

Flowcytometrie fytoplanktonmonitoring 2001b

Evaluatie van flowcytometrie fytoplanktonmonitoring
juli t/m december 2001



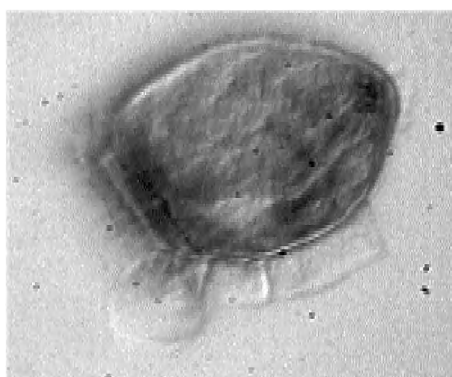
Rapport RIKZ/2003.013

Februari 2002

**T.P.A. Rutten
A. Sandee
A.R.T. Hofman**

Flowcytometrie fytoplanktonmonitoring 2001b

Evaluatie van flowcytometrie fytoplanktonmonitoring
juli t/m december 2001



Rapport RIKZ/2003.013

Februari 2002

**T.P.A. Rutten
A. Sandee
A.R.T. Hofman**

Inhoudsopgave

Inhoudsopgave	2
Samenvatting	4
1. Inleiding	6
1.1 Dit verslag	6
1.2 Wat is nieuw in dit rapport ?	6
2. Materialen en Methoden	8
2.1 Beschrijving gehanteerde materialen en methoden	8
2.2 Uitwerken gegevens	8
2.2.1 Globale trends	8
2.2.2 Vergelijking met andere technieken	9
2.2.3 Uitwerken in scatterplots	9
3. Resultaten	10
3.1 Noordwijk 10	10
3.1.1 Algemene trends	10
3.1.2 Flowcytometrische fytoplankton concentraties	12
3.1.3 Snelle microscopische analyse	16
3.1.4 Fytoplanktonconcentratie van deeltjes > 10 µm	17
3.2 Noordwijk 2	18
3.2.1 Algemene trends	18
3.2.2 Flowcytometrische fytoplankton concentraties	19
3.2.3 Snelle microscopische analyse	23
3.2.4 Fytoplanktonconcentratie van deeltjes > 10 µm	24
3.3 Terschelling 135	25
3.3.1 Algemene trends	25
3.3.2 Flowcytometrische fytoplankton concentraties	26
3.3.3 Snelle microscopische analyse	30
3.3.4 Fytoplanktonconcentratie van deeltjes > 10 µm	31
3.4 Schaar van ouden Doel	32
3.4.1 Algemene trends	32
3.4.2 Flowcytometrische fytoplankton concentraties	34
3.5 Vlissingen	38
3.5.1 Algemene trends	38
3.5.2 Flowcytometrische fytoplankton concentraties	40
3.6 Zijpe	44
3.6.1 Algemene trends	44
3.6.2 Flowcytometrische fytoplankton concentraties	46
4. Discussie	50
4.1 Planningen en uitvoering	50
4.2 Een vergelijking tussen meetlokaties m.b.v. basale statistiek	51
4.3 Kenmerken van pigmentgroepen	53
4.4 Automatische clusterherkenning in FCM-data	56
4.5 Resultaten Flowcytometrie en snelle tellijsten microscopie	57

4.6 Verschillen tussen flowcytometrie en Microscopie	58
4.7 Efficiency	59
4.8 Hoe verder in 2002 ?	59
4.9 Innovatieve ontwikkelingen	60
5. Aanbevelingen	61
6. Conclusies	62
7. Referenties	64

Samenvatting

Dit rapport behandelt de rapportage en evaluatie van fytoplankton-monitoring gegevens over de tweede helft van 2001 van een zestal lokaties, uitgevoerd met flowcytometrie. Dit vindt plaats als onderdeel van het Rijkswaterstaat monitorings programma in de Nederlandse kustwateren (MWTL) in de projecten MONBIO en TNWMILLAB. Per lokatie zijn concentraties en de biomassa, onderverdeeld in grootteklassen, uitgewerkt en wordt hiervan een samenvattende beschrijving van de belangrijkste geconstateerde fytoplanktontrends gegeven.

Nieuw in deze rapportage ten opzichte van eerdere rapportages is dat de datasets uitgebreider en in relatie met elkaar en tussen de jaargangen 2000 en 2001 zijn onderzocht. Zo zijn eventuele relaties tussen pigmentgroepen onderzocht en zijn tijdsgeïntegreerde concentraties en biomassa's over het gehele jaar berekend per lokatie zodat de onderlinge relaties tussen lokaties vergeleken kunnen worden. Nieuw is ook dat de snelle microscopische tellijsten gekoppeld zijn aan flowcytometer clusterresultaten (cluster=één of meer soorten) voor deeltjes groter dan 5 µm. Als aanvulling op de microscopische tellijsten is de autotrofe fytoplanktonconcentratie vanaf de fracties > 10 µm in oplopende fractiegroottes gepresenteerd van de lokaties Noordwijk 10 en 2 en Terschelling 135.

Uit de resultaten van de monitoring van fytoplankton met behulp van flowcytometrie is gebleken dat alle bemonsteringen van 5 van de 6 lokaties in 2001 zijn uitgevoerd. Alleen van Terschelling 135, werd een behoorlijk aantal monsters niet genomen (7 v.d. 18). Circa 90% van de monsters is flowcytometrisch binnen 24 hr geanalyseerd en gerapporteerd.

Trends die waargenomen zijn tussen lokaties en tussen jaargangen, die met andere technieken, naar ons bekend is, niet waargenomen zijn:

- de hoge/hogste concentratie autotrofe deeltjes die in de jaargangen 2000 en 2001 op diverse lokaties in juli gevonden is en veroorzaakt wordt door kleine oranje fluorescerende (fycorerithrine)deeltjes.
- de voor diverse zoutwater en brakke wateren gelijke opgang en neergang van deeltjes met fycocerithine (FGO) en fycocyanine/chlorofyl-b (FRR) en de constatering dat deze beide pigmentgroepen een tegengestelde concentratiebeweging maken gedurende het gehele jaar en voor diverse lokaties.
- de biomassa (chlorofyl/ml) hoofdzakelijk bepaald wordt door grotere deeltjes (>10 µm), de concentratie (n/ml) door kleine deeltjes (<10 µm).

Uit de onderlinge vergelijking tussen lokaties bleek dat gedurende het gehele jaar 2001 op Noordwijk 2 de hoogste biomassa (concentratie) aanwezig was en dat van de 6 lokaties op Terschelling 135 de laagste biomassa gevonden werd (ca 17x). Ook bleek dat gedurende het jaar 2001 op de lokatie Schaar van oude Doel de grootste aantallen deeltjes met chlorofyl-a gevonden zijn, gevolgd door Noordwijk 2, Vlissingen en Noordwijk 10 en vervolgens Zijpe en tenslotte Terschelling 135, waar het minst aantal deeltjes met chlorofyl-a is aangetroffen. De toepassing van tijdsgeïntegreerde berekende waarden van

concentraties en biomassa bleek een goed inzicht te geven in de onderlinge vergelijking van resultaten.

Een vergelijking tussen aantallen clusters gevonden met flowcytometrie en soorten met microscopie toonde redelijke overeenkomsten, maar het hoge aantal deeltjes kleiner dan 10 μm stoort de vergelijking met microscopie. Veelal worden met behulp van flowcytometrie deeltjes kleiner dan 10 μm gedetecteerd, waarvan uit imaging in flow opnames is gebleken dat ze niet toegeschreven kunnen worden aan herkenbare soorten, maar aan zeer kleine autotrofe cellen en/of detritus met ingesloten algen of chlorofyl-a bevattende deeltjes. Deze kleinste deeltjes worden niet of nauwelijks meegeteld bij microscopische tellingen. Voor een aanvullende vergelijking met microscopie is het zinvol om, evenals bij de microscopische analyse, een voorconcentrerende of fractionering van deeltjes groter dan 10 μm uit te voeren. De flowcytometrische analyse van deze gefractioneerde monsters is nodig om de relatieve kleine aantallen van deeltjes groter dan 10 μm vast te stellen en een concentratie te bepalen, die als aanvulling op de microscopische waarnemingen gebruikt kan worden.

Een opvallende conclusie is dat detritus (ook grotere vlokken detritus) voor een groot deel bleek bij te dragen aan de totaalconcentratie of totaalbiomassa deeltjes (met chlorofyl-a). Iets wat met een microscopische analyse niet inzichtelijk gemaakt kan worden.

1. Inleiding

1.1 Dit verslag

In dit verslag worden de resultaten van fytoplanktonanalyses, die met behulp van flowcytometrie zijn uitgevoerd, van juli tot en met december 2001 van zes lokaties behorende tot het MWTL programma, gerapporteerd en besproken. Eerder dit jaar zijn de flowcytometrische resultaten uit de eerste helft van het jaar 2001 ook verschenen (Rapport RIKZ/2003.012). De resultaten van 2000 en 2001 zijn uitgevoerd op de EurOPA n.s. flowcytometer met een 'imaging in flow' module, waarmee digitale foto's van algen gemaakt kunnen worden. Het streven is door middel van een schriftelijke rapportage binnen 2 maanden een overzicht en opvallende resultaten toe te lichten van de fytoplanktongegevens over elke helft van het monitoringsjaar. Eerder en aktueller kwam een groot deel van de in dit verslag gepresenteerde resultaten beschikbaar via een website voor de interne RIKZ-gebruiker (binnen 48 uur na monstername). In 2002 zal dit ook voor externe geïnteresseerden via internet beschikbaar komen.

Het **doel** van de fytoplanktonmonitoring is tweeledig:

- *de invloed van het menselijk handelen op het ecosysteem op de lange termijn kwalitatief (soortensamenstelling) dan wel kwantitatief (biomassa, soortenconcentraties) vast te stellen.*
- *het verkrijgen van informatie over de in de Nederlandse wateren voorkomende giftige algensoorten of soorten die plagen of bloeien veroorzaken, zoals bijvoorbeeld de 'schuimvormer' *Phaeocystis* sp.*

De bevindingen van fytoplanktonmonitoring binnen het MWTL-programma vormen een **drietraps-rapportage**.

- ❖ Een zeer snelle rapportage van monitoringsgegevens binnen 48 uur, die via een website bekeken kan worden (flowcytometrie en snelle tellijst microscopie)
- ❖ Een halfjaarlijkse uitgebreidere evaluerende rapportage van de eerste of tweede helft van een kalenderjaar (flowcytometrie, snelle microscopie welke binnen twee maanden verschijnt)
- ❖ Een uitgebreide éénjaarlijkse rapportage fytoplankton (microscopie).

1.2. Wat is nieuw in dit rapport?

Nieuw in dit rapport ten opzichte van de eerste rapportage in 2001 is dat de datasets uitgebreider en in relatie met elkaar zijn onderzocht. Zo worden relaties tussen pigmentgroepen onderzocht en worden tijdsgeïntegreerde concentraties en biomassa's over het gehele jaar berekend per lokatie zodat de onderlinge relaties vergeleken kunnen worden. Nieuw is ook dat de snelle microscopische tellijsten gekoppeld zijn aan flowcytometer resultaten voor deeltjes groter dan 5 µm. Voor Noordwijk 10 is een clusteranalyse uitgevoerd, waarbij het aantal gevonden clusters vergeleken is met het microscopisch gevonden aantal soorten. Ook worden in deze rapportage alle autotrofe fytoplanktonconcentratie vanaf de fracties > 10 µm in de bekende fractiegroottes gepresenteerd, omdat verwacht wordt dat deze concentraties dicht bij de concentraties zullen liggen die voor microscopie gangbaar zijn. Daarnaast wordt uitvoeriger ingegaan op de vergelijking tussen flowcytometrische resultaten uit 2001 met 2000.

Er worden in deze rapportage geen resultaten van de digitale foto-opnames (imaging in flow) behandeld, omdat het maken van deze foto's vanaf juli gestopt is. In het vorige rapport is immers geconcludeerd dat gebruik van de snelle microscopische analyse efficiënter is.

Verder zullen de nieuwste resultaten op innovatief gebied ten aanzien van flowcytometrie bij het RIKZ kort worden toegelicht (RIKZ project TNWMILLAB) als ook de visie op flowcytometrie.

2. Materialen en Methoden

2.1 Beschrijving gehanteerde materialen en methoden

De gehanteerde methoden en gebruikte materialen ten behoeve van de analyses uit de periode juli tot en met december 2001 zijn ongewijzigd en beschreven in het rapport van de flowcytometrische halfjaarlijkse rapportage januari-juni 2001 (RIKZ/2003.012).

Imaging in flow is in de tweede helft van 2001 niet toegepast.

2.2 Uitwerken gegevens

Van elke analyse wordt een geautomatiseerde standaardrapportage gemaakt en zijn de rapportages en grafieken van de resultaten via een webbrowser per lokatie te bekijken via W:\flowcyto\aktueel\monitoring.htm. Van alle lokaties zijn tevens de subfracties < 5 µm en 5-10 µm verwijderd uit de dataset en is verder gerekend met de overgebleven dataset voor clusteranalyse en de concentratie-fractiegrootteverdeling

De microscopische snelle tellijstresultaten van drie lokaties (N10, N2, TS135) zijn geïnventariseerd en op lokatie gesorteerd en gebruikt ter vergelijking met de flowcytometrische resultaten.

In dit rapport wordt voorafgaand aan de presentatie van de resultaten per lokatie een korte samenvattende beschrijving gegeven, waarin de algemene trends beschreven zijn.

2.2.1. Globale trends

De globale trends in 2001 worden uitgesplitst in een aantal grafieken:

- ◆ de concentraties van deeltjes met chlorofyl-a uitgesplitst in 17 groottefracties (n/ml.fractie)
- ◆ de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentraties van deeltjes met chlorofyl-a uitgesplitst in 17 groottefracties ($\% n_{\text{fractie}}/n_{\text{totaal}}$)
- ◆ de concentraties chlorofyl-a/ml (biomassa) uitgesplitst in 17 groottefracties (linFGR/ml.fractie)
- ◆ de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentratie chlorofyl-a/ml uitgesplitst in 17 groottefracties ($\% \text{linFGR/ml.fractie/totaal-linFGR/ml}$)
- ◆ de concentraties biovolume (van deeltjes met chlorofyl-a)/ml uitgesplitst in 17 groottefracties (linFLS/ml.fractie)
- ◆ de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentratie biovolume/ml uitgesplitst in 17 groottefracties ($\% \text{linFLS/ml.fractie/totaal-linFLS/ml}$)
- ◆ de concentraties van deeltjes met chlorofyl-a EN fycobiliproteinen uitgesplitst in 17 groottefracties ($n_{(\text{FGR}>0\&\text{FGO}>0)}/\text{ml.fractie}$)
- ◆ de concentraties van deeltjes met chlorofyl-a, chlorofyl-b EN fycocyanine uitgesplitst in 17 groottefracties ($n_{(\text{FGR}>0\&\text{FGO}>0)}/\text{ml.fractie}$)

2.2.2 Vergelijking met microscopie

Een globaal overzicht van de abundante numerieke deeltjes, die gevonden zijn met de snelle microscopische methode zijn in een tabel gepresenteerd. Een vergelijking tussen microscopie en flowcytometrie wordt gemaakt voor Noordwijk 10, Noordwijk 2 en Terschelling 135.

2.2.3 Uitwerken in scatterplots

Per deeltje worden 6 getalwaarden vastgelegd overeenkomend met de optische eigenschappen van elk deeltje. Door middel van scatterplot-presentaties worden de optische eigenschappen van fytoplanktondeeltjes ten opzichte van elkaar uitgezet. Deeltjes met gelijke optische eigenschappen vormen (in scatterplots) clusters. Verschillende clusters van fytoplanktondeeltjes vertegenwoordigen verschillende groepen met karakteristieke optische eigenschappen (bijv. pigmenten). Dit proces van clusteren vindt geautomatiseerd en objectief met behulp van in MATLAB geschreven algoritmes plaats (clusterfcm (v5.0) en fcluster (v3.0b) instelling 50,8). Alvorens te clusteren worden de analysefiles door een digitaal filter (fsieve (v1.0) instelling (1.58,5,5)) gehaald, waarbij alle deeltjes kleiner dan 5 of 10 μm uit de dataset worden verwijderd. Dit om de vergelijking met microscopie, waarbij deeltjes $< 5 \mu\text{m}$ visueel nauwelijks waargenomen worden, eenvoudiger te maken en omdat bij de flowcytometrische analyse blijkt dat deze kleinste deeltjes numeriek dominant zijn en de relatieve bijdragen van grotere deeltjes daardoor ondergesneeuwd raakt. Op grond van de gevonden clusters werd een onderverdeling in talrijkheid gemaakt naar analogie van de snelle microscopische analyse. De resultaten van clustering zijn voor Noordwijk 10 vergeleken met de microscopische resultaten.

3. Resultaten

3.1 Noordwijk 10

3.1.1 Algemene trends

De **totaalconcentratie autotrofe deeltjes** wordt in de tweede helft van 2001 gekenmerkt door een nog hogere bijdrage van kleine deeltjes ($<10\ \mu\text{m}$) dan de eerste helft van 2001. De hoogste concentraties (120.000 – 170.000 d/ml) worden gevonden in juli met een maximum midden juli (wk 29). De hoge concentraties zijn circa 5-maal hoger dan de hoogste, die gevonden zijn in het voorjaar van 2001. Na de hoogste bloeipiek in week 29, wordt in week 30 een zeer lage concentratie gevonden ($<10.000\ \text{d/ml}$). Daarna klimt de concentratie geleidelijk naar 80.000 d/ml midden augustus. Vanaf dan neemt de concentratie af en schommelt vanaf september rond de 20.000 d/ml en lager. De relatieve hoeveelheid deeltjes kleiner dan $5\ \mu\text{m}$ neemt af tot circa 50%.

De **biomassa** heeft in de tweede helft van het jaar een grillig verloop met drie periodes met hogere biomassa, die allen rond een waarde van $1,5 \times 10^9\ \text{a.u./ml}$ uitkomen. De eerste in juli vooral veroorzaakt door relatief kleinere deeltjes. Begin augustus de tweede periode met iets grotere deeltjes ($75\text{--}500\ \mu\text{m}$) en de derde periode met een grote bijdrage (ca 40%) van zeer lange (grote) deeltjes ($750\text{--}1000\ \mu\text{m}$). In de weken 30 en 31 (tweede periode) is de biomassa in week 31 weliswaar driemaal hoger dan in week 30, maar is de relatieve bijdrage van de grootteklassen nagenoeg dezelfde. Vanaf september daalt de biomassa (exponentieel?) naar lage waarden (ca $1 \times 10^8\ \text{a.u./ml}$) en daalt ook het relatieve aandeel van grotere deeltjes. In de tweede helft van 2001 worden aanmerkelijk lagere biomassa's gevonden en is het aandeel grotere deeltjes geringer dan de eerste helft van het jaar.

Het verloop van het **biovolume** uitgedrukt in de linFLS/ml parameter toont grote overeenkomst met het verloop van het totaalconcentratieverloop, behalve dat de bijdrage van grotere deeltjes iets nadrukkelijker in het biovolume naar voren komt. Dit is bijvoorbeeld zichtbaar in de periode eind augustus/begin september.

De hoogste **concentratie deeltjes met fycobiliproteinen** (oranje fluorescerend vooral afkomstig van het pigment fycoerithrine) worden midden juli geconstateerd. Midden juni (zie rapportage eerste helft 2001) werd al een toename waargenomen van 2000 naar 10.000 d/ml via 20.000 naar 140.000 d/ml midden juli. Eind juli is de concentratie plots weer laag ($<1000\ \text{d/ml}$). In augustus wordt weer een lichte stijging waargenomen. De hoge totaalconcentratie autotrofe deeltjes midden juli, maar ook midden augustus wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door deze oranje kleine fluorescerende deeltjes.

De **concentratie deeltjes met fycocyanine-chlorofyl-b** laat een stijging naar een relatief hoge waarde zien midden juli (ca 35 000 d/ml). Midden augustus wordt de hoogste concentratie van het gehele jaar gevonden (45 000 d/ml).

Een vergelijking tussen de jaren **2000 en 2001** vertoont opvallende overeenkomsten. De hoogste concentratie deeltjes is in beide jaren ca 160.000 d/ml. Deze bloeipiek wordt voornamelijk door oranje fluorescerende deeltjes veroorzaakt, die in 2001 één maand later tot bloei zijn gekomen. Na deze

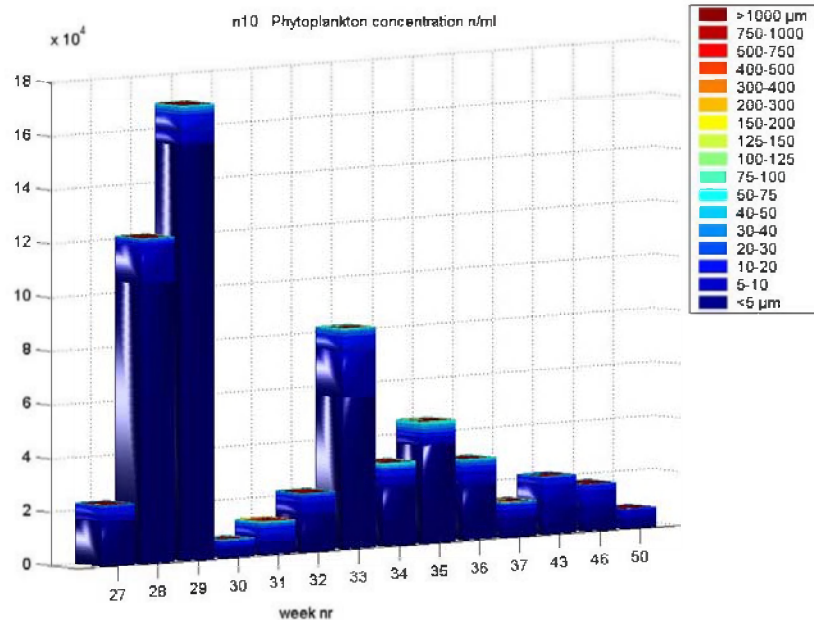
bloeipiek wordt in beide jaren een zeer sterke daling van de totaalconcentratie waargenomen. Daarna is het concentratieverloop en de absolute waarde ervan redelijk onderling vergelijkbaar. Ook het biomassa-verloop is tussen beide jaren goed vergelijkbaar in absolute zin, maar ook de relatieve bijdragen in de volgorde van eerst kleinere, vervolgens middelgrote en tenslotte zeer grote deeltjes in de zomer. Ook het verloop van de oranje fluorescerende deeltjes toont goede gelijkenis, namelijk in beide jaren een hoogste concentratie rond de 140.000 d/ml, weliswaar één maand verschoven in tijd. In beide jaren wordt een lichte stijging naar 30.000/ml eind augustus-begin september waargenomen.

*Uit de resultaten van de **microscopische tellijsten** blijkt dat Noordwijk 10 in de periode augustus t/m eerste helft september vooral gedomineerd wordt door *Chaetoceros socialis* en vanaf deze periode door *Paralia marina*. In deze tweede helft worden ook regelmatig de soorten *Rhizosolenia* sp. en *Thalassiosira* sp. en *Myrionecta* (vroeger *Mesodinium*) *rubrum* dominant aanwezig gevonden. De flowcytometrische selectie van deeltjes groter dan 10 µm geeft een concentratieverloop dat afwijkt van het totaalconcentratieverloop (dus met kleine deeltjes) en verloopt van kleiner dan 2000 deeltjes/ml in december tot 8500 d/ml midden juli.*

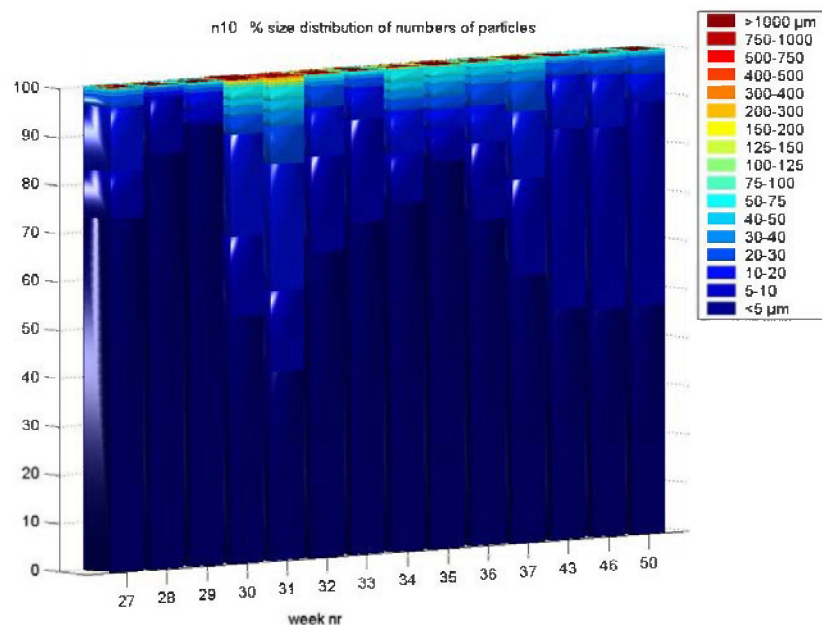
3.1.2 Flowcytometrische fytoplanktonconcentraties Noordwijk 10

Fytoplanktonconcentratie: de totaalconcentraties van deeltjes met chlorofyl-a zijn uitgesplitst in 17 groottefracties (deeltjes/ml.fractie) in FIGUUR 3.1.1 en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentraties van deeltjes met chlorofyl-a uitgesplitst in 17 groottefracties ($\% \text{ n.fractie}/\text{n}_{\text{totaal}}$) in FIGUUR 3.1.2.

FIGUUR 3.1.1
Concentratie autotrofe
deeltjes (met chlorofyl-a)
per lengtefractie

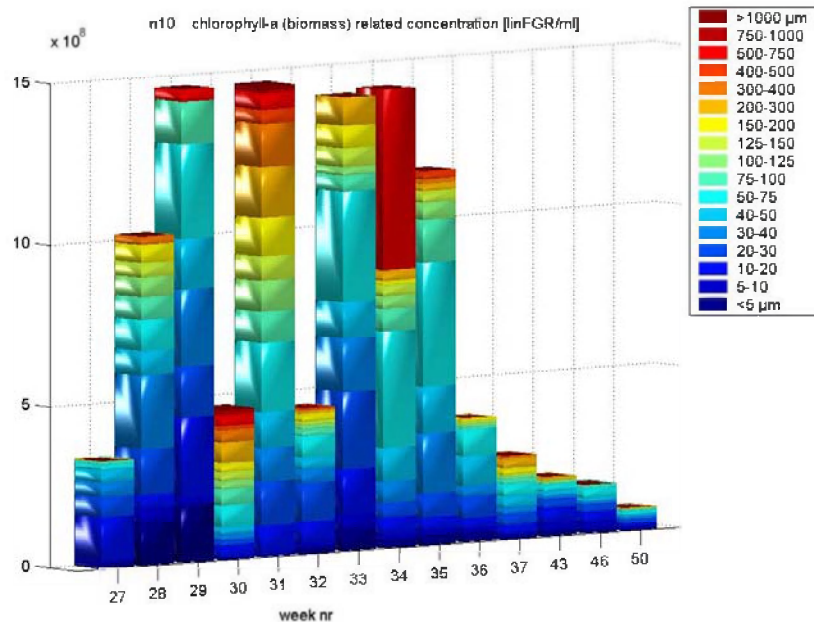


FIGUUR 3.1.2
Concentratie autotrofe
deeltjes (met chlorofyl-a)
per lengtefractie

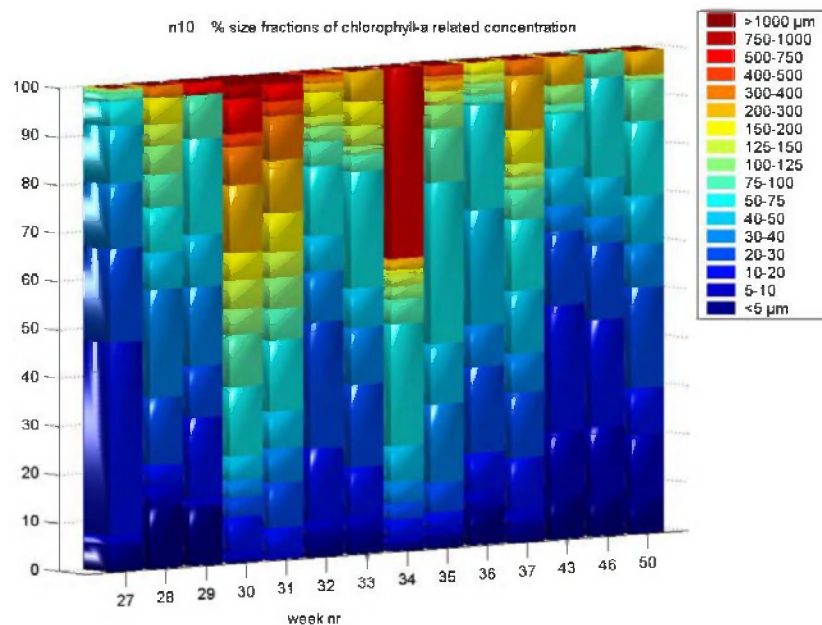


De **chlorofyl-a/ml concentraties** (biomassa) of flowcytometrische linFGR/ml variabele is uitgesplitst in 17 groottefracties (linFGR/ml.fractie) (FIGUUR 3.1.3) en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentratie chlorofyl-a/ml uitgesplitst in 17 groottefracties (% linFGR/ml.fractie/totaal-linFGR/ml) in FIGUUR 3.1.4.

FIGUUR 3.1.3
Totale LinFGR/mL
(chlorofyl-a/m l) per
lengtefractie

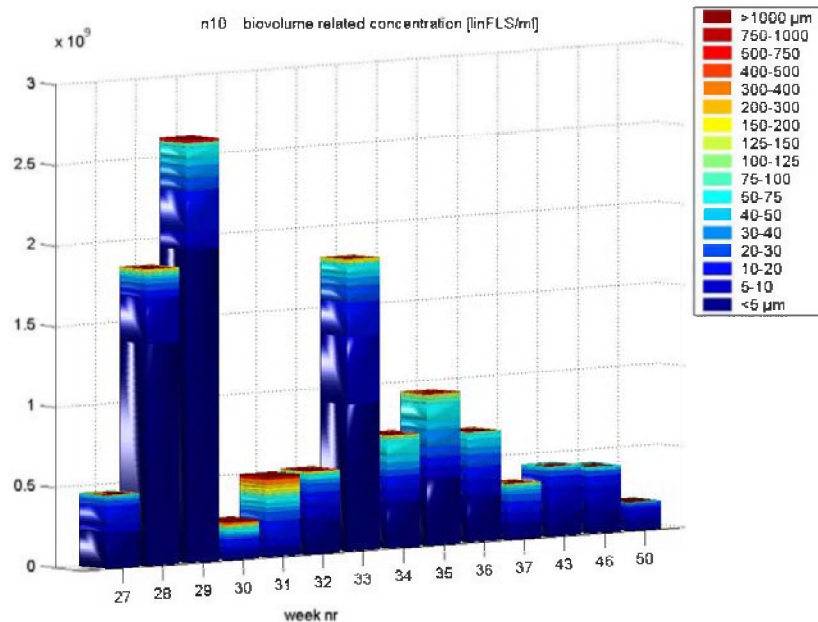


FIGUUR 3.1.4
% LinFGR/ml per
lengtefractie

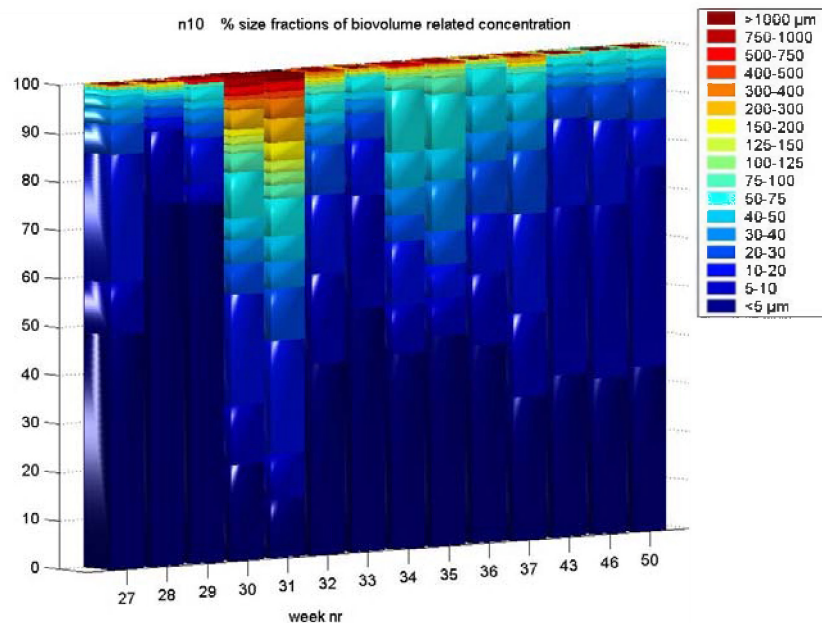


De **biovolumeconcentraties** (van deeltjes met chlorofyl-a)/ml uitgesplitst in 17 groottefracties (linFLS/ml.fractie) is weergegeven in FIGUUR 3.1.5 en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentratie biovolume/ml uitgesplitst in 17 groottefracties (% linFLS/ml.fractie/totaal-linFLS/ml) in FIGUUR 3.1.6.

FIGUUR 3.1.5
Totale LinFLS/ml per
lengtefractie Noordwijk 10

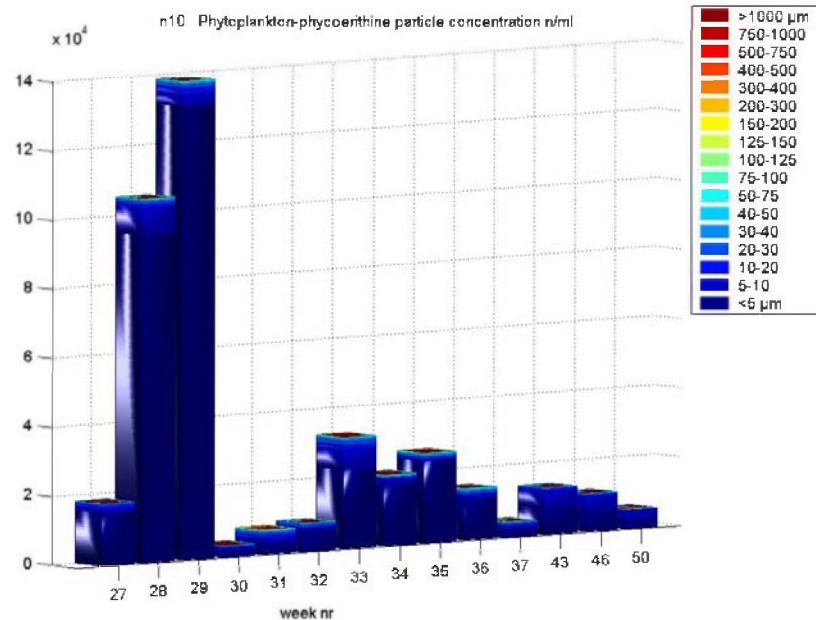


FIGUUR 3.1.6
Totale LinFLS/ml per
lengtefractie Noordwijk 10

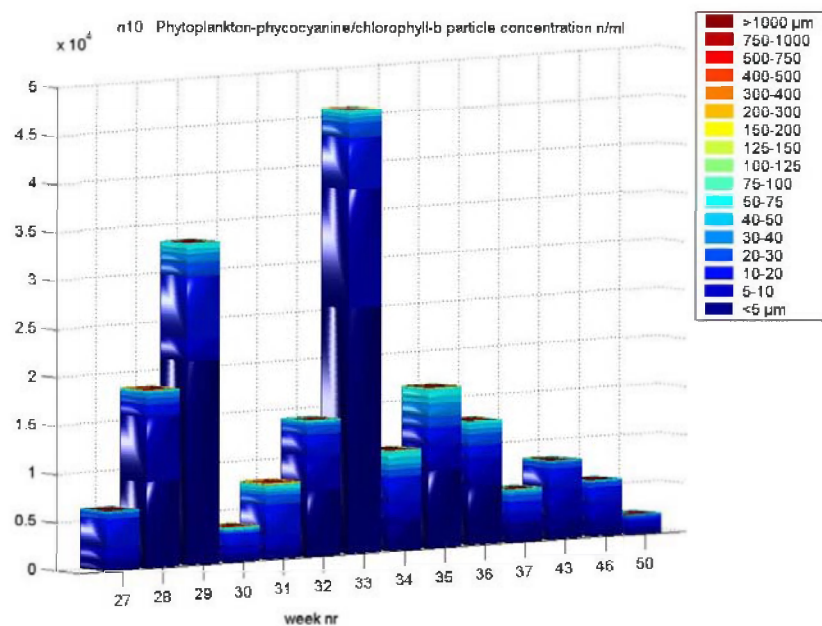


De concentraties van deeltjes met chlorofyl-a EN **fycobiliproteïnen** uitgesplitst in 17 groottefracties ($n_{(FGR>0 \& FGO>0)}$ /ml.fractie) is gepresenteerd in FIGUUR 3.1.7 en de concentraties van deeltjes met chlorofyl-a EN **fycocyaninen-chlorofyl-b** in FIGUUR 3.1.8.

FIGUUR 3.1.7
Absolute
deeltjesconcentratie van
deeltjes met FGR & FGO



FIGUUR 3.1.8
Absolute
deeltjesconcentratie van
deeltjes met FGR & FRR



3.1.3 Snelle microscopische analyse

De resultaten van de snelle microscopische tellingen over de tweede helft van 2001 zijn samengevoegd in onderstaande tabel 3.1. De plussen in de tabel geven aan in welke mate deeltjes gevonden zijn waarbij drie klassen onderscheiden worden: '+++' >10% (meer dan 10 van de 100), '++' >5% en < 10%, '+' >2% en <5%.

TABEL 3.1

Resultaten van de
snelle microscopische
tellingen

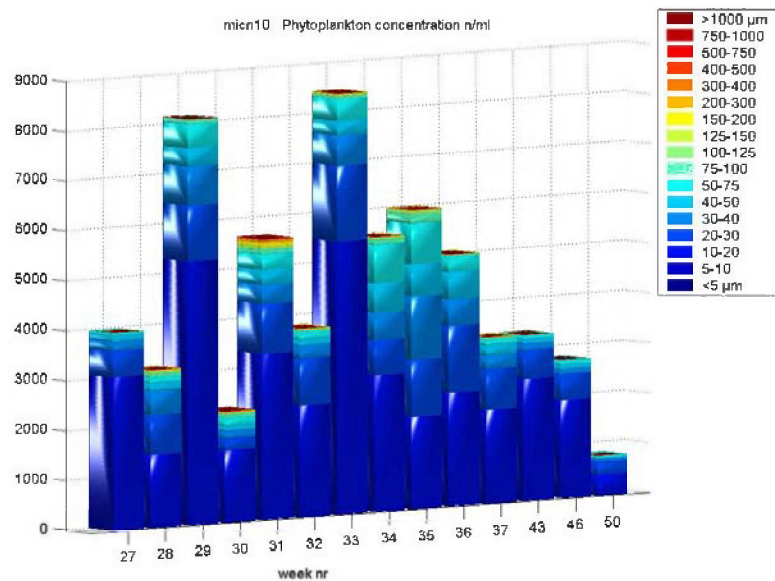
NOORDWIJK 10 - 2001	Week no.													
Algensoort	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	43	46	50
Actionoptychus senarius										+	+		+	++
Asterionella glacialis											++			
Brockmanniella brockmannii										++	++		+++	
Ceratium fusus						+	++							
Chaetoceros			+++		+	+								
Chaetoceros debilis				++			+	+++						
Chaetoceros costatus							+							
Chaetoceros socialis			+	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	++		+	
Chrysochromulina	+				+	+			+					
Cylindrotheca closterium						+							+	
Cryptophyceae	+		+							++				
Cyclotella			+											
Delphineis minutissima										++		+++	++	+++
Detonula pumila			+											
Dinophyceae cyste										+				
Dinophysis acuminata					+++									
Diplopsalis gr.	+				+									
Ditylum brightwellii											+			
Eucampia zodiacus	+++										+			
Eunotogramma dubium													+	
Gonyaulax spinifera						+								
Guinardia flaccida						++	+++							++
Gymnodinium	+													
Gymnodiniaceae					+									
Gymnodiniaceae 10-30 µm			+											
Gyrodinium calyptoglyphe														+
Gyrodinium spirale	+													
Heterocapsa minima									+					
Heterosigma akashiwo							+							
Heterosigma triquetra	+													
Lauderia annulata	+++													
Leptocylindricus minimus						++								
Myrionecta rubra		+++		+++	+++									
Odontella aurita var. minima			+							+	++			
Paralia marina		+	+			+		+		+++	+++	+++	+++	+++
Phaeocystis kolonie								+			+			
Pleurosigma										+				
Prorocentrum micans					+	+								
Prorocentrum minimum						+	+++	+						
Prorocentrum triestinum									+					
Protoperidinium 30 - 50 µm					++									
Protoperidinium bipes							+							
Protoperidinium minutum	+									++				
Protoperidinium subinermis	+++					+								
Pseudonitzschia pungens cf			+	+++						+				
Rhaphoneis amphiceros										+				+
Rhizosolenia delicatula			+	+++			+++	++			+			+++
Rhizosolenia shrubsolei				+++	+++									
Roperia tessellata														+
Scrippsiella					+		+		+					
Thalassionema nitzschioides													+++	+++
Thalassiosira <30 µm						+++		+		+	+++	+	+++	+++
Thalassiosira 30-80 µm										+				
Thalassiosira punctigera										++	+++		+	
Thalassiosira rotula	+													

3.1.4 Fytoplanktonconcentratie van deeltjes groter dan 10 µm

De flowcytometrische totaalconcentraties van deeltjes met chlorofyl-a > 10 µm zijn uitgesplitst in 15 groottefracties (deeltjes/ml.fractie) in FIGUUR 3.1.9, waarbij de fracties < 5 µm en 5-10 µm verwijderd zijn uit de dataset. De legenda laat nog wel de fracties <5 en 5-10 µm zien, maar de eerste balk in de figuur is de fractie deeltjes 10-20 µm. Dit is gedaan om de kleur per fractie niet te laten veranderen ten opzichte van andere grafieken.

FIGUUR 3.1.9

Absolute
deeltjesconcentratie van
deeltjes **groter dan 10 µm**
met FGR (chlorofyl-a)



3.2 Noordwijk 2

3.2.1 Algemene trends

De **concentratie autotrofe deeltjes** is op Noordwijk 2 midden juli de hoogste (ca 110.000 d/ml) van de tweede helft van 2001. Alleen begin mei (zie rapportage eerste helft 2001) wordt een hogere concentratie gevonden. Wederom wordt, net als bij Noordwijk 10, de totaalconcentratie gedomineerd (>50 %) door deeltjes < 10 µm. Ten opzichte van Noordwijk 10 zijn de concentratie op Noordwijk 2 over het algemeen lager.

Begin augustus wordt de hoogste **biomassa** geconstateerd ($1,5 \times 10^9$ a.u./ml), die vooral veroorzaakt wordt door lange/grote deeltjes. Daarna daalt de biomassa gestaag naar een laagste waarde eind oktober (wk 43). De gevonden biomassa's in de tweede helft van het jaar zijn veel lager dan in de eerste helft van het jaar. De biomassa in wk 31 is circa 9-maal lager dan de hoogste biomassa in het voorjaar van 2001.

Voor het **biovolume** (uit linFLS/ml) wordt eenzelfde beeld gevonden als het totaalconcentratieverloop alleen is de invloed van middelgrote deeltjes iets groter.

De **concentratie deeltjes met fycobiliproteinen** (fycoerithrine) zijn het hoogst midden juli, net als op Noordwijk 10, met een waarde van ongeveer 90.000 d/ml, lager dan Noordwijk 10. De totaalconcentratie autotrofe deeltjes wordt voornamelijk bepaald door deze deeltjes.

De **concentratie deeltjes met fycocyanine-chlorofyl-b** zijn midden juli, midden en eind augustus het hoogst, namelijk ongeveer 20.000 d/ml. In de overige perioden is de concentratie 10.000 d/ml of lager.

Ten opzichte van **2000** valt op dat de hoge concentratie van begin mei 2001 afwezig was in 2000 en dat de hoge (door oranje fluorescerende deeltjes veroorzaakte) aantallen-bloei piek midden juli in 2001, in 2000 één maand eerder heeft plaats gevonden, maar dat de orde grootte nagenoeg gelijk is (110.000 d/ml t.o.v. 100.000 d/ml). Het biomassa verloop van 2000 vertoont lichte overeenkomsten met 2001. Namelijk voorjaarsbloei rond de waarden $1-1,5 \times 10^9$ a.u./ml en in beide jaren een augustusbloei van met name deeltjes met grote lengtes (3×10^9 (2000) t.o.v. $1,5 \times 10^9$ a.u./ml). De oranje fluorescerende deeltjes zijn in orde grootte redelijk vergelijkbaar namelijk 65 000 d/ml in 2000 ten opzichte van 90.000 d/ml in 2001.

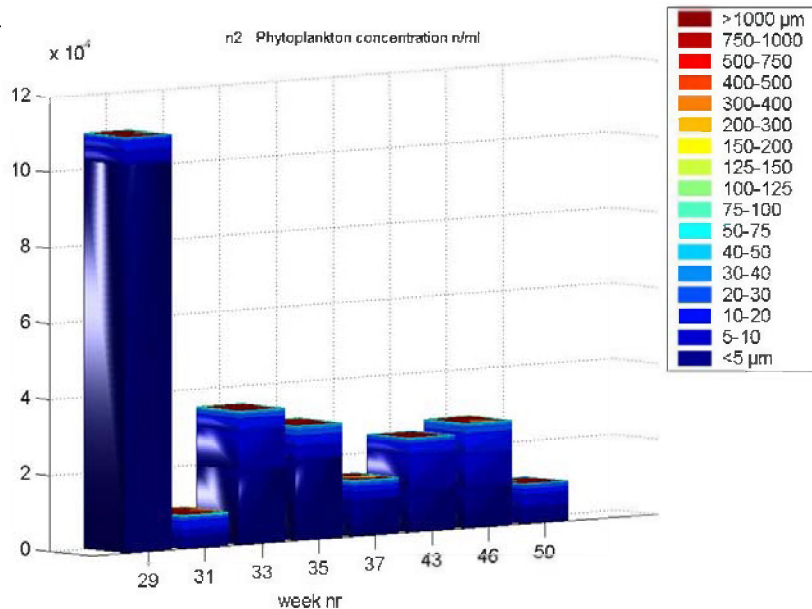
Uit de **microscopische snelle analyseresultaten** valt op dat de soorten *Chaetoceros* sp., *Delphineis minutissima*, *Paralia marina*, *Rhizosolenia* sp. en *Thalassiosira* sp. regelmatig dominant aanwezig zijn. Deze soorten zijn ook gevonden op Noordwijk 10. De concentratie van deeltjes > 10 µm, die bepaald zijn uit flowcytometrische gegevens, varieert in deze periode tussen 3000/ml en 8000/ml.

3.2.2 Flowcytometrische fytoplanktonconcentraties Noordwijk 2

Fytoplanktonconcentratie: De totaalconcentraties van deeltjes met chlorofyl-a zijn uitgesplitst in 17 groottefracties (deeltjes/ml.fractie) in FIGUUR 3.2.1 en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentraties van deeltjes met chlorofyl-a uitgesplitst in 17 groottefracties (% n.fractie/ n_{totaal}) in FIGUUR 3.2.2.

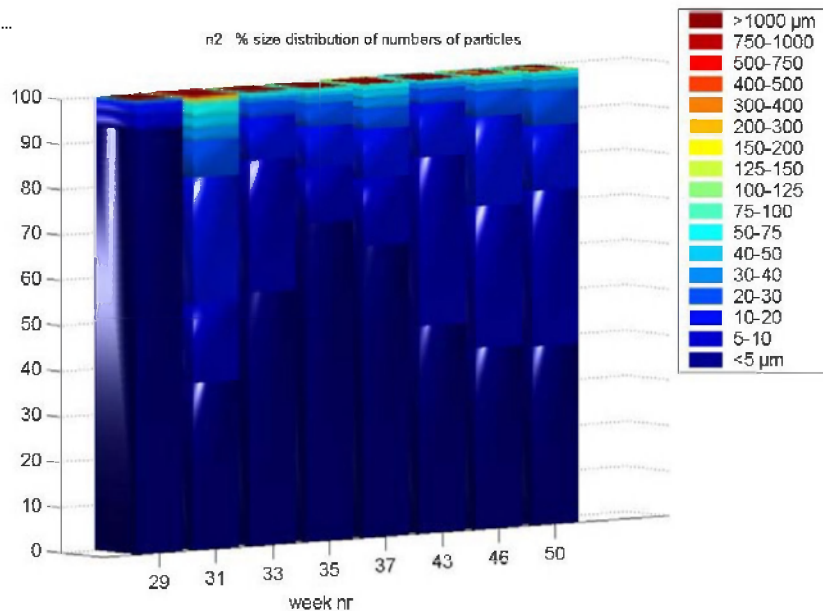
FIGUUR 3.2.1

Concentratie autotrofe deeltjes (met chlorofyl-a) per lengtefractie



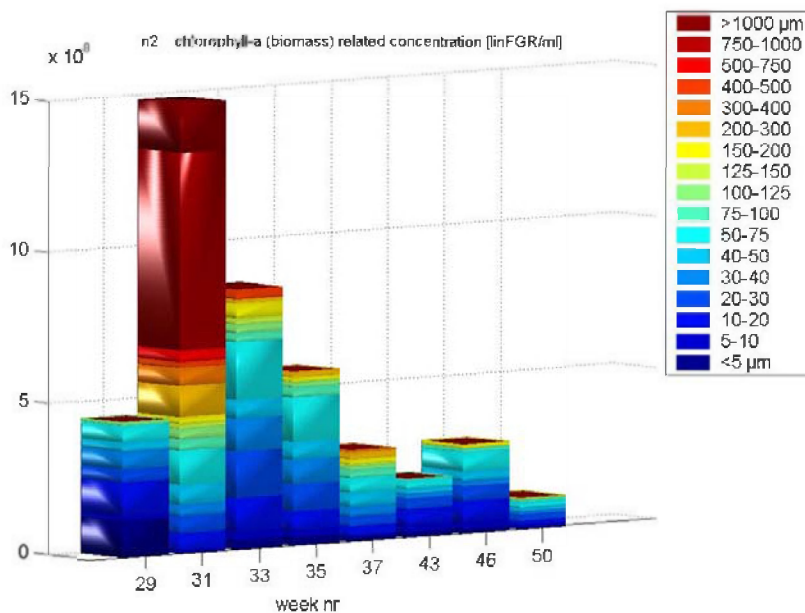
FIGUUR 3.2.2

% Aantal autotrofe deeltjes met chlorofyl-a per lengtefractie

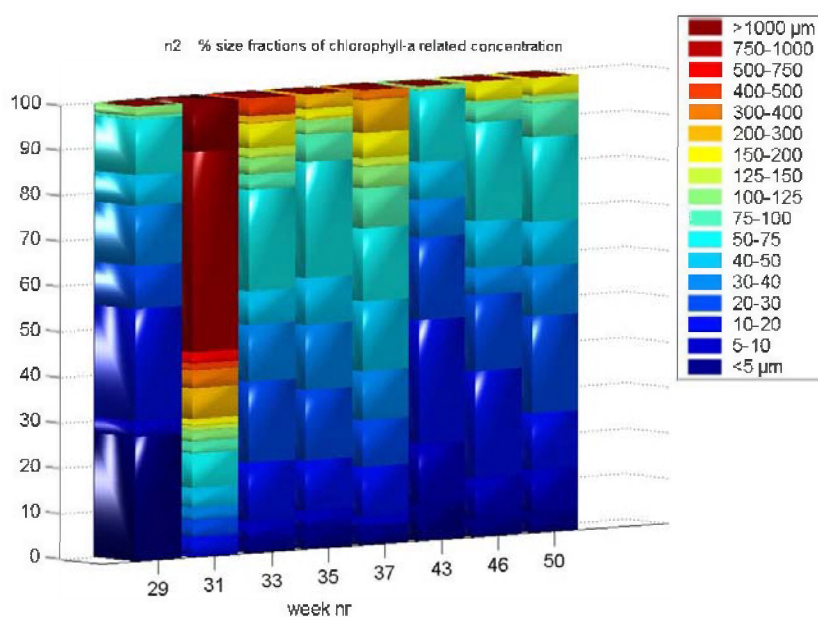


De **chlorofyl-a/ml concentraties** (biomassa) of flowcytometriscie linFGR/ml variabele is uitgesplitst in 17 groottefracties (linFGR/ml.fractie) (FIGUUR 3.2.3) en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentratie chlorofyl-a/ml uitgesplitst in 17 groottefracties in FIGUUR 3.2.4.

FIGUUR 3.2.3
Totale LinFGR/mL
(chlorofyl-a/m l) per
lengtefractie Noordwijk 2

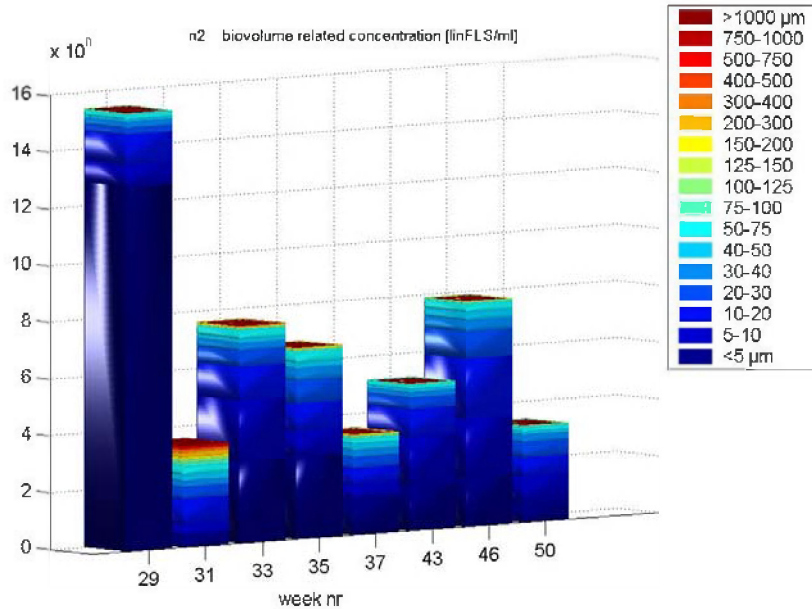


FIGUUR 3.2.4
% LinFGR/mL per
lengtefractie Noordwijk 2

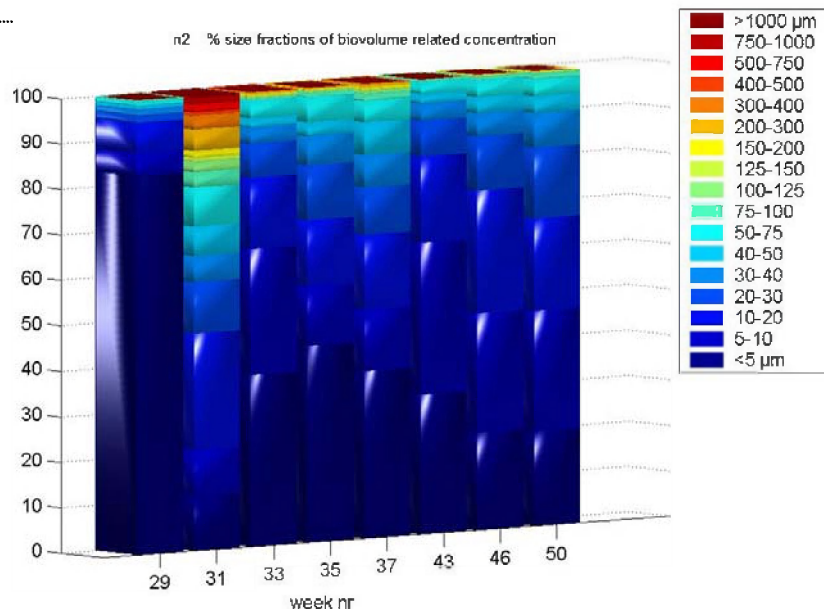


De **biovolumeconcentraties** (van deeltjes met chlorofyl-a)/ml uitgesplitst in 17 groottefracties (linFLS/ml.fractie) is weergegeven in FIGUUR 3.2.5 en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentratie biovolume/ml uitgesplitst in 17 groottefracties (% linFLS/ml.fractie/totaal-linFLS/ml) in FIGUUR 3.2.6.

FIGUUR 3.2.5
Totale LinFLS/ml per
lengtefractie Noordwijk 2

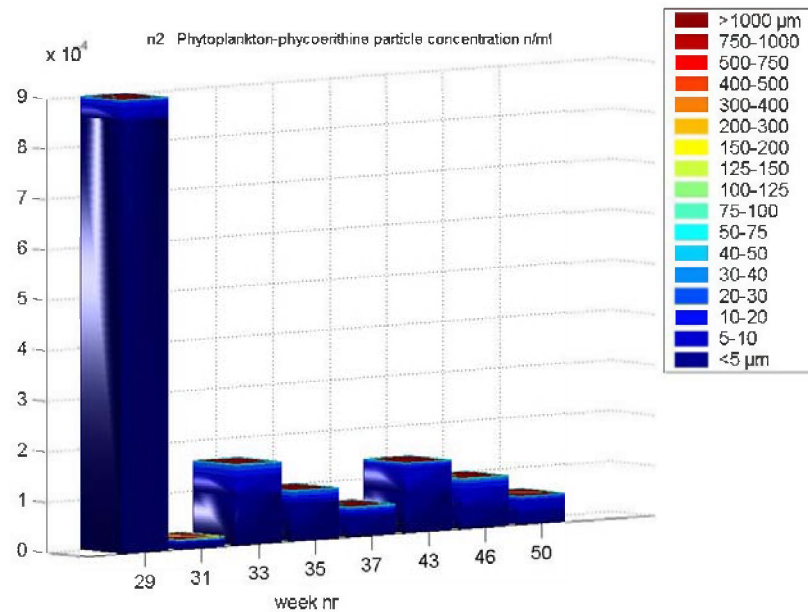


FIGUUR 3.2.6
% LinFLS/ml per
lengtefractie Noordwijk 2

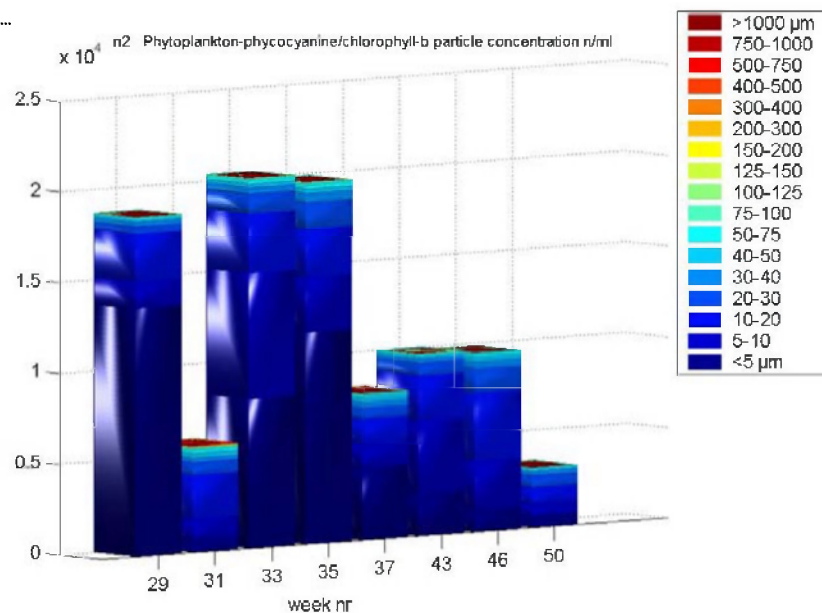


De concentraties van deeltjes met chlorofyl-a EN **fycobiliproteïnen** uitgesplitst in 17 groottefracties ($n_{(FGR>0 \& FGO>0)}$ /ml.fractie) is gepresenteerd in FIGUUR 3.2.7 en de concentraties van deeltjes met chlorofyl-a EN **fycocyaninen en chlorofyl-b** in FIGUUR 3.2.8.

FIGUUR 3.2.7
Absolute
deeltjesconcentratie van
deeltjes met FGR & FGO



FIGUUR 3.2.8
Absolute
deeltjesconcentratie van
deeltjes met FGR & FRR



3.2.3 Resultaten snelle microscopische analyse

In onderstaande tabel 3.2 zijn de resultaten gepresenteerd van de snelle microscopische tellingen. De plussen in de tabel geven de mate van talrijkheid van de aangetroffen deeltjes weer, waarbij '+++' >10%, '++' >5% en < 10%, '+' >2% en <5%.

TABEL 3.2

Resultaten van de snelle microscopische tellingen

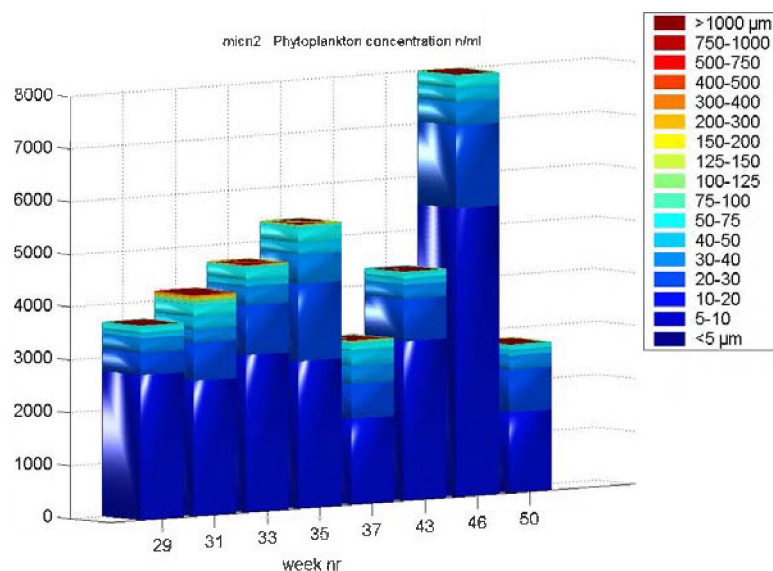
NOORDWIJK 2 - 2001	Week no.							
Algensoort	29	31	33	35	37	43	46	50
Actionoptychus senarius					+		+	
Brockmanniella brockmannii		+			+		+++	+++
Chaetoceros diadema								+
Chaetoceros	+++							
Chaetoceros socialis	+	+++	+	+++	+		+	+
Chrysochromulina			+	++	+			
Cylindrotheca closterium								+
Cryptophyceae	+		++					
Cyclotella	+							
Delphineis minutissima		+			++	+++	+++	+++
Detonula pumila	+							
Diplopsalis gr.		+						
Eunotogramma dubium								+
Guinardia flaccida			+++					
Gymnodiniaceae 10-30 µm	+							
Gymnodinium			+					
Heterosigma akashiwo			++					
Leptocylindricus danicus		+			+			
Leucocryptos marina						+		
Navicula			+					
Odontella aurita							+	
Odontella aurita var. minima	+				+			
Oxytoxum								
Paralia marina	+	+	+		+++	+++	+++	+++
Pennate diatomee								
Phaeocystis flagellaat			+	+				
Phaeocystis kolonie				+				
Plagiogrammopsis vanheurckii								+
Prorocentrum minimum			+++	+				
Protomonadales sp.								
Protoperidinium minutum			+		+			
Protoperidinium 30-50 µm		+						
Pseudonitzschia pungens cf.	+							
Rhaphoneis amphiceros						++		+
Rhizosolenia delicatula	+		+++	+	+			
Rhizosolenia shrubsolei		+++						
Scrippsiella			+++					
Thalassionema nitzschioides						+	++	+++
Thalassiosira <30 µm	+++		+	+	+++	+++	+++	+++
Thalassiosira 30-80 µm								+
Thalassiosira levanderi	++							
Thalassiosira punctigera					++			

3.2.4 Fytoplanktonconcentratie van deeltjes groter dan 10 µm

De flowcytometrische totaalconcentraties van deeltjes met chlorofyl-a > 10 µm zijn uitgesplitst in 15 groottefracties (deeltjes/ml.fractie) in FIGUUR 3.2.9. De fracties < 5 µm en 5-10 µm zijn verwijderd uit de dataset.

FIGUUR 3.2.9

Absolute
deeltjesconcentratie van
deeltjes **groter dan 10 µm**
met FGR (chlorofyl-a)



3.3 Terschelling 135

3.3.1 Algemene trends

De **totaalconcentratie deeltjes** met chlorofyl-*a* is in juli laag, namelijk ca 2000/ml, stijgt in augustus tot boven 8000/ml en heeft een hoogste concentratie in de periode midden oktober tot december van ca 12000 d/ml. De bijdrage van grotere deeltjes ($>20\ \mu\text{m}$) aan de totaalconcentratie is verwaarloosbaar. De concentratie in het laatste kwartaal (twee monsters) is op deze lokatie de hoogste van het gehele jaar 2001.

De **biomassa-concentratie** (LinFGR/ml) lijkt exponentieel te stijgen vanaf eind juli t/m midden oktober. Midden oktober wordt de hoogste waarde bereikt, namelijk 4×10^8 a.u./ml en tevens de hoogste van het gehele jaar. De hogere biomassa, die in oktober gevonden wordt is voor een groot deel veroorzaakt door enkele zeer grote deeltjes. Ter vergelijking: De hoogste biomassa, die in 2001 op Noordwijk 10 werd gevonden is $7,5 \times 10^8$ a.u./ml, dus ca 20-maal hoger.

Het **biovolume** (linFLS/ml) laat een constante toename zien vanaf eind juli. Ten opzichte van de totaalconcentratie is de bijdrage van grotere fracties iets duidelijker aanwezig.

Verhoogde concentraties van autotrofe **deeltjes met fycoerithrine** worden midden augustus en midden oktober waargenomen met concentraties rond de 5000 d/ml. Deze waarde is vergelijkbaar met de hoogste waarde, die in de eerste helft van 2001 (in januari) gevonden is. De totaalconcentratie deeltjes met fycoerithrine wordt vooral gedomineerd door kleine fracties ($<10\ \mu\text{m}$).

De concentratie van **autotrofe deeltjes met fycocyanine** laat een gestage stijging zien vanaf juli 1000 d/ml naar 3500 d/ml (midden augustus), naar 5000 d/ml (eind augustus) en tenslotte naar 6500 d/ml (midden oktober). De concentratie wordt vooral bepaald door de kleinste fracties ($<10\ \mu\text{m}$). De concentratie midden oktober is de hoogste van het gehele jaar 2001.

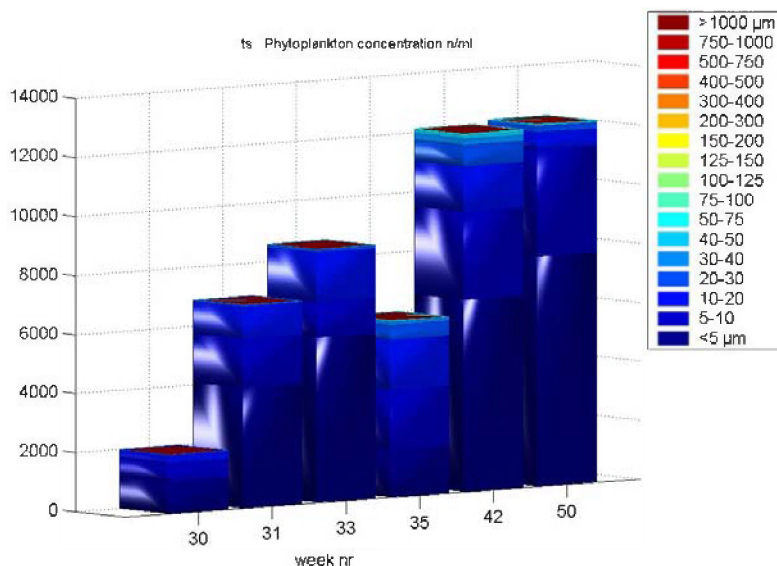
2001 resultaten versus 2000 resultaten tonen dat in beide jaren midden oktober de hoogste concentratie autotrofe deeltjes wordt gevonden. In 2000 was deze concentratie hoger (22.500 d/ml) dan in 2001 (12.000 d/ml). Tevens is de biomassa midden oktober in beide jaren het hoogst. In 2000 is de biomassa lager ($1,7 \times 10^8$ a.u./ml) ten opzichte van 2001 (4×10^8 a.u./ml). De relatief hoge bijdrage van grote deeltjes in 2001 lijkt hiervan de belangrijkste oorzaak. Midden mei wordt de tweede hoogste biomassa in beide jaren gevonden. In 2000 wederom lager (1×10^8 a.u./ml) ten opzichte van $1,8 \times 10^8$ a.u./ml in 2001. De deeltjes met fycoerithrine zijn tevens midden oktober het talrijkst in beide jaren, hoewel in 2000 de concentratie veel hoger was (13.500 d/ml) dan in 2001 (5000 d/ml). In 2001 wordt midden augustus een bloeipiek geconstateerd, die in 2000 niet wordt waargenomen.

Uit de **microscopische snelle tellijsten** volgt dat de soorten *Chrysochromulina*, *Ceratium fusus*, *Emiliana huxleyi*, *Gymnodinium* en *Thalassiosira* sp. regelmatig in hogere aantallen aangetroffen zijn op deze lokatie. De gevonden flowcytometrische concentraties geselecteerd op fytoplankton $> 10\ \mu\text{m}$, schommelt van 250 (eind juli) tot 2600 (eind augustus).

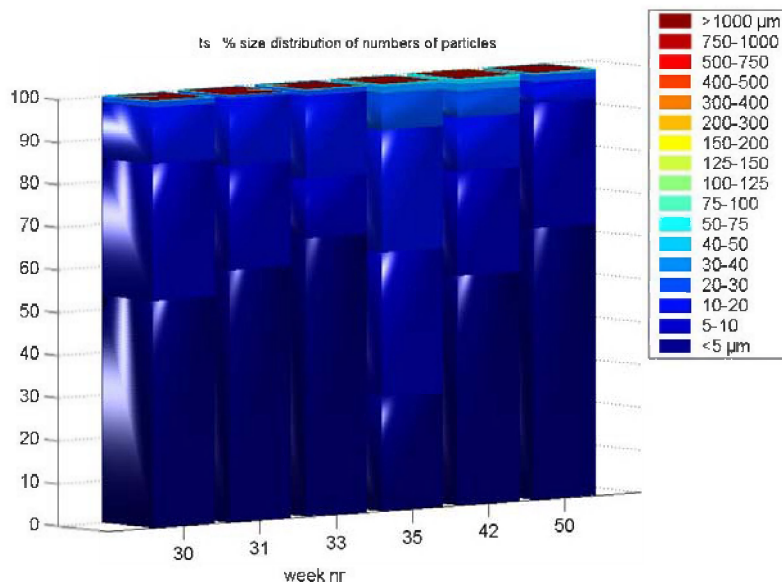
3.3.2 Flowcytometrische fytoplanktonconcentraties Terschelling 135

Fytoplanktonconcentratie: De totaalconcentraties van deeltjes met chlorofyl-a zijn uitgesplitst in 17 groottefracties (deeltjes/ml.fractie) in FIGUUR 3.3.1 en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentraties van deeltjes met chlorofyl-a uitgesplitst in 17 groottefracties ($\% \text{ n.fractie} / \text{n}_{\text{totaal}}$) in FIGUUR 3.3.2.

FIGUUR 3.3.1
Concentratie autotrofe
deeltjes (met chlorofyl-a)
per lengtefractie

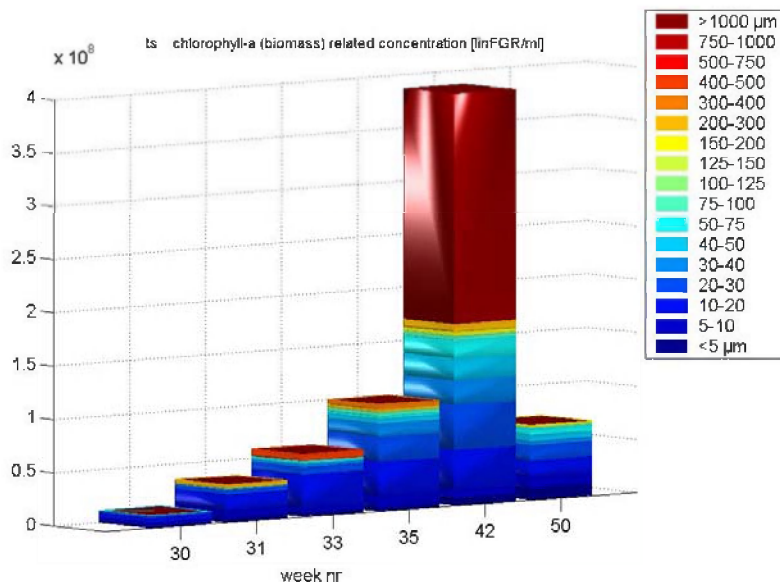


FIGUUR 3.3.2
% Aantal autotrofe deeltjes
met chlorofyl-a per
lengtefractie

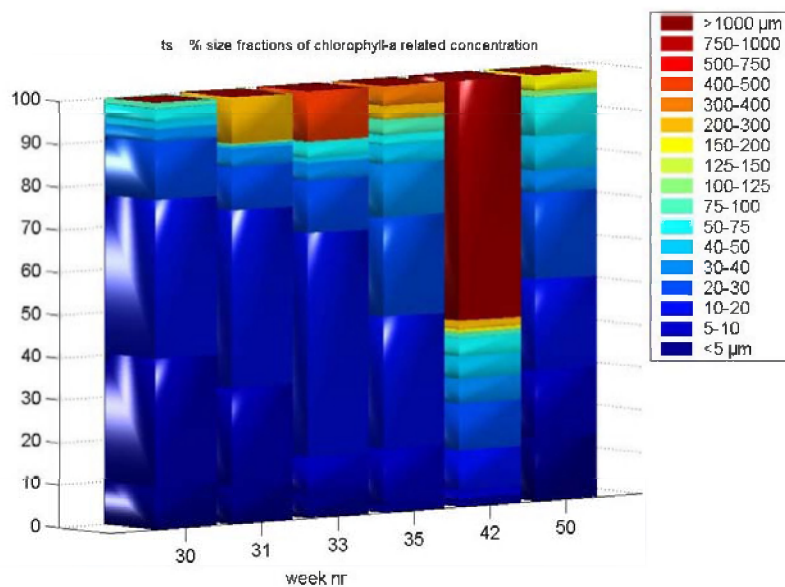


De **chlorofyl-a/ml concentraties** (biomassa) of flowcytometriscie linFGR/ml variabele is uitgesplitst in 17 groottefracties (linFGR/ml.fractie) (FIGUUR 3.3.3) en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentratie chlorofyl-a/ml uitgesplitst in 17 groottefracties (% linFGR/ml.fractie/totaal-linFGR/ml) in FIGUUR 3.3.4.

FIGUUR 3.3.3
Totale LinFGR/mL
(chlorofyl-a/m l) per
lengtefractie

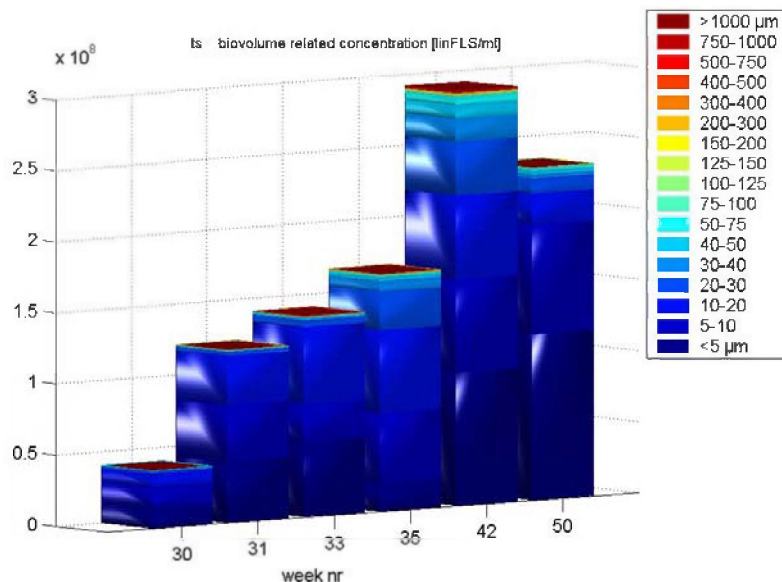


FIGUUR 3.3.4
% LinFGR/mL per
lengtefractie

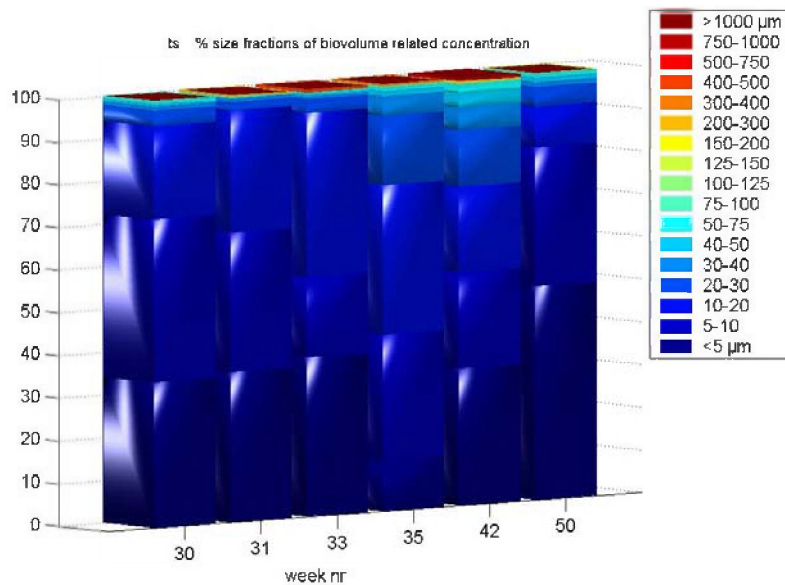


De **biovolumeconcentraties** (van deeltjes met chlorofyl-a)/ml uitgesplitst in 17 groottefracties (linFLS/ml.fracties) is weergegeven in FIGUUR 3.3.5 en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentratie biovolume/ml uitgesplitst in 17 groottefracties (% linFLS/ml.fractie/totaal-linFLS/ml) in FIGUUR 3.3.6.

FIGUUR 3.3.5
totale LinFLS/ml per
lengtefractie



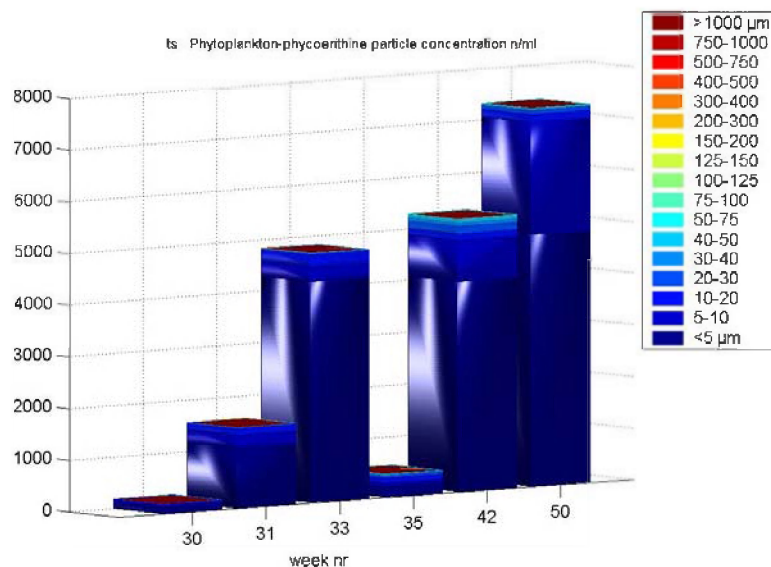
FIGUUR 3.3.6
% LinFLS/ml per
lengtefractie



De concentraties van deeltjes met chlorofyl-a EN **fycobiliproteïnen** uitgesplitst in 17 groottefracties ($n_{(FGR>0 \& FGO>0)}$ /ml.fractie) is gepresenteerd in FIGUUR 3.3.7 en de concentraties van deeltjes met chlorofyl-a EN **fycocyaninen en chlorofyl-b** in FIGUUR 3.3.8.

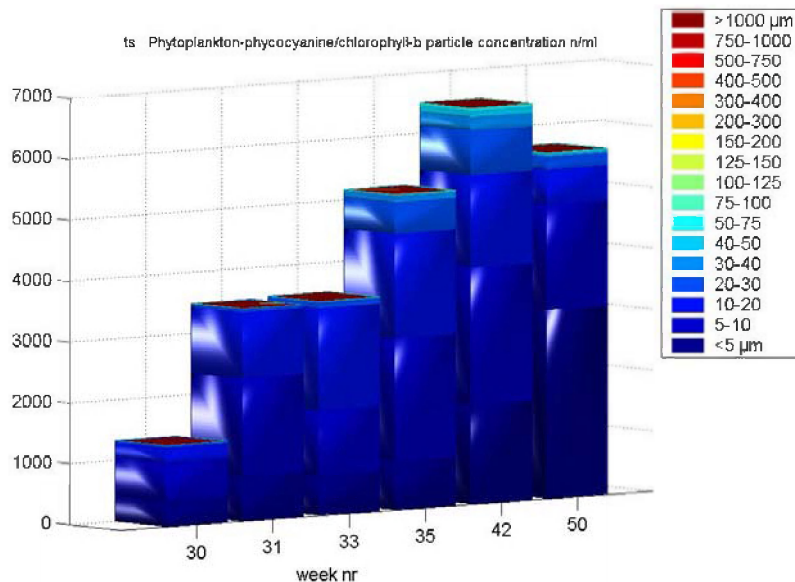
FIGUUR 3.3.7

Absolute
deeltjesconcentratie van
deeltjes met FGR & FGO



FIGUUR 3.3.8

Absolute
deeltjesconcentratie van
deeltjes met FGR & FRR



3.2.4 Resultaten snelle microscopische analyse

In onderstaande tabel zijn de resultaten gepresenteerd van de snelle microscopische tellingen. De plussen in de tabel geven de mate van talrijkheid van de aangetroffen deeltjes weer, waarbij '+++>10%', '++>5% en < 10%', '+>2% en <5%.

TABEL 3.3

Resultaten van de snelle microscopische tellingen

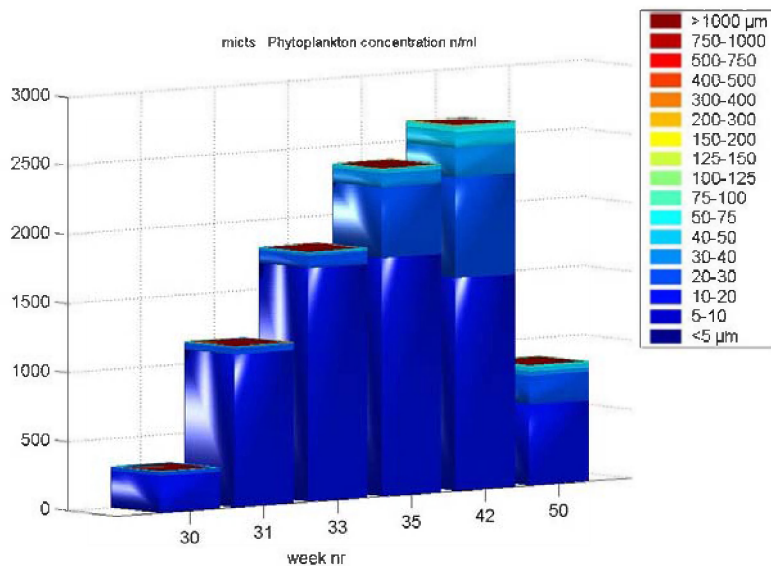
TSLG135 - 2001	Week no.					
Algensoort	30	31	33	35	42	50
Braarudosphaera bigelowii		+++				
Cerataulina sp.						
Ceratium furca	+	++			+	++
Ceratium fusus		+	+++	+++	+	+
Ceratium macroceros	+					
Ceratium tripos	++	++			+	
Chaetoceros					++	
Chrysochromulina	+++	+++	+++	+++	+	
Cochlodinium		++		+		
Coronosphaera mediterranea					+	
Cryptophyceae					+	
Delphineis minutissima					+	++
Dictocha fibula						+
Dinophysis accuminata		+		+		
Dinophysis norvegica			+			
Dinophysis rotundata		+				
Emiliana huxleyi	+++	+++				
Entomoneis						+
Eucampia zodiacus					++	
Gymnodinium	++	++	+	+++	++	
Gyrodinium calyptoglyphe			+			+
Gyrodinium sp.						
Helicotheca tamesis						+
Heterocapsa minima				+		
Leptocylindricus danicus	++			+	++	
Mesoporos perforatus					+	
Navicula distans						+
Paralia marina					+	+
Pleurosigma						++
Prorocentrum micans						+
Prorocentrum minimum			++			
Protoperidinium cerasus			+		+	+
Protoperidinium steinii				+++		
Rhizosolenia alata	+	++	++		+	
Rhizosolenia delicatula					++	
Rhizosolenia hebetata f. semispina					+	
Rhizosolenia shrubsolei				++	+	
Rhizosolenia styliformis					+	
Roperia tessellata						+
Thalassionema nitzschioides					+	++
Thalassiosira <30 µm					+++	+++
Thalassiosira 30-80 µm					+	++

3.3.4 Fytoplanktonconcentratie van deeltjes groter dan 10 µm

De flowcytometrische totaalconcentraties van deeltjes met chlorofyl-a > 10 µm zijn uitgesplitst in 15 groottefracties (deeltjes/ml.fractie) in FIGUUR 3.3.9. De fracties < 5 µm en 5-10 µm zijn verwijderd uit de dataset.

FIGUUR 3.3.9

Absolute
deeltjesconcentratie van
deeltjes **groter dan 10 µm**
met FGR (chlorofyl-a)



3.4 Schaar van Ouden Doel

3.4.1 Algemene trends

De **totaalconcentratie** van autotrofe deeltjes (met chlorofyl-a) is in de tweede helft van 2001 het hoogst midden juli (39.000 d/ml) en daalt langzaam naar 29.000 d/ml midden oktober. Midden september wordt een lichte tijdelijke toename waargenomen (37.000 d/ml). Eind november is de totaalconcentratie veel lager (7000 d/ml). De fracties < 20 µm dragen hoofdzakelijk bij aan de totaalconcentratie, maar het aandeel grotere deeltjes is hoger dan wordt waargenomen op de 'zee-lokaties'.

De **biomassa** of chlorofyl-a concentratie (linFGR/ml) schommelt vanaf midden juli tot en met eind oktober rond de 5×10^8 a.u./ml, met één uitschieter naar boven midden september (8×10^8 a.u./ml). De relatieve bijdragen van de groottefracties aan de totale biomassa blijft nagenoeg over de gehele periode constant op het midden-september-monster na, waar relatief meer grotere deeltjes bijdragen aan de biomassa. De hoogste bijdragen aan de biomassa komen uit de fracties 10-20 µm en 50-75 µm, en het totaalbeeld van de biomassa wijkt aanzienlijk af van het beeld van de overige lokaties. Vanaf november worden lage biomassa's gevonden. De biomassa-waarden uit de tweede helft van 2001 zijn lager dan hoogste waarden die in juni gevonden zijn ($7-15 \times 10^8$ a.u./ml), maar hoger dan de waarden gevonden in de periode januari-mei ($2-3 \times 10^8$ a.u./ml).

Het **biovolume-concentratieverloop** (LinFLS/ml) vertoont een gelijke trend met het totaalconcentratieverloop, maar is iets grilliger.

Vanaf juli tot en met augustus ligt de **concentratie van deeltjes met fycobiliproteïnen** rond een waarde van ca 3000 d/ml. Dit is laag vergeleken met de totaalconcentratie autotrofe deeltjes, waarbij de verhouding autotrofe deeltjes met fycoerithrine hoog is ten opzichte van de totaalconcentratie. Vanaf midden-september eind-oktober worden hogere concentraties (met fycoerithrine) gevonden (5000-8000 d/ml). Daarna zijn de concentraties weer lager (1500 d/ml). De concentratie wordt hoofdzakelijk bepaald door kleinere deeltjes.

In juli wordt de hoogste concentratie van autotrofe deeltjes met **fycocyanine/chlorofyl-b** gevonden, namelijk 28 000 d/ml (hoofdzakelijk <20 µm). Daarna daalt de concentratie langzaam en gestaag van 25 000 (eind augustus), naar 13.000 d/ml eind oktober. Vanaf november worden lage waarden gemeten (< 4000 d/ml).

Ten opzichte van het jaar **2000** is voor de totaalconcentratie autotrofe deeltjes dezelfde trend waarneembaar als in 2001. De hoogste concentratie wordt gevonden in juni, namelijk 60.000 (in 2000) versus 70.000 d/ml (in 2001) en daarna afnemend. In 2000 wordt een concentratietoename in oktober en november waargenomen. In 2001 wordt dit ook in oktober geconstateerd met een vergelijkbare concentratie (ca 30.000 d/ml), maar niet vergelijkbaar in november (30.000 (in 2000) vs 7000 d/ml (in 2001)). De hoogste biomassa in 2000 in augustus ($1,3 \times 10^9$ a.u./ml) wordt een kleine maand later in 2001 in september geconstateerd ($0,8 \times 10^9$ a.u./ml). Vanaf mei-juni worden in zowel 2000 als in 2001 gestage stijgingen in de biomassa waargenomen met in juni de maximale biomassawaarde ($1,0 \times 10^9$ a.u./ml (in 2000) ten opzichte van $1,8 \times 10^9$ a.u./ml (in 2001)). Voor de totaalconcentratie autotrofe deeltjes met fycoerithrine worden op het eerste kwartaal na, grote overeenkomsten tussen beide jaren gevonden. In het

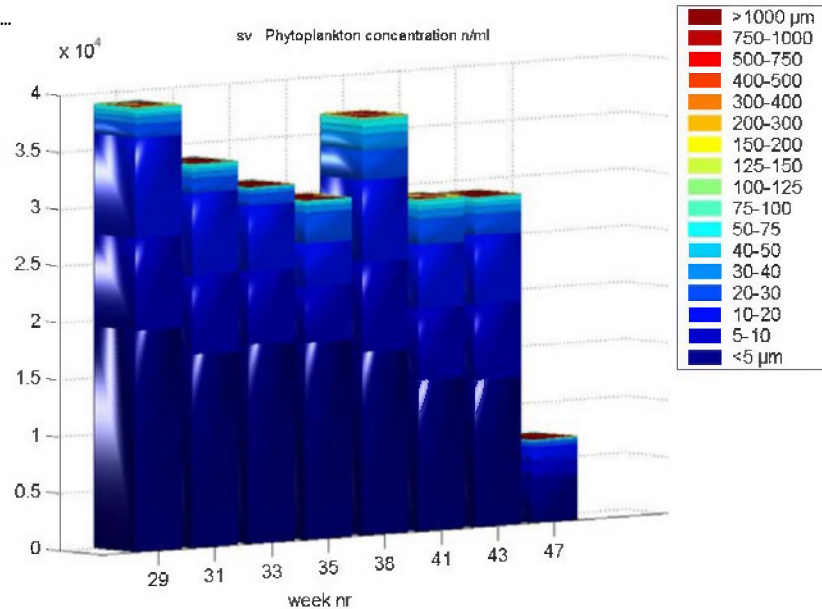
eerste kwartaal van 2001 worden dubbelhoge waarden gevonden vergeleken met het eerste kwartaal in 2000. Voor de periode april – begin september worden concentraties rond de 2000-4000 d/ml gevonden. Vervolgens een stijging naar 8000/ml in beide jaren, in 2000 rond midden oktober, in 2001 rond midden-eind september.

3.4.2 Flowcytometrische fytoplanktonconcentraties Schaar van ouden Doel

Fytoplanktonconcentratie: De totaalconcentraties van deeltjes met chlorofyl-a zijn uitgesplitst in 17 groottefracties (deeltjes/ml.fractie) in FIGUUR 3.4.1 en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentraties van deeltjes met chlorofyl-a uitgesplitst in 17 groottefracties (% n.fractie/ n_{totaal}) in FIGUUR 3.4.2.

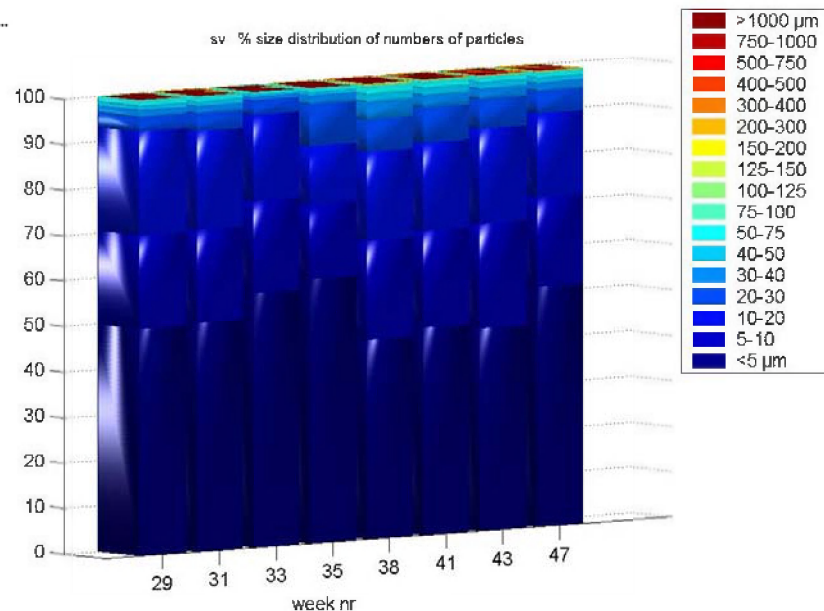
FIGUUR 3.4.1

Concentratie autotrofe deeltjes (met chlorofyl-a) per lengtefractie



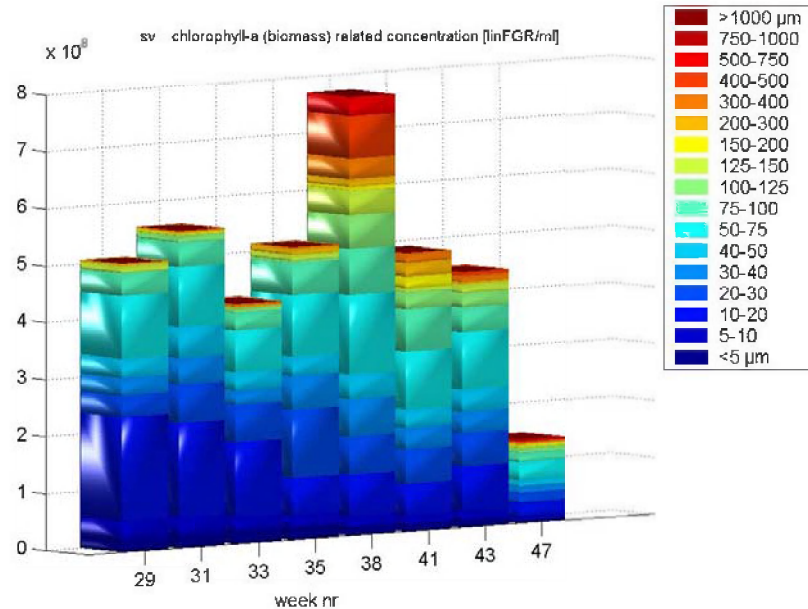
FIGUUR 3.4.2

% Aantal autotrofe deeltjes met chlorofyl-a per lengtefractie

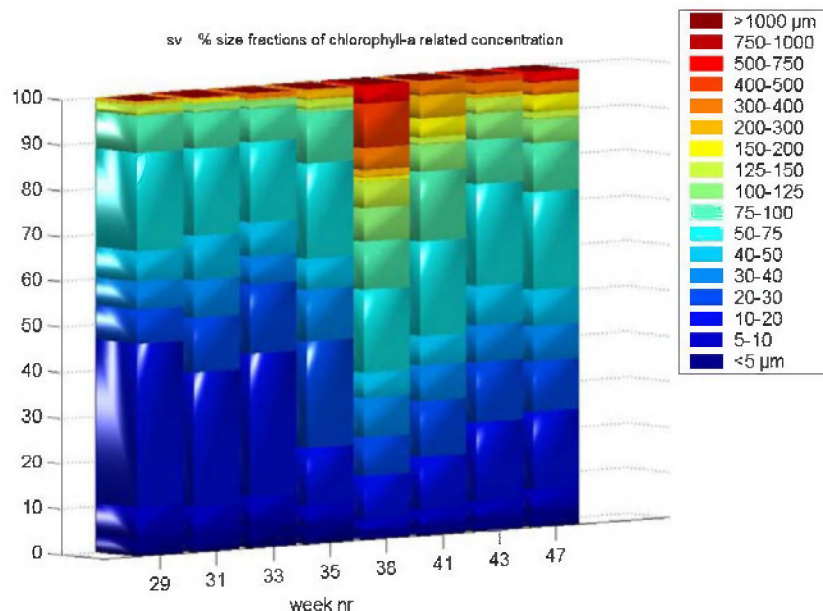


De chlorofyl-a/ml concentraties (biomassa) of flowcytometrische linFGR/ml variabele is uitgesplitst in 17 groottefracties (linFGR/ml.fractie) (FIGUUR 3.4.3) en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentratie chlorofyl-a/ml uitgesplitst in 17 groottefracties (% linFGR/ml.fractie/totaal-linFGR/ml) in FIGUUR 3.4.4.

FIGUUR 3.4.3
Totale LinFGR/mL
(chlorofyl-a/m l) per
lengtefractie

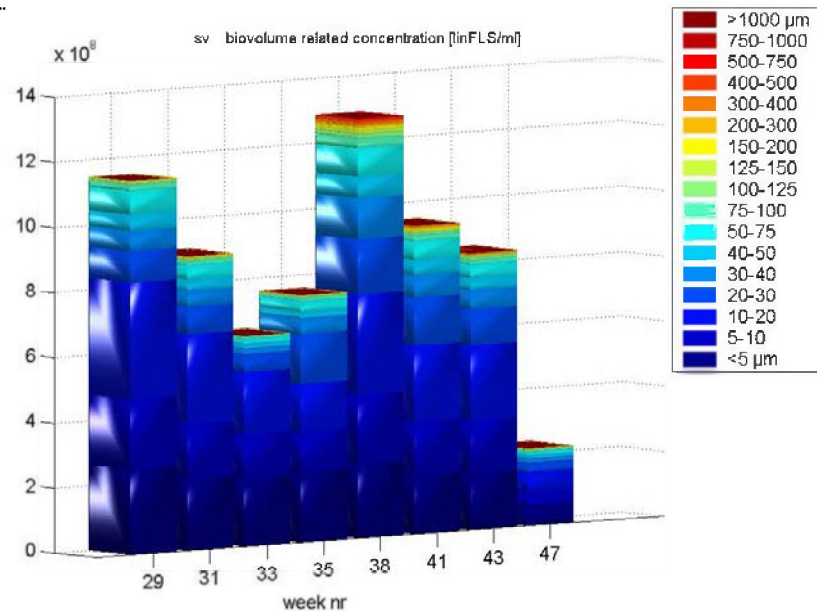


FIGUUR 3.4.4
% LinFGR/mL per
lengtefractie Schaar van
Oude Doel

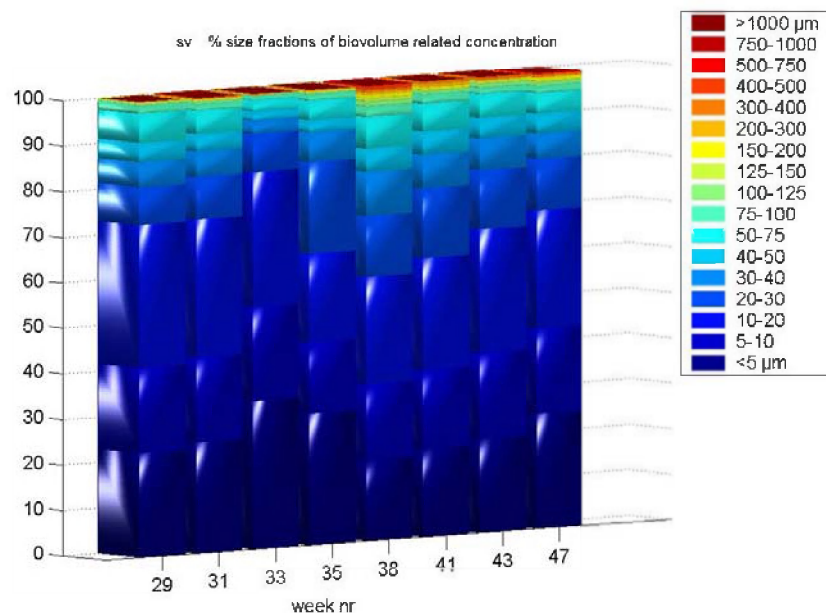


De biovolumeconcentraties (van deeltjes met chlorofyl-a)/ml uitgesplitst in 17 groottefracties (linFLS/ml.fractie) is weergegeven in FIGUUR 3.4.5 en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentratie biovolume/ml uitgesplitst in 17 groottefracties (% linFLS/ml.fractie/totaal-linFLS/ml) in FIGUUR 3.4.6.

FIGUUR 3.4.5
Totale LinFLS/ml per
lengtefractie Schaar van
Oude Doel

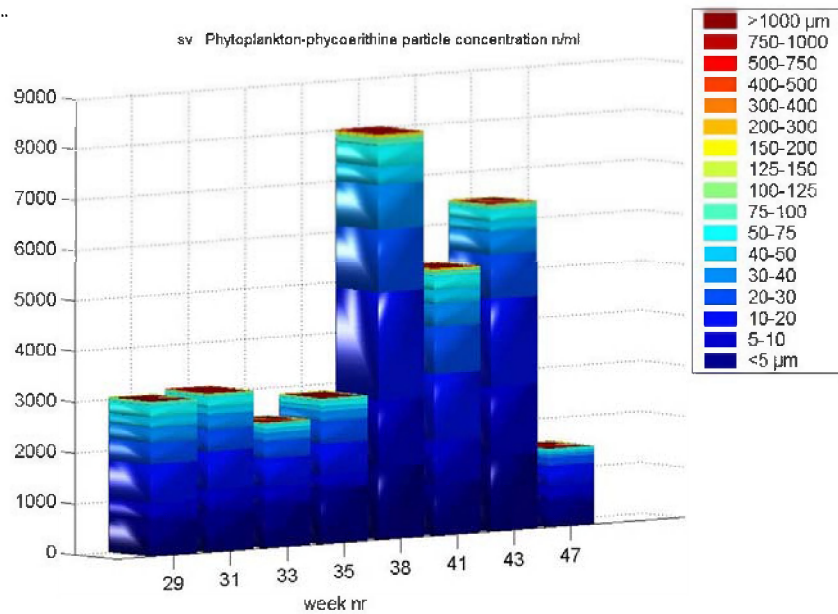


FIGUUR 3.4.6
% LinFLS/ml per
lengtefractie Schaar van
Oude Doel

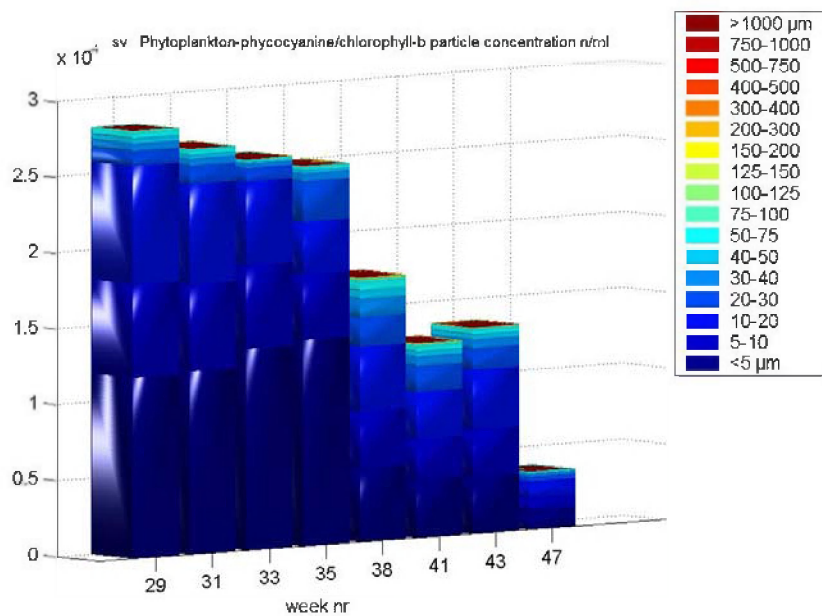


De concentraties van deeltjes met chlorofyl-a EN **fycobiliproteinen** uitgesplitst in 17 groottefracties ($n_{(FGR>0 \& FGO>0)}$ /ml.fractie) is gepresenteerd in FIGUUR 3.4.7 en de absolute concentratie deeltjes met met chlorofyl-a EN **fycocyanine en chlorofyl-b** uitgesplitst in FIGUUR 3.4.8.

FIGUUR 3.4.7
Absolute
deeltjesconcentratie van
deeltjes met FGR & FGO



FIGUUR 3.4.8
Absolute
deeltjesconcentratie van
deeltjes met FGR & FRR



3.5 Vlissingen

3.5.1 Algemene trends

Midden juli wordt de hoogste **concentratie autotrofe deeltjes** van het jaar 2001 gevonden (45 000 d/ml), het daarop volgende monster, begin augustus, de laagste, namelijk ca 5000/ml. Vanaf augustus stijgt de totaalconcentratie langzaam tot bijna 35 000 d/ml eind oktober. Vanaf eind november is de concentratie weer lager. De kleinste lengtefracties <10 µm vertegenwoordigen het grootste aandeel in de totaalconcentratie

De **biomassa** (chlorofyl-a/ml of linFGR/ml) neemt in juli af van ca 9×10^8 a.u./ml naar 3 tot 4×10^8 a.u./ml in augustus, waarna deze tot en met eind oktober nauwelijks meer verandert. Vanaf eind november is de biomassaconcentratie tweemaal lager. Het aandeel van de fracties van kleinere deeltjes neemt in de tweede helft van 2001 geleidelijk toe. Eind juli is hierop een uitzondering, omdat enkele zeer grote deeltjes (>750 µm) nadrukkelijk de biomassa bepalen. Bij afwezigheid van deze grote deeltjes eind juli, was de biomassaconcentratie gelijk geweest aan de gevonden concentratie in de periode augustus-oktober. Voor de gehele tweede helft van 2001 geldt dat de hoogte van de gemeten biomassa's in de marge valt van de biomassa's, die ten tijde van de hoge voorjaarsbloei zijn bepaald en 3 tot 5-maal hoger waren.

Het **biovolume** uitgedrukt in LinFLS/ml vertoont een gelijke trend als het totaal autotrofe deeltjesconcentratie-verloop, alleen is de invloed van middelgrote deeltjes duidelijker zichtbaar.

De concentratie van autotrofe **deeltjes met fycoerithrine** is midden juli de hoogste van het gehele jaar 2001 (32.000 d/ml). De start van deze bloei werd al eind juni geconstateerd. In de periode daarna fluctueert de concentratie tussen 2500 en 10.000 d/ml. In het najaar zijn de concentraties hoger dan de periode januari t/m mei 2001. Het aandeel zeer kleine deeltjes bepaalt voor het grootste deel de concentratie. Ten opzichte van de totaalconcentratie autotrofe deeltjes is het aandeel van deeltjes met fycoerithrine hoog (30-80%) vergeleken met de meer 'zoetwater' gelegen locaties Schaar van ouden Doel en Zijpe.

De concentratie autotrofe **deeltjes met fycocyanine-chlorofyl-b** schommelt van juli tot en met eind oktober rond de 12000-15000 d/ml, met als uitzondering eind juli, waar een lagere concentratie (ca 4000 d/ml) gevonden wordt. Vanaf november is de concentratie lager rond de 6000 d/ml. In de eerste helft van 2001 werd de hoogste concentratie gevonden van het jaar (ca 28.000 d/ml). In de tweede helft van het jaar zijn de kleinste deeltjes (< 5 µm) nadrukkelijker aanwezig dan in de eerste helft van het jaar.

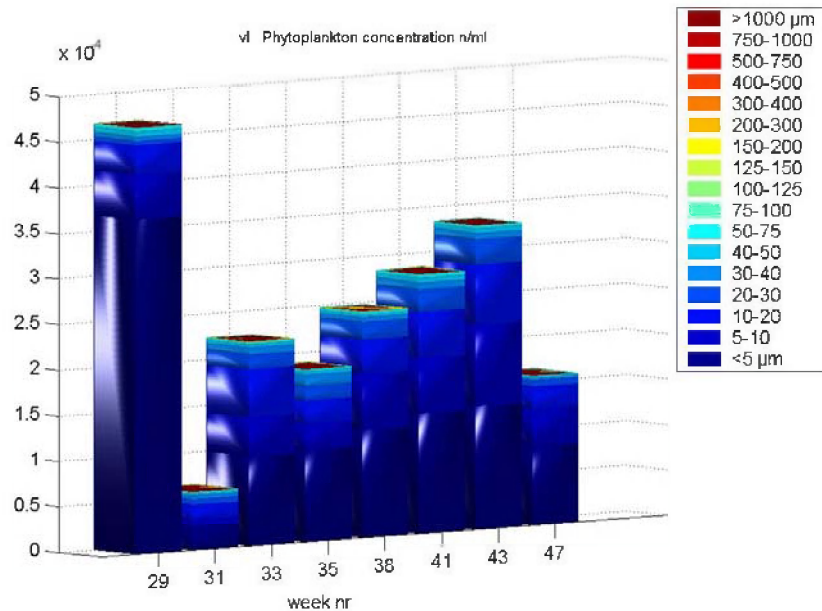
De resultaten **van 2000 en 2001** geven enige verschillen. De concentraties autotrofe deeltjes zijn in 2001 over de eerste helft van het jaar ongeveer dubbel zo hoog als in dezelfde periode in 2000. De hogere concentraties worden in beide jaren in juni en juli teruggevonden. November 2000 onderscheidt zich van november 2001 door een driemaal hogere concentratie. De hoogste biomassa wordt in 2001 een maand eerder geconstateerd dan in 2000 en wordt in beide jaren met name veroorzaakt door grote deeltjes (>200 µm) en is in 2001 hoger dan in 2000 ($4,5 \times 10^9$ t.o.v. $3,5 \times 10^9$ a.u./ml). In 2001 blijft de biomassa hoog tot midden juni, terwijl in 2000 begin juni al lagere biomassawaarden werden

waargenomen. Daarna laten beide jaren in verhouding lage biomassa's zien ($<0,5 \times 10^9$ a.u./ml). Voor autotrofe deeltjes met fycoerithrine zijn redelijke overeenkomsten tussen beide jaren in absolute aantallen en in de perioden, waarin er toe- en afnames zijn. Alleen in juni/juli wordt in 2001 een veel (ca driemaal) hogere concentratie dan in 2000 gevonden.

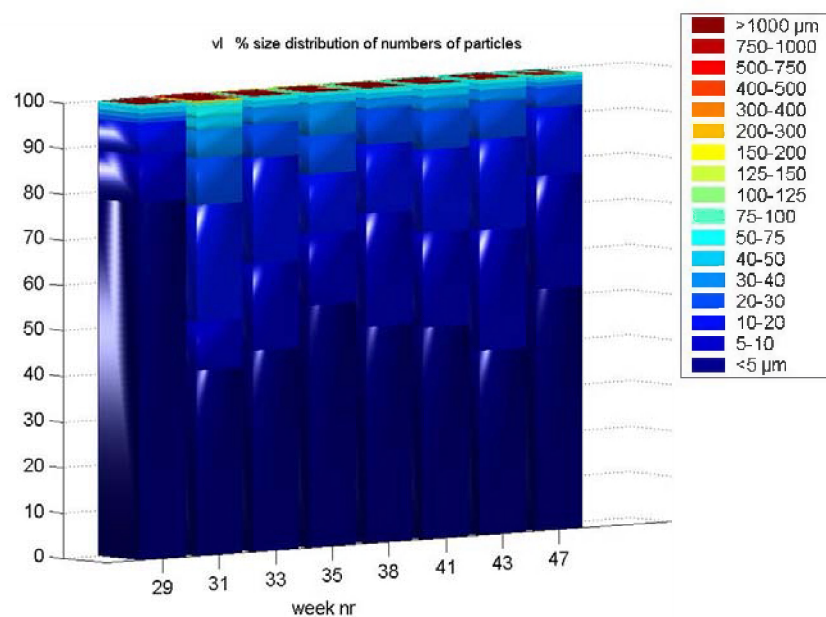
3.5.2 Flowcytometrische fytoplanktonconcentraties Vlissingen

Fytoplanktonconcentratie: De totaalconcentraties van deeltjes met chlorofyl-a zijn uitgesplitst in 17 groottefracties (deeltjes/ml.fractie) in FIGUUR 3.5.1 en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentraties van deeltjes met chlorofyl-a uitgesplitst in 17 groottefracties (% n.fractie/ n_{totaal}) in FIGUUR 3.5.2.

FIGUUR 3.5.1
Concentratie autotrofe
deeltjes (met chlorofyl-a)

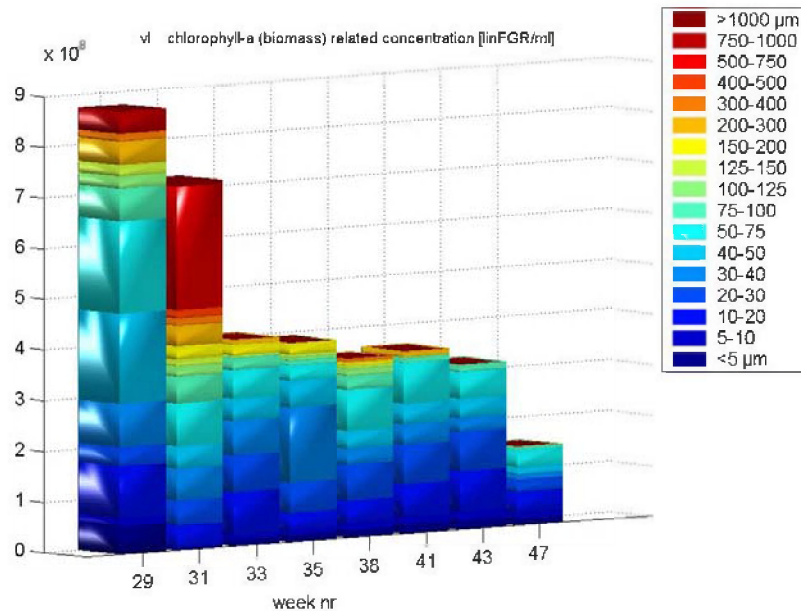


FIGUUR 3.5.2
% Aantal autotrofe
deeltjes met chlorofyl-a

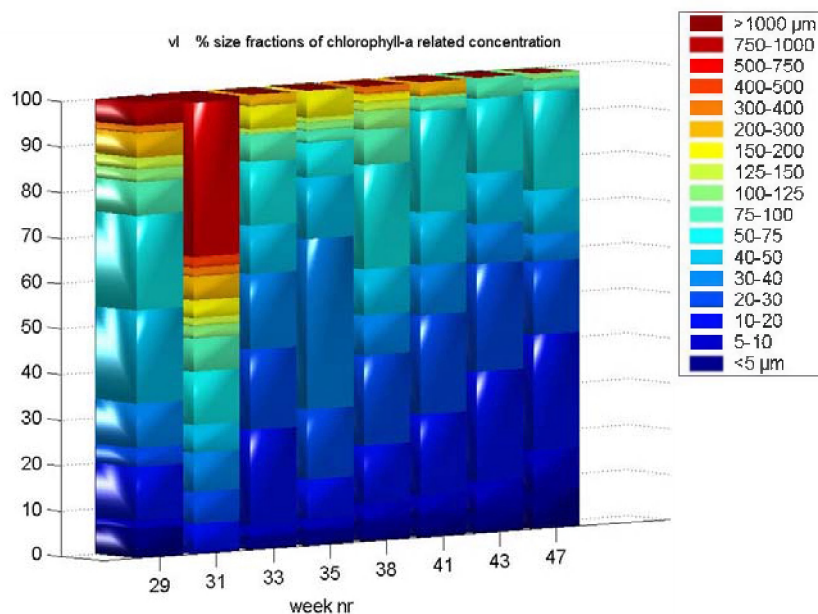


De **chlorofyl-a/ml concentraties** (biomassa) of flowcytometrische linFGR/ml variabele is uitgesplitst in 17 groottefracties (linFGR/ml.fractie) (FIGUUR 3.5.3) en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentratie chlorofyl-a/ml uitgesplitst in 17 groottefracties (% linFGR/ml.fractie/totaal-linFGR/ml) in FIGUUR 3.5.4.

FIGUUR 3.5.3
Totale LinFGR/mL
(chlorofyl-a/m l) per
lengtefractie



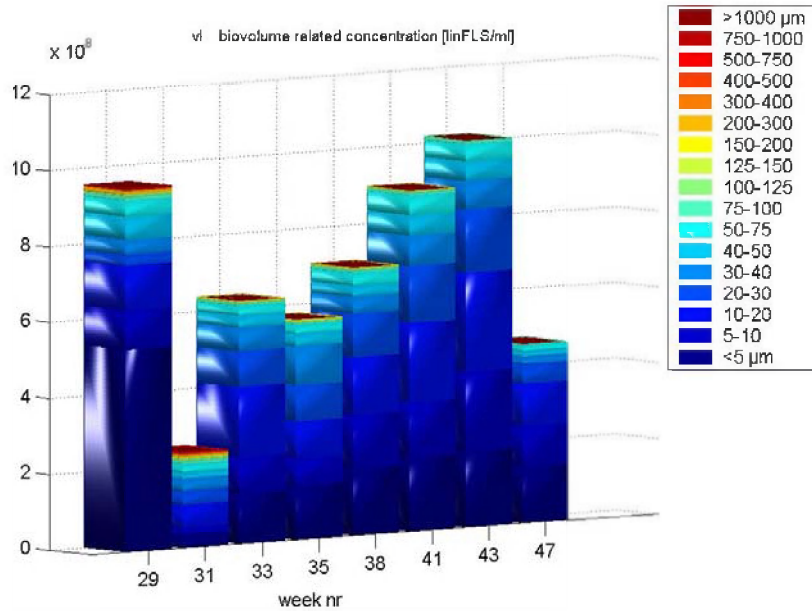
FIGUUR 3.5.4
% LinFGR/ml per lengte-
fractie



De **biovolumeconcentraties** (van deeltjes met chlorofyl-a)/ml uitgesplitst in 17 groottefracties (linFLS/ml.fractie) is weergegeven in FIGUUR 3.5.5 en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentratie biovolume/ml uitgesplitst in 17 groottefracties (% linFLS/ml.fractie/totaal-linFLS/ml) in FIGUUR 3.5.6.

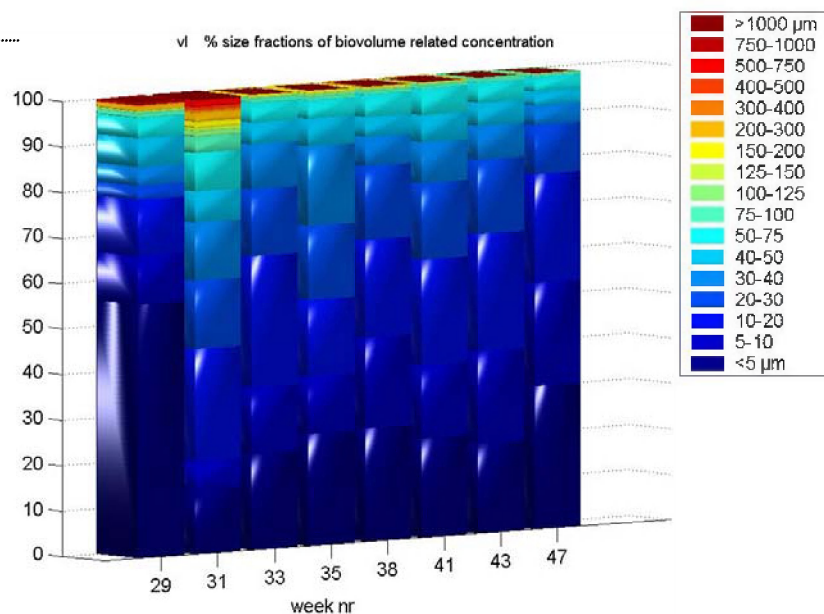
FIGUUR 3.5.5

Totale LinFLS/ml per lengte-fractie



FIGUUR 3.5.6

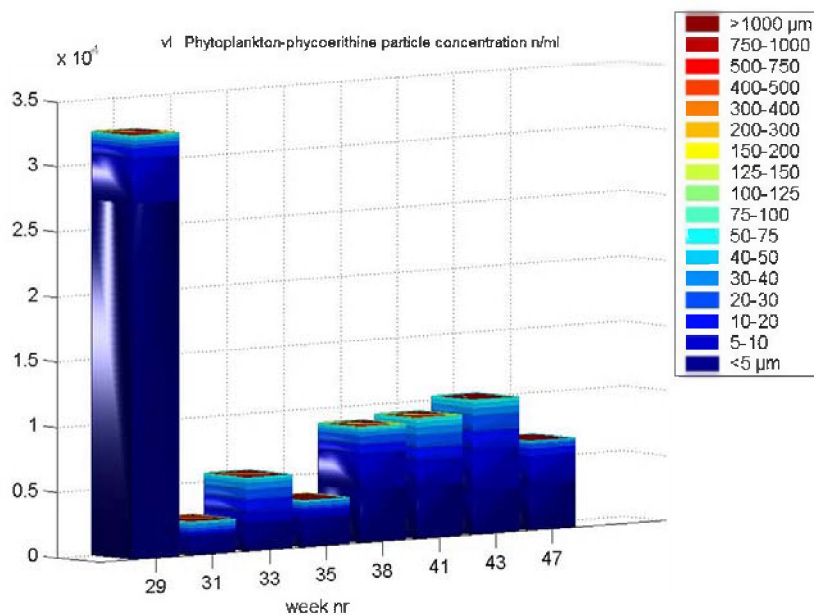
% LinFLS/ml per lengte-fractie



De concentraties van deeltjes met chlorofyl-a EN **fycobiliproteinen** uitgesplitst in 17 groottefracties ($n_{(FGR>0 \& FGO>0)}$ /ml.fractie) is gepresenteerd in FIGUUR 3.5.7 en concentraties van deeltjes met chlorofyl-a EN **fycocyaninen en chlorofyl-b** in FIGUUR 3.5.8.

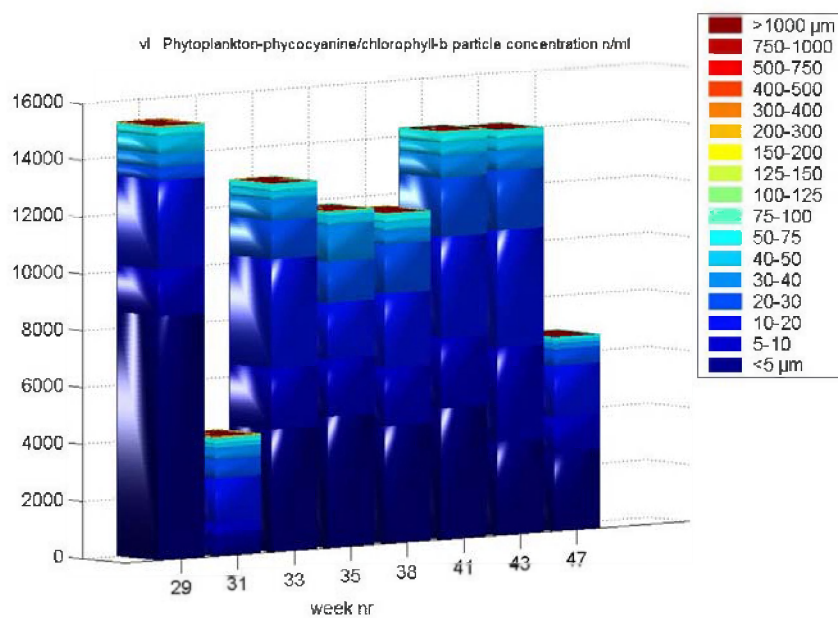
FIGUUR 3.5.7

Absolute deeltjesconcentratie
van deeltjes met FGR & FGO



FIGUUR 3.5.8

Absolute deeltjesconcentratie
van deeltjes met FGR & FRR



3.6 Zijpe

3.6.1 Algemene trends

De **totaalconcentratie** deeltjes met chlorofyl-a (LinFGR/ml) schommelt in juli op een waarde van 10.000-20.000 d/ml en is midden augustus gestegen naar een concentratie van 60.000 d/ml, vooral veroorzaakt door kleine deeltjes (<10%). Vanaf midden augustus daalt de concentratie naar ca 20.000 d/ml midden oktober en vervolgens een sterke daling naar < 10.000 d/ml vanaf november. De relatieve bijdrage van grotere deeltjes is in juli duidelijk groter dan de maanden daarna. De concentraties in augustus zijn de hoogste van het gehele jaar 2001.

De **biomassa of chlorofyl-a concentratie** is begin juli het hoogst van het gehele jaar namelijk ca 3×10^9 a.u./ml. Opvallend hierbij is dat deze vooral wordt veroorzaakt door de middelgrote fracties (50-300 μ m) en niet de allergrootste fracties, zoals veelal waargenomen wordt. Midden juli is er een kentering naar een lage biomassa (ca $0,5 \times 10^9$ a.u./ml) gevolgd door een hoge biomassa begin augustus ($2,5 \times 10^9$ a.u./ml), die wederom veroorzaakt wordt door middelgrote deeltjeslengte fracties. Vanaf midden augustus wordt een steeds lagere biomassa gevonden die daalt naar een waarde van $0,4 \times 10^9$ a.u./ml. Midden oktober verschuift de biomassa naar grotere deeltjes en treedt een lichte stijging op, maar in november worden de laagste waarden waargenomen (< $0,1 \times 10^9$ a.u./ml). De bijdrage van kleine deeltjes is duidelijk groter in de perioden tot april en vanaf september.

Het verloop van de **biovolume** (linFLS/ml) gerelateerde variabele is vergelijkbaar met de totaalconcentratie, hoewel de bijdrage van grotere deeltjes nadrukkelijk aanwezig is. Vooral in juli valt op dat het biovolume niet alleen door de kleinste fracties wordt bepaald.

De concentratie van **deeltjes met fycoerithrine** neemt in juli af van 3000 d/ml naar 1500 d/ml. Vervolgens schommelt de concentratie tot november tussen 3000 en 4500 d/ml. Vanaf november is de concentratie 1500 d/ml en lager. In de tweede helft van 2001 zijn alle waargenomen concentraties laag vergeleken met de hoge concentratie die is waargenomen in juni in 2001. Opvallend is dat de concentratie van deeltjes met fycoerithrine laag is ten opzichte van de totaalconcentratie autotrofe deeltjes (ca 10%), terwijl deze bij 'zee'lokaties veel hoger is.

Het verloop van de concentratie van autotrofe deeltjes met **fyocyanine/chlorofyl-b** is identiek aan het verloop van de totaalconcentratie autotrofe deeltjes, alleen liggen de absolute niveaus ca 75% lager. De concentraties, die midden augustus en begin september gevonden zijn, zijn de hoogste van het jaar, namelijk 40.000 d/ml. Het zijn hoofdzakelijk kleine deeltjes die de concentratie bepalen.

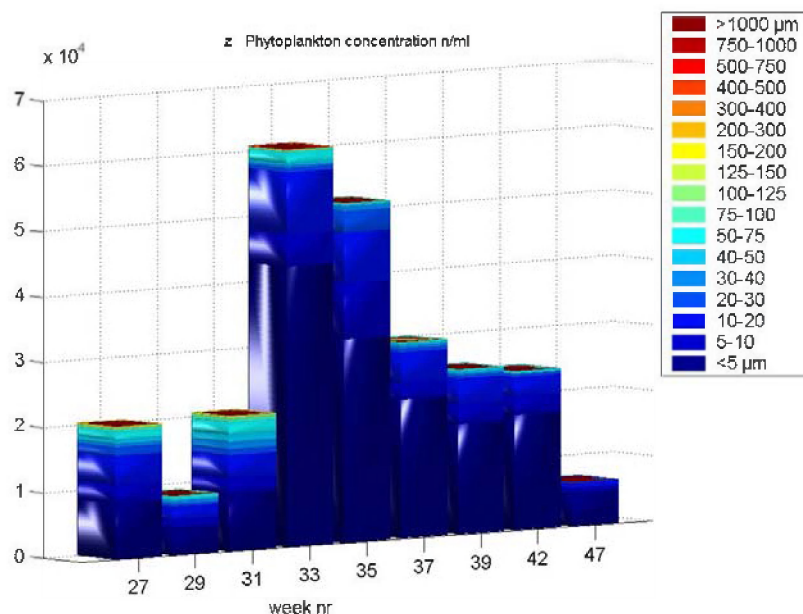
Een vergelijking tussen **2000 en 2001** levert voor de totaalconcentratie van autotrofe deeltjes het beeld op dat begin augustus in beide jaren de hoogste concentraties zijn gevonden, maar in 2001 hoger (60.000 d/ml) dan in dezelfde periode in 2000 (45.000 d/ml). In het voorjaar worden in beide jaren, eind april en begin juni, twee bloeipeken waargenomen, maar de concentraties zijn in 2001 lager (tweemaal ca 25.000 d/ml) ten opzichte van 2000 (tweemaal ca 35.000 d/ml). In beide jaren is de relatieve bijdrage van de fracties aan de totaalconcentratie redelijk met elkaar in overeenstemming in dezelfde periodes.

De vergelijking tussen de jaren van de biomassa laat een langdurigere en hogere biomassa zien in het voorjaar van 2001 ten opzichte van het voorjaar 2000. In beide jaren wordt in juli de hoogste biomassa gevonden. In 2001 begin en eind juli en tweemaal rond een waarde $2,7 \times 10^9$ a.u./ml en eenmalig nog hoger in 2000 eind juli met een waarde van $4,5 \times 10^9$ a.u./ml. Opvallende verschillen worden tussen beide jaren gevonden voor de concentratie autotrofe deeltjes tevens met fycoerithrine. In 2001 zijn over het algemeen lage concentraties tussen de 1000 en 4000 d/ml en één uitschieter in juni naar 15.000 d/ml waargenomen. In 2000 zijn over het gehele jaar ook waarden rond de 1000-4000 d/ml gevonden, maar ook een viertal bloeipieken in mei, juni en september met concentraties rond de 7000 d/ml en eind juni 2000 een lichte verhoging naar 9000 d/ml.

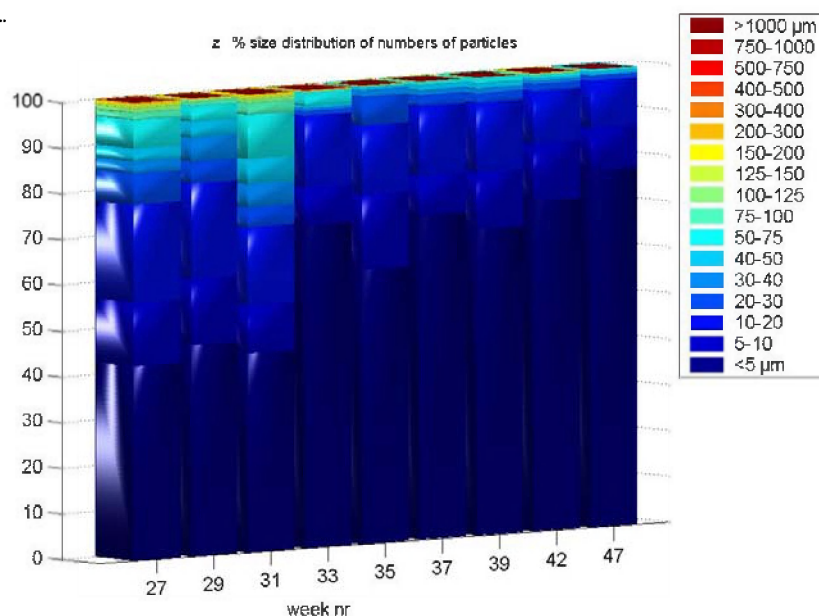
3.6.2 Flowcytometrische fytoplanktonconcentraties Zijpe

Fytoplanktonconcentratie: De totaalconcentraties van deeltjes met chlorofyl-a zijn uitgesplitst in 17 groottefracties (deeltjes/ml.fractie) in FIGUUR 3.6.1 en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentraties van deeltjes met chlorofyl-a uitgesplitst in 17 groottefracties ($\% \text{ n.fractie}/\text{n}_{\text{totaal}}$) in FIGUUR 3.6.2.

FIGUUR 3.6.1
Concentratie autotrofe
deeltjes (met chlorofyl-a)
per lengtefractie

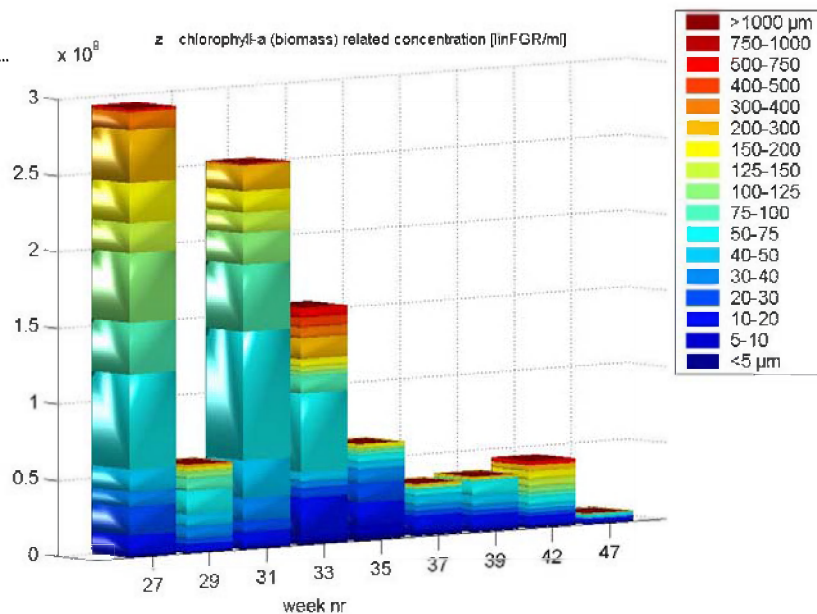


FIGUUR 3.6.2
% Aantal autotrofe deeltjes
met chlorofyl-a per
lengtefractie

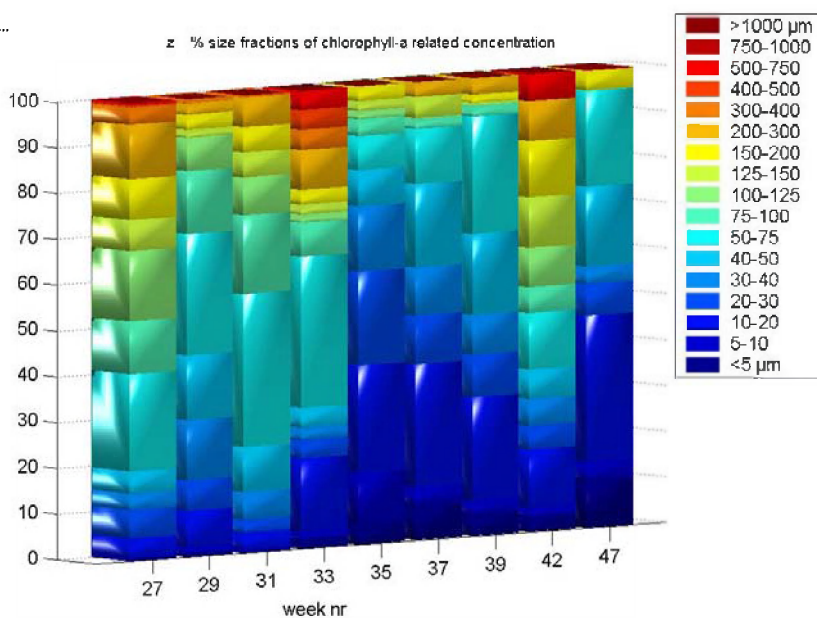


De **chlorofyl-a/ml concentraties** (biomassa) of flowcytometrische linFGR/ml variabele is uitgesplitst in 17 groottefracties (linFGR/ml.fractie) (FIGUUR 3.6.3) en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentratie chlorofyl-a/ml uitgesplitst in 17 groottefracties (% linFGR/ml.fractie/totaal-linFGR/ml) in FIGUUR 3.6.4.

FIGUUR 3.6.3
Totale LinFGR/mL
(chlorofyl-a/m l) per
lengtefractie

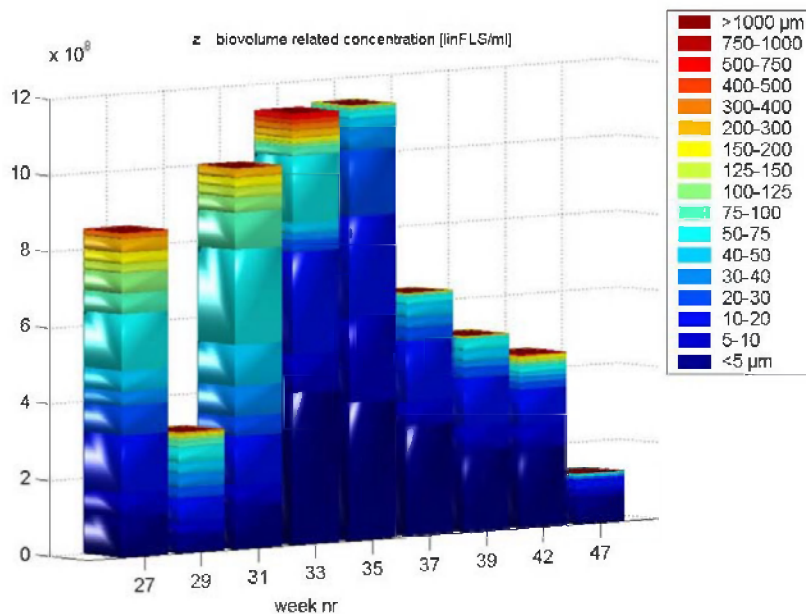


FIGUUR 3.6.4
% LinFGR/ml per
lengtefractie

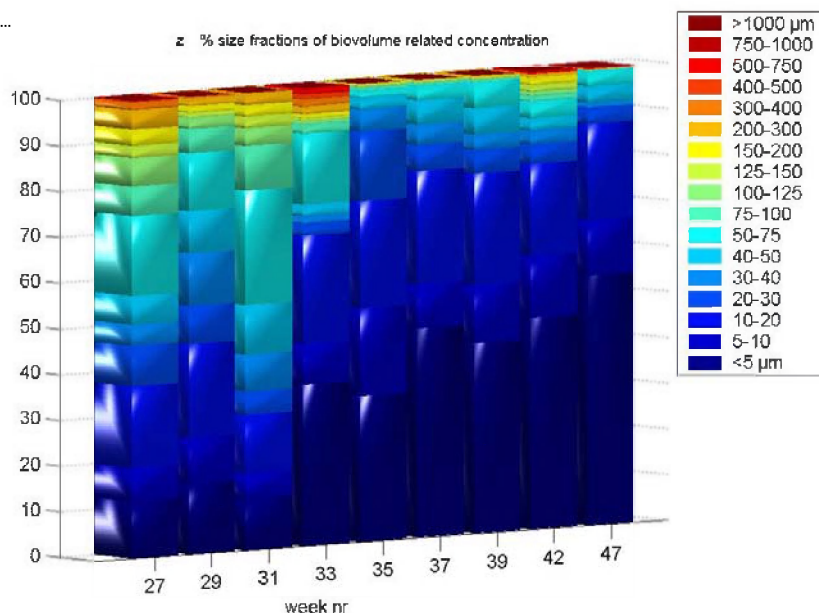


De **biovolumeconcentraties** (van deeltjes met chlorofyl-a)/ml uitgesplitst in 17 groottefracties (linFLS/ml.fractie) is weergegeven in FIGUUR 3.6.5 en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentratie biovolume/ml uitgesplitst in 17 groottefracties (% linFLS/ml.fractie/totaal-linFLS/ml) in FIGUUR 3.6.6.

FIGUUR 3.6.5
Totale LinFLS/ml per
lengtefractie

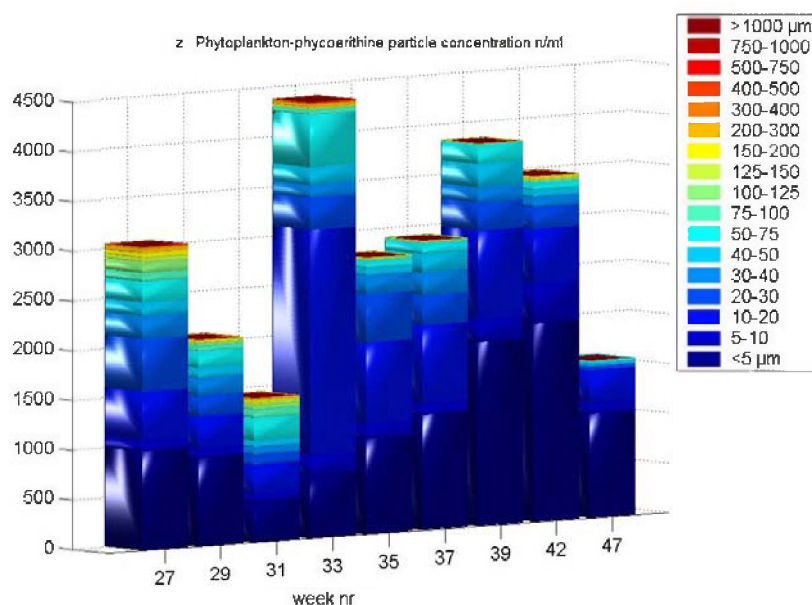


FIGUUR 3.6.6
% LinFLS/ml per
lengtefractie

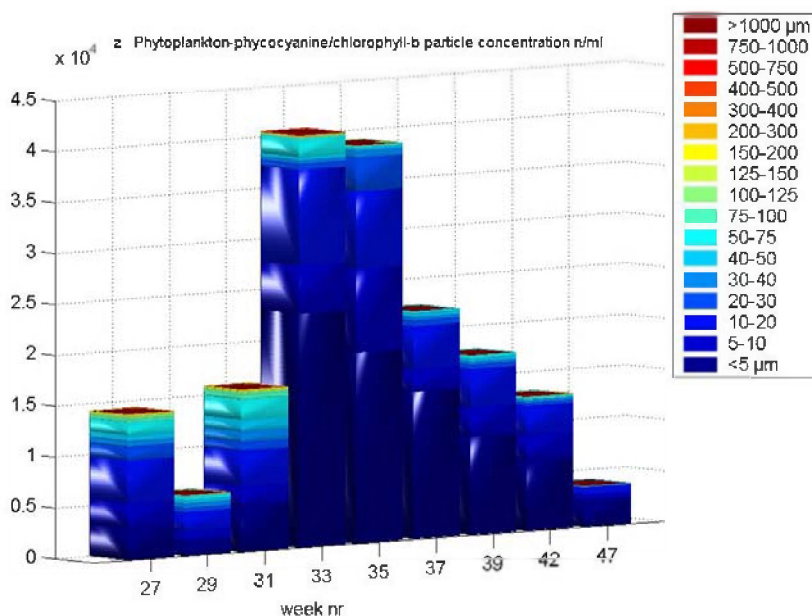


De concentraties van deeltjes met chlorofyl-a EN **fycobiliproteïnen** uitgesplitst in 17 groottefracties ($n_{(FGR>0 \& FGO>0)}/\text{ml.fractie}$) is geïllustreerd in FIGUUR 3.6.7 en concentraties van deeltjes met chlorofyl-a EN **fycocyaninen en chlorofyl-b** in FIGUUR 3.6.8.

FIGUUR 3.6.7
Absolute
deeltjesconcentratie van
deeltjes met FGR & FGO



FIGUUR 3.6.8
Absolute
deeltjesconcentratie van
deeltjes met FGR & FRR



4. Discussie

4.1 Monsterplanning en uitvoering

Alle monsters die in 2001 zijn ingepland voor de lokaties Noordwijk 10, Noordwijk 2, Schaar van ouden Doel, Vlissingen en Zijpe zijn bemonsterd, gearriveerd bij het laboratorium en geanalyseerd. Alleen van de lokatie Terschelling 135 zijn slechts 11 van de 18 bemonsterd, gearriveerd en analyseerd. Over het algemeen zijn de monsters in de geplande weken ook bemonsterd en zodra dit niet het geval was, door slechte weersomstandigheden, werden de monsters in een later stadium bemonsterd. Vanuit praktisch oogpunt van analyse is het gewenst om consequent minimaal één dag vantevoren met het laboratorium contact op te nemen dat monsters niet zullen worden aangeleverd en melding te maken wanneer monsters alsnog worden aangeleverd. De tijd vanaf bemonstering tot en met analyse van de (levende) monsters bedroeg in 2001 voor een zeer groot deel van de monsters (zie tabel 4.1) maximaal 24 uur, uitgezonderd Terschelling 135 ten gevolge van een langere vaartijd, waardoor monsters één dag later arriveerden.

TABEL 4.1: % geanalyseerde monsters als functie van de tijd na bemonstering

Tijd vanaf bemonstering t/m analyse	Lokaties					
	N10	N2	TS135	SV	VL	ZIJ
< 1 dg	81 %	84 %	30 %	94 %	94 %	90 %
< 2 dgn	13 %	16 %	60 %	6 %	6 %	10 %
< 3 dgn	6 %					
< 4 dgn						
< 5 dgn			10 %			

4.2 Een vergelijking tussen meetlokaties met basale statistiek

Een algemene onderlinge vergelijking van de resultaten van 2001 tussen alle lokaties wordt verkregen met behulp van basale statistiek. Deze bestaat uit de maximum-, de minimumwaarden gekoppeld aan het bemonsteringstijdstip en de gemiddelde waarden van de totaalconcentraties en –biomassa. Daarnaast zijn de oppervlaktes onder de curves van de totaalconcentraties en –biomassa's als functie van de tijd berekend. Een vergelijking van deze waarden geïntegreerd in tijd over het gehele jaar maakt het mogelijk aan te geven hoe de aantallen of biomassa's fytoplankton onderling (tussen lokaties of jaargangen) verhouden. Dit is dus niet hetzelfde als de optelling van alle waarden van de geanalyseerde monsters, want bij een verschil in monsteraantallen is een vergelijking tussen jaren onderling niet meer mogelijk. Uit de basale statistiekresultaten, die in tabel 4.2 zijn weergegeven, blijkt dat grote verschillen tussen de lokaties gevonden worden. Wordt bijvoorbeeld de gehele biomassa (LinFGR/ml) per lokatie gedurende het hele jaar (tijdsgeïntegreerd) vergeleken, dan wordt op Noordwijk 2 de hoogste biomassa van alle lokaties gevonden. Als deze waarde op 100% gesteld wordt, dan wordt bij N10, 59% biomassa gevonden ten opzichte van N2, Vlissingen 52%, Zijpe 41% en Schaar van ouden Doel 23% en tenslotte Terschelling 135 6% van de waarde die is gevonden op Noordwijk 2. De laagste tijdsgeïntegreerde totale biomassa op Terschelling 135 is dus circa 17x lager dan op Noordwijk 2. Bij Vlissingen is de tijdsgeïntegreerde totale biomassa circa tweemaal hoger dan stroomopwaarts bij Schaar van ouden Doel.

Het aantal deeltjes met chlorofyl-a was het hoogst op Noordwijk 10, gevolgd door Noordwijk 2. Over het gehele jaar echter, was het tijdsgeïntegreerde aantal deeltjes op de lokatie Schaar van ouden Doel het hoogst, gevolgd door Noordwijk 2. Op de lokatie Terschelling 135 werd gedurende het gehele jaar 4-maal lagere aantalwaarden gevonden. De weeknummers waarin de hoogste aantallen deeltjes zijn gevonden per lokatie vallen over het algemeen niet samen met de weeknummers waarin de hoogste biomassa's gevonden werd.

Het aantal deeltjes met chlorofyl-a en fycoerithrine was het hoogst op Noordwijk 10 gevolgd door de lokaties Noordwijk 2 en Vlissingen. Maximum waarden werden voor deze drie lokaties gevonden in week 29 (midden juli).

Het aantal deeltjes met chlorofyl-a, chlorofyl-b en fycocyanine is het gemiddeld en tijdsgeïntegreerd het hoogst op Schaar van ouden Doel, gevolgd door de lokaties Noordwijk 2 en Zijpe.

Vermeldenswaardig is dat de Westerschelde-lokaties Vlissingen en Schaar van ouden Doel de hoogste minimum waarden in alle aantallenconcentraties en biomassaconcentraties laten zien. Deze lokaties vertonen gedurende het gehele jaar minder uitschieters naar boven en naar onder dan de lokaties Noordwijk 2 en 10. Zoals verwacht werd op grond van het lagere nutriëntenaanbod, zijn alle waarden op de lokatie Terschelling 135 het laagst, voor de biomassa opvallender (17x lager dan Noordwijk 2) dan voor het aantal deeltjes (4x lager dan Noordwijk 2).

TABEL 4.2: Overzicht algemene statistieken (MAX, MIN, MEAN, TIJDSGEÏNTEGREERD)
van 6 lokaties in 2001

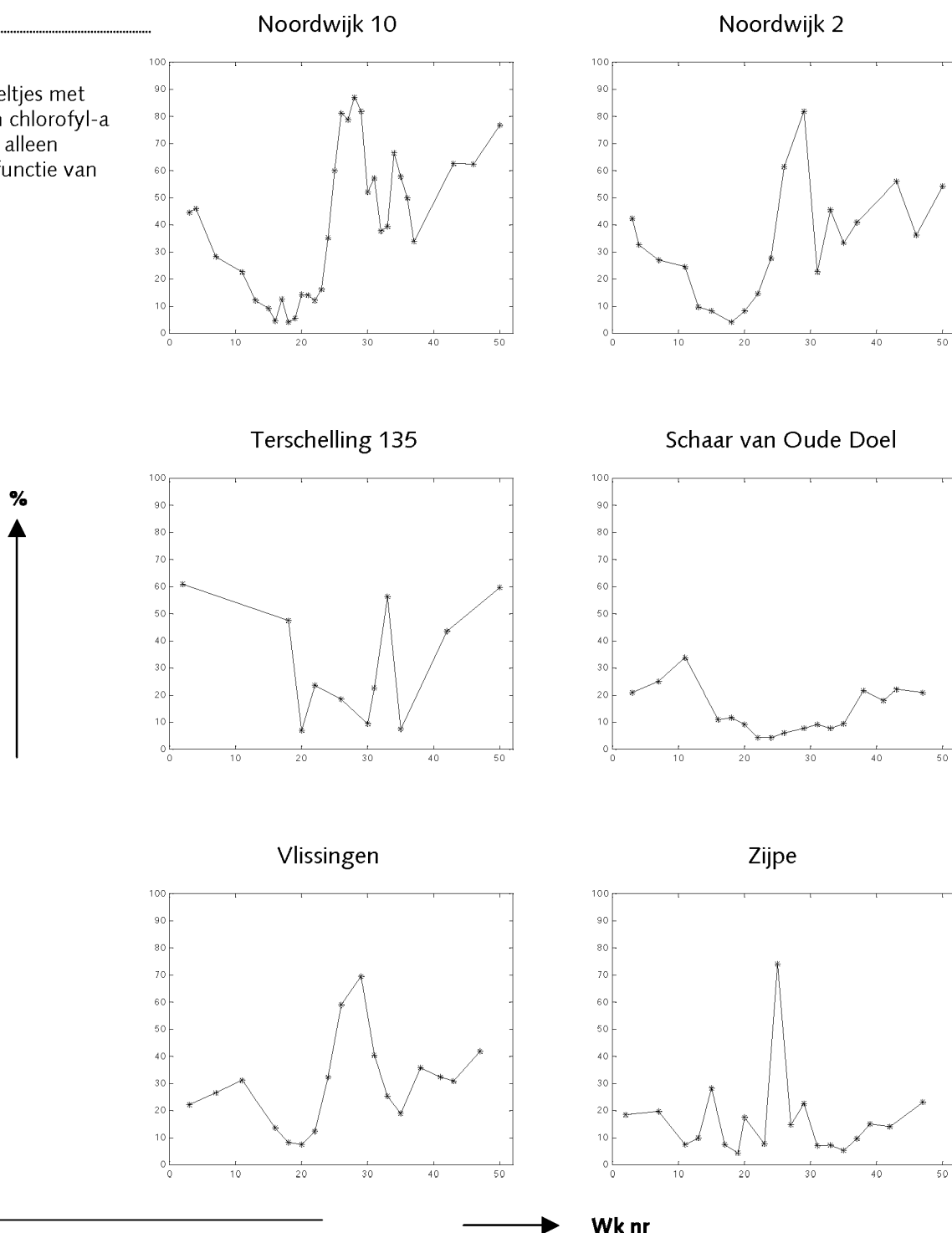
Lok	Wknr	max LinFGR/ml	% t.o.v. 1e	Lok	Wknr	min LinFGR/ml	% t.o.v. 1e	Lok	mean LinFGR/ml	% t.o.v. 1e	Lok	opp LinFGR/ml	% t.o.v. 1e
N2	18	11312002000	100	VL	47	155997460	100	N2	2331016400	100	N2	101439540000	100
N10	15	7610630400	67	SV	47	146675210	94	N10	1479074100	63	N10	59903552000	59
VL	16	4580610200	40	N2	3	81978853	53	VL	1205909600	52	VL	52652450000	52
ZIJ	27	2942472100	26	N10	4	69000956	44	ZIJ	1041518200	45	ZIJ	41507059000	41
SV	26	1547824400	14	ZIJ	2	55089134	35	SV	524178530	22	SV	23134219000	23
TS	42	387104220	3	TS	30	11859533	8	TS	99250561	4	TS	5777862300	6
Lok	Wknr	max N (FGR)/ml	% t.o.v. 1e	Lok	Wknr	min N (FGR)/ml	% t.o.v. 1e	Lok	mean N (FGR)/ml	% t.o.v. 1e	Lok	opp N (FGR)/ml	% t.o.v. 1e
N10	29	169600	100	SV	47	7400	100	SV	32385	100	SV	1473612	100
N2	18	141200	83	VL	31	6400	86	N2	27477	85	N2	1370344	93
SV	24	72000	42	N2	11	5733	77	N10	25898	80	VL	1135336	77
ZIJ	33	60800	36	N10	11	5200	70	VL	22417	69	N10	1055733	72
VL	29	46800	28	ZIJ	2	2800	38	ZIJ	20483	63	ZIJ	910452	62
TS	50	12267	7	TS	18	766	10	TS	6663	21	TS	361399	25
Lok	Wknr	max N (FGO)/ml	% t.o.v. 1e	Lok	Wknr	min N (FGO)/ml	% t.o.v. 1e	Lok	mean N (FGO)/ml	% t.o.v. 1e	Lok	opp N (FGO)/ml	% t.o.v. 1e
N10	29	138880	100	VL	20	1730	100	N10	14688	100	N10	583098	100
N2	29	89967	65	SV	47	1551	90	N2	9825	67	N2	509345	87
VL	29	32529	23	N2	20	1242	72	VL	7071	48	VL	365608	63
ZIJ	25	15282	11	N10	22	739	43	SV	3880	26	SV	206881	35
SV	38	8015	6	ZIJ	2	517	30	ZIJ	2783	19	TS	161356	28
TS	50	7327	5	TS	30	190	11	TS	2543	17	ZIJ	128611	22
Lok	Wknr	max N (FRR)/ml	% t.o.v. 1e	Lok	Wknr	min N (FRR)/ml	% t.o.v. 1e	Lok	mean N (FRR)/ml	% t.o.v. 1e	Lok	opp N (FRR)/ml	% t.o.v. 1e
N2	18	135940	100	VL	31	4188	100	SV	20962	100	SV	886033	100
SV	24	59587	44	SV	47	3796	91	N2	16054	77	N2	775418	88
N10	33	45951	34	ZIJ	2	1788	43	ZIJ	14084	67	ZIJ	608858	69
ZIJ	33	40529	30	TS	18	281	7	VL	11285	54	VL	539595	61
VL	18	28399	21	N10	21	0	0	N10	10477	50	N10	432511	49
TS	42	6505	5	N2	4	0	0	TS	3526	17	TS	182662	21

4.3 Kenmerken van pigmentgroepen

Oranje fluorescerend. De verhouding van de totaalconcentratie deeltjes met chlorofyl-a en fycoerithrine en de totaalconcentratie deeltjes met alléén chlorofyl-a oftewel $\% N_{\text{tot}}(\text{FGR\&FGO}) / N_{\text{tot}}(\text{FGR})$ is weergegeven per lokatie gedurende het jaar 2001. Uit de figuren blijkt dat het aandeel van deeltjes met fycoerithrine relatief laag is op de lokaties Schaar van ouden Doel en Zijpe (uitgezonderd één uitschieter).

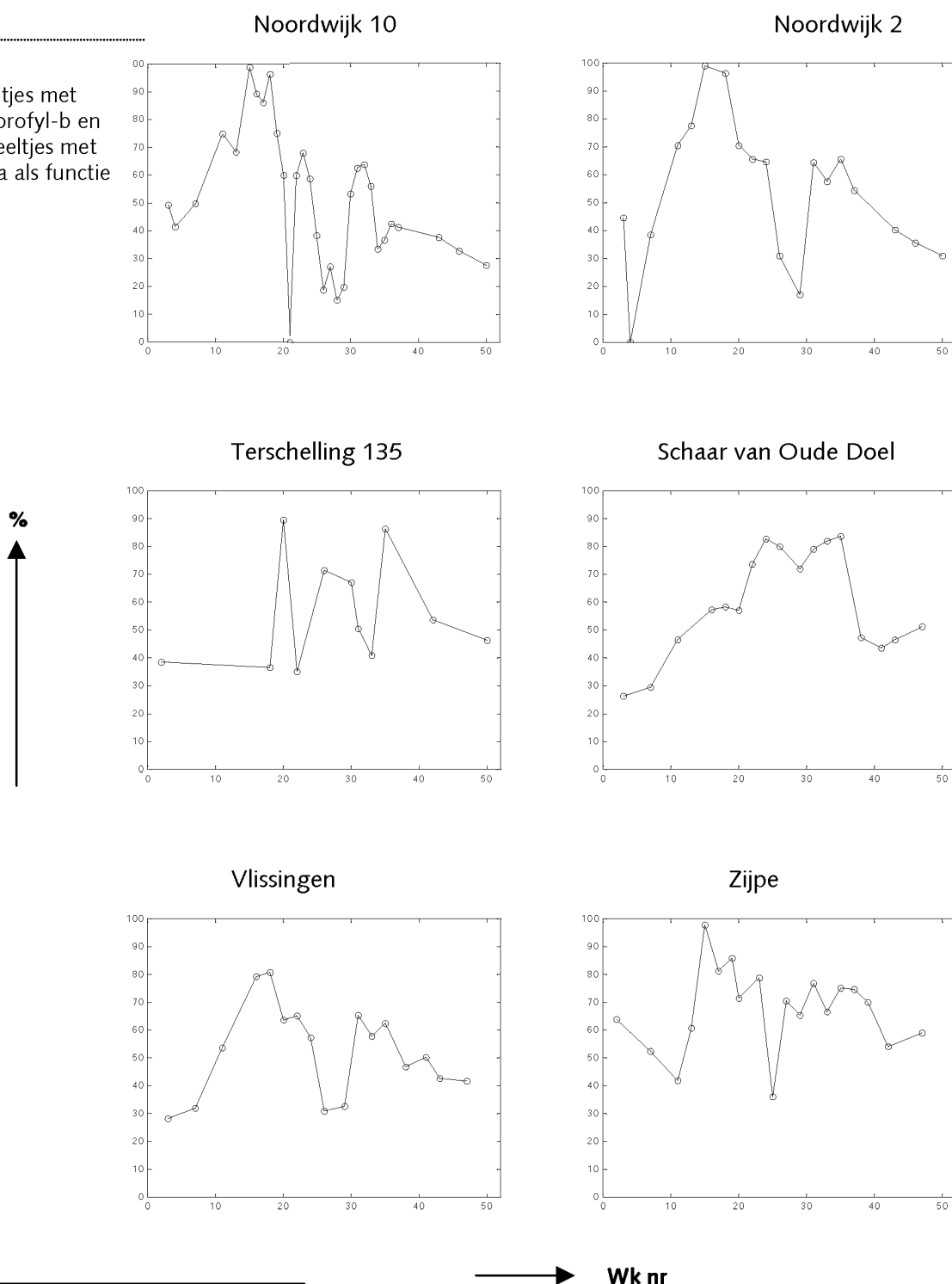
In juli werden op de meeste lokaties de hoogste relatieve bijdragen van deeltjes met fycoerithrine gevonden. Het percentage van deeltjes met fycoerithrine ligt op de meer 'zoute' lokaties (N2,N10,VI,TS) significant hoger en het verloop op deze lokaties toont onderlinge gelijkheid.

FIGUUR 4.3.1
Verhouding deeltjes met
fycoerithrine en chlorofyl-a
en deeltjes met alleen
chlorofyl-a als functie van
de weeknr



Rood fluorescerend (rode laser): De verhouding van het percentage van de totaalconcentratie deeltjes met chlorofyl-a, -b en fycocyanine/ totaalconcentratie deeltjes met chlorofyl-a oftewel $\% N_{\text{tot}}(\text{FGR\&FRR}) / N_{\text{tot}}(\text{FGR})$ is weergegeven per lokatie gedurende het jaar 2001. Het verloop van de lokaties Noordwijk 10, Noordwijk 2 en Vlissingen vertoont een opvallende gelijkenis. Voor Terschelling is dit lastig vast te stellen (gering aantal waarnemingen). Vooral in de periode rond april worden voor deze lokaties hoge percentage (>80%) gevonden van deeltjes met chlorofyl-a, -b en fycocyanine ten opzichte van het totaal aantal autotrofe deeltjes (alleen chlorofyl-a). Schaar van Oude Doel vertoont een afwijkend verloop ten opzichte van de overige lokaties. Opvallend is dat in de periode dat de hoogste percentages deeltjes met

FIGUUR 4.3.2
Verhouding deeltjes met fycocyanine/chlorofyl-b en chlorofyl-a en deeltjes met alleen chlorofyl-a als functie van de weeknr



fycoerithrine gevonden worden (Figuur 4.3.1), lagere (soms laagste) waarden gevonden worden voor deeltjes met chlorofyl-b en fycocyanine. Met andere woorden, deze tegengestelde relatie zou kunnen duiden op een concurrentiestrijd tussen deze veelal kleinste deeltjes (<10 µm). Neemt de ene pigmentgroep toe dan gaat dat ten koste van de andere pigmentgroep. Dit gaat op voor zowel de zoetwater als zoutwater lokaties, die met flowcytometrie gemeten zijn.

Het is inmiddels eenvoudig om achteraf (na analyse) met automatische clusterherkennings-software, clusters van deeltjes uit de 6 parameter fcm-dataset te selecteren op grond van dezelfde pigmenthoeveelheid en pigmentcombinaties. Van de geclusterde deeltjes zouden foto's, met behulp van Imaging in Flow, uitsluitsel kunnen geven over de soorten. Echter de clusterherkenning vindt achteraf plaats en is niet te gebruiken in combinatie met software die tijdens de analyse gebruikt wordt. Met andere woorden, het selecteren van achteraf geclusterde deeltjes voor Imaging in Flow is niet mogelijk. Om deze reden is het lastig om achteraf vastgestelde clusters toe te kennen aan soorten fytoplankton. De vraag is dan wat deze clustergegevens ons aan extra informatie zouden leveren zonder de soortennamen te weten. Een alternatief om toch een vergelijking met microscopie te maken is de meest talrijke clusters die tezamen 90 of 95 % van de concentratie bepalen en te vergelijken met de microscopische tellijsten. Verder wordt een groot deel van de concentratie bepaald door deeltjes kleiner dan 5-10 μm en komen deze deeltjes nauwelijks voor in microscopische tellijsten. Om deze reden zijn deeltjes kleiner dan 5 μm uit de dataset verwijderd. De automatische clusterherkenning is afhankelijk van de instellingen van de software en deze instellingen zijn voor alle monsters constant gehouden.

De resultaten van de snelle geautomatiseerde clusterherkenning met behulp van Matlab is op deze manier voor Noordwijk 10 uitgewerkt en gepresenteerd in tabel 4.3. De mate van talrijkheid (aantallen) van deeltjes per clustergroep is dezelfde als van de microscopische tellingen. '+++' >10%, '++' >5% en <10%, '+' >2% en <5%. De resultaten van de microscopische snelle tellingen (in principe zijn dit dezelfde resultaten als uit de vorige paragraaf, maar zonder soortnamen en hier gesorteerd van hoog naar laag) zijn tevens in de tabel 4.3 weergegeven.

[illegible]

4.5 Resultaten flowcytometrie en snelle tellijsten microscopie

Uit de vergelijking tussen de snelle microscopische tellijsten en de aantallen gevonden clusters en onderlinge verdeling hiertussen (zie ook tabel 4.3) blijkt een redelijk tot goede overeenkomst tussen beide methoden. De aantallen van de meest dominante ('+++') soorten (MIC) en meest dominante clusters (FCM) wijken onderling weinig af. Met andere woorden, ondanks de geringe pigmentverschillen worden toch clusters gevonden, die in (relatief) aantal overeenkomen met de microscopisch gevonden aantallen. Verder zijn de deeltjes kleiner dan 5 µm uit de dataset van Noordwijk 10 verwijderd alvorens te clusteren. De grens zou eventueel ook hoger kunnen liggen op bijvoorbeeld 10 µm, omdat voor de snelle microscopische analyse immers ook 10 µm gaas gebruikt wordt. Nu is gekozen voor vaste instellingen voor alle Noordwijk monsters. Deze instellingen hebben in het verleden redelijke resultaten geleverd met een beperkt aantal monocultures. Ondanks geringe investering in het testen van de meest optimale verwerking bij verschillende instelmogelijkheden van de software zijn de resultaten van Noordwijk 10 zeer hoopgevend ten aanzien van de clusters die gevonden zijn.

De koppeling tussen in Matlab gevonden clusters en overeenkomstige soorten is de volgende te overbruggen stap. Hiervoor zouden de deeltjes behorende tot de in Matlab gevonden clusters met behulp van imaging in flow in beeld gebracht moeten worden. De koppeling met in Matlab gevonden clusters en imaging in flow opnames van soorten is echter (nog ?) niet mogelijk. De goede gevonden overeenkomst tussen getelde soorten (MIC) en aantallen clusters (FCM) is aanleiding om hier verder op door te gaan in combinatie met imaging in flow voor de vaststelling van soorten binnen elk gevonden cluster.

De flowcytometrische analyse wordt gekenmerkt, maar daardoor ook verstoord door de hoge gevoeligheid van het instrument voor kleine weinig fluorescerende deeltjes. Het resultaat is dat veel zeer kleine deeltjes die met flowcytometrie worden gedetecteerd, niet met microscopie wordt waargenomen en geteld. Het aandeel van deze kleine deeltjes ten opzichte van microscopie is erg hoog. Een vergelijking tussen flowcytometrie en microscopie waarbij de kleine deeltjes zijn weggefilterd, hetzij digitaal hetzij in werkelijkheid, zou een evenwichtigere vergelijking met microscopie moeten opleveren. Dit is onderzocht voor de dataset van de eerste helft van het jaar 2001, waarbij digitaal alle deeltjes kleiner dan 10 µm zijn weggefilterd en waarbij een tweede analyse is gedaan ten bate van Imaging in Flow waarbij in werkelijkheid deeltjes over een 10 µm gaas gefractioneerd zijn. Opvallend was dat tussen beide fractioneringsmethoden (digitaal vs werkelijk) geen één op één relatie gevonden werd. De digitaal gefractioneerde monsters bleken naar verhouding veel meer detritusachtige vlokken langer dan 10 µm (met chlorofyl-a) te bevatten dan de gefractioneerde monsters. Resultaten van de eerste helft van het jaar 2001 van gefractioneerde monsters (10 µm) tonen qua gevonden groottefractie en clusters grote overeenkomsten met microscopische snelle tellijsten, juist door afwezigheid van (veel) detritus ten gunste van de aanwezigheid van meer algen. Er wordt nog gewacht op de absolute getelde aantallen met behulp van de uitgebreide microscopische analyse van gefixeerde

monsters voor een volledig vergelijking met flowcytometrie.

De geschatte concentratie deeltjes met chlorofyl-a wordt dus voor een groot deel beïnvloed door de aanwezigheid van detritus met ingesloten chlorofyl-a bevattende deeltjes, die bovendien in sommige gevallen een groot deel van de biomassa blijken te bepalen. Deze opvallende nieuwe invalshoek laat de vraagstelling ontstaan wat nu gemeten dient te worden voor de fytoplanktonmonitoring. Alléén fytoplankton herkenbare cellen of de verzameling van deeltjes met chlorofyl-a. Voor de gewenste vergelijking met microscopie wordt voortaan een tweede flowcytometrische analyse gedaan met over een 10 µm gaas gefractioneerd monster. Verwacht wordt dat de resultaten van dit tweede gefractioneerde monster veel beter de grootteklassen, de waargenomen soorten en de concentraties zoals bepaald met microscopie, zal benaderen.

4.6 Verschillen tussen FlowCytoMetrie en MICroscopie

Wellicht wordt deze paragraaf ten overvloede behandeld, maar toch worden de voornaamste verschillen tussen meetgegevens afkomstig van flowcytometrie en van microscopie hiernavolgend opgesomd.

FlowCytoMetrie

- Niet zozeer soorten, maar algemene gegevens fytoplankton (totaalconcentratie, chlorofyl-a etc.) worden als functie van de groottefractie vastgesteld
- Elke waarneming met chlorofyl-a fluorescentie draagt bij aan de totaalconcentratie
- Meerdere cellen bijeen (kolonie of keten) worden als één deeltje beschouwd
- Kleine deeltjes < 5 µm en vanaf ca 0,5 µm worden al gedetecteerd en dus meegenomen in de eindconcentraties
- Gebruikte monstervolumina kleiner dan 5 ml en meestal < 1 ml
- Aantal deeltjes dat geteld wordt ca 10000-15000
- Analyseduur ca 2-15 minuten

MICroscopie

- Per taxonomisch vastgestelde soort worden aantallen geteld
- Deeltjes vanaf ca 5-10 µm worden geteld
- Monster worden gefixeerd, waardoor celverlies van kwetsbare soorten zal optreden
- Gebruikte monstervolumina meestal groter dan 100 ml
- Totaal aantallen geteld meestal kleiner dan 500
- Analyseduur langer dan 1 hr

4.7 Efficiency

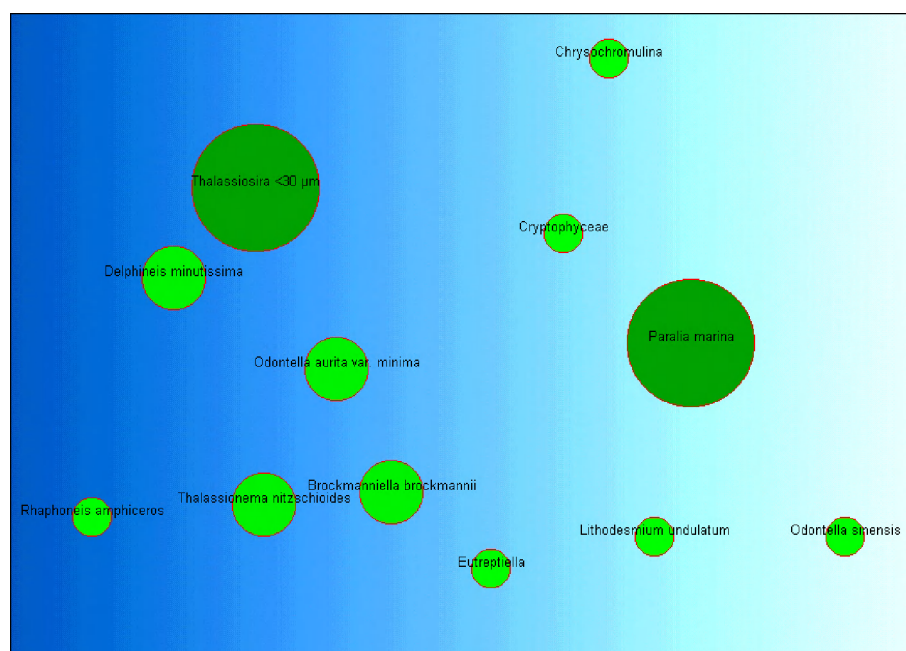
De ervaring met de verwerking van MWTL-monsters in de laatste zes maanden van 2001 heeft wederom geleerd dat een snelle flowcytometrische analyse en (geautomatiseerde) verwerking tot de eindresultaten goed te realiseren is binnen een tijdsbestek van gemiddeld één uur per monster of minder. Bij grotere aanvoer van monsters wordt de verwerkingsduur korter omdat de overhead (calibratiemetingen) per monster geringer wordt. Van de rapportage via grafieken op een website is gebleken dat dit binnen 24-48 uur gerapporteerd is.

4.8 Hoe verder in 2002

De fytoplankton monitoring website van fytoplanktonmeetgegevens afkomstig van flowcytometrie en microscopie wordt begin 2002 op internet gezet. Voor fytoplanktonmonitoring zoals uit vorige rapportages gebleken is, wordt een integrale aanpak van microscopie en flowcytometrie voorgesteld. Dit betekent dat naast de flowcytometrische vastgestelde kwantitatieve informatie, microscopische meer kwalitatieve informatie (over soorten) gewenst is. Van de lokaties Noordwijk 10 (maar ook Noordwijk 2 en Terschelling 135) zijn de resultaten van de snelle microscopische analyse binnen 48 hr beschikbaar. Per januari 2002 zullen op de flowcytometrie monitorings-website de microscopische snelle tellijsten naast de flowcytometrie gegevens beschikbaar zijn. Gekozen is voor een visuele aanpak in de vorm van een afbeelding, waarbij 3 'bubble'groottes afgebeeld worden voor de drie klassen ('+++','++','+'). Een voorbeeld hiervan is in figuur 3.9.1 afgebeeld.

FIGUUR 4.9.1

Visuele presentatie van de microscopische analyse van N10 op 15 oktober 2001



De snelle tellijsten van de snelle microscopische scan worden gekoppeld met

flowcytometriegegevens bijvoorbeeld via automatische clustering, database en eventuele IIF-foto's nadat een groter volume (bijv. 500 ml) over 10 µm gaas gefractioneerd is om het aandeel grotere deeltjes representatiever te laten zijn. Begin 2002 wordt bekeken welke omrekenmethode voor de lengtebepaling op grond van de signaallengte definitief gebruikt zal gaan worden. De rapportage van de flowcytometrie-monitoringgegevens zullen in Labinsys en vervolgens ook aan DONAR worden gerapporteerd.

4.9 Innovatieve ontwikkelingen

De invoering van het pulse shape analysis principe, waarbij meer informatie per deeltje gegenereerd wordt, zal leiden tot meer clusters van specifieke soorten en een betere soortherkenning. Hierbij zal de rol van de imaging in flow als extra validatie van de controle van de clusters per soort belangrijk(er) worden.

Experimenten met statistische methoden en ook neurale netwerkmethoden om soorten toe te kennen aan flowcytometrische (pulse shape) gegevens zullen in 2002 worden toegepast.

5. Aanbevelingen

Voortaan wordt naast de standaard flowcytometrische analyse van het gehele monster de analyse van het gefractioneerde ($>10\ \mu\text{m}$) monster aanbevolen. De concentratie van de laatste zullen naast de resultaten van de snelle microscopische tellijsten gepresenteerd worden op de website waarbij een schatting gemaakt kan worden van de concentraties van soorten.

De pulse shape analyse module wordt begin 2002 opgeleverd en aanbevolen wordt om monitoringsmonsters hiermee te analyseren.

De bepaling van de lengte van deeltjes is bij de standaard analyse gebaseerd op de lengte van het fluorescentiesignaal. Bekend is dat voor bolvormige soorten met relatief veel chlorofyl-a overschatting van de lengte optreedt, omdat het fluorescentiesignaal relatief fors is. In de tweede helft van het jaar is onderzoek gedaan naar de lengte gebaseerd op de zijwaartse lichtverstrooiing, waarbij gevonden is dat de berekende lengte in veel gevallen beter overeen kwam met de werkelijke lengte. Een nadeel is de trendbreuk die zal ontstaan in de dataset. Aanbevolen wordt de twee principes voor de lengtebepaling van deeltjes naast elkaar te gebruiken om inzicht te krijgen in de consequenties.

6. Conclusies

De monitoring van fytoplankton met behulp van flowcytometrie heeft geleerd dat:

- ✓ Alle bemonsteringen van 5 van de 6 lokaties zijn in 2001 uitgevoerd. Alleen van Terschelling 135 is een behoorlijk aantal monsters niet genomen. De monsters zijn flowcytometrisch meestal binnen 24 hr geanalyseerd en gerapporteerd.
- ✓ Resultaten tussen lokaties en tussen jaargangen van dezelfde lokaties laten bepaalde trends zien, die met andere technieken, naar ons bekend is, niet zijn waargenomen.
 - trend 1 is de hoge (hoogste) concentratie autotrofe deeltjes die in de jaargangen 2000 en 2001 op diverse lokaties gevonden zijn in juli veroorzaakt door kleine oranje fluorescerende deeltjes.
 - trend 2 is de voor diverse zoutwater en brakke wateren gelijke opgang en neergang van deeltjes met fycoerithine (FGO) en fycocyanine/chlorofyl-b (FRR) en de constatering dat deze beide pigmentgroepen een tegengestelde concentratiebeweging maken gedurende het gehele jaar en voor diverse lokaties.
 - trend 3 is dat de biomassa (chlorofyl/ml) hoofdzakelijk bepaald wordt door grotere deeltjes ($>10\ \mu$), de concentratie (n/ml) door kleine deeltjes ($<10\ \mu$ m).
- ✓ Een onderlinge vergelijking tussen lokaties toonde dat gedurende het gehele jaar 2001 op Noordwijk 2 de hoogste biomassa (concentratie) aanwezig was en dat van de 6 lokaties op Terschelling 135 de laagste gevonden werd (ca 17x). Maar ook dat gedurende het jaar 2001 op de lokatie Schaar van oude Doel de grootste aantallen deeltjes met chlorofyl-a gevonden zijn, gevolgd door Noordwijk 2, Vlissingen en Noordwijk 10 en vervolgens Zijpe en op Terschelling 135 het minst aantal deeltjes met chlorofyl-a is aangetroffen. Tijdsgeïntegreerde waarden in concentraties en biomassa bleken ten opzichte van de gemiddelde waarden per lokatie redelijke overeenkomsten, maar ook verschillen te geven.
- ✓ Een vergelijking tussen aantallen clusters gevonden met flowcytometrie en soorten met microscopie toonde redelijke overeenkomsten, maar het hoge aantal deeltjes kleiner dan $10\ \mu$ m stoort de vergelijking met microscopie. Veelal worden met behulp van flowcytometrie deeltjes kleiner dan $10\ \mu$ m gevonden, welke niet kunnen worden toegeschreven aan soorten, maar aan zeer kleine autotrofe cellen en/of detritus met ingesloten algen of chlorofyl-a bevattende deeltjes. Deze kleinste deeltjes worden niet meegeteld bij microscopische tellingen. Voor een aanvullende vergelijking met microscopie is het zinvol om, evenals bij de microscopische analyse, een voorconcentrering en fractionering van deeltjes groter dan $10\ \mu$ m uit te voeren. De flowcytometrische analyse van deze gefractioneerde monsters is nodig om de relatieve kleine aantallen van deeltjes groter dan $10\ \mu$ m vast te stellen en een concentratie te bepalen, die vergelijkbaar is met microscopische waarnemingen. Een opvallende conclusie is dat detritus (ook grotere vlokken detritus) voor een groot deel kan bijdragen

aan de totaalconcentratie of totaalbiomassa deeltjes met chlorofyl-a. Iets wat met een microscopische analyse niet inzichtelijk gemaakt kan worden.

7. Referenties

Anonymus, MONITOR-programma voor de zoute wateren. Nota GWIO-87.018, 1987

Anonymus, MAS-C0001,

Dubelaar G.B.J., Cunningham A., Groenewegen A.C., Klijnstra J., Jonker R.R., Ringelberg J., Rutten T.P.A., Peeters J.C.H., Vriezekolk G.A., Roy van R.H.M., Tascioglu B., Wietzorrek J., Kachel V., König J.W., Veen van J.J., Boddy L., Wilkins M.F., Morris C.W., Carr M.R., Tarran G.A., Burkill P.H., Beeker A.E.R.: A European Optical Plankton Analysis System: Flow cytometer based technology for automated phytoplankton identification and quantification. Final Report MAS2-CT91-0001, 1995.

Hofstraat, J.W., M. Rademaker & R.P.T. Koeman, Standaardvoorschrift B001: Oppervlaktewater - Voorschrift voor de verzameling en conservering van fytoplankton in het mariene milieu - Ringleiding en sampler, 1991a

Hofstraat, J.W., M. Rademaker & R.P.T. Koeman, Standaardvoorschrift B003: Oppervlaktewater - Voorschrift voor de verzameling van levend fytoplankton (kwantitatief) in het mariene- en brakwater milieu - Ringleiding 1991b

Rutten T.P.A., Sandee A., Hofman A.R.T., Evaluatie van flowcytometrie fytoplanktonmonitoring 2000, Rapport RIKZ/2001.034, 2001

Rutten T.P.A., Sandee A., Hofman A.R.T., Flowcytometrie fytoplanktonmonitoring 2001a, Rapport RIKZ/2003.012