

BIJLAGE 18 UTERMÖHLMETHODE

De Utermöhlmethode is ontwikkeld door de heer Utermöhl voor een betrouwbare, kwantitatieve analyse van fytoplankton (Utermöhl 1931 en 1958). De methode wordt in het Engels ook wel aangeduid als de inverted-microscope method (Hasle 1978). De reden is dat deze methode gebruikt maakt van een omkeermicroscop (inverted microscope; zie [bijlage 16](#)) en niet van een klassieke, staande microscoop (zie [bijlage 15](#)). De Utermöhlmethode maakt namelijk gebruik van speciale telkamers (sedimentatiecuvetten; zie [bijlage 17](#)), die niet met staande microscopen te gebruiken zijn.

Norm

Voor de analyse van fytoplankton volgens deze methode is een Nederlandse norm geschreven (NEN-EN 15204). Deze is in 2006 geaccepteerd door de CEN, de Europese commissie voor standaardisatie (Comité Européen de Normalisation). Hiermee is deze norm een Europese standaard geworden. De voorschriften in dit handboek voor de analyse van fyto- en zoöplankton en (deels) sialgalen, zijn gebaseerd op deze norm. Het normblad geeft veel informatie over de benodigdheden voor de Utermöhlmethode en de werkwijze. Deze informatie is voor een deel ook opgenomen in het handboek, maar het kan nooit kwaad om het ook nog eens in het normblad te lezen. Wat in de norm veel uitgebreider aan de orde komt, zijn statistische technieken om de random verdeling van organismen in de cuvet te onderzoeken, om de betrouwbaarheid van tellingen te bepalen, de meetonzekerheid en de detectielimiet.

In deze bijlage besteden we aandacht aan de volgende vragen:

- 1 welke voorwaarden stelt de methode?
- 2 zijn er technieken om een betrouwbare telling uit te voeren bij een niet random verdeling?
- 3 hoe kan men de betrouwbaarheid van een telling bepalen?
- 4 welke telstrategie is handig en wat is daarvan de achtergrond?

1.1 Welke voorwaarden?

Om een betrouwbare dichtheid te kunnen berekenen op basis van tellingen volgens de Utermöhlmethode, moet aan de volgende zes voorwaarden voldaan zijn:

- 1 het monster moet homogeen zijn op het moment dat men het deelmonster voor de telling onttrekt (zie [bijlage 13](#));
- 2 de te onderzoeken oppervlakte van de bodem van de sedimentatiecuvet moet nauwkeurig bekend zijn (zie [bijlage 17](#));
- 3 het te onderzoeken volume deelmonster moet nauwkeurig bekend zijn (zie [bijlage 14 en 17](#));
- 4 alle organismen in het deelmonster moeten gesedimenteerd zijn; [tabel 1](#) in [bijlage 17](#) geeft sedimentatietijden voor Lugolgeconserveerde monsters, afhankelijk van de hoogte van de cuvetkolom;
- 5 indien beeldvelden geteld worden, moet de oppervlakte van het beeldveld nauwkeurig bekend zijn (zie [bijlage 16](#));
- 6 wanneer de dichtheidsbepaling gebaseerd wordt op een telling van willekeurige beeldvelden, moet de verdeling van organismen over de bodem van de sedimentatiekamer *random* zijn (volgens het toeval) of homogeen.

OPMERKING

Op het laboratorium kunnen we in principe alleen de dichtheid per liter in het monster bepalen. De vertaling naar de dichtheid in het oppervlaktewater waaruit het monster afkomstig is, is een heel ander verhaal. Dit heeft te maken met de onbekende heterogene verdeling van organismen in het oppervlaktewater waar men rekening mee moet houden (zie [hoofdstuk 7 en 10](#)).

Random verdeling over de cuvetbodem

Een random (of homogene) verdeling van organismen over de cuvetbodem kan men bevorderen door de volgende zorg aan het inzetten te besteden:

- 1 zorg dat de cuvet, het monster en de andere in te zetten hulpmiddelen (pipetten e.d.) op gelijke temperatuur zijn (bij voorkeur kamertemperatuur; als het monster koud is en de cuvet warm, ontstaan gasbellen in de vloeistof die zowel de sedimentatie als de verdeling van organismen over de cuvetbodem nadelig beïnvloeden);
- 2 zorg voor een juiste inzetprocedure:
 - bodempje verdunningsvloeistof aanbrengen voor het inbrengen van het deelmonster,
 - gelijkmatig pipetteren;
 - volledig afvullen van de cuvet;
 - afdekken van de cuvet na het inzetten;
 - gelijkmatige condities tijdens het sedimenteren (gebruik een met tempex geïsoleerde doos met deksel om de cuvetten voor sedimentatie weg te zetten).
- 3 gebruik bij voorkeur Lugol voor de conservering (in ieder geval voor algen); Lugol bevordert een snelle sedimentatie (zie [bijlage 12](#)).

Men kan eenvoudig toetsen of sprake is van een random of homogene verdeling van organismen.

- 1 Bepaal in tien beeldvelden het aantal *waarnemingen* van organismen. Meer beeldvelden mag ook maar is niet nodig. Bepaal NIET het aantal cellen per beeldveld, tenzij alle organismen uitsluitend uit losse cellen bestaan.
- 2 Bepaal het gemiddelde aantal waarnemingen per beeldveld, $N_{\text{gemiddeld}}$, en de variantie voor steekproeven, $\text{VAR}_{\text{steekproef}}$.
- 3 Bereken de verhouding tussen $\text{VAR}_{\text{steekproef}}$ en $N_{\text{gemiddeld}}$.
- 4 Interpreteer de waarde van deze verhouding als volgt:
 - waarde kleiner dan één ($< 0,8$): de verdeling benadert homogeniteit;
 - waarde circa één: de verdeling is random;
 - waarde (veel) groter dan één (groter dan 1,1 à 1,2): de verdeling is niet random maar heterogeen (geclusterd; zie ook Edgar & Laird 1993).

Een bepaling van de randomness met behulp van Chi-kwadraat uit het aantal getelde beeldvelden, het gemiddelde aantal waarnemingen per beeldveld en de variantie, is beschreven in NEN-EN 15204.

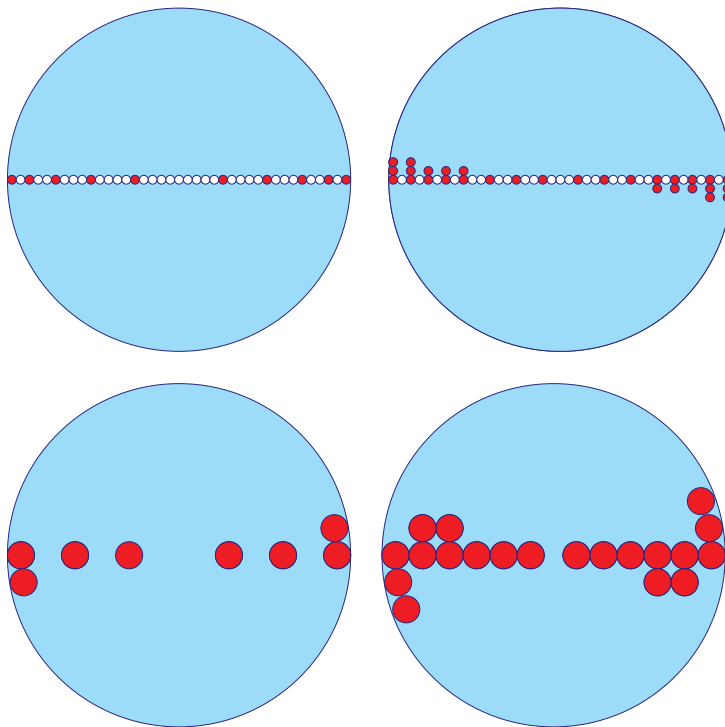
1.2 Zijn er technieken voor een niet random verdeling?

In de praktijk van de Utermöhlmethode komen we regelmatig verdelingen tegen die al op het eerste gezicht niet random of homogeen zijn.

Concentrische verdeling

Het meest voorkomend is een verdeling waarbij de kleinste organismen (grootte kleiner dan vijf micrometer) duidelijk talrijker zijn langs de rand van de cuvet dan meer naar het midden. Als deze verdeling concentrisch is (in ronde cuvetten), kunnen we met ronde cuvetten toch een betrouwbare telling uitvoeren, door beeldvelden te tellen in sectoren van de cuvet. Hierbij kiest men een groter aantal beeldvelden langs de rand van de cuvet of men houdt proportionele afstanden aan tussen de opvolgend getelde beeldvelden ([figuur 1](#)). Kies bij voorkeur minimaal twee sectoren die tegenover elkaar liggen. Om deze strategie toe te kunnen passen moet men tot de rand van de cuvetbodem kunnen tellen. Bij het gebruik van vierkante cuvetten is deze strategie niet toe te passen.

Fig 1 Het tellen van beeldvelden in sectoren van een rond cuvet



Andere ongelijkmatige verdelingen

Een ophoping in het midden van de cuvet komt wel eens voor in cuvetten met een groot bodemoppervlak en een lage verhouding tussen de hoogte van de kolom en de grootte van dit oppervlak. De oorzaak kan trilling zijn. De beste oplossing hierbij is om de hele cuvet te tellen, de helft of een kwart. Een kleinere sector raden wij af, vanwege de grote invloed van de hoeveelheid waarnemingen in juist de sectorpunt, op het resultaat van de telling.

Een ophoping aan één kant van de cuvet kan ontstaan door eenzijdige blootstelling aan temperatuurverschillen (zonlicht, tocht). Bij zo'n verdeling raden wij aan om het monster opnieuw in te zetten.

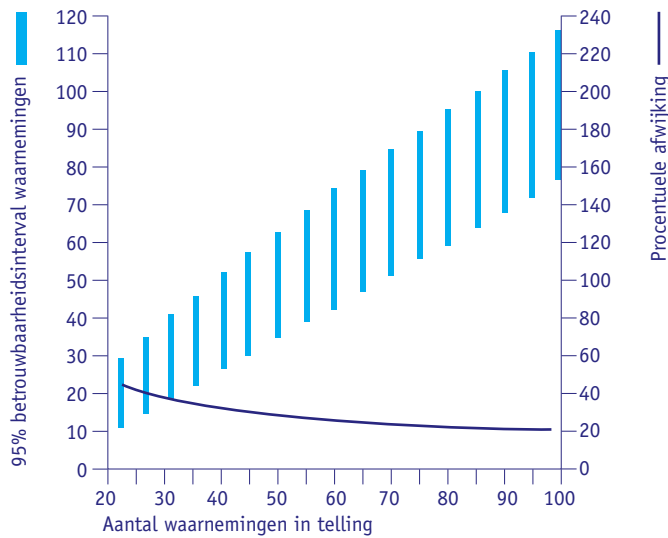
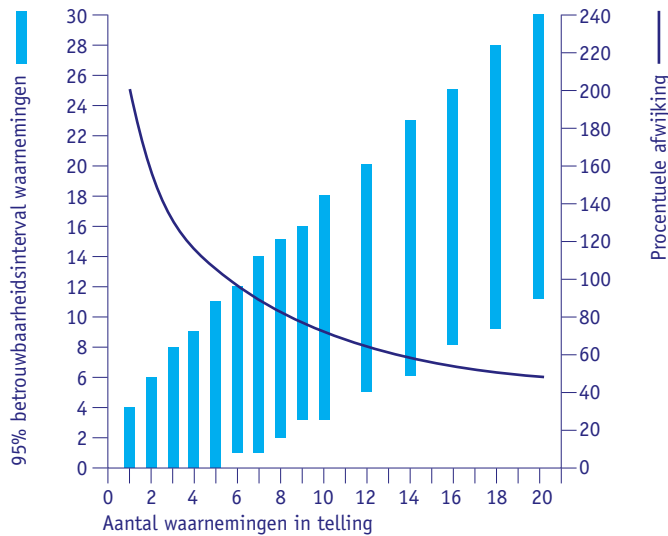
1.3 Hoe bepaal je de betrouwbaarheid?

Beoordeel voor je gaat tellen altijd eerst de verdeling van organismen over de cuvetbodem. Lijkt deze random (zo nodig controleren; zie [paragraaf 1.1](#)), is deze concentrisch (bij ronde cuvetten) of is duidelijk sprake van een excentrische of een geclusterde verdeling? In de laatste twee gevallen zet men het monster opnieuw in, na eventuele clusters van algen te hebben verbroken met behulp van een ultrasoon bad (zie [bijlage 20](#)). In andere gevallen kiest men een passende telstrategie (zie [paragraaf 1.4](#)).

Theoretisch is de betrouwbaarheid van een telling alleen te berekenen wanneer men kan uitgaan van een random of homogene verdeling van de waarnemingen. Deze betrouwbaarheid zegt overigens niets over de betrouwbaarheid van de dichtheid in cellen per milliliter, wanneer er kolonies in het monster aanwezig zijn van uiteenlopende grootten.

In de praktijk is het vooral belangrijk om ‘voeling’ te houden met de betrouwbaarheid van de telling. Dit doet men door tijdens de telling vergelijkingen te maken tussen het aantal waarnemingen per beeldveld en het aantal waarnemingen in overeenkomstige delen van het cuvet (sectoren bij gebruik van ronde cuvetten). De verschillen moeten niet groot zijn (binnen het 95%-betrouwbaarheidsinterval).

Fig 2 95%-Betrouwbaarheidsintervallen voor waarnemingen die volgens het toeval verdeeld zijn Poissonverdeling.



Betrouwbaarheidsinterval

De betrouwbaarheid van het aantal waarnemingen in het onderzochte volume (dit kunnen ook losse beeldvelden zijn, of delen van de cuvet) kan men beoordelen op basis van het 95%-betrouwbaarheidsinterval volgens de Poissonverdeling.

Uit [figuur 2](#) kan men voor één tot honderd waarnemingen de bijbehorende onderste en bovenste grens van dit betrouwbaarheidsinterval aflezen. Voor de berekening van betrouwbaarheidsintervallen verwijzen we naar NEN-EN 15204, statistische literatuur of geschikte websites, zoals www.wynneconsult.com of www.wisfaq.nl. In de norm NEN-EN 15204 wordt uitgebreid aandacht besteed aan deze en andere statistische aspecten. Daarnaast kan men nuttige informatie vinden in Sournia (1978) en Hallegraeff *et al.* (2003).

1.4 Welke telstrategie?

Talrijkheid of gewichtigheid

Een fytoplanktonanalyse vergt een behoorlijke tijdsinvestering. Daarom is het noodzakelijk om de analyse zo efficiënt mogelijk op te zetten.

Het primaire doel van fytoplanktontellingen voor de waterbeheerder is: bepaling van de ecologische kwaliteit. De in Nederland gebruikte, traditionele beoordelingssystemen evalueren daarvoor de soortsamenstelling van fytoplankton, gewogen naar talrijkheid (hoe talrijker de alg, hoe groter zijn bijdrage aan het beoordelingsresultaat). Voor een ecooloog is talrijkheid niet altijd interessant. Wanneer men wil weten welke alg als beste uit de strijd komt om voedingsstoffen en licht, is het biovolume, zijn 'gewichtigheid' een betere maat. Met talrijkheid alleen kan men bij dit soort vragen op het verkeerde been gezet worden.

Ook in het blauwalgenprotocol van maart 2010, is het biovolume onderkend als belangrijke parameter (zie [bijlage 23](#)). Tussen het signaal van de fluoroprobe en de hoeveelheid algen is er een beter verband wanneer die hoeveelheid is uitgedrukt in biovolume in plaats van cellen. En waarschijnlijk zal ook de hoeveelheid toxine in het water een beter verband hebben met het biovolume aan blauwalgen per liter, dan met hun aantal cellen per liter (alleen wanneer alle blauwalgensoorten even grote cellen hadden, zou dat niet op hoeven gaan).

Doelstelling

De doelstelling waaraan een fytoplanktonanalyse moet voldoen, kunnen we in zijn algemeenheid opsplitsen in drie verschillende onderdelen:

- 1 de benodigde precisie waarmee geteld moet worden (betrouwbaarheid);
- 2 de verhouding waarin soorten met verschillende grootte en abundantie geteld worden (gericht op biovolumebijdrage en niet zozeer op talrijkheid);
- 3 de soortenrijkdom die in voldoende mate beschreven moet worden (biodiversiteit; zie [intermezzo 1](#)).

INTERMEZZO 1 BIODIVERSITEIT

De analyse moet recht doen aan de soortenrijkdom van het monster. Een monster dat veel soorten bevat met een lage dichtheid, kan dan veel analysetijd kosten. Dit is natuurlijk afhankelijk van het criterium dat men stelt aan het detecteren van deze biodiversiteit. Dit criterium bepaalt de grootte van het te onderzoeken deelmonster, en daarmee de analysetijd. Men kan de analyse echter efficiënt maken, door tijdig over te stappen naar een volgende analysestap. Bij een monster met een hoge soortenrijkdom (en vaak lage dichtheid per taxon), komt men tijdens de analyse voortdurend soorten tegen die men nog niet eerder geteld heeft. Een ervaren analist kan tijdens de analyse besluiten om een analysestap tussen te voegen (een stap waarin een extra aantal beeldvelden wordt geteld), dan wel eerder door te gaan met een volgende stap. Dit besluit men dan op grond van het aantal waarnemingen van de meest talrijke soort in de stap waarmee men bezig is: minimaal tien. Minder talrijke soorten kan men dan 'overzetten' naar de volgende stap.

Strategie

In het algemeen zijn kleinere soorten talrijker dan grotere. Omdat het biovolume toeneemt met de derde macht van de grootte van een alg, zal een talrijk aanwezige, maar kleine soort toch maar weinig bijdragen aan het biovolume. Deze grootte:volume-verhouding wordt gemakkelijk onderschat, maar een fytoplanktongemeenschap ziet er wat dat betreft net zo uit als een bos: veel kleine plantjes en mos, iets minder veel, maar grotere planten en struiken, en ten slotte een relatief klein aantal grote bomen. Wanneer men zich hiervan bewust is, zal men bij de telling niet overdreven veel energie steken in het tellen van kleine algen. Zo spaart men tijd voor het tellen van grotere soorten in een groter deelvolumen. Men volgt dan een telstrategie die in balans is.

In de werkvoorschriften voor fytoplankton en zoöplankton beschrijven we een telstrategie in drie fasen. In het kort komt deze hier op neer:

- 1 begin de telling met het maken van een soortenlijst;
- 2 tel vervolgens de relatief talrijke, maar gewoonlijk kleine soorten in een klein deelvolumen (deel van de cuvet) bij een sterke vergroting;
- 3 tel tenslotte de minder talrijke, grote soorten in een groot deelvolumen (groter deel van of de gehele cuvet) bij een zwakke vergroting (voor minder talrijke kleine soorten zal deze vergroting te zwak zijn).

Fase 2 en 3 kunnen beide bestaan uit meerdere stappen, afhankelijk van de soortenrijkdom van het monster (zie hoofdstuk 7).

Wat de analyse-inspanning van het kleinste deelvolumen betreft (fase 2 - stap 1), raden wij aan om minimaal vijf beeldvelden te onderzoeken.

Wat de analyse-inspanning voor meso- en macrozoöplankton betreft raden wij aan om altijd hele cuvetten te onderzoeken.

In tegenstelling tot wat elders wel eens geadviseerd wordt (bijvoorbeeld HELCOM 2008), bevelen wij aan om de telling te beginnen met de sterkste vergroting en daarna over te stappen naar zwakkere vergrotingen en niet andersom.

Tabel 1 Berekening van de dichtheid van algencellen uit een telling

OMSCHRIJVING	NOTATIE	EENHEID
Volume deelmonster	V	ml
Onderzocht deel van de cuvetbodem	$O_{\text{onderzocht}}$	%
Aantal getelde cellen	nCellen	cellen
Dichtheid in het monster	Dichtheid	cellen/ml

BEREKENING

$$\text{Dichtheid} = \frac{n\text{Cellen} \times 100}{O_{\text{onderzocht}} \times V}$$

Let op

Bij het scannen van banen (transecten) in plaats van beeldvelden, kunnen soorten die aan de buitenzijden van de baan liggen (tegen de rand van het beeldveld) over het hoofd gezien worden. Hulpmiddelen om dit te voorkomen zijn een oculair met een rechthoekig veld, ruim binnen de begrenzing van het beeldveld, of (bij zoöplankton) een cuvet met een gelinieerde bodemplaat. Alleen de soorten binnenin de rechthoek of binnen de lijntjes worden geteld.

Berekening van de dichtheid

De dichtheid van elk aangetroffen taxon in cellen per milliliter kan men eenvoudig berekenen uit het totale aantal getelde cellen, de grootte van het ingebrachte volume deelmonster en de grootte van het onderzochte deel van de cuvetbodem (tabel 1). Voor zoöplankton gaat men op dezelfde manier te werk, alleen vervangt men daarbij het woord *cellen* door *dieren* of *organismen*.

1.5 Literatuurverwijzingen

- Edgar RK & Laird K (1993) Computer simulations of error rates of Poisson-based interval estimates of plankton abundance. *Hydrobiologia* 264: 65-77.
- Hallegraeff GM, Anderson DM & Cembella AD (red) (2003) *Manual on harmful marine microalgae*. Monographs on Oceanic Methodology 11, UNESCO Publishing, Parijs. 793 pp.
- Hasle GR (1978) The inverted-microscope method. In: Sournia A (red) *Phytoplankton manual*. Monographs on Oceanic Methodology 6, UNESCO, Parijs. pp 88-96.
- HELCOM (2008) Guidelines concerning phytoplankton species composition, abundance and biomass. *Manual for Marine Monitoring in the COMBINE Programme of HELCOM*, Annex 6, update 8.1.2008. http://www.helcom.fi/groups/monas/CombineManual/AnnexesC/en_GB/annex6/
- NEN-EN 15204 (2006) *Water quality - Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy (Utermöhl technique)*. Nederlands Normalisatie-instituut, Delft. 42 pp.
- Sournia A (red) *Phytoplankton manual*. Monographs on oceanographic methodology 6, UNESCO, Parijs. 337 pp.
- Utermöhl H (1931) Neue Wege in der quantitativen Erfassung des Planktons (mit besonderer Berücksichtigung des Ultraplanktons). *Verhandlungen der Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie* 5(2): 567-596.
- Utermöhl H (1958) Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. Neue Wege in der quantitativen Erfassung des Planktons (mit besonderer Berücksichtigung des Ultraplanktons). *Mitteilung Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie* 9: 1-38.

