regelmatig twee keer een zelfde preparaat (met enige weken tussen beide analyses omdat anders het preparaat nog kan worden 'herinnerd') en vergelijk de resultaten kritisch. Stel zonodig de werkwijze bij;
- noteer de resultaten van de controles en raadplegingen op de werkstaat of in het computerbestand.

### Tweedelijnscontrole

De tweedelijnscontrole is bedoeld om de reproduceerbaarheid van onderzoeksresultaten binnen één laboratorium te testen. De analist houdt rekening met opmerkingen van directe collega's over de kwaliteit van de werkzaamheden. Voor kiezelwieren betekent dit:

- a prepareren;
  - neem nota van opmerkingen van degenen die de preparaten analyseren over de kwaliteit van de preparaten. Pas de werkwijze zonodig aan;
  - laat regelmatig eenzelfde monster door twee verschillende mensen prepareren en kijk of beide analisten vergelijkbare preparaten maken; bespreek eventuele onderlinge verschillen en pas zonodig de werkwijze aan.
- b tellen en determineren;
  - zorg voor een goede, interne opleiding van nieuwe collega-analisten;
  - toon bijzondere vondsten aan collega's;
  - laat minimaal eens per jaar eenzelfde preparaat in duplo analyseren door alle, voor kiezelwieranalyse bevoegde analisten;
  - bespreek de onderlinge resultaten en neem maatregelen om geconstateerde systematische verschillen (meestal in determinatie) in de toekomst te voorkomen.

### Derdelijnscontrole

De derdelijnscontrole is bedoeld om de betrouwbaarheid en reproduceerbaarheid van analysesresultaten tussen laboratoria te testen. De analist houdt rekening met opmerkingen van externe deskundigen en houdt zich op de hoogte van belangrijke ontwikkelingen op het gebied van de taxonomie. Voor kiezelwieren betekent dit:

- a prepareren;
  - leg een aantal preparaten ten minste eens per jaar voor aan externe deskundigen, neem nota van hun opmerkingen over de kwaliteit van deze preparaten en pas de werkwijze zonodig aan;
  - laat jaarlijks delen van enkele eigen monsters ook prepareren door een ander laboratorium en koppel daaraan een kruistelling van de preparaten.
- b tellen en determineren;
  - doe jaarlijks mee aan interlaboratoria ringonderzoeken, wanneer bruikbare ringonderzoeken georganiseerd worden (zie [bijlage 2](#));
  - 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 van het bemonsteren, prepareren en determineren (zie [bijlage 2](#) voor adressen);
  - hou je op de hoogte van belangrijke recente ontwikkelingen op het gebied van de taxonomie en toets je determinaties regelmatig aan de meningen van collega's buiten het eigen lab, zo mogelijk tijdens (inter)nationale workshops;

- lees vaktijdschriften, zoals *Diatom Research* en *Diatomedelingen* en neem deel aan bijeenkomsten van vakverenigingen (zie [bijlage 2](#)), zoals in elk geval de Nederlands-Vlaamse Kring van Diatomisten (jaarlijks) en zo mogelijk de Central European Diatom Meeting (jaarlijks) en de International Society for Diatom Research (tweejaarlijks).

### 9B.12 Literatuurverwijzingen

- NEN-EN 13946 (2003) Water quality - Guidance standard for the routine sampling and pretreatment of benthic diatoms from rivers. Nederlands Normalisatie-instituut, Delft. 14 pp
- NEN-EN 14407 (2004) Water quality - Guidance standard for the identification, enumeration and interpretation of benthic diatom samples from running waters. Nederlands Normalisatie-instituut, Delft. 12 pp.
- 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.
- Schrader HJ & Gersonde R (1978) Diatoms and silicoflagellates. *Utrecht Micropaleontological Bulletins* 17: 129-176.
- STOWA (2006) Handboek Nederlandse ecologische beoordelingssystemen (EBEO-systemen). Deel A. Filosofie en beschrijving van de systemen. Rapport 2006-4. STOWA, Utrecht. 255 pp + CD-ROM.
- Van Dam H, Mertens A & Sinkeldam J (1994) A coded checklist and ecological indicator values of freshwater diatoms from The Netherlands. *Netherlands Journal of Aquatic Ecology* 28: 117-131.
- Van der Molen DT & Pot R (2007a) Referenties en maatlatten voor natuurlijke watertypen voor de Kaderrichtlijn Water. Rapport 2007-32. STOWA, Utrecht. 361 pp.
- Van der Molen DT & Pot R (2007b) Referenties en maatlatten voor natuurlijke watertypen voor de Kaderrichtlijn Water. Aanvulling kleine typen. Rapport 2007-32B. STOWA, 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.