

Evaluatie van flowcytometrie fytoplanktonmonitoring 2000

Evaluatie van flowcytometrie fytoplanktonmonitoring 2000

Rapport RIKZ/2001.034

T. Rutten, B. Sandee en A. Hofman

Augustus, 2001

Colofon

.....

Uitgegeven door:

RIKZ

Opdrachtgever:

ITB en ITL intern

Project:

BIOMON & TNW*Millab

Auteurs:

Thomas Rutten, Ben Sandee en Angelo Hofman

Datum:

Augustus 2001

Informatie:

ITL-lab Middelburg

Ir. T. Rutten

E-mail:

T.P.A.Rutten@rikz.rws.minvenw.nl

Tel. : 0118 672273

Inhoudsopgave

Voorwoord	III
Samenvatting	V
1. Inleiding	1
1.1 Een overzicht	1
1.2 Wat nu?	3
1.3 Vraagstelling van dit rapport	5
2. Materialen en Methoden	6
2.1 Beschrijving gehanteerde materialen en methoden	6
2.2 Uitwerken gegevens	7
2.2.1 Globale trends	7
2.2.2 Vergelijking met andere technieken (HPLC, zwevend Stof, POC)	8
2.2.3 Fytoplanktonsoorten flowcytometrie versus microscopie	9
3. Resultaten	10
3.1 Algemene trends Noordwijk 10	10
3.2 Noordwijk 10, een vergelijking met referentiemethoden	14
3.3 Noordwijk 10, microscopie versus flowcytometrie	17
3.4 Imaging in flow versus microscopie (Noordwijk 10 en Noordwijk 2)	21
4. Discussie	25
4.1. Algemene trends	25
4.1.1. Fytoplanktonconcentratie	25
4.1.2. Chlorofyl-a	25
4.1.3. Biovolume	26
4.1.4. Fycoerithrine en fycocyanine	26
4.2. Relatie met nutriënten	27
4.3. Relaties nutriënten met behulp van statistiek: principaal componenten analyse	28
4.4. Vergelijkingen met referentietechnieken	31
4.4.1. LinFGR/ml (biomassa) versus Chlorofyl-a (HPLC)	31
4.4.2. LinFGR/ml (biomassa) versus particulier organisch koolstof (Carlo Erba)	32
4.4.3. LinFLS/ml (biovolume) versus particulier organisch koolstof (Carlo Erba)	32
4.4.4. LinFLS/ml & linPLS/ml (biovolume) versus zwevend stof gehalte (gravimetrie)	32
4.4.5. Totaalconcentratie autotroof fytoplankton: flowcytometrie versus microscopie	33
4.4.6. Imaging in flow foto's versus microscopische waarnemingen	34
4.4.7. Aantallen flowcytometrie versus microscopie	35
4.4.8. Huidige obstakels om soorten te benoemen uit flowcytometrie-data	36
4.4.9. Resume	37

5. Conclusies	40
6. Aanbevelingen	42
7. Referenties	44

BIJLAGEN

1. Foto's gemaakt met de imaging in flow module
2. Voorbeeld mogelijke internetpresentatie flowcytometrische analyseresultaten
3. Schematisch overzicht mogelijkheden met flowcytometrie
4. Monitoring door Bedford Basin Institute/William Li
5. Bijlagenverslag met uitgewerkte resultaten voor alle locaties

Voorwoord

Binnen de laboratoria van het RIKZ vindt innovatie en technologische ontwikkeling plaats van analyses en bemonsteringsmethoden onder het deelproject TNWMILLAB. Dit deelproject is een onderdeel van het Programma Basisinformatie **N**atte **I**nfrastructuur dat door het hoofdkantoor wordt gefinancierd. Een onderdeel van het PBNI is het programma ten bate van de Monitoring Waterstaatkundige Toestand des Lands (MWTL) van de Nederlandse kustwateren en het gehele Nederlandse deel van de Noordzee dat voorziet in registratie van biotische en abiotische factoren, met als doel het volgen van lange termijn trends en veranderingen in de genoemde wateren voor de voorbereiding en evaluatie van het waterbeleid. Een van de biotische factoren die bepaald worden, bestaat uit fytoplanktontellingen.

Een onderdeel van technologische vernieuwing binnen het laboratorium in Middelburg is de inzet van flowcytometrie, een techniek om snel, objectief en reproduceerbaar algen te tellen in een watermonster. Algentellingen worden momenteel uitgevoerd met behulp van microscopie en zijn tijdrovend en persoonsafhankelijk. Bekeken is in hoeverre flowcytometrie geïntegreerd kan worden met microscopie met als doel de algentellingen in de toekomst efficiënter te kunnen uitvoeren. De resultaten van flowcytometrische analyses van monsters uit het PBNI-monitoringsprogramma van het jaar 2000 zijn geëvalueerd en vergeleken met microscopische resultaten.

Dit rapport is gemaakt in opdracht van de projectleider (TNWMILLAB) dhr. Evers en de projectleider (BIOMON) dhr. Bot, beiden van het Rijksinstituut voor Kust en Zee (RIKZ). Het rapport richt zich met name op een lezerspubliek met een aquatische-biologische achtergrond.

Samenvatting

De fytoplanktonmonitoring in de Nederlandse kustwateren wordt sinds jaren in het kader van het Rijkswaterstaat MWTL-programma uitgevoerd met behulp van microscopie. Hiernaast wordt flowcytometrie de laatste jaren tevens ingezet op een beperkter aantal locaties. De daadwerkelijke integratie met de tijdrovende microscopische analyse en een gedeeltelijke vervanging daarvan, is nog niet gerealiseerd. De verbeterde flowcytometrische apparatuur (kwaliteitsborging, robuust systeem, in staat zijn digitale foto's te maken, vergaande automatisering) bij de laboratoria van het RIKZ en de nieuwe analysestrategie (groottefracties, visuele informatievoorziening, snelle rapportage), hebben geleid tot nieuwe informatie. Op grond van de in dit verslag behandelde bevindingen, kan de discussie gevoerd worden welke rol flowcytometrie in fytoplanktonmonitoring zal betekenen.

De bevindingen op de meest frequent bemonsterde locatie Noordwijk 10 zijn geëvalueerd. Van de overige vijf locaties zijn de resultaten in de vorm van visuele presentaties in het bijlagenverslag weergegeven.

Uit de gestapelde staafdiagrammen van Noordwijk 10 blijkt dat de bijdragen aan de totaalconcentratie fytoplanktondeeltjes bepaalde trends laat zien. Over het gehele jaar domineren de deeltjes kleiner dan 5 µm in aantal, maar is hun bijdrage in de chlorofyl-a concentratie klein. In het voorjaar, als ook midden-eind juli en begin augustus zijn duidelijke bloeien (aantallen deeltjes) waarneembaar van grotere grootteklassen. Het biomassaverloop verschilt van het totaal(aantal)concentratieverloop. Begin mei en midden juni, midden juli en begin augustus worden de hoogste biomassa's gevonden, terwijl de totaalconcentratie alleen midden juli opvallend hoog is. Verder valt op dat een groot deel van de deeltjes kleiner dan 5 µm tevens fycoerithrine-pigment bevatten.

Uit de vergelijking van flowcytometrische resultaten met referentietechnieken waarbij chlorofyl-a, zwevend stof en particulier organisch koolstof van dezelfde locaties bepaald zijn, blijkt met name voor chlorofyl-a (voor alle locaties) en POC (voor 4 locaties) een redelijke tot goede correlatie met de flowcytometrische LinFGR/ml parameter. Voor zwevend stof werd nauwelijks correlatie gevonden met een flowcytometrische parameter.

De vergelijking met microscopische resultaten leverden goede overeenkomsten tussen beide technieken voor de gevonden totaal-fytoplanktonconcentraties, indien bij flowcytometrie de groep deeltjes kleiner dan 5 µm werd weggelaten. Hierin blijkt een essentieel verschil tussen beide technieken. Flowcytometrie meet dankzij de hoge gevoeligheid ook picoplankton (1-5 µm) dat veelal gemist wordt bij microscopie. Uit de microscopische waarnemingen blijkt dat de soorten die meer dan 2% bijdragen aan de totaalconcentratie gemiddeld 92% van de totaalconcentratie verklaren. Het aantal soorten dat hiervoor nodig is ligt gemiddeld op 7,5 (±2,5) per monster gebaseerd op de uitgebreide microscopische analyseresultaten van Noordwijk 10 over het eerste half jaar 2000. Uit de flowcytometrische clusteranalyse worden in dezelfde periode gemiddeld 8,4 (±1,9) clusters van deeltjes gevonden.

Een vergelijking tussen soorten gevonden met microscopie en imaging in flow

flowcytometrie is voor het jaar 2000 een leerproces gebleken. In het begin werden te kleine en niet determineerbare deeltjes teveel gefotografeerd, waardoor de grotere deeltjes, die juist met microscopie bepaald werden, statistisch gemist werden. Het instellen van de digitale camera vereiste tevens enige ervaring die aan het eind van het jaar 2000 goede foto's ging opleveren. De oogst duidelijke foto's van grotere deeltjes was daardoor relatief laag. Concentreren of fractionering van grotere deeltjes (m.b.v. een planktonnet van 10 µm) is noodzakelijk gebleken. De duidelijke foto's van grotere deeltjes waren goed vergelijkbaar met de microscopisch waargenomen soorten. Vanaf januari 2001 worden goede en grote aantallen digitale foto's per monster genomen, dankzij de in 2000 opgebouwde ervaring.

Uit de relatie tussen verschillende variabelen (nutriënten, chlorofyl, koolstof etc.) en flowcytometrische variabelen blijken met behulp van principaal componenten analyse drie grootteklassen te clusteren. Kleinere fytoplanktondeeltjes < 40 µm, middelgrote tussen 40 en 150 µm en de grotere fytoplanktondeeltjes > 150 µm. De middelgrote deeltjes tonen de grootste tegengestelde relatie met N-verbindingen, de grotere deeltjes vertonen de grootste tegengestelde relatie met P-verbindingen. Feofytine toont dezelfde mate variantie met de groep grotere deeltjes, chlorofyl lijkt meer te correleren richting de groep middelgrote deeltjes. De particulaire fracties (POC, PN, PP) tonen dezelfde variatie als de groep middelgrote deeltjes.

De aantallen deeltjes op grond waarvan met beide technieken tellingen gebaseerd zijn verschilt van circa 200 voor microscopie tot 10000-15000 voor flowcytometrie. Het aantal digitale foto's zal vergelijkbaar zijn met microscopie.

Concluderend achten de auteurs van dit verslag een integratie van flowcytometrie en imaging in flow met de microscopie waardevol en mogelijk. Aangetoond is dat de flowcytometrische verkregen informatie, die geleverd wordt betrouwbaar en objectief is. Het voordeel van het tellen in levende monsters en het maken van digitale opnames hierin is dat geen celverlies optreedt door conservering en fixatie door het uit elkaar spatten van cellen zoals per definitie zal plaatsvinden bij elke tot nog toe bekende fixatiemethode. Het nadeel van levende monsters is de snelheid waarbinnen een monster geanalyseerd moet zijn om de representativiteit van het monster te waarborgen. Uit de bevindingen blijkt dat de flowcytometrisch verkregen informatie goed overeenkomt met andere (bekendere) analytische technieken. Bij een standaard flowcytometrische analyse wordt meer informatie verkregen over kleine deeltjes, die microscopisch niet of nauwelijks zichtbaar zijn. Daarnaast onderscheidt flowcytometrie zich van microscopie doordat snel een relatie gelegd kan worden tussen aantallen, biomassa, groottefracties en soorten. De soortensamenstelling uitgedrukt als biomassa per volume (chlorofyl-a) is bij microscopische tellingen lastig. Gedetailleerde informatie over soorten of de identificatie van soorten wordt verkregen op grond digitale opnames van deeltjes (imaging in flow). Aan de foto-opnames kan kwantitatieve informatie ontleend worden over de onderlinge verhoudingen waarin soorten voorkomen in een monster.

De kosten van de flowcytometrische analyse liggen zeker niet hoger dan van een microscopische telling. Tellingen bij flowcytometrie zijn echter op robuustere statistiek gebaseerd. Een nadeel van flowcytometrie is de apparaatafhan-

kelijkheid, omdat de apparatuur commercieel niet leverbaar is. Een verbetering van de soortherkenning alleen op grond van flowcytometrische optische data (dus geen foto's) wordt verwacht in 2001 door de introductie van een nieuwe vorm van signaalanalyse, die toepasbaar wordt gemaakt in het kader van de upgrade van de optical plankton analyser.

1 Inleiding

1.1 Een overzicht

In dit rapport wordt de vergelijking ten bate van fytoplanktonmonitoring tussen flowcytometrie en microscopie uitgewerkt. Dit is drie, vier en zes jaar geleden al eerder uitgevoerd, beschreven en besproken, maar doordat de flowcytometrie-apparatuur bij het laboratorium van het RIKZ momenteel significant verbeterd is, liggen nieuwe mogelijkheden in het verschiet. Zo is er de afgelopen jaren extra inspanning aan de voortdurende kwaliteitsborging besteed om reproduceerbaar meten te garanderen, is de dataverwerking geautomatiseerd en verbeterd en wordt actief gebruik gemaakt van de optie om foto's tijdens analyse te maken (imaging in flow) ter identificatie van fytoplankton deeltjes.

Volledigheidshalve wordt het doel van de fytoplanktonmonitoring beschreven. Dit is tweeledig:

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

Uit de voorgaande stukken en discussies (*'Rol flowcytometrie in fytoplanktonmonitoring', RIKZ/IT-97.838*) over dit onderwerp is aangegeven dat behoefte is aan *'bruikbare informatie, welke van belang is voor ecologische studies, zoals de fytoplankton grootteverdeling, biodiversiteit, eetbaarheid en toxische algenproblematiek. Van biodiversiteit werd gezegd dat dit op verschillende manieren gedefinieerd kan worden namelijk op soortniveau (zoals met microscopie bepaald wordt), maar ook op grootte of biovolume, of pigmentgroepen.'* Uit diezelfde discussie bleek dat er *'behoefte was aan een snellere vorm van rapportage van fytoplanktongegevens'.*

Men was het erover eens dat destijds de sterke punten van flowcytometrie waren:

- *Mogelijkheid tot grootteverdeling van fytoplankton gekoppeld aan fluorescentiegegevens (bijv. chlorofyl).*
- *De grote aantallen die geteld kunnen worden.*
- *Toxische soorten die met bijv. RNA-probes snel gemeten kunnen worden.*
- *Nanoplankton en picoplankton analyse.*

Verder werd geconcludeerd dat *'de problematiek van het tellen van zeldzame soorten en de hiervoor benodigde grote volumina zou aangepakt moeten worden met concentrering of fractionering, dat flowcytometrie een goede bijdrage in combinatie met moleculaire (RNA-probe) technieken kan leveren binnen de toxische algen monitoring, dat er geen trendbreuk wordt veroorzaakt (zowel niet microscopisch als flowcytometrisch) alvorens de resultaten van de biologische evaluatie uitgewerkt waren en dat (inter)nationale verplichtingen over eutrofiërende parameters nagekomen blijven worden'.*

Uit steekproefsgewijze vergelijkingen van een vorige evaluatie tussen flowcytometrie (Optical Plankton Analyser/OPA) en microscopie (*'Evaluatie monitoringsdata '90'-'96', RIKZ/IT 97.813x*) bleek al dat op de locaties Noordwijk 2, Noordwijk10 en Terschelling 135 *'redelijke correlaties gevonden werden tussen deeltjesconcentraties bepaald met microscopie en flowcytometrie'*. Echter de overeenkomsten waren met name terug te voeren *'op de korte periodes van bloei van de overeenkomstige soorten, welke door beide technieken waargenomen werden, afgewisseld door periode met lage concentraties'*.

Een nieuw gegeven was dat op grond van de microscopische tellijsten

- *'het aantal soorten dat voor een groot deel (95 %) de totale Fytoplanktonconcentratie bepaalde voor de drie genoemde locaties maximaal 13 en gemiddeld 5 à 6 soorten bedroeg'. Bovendien bleek dat een redelijk deel van deze soorten (circa 50%) geteld/vastgesteld kon worden met flowcytometrie.*
- *'Daarnaast bleek iets soortgelijks voor de biomassa namelijk 'het aantal soorten dat voor een groot deel (95 %) de totale biomassaconcentratie bepaalde, was maximaal 24 en gemiddeld 9 soorten.'*

Echter het aantal soorten per monster dat geïdentificeerd wordt met behulp van microscopie is veel groter dan flowcytometrie, omdat met flowcytometrie met name alleen de numeriek dominanten worden onderscheiden in kleinere volumina waardoor grotere deeltjes (met veel relatieve biomassa) statistisch gemist werden.

Verder viel op dat

- *'het totaal aantal tellingen per soort en analyse bij microscopie over het algemeen veel geringer is dan bij flowcytometrie',* hoewel met flowcytometrie veelal in veel kleinere volumina geanalyseerd is.

Nog eerder zijn OPA-resultaten van de locatie Noordwijk 10 (NW10) uit 1990 en 1991 uitgewerkt en beschreven in een rapport (*v. Zeijl et al., 1993*) en publicatie (*Hofstraat et al., 1994*). Ook hierin zijn vergelijkingen gemaakt tussen lichtmicroscopische en flowcytometrische resultaten voor de variabelen, die men toen duidelijk kon onderscheiden namelijk de totale concentratie fytoplankton, Rhodomonas of Cryptophyceae en Phaeocystis sp. (alleen '91). Verder werden vergelijkingen gemaakt tussen de lineaire rode fluorescentie van de groene laser (flowcytometrie) en de chlorofyl-a concentratie (HPLC/High Performance Liquid Chromatography) en de in-situ fluorescentie (Turner)(alleen '91). De conclusies luiden dat:

- *Flowcytometrie bruikbaar is als kwantitatief meetinstrument over langere periodes bij gebruik van standaard chlorofylbollen voor instrumentele calibratie.*
- *Totaaltellingen van natuurlijke fytoplanktonmonsters met behulp van flowcytometrie mogelijk is door onderscheid op het niveau van de belangrijk(st)e taxa of soortgroepen en zelfs van sommige soorten.*
- *De kracht van flowcytometrie vooral zit in het verrichten van grote aantallen tellingen.*
- *De vergelijking tussen flowcytometrie en lichtmicroscopie (microscopie) voor de dominante soorten (bijv. Phaeocystis sp.) een goede correlatie tussen flowcytometrie en fluorescentiemicroscopie leverde,*

- waarbij de microscoopmonsters glutaaraldehyde gefixeerd waren.*
- *Een onderschatting voor fluorescentiemicroscopie waargenomen werd voor kleine oranje en rood fluorescerend picoplankton ten opzichte van flowcytometrie.*
- *Voor levende monsters er met behulp van microscopie een onderschatting geconstateerd werd van flagellaten ten opzichte van flowcytometrie.*
- *Omdat flowcytometrie de celchlorofylfluorescentie per deeltje meet, goede correlatie aanwezig was tussen in situ fluorescentie en chlorofyl-a resultaten.*
- *Flowcytometrie belangrijk bijdraagt aan de fytoplanktonmonitoring als intermediair tussen microscopie en bulkanalyses (zoals chlorofyl).*

Verder zijn rapportages verschenen met de uitwerking flowcytometrische monitoringsresultaten uit 1992 en 1993 (Vriezekolk 1994, Vriezekolk 1995). Van 1992 zijn lichtmicroscopische en flowcytometrische analyseresultaten vergeleken voor de totale en afzonderlijke (voor soorten) concentraties fytoplankton en tussen de flowcytometrische lineaire verschillende fluorescentieconcentraties (FGO (excitatie groen-emissie oranje), FGR (groen-rood) en FRR (rood-rood)/flowcytometrie) en de chlorofyl-a concentratie (HPLC). Ook werd in één van deze rapporten nadruk gelegd op de foutenanalyse (spreiding en nauwkeurigheid).

De conclusies van deze rapporten luiden dat:

- *Fytoplanktonconcentraties snel en nauwkeurig bepaald konden worden.*
- *Het aantal te onderscheiden groepen maximaal 6 is, soms meer maar voor identificatie zijn toegevoegde technieken nodig*
- *Omrekening van flowcytometrie-fluorescentie parameters mogelijk is naar fluorescentie per liter, hetgeen een redelijke correlatie heeft met HPLC chlorofyl-a per liter.*
- *Lineaire Time of Flight waarden (relatie met de lengte van deeltjes) veel spreiding tonen en in absolute zin niet goed in overeenstemming waren met de theoretische waarde.*
- *De aanbeveling gedaan werd om ten tijde van algenbloei hoogfrequent te bemonsteren (naar éénmaal per week van april t/m september) om een goed beeld te krijgen van het opkomen en afsterven van algenbloeien.*

1.2 Wat Nu?

Na zoveel evaluaties en conclusies is eigenlijk een voldoende beeld bekend over de toegevoegde waarde, maar ook de tekortkomingen van flowcytometrie voor fytoplanktonmonitoring. Toch blijkt dat de implementatie van flowcytometrie in monitoring onvoldoende succesvol is geweest, omdat immers een echt integrale aanpak van beide technieken binnen monitoring niet wordt toegepast en daarmee de beoogde doelstelling van flowcytometrie niet gehaald is.

Flowcytometrie was juist ooit geïnitieerd om de tijdrovende microscopische analyses gedeeltelijk te vervangen.

Is daarmee de conclusie gerechtvaardigd om de inzet van flowcytometrie voor de fytoplanktonmonitoring in het vervolg te schrappen? Het antwoord is 'nee'

en wel om redenen die genoemd zullen worden in dit verslag.

Buiten de naar onze mening nog terecht te voeren discussie of de beoogde doelstellingen van de fytoplanktonmonitoring genoemd op de vorige pagina met de traditionele microscopische analyses voldoende kunnen worden beantwoord en buiten de naar onze mening terechte vraag of de microscopische analyse wel de meest efficiënte methode is en resultaten oplevert, is de (gedeeltelijke) vervanging van de microscopische methode door de flowcytometrische methode vooral terug te voeren op één tekortkoming van flowcytometrie namelijk het in staat zijn om vele soorten te identificeren. Zelfs als dat wel lukt is het nog de vraag of de overgang naar een andere techniek gemaakt zal worden, omdat er een mogelijke trendbreuk in een dataset kan optreden. Met andere woorden, het zijn niet alleen de prestaties van een analysetechniek die volledig de doorslag geven, maar ook de politiek en durf om een bestaande techniek af te bouwen ten gunste van een nieuwe techniek.

Ten opzichte van alle voorgaande evaluaties is de flowcytometrische techniek zoals wordt toegepast bij ITLM-RIKZ verbeterd, namelijk door een unieke combinatie van het fotograferen van deeltjes tijdens de flowcytometrische analyse (imaging in flow) zodat deze geïdentificeerd kunnen worden. Dit houdt in dat er dus gedetailleerdere informatie geleverd wordt, dan bij eerdere evaluaties.

Wat betekent dit in de discussie over de rol van flowcytometrie in fytoplanktonmonitoring ?

In dit rapport wordt zoveel mogelijk op grond van getalsmatige feiten uitspraken gedaan over de prestaties van flowcytometrie geleverd op monsters uit de periode van januari t/m december 2000. Daarnaast wordt uitgewerkt wat de flowcytometrische techniek aan extra informatie oplevert ten opzichte van andere technieken in het werkveld van fytoplankton gerelateerde gegevens, zoals chlorofyl-a, POC, biovolume, nutriënten en produktie en worden hiermee vergelijkingen gemaakt. De prestaties van de imaging in flow worden vergeleken met de microscopische resultaten. De resultaten van Noordwijk 10 in 2000 worden in vier onderdelen nader verwerkt:

- A. globale trend 2000 met gegevens/grafieken d.w.z. Concentraties totaal, concentraties naar groottefracties, biomassa (chlorofyl-a) totaal, biomassa naar groottefractie, biovolume totaal, naar groottefractie;
- B. vergelijking met andere technieken (chlorofyl-a, zwevend stof, particulier organisch koolstof);
- C. vergelijking met microscopie (snelle tellijst) en foto's van imaging in flow module.

1.3 Vraagstelling van dit rapport

Dit rapport beoogt uiteindelijk de volgende vragen te beantwoorden:

1. In hoeverre is het mogelijk de flowcytometrische analyse te integreren met de microscopische analyse?
2. Welke betekenis hebben de extra variabelen, die met flowcytometrie bepaald worden in relatie met referentiewaarden (bijvoorbeeld flowcytometrisch volume versus particulier organisch koolstof)?
3. Welke kwaliteit hebben de 'flowcytometrische getallen'?
4. Wat zijn de kosten van flowcytometrische analyses?

2. Materialen en Methoden

2.1 Beschrijving gehanteerde materialen en methoden

Monsternamen worden gedaan per schip met een ringleiding 3 meter onder het wateroppervlak volgens RWS standaard GSV B003). Monsters van circa 1 liter worden na monsternamen ongefixeerd (levend, zonder toevoegingen) gekoeld bij 4 °C en in het donker aangeleverd in 1 liter PE plastic flessen en bij aankomst op het laboratorium in het donker bij 4 °C opgeslagen (waarmee de invloed van biologische activiteit en fotoadaptatie geminimaliseerd wordt). Binnen 30 uur vindt in principe flowcytometrische analyse plaats. Voor subsampling wordt het monster gehomogeniseerd door licht zwenken van de fles. Het subsamplevolume dat voor de flowcytometrische analyse gebruikt wordt is circa 5-10 ml. Ter calibratie van de flowcytometer opstelling worden per analysedag standaardanalyses uitgevoerd met referentieballen (7,9 µm FCSC chlorofylballen (Flow Cytometry Standardization Corporation, USA) en 1,8 µm fluoresceïne PCRed-ballen (Polysciences Inc., USA).

Drie druppels chlorofylballen (FCSC) worden toegevoegd aan 5 ml calibratie-oplossing van fluoresceïne PC red ballen. Bij een sample rate van 50 µl/min wordt bij standaardinstellingen van de apparatuur getriggerd op FGR (rode fluorescentie van de groene laser). Ter controle van de EurOPA n.s. flowcytometer worden vervolgens de ruwe waarden in Spyro software (Pyxilla software) van alle optische kanalen uitgelezen en op (Shewart)kaarten geregistreerd als ook de concentratie deeltjes. Bij een te grote afwijking in één van de optische kanalen, waarbij als referentie de gemiddelden ± standaard deviatie (2x) geldt, wordt de apparatuur nogmaals gecontroleerd. De laserintensiteiten van de Argon (Coherent, Innova 90, USA) en HeNe-lasers (Coherent, USA) worden elke analysedag gecontroleerd en bijgehouden op (Shewart)kaarten.

Per analyse worden minimaal 5000, maar meestal 15000 deeltjes opgeslagen bij FGR triggering (alleen fluorescerende deeltjes). De concentratiebepaling wordt uitgevoerd in triplo. Bij PLS-triggering (zowel fluorescerende als niet-fluorescerende deeltjes) worden 5000 deeltjes opgeslagen per monster.

Per deeltje worden gemeten: FGR (rode fluorescentie aangeslagen door groene laser) correlerend met chlorofyl-a, FGO (oranje fluorescentie aangeslagen door groene laser) correlerend met de hoeveelheid fycobiliproteïnen, PLS (lichtverstrooiing in zijwaartse richting aangestraald door groene laser) correlerend met volumetrische en morfologische kenmerken van een deeltje en FLS (voorwaartse lichtverstrooiing aangestraald door groene laser) correlerend met volumetrische kenmerken. Ook wordt FRR (rode fluorescentie aangeslagen door rode laser) correlerend met chlorofyl-a,-b en fycocyanine (blauwalgen) gemeten en de time of flight (TOF) uit de lengte van het triggersignaal dat correspondeert met de lengte van deeltjes in langgerekte richting.

Van elke analyse wordt de gemiddelde concentratie deeltjes (fluorescerende als niet-fluorescerende) per ml berekend en worden de fluorescentieconcentraties (a.u./ml) en lichtverstrooiingsconcentraties (a.u./ml) berekend als functie van de deeltjesgrootte. Elk monster wordt opgedeeld in 16 fracties (deeltjesgrootteranges) en per fractie worden de eerder genoemde karakteristieken bepaald.

Per analyse is een geautomatiseerde deeltjesclustering mogelijk voor de indeling van deeltjes naar hoofdclusters van deeltjes met optisch gelijke eigenschappen. Dataverwerking vindt geautomatiseerd plaats in MATLAB software (v5.2, The Math Works, Cambridge).

Met behulp van imaging in flow (IIF) worden deeltjes gefotografeerd op grond van geselecteerde clusters in bivariate scatterplots in Spyro. Van de meest visueel opvallende clusters worden tijdens de analyse deeltjes geselecteerd en worden van deze deeltjes aldus foto's gemaakt. Per analyse worden circa 100 tot 200 opnames gemaakt. Foto's worden digitaal opgeslagen als tif- of als jpg-format.

Voor de microscopische analyse worden monsters genomen en afgeleverd volgens RWS standaard voorschrift B001 met behulp van Niskin-flessen of ringleiding.

Snelle microscopische analyse vindt plaats op levend (ongefixeerd) monster, waarbij 30 tot 100 ml over 10 µm gaas gefilterd wordt (buitenshuis door Koeman en Bijkerk bv.). Telling gebaseerd op 100 waarnemingen vindt plaats. Onderscheid wordt gemaakt in verschillende klassen namelijk deeltjes die dominant aanwezig zijn (+++/meer dan 10-maal waargenomen), algemeen aanwezig zijn (++/5-10-maal) en deeltjes die 2-5 (+) of éénmaal (.) waargenomen zijn.

Voor de uitgebreide microscopische analyse worden tellingen op lugol-gefixeerde monsters uitgevoerd zowel op ongeconcentreerde als geconcentreerde (4-20x) monsters. Voor een meer gedetailleerde beschrijving van de werkwijze wordt verwezen naar de jaarlijkse rapporten van de 'Biomonitoring van fytoplankton in de Nederlandse zoute en brakke wateren'.

2.2 Uitwerken gegevens

De verwerking van de flowcytometrische analyses word opgesplitst in verschillende delen van globale gegevens naar gedetailleerde gegevens. Van elke analyse wordt een geautomatiseerde standaardrapportage gemaakt volgens bijlage X. Alle resultaten van deze standaardrapportages zijn verzameld en uitgezet per locatie in een aantal grafieken en wordt bijna geheel geautomatiseerd verwerkt. In dit verslag is dit gepresenteerd voor Noordwijk 10 (NW10). In het bijlagenverslag zijn de resultaten van de overige vijf locaties uitgewerkt en gepresenteerd. In 2001 wordt getracht de actuele resultaten ONLINE via INTERNET te presenteren.

Ook alle microscopische snelle tellijstresultaten zijn geïnventariseerd en op locatie gesorteerd en gebruikt ter vergelijking met de flowcytometrische resultaten.

Van de eerste helft van 2000 zijn gedurende deze evaluatie microscopische resultaten van gefixeerde monsters gereed en beschikbaar gekomen en deze zijn tevens gebruikt voor de vergelijking met de flowcytometrische resultaten.

2.2.1. Globale trends

De globale trends in 2000 worden uitgesplitst in een aantal grafieken:

- de totaalconcentraties van alle deeltjes van ca 0,5-1000 µm (n/ml);
- de totaalconcentraties van deeltjes met chlorofyl-a (n/ml);

- de concentraties van deeltjes met chlorofyl-a uitgesplitst in 16 groottefracties (n/ml.fractie);
- de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentraties van deeltjes met chlorofyl-a uitgesplitst in 16 groottefracties ($\% \text{ n.fractie/n}_{\text{totaal}}$);
- de concentraties chlorofyl-a/ml (biomassa) uitgesplitst in 16 groottefracties (linFGR/ml.fractie);
- de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentratie chlorofyl-a/ml uitgesplitst in 16 groottefracties ($\% \text{ linFGR/ml.fractie/totaal-linFGR/ml}$);
- de concentraties biovolume (van deeltjes met chlorofyl-a)/ml uitgesplitst in 16 groottefracties (linFLS/ml.fractie);
- de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentratie biovolume/ml uitgesplitst in 16 groottefracties ($\% \text{ linFLS/ml.fractie/totaal-linFLS/ml}$);
- de concentraties van deeltjes met chlorofyl-a EN fycobiliproteïnen uitgesplitst in 16 groottefracties ($\text{n}_{(\text{FGR}>0\&\text{FGO}>0)}/\text{ml.fractie}$);
- de percentuele bijdrage per fractie aan deeltjes met chlorofyl-a EN fycobiliproteïnen uitgesplitst in 16 groottefracties ($\% \text{ n}_{(\text{FGR}>0\&\text{FGO}>0)}/\text{ml.fractie/totaal-n}_{(\text{FGR}>0\&\text{FGO}>0)}$);

2.2.2 Vergelijking met andere technieken (HPLC, zwevend stof, POC)

Ter vergelijking met referentietechnieken zijn de volgende flowcytometrische variabelen uitgezet als functie van referentiewaarden. De met een * aangegeven onderdelen zijn daadwerkelijk vergeleken en uitgevoerd. De overige onderdelen zijn niet volledig beschikbaar om de vergelijking uit te voeren.

Variabele	Flowcytometrie	Referentievariabele
* Totaalconcentratie fluorescerende deeltjes	deeltjesconcentratie FGR getriggerd	Mic.lijt gedeeltelijk beschikbaar
* Totaalconcentratie deeltjes	deeltjesconcentratie PLS getriggerd	zwevend stof
Fytoplankton grootteverdeling	fracties onderverdeeld uit TOF-FCM	Mic.lijt gedeeltelijk beschikbaar
* Biomassa gerelateerd	linFGR/ml	chlorofyl-a
	linFRR/ml	chlorofyl-b,fycocyanine
	linFGO/ml	Fycobiliproteïnen
Biovolume gerelateerd	linPLS/ml	Mic.lijt gedeeltelijk beschikbaar
	linFLS/ml	Mic.lijt gedeeltelijk beschikbaar
* Biovolume	linPLS/ml	POC
*	linFGR/ml	POC
* Aantal aangetroffen soorten	hoofdclusters /IIF	snelle Mic.tellijst Koeman
<ton(soorten) concentratie	hoofdclusters /IIF	Mic.lijt gedeeltelijk beschikbaar

2.2.3 Fytoplanktonsoorten flowcytometrie versus microscopie

Een globaal overzicht van de abundante numerieke deeltjes, die gevonden zijn met de snelle microscopische methode zijn in een tabel gepresenteerd.

De uitgebreide microscopische resultaten van lugol gefixeerde monsters van de eerste helft van het jaar zijn reeds gerapporteerd. Hiervan zijn de deeltjes, die meer dan 2% van de totale concentratie bepalen uitgelicht en weergegeven in een tabel. De getelde totaalconcentraties van Noordwijk 10 van januari t/m juni 2000 worden gebruikt voor verdere vergelijking met flowcytometrische gegevens.

Een vergelijking met betrekking tot gevonden soorten tussen microscopie en imaging in flowcytometrie wordt gemaakt voor de monsters van de locaties Noordwijk 10 en 2. Digitale foto's worden vergeleken de waargenomen (microscopische gevonden) soorten. Het gebruik van de imaging in flow module zoals gebruikt in het jaar 2000 wordt geëvalueerd, omdat gebleken is dat de analysemethodiek vaker aangepast is. Het koppelen van soorten met optische flowcytometrische data, bijvoorbeeld clusters uit scatterplots, wordt besproken.

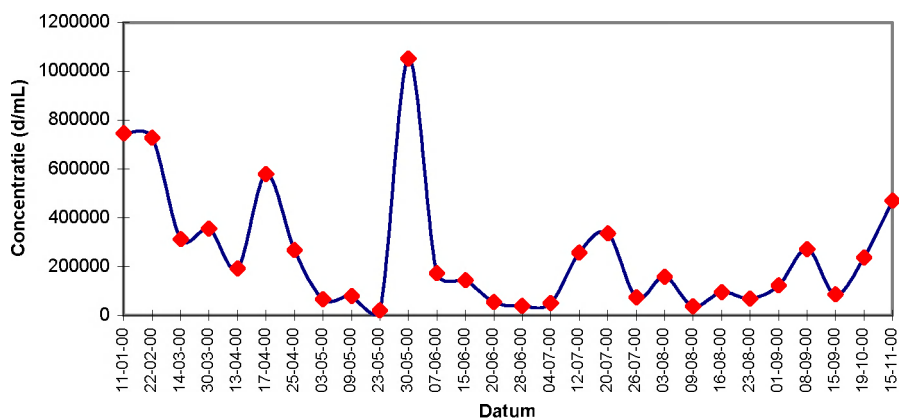
3. Resultaten

De resultaten van de flowcytometrische analyses worden in dezelfde volgorde als in hoofdstuk 2 beschreven. Één locatie is er uitgelicht, namelijk Noordwijk 10. Deze locatie wordt gedetailleerder uitgewerkt. De overige 5 locaties worden in het bijlagen-resultaten-verslag gepresenteerd.

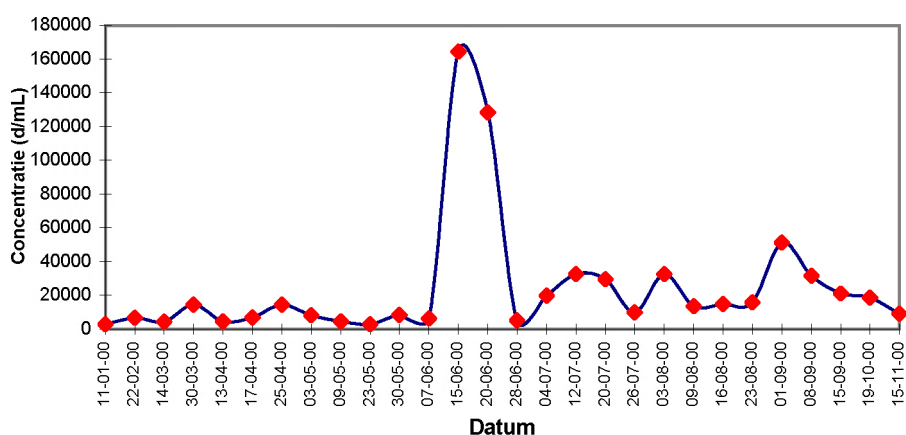
3.1 Algemene trends Noordwijk 10

De totaalconcentraties van alle niet-(chlorofyl-a) fluorescerende en (chlorofyl-a) fluorescerende deeltjes van ca 0,5-1000 μm (deeltjes/ml) is weergegeven in FIGUUR 1, de totaalconcentratie van deeltjes met chlorofyl-a (deeltjes/ml) in FIGUUR 2.

FIGUUR 1: Deeltjesconcentratie (alle deeltjes)



FIGUUR 2: Deeltjesconcentratie (alleen met chl-a) Noordwijk 10



Fytoplanktonconcentratie: De algemene trend in de fytoplanktonconcentratie op Noordwijk 10 is een opvallende hoge bloei van algen midden juni (FIGUUR 2). Door deze hoge concentratie wordt het beeld over de overige maanden

vertekend, omdat hier relatieve veranderingen erg klein lijken. Lichte bloeipieken zijn waarneembaar rond 12 juli, 3 augustus en 1 september, maar qua aantallen per ml niet in verhouding tot de hoge gemeten concentratie midden juni. De fractionering van de monsters in 16 grootteklassen laat zien dat de totaalconcentratie fytoplanktondeeltjes vooral bepaald wordt door deeltjes $< 5 \mu\text{m}$ (FIGUUR 3 en 4). Er zijn verschillende soorten bloeiperioden (concentratieverhogingen) te onderscheiden.

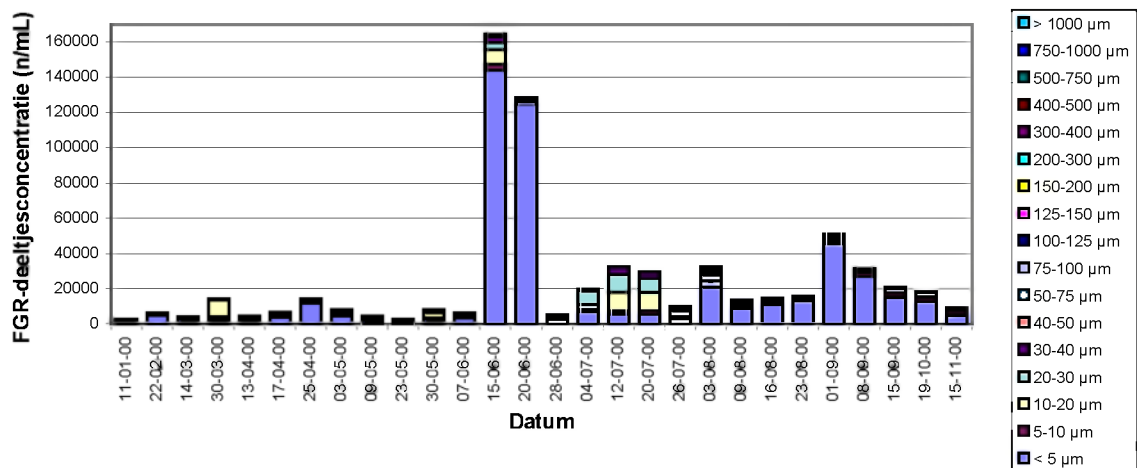
Kleine deeltjes ($< 5 \mu\text{m}$) : 25 april, midden juni, eind augustus – begin september.

Middelgrote deeltjes ($> 5, < 30 \mu\text{m}$) : midden april, rond 30 mei, midden - eind juli

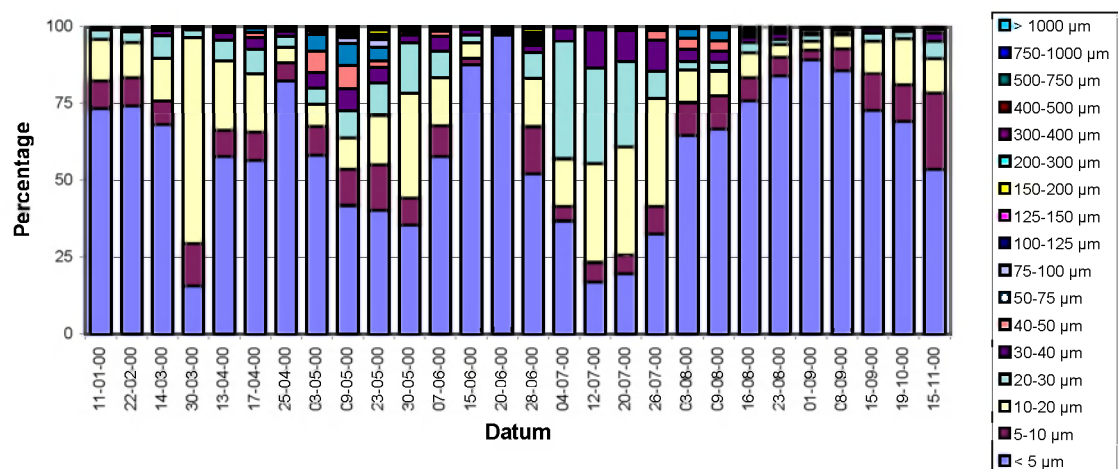
Grotere deeltjes ($> 30 \mu\text{m}$) : begin - midden mei, eind juli - begin augustus

Dezelfde totaalconcentraties van deeltjes met chlorofyl-a zijn uitgesplitst in 16 groottefracties (deeltjes/ml.fractie) in FIGUUR 3 en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentraties van deeltjes met chlorofyl-a uitgesplitst in 16 groottefracties (% n.fractie/ n_{totaal}) in FIGUUR 4.

FIGUUR 3: Concentratie autotrofe deeltjes (met chlorofyl-a) per lengtefractie Noordwijk 10

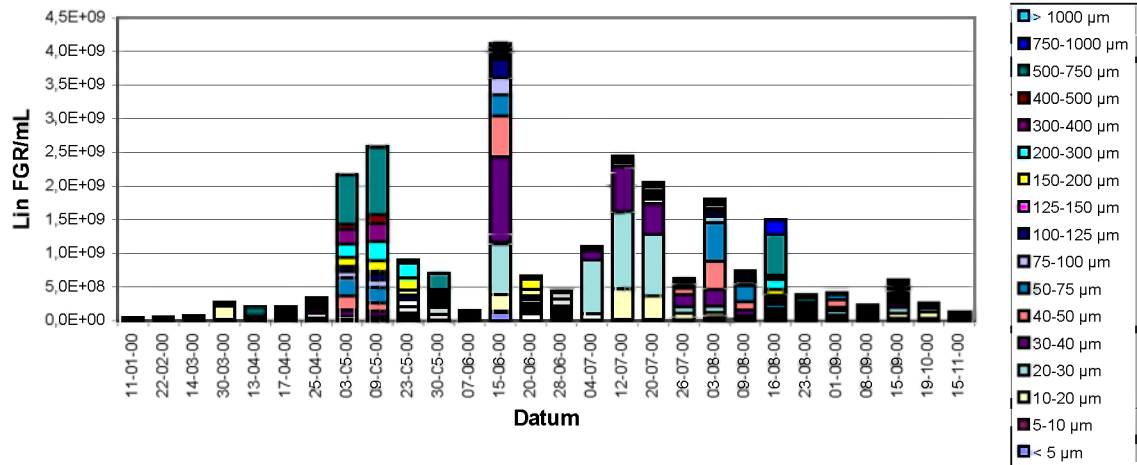


FIGUUR 4: % aantal autotrofe deeltjes met chlorofyl-a per lengtefractie Noordwijk 10

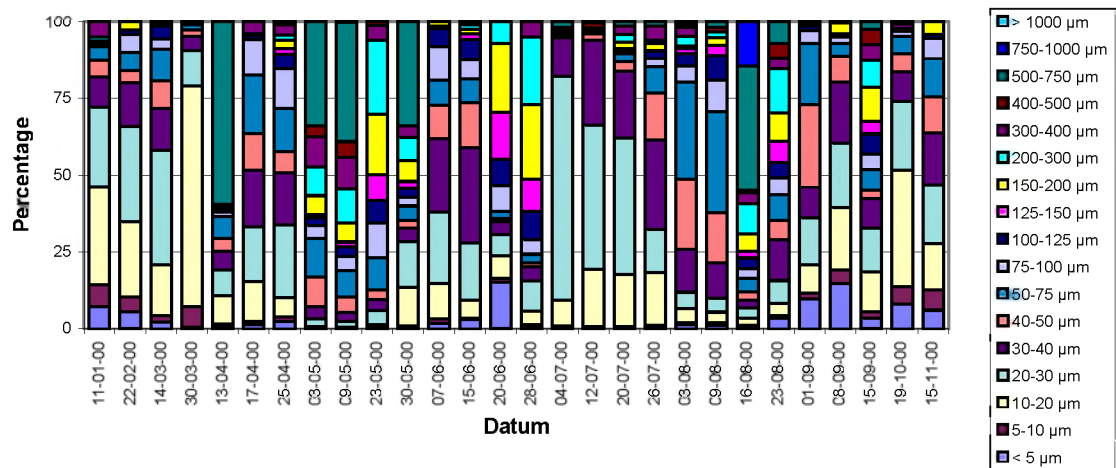


De chlorofyl-a/ml concentraties (biomassa) of flowcytometrische linFGR/ml variabele is uitgesplitst in 16 groottefracties (linFGR/ml.fractie) (FIGUUR 5) en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentratie chlorofyl-a/ml uitgesplitst in 16 groottefracties (% linFGR/ml.fractie/totaal-linFGR/ml) in FIGUUR 6.

FIGUUR 5: Totale LinFGR/mL (chlorofyl-a/ml) per lengtefractie Noordwijk 10



FIGUUR 6: % LinFGR/ml per lengtefractie Noordwijk 10



Chlorofyl-a: Ondanks de hoge concentratie is de bijdrage van de kleinste fractie aan de chlorofyl-concentratie te verwaarlozen ten opzichte van de grotere fracties (FIGUUR 5 en 6). De perioden van bloei die optreden op grond van **biomassa**toename verschilt van de bloei die optreedt op grond van fytoplanktonconcentraties (zie bovenstaande onderdeel).

Biomassa toenames : begin mei veroorzaakt door grote deeltjes van 500-750 µm), 15 juni (bloei van deeltjes van 20 tot 125 µm), midden juli (deeltjes van 10-40 µm), 3 augustus (deeltjes van 40 tot 75 µm) en ten slotte rond 16 augustus (deeltjes 500-750 µm).

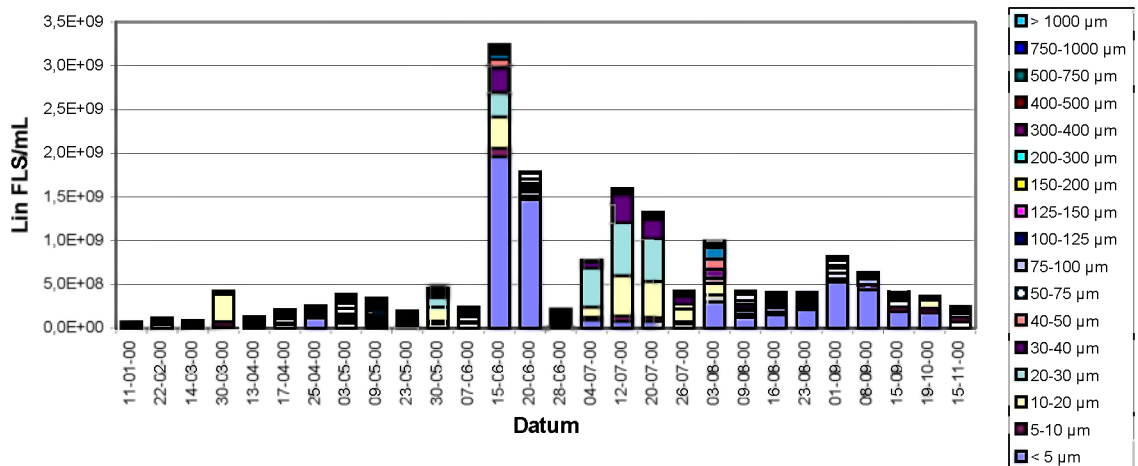
Alleen midden juli waren er fytoplanktondeeltjes tegelijkertijd verantwoordelijk voor een significante toename in zowel de deeltjesconcentraties als in

biomassa. Midden juni bijvoorbeeld lijkt dit enigszins ook aanwezig, hoewel de concentratie toename vooral veroorzaakt wordt door kleine deeltjes en de chlorofyl-a toename door andere (grotere) deeltjes.

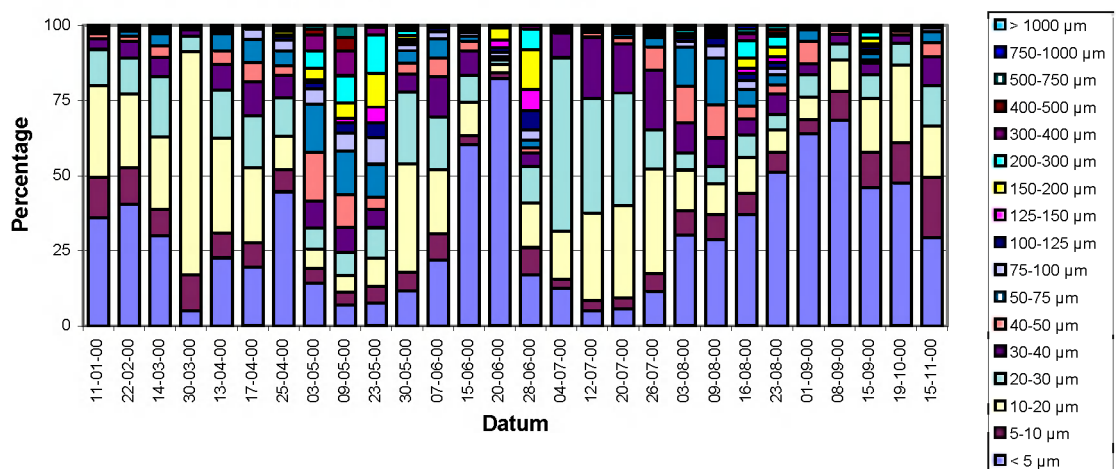
De biovolumeconcentraties (van deeltjes met chlorofyl-a)/ml uitgesplitst in 16 groottefracties

(linFSL/ml.fractie) is weergegeven in FIGUUR 7 en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentratie biovolume/ml uitgesplitst in 16 groottefracties (% linFSL/ml.fractie/totaal-linFSL/ml) in FIGUUR 8.

FIGUUR 7: Totale LinFSL/ml per lengtefractie Noordwijk 10



FIGUUR 8: % LinFSL/ml per lengtefractie Noordwijk 10

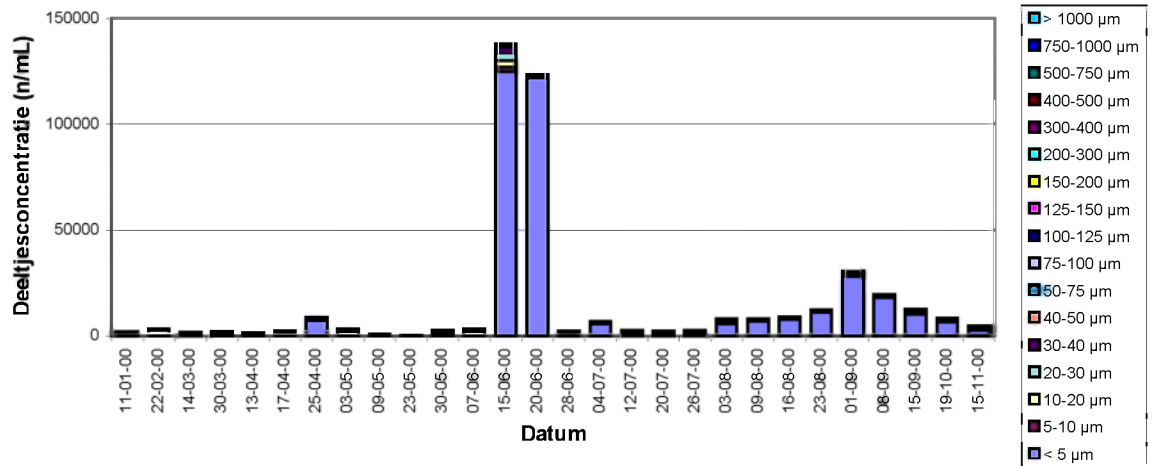


Biovolume: Het biovolume van deeltjes wordt gekoppeld aan de flowcytometrische linFSL/ml parameter (FIGUUR 7 en 8). Goede overeenkomsten met chlorofyl-a toenames worden gevonden in de

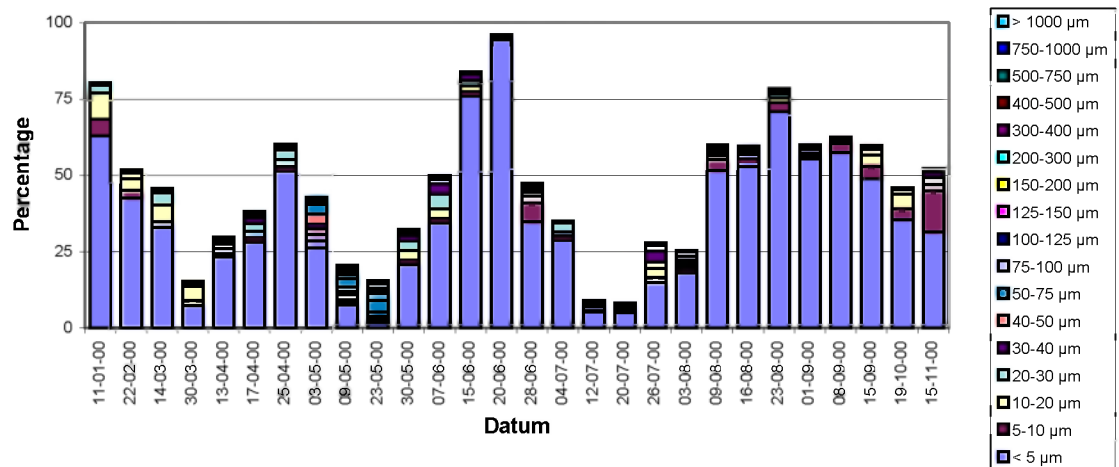
periodes : 15 juni, begin en midden juli en 3 augustus

De concentraties van deeltjes met chlorofyl-a én fycobiliproteïnen uitgesplitst in 16 groottefracties ($n_{(FGR>0 \& FGO>0)}/\text{ml.fractie}$) is gepresenteerd in FIGUUR 9 en de percentuele bijdrage per fractie aan deeltjes met chlorofyl-a én fycobiliproteïnen uitgesplitst in 16 groottefracties ($\%n_{(FGR>0 \& FGO>0)}/\text{ml.fractie}/\text{totaal- } n_{(FGR>0 \& FGO>0)}$) in FIGUUR 10.

FIGUUR 9: Absolute deeltjesconcentratie van deeltjes met FGR & FGO per lengtefractie Noordwijk 10



FIGUUR 10: % aantal FGR & FGO fluorescentie per lengtefractie Noordwijk 10



3.2 Noordwijk 10, een vergelijking met referentiemethoden

Voor Noordwijk 10 zijn de onderstaande correlaties onderzocht tussen een relevant geachte flowcytometrische variabele en de resultaten van een conventionele analysetechniek.

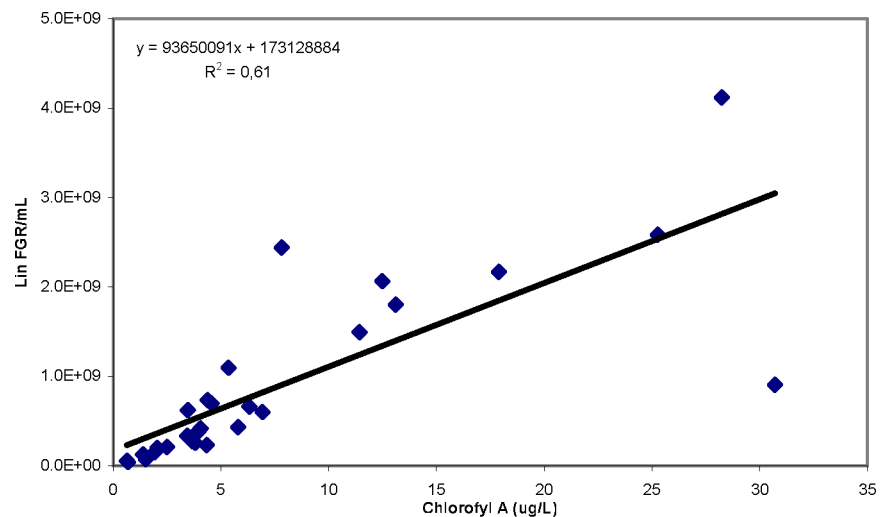
- FCM-linFGR/ml (FGR-triggered) versus HPLC-Chlorofyl-a: LinFGR/ml is de flowcytometrische fluorescentie parameter die rechtstreeks van deeltjes de in vivo totaal fluorescentie meet aangestraald door groen (laser) licht (529 nm) en emissie gemeten in het rode gebied (>670 nm). De

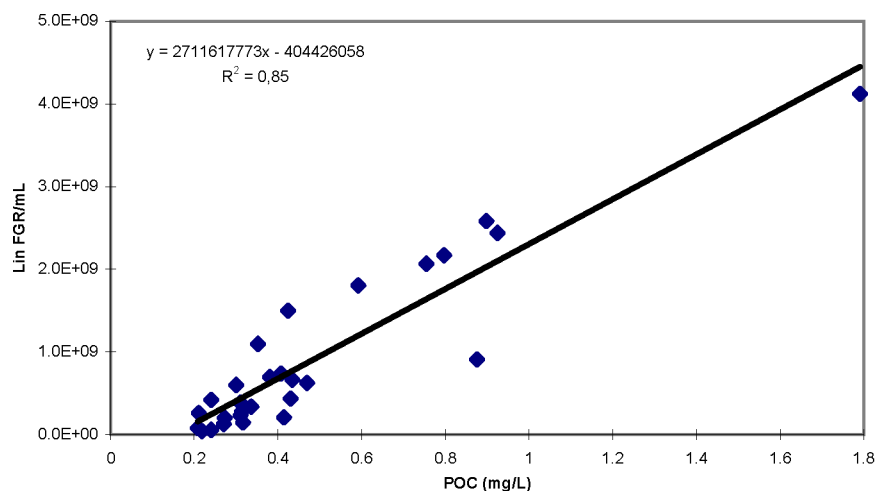
gemeten fluorescentie van autotroof fytoplankton (=FGR-triggered) dient binnen de gegeven grenzen sterk met chlorofyl-a fluorescentie te correleren.

- FCM-linFGR/ml (FGR-triggered) versus particulier organisch Koolstof (POC-gehalte): De bijdrage van autotroof fytoplankton in water aan het totaal gemeten particuliere koolstof gehalte van water zou in relatief heldere kustwateren met weinig andere koolstofbronnen aanleiding kunnen geven tot een lineaire relatie tussen beide parameters.
- FCM-linFLS/ml (FGR-triggered) versus particulier organisch Koolstof (POC-gehalte): De bijdrage van autotroof fytoplankton uitgedrukt in biovolume/ml door gebruik van de voorwaartse lichtverstrooiingsvariabele heeft eventueel een relatie met het totaal particulier gevonden organisch materiaal bij de aanname dat de koolstofdichtheid van de planktoncellen nagenoeg gelijk is.
- FCM-linFLS/ml (PLS-triggered) versus zwevende stof gehalte: Het biovolume van alle gemeten deeltjes (= PLS-triggered) per ml heeft eventueel een lineaire correlatie met het zwevende stof bij de aanname dat de dichtheid van alle deeltjes ongeveer gelijk blijft.
- FCM-linPLS/ml (PLS-triggered) versus zwevende stof gehalte: Idem als linFLS/ml, alleen wordt met linPLS de zijwaartse lichtverstrooiing gemeten en is deze parameter gevoeliger voor morfologische verschillen.

Alleen de eerste twee onderzochte relaties lieten een acceptabele correlatie zien. Deze twee vergelijkingen zijn in de FIGUREN 11 en 12 gepresenteerd.

FIGUUR 11: Vergelijking tussen het HPLC-Chlorofyl-a gehalte en de FCM-linFGR/ml Noordwijk 10



FIGUUR 12: Vergelijking tussen het POC-gehalte en de FCM-linFGR/ml Noordwijk 10

Zoals eerder al is aangetoond (Hofstraat et al., 1994, Vriezolk, 1994) worden ook nu redelijke tot goede correlaties gevonden tussen de concentratie chlorofyl-a bepaald met FCM (linFGR/ml) en de HPLC gevonden hoeveelheid chlorofyl-a (zie TABEL 1).

TABEL 1: linFGR/ml versus HPLC-Chlorofyl-a

Locatie	LinFGR/ml v.s. Chlorofyl a gehalte	
	r^2	Vergelijking
Noordwijk 10	0.61	$y = 9.36 \cdot 10^7 x + 1,73 \cdot 10^8$
Noordwijk 2	0.56	$y = 9.65 \cdot 10^7 x + 1,12 \cdot 10^8$
Terschelling 135	0.85	$y = 6.10 \cdot 10^7 x + 5.65 \cdot 10^6$
Zijpe	0.76	$y = 1.39 \cdot 10^8 x - 9.57 \cdot 10^7$
Schaarvoddl	0.75	$y = 6.66 \cdot 10^7 x + 9.29 \cdot 10^6$
Vlissingbissvh	0.97	$y = 9.82 \cdot 10^7 x - 8.89 \cdot 10^7$

Opmerking: Het termijneffect bij Noordzee monsters zou mogelijk wat groter kunnen zijn omdat de HPLC-monsters direct na monsternamen worden geconserveerd en de fcm monsters gemiddeld twee dagen ongeconserveerd onderweg zijn

Een andere denkbare correlatie was die tussen de flowcytometrische linFGR/ml waarde en het particulier organisch koolstof (POC) gehalte. Voor Noordwijk 10 blijkt dat er correlatie is tussen de twee parameters (zie FIGUUR 12). Maar zoals in de onderstaande TABEL 2 te zien is geldt dit niet voor alle onderzochte locaties.

TABEL 2: linFGR/mL versus POC-gehalte (Carlo Erba)

Locatie	LinFGR/ml versus POC-gehalte	
	r^2	Vergelijking
Noordwijk 10	0.85	$y = 2.71 \cdot 10^9 x - 4.04 \cdot 10^8$
Noordwijk 2	0.58	$y = 1.73 \cdot 10^9 x - 2.47 \cdot 10^8$
Terschelling 135	0.59	$y = 5.27 \cdot 10^8 x - 1.58 \cdot 10^7$
Zijpe	0.79	$y = 3.96 \cdot 10^9 x - 8.08 \cdot 10^8$
Schaarvoddl	< 0.10	niet relevant
Vlissingbissvh	< 0.10	niet relevant

3.3 Noordwijk 10, microscopie versus flowcytometrie

De resultaten van de snelle microscopische tellingen zijn samengevat in onderstaande TABEL 3. Samengevat blijkt dat het totaal aantal verschillende soorten fytoplankton dat in het jaar 2000 meer dan 2% van de totaalconcentratie vertegenwoordigt, slechts tientallen verschillende soorten zijn en per datum gemiddeld 10 soorten. Uitsplitsend naar categorie zijn gemiddeld 2 soorten aanwezig met een bijdrage >10% , 2 soorten tussen de 5-10% en 5 soorten >2%.

TABEL 3: Resultaten van de snelle microscopische analyse (levend monster)

			> 10 % 2 - 10 %																											
			1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28																											
Noordwijk 10 (2000)			Datum																											
μm	μm	Algensoort	01/11/00	02/22/00	03/14/00	03/30/00	04/13/00	04/17/00	04/25/00	05/03/00	05/09/00	05/23/00	05/30/00	06/07/00	06/15/00	06/20/00	06/28/00	07/04/00	07/12/00	07/20/00	07/26/00	08/03/00	08/09/00	08/16/00	08/23/00	09/01/00	09/08/00	09/15/00	10/19/00	11/15/00
1	5	Cryptophyceae																												
2	5	Leptocylindrus minimus																												
3	20	Skeletonema costatum																												
4	8	Phaeocystis flagellaat																												
4	8	Phaeocystis cel																												
5	50	Rhizosolenia setigera																												
5	16	Leptocylindrus danicus																												
6	49	Rhizosolenia stolterfothii																												
6	40	Rhizosolenia shrubsolei																												
6	12	Chaetoceros socialis																												
6	12	Chrysochromulina sp																												
10	25	Brockmanniella brockmanni																												
10	40	Chaetoceros debilis																												
10	100	Eucampia zodiacus																												
15	45	Delphineis minutissima																												
20	100	Rhaphoneis amphiceros																												
20	30	Scripsiella sp																												
20	60	Lauderia annulata																												
25	100	Ditilum brightwellii																												
25	100	Nitzschia closterium																												
25	30	Mesodinium rubrum																												
25	90	Guinardia flaccida																												
25	35	Plagiogrammopsis vanheurckii																												
30	61	Thalassiosira rotula																												
30	40	Ebria tripartita																												
35	70	Prorocentrum micans																												
40	60	Paralia marina																												
40	70	Roperia tessellata																												
43	145	Thalassiosira punctigera																												
80	140	Pseudonitzschia pungens cf																												
90	150	Pleurosigma normanii																												
200	300	Ceratium fusus																												
		Rhizosolenia delicatula																												
		Thalassionema nitzschioides																												
		Thalassiosira sp < 30 μm																												
		Thalassiosira sp < 30-80 μm																												
		Coccolithus pelagicus																												
		Chaetoceros (sol. cellen)																												
		Chaetoceros sp																												
		Protomonadales > 10 μm																												
		Protoperidinium sp 10 - 30 μm																												
		Protoperidinium bipes																												
		Protoperidinium minutum																												
		Tintinnida non det																												
		Phaeocystis kol.																												
		aantal Concentratie 2 - 5 %	9	5	8	10	7	8	5	3	3	2	1	3	3	6	3	4	2	8	9	2	4	6	6	6	7	5	3	9
		aantal Concentratie 5 -10 %	1	1	4	4	3	2	3	1	0	1	2	4	2	1	3	1	1	2	1	5	2	4	2	3	0	4	2	1
		aantal Concentratie > 10 %	4	3	2	3	3	2	1	2	2	1	2	3	2	2	3	1	2	4	3	1	2	2	4	3	3	2	3	4
		aantal algensoorten > 2%	14	9	14	17	13	12	9	6	5	4	5	10	7	9	9	6	5	14	13	8	8	12	12	12	10	11	8	14

De resultaten van de uitgebreide microscopische tellingen t/m juni 2000 zijn samengevat in TABEL 4. Het totaal aantal verschillende soorten fytoplankton dat in het jaar 2000 meer dan 2 % van de totaalconcentratie vertegenwoordigt is lager dan bij de snelle telling namelijk gemiddeld slechts 7 soorten (t/m juni). Uitgesplitst naar categorie zijn gemiddeld 3 soorten aanwezig met een bijdrage >10% , 2 soorten tussen de 5-10% en 3 soorten >2%. De soorten die meer dan 2% bijdragen aan de totaalconcentratie (dus genoemd in TABEL 4) vertegenwoordigen gemiddeld (van januari t/m juni 2000) 92 % ($\pm 5\%$) van de totaalconcentratie.

TABEL 4: zie volgende pagina

TABEL 4: Verkorte resultaten van de uitgebreide microscopische analyse (gefixeerd monster)

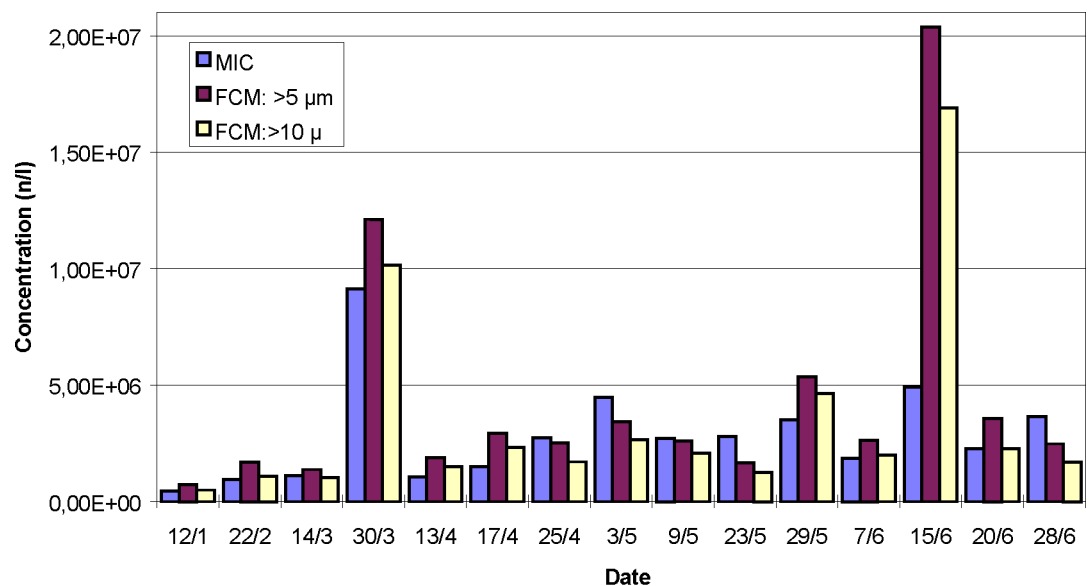
> 10 % ■
 2 - 10 % ■

Noordwijk 10 (2000)			Datum														
µm	µm	Algensoort	11-01-00	22-02-00	14-03-00	30-03-00	13-04-00	17-04-00	25-04-00	03-05-00	09-05-00	23-05-00	30-05-00	07-06-00	15-06-00	20-06-00	28-06-00
1	5	Cryptophyceae <10															
0.2	10	Chrysomonadales sp.															
2	5	Leptocylindrus minimus															
3	20	Skeletonema costatum															
4	8	Phaeocystis flagellaat															
4	8	Phaeocystis cel															
5	50	Rhizosolenia setigera															
5	16	Leptocylindrus danicus															
6	49	Rhizosolenia stolterfothii															
6	40	Rhizosolenia shrubsolei															
6	12	Chaetoceros socialis															
6	12	Chrysochromulina sp															
10	25	Brockmanniella brockmannii															
10	40	Chaetoceros debilis															
10	100	Eucampia zodiacus															
15	45	Delphineis minutissima															
20	100	Rhaphoneis amphiceros															
20	30	Scripsiella sp															
20	60	Lauderia annulata															
25	100	Ditulum brightwellii															
25	100	Nitzschia closterium															
25	30	Mesodinium rubrum															
25	90	Guinardia flaccida															
25	35	Plagiogramopsis vanheurckii															
30	61	Thalassiosira rotula															
30	40	Ebria tripartita															
35	70	Prorocentrum micans															
40	60	Paralia marina															
40	70	Roperia tessellata															
43	145	Thalassiosira punctigera															
80	140	Pseudonitzschia pungens cf															
90	150	Pleurosigma normanii															
200	300	Ceratium fusus															
		Rhizosolenia delicatula															
		Thalassiosira nitzschoides															
		Thalassiosira sp < 30 µm															
		Thalassiosira sp < 30-80µm															
		Coccolithus pelagicus															
		Chaetoceros (sol. cellen)															
		Chaetoceros sp															
		Protomonadales > 10 µm															
		Protoperidinium sp 10 - 30 µm															
		Protoperidinium bipes															
		Protoperidinium minutum															
		Tintinnida non det															
		Phaeocystis kol.															
		Centrales < 10															
		Centrales 10-30															
		Cryptophyceae >10															
		Pennate diatomee <10 d<50 l															
		Planktothrix sp															
		Prasinophyceae															
		Protomonadales < 10 l															
		Heterocapsa minima															
		Cylindrotheca closterium															
		Naviluca sp															
		Skeletonema subsalsum															
		Chaetoceros compressus															
		Pyramimonas < 10 l															
		Chaetoceros ceratosporus															
		aantal Concentratie 2 - 5 %	5	2	9	3	3	6	2	0	1	1	1	2	3	3	1
		aantal Concentratie 5 -10 %	3	2	1	0	4	1	1	1	1	2	2	3	3	1	0
		aantal Concentratie > 10 %	3	4	4	1	2	3	5	2	3	2	4	1	4	3	3
		aantal algensoorten > 2%	11	8	14	4	9	10	8	3	5	5	7	6	10	7	4

De totaalconcentratie van deeltjes geteld met microscopie en met flowcytometrie (deeltjes met chlorofyl-a) zijn onderling vergeleken voor monsters t/m juni van de lokatie Noordwijk 10.

Uit de dataset van de totaal fytoplanktonconcentratie van de flowcytometrische gegevens is de groep deeltjes $< 5 \mu\text{m}$ verwijderd. Deze groep deeltjes is niet of nauwelijks microscopisch waarneembaar en worden niet geteld, terwijl bij flowcytometrie de klasse $< 5 \mu\text{m}$ juist voor het grootste gedeelte (ca 40-90%) de totaalconcentratie bepalen (zie FIGUUR 3). Verwijdering uit de dataset is tevens gedaan voor de groep deeltjes $< 10 \mu\text{m}$. In FIGUUR 13 is de vergelijking van de fytoplanktonconcentraties tussen beide technieken weergegeven.

FIGUUR 13: Concentratie deeltjes/l bepaald met microscopie (blauwe kolom) en het flowcytometrie (paarse en gele kolommen)



TABEL 5: Inventarisatie van de uitgebreide microscopische analyse van de soorten of verzamelnaam van soorten (b.v. Cryptophyceae), die meer dan 2% van de totaalconcentratie vertegenwoordigen en de bijdrage van deze soorten (> 2%) aan de totaalconcentratie + het aantal gevonden clusters van deeltjes geselecteerd op grond van pigmentsamenstelling

Aantal te herkennen soorten/verzamelgroepen meer dan 2% aanwezig in monster			
Datum	M I C R O S C O P I E		FLOWCYTOMETRIE
	Soorten/groepen	tezamen x% van totaalconcentratie	Clusters
11-Jan-00	11	93.6	10
22-Feb-00	8	81.3	8
14-Mar-00	14	88.7	9
30-Mar-00	4	90.9	5
13-Apr-00	9	87.7	10
17-Apr-00	10	92.9	9
25-Apr-00	8	91.4	10
03-May-00	3	89.0	8
09-May-00	5	94.4	10
23-May-00	5	97.4	6
30-May-00	7	98.0	6
07-Jun-00	6	91.5	10
15-Jun-00	10	97.5	10
20-Jun-00	7	89.2	6
28-Jun-00	4	94.7	9
Gemiddelde	7.5	91.9	8.4
standaard deviatie (68%)	2.9	4.4	1.8

3.4 Imaging in flow versus microscopie (Noordwijk 10 en Noordwijk 2)

De resultaten van de imaging in flow (IIF) analyses worden voor een aantal data gepresenteerd in onderstaande TABEL voor de locaties Noordwijk 10 en 2. Per soort c.q. deeltje staat het aantal waarnemingen vermeld. Deze zijn vergeleken met de snelle microscopische analyses die door Koeman en Bijkerk bv. uitgevoerd zijn. De deeltjes worden onderscheiden in verschillende categorieën namelijk:

- 1) m.b.v. microscopie als dominant aanwezig (++ en +++) geclassificeerd en niet met de IIF waargenomen;
- 2) door zowel microscoop als met de IIF waargenomen;
- 3) met de IIF waargenomen, niet met de microscoop.

Opvallend is dat met de IIF veel deeltjes zijn gefotografeerd die niet determinabel zijn. Deze groep bestaat hoofdzakelijk uit kleine deeltjes, bollen en detritus vlokken. Verhoudingsgewijs zijn er te weinig foto's genomen van (grotere) planktoncellen. In monsters waarvan slechts een beperkt aantal bruikbare foto's genomen is, zoals op de data 17/4(n=9), 4/7(n=10) en 15/11(n=5), worden in vergelijking met de snelle microscopische analyse verscheidene (n=4) dominant aanwezige soorten gemist. Zodra er een groter aantal bruikbare foto's voorhanden is, bijvoorbeeld op de data 9/5(n=21) en 9/8(n=41), valt op dat op één soort na alle dominant aanwezige soorten waargenomen worden.

Het aantal soorten fytoplankton dat m.b.v. de microscoop slechts beperkt (+) en niet met de IIF waargenomen is, varieert van 2 tot 8. Soorten die slechts eenmaal tijdens een microscopische analyse zijn aangetroffen en niet met de IIF variëren in aantal van 18 tot 35.

Er zijn nogal wat data waarop geen foto's genomen zijn. De oorzaken voor dit probleem zijn tweeledig.

Een belangrijk 'probleem' dat gedurende het hele jaar speelde, was de tijd van monsterontvangst. De Noordzee monsters worden meestal op vrijdagmiddag bezorgd tussen 12.00 en 15.00 uur. De monsters moeten dan eerst flowcytometrisch geanalyseerd worden, wat bij lage concentraties enige tijd kost.

Vervolgens moet de imaging in flow module uitgelijnd worden wat, zeker in het begin van het jaar door een gebrek aan ervaring, veel tijd kostte. Vanwege dit tijdsgebrek zijn een aanzienlijk aantal monsters niet met de IIF geanalyseerd. De IIF-module is tevens nog een bepaalde periode niet inzetbaar geweest vanwege problemen met de uitlijning.

In bijlage 1 zijn foto's afgebeeld van fytoplanktoncellen, die gemaakt zijn met de imaging in flow module.

TABEL 6: Resultaten van de imaging in flow foto's vergeleken met microscopische waarnemingen

'++ en +++ Koeman, - IIF ■
'+ Koeman, +IIF ■
'- Koeman, +IIF ■

	4	5	6	7	8	10
Noordwijk 10 (2000)						
Algensoort	17-04-00	09-05-00	04-07-00	03-08-00	09-08-00	15-11-00
detritus					3	147
cel indet.	4		3	11	19	8
bol indet.			7	5	7	7
keten indet.						1
keten diatomee			2	2	14	
pennate diatomee				1	1	
cf. Rhodomonas	3		4			
Brockmanniella Brockmannii						
centrische diatomee	2				1	2
Paralia marina						
Rhizosolenia stolterfothii		2				
Rhizosolenia delicatula		1				
Rhizosolenia cf delicatula	1	16		2		1
Rhizosolenia shrubsolei		1				
Thalassiosira sp < 30 um						
Thalassiosira sp < 30-80um						
Thalassiosira nordenskioldii		1				
Thalassiosira punctigera						
Nitzschia sp	1					1
cf Chaetoceros				3	11	
Chaetoceros socialis						
Chaetoceros sp	2			4	1	
Delphineis minutissima						
Chrysochromulina sp						
Phaeocystis flagellaat						
cf Phaeocystis			1			
Phaeocystis kol.					1	
cf Leptocylindricus			2		2	
Leptocylindrus cf minimus					1	
Eucampia zodiacus					2	
cf Pleurosigma					5	
Pleurosigma normanii						
Pseudonitzschia sp			1			
Pseudonitzschia pungens cf						
Ceratium sp					2	
Lauderia annulata						
cf Prorocentrum				1		
n Koeman +	8	2	4	2	2	8
n Koeman .	28	29	18	24	26	35

TABEL 6 : vervolg

'++ en +++ Koeman, - IIF
'+ Koeman, +IIF
'- Koeman, +IIF

Noordwijk 2 (2000)	Datum				
Algensoort	11-01-00	14-03-00	30-03-00	17-04-00	16-08-00
detritus	33	16	10	4	2
eel indet.	8	6	33	2	
bol indet.		6	12	2	
keten diatomee	1				4
pennate diatomee				2	1
cf siliat tin tin	1				
cf. Rhodomonas		1	9	1	
Brockmanniella Brockmannii					
Bidulphia aurita var. minima		1			
cf dinoflagellaat			1		
Actinopterychus senarius					
Paralia marina					
Rhizosolenia setigera					
Rhizosolenia delicatula					1
Rhizosolenia cf delicatula					9
Rhizosolenia cf pungens				1	
Rhizosolenia shrubsolei					2
Thalassionema nitzschioides					
Thalassiosira sp < 30 um					
Thalassiosira sp < 30-80um					
Thalassiosira cf nordenskioldii					1
Schroederella schroederi					5
Ditulum brightwellii					
Nitzschia closterium					
Nitzschia sp			1	2	
cf Chaetoceros				2	
Chaetoceros sp				2	3
Delphineis minutissima					
Protomonadales > 10 um					
Protoperidinium sp 10 - 30 um					
Protoperidinium sp 30 - 50 um					
cf Phaeocystis			2		
cf Leptocylindricus				1	
Leptocylindrus cf minimus					21
Eucampia zodiacus					1
Pseudonitzschia sp					5
Plagiogramma brockmannii				1	
Plagiogrammopsis vanheurckii					
n Koeman +	6	10	7	4	8
n Koeman .	17	34	24	37	41

4. Discussie

4.1 Algemene trends

4.1.1 Fytoplanktonconcentratie

Het verloop van de totale en over de fracties verdeelde autotrofe fytoplanktonconcentraties varieert met grote fluctuaties in één jaar. De enorme concentraties midden juni vertekenen de relatieve veranderingen in de overige perioden van het jaar. Een voorjaarsbloei op Noordwijk 10 is niet geconstateerd in de (aantal) concentratie. Uit de metingen op Noordwijk 10, maar ook op de overige locaties, blijkt dat de bijdragen in de fytoplanktondeeltjesconcentratie van de kleinste fractie $< 5 \mu\text{m}$ groot is en gedurende het jaar varieert van ca 20% tot 95% van de totaalconcentratie! Deze kleine deeltjes worden veelal gemist met microscopie. Opvallend in de meeste (ook internationale) monitoring programma's is dat deze alleen de monitoring van het micro-fytoplankton ($> 5 \mu\text{m}$) omvatten en niet het nano- of picoplankton (bijvoorbeeld heterotrofe bacteriën en kleine autotrofe algen) en het femtoplankton (virussen). Met flowcytometrie wordt bij het RIKZ dus tevens het autotrofe nano- en picoplankton gemeten tussen ca 1-5 μm . De waarneming van deze extra groep zeer kleine deeltjes is een voordeel van de flowcytometrische analyse. Indien de monitoring van bacteriën en virussen van belang is, kan flowcytometrie ingezet worden, zoals bekend is uit de literatuur. Voor (flowcytometrische) metingen van bacteriën en virussen dient gebruikt te worden gemaakt van kleuring van het DNA of RNA. Deze technieken worden routinematig (voor flowcytometrische analyse) al toegepast (Marie et al., 1999) en zijn uitvoerig beschreven voor bacteriën door Marie et al (1997) en Gasol et al. (2000) en voor virussen door Marie et al. (1999) en Brussaard (2000).

Het verloop van de autotrofe fytoplanktonconcentratie opgedeeld in fracties geeft inzicht in het opkomen van bloeien van bepaalde groottefracties fytoplankton gedurende het jaar. Het totaalbeeld wordt vooral numeriek gedomineerd door de kleinste waarneembare fytoplanktoncellen kleiner dan 5 μm .

4.1.2 Chlorofyl-a

De chlorofyl-a concentratie wordt veelal gebruikt als biomassa-indicator van het levende autotrofe fytoplankton in een watersysteem. De biomassa is gecorreleerd met het biovolume en uitgaande van bolvormige deeltjes neemt de biomassa toe met de derde macht van de lengte of diameter van een deeltje. De grotere deeltjes bepalen daarom vaak het grootste deel van de biomassa, tenzij de kleine deeltjes zodanig talrijk zijn (concentratie kleine deeltjes met de derde macht hoger dan de grotere deeltjes) dat ze in biomassa de gelijke of meerdere zijn van de grotere deeltjes. Uit de resultaten van Noordwijk 10 (FIGUUR 5) blijkt dat de chlorofyl-a bijdrage van de kleinste fractie, ondanks een aanzienlijke numerieke dominantie, nauwelijks bijdraagt aan de totale biomassa. Alleen rond 20 juni en begin september dragen de deeltjes $< 5 \mu\text{m}$ redelijk bij, ongeveer 15%, aan de totale chlorofyl-a concentratie. De rest van het jaar wordt de biomassa vooral bepaald door grotere deeltjes. In het voorjaar zijn het vooral de

grotere deeltjes $>200\ \mu\text{m}$, die bijdragen aan de biomassa, dit kunnen bijvoorbeeld ook ketens zijn. In juli zijn het vooral middelgrote deeltjes tot $40\ \mu\text{m}$ die de biomassa bepalen. Eind juli en begin augustus treedt langzaam een verschuiving op van middelgrote deeltjes naar iets grotere deeltjes $<75\ \mu\text{m}$, die voor een groot deel de biomassa verklaren. Midden augustus bepalen net als in het voorjaar zeer grote deeltjes $>200\ \mu\text{m}$ de biomassa, waarna snel een verschuiving in september volgt naar de middelgrote deeltjes $<75\ \mu\text{m}$ en vervolgens weer later in het jaar de deeltjes $<40\ \mu\text{m}$.

Uit de biomassaverdeling of de chlorofyl-a concentratie uitgesplitst naar fracties blijkt dat dit vooral bepaald wordt door de grotere deeltjes waarin per periode bepaalde dominante grootteklassen onderscheiden kunnen worden.

4.1.3 Biovolume

De linFLS/ml parameter is indicatief voor het biovolume. Bekend is dat deeltjes een toename in de linFLS/ml parameter geven bij een toename van de deeltjesgrootte, maar een lineaire of anderszins eenduidige correlatie met het werkelijk biovolume van fytoplankton moet nog worden gemodelleerd. De verwachting is dat het biovolume in hoge mate correleert met de biomassa. Echter, een afwijkend beeld is aanwezig ten opzichte van de chlorofyl-a concentratie in de periode begin mei, waarbij nauwelijks een biovolume toename wordt geconstateerd bij een gelijktijdige hoge chlorofyl-a toename in dezelfde periode. De aanwezigheid van chlorofyl-a wordt vooral bepaald door grotere deeltjes, waarvan de verwachting was dat dit ook tot uitdrukking had moeten komen in het biovolume of linFLS/ml plaatje (FIGUUR 7). Aan de andere kant blijkt uit de linFLS grafiek dat deze parameter toch sterk bepaald wordt door de talrijke kleinere deeltjes en dus met relatief weinig biovolume en lijkt de relatie tussen linFLS/ml en biovolume minder sterk aanwezig dan men op grond van de lichtverstrooiing in voorwaartse richting van deeltjes zou verwachten.

Voorzichtig kan geconcludeerd worden dat het linFLS/ml getal het gemiddelde effect van beide parameters (aantallen, biovolume en -massa) in zich verenigt en minder dan verwacht het biovolume effect wordt doorberekend

4.1.4 Fycoerithrine en fycocyanine

Deze pigmenten komen voor in Cryptofyceae (fycoerithrine) en Cyanobacteria (fycocyanine). Fycoerithrine wordt bepaald met de linFGO/ml. Niet eerder werd specifiek naar deeltjes gekeken met de combinaties chlorofyl-a en fycoerithrine. Op Noordwijk 10 in 2000 blijkt dat de groep deeltjes kleiner dan $5\ \mu\text{m}$ grotendeels deeltjes zijn met naast chlorofyl-a ook fycoerithrine (FIGUUR 9). Het relatieve aandeel van deeltjes dat zowel chlorofyl-a als fycoerithrine bevat ligt in de perioden t/m februari, in juni en vanaf midden augustus rond de 50% en hoger (van de totaal concentratie). In de perioden 30 maart, midden mei, midden-eind juli rond de 25 % en lager.

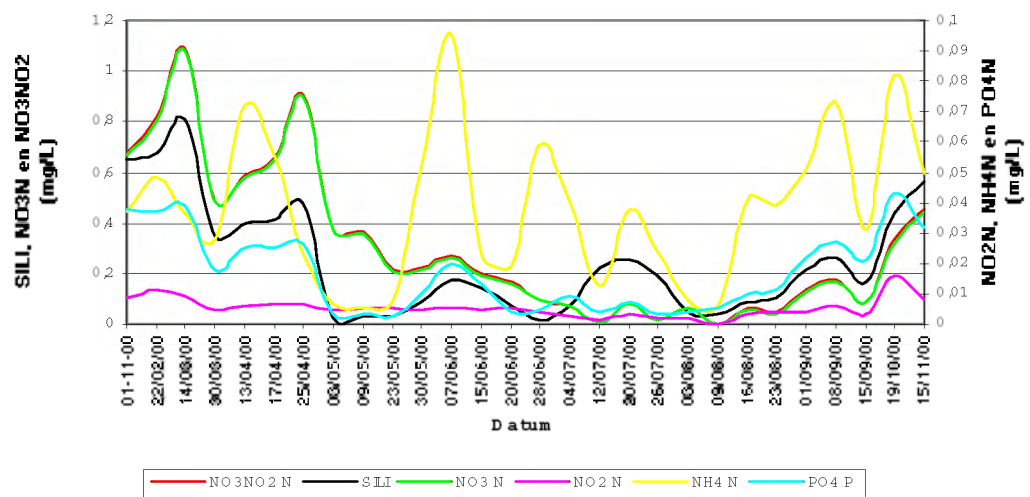
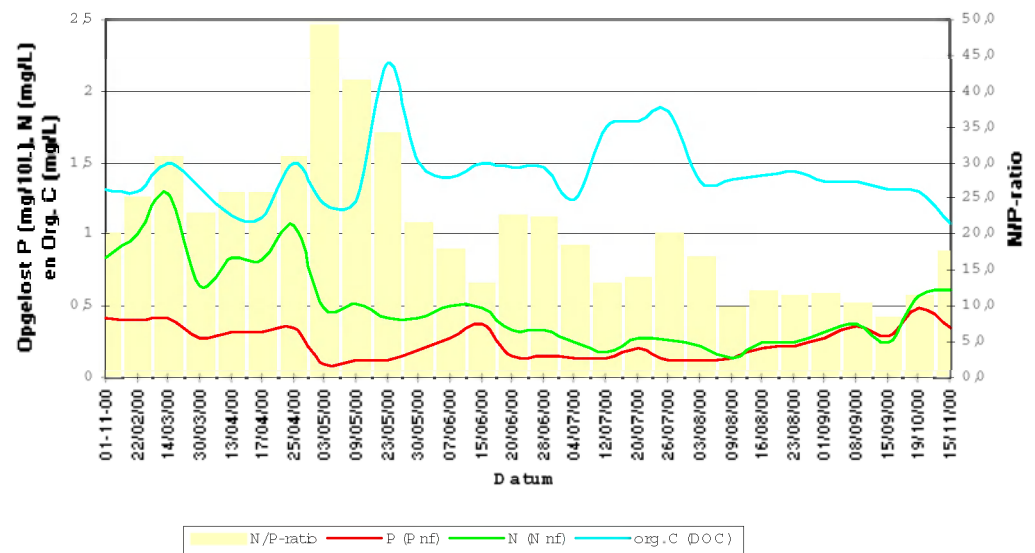
In mei is het aandeel van grotere deeltjes dan $5\ \mu\text{m}$ met fycoerithrine opvallend hoog vergeleken met de rest van het jaar waar de groep $<5\ \mu\text{m}$ in aantal domineert.

Fycocyanine wordt gemeten met de linFRR/ml parameter. Cyanobacteriën worden gekenmerkt door de aanwezigheid van fycocyanine. Deze groep algen wordt vooral geassocieerd met de zoetwateralgenproblematiek, waarbij drijflagen en afsterving van talrijke algen in eutrofe watersystemen voor zuurstofloosheid in het water kunnen zorgen of waarbij toxines worden geproduceerd. In 2001 wordt deze groep algen met fycocyanine meegenomen in de standaard monitoringsdata.

De totaalconcentratie fytoplankton deeltjes wordt grotendeels bepaald door deeltjes < 5 µm met zowel chlorofyl-a als fycoerithrine, vermoedelijk Cryptofyceae. Deze groep, kleiner dan 5 µm, is moeilijk te tellen met microscopie.

4.2 Relatie met nutriënten

De relatie tussen nutriënten en fytoplanktongegevens afkomstig van flowcytometrie is onderzocht voor de locatie Noordwijk 10. Het nutriëntenconcentratieverloop en het opgelost N, P, organisch koolstof en de N/P-ratio zijn weergegeven in de figuren 14 en 15. Indien een relatie tussen de flowcytometrische gegevens en de nutriëntengegevens gemaakt wordt, valt op dat na een periode van januari t/m april met een hoge concentratie aan silicium (FIGUUR 14), in mei flowcytometrisch een grote procentuele bijdrage aan deeltjes gedetecteerd worden met een hoge linFLS-waarde (veel voorwaartse lichtverstrooiing, veel biovolume) (FIGUUR 8). Uit FIGUUR 15 blijkt dat in mei een hoge N/P-ratio aanwezig is. Uit de mesocosm studies is onder andere naar voren gekomen dat een hoge N/P ratio in het voordeel werkt van diatomeeën. De uitgebreide microscopische tellijst laat in dezelfde periode een procentuele toename zien van diatomeeën (*Chaetoceros socialis* en de *Rhizosolenia delicatula*). Deze gegevens in beschouwing genomen lijkt het er dus op dat in deze periode (mei) een bloei geweest is van diatomeeën, die flowcytometrisch opvallend verhoogde waarden toonde met de linFLS/ml parameter. Dus mogelijk geeft de linFLS/ml parameter een indicatie voor (procentuele) bloeien van diatomeeën, indien deze wordt uitgezet in een 100 % gestapelde kolomgrafiek (FIGUUR 8). Dit wordt bevestigd in de periode augustus, waar tevens een diatomeeënbloei heeft plaatsgevonden zoals uit de microscopische tellijst blijkt. In dezelfde periode werd flowcytometrisch een toename van deeltjes geconstateerd met een hoge linFLS-waarde.

FIGUUR 14: Nutriënten balans van Noordwijk 10

FIGUUR 15: Opgelost P, N, Organisch koolstof en de N/P ratio van Noordwijk 10


4.3 Relaties nutriënten met behulp van statistiek: principaal componenten analyse

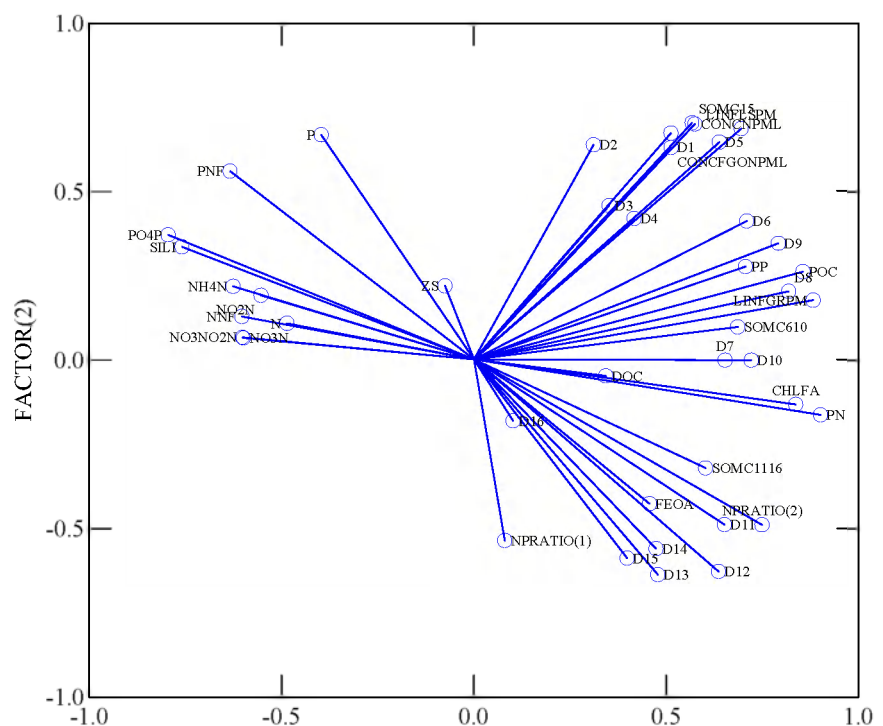
Wat zijn de onderlinge relaties en effecten van diverse parameters op elkaar? Bekend is dat nutriënten en fytoplankton onderlinge relaties hebben. Bij onderzoek naar de onderliggende relaties tussen vele parameters met principaal componenten analyse wordt de covariantie tussen parameters onderzocht en kan worden uitgedrukt in twee principale componenten, welke de grootste variantie (spreiding) in een gehele dataset verklaren. Is een vector van een variabele evenwijdig met principale component 1 (de component, die de hoogste variantie in de dataset uitdrukt) dan zal een verandering van de betreffende vector

of parameter alleen spreiding veroorzaken op deze principale component 1 en geen invloed op de spreiding in component 2 veroorzaken. Is deze vector a langer dan vector b dan is de invloed van parameter a groter op de spreiding in de principale component 1 dan vector of parameter 2. Is de hoek van vector c 45° dan heeft een verandering van vector c evenveel invloed op de spreiding van principale component 1 als 2. De hoek van de vectoren onderling bepaalt in hoeverre de vectoren overeenkomstige effecten op beide principale componenten veroorzaken. De lengte van de vectoren bepaalt de mate waarin dat effect ten opzichte van andere vectoren zwaarder weegt op de betreffende principale component.

Bij weliswaar evenwijdige, maar tegengestelde richtingen hebben de betreffende vectoren of parameters een tegengesteld effect op de principale component.

In FIGUUR 16 is het resultaat van de principaal componenten analysetechniek afgebeeld en zijn de twee principale componenten 1 en 2 als x- respectievelijk y-as gepresenteerd. De opgetelde variantie uitgedrukt door beide componenten verklaart 66% van de totale variantie van de gehele dataset. Elke gebruikte variabele in de dataset is als vector afgebeeld in FIGUUR 16.

FIGUUR 16: Principaal component analyse van nutriëntgegevens in relatie met flowcytometrische gegevens



Een verklaring van de gebruikte symbolen in FIGUUR 16:

- *D1 t/m D16 is de flowcytometrische chlorofyl-a concentratie in de genoemde 16 klassen (D1 < 5µm t/m D16 750-1000 µm)*

- *SomC15 is de som van de concentraties van autotrofe deeltjes tot 40 μm*
- *SomC610 is de som van de concentraties van autotrofe deeltjes van 40-150 μm*
- *SomC1116 is de som van de concentraties van autotrofe deeltjes van 150-1000 μm*
- *LINFRPM is de flowcytometrische chlorofyl-a concentratie*
- *LINFLSPM is de flowcytometrische biovolume/voorwaartse lichtverstrooiing concentratie*
- *CONCNPML is de totale autotrofe deeltjesconcentratie*
- *CONCFGOPML zijn de deeltjes met fycobiliproteïnen (waaronder fycoerithrine, fycocyanine)*
- *N, NNf, NO₃NO₂N, NO₃N, NO₂N, NH₄N zijn de stikstofgerelateerde nutriënten*
- *P, PNf, PO₄P zijn de fosfor gerelateerde nutriënten*
- *SIL is silicium gerelateerd nutriënt (diatomee-nutriënt)*
- *DOC is opgelost organisch koolstof*
- *PN is particulier stikstof*
- *PP is particulier fosfor*
- *POC is particulier organisch koolstof*
- *NPRATIO1 en 2 zijn de ratio's tussen totaal N en P (opgelost, niet opgelost)*
- *ZS is zwevend stof*
- *CHLFA is de HPLC bepaalde chlorofyl-a concentratie*
- *FEOA is de HPLC bepaalde feofytine concentratie (afbraakproduct van chlorofyl-a)*

De gebruikte data bestaat uit gegevens van alle monsters van Noordwijk10 uit het jaar 2000.

Er zijn twee principale componenten factor 1 en factor 2: Factor 1 verklaart de grootste variatie in de dataset en wordt gekenmerkt door parameters die hieraan evenwijdig liggen zoals nutriënten met N, SI en PO₄P en naar de positieve kant parameters als chlorofyl, PN. Factor 2 heeft geen duidelijke relatie met parameters. Nog het meest met P, de NP-ratio (opgelost) en D2.

Opvallend is dat drie verschillende grootteklassen elk clusteren in dezelfde richting: De grootteklassen zijn algen in de grootterange:

1 tot 40 μm (op 1 uur)	: d1 t/m d5
40 tot 150 μm (op 2 tot 4 uur)	: d6 t/m d10
150 tot 1000 μm (op 5 uur)	: d11 t/m d16

1 tot 40 μm : Deze groep algen correleren nauwelijks met de nutriënten. Opvallend is dat een toename van algen in deze grootteklasse niet direct leidt tot een afname van de nutriënten en zelfs een lichte toename van totaal P en P na filtratie.

40 tot 150 μm

Deze groep algen correleert sterk negatief met vooral de N nutriënten. Een toename fytoplankton uit de middenklasse leidt tot een afname van vooral de N

verbindingen. Verder correleert deze groep goed met de totaal gemeten chlorofyl-a concentratie, de flowcytometrische linFGR/ml parameter (ook chlorofyl). Ook correleert de middengroep met POC en PN. Tussen PN en chlorofyl-a blijkt ook een goede correlatie.

150 tot 1000 µm

Deze groep correleert het meest negatief met P en Pnf. Een toename van grote algen leidt tot relatief een grotere afname van P dan N nutriënten. De grotere algen lijken redelijk te correleren met de parameter NP-ratio (particulair). Verder blijkt dat een toename van de grotere algen gepaard gaat met een toename van de feofytine concentratie.

4.4 Vergelijkingen met referentietechnieken

4.4.1 LinFGR/ml (biomassa) versus Chlorofyl-a (HPLC)

Zoals eerder al is aangetoond (Hofstraat et al., 1994, Vrieseckolk, 1994) worden ook nu redelijke tot goede correlaties gevonden tussen de concentratie chlorofyl-a bepaald met FCM (linFGR/ml) en de HPLC gevonden hoeveelheid chlorofyl-a (zie TABEL 1).

De uitbijters in de grafieken waarin de onderlinge correlaties zijn onderzocht, zijn grotendeels te verklaren door het verschil in de technieken en/of door bepaalde opvallende monsterkarakteristieken. Wanneer deze uitbijters worden verwijderd worden de correlatiecoëfficiënten groter dan 0.80 en komen de vergelijkingen van de trendlijnen dichter bij elkaar te liggen. Zo wordt bij Noordwijk 10 de correlatie 0.91 wanneer de punten op de data 23 mei, 15 juni en 12 juli worden verwijderd (zie ook FIGUUR 11). Een verklaring voor de te lage linFGR/ml-waarde op 23 mei zou kunnen zijn dat er (gezien de uitgebreide microscopische tellijst) een relatieve hoge bijdrage in biomassa (linFGR/ml) zou moeten zijn van de soort *Rhizosolenia delicatula*, maar dat deze deeltjes bij de flowcytometrische analyse statistisch gemist zijn door een relatief hoge procentuele bijdrage in de numerieke concentratie van de *Prasinophyceae* (kleine deeltjes) gecombineerd met een lage totaal concentratie van fluorescerende deeltjes. Op 15-06-00 is uit de snelle microscopische tellijstgegevens een bloei aanwezig van *Mesodinium rubrum* (heterotrofe microflagellaat die in symbiose leeft met *Cryptophyceae*). Het is zeer aannemelijk dat de cellen van deze kwetsbare microzoöplanktonsoort bij de filtratiestap van de HPLC-methode, kapot slaan op het filter, waarbij de kleine *Cryptophyceae* vrijkomen en door de poriën van het filter verdwijnen. Hierdoor zou er een onderschatting in het HPLC-Chlorofyl-a gehalte kunnen ontstaan.

Verder moet opgemerkt worden dat iedere techniek zijn specifieke foutenbronnen kent door het verschil in de analysemethodiek. Hieronder worden de belangrijkste verschillen tussen flowcytometrie en HPLC weergegeven.

FCM	HPLC
0,25-2,5 ml monster in bewerking <u>nadeel:</u> door numerieke dominantie kunnen zeldzamere grotere deeltjes statistisch worden gemist	0,25-1 L monster in bewerking
levende cellen <u>nadeel:</u> kans op termijneffecten na de monsternamen (groei, sterfte, etc.)	gefiltreerd(>1µm), geëxtraheerd <u>nadeel:</u> kans op lyse van de cellen, pigmentafbraak (b.v. t.g.v. Chlorofylase)

4.4.2 LinFGR/ml (biomassa) versus particulier organisch koolstof (Carlo Erba)

Uit de TABEL 2 met gegevens over een eventuele correlatie tussen de flowcytometrische linFGR/ml waarde en het particulier organisch koolstof (POC) gehalte blijkt dat redelijke correlaties gevonden worden voor alle locaties, behalve voor de locaties in de Westerschelde. Een verklaring voor de ongecorrleerdheid van de monsters afkomstig van de Westerschelde locatie is dat het water in de Westerschelde veel detritus-achtig materiaal bevat waarin levende kleine cellen opgesloten of eraan vastgekleefd zitten. Dit blijkt bijvoorbeeld uit de foto's van de imaging in flow van Westerschelde monsters, waarin veel detritus geconstateerd wordt. Ook blijkt dat een deel van deze vlokken één of meer algen bevatten, waarbij relatief grote deeltjes gemeten worden met een relatief lage fluorescentiewaarde. Afwijkingen tussen de flowcytometrische fluorescentie biomassa waarden en de POC-waarden zijn hiermee in deze matrix te verklaren, omdat het detritus verstrend werkt op de werkelijke koolstofbijdrage per fytoplanktoncel.

4.4.3 LinFLS/ml (biovolume) versus particulier organisch koolstof (Carlo Erba)

Een relatie tussen de grootte van een fytoplanktondeeltje en de hoeveelheid organisch koolstof van het deeltje lijkt logisch. Om deze reden is onderzocht of een correlatie aanwezig was tussen de linFLS/ml en het POC-gehalte. Uit de gegevens blijkt echter dat er geen correlatie gevonden wordt. Een verklaring is lastig. Een mogelijke verklaring is de variatie in celinhoud in relatie tot het volume van een cel. Geconstateerd wordt dat soorten een dichte celstructuur (veel celmateriaal) hebben en andere soorten een open celstructuur. Ook binnen dezelfde soort wordt dit geconstateerd wanneer cellen in een verschillende fase (groei, sterfte) zitten.

4.4.4 LinFLS/ml & linPLS/ml (biovolume) versus zwevend stof gehalte (gravimetrie)

De bovenstaande correlaties zijn voor de locatie Noordwijk 10 onderzocht en waren met regressiecoëfficiënten van respectievelijk 0.21 resp. 0.38 ongecorrleerd. Een vermoedelijke oorzaak is de grote fout die optreedt in de totaalconcentratie (waar het aandeel autotrofe fytoplanktondeeltjes relatief hoog is. De fytoplanktondeeltjes hebben een lagere dichtheid dan de slibdeeltjes of

andere vaste in suspensie verkerende deeltjes en veroorzaken bij een hoge concentratie toch een laag zwevend stof gehalte.

4.4.5 Totaalconcentratie autotroof fytoplankton: flowcytometrie versus microscopie

De door de flowcytometer bepaalde concentratie autotroof fytoplankton is veel hoger dan de microscopische bepaalde concentratie, omdat, zoals eerder al is opgemerkt, de fractie kleiner dan 5 µm 30-95% van de totaalconcentratie vertegenwoordigt en deze klasse niet kan worden geteld met microscopie. Nieuw echter, is dat bij de dataverwerking van flowcytometer resultaten eenvoudig gecorrigeerd kan worden voor deze groep deeltjes kleiner dan 5 µm, waardoor de vergelijking met microscopie beter wordt zoals in FIGUUR 15 wordt aangetoond. De grootste verschillen in concentratie worden gevonden in de periode midden juni. Hier is de flowcytometerconcentratie veel hoger dan de microscoopconcentratie. Uit de (snelle) tellijst van het levende monster blijkt dat op deze datum een zeer hoge concentratie van *Mesodinium rubrum* cellen (heterotroof microflagellaat) die in symbiose leven met *Cryptophyceae* aangetroffen zijn, terwijl bij de uitgebreide tellijst de concentratie veel lager is na lugol fixatie, waarvan bekend is dat cellen 'kapot' klappen en daarmee vermoedelijk de microscopische concentratie onderschat is. In het lugol monster blijkt deze soort dan ook slechts 5% van de totaaldeeltjesconcentratie uit te maken, terwijl uit de snelle (ongefixeerde) microscopische telling blijkt dat de soort dominant (>10%) in het monster voorkomt. Daarnaast is het tevens mogelijk dat het verschil in concentratie tussen flowcytometrie en gefixeerde microscopische tellingen groter is doordat bij de flowcytometrische analyse kwetsbare cellen zouden kunnen beschadigen (door de roerder), waarbij de kleinere *Cryptophyceae* vrijkomen en een hogere concentratie veroorzaken. Controle hierop is mogelijk door het maken van digitale foto's van deze cellen tijdens de flowcytometrische analyse.

Een tegengesteld (concentratie)effect doet zich voor op de manier waarop de concentratiebepaling plaats vindt bij respectievelijk microscopie en flowcytometrie. Bij flowcytometrie wordt de concentratie vastgesteld op grond van het aantal observaties per volume. Het begrip observatie vertegenwoordigt één enkele cel, maar ook meerdere cellen indien deze als keten of kolonie aan elkaar zitten. Bij microscopie wordt een observatie uitgesplitst naar het aantal cellen of individuen per observatie en wordt op grond hiervan de concentratie vastgesteld (Overigens wordt het begrip individu in bij microscopie verschillend geïnterpreteerd). Op grond hiervan wordt verwacht dat de microscopische vastgestelde fytoplanktonconcentratie voor de groep deeltjes > 5 µm consequent hoger zal uitvallen dan bij flowcytometrie, vooral voor monsters die uit vele (lange) ketens of kolonies bestaan. Opvallend is dat de verschillen tussen beide technieken toch niet groot zijn. Alleen op 3 mei, 23 mei en op 28 juni zijn de concentraties fytoplanktondeeltjes bij microscopie hoger dan gemeten met flowcytometrie, maar voor de overige data is dit lager. Op 3 mei is microscopisch een relatief erg hoog aandeel (67%) van de kolonievormende soort *Chaetoceros socialis* gevonden, op 23 mei is de ketenvormer soort *Rhizosolenia delicatula* redelijk talrijk (36%). Voor de verhoging van 28 juni is geen

verklaring, wel is er een relatief hoog aandeel van de groep *Prasinophyceae* (65%) in het monster aanwezig, maar dit zijn losse enkele cellen.

4.4.6 Imaging in flow foto's versus microscopische waarnemingen

Aanpassingen gedurende het jaar 2000 aan de methodiek

In 2000 is begonnen met het standaard inzetten van de imaging in flow module bij het meten van monitoring monsters. De eerste opzet was om in de monsters zo veel mogelijk clusters te onderscheiden op grond van bivariate scatterplots in Spyro-software, gebaseerd op flowcytometrische waarnemingen van fytoplanktoncellen. Van de visueel aangetroffen clusters zou een dusdanig aantal foto's gemaakt worden dat het mogelijk zou maken om soorten te koppelen aan clusters. Er werd gestreefd naar een gemiddeld aantal foto's van 200 per monster. Na een aantal maanden op deze manier gewerkt te hebben bleek een aanpassing van deze methodiek noodzakelijk, omdat de meeste clusters van deeltjes in de diverse scatterplots (pls-fgr, pls-fgo en pls-frr) werden gevormd door met name zeer kleine deeltjes (<5 µm). In eerste instantie werden ook van deze deeltjes veel foto's genomen. In de "clusters" met grotere deeltjes werden bovendien veel detritusvlokken aangetroffen. Het gevolg was dat er in verhouding zeer weinig herkenbare planktoncellen gefotografeerd werden. De planktoncellen die wel via foto's herkend konden worden bevonden zich voornamelijk in het cluster met deeltjes > ca. 10 µm.

Op grond van de resultaten van het eerste half jaar werd besloten om de zeer kleine(niet-determinabele) deeltjes niet meer te fotograferen. In plaats hiervan is er verder gewerkt met een vaste selectie van het cluster met de deeltjes > ca. 10 µm. Met deze opzet werd deels afgestapt van het idee om soorten te kunnen koppelen aan clusters. Er werd vanaf dat moment gestreefd naar het nemen van ca. 200 foto's van het cluster met de grotere (>ca. 10 µm) deeltjes. Een taxonomist zou op deze manier ca. 200 herkenbare planktoncellen te zien krijgen waardoor in vergelijking met de snelle microscopische tellijsten een representatief beeld zou moeten ontstaan van de planktonsamenvatting in de monsters. Het cluster met de grotere deeltjes wordt echter gevormd door een klein percentage van het totaal aantal deeltjes. In de praktijk betekent dit dat het fotograferen van 200 foto's van dit cluster een tijdrovende bezigheid is (het opvoeren van de monstertoevoersnelheid kan dit proces versnellen maar leidt tot een lagere kwaliteit foto's).

Aan het einde van het jaar is de manier van werken nogmaals aangepast, vanwege de lage aantallen planktoncellen groter dan 10 µm in slechts enkele milliliters monster door de monsters voor de IIF-analyse eerst te concentreren over een 10 µm gaas. Het belangrijkste voordeel dat hiermee bereikt wordt is een hogere concentratie aan planktondeeltjes. De monstertoevoersnelheid kan laag blijven waardoor de kwaliteit van de foto's goed blijft. Een ander voordeel is de kortere tijdsduur van de IIF-analyse die nu gehaald wordt. Bovendien kan er sneller geanticipeerd worden op kleine fluctuaties van de mantelvloeistof-snelheid waar de IIF-analyse zeer gevoelig voor is.

Voor 2001 is gestart met een uitgebreide IIF-analyse waarmee, zoals tijdens de eerste maanden van 2001 is gebleken, resultaten worden behaald die veel beter vergelijkbaar zijn met de microscopische analyses dan in 2000 het geval was.

De soort(en)samenstelling van opvallende clusters in het niet geconcentreerde monster worden in 2001 met de IIF onderzocht. Vervolgens wordt het monster geconcentreerd over een 10 µm gaas en worden de cellen geresuspendeerd in 30 ‰ NaCl.

Van het geconcentreerde monster wordt nogmaals de concentratie bepaald en een vaste selectie in dit monster(deeltjes > ca. 10 µm) wordt met de IIF geanalyseerd. Het streefpunt is om 200 duidelijke foto's van fytoplanktondeeltjes te maken. Aangezien het selectiepercentage, de concentratiefactor en de concentratie van het geconcentreerde monster bekend is kan de concentratie van de dominant aanwezige soorten berekend worden.

Een belangrijke vooruitgang is de kwaliteit van de foto's die na een jaar ervaring duidelijk is toegenomen. De gedetailleerde classificatie zoals die met de microscoop mogelijk is zal niet met de IIF gehaald kunnen worden, omdat met een vaste vergroting gewerkt wordt. Een snelle bepaling van de dominant aanwezige soorten op species niveau inclusief concentratie behoort wel tot de mogelijkheden.

Vergelijking met microscopie in 2000: In vergelijking met de snelle microscopische analyses, zoals die door Koeman en Bijkerk bv. uitgevoerd zijn, blijkt dat er met de IIF toch een aantal dominant aanwezige soorten gemist worden. Dit is met name het geval op die data dat er zeer weinig planktondeeltjes gefotografeerd zijn. Het aantal gemiste (dominante) soorten neemt echter snel af als er meer duidelijke foto's aanwezig zijn.

Een belangrijk verschil met microscopie blijft het vermogen van de microscoop om met behulp van verschillende vergrotingen de algen gedetailleerder in beeld te krijgen. Op basis van de IIF foto's kan vaak wel geconcludeerd worden welke species het betreft maar is het daarentegen meestal niet mogelijk om ook de sub species te benoemen. In het geval er sprake is van onscherpe foto's wordt een soort vaak benoemd met het voorvoegsel cf.(con fir).

De kwaliteit van de foto's is afhankelijk van de uitlijning van de IIF-module en van de stabiliteit van het fluidics-systeem. Ondanks dat beiden vaak niet optimaal waren werd de scherpte van de genomen foto's door Louis Peperzak (OSB) toch als goed gekwalificeerd

Concluderend op grond van de resultaten en bevindingen van de IIF in 2000 blijkt duidelijk dat de nieuwe IIF een leerproces is geweest.. De manier van werken is gedurende het jaar een aantal keren aangepast. De fcm-operatoren hadden geen ervaring met IIF waardoor er regelmatig met een niet optimaal uitlijnde IIF gewerkt is . De kwaliteit van de foto's varieert hierdoor sterk maar is over het algemeen redelijk.

4.4.7 Aantallen flowcytometrie versus microscopie

Uit de microscopietellingen van het eerste helft van 2000 blijkt dat de kwantitatieve en kwalitatieve karakterisering gebaseerd is op circa 100 -150 observaties per monster.

De kwantitatieve en kwalitatieve karakterisering op grond van de digitale foto's van de combinatie flowcytometrie en imaging in flow is gebaseerd op circa 200 observaties.

Tellingen bij een standaard flowcytometrische analyse zijn gebaseerd op 10000-15000 observaties per monster.

In het algemeen wordt bij microscopische tellingen de betrouwbaarheid berekend als functie van de wortel van het aantal waarnemingen (Lund et al., 1958) onder de aanname dat de random verdeling die bij de schatting van de betrouwbaarheid van een steekproef ontstaat Poisson verdeeld is. Bij een 95% betrouwbaarheidsinterval wordt dit: $(2 \cdot \sqrt{\text{aantal}} \cdot 100\%) / \text{aantal}$. Bij 100 waarnemingen is de betrouwbaarheid 20%, bij 200 waarnemingen 14%, bij 10000 waarnemingen 2% en bij 15000 waarnemingen 1.6%.

Bij de concentreermethode waarbij gebruik gemaakt wordt van bezinking is de kans aanwezig dat deeltjes aan de wand blijven kleven. Vooral voor kleiner plankton wordt daarom geen bezinkingsmethode aangeraden (Reid, 1983)

4.4.8 Huidige obstakels om soorten te benoemen uit flowcytometrie-data

De automatische clustering via de matlab-software (algoritme clusterfcm(v6.0) 30,15) levert een aantal clusters op die in aantal en concentraties te vergelijken zijn met microscopie (zie FIGUUR 13). Toch is het lastig achteraf gevonden clusters toe te kennen aan soorten om diverse redenen:

- Een essentiële stap, die momenteel nog mist is de koppeling tussen foto en de overeenkomstige flowcytometrische optische eigenschappen van het gefotografeerde deeltje op grond waarvan een cluster achteraf is te controleren of definiëren. Nu kan 'alleen' op grond van een selectie van deeltjes in de bedieningssoftware gefotografeerd worden, maar dus niet in combinatie met de opslag van de optische eigenschappen. Foto's worden gemaakt aan de hand van een selectie van data in een scatterplot van twee flowcytometrische variabelen. Door sterke overlap van cluster (van soorten) in deze tweedimensionale plot is het maken van een aparte selectie van een achteraf door MATLAB gevonden cluster onmogelijk. Achteraf is er dus behoefte aan de combinatie van een foto en de overeenkomstige optische data om de achteraf gevonden clusters te kunnen 'valideren'. Zolang deze gelijktijdige opslag van foto en overeenkomstige flowcytometriedata van een deeltje niet mogelijk is, is de definitieve validatieslag niet uit te voeren. De oorspronkelijke opzet van deze combinatie van foto en opslag fcm-gegevens is in principe de bedoeling geweest, maar door gebrek aan tijd binnen het EurOPA-project is hieraan nauwelijks aandacht besteed. Volgens de software-ontwerper is de optie wel aanwezig in Spyro-software.
- De spreiding van de gemiddelde optische karakteristieken van de gevonden clusters is groot, hoofdzakelijk veroorzaakt door biologische spreiding (korte ketens lange ketens, grote cellen kleine cellen). Door de grote spreiding en onderlinge overlap van deeltjeseigenschappen is het vastleggen van de absolute getalwaarden in een database per soort riskant. Een database zou ontworpen kunnen worden op grond van dimensieloze getallen, waarbij de optische gevonden getalwaarden onafhankelijker worden van lengte (bij ketens) of volume effecten (bij kolonies, enkelcelligen).

4.4.9 Resumé

In de inleiding is gesteld de onderstaande vragen te beantwoorden en hiertoe is vooral ingegaan op de huidige stand van zaken en resultaten van flowcytometrie (met de extra mogelijkheden vergeleken met eerdere evaluaties) van de lokatie Noordwijk 10 in 2000:

1. In hoeverre is het mogelijk de microscopische analyse gedeeltelijke te vervangen?
2. Welke betekenis hebben de extra variabelen, die met flowcytometrie bepaald worden in relatie met referentiewaarden (bijvoorbeeld flowcytometrisch volume vs particulier organisch koolstof)?
3. Welke kwaliteit hebben de 'flowcytometrische getallen'?
4. Wat zijn de kosten van flowcytometrische analyses?

Vraag 1 kan eigenlijk pas beantwoord worden na de vragen 2 tot en met 4 beantwoord te hebben. Antwoord van vraag 2: In vergelijking met referentietechnieken als chlorofyl-a, POC, getelde autotrofe deeltjesconcentraties $> 5\mu\text{m}$ (met microscopie), fytoplanktonsoorten die geteld zijn op grond van de imaging in flow beelden en vastgesteld met microscopie zijn goede tot redelijke overeenkomsten gevonden. Flowcytometrie levert een meerwaarde door de groep van deeltjes $< 5\mu\text{m}$, die met andere technieken niet bepaald worden. Verder blijkt uit de relatie met bijvoorbeeld nutriëntgegevens dat bepaalde grootteklassen clusteren in drie groepen $< 40\mu\text{m}$, $40\text{--}150\mu\text{m}$ en $> 150\mu\text{m}$ en elk als groep een specifieke relatie heeft met een toename van N- of P-verbindingen in het water.

Antwoord op vraag 3: De kwaliteit van de flowcytometrische analyses wordt op diverse manieren geborgd. Zoveel mogelijk wordt binnen de criteria, die gelden voor Sterlab, gewerkt. De EurOPA n.s. is bijvoorbeeld uitgebreid gevalideerd, wat inhoudt dat verschillende prestatiekenmerken (reproduceerbaarheid, gevoeligheid, juistheid, robuustheid, dynamisch bereik, etc.) vastgesteld en vastgelegd zijn (Sandee, werkdocument RIKZ/IT-99.896x). Hiertoe zijn concentratiebepalingen tussen flowcytometrie en microscopie vergeleken, waarin goede onderlinge correlaties gevonden werden. Elke analysedag worden standaardbollen doorgemeten, die dienen te voldoen aan een opgegeven minimum en maximumwaarde. Deze 1^e lijnsborging wordt consequent bijgehouden op een kaart om lange termijn reproduceerbaarheid van de analyses te waarborgen. Een 2^e lijnsborging (gecertificeerd referentiemateriaal) en een 3^e lijnsborging (ringonderzoeken) vinden niet plaats, maar het is wel de bedoeling dit zoveel mogelijk toe te gaan passen in de toekomst. Wordt gekeken naar het aantal tellingen per monster dat per analyse wordt gedaan dan is dit 10000-15000 voor flowcytometrie ten opzichte van ca 100-150 voor microscopie. Volgens Poissonstatistiek is het verschil in telfout op grond van de totaaltelling $\sqrt{\text{aantal}}$ /aantal oftewel 1% voor flowcytometrie en 10% voor microscopie. Flowcytometriemonstervolumina zijn klein (tot 10 ml) ten opzichte van microscopiemonster-volumina (opconcentrerend tot ca 20x gebaseerd op ca 500 ml). Voor de imaging in flow foto-opnames wordt sinds eind 2000 ook opgeconcentreerd (van ca 500 naar 50-20 ml) en worden circa 200 foto's genomen. De fotokwaliteit is minder goed dan de microscopische optische

kwaliteit, waardoor identificatie op grond van digitale imaging in flow foto's soms niet mogelijk is. Een voordeel van de imaging in flow opnames is dat elk deeltje dat chlorofyl-a fluorescentie heeft in principe gefotografeerd kan worden en 'onzichtbaarheid' door detritus uitgesloten is bij deze techniek.

Antwoord op vraag 4: De kosten voor een nieuw flowcytometrisch analyseapparaat zijn ca kf 300,- en wordt in 8 jaar afgeschreven (kf 37,5 p.jr.). Een standaardanalyse duurt gemiddeld 1 uur inclusief rapportage. Kosten voor onderhoud en materialen per jaar worden op ca 5% van de nieuwprijs geschat (kf 15,- p.jr.). Uitgaande van het uurtarief van het RIKZ van fl 152,- zijn bij 500 flowcytometrische analyses per jaar, de kosten per analyse fl 257,- (fl 75,- + 152,- + 30,-). Bij 1000 analyses per jaar zijn de kosten per analyse fl 219,50 (fl 37,50 + 152,- + 30,-). In 2000 zijn in totaal op de flowcytometer meer dan 1000 analyses gedraaid.

Antwoord op vraag 1: Als toeleverancier van informatie over fytoplanktongegevens in de kustwateren, achten de auteurs van dit verslag een (gedeeltelijke) vervanging van microscopische analyse door een combinatie van flowcytometrie en imaging in flow goed mogelijk. Aangetoond is dat de flowcytometrische verkregen informatie, die geleverd wordt betrouwbaar en objectief is. Het voordeel van het tellen in levende monsters en het maken van digitale opnames hierin is dat geen celverlies optreedt door conservering en fixatie door het uit elkaar spatten van cellen zoals per definitie zal plaatsvinden bij elke tot nog toe bekende fixatiemethode. Het nadeel van levende monsters is de snelheid waarbinnen een monster geanalyseerd moet zijn om de representativiteit van het monster te waarborgen. Ook uit dit verslag blijkt dat de flowcytometrisch verkregen informatie goed overeen komt met andere (bekendere) analytische technieken. Bij een standaard flowcytometrische analyse wordt meer informatie verkregen over kleine deeltjes, die microscopisch niet of nauwelijks zichtbaar zijn. Daarnaast onderscheidt flowcytometrie zich van microscopie doordat snel een relatie gelegd kan worden tussen aantallen, biomassa, groottefracties en soorten. De soortensamenstelling uitgedrukt als biomassa per volume (chlorofyl-a) is bij microscopische tellingen lastig. De biomassabijdrage van soorten wordt bij microscopie geschat aan de hand van een theoretische biomassa gerelateerde variabele per soort. Gecombineerd met eventueel een schatting van het biovolume kan dan de biomassa per soort berekend of geschat worden (Reid, 1983). De betrouwbaarheid van deze afgeleide methode is matig, alleen al door de grote biologische spreiding. Bij flowcytometrie is de biomassaverdeling van diverse groottefracties een duidelijk voordeel, omdat per individueel deeltje een chlorofyl-a bijdrage en biovolume bijdrage van dat deeltje daadwerkelijk gemeten wordt en het totaalbeeld van alle deeltjes desgewenst snel kan worden gegeven, zoals wordt aangetoond in dit verslag. De meerwaarde van flowcytometrie kan dan geleverd worden bij vragen als: welke grootteklassen dragen het belangrijkste bij aan de biomassa, welke deeltjes leveren de meeste koolstof en hoe verhouden de aantallen deeltjes zich ten opzichte van de biomassa van die deeltjes?

Gedetailleerde informatie over soorten of de identificatie van soorten wordt verkregen op grond digitale opnames van deeltjes (imaging in flow). Aan de

foto-opnames kan kwantitatieve informatie ontleend worden over de onderlinge verhoudingen waarin soorten voorkomen in een monster.

De kosten van de flowcytometrische analyse liggen niet hoger, maar waarschijnlijk lager dan van een microscopische telling. Tellingen bij flowcytometrie zijn echter op hogere aantallen gebaseerd, als ook het aantal digitale foto-opnames, vergeleken met het aantal microscopische waarnemingen. Een nadeel van flowcytometrie is de apparaat-afhankelijkheid. Bij uitval is een tweede identiek apparaat niet aanwezig. Wel moet worden opgemerkt dat de upgrade van de 'oudere' Optical Plankton Analyser 'op zeer korte termijn een tweede flowcytometerapparaat oplevert. De mogelijke commercialisering van flowcytometrie en in het bijzonder van de RIKZ-apparaten, zal garanties kunnen bieden in de toekomst met betrekking tot de apparaatafhankelijkheid.

5. Conclusies

De bevindingen van de meest frequent bemonsterde locatie Noordwijk 10 zijn geëvalueerd.

Uit de gestapelde staafdiagrammen van Noordwijk 10 blijkt dat de bijdragen aan de totaalconcentratie fytoplanktondeeltjes herkenbare trends laat zien.

Over het gehele jaar domineren de deeltjes kleiner dan 5 µm in aantal, maar is hun bijdrage in de chlorofyl-a concentratie klein. In het voorjaar, als ook midden-eind juli en begin augustus zijn duidelijke bloeien (aantallen deeltjes) waarneembaar van grotere grootteklassen. Het biomassaverloop laat tevens trends zien, maar verschilt duidelijk van het totaal(aantal)concentratieverloop. Begin mei en midden juni, midden juli en begin augustus worden de hoogste biomassa's gevonden veroorzaakt door grotere deeltjes, terwijl de totaalconcentratie vooral midden juli opvallend hoog is ten opzichte van de overige periodes. Verder valt op dat een groot deel van de deeltjes kleiner dan 5 µm tevens fycoerithrine-pigment te bevatten.

Uit de vergelijking van flowcytometrische resultaten met referentietechnieken waarbij chlorofyl-a, zwevend stof en particulier organisch koolstof in monsters van de dezelfde locaties bepaald zijn, blijkt met name voor chlorofyl-a (voor alle locaties) en POC (voor 4 locaties) een redelijke tot goede correlatie met de flowcytometrische linFGR/ml parameter. Voor zwevend stof werd nauwelijks correlatie gevonden met een flowcytometrische parameter.

De vergelijking met microscopische resultaten leverden goede overeenkomsten tussen beide technieken voor de gevonden totaal-fytoplanktonconcentraties, indien bij flowcytometrie de groep deeltjes kleiner dan 5 µm werd weggelaten. Hierin blijkt een essentieel verschil tussen beide technieken. Flowcytometrie meet dankzij de hoge gevoeligheid ook picoplankton (1-5 µm) dat veelal gemist wordt bij microscopie. Uit de microscopische waarnemingen blijkt dat de soorten die meer dan 2% bijdragen aan de totaalconcentratie gemiddeld 92% van de totaalconcentratie verklaren. Het aantal soorten dat hiervoor nodig is ligt gemiddeld op 7,5 (±2,5) per monster gebaseerd op de uitgebreide microscopische analysesresultaten van Noordwijk 10 over het eerste halve jaar 2000. Uit de flowcytometrische clusteranalyse worden in dezelfde periode gemiddeld 8,4 (±1,9) clusters van deeltjes gevonden.

Een vergelijking tussen soorten gevonden met microscopie en imaging in flow-flowcytometrie is voor het jaar 2000 een leerproces gebleken. In het begin werden te kleine en niet determineerbare deeltjes teveel gefotografeerd waardoor de grotere deeltjes, die juist met microscopie bepaald werden, statistisch gemist werden. Het instellen van de digitale camera vereiste tevens enige ervaring die aan het eind van het jaar 2000 goede foto's ging opleveren. De oogst duidelijke foto's van grotere deeltjes was daardoor relatief laag.

Opconcentrerend of fractionering van grotere deeltjes (m.b.v. een planktonnet van 10 µm) is noodzakelijk gebleken. De duidelijke foto's van grotere deeltjes waren goed vergelijkbaar met de microscopisch waargenomen soorten. Vanaf januari 2001 worden goede en grote aantallen digitale foto's per monster genomen, dankzij de in 2000 opgebouwde ervaring.

Uit de relatie tussen verschillende variabelen (nutriënten, chlorofyl, koolstof etc.) en flowcytometrische variabelen blijken met behulp van principaal componenten analyse drie grootteklassen te clusteren. Kleinere fytoplanktondeeltjes < 40 µm, middelgrote tussen 40 en 150 µm en de grotere fytoplanktondeeltjes > 150 µm. De middelgrote deeltjes tonen de grootste tegengestelde relatie met N-verbindingen, de grotere deeltjes vertonen de grootste tegengestelde relatie met P-verbindingen. Feofytine toont dezelfde mate variantie met de groep grotere deeltjes, chlorofyl lijkt meer te correleren richting de groep middelgrote deeltjes. De particulaire fracties (POC, PN, PP) tonen dezelfde variatie als de groep middelgrote deeltjes.

De aantallen deeltjes op grond waarvan met beide technieken tellingen gebaseerd zijn verschilt van circa 200 voor microscopie tot 10000-15000 voor flowcytometrie. Het aantal digitale foto's zal vergelijkbaar zijn met microscopie. Concluderend achten de auteurs van dit verslag een (gedeeltelijke) vervanging van microscopische analyse door een combinatie van flowcytometrie en imaging in flow goed mogelijk.

6. Aanbevelingen

1. De kans dat grotere deeltjes gemist worden bij de digitale foto-opnames van een monster is aanwezig omdat ze minder talrijk en dus met een relatief lage concentratie in een monster aanwezig zijn. De identificatie van deeltjes aan de hand van de digitale foto's is mogelijk vanaf circa 5 μm en groter. De relatief langere wachttijden voordat grotere deeltjes gefotografeerd zijn en het kwijtraken van een grote hoeveelheid 'ballast' deeltjes kleiner dan 5 μm vereist de opconcentrering of fractionering van grotere deeltjes. Dit zal tevens de vergelijking met microscopische resultaten ten goede komen, omdat in principe alleen de grotere deeltjes gemeten worden. Om deze reden is besloten eind 2000 en vanaf 2001 te starten met het fractioneren van monsters ten bate van de imaging in flow opnames. Van elk opgeconcentreerd monster wordt de concentratie fytoplankton nogmaals bepaald, zodat kwantitatieve informatie gecombineerd kan worden met de vastgestelde soorten in de opgeconcentreerde monsters.
2. Het is zeer gewenst de digitale foto's van fytoplankton te combineren met de overeenkomstige flowcytometrische optische eigenschappen van de deeltjes, zodat achteraf gevonden clusters van deeltjes gevalideerd kunnen worden met foto's. Hiervoor dient de SPYRO-software te worden aangepast. Op grond van deze toepassing kan meer informatie geleverd worden over soorten.
3. Het wordt aanbevolen om (weer) gebruik te maken van een interne referentiestandaard(bol) waarmee referentiewaarden gebruikt kunnen worden om clusters met een bepaalde spreiding, juist in een database te kunnen definiëren. Invloed door afwijkingen in laserintensiteit, stroomsnelheid e.d. kunnen worden dan worden uitgevlakt.
4. De upgrade van de OPA zal onder andere bestaan uit een geavanceerde vorm van signaalverwerking, door toepassing van het pulse shape analysis principe (Rutten et al. 2001). Dit zal ertoe leiden dat op de OPA nieuwe stijl (OPA n.s.) vele extra variabelen per optische parameter bepaald zullen worden. Op grond van deze extra informatie ontstaat een te verwachten uniek spectrum van getallen per soort, waardoor soortherkenning, bijvoorbeeld aan de hand van een database, sterk verbeterd zal worden.
5. Aanbevolen wordt dankzij de hoge snelheid van de flowcytometrische analyse en de bijna geheel geautomatiseerde resultaatverwerking om binnen één week resultaten via internet te visualiseren, zodat actueel en snel een globaal beeld over fytoplanktongegevens in de Nederlandse kustwateren door het RIKZ geleverd wordt. Een voorbeeld is gegeven in bijlage 2.
6. De blauwalgen of blauwwieren of Cyanobacteriën dienen volgens de Europese kaderrichtlijn in de daartoe gedefinieerde stroomgebieden gemonitord

te worden. Hieronder vallen de Nederlandse estuaria, Waddenzee en de 1-mijlszone vanuit de Nederlandse kust. Met behulp van flowcytometrie zijn blauwalgen goed te monitoren. Het wordt aanbevolen nadat de juistheid van de FCM-methode is vastgesteld, daadwerkelijke de blauwalgmonitoring te gaan uitvoeren.

7. Metingen aan zoöplankton, microzoöplankton, picoplankton, nanoplankton, bacteriën en/of virussen in (kust)wateren) is in de meeste monitoringsprogramma's onderbelicht. Aanbevolen wordt om de essentie en rol van elk van de genoemde groepen in het ecosysteem te overwegen. De rol van flowcytometrie in monitoring voor deze 'nieuwe' groepen kan hierin niet genegeerd worden.
8. Is er een toxische algenproblematiek? Door diverse internationale onderzoekers wordt de toxische algenproblematiek gezien als een nauwelijks serieus genomen probleem ('Researchers criticize response to killer algae', Nature). Adequate respons is momenteel (te) traag. Kennisopbouw over de toepassing van antilichamen en RNA-probes, kleuringstechnieken, fixatietechnieken en snelle monitoring vindt plaats binnen het RIKZ-project 'Monisnel' (OSB). De bijdrage van flowcytometrie is hierin essentieel en voor een toekomstige snelle monitoring van toxische algen met behulp van flowcytometrie en voorberekings(kleurings)technieken wordt lange termijn kennisopbouw en implementatie binnen monitoring aanbevolen.
9. DNA labellingstechnieken voor het opsporen van activiteit van farmaca in combinatie met HPLC of flowcytometrie is al ver gevorderd. Ook voor bepaalde stoffen die binden aan receptoren (bijvoorbeeld oestrogenen) ligt al gereedschap klaar. Dit is misschien een van de mogelijkheden voor flowcytometrie, die past in meer effectgericht monitoren (signaal = f[affiniteit voor receptor x concentratie]).

7. Referenties

Anonymus, 1987

MONITOR-programma voor de zoute wateren. Nota GWIO-87.018

Brussaard C.P.D., Marie D., Bratbak G., 2000

Flow cytometric detection of viruses, J. Virol. Methods, 85:175-182

Carr M.R., Tarran G.A., Burkill P.H., 1996

Discrimination of marine phytoplankton species through the statistical analysis of their flow cytometric signatures, Journal of Plankton Res., 18:1225-1238

Dalton R., 2000

Researchers criticize response to killer algae, Nature, vol 406, Aug 2000

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., 1995

A European Optical Plankton Analysis System: Flow cytometer based technology for automated phytoplankton identification and quantification. Final Report MAS2-CT91-0001, 1995

Gasol JM, Zweifel UL, Peters F, Fuhrman JA, Hagström A, 1999

Significance of size and nucleic acid content heterogeneity as measured by flow cytometry in natural planktonic bacteria, Appl. Environm. Microbiol., 65:4475-4483

Heusden van, G.P.H., 1972

Estimation of the biomass of plankton, Hydrobiologia, vol.39, 2, 165-208

Hofstraat, J.W., M. Rademaker & R.P.T. Koeman, 1991a

Standaardvoorschrift B001: Oppervlaktewater - Voorschrift voor de verzameling en conservering van fytoplankton in het mariene milieu - Ringleiding en sampler

Hofstraat, J.W., M. Rademaker & R.P.T. Koeman, 1991b

Standaardvoorschrift B003: Oppervlaktewater - Voorschrift voor de verzameling van levend fytoplankton (kwantitatief) in het mariene- en brakwater milieu - Ringleiding

Hofstraat, 1989

Biologische monitoring van fytoplankton. Notitie GWIO-89.274

Hofstraat J.W., Vreeze de M.E.J., Zeijl van W.J.M., Peperzak L., Peeters J.C.H. and Balfort H.W., 1991

Flow cytometric discrimination of phytoplankton classes by fluorescence and excitation properties, J. of fluorescence, 1, no. 4, 249-265

Hofstraat J.W., Zeijl van W.J.M., Vreeze de M.E.J., Peeters J.C.H., Peperzak L., Colijn F. and Rademaker, T.W.M., 1994

Fytoplankton monitoring by flow cytometry, J. of Fytoplankton Res. vol 19., no.9, 1197-1224

Jonker R.R., Meulemans J.T.M., Dubelaar G.B.J., Ringelberg J., 1995

Flow cytometry: A powerful tool in analysis of biomass distributions in phytoplankton, Water science and technology

Lund J.W.G., Kipling C., LeCren E.D., 1958

The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting, Hydrobiologia, 11, 143-170

Marie D., Partensky F.P., Vaultot D., Brussaard C., 1999

Enumeration of phytoplankton, bacteria and viruses in marine samples. In: Robinson J.P., Darzynkiewicz Z., Dean P.N., Orfao A., Rabinovitch P.S., Stewart C.C., Tanke H.J., Wheelless L.L., editors, Current protocols in flow cytometry, New York: John Wiley & Sons Inc., Supplement 10, Unit 11.11, p. 1-15

Marie D., Partensky F.P., Jacquet S., Vaultot D., 1997

Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using nucleic acid stain SYBR Green I, Appl. Environm. Microbiol., 63:186-193

Marie D., Brussaard C.P.D., Thyrrhaug R., Bratbak G., Vaultot D., 1999

Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry, Appl. Environm. Microbiol., 65:45-52

Rademaker, M., 1992

Oppervlaktewater - Voorschrift voor het determineren van fytoplankton monsters uit het mariene - en brakwater milieu - Microscop

Reid F.M.H., 1983

Biomass estimation of components of the marine nanoplankton and picoplankton by the Utermöhl settling technique, Journal of Plankton Res, 5, p. 235-252

RIKZ/IT-97.838 1997

Besprekingsverslag, 'Rol van flowcytometrie in fytoplanktonmonitoring'

Rutten T.P.A., Vriezেকolk G.H., Peeters J.C.H., 1997

Evaluatie flowcytometrie monitoringsdata '90-'96, Werkdocument RIKZ/IT

97.813x

Rutten T.P.A., Peeters J.C.H., Feldmeier R.J., 2001

Identification and quantification of algae species using flow cytometry combined with real-time pulse shape analysis, in prep.

Sandee A., 'EurOPA nieuwe stijl validatie', 1999

Werkdocument RIKZ/IT-99.896x

Vriezekolk G.H., 1994

Analyse van algenmonsters met de Optical Plankton Analyzer; Resultaten 1992, RIKZ rapport, 94-030

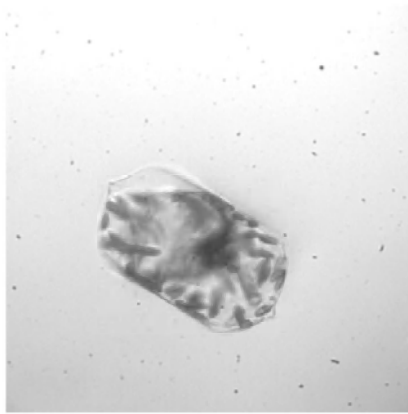
Vriezekolk G.H., 1995

Analyse van algenmonsters met de Optical Plankton Analyzer; Resultaten 1993, RIKZ werkdocument 96-814x

Zeijl van, W.J.M., Rademaker M., Hofstraat J.W., de Waal W.A.J., 1993

Analyse van algenmonsters met de Optical Plankton Analyzer; Resultaten 1990 en 1991, RIKZ rapport, 93.052

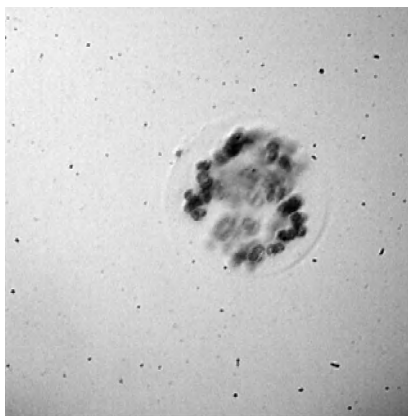
Bijlage 1: Foto's gemaakt met de Imaging in Flow module



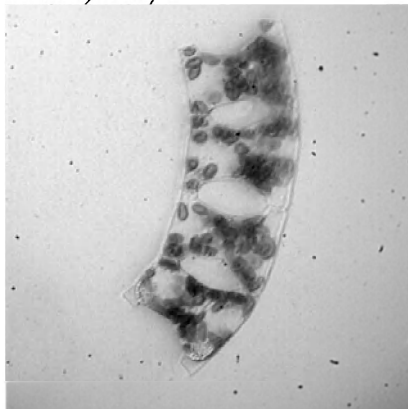
Cerataulina pelagica



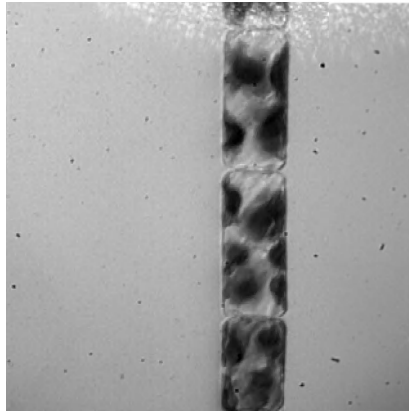
Rhizosolenia shrubsolei



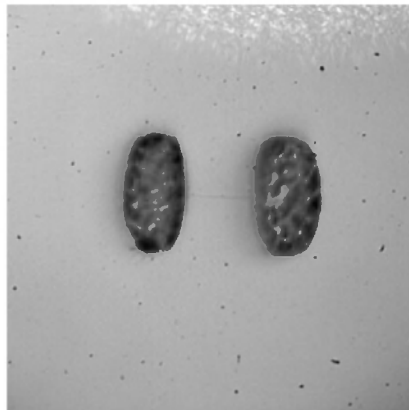
Phaeocystis sp.



Eucampia zoodiacus



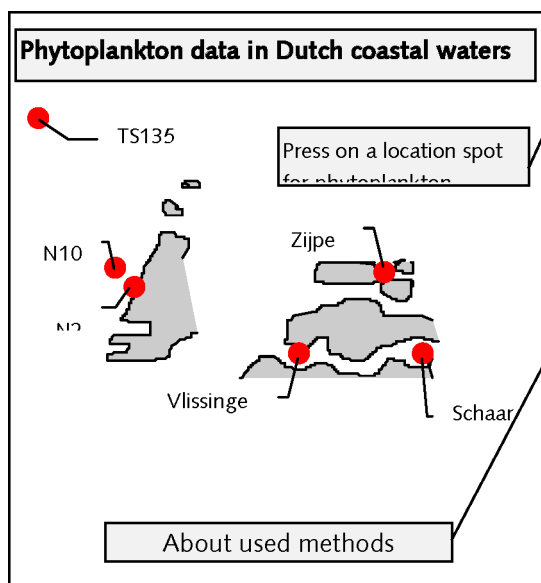
Rhizosolenia delicatula



Thalassiosira sp.

Bijlage 2: Voorbeeld mogelijke internetpresentatie flowcytometrische analyseresultaten

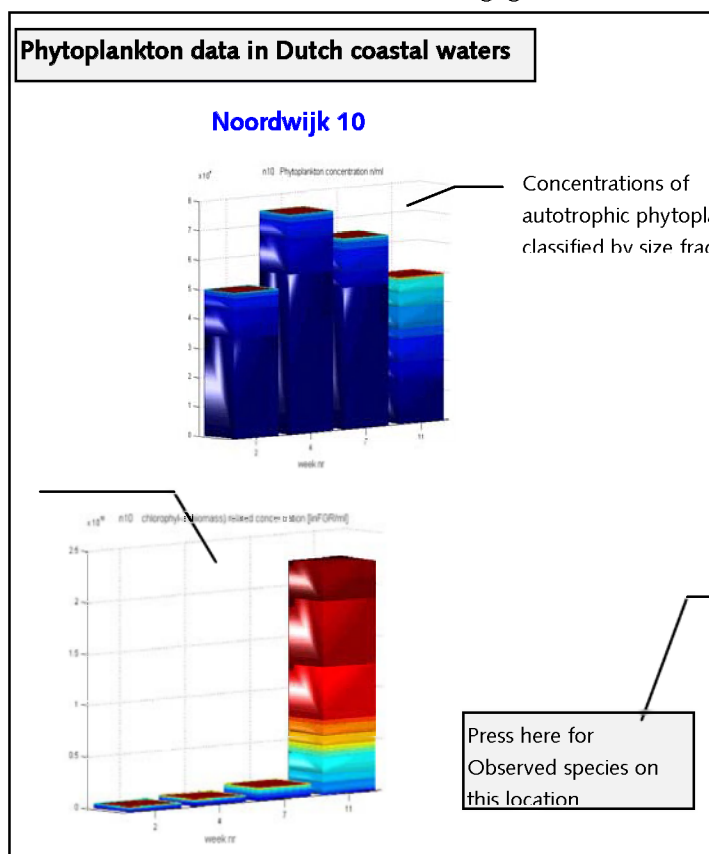
site 1:



Zie sites 2 - 7

Zie sites 14-16

sites 2-7 (per lokatie hetzelfde alleen met andere meetgegevens)



Zie sites 8-13

sites 8-13 (per lokatie hetzelfde alleen met andere meetgegevens)

Phytoplankton data in Dutch coastal waters

Noordwijk 10

Most recent data:

Species observed:

+++ >10%

Phaeocystis sp.

Rhodomonas sp.

Nitzschia sp.

++ 5-10%

Thalassiosira nord.

Rhizosolenia del.

+ 2-5%



	%aantal	%conc
GROOTTEVERDELING	FGR>0	linFGR/ml
< 5 μm	73.91	4.66
5-10	8.21	2.27
10-20	12.09	20.74
20-30	3.38	19.92
30-40	1.10	12.84
40-50	0.61	10.19
50-75	0.41	11.76
75-100	0.11	5.08
100-125	0.09	3.30
125-150	0.05	3.94
150-200	0.03	3.22
200-300	0.01	2.08
300-400	0.00	0.00
400-500	0.00	0.00
500-750	0.00	0.00
750-1000	0.00	0.00
>1000	0.00	0.00

Bijlage 3: Schematisch overzicht mogelijkheden met flowcytometrie

EurOPA n.s./OPA n.s.

Primaire parameters	FCM-naam	correlerend met
Concentratie fluoresc/niet-fluoresc deeltjes	Deeltjes/ml	Deeltjes/ml
Deeltjesgrootte	TOF [µm]	Lengte
Concentratie rode/oranje fluorescentie	FGR [au/ml] FGO [au/ml] FRR [au/ml]	Chlorofyl-a Fycoerithrine Fycocyanine/Chlorofyl-b
Concentratie lichtverstrooiing	FLS [au/ml] PLS [au/ml]	Volume/Biomassa Volume/Morfologisch
Signaalspecifieke informatie/spectra per deeltje (*)	Per FGR, FGO, FRR, FLS, PLS worden 12 extra variabelen bepaald	levert karakteristieke getallen per soort
* nieuw in ontwikkeling voor OPA n.s.		
Foto v.e. deeltje	digitaal opgeslagen foto	Soortherkenning

Afgeleiden/Secundaire parameters

Globale soortenonderscheid (C,D)
Specifieke soortenonderscheid (B)
Groeisnelheid (A,B)
Graassnelheid
Primaire productie

Cyano's, rood-fluorescerende, oranje fluorescerende, groep dinoff'n+diat'n, groottefracties, Virussen/Bacteriën/Fytoplankton/Microzooplankton
Veelal toxische/plaagsoorten

Hulptechnieken

A	Kleuring algemeen
B	Kleuring specifiek RNA/DNA/anti-lichaam
C	Fractionering/ Concentrerend
D	Dataverwerking met NN/MVS

Bijlage 4: Monitoring door Bedford Basin Institute/William Li

Onderstaand voorbeeld verwijst naar een deel van de biologische monitoring van het Bedford Basin Institute te Canada, waarbij onder andere flowcytometrie gebruikt wordt. Tevens kunnen via het genoemde internetadres resultaten bekeken worden. Naar analogie van dit voorbeeld kunnen momenteel flowcytometrische fytoplanktonresultaten van het RIKZ via een internetbrowser binnen 1 á 2 dagen worden bekeken binnen het RIKZ en wordt gestreefd dit in 2001 op internet operationeel te maken.

<http://www.mar.dfo-mpo.gc.ca/science/ocean/BedfordBasin/Pages/Methods.html>

Bacteria

Total heterotrophic bacteria were counted by epifluorescence microscopy of DAPI-stained cells collected on 0.2 mm polycarbonate membrane filters (Li and Dickie 1984); or by flow cytometric analysis of cryogenically preserved cells (1% paraformaldehyde, -70°C) stained with TOTO-1 (Li et al. 1995) or with SYTO-13 (del Giorgio et al. 1996; Guindulain et al. 1997). Bacterial abundance is reported as cells mL⁻¹.

Viruses

Total number of viruses were counted by flow cytometric analysis of cryogenically preserved samples (1% paraformaldehyde, -70°C) stained with SYBR Green-I (Marie et al. 1999). Viral abundance is reported as particles mL⁻¹.

In vitro chlorophyll

Chlorophyll a was measured in vitro by fluorometric method on 90% acetone extracts of material filtered onto Whatman GF/F filters from triplicate 100-mL subsamples. Fluorescence was measured in Turner Design Model 10 fluorometer and calibrated against spinach chlorophyll a. Measurements are reported in units of mg m⁻³.

Phytoplankton pigments

Water samples of 250 to 500-mL were filtered onto Whatman GF/F glass-fibre filters (25mm diameter) and stored in liquid nitrogen until processed. Pigment concentrations were quantified with reverse-phase, high- performance liquid chromatography (HPLC) as described in Head and Horne (1993). Frozen filters were homogenized in 1.5-ml 90% acetone, centrifuged and diluted with 0.5 M ammonium acetate buffer at a ratio of 2:1 before injection. Pigments were identified by comparing their retention times and absorption characteristics with standard solutions of purified pigments: chlorophyll a, chlorophyll b, alloxanthin, fucoxanthin, peridinin, 19-hexanoyloxyfucoxanthin.

Synechococcus and unclassified phytoplankton

Red autofluorescing cells were enumerated by flow cytometric analysis (Becton Dickinson FACSORT) of cryogenically preserved samples (1% paraformaldehyde, -70°C) according to Li (1995). Synechococcus were identified as red

autofluorescing picoplankters (<2 µm) that were also orange autofluorescing. All other red autofluorescing cells (without orange fluorescence) were deemed to be phytoplankton but remain unclassified by taxonomic affiliation. For these cells, measurements of forward light scatter per cell allow an estimate to be made of the mean equivalent spherical diameter (ESD, µm) as a characteristic of the assemblage. Abundance of *Synechococcus* and unclassified phytoplankton are reported as cells mL⁻¹.

Diatoms, dinoflagellates and silicoflagellates

Phytoplankton were fixed in acid Lugol's solution (Thronsdon 1978). Microscope slides were prepared by the filter-transfer-freeze method (Hewes and Holm-Hansen, 1983; Hewes et al. 1984) as modified by Pauley (1989). In essence, 10 mL of phytoplankton sample was filtered onto a 25 mm polycarbonate filter which was then placed sample-side down onto a drop of water in the centre of a wax ring on a microscope slide. The slide-filter combination was frozen at -20°C, after which the filter was smoothly peeled off and a cover-slip sealed over the sample. Slide preparation, taxonomic identification and cell enumeration were all performed by K. Pauley (Botanico Services, New Brunswick).

http://www.sb-roscoff.fr/Phyto/cyto_examples.html

A few examples of the analysis of picoplankton populations by flow cytometry

by. D. Marie, Station Biologique, Roscoff

November 1998

Phytoplankton

The combined analysis of the light-scattering parameters and of the fluorescence of natural photosynthetic pigments (chlorophyll, phycoerythrin) allows the identification of different groups that differ in terms of size and pigment contents. Subpopulations of picoplankton are interactively defined with gates and identified by the combination of all recorded parameters. The *Synechococcus* population (Syn, green) is discriminated from other phytoplankters by its orange fluorescence (due to the presence of phycoerythrin) on the orange versus red fluorescence cytogram (C). *Prochlorococcus* cells (Proc, red) that are smaller and less fluorescent are distinguished from picoeukaryotes (Euk, blue) on the bivariate distribution of the Forward and Side Scatters (as a function of size) versus red fluorescence (A and B).

Bacteria

Flow cytometric analysis of bacteria, that have generally a very low DNA content and that have no pigments, requires the combination of highly fluorescent stains and sensitive instruments. Initially the UV-excited dyes DAPI or Hoechst

33342 have been used for this purpose. Recently, blue-excited dyes such as YOYO-1, PicoGreen or SYBRTM Green-I have been introduced that make this type of analysis possible on small low-cost flow cytometers (laser line = 488 nm). Each cell has an intensity of fluorescence that is assumed to be proportional to its DNA content. The coastal waters are dominated by the bacteria that have a higher DNA content (Fig. A) while the small bacteria are more abundant in the oligotrophic waters (Fig. B).

Viruses

Viruses infecting algae and bacteria, constitute the most abundant group of nucleic acids-containing particles in the ocean with concentration ranging from 10⁵ to 10⁸ ml⁻¹. Analysis of natural samples from different oceanic regions ranging from mesotrophic to oligotrophic conditions revealed two or three populations of SYBR-I stained particles clearly above background but with much lower fluorescence than that usually displayed by bacteria. These virus populations (V-I and V-II) seem to be ubiquitously present in oceanic samples from very different environments. In the mesotrophic English Channel, we found 20 times more viruses than bacteria and 10 fold more V-II than V-I viruses. The analysis of a depth profile in the Mediterranean Sea revealed that the abundance of virus particles displayed the same vertical trend as bacteria and phytoplanktonic cells.

Probes targeted to 18S rRNA

The taxonomy of small eukaryotic picoplankton is still poorly known. Most species have very few morphological features and can hardly be discriminated, even at the class level, by classical methods such as optical microscopy. Fluorescent oligonucleotide probes targeted to 18S rRNA appear as very promising tools for this purpose, allowing the identification of specific groups within complex communities. From knowledge of the ribosomal DNA sequences of microorganisms, nucleic acid probes specific for taxa can be designed. They are complementary to a region of the ribosomal RNA molecule which is unique to the target group and can be used as "phylogenetic stains" once they have been labeled with a fluorochrome. Oligonucleotide probes will hybridize to their homologous strand on the rRNA molecule within preserved cells. Labeled cells are detected by the probe-conferred fluorescence. Cells are discriminated on SSC versus green fluorescence (FITC) cytograms

Evaluatie van flowcytometrie fytoplanktonmonitoring 2000

(BIJLAGEN-RESULTATEN-VERSLAG)

Opdrachtgever : ITB en ITL intern
*Project : BIOMON & TNW*Millab*
Uitgevoerd door : Angelo Hofman, Ben Sandee en Thomas Rutten

Inhoud

Dit bijlagenverslag behoort bij het rapport "Evaluatie van flowcytometrie fytoplanktonmonitoring 2000" (RIKZ/2001.034). In dit werkdocument wordt uiteen gezet wat de prestaties waren van de flowcytometrie t.a.v. de monitoringsmonsters in het jaar 2000. Voor de duidelijkheid zijn hiervoor hoofdzakelijk gegevens van de lokatie Noordwijk 10 gebruikt. Door een geautomatiseerde verwerking van de gegevens zijn ook voor de andere lokaties mogelijkerwijs interessante grafieken gegenereerd. Deze grafieken worden in dit bijlagenverslag gepresenteerd, maar niet verder geëvalueerd.

In dit bijlagen verslag worden flowcytometrische gegevens (2000) gepresenteerd van de onderstaande lokaties;

	Blz.
• SCHAARVODDL (Westerschelde) -----	3
• VLISSGBISSVH (Westerschelde) -----	9
• ZIJPE (Oosterschelde) -----	15
• NOORDWK2 (Noordzee) -----	22
• NOORDWK10 (Noordzee) -----	28
• TERSLG135 (Noordzee) -----	34
• Oppervlakte -----	34
• Spronglaag -----	40
• Bodem + 3 m -----	44

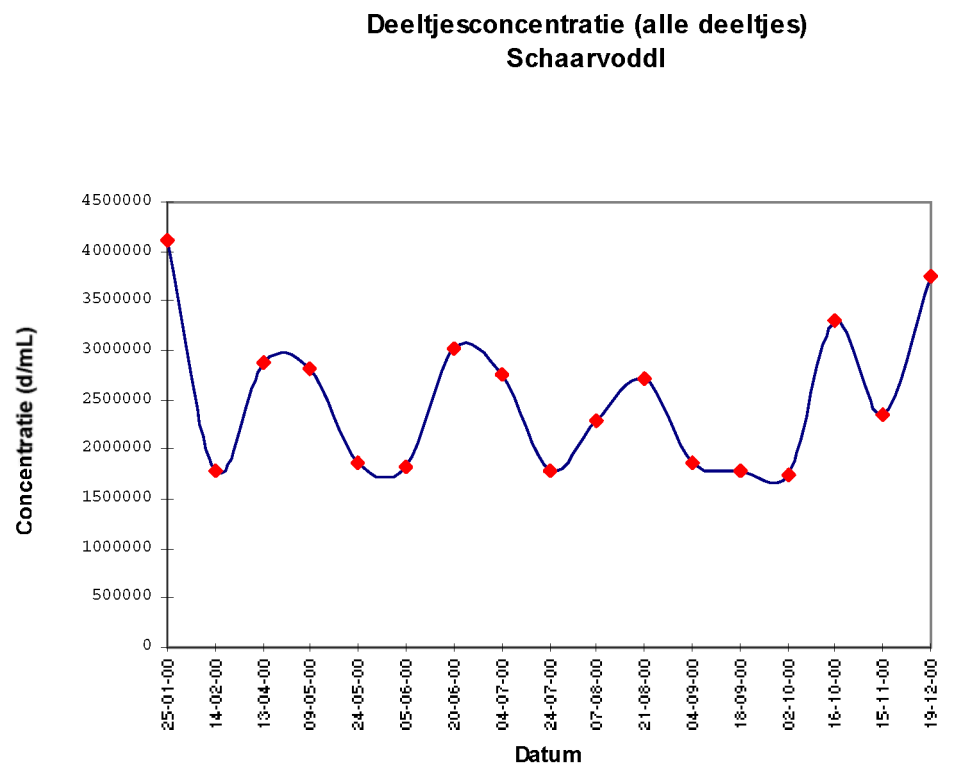
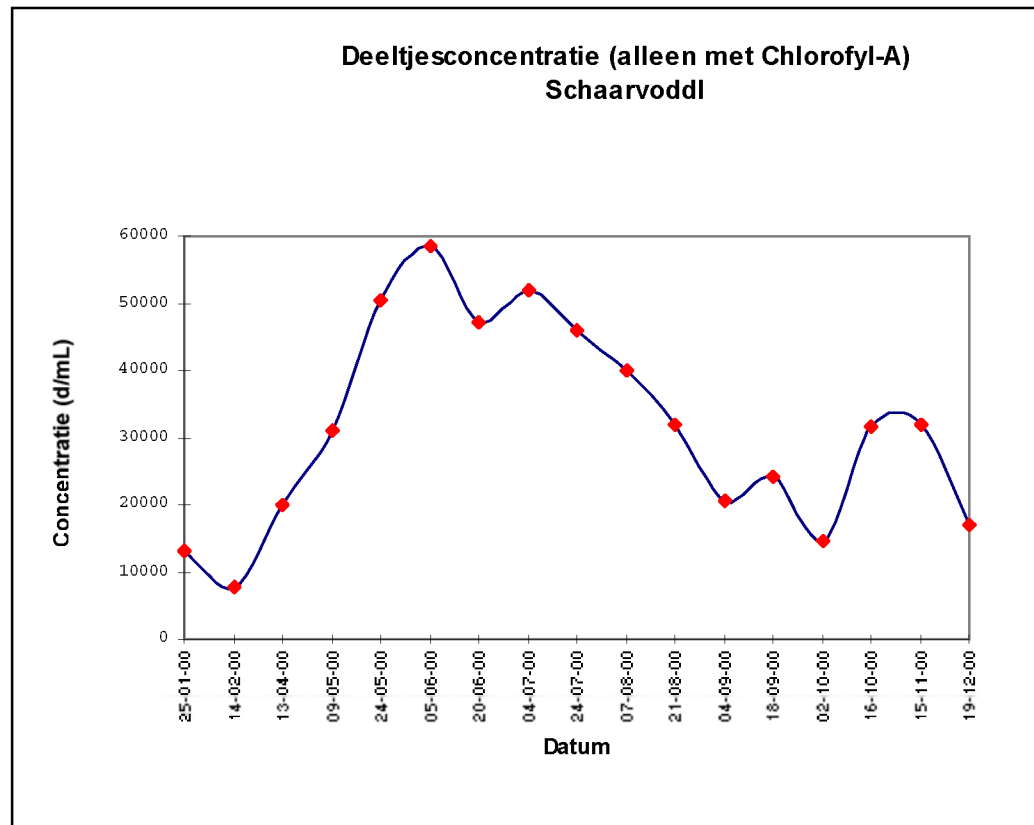
De gegevens worden per lokatie gepresenteerd in de onderstaande grafiekvormen;

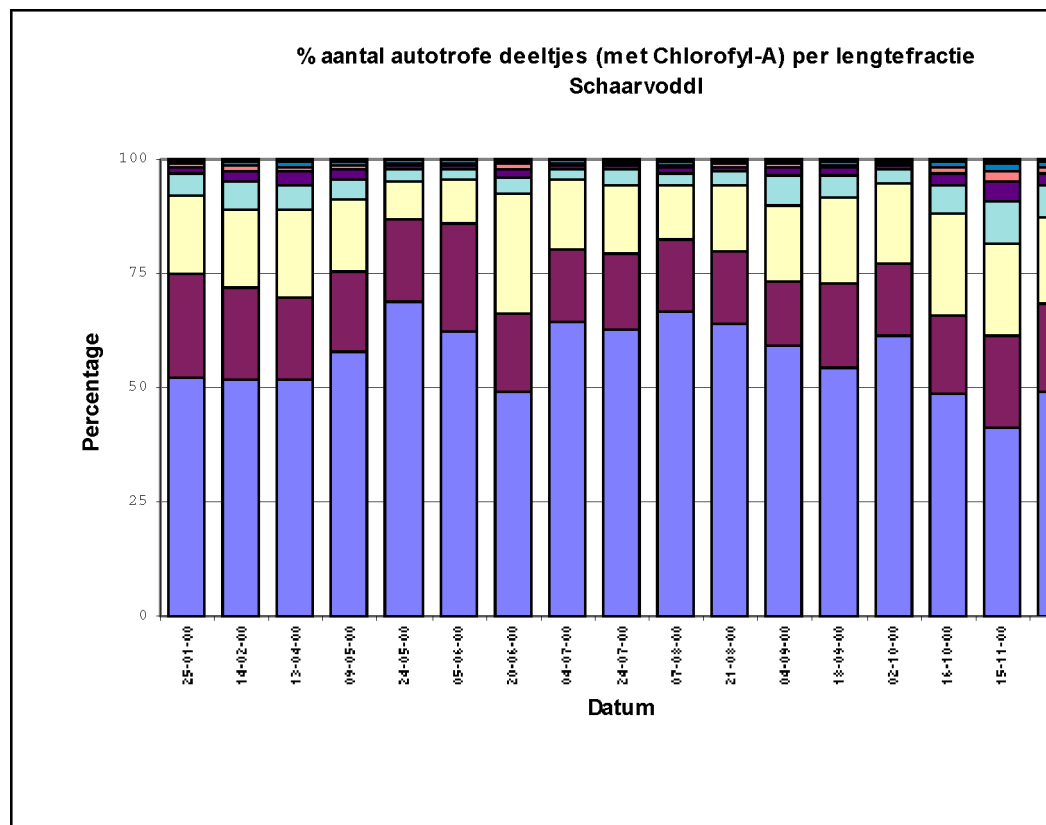
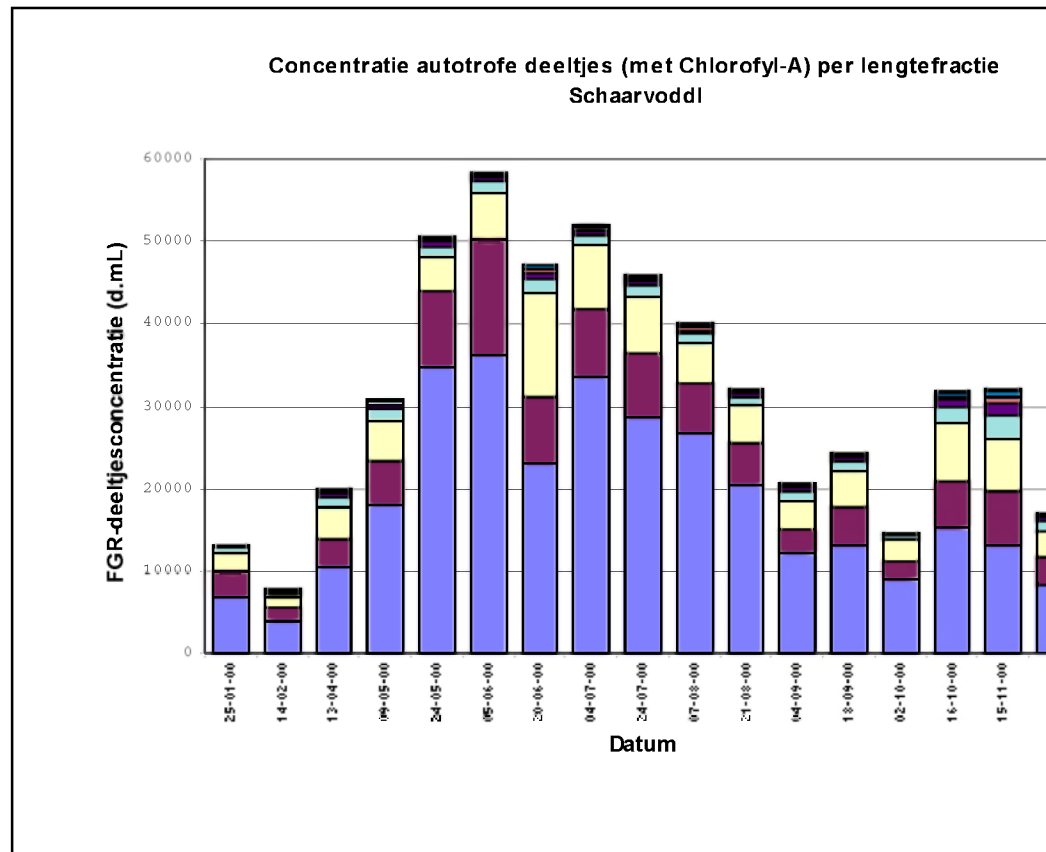
- de totaalconcentraties van alle deeltjes van ca 0,5-1000 μm (n/ml)
- de totaalconcentraties van deeltjes met chlorofyl-a (n/ml)
- de concentraties van deeltjes met chlorofyl-a uitgesplitst in 16 groottefracties (n/ml.fractie)
- de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentraties van deeltjes met chlorofyl-a uitgesplitst in 16 groottefracties ($\% \text{ n.fractie/n}_{\text{totaal}}$)
- de concentraties chlorofyl-a/ml (biomassa) uitgesplitst in 16 groottefracties (linFGR/ml.fractie)
- de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentratie chlorofyl-a/ml uitgesplitst in 16 groottefracties ($\% \text{ linFGR/ml.fractie/totaal-linFGR/ml}$)
- de concentraties biovolume (van deeltjes met chlorofyl-a)/ml uitgesplitst in 16 groottefracties (linFLS/ml.fractie)
- de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentratie biovolume/ml uitgesplitst in 16 groottefracties ($\% \text{ linFLS/ml.fractie/totaal-linFLS/ml}$)

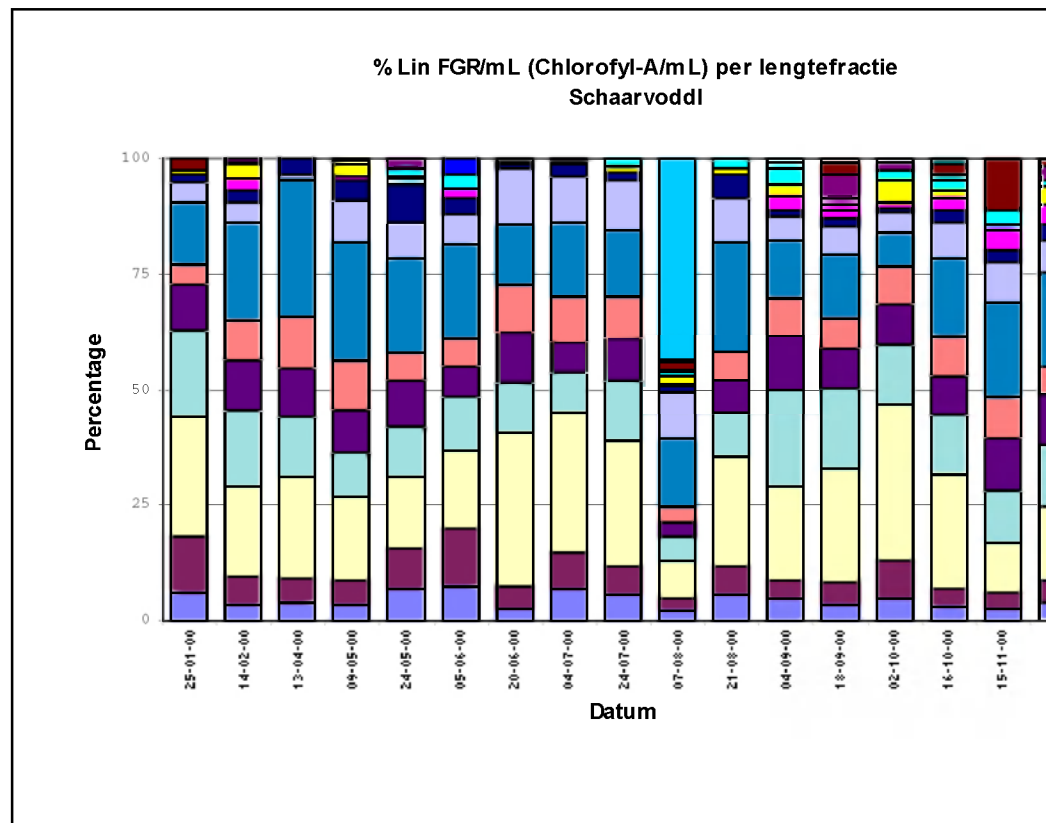
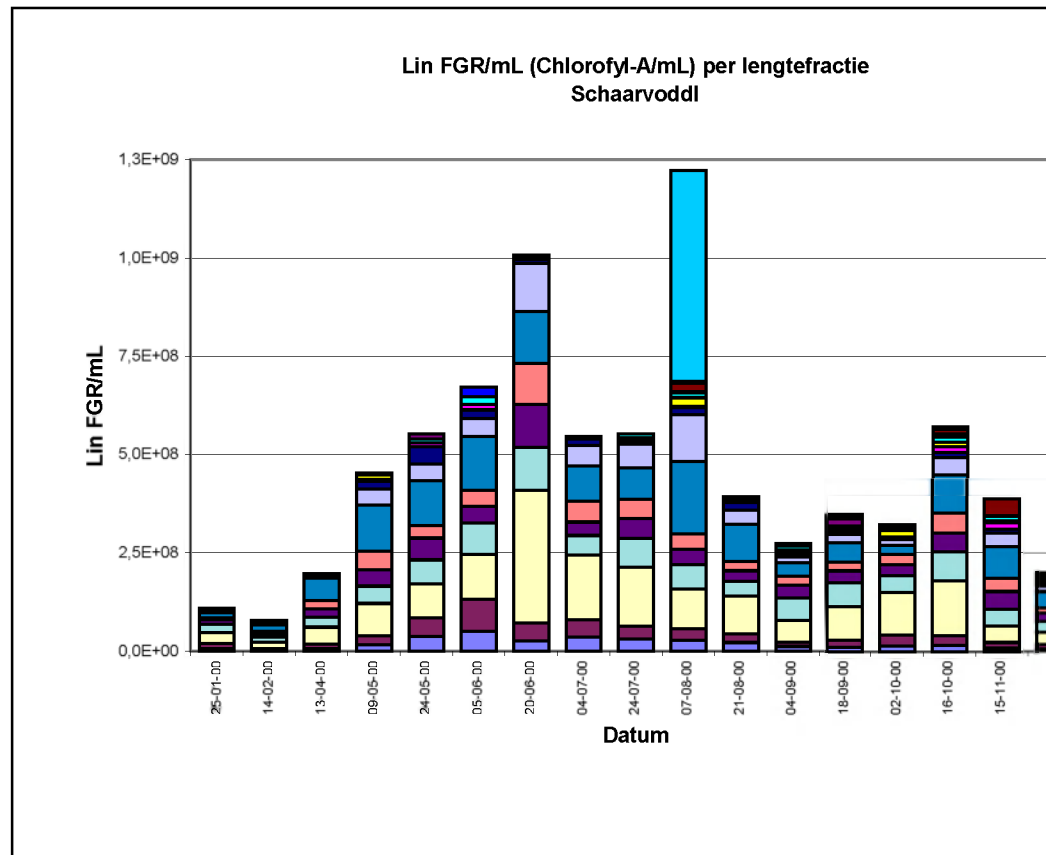
- de concentraties van deeltjes met chlorofyl-a EN fycobiliproteinen uitgesplitst in 16 groottefracties ($n_{(FGR>0 \& FGO>0)}/\text{ml.fractie}$)
- de percentuele bijdrage per fractie aan deeltjes met chlorofyl-a EN fycobiliproteinen uitgesplitst in 16 groottefracties ($\%n_{(FGR>0 \& FGO>0)}/\text{ml.fractie/totaal} - n_{(FGR>0 \& FGO>0)}/$)

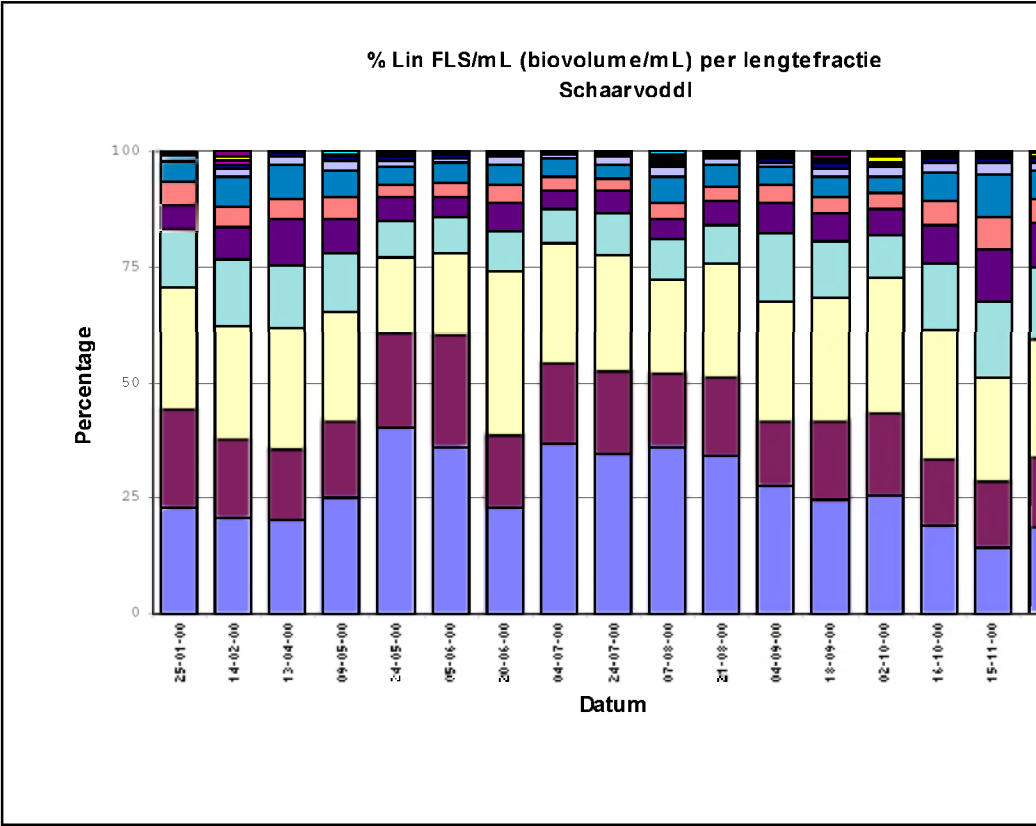
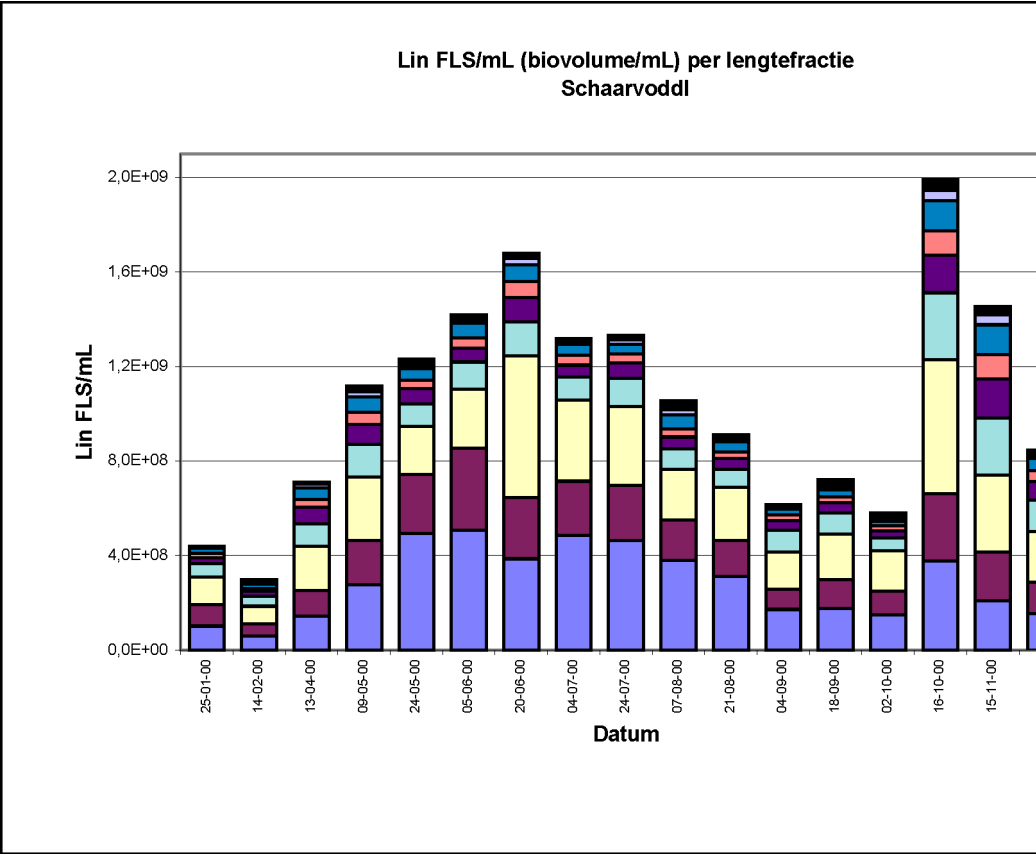
Voor een uitgebreide beschrijving wordt verwezen naar het rapport "Evaluatie van flowcytometrie fytoplanktonmonitoring 2000" (RIKZ/ 2001.034).

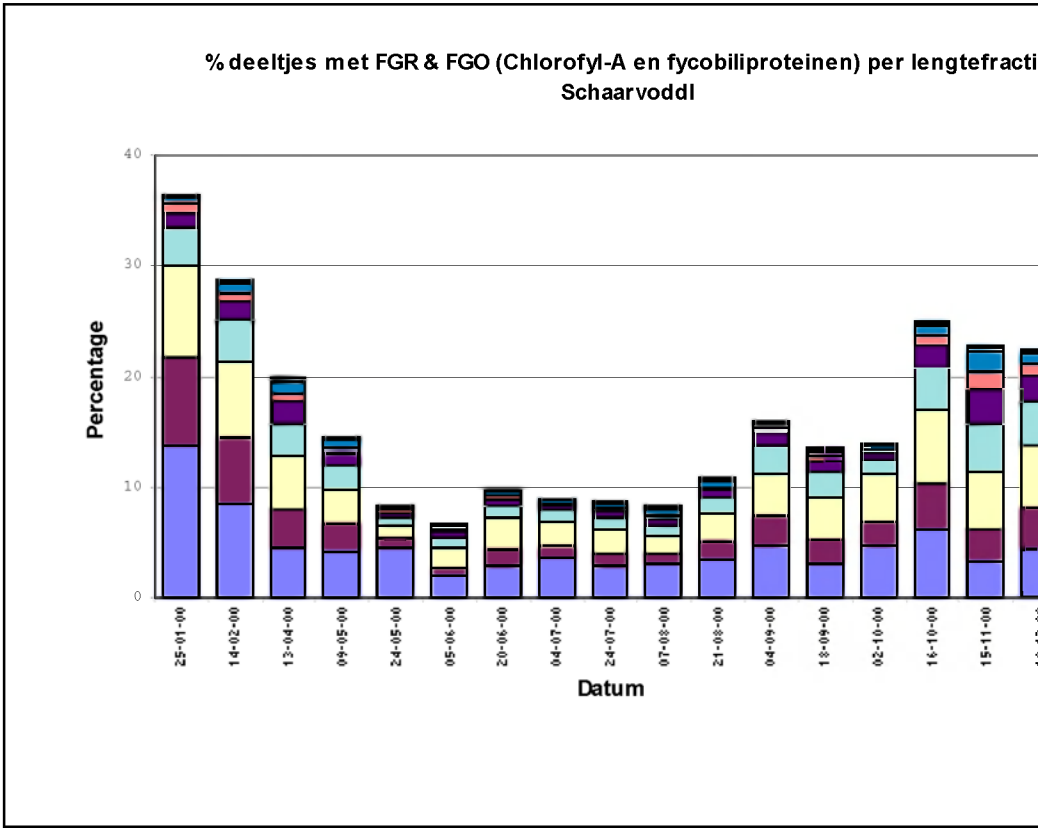
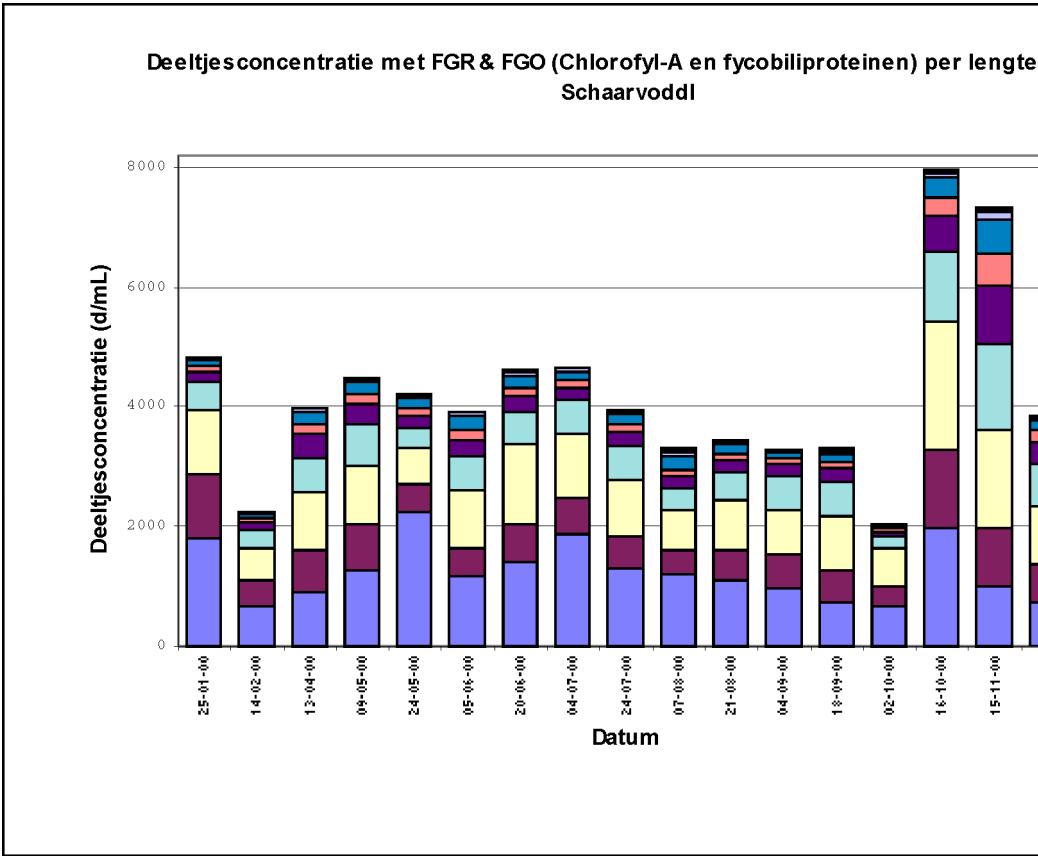
SCHAARVODDL



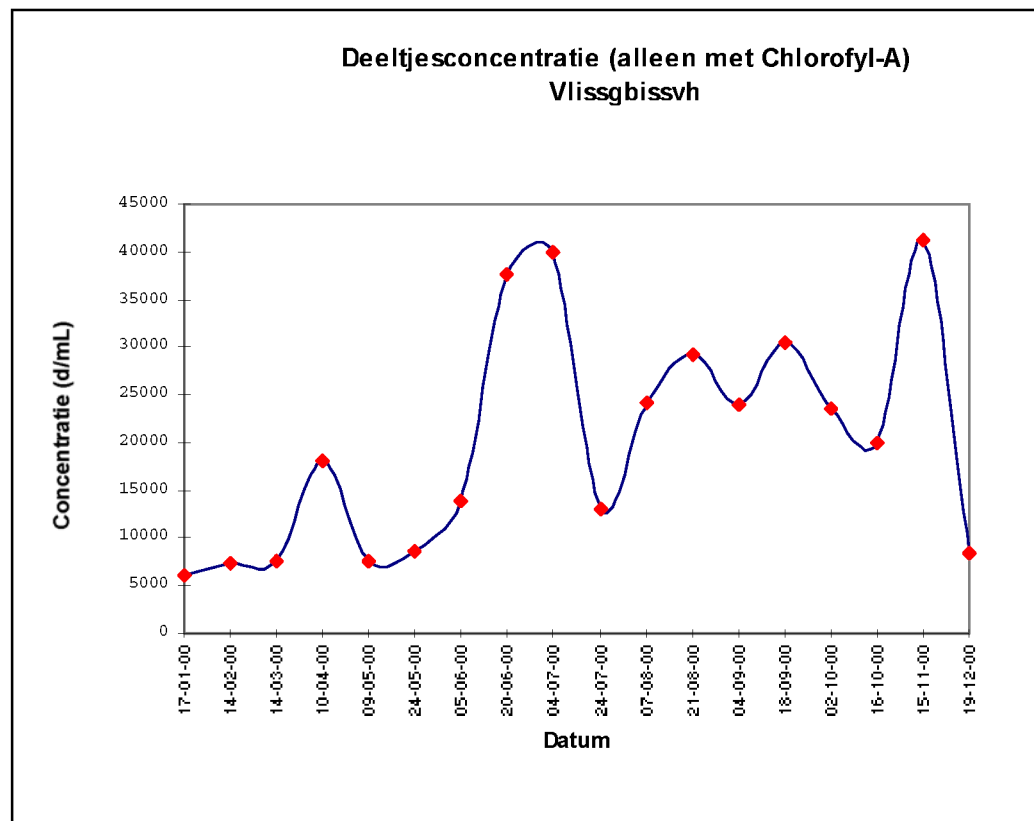




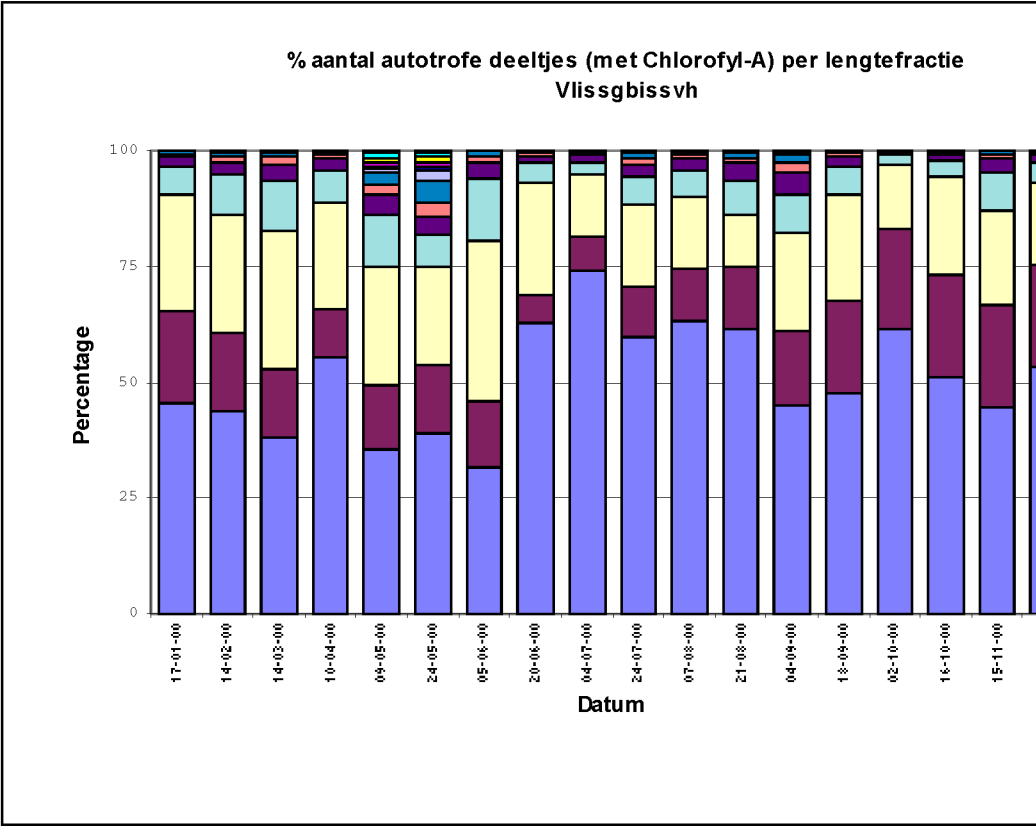
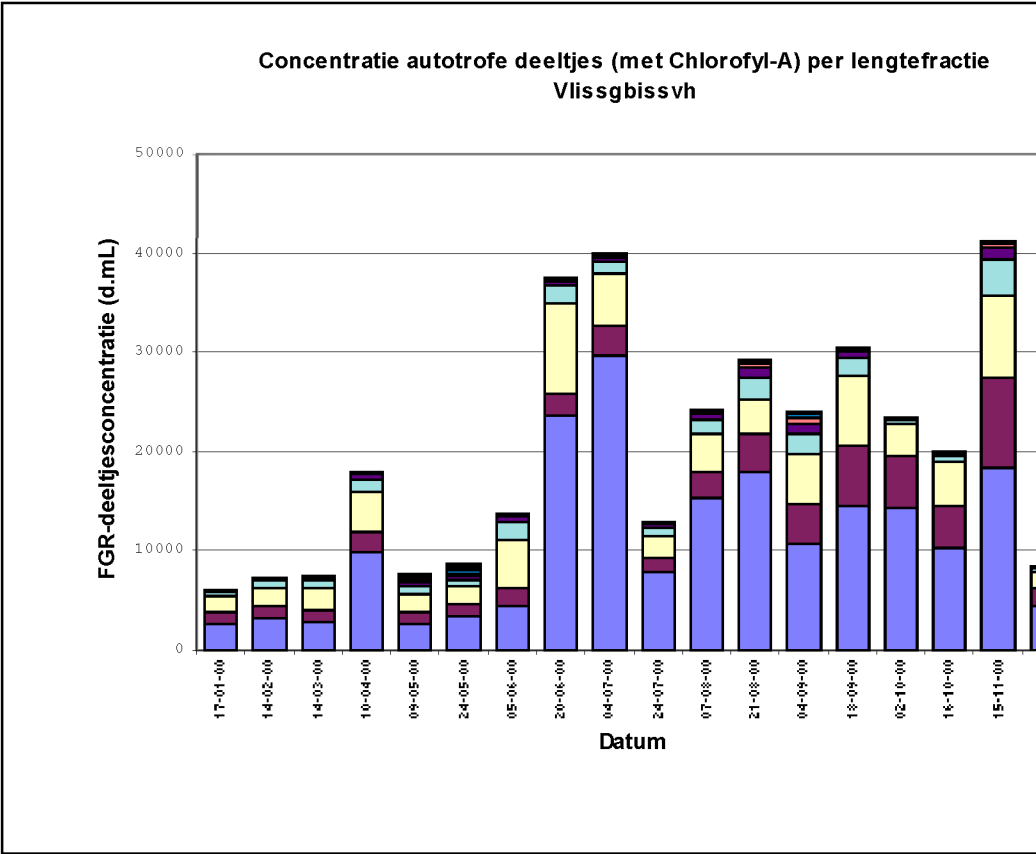


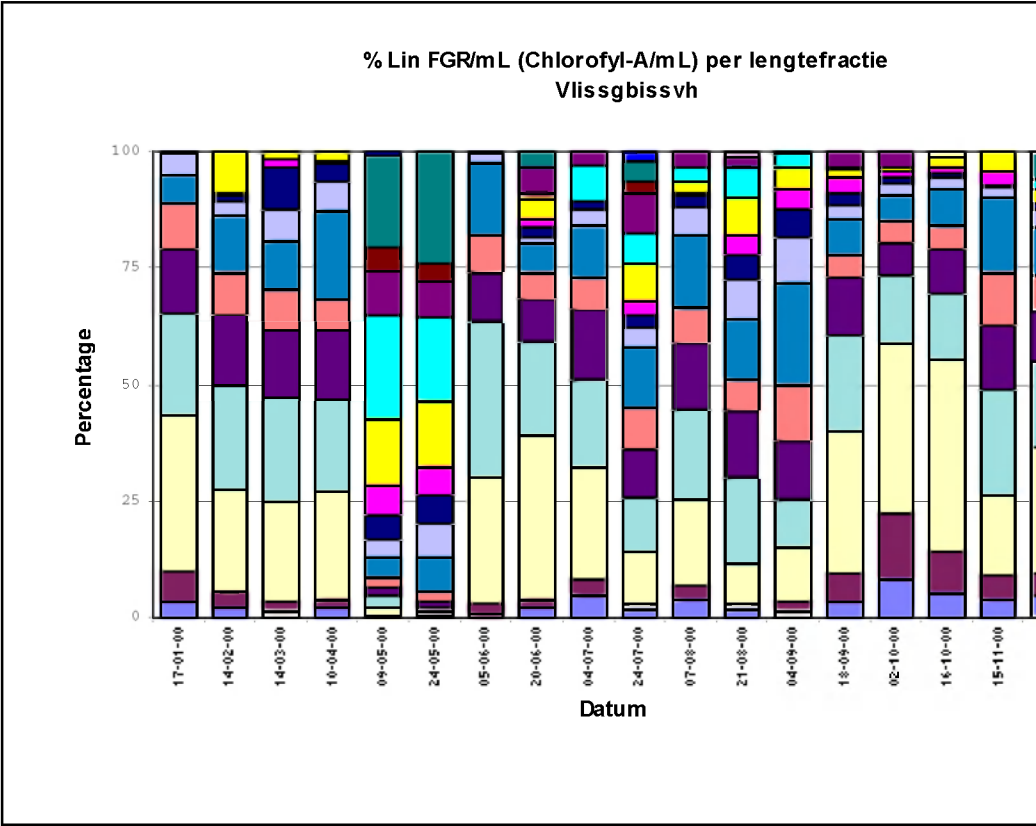
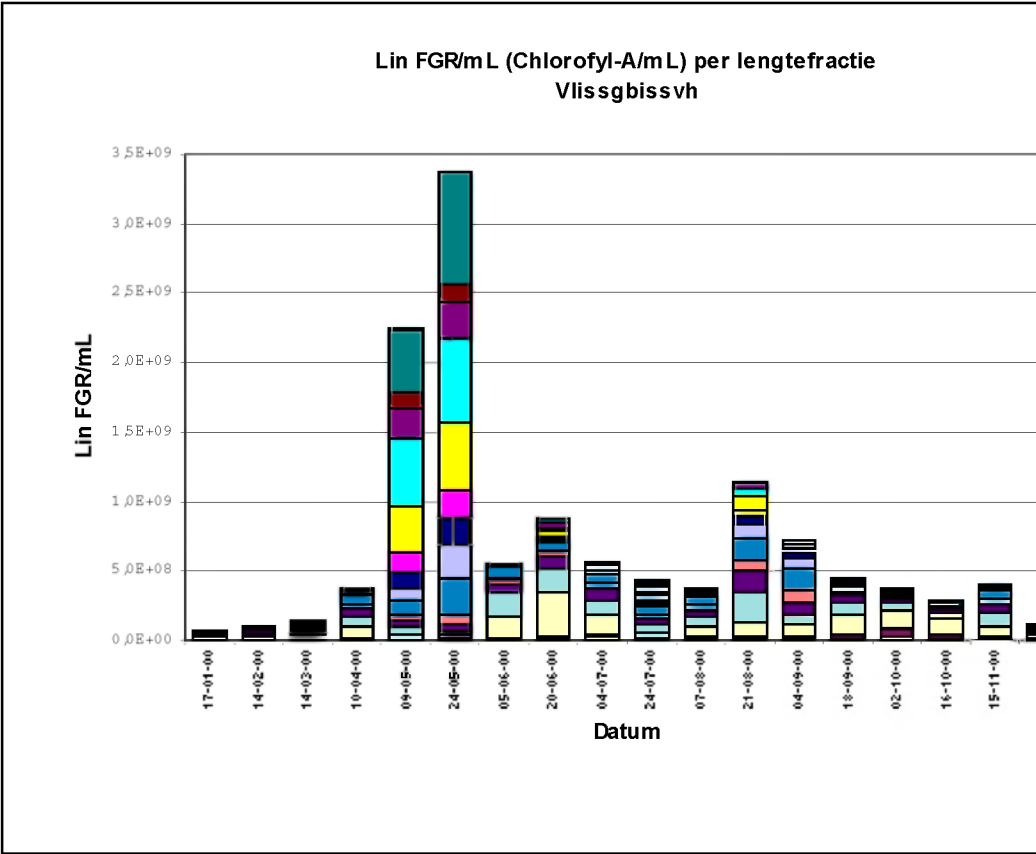


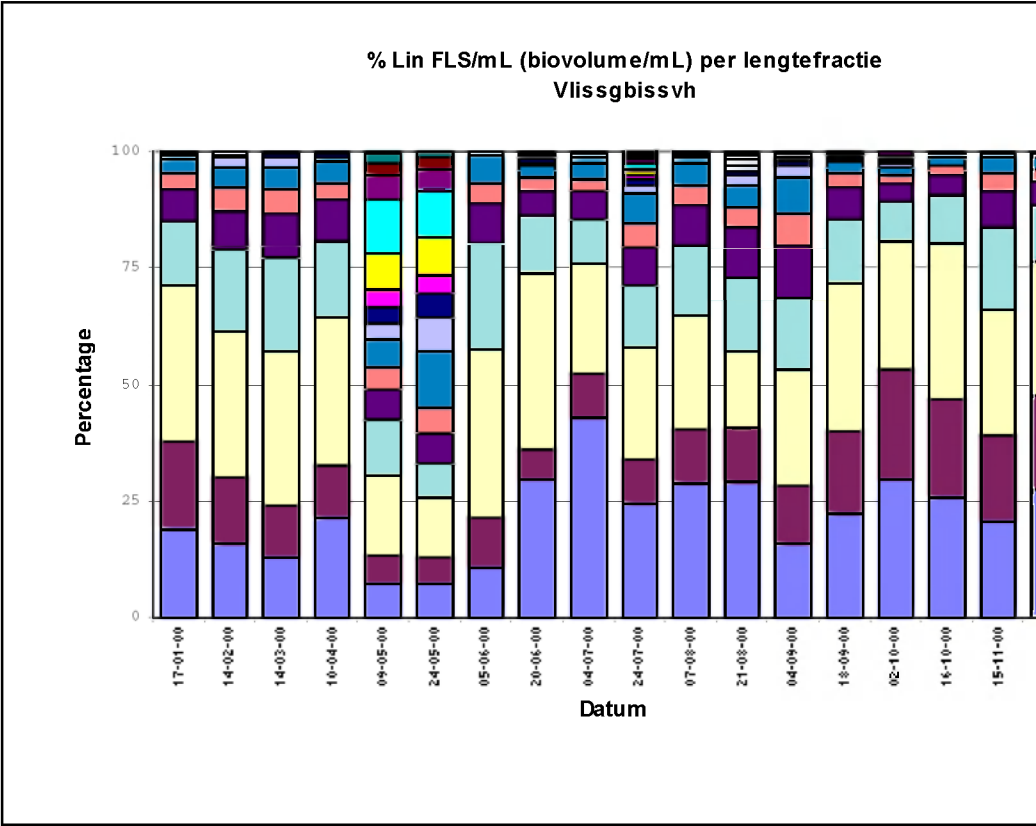
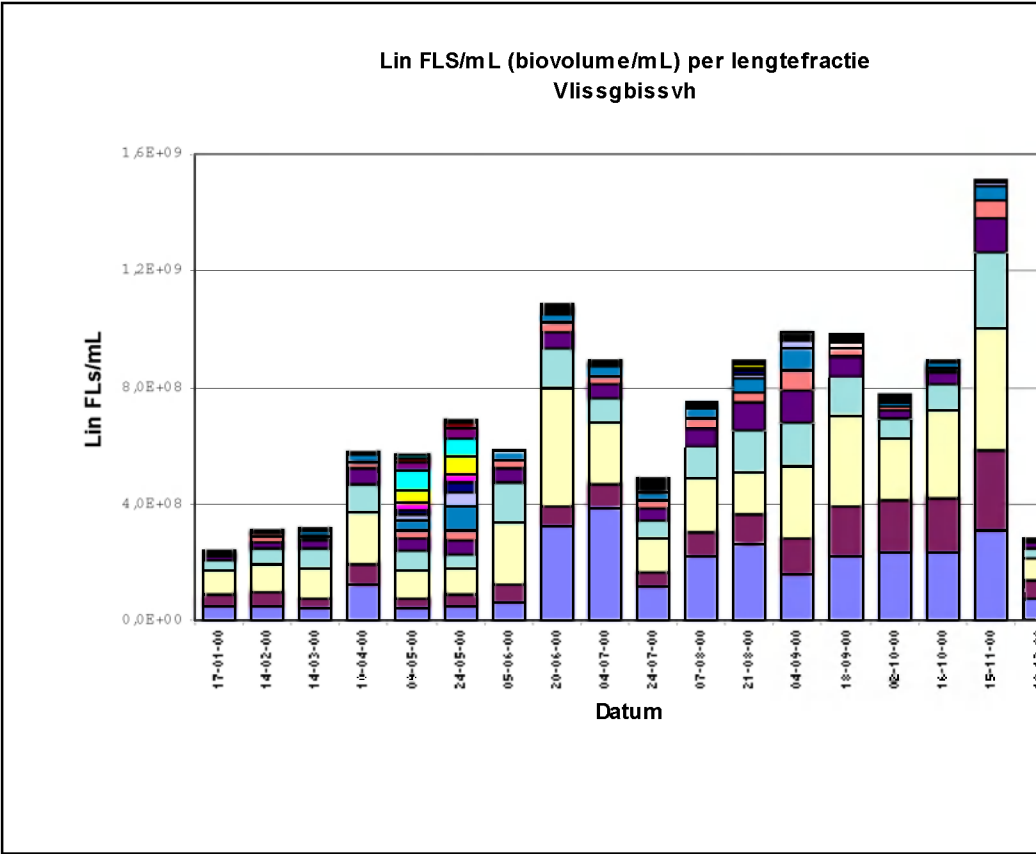
VLISSGBISSVH

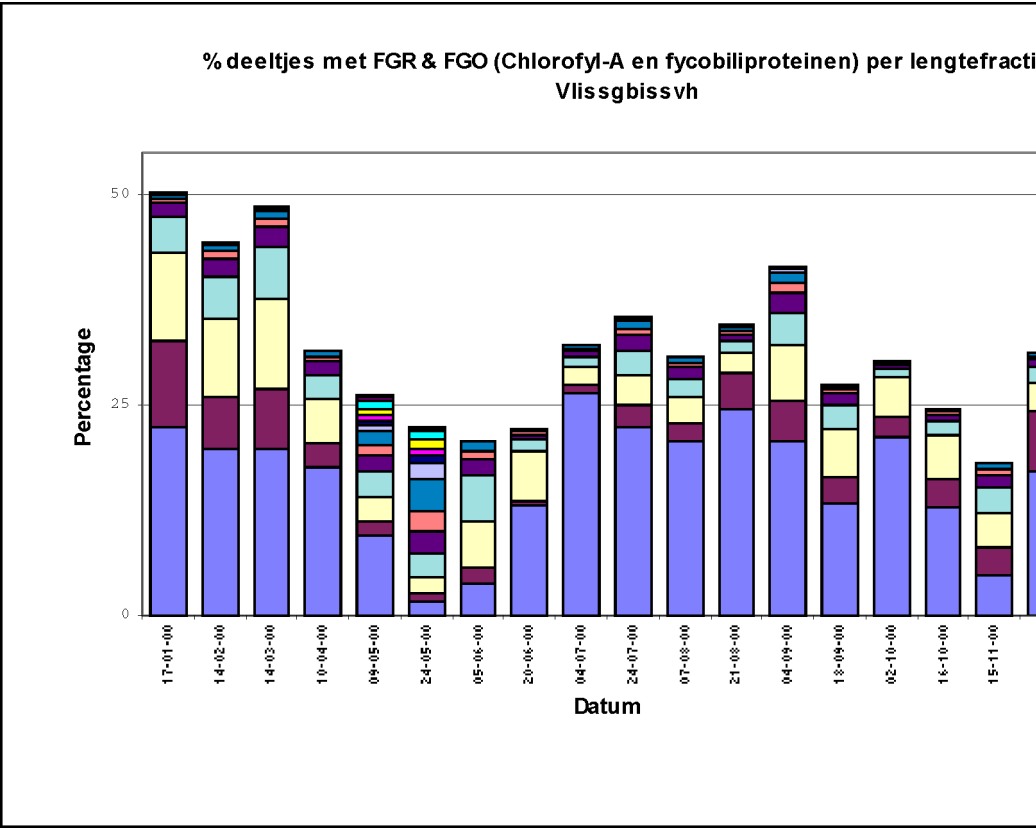
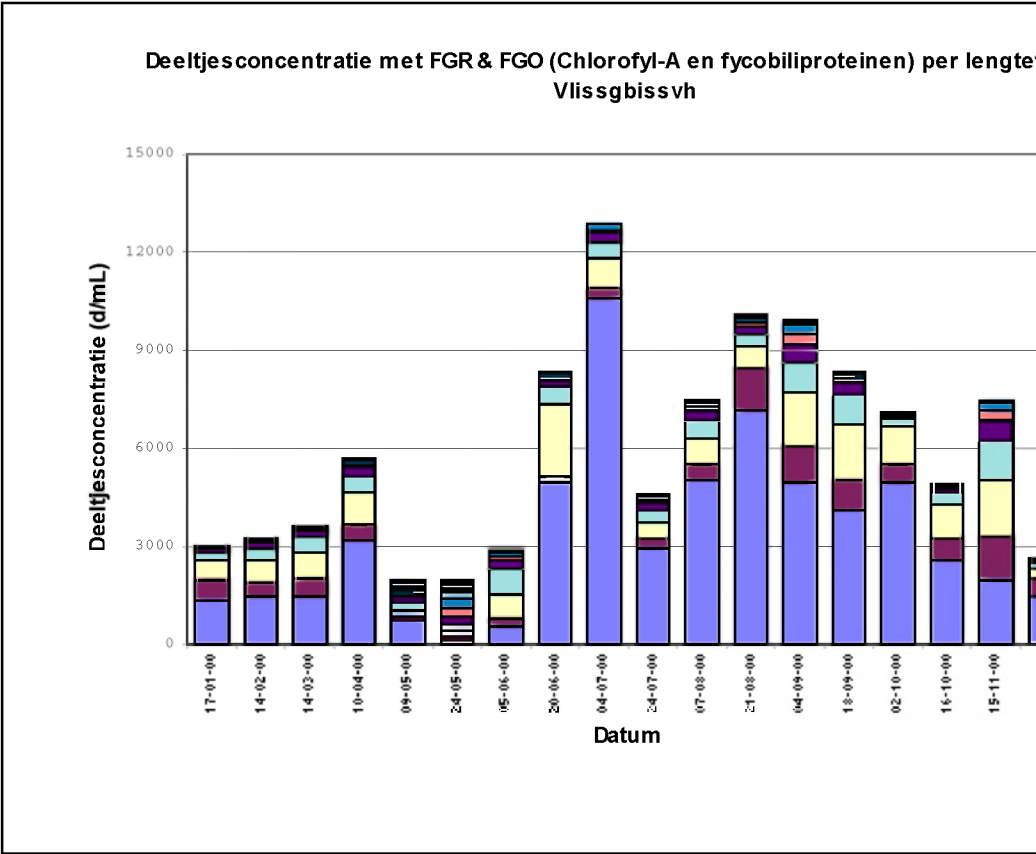


Fout! Ongeldig ingesloten object.



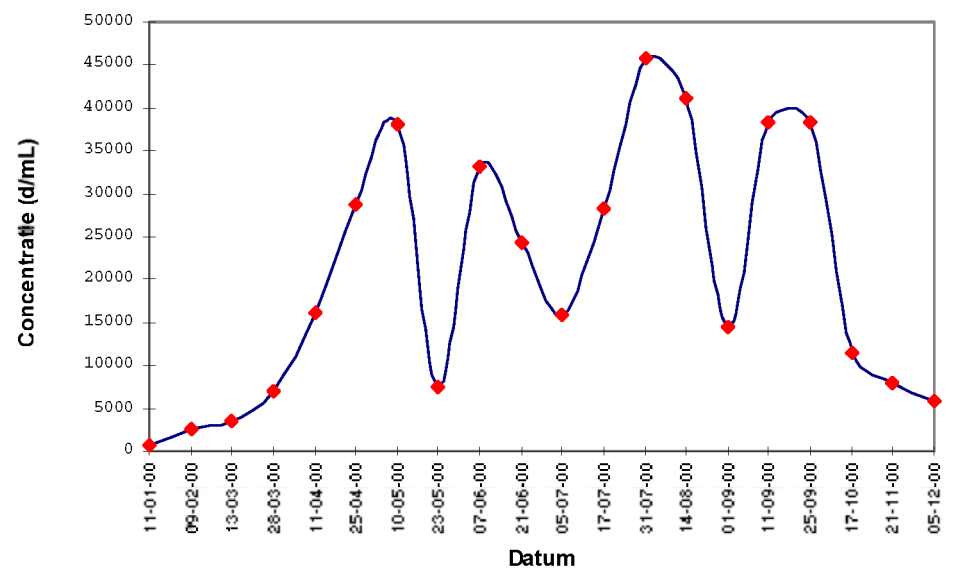




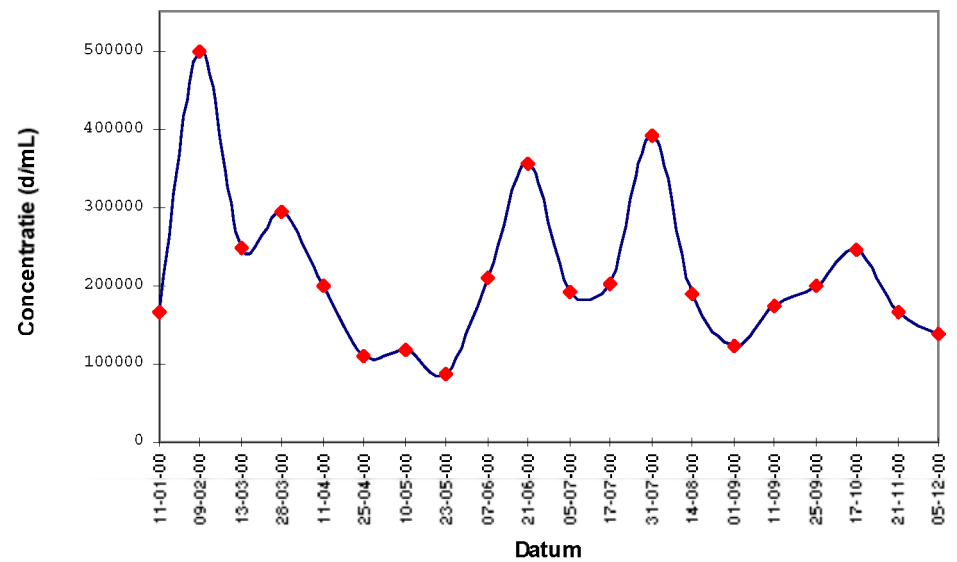


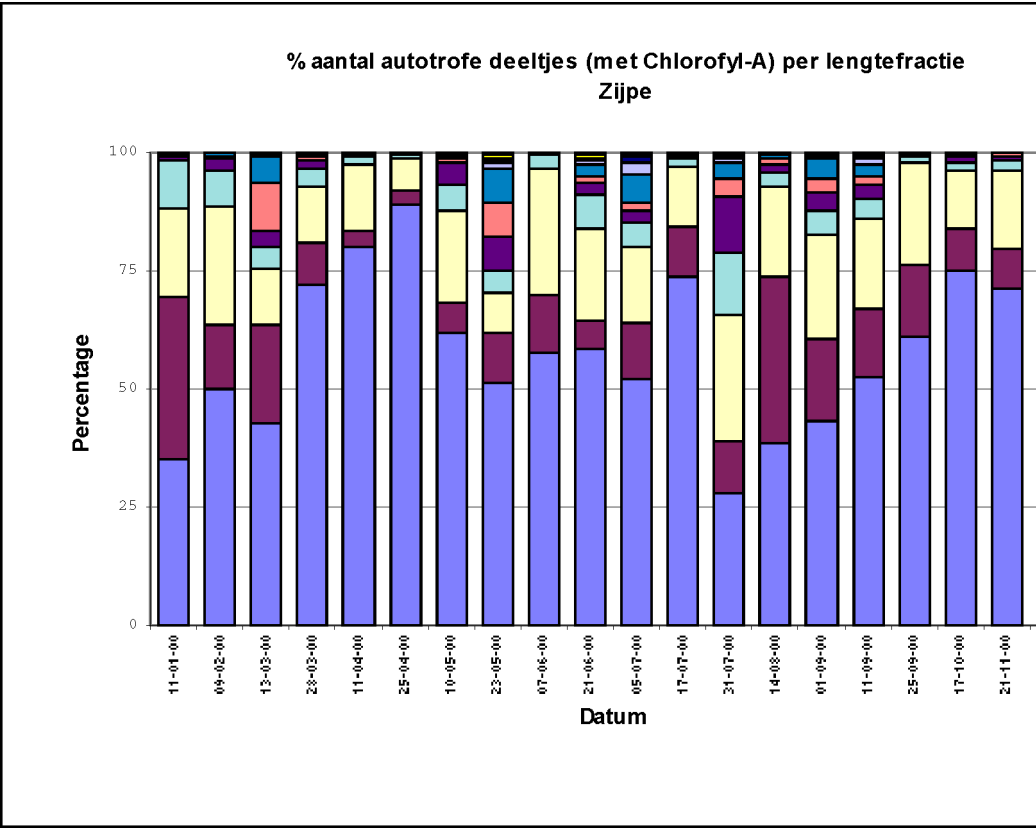
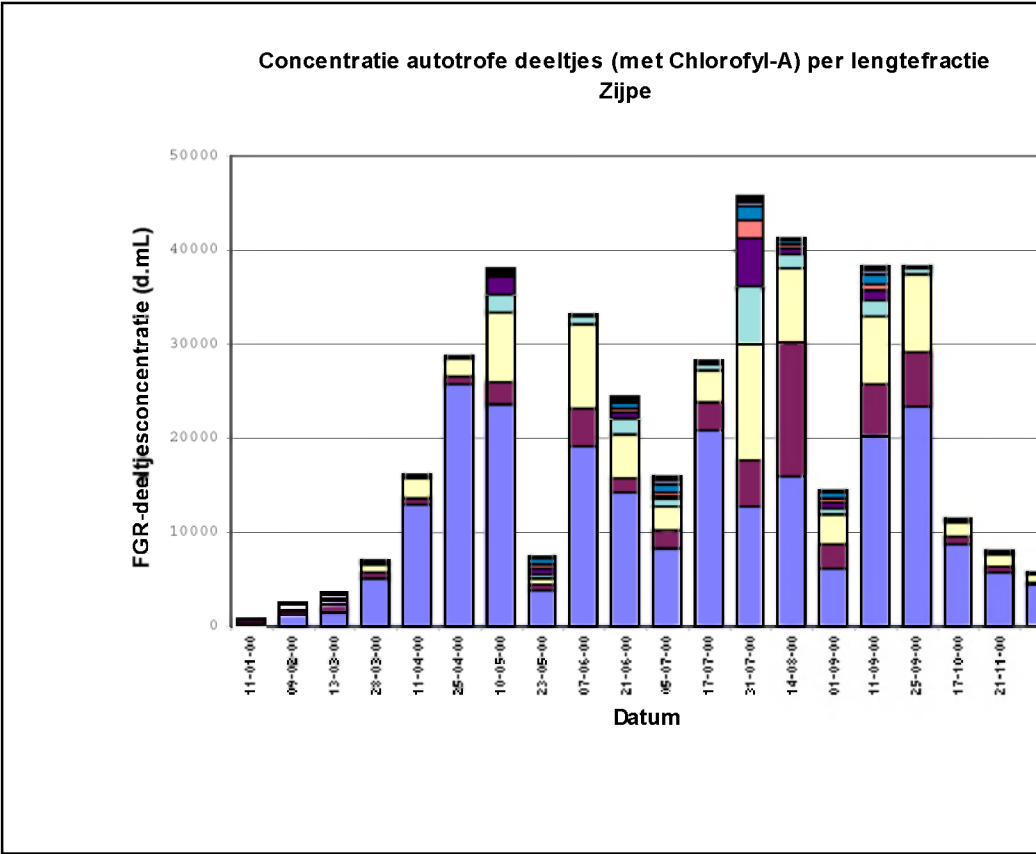
ZIJPE

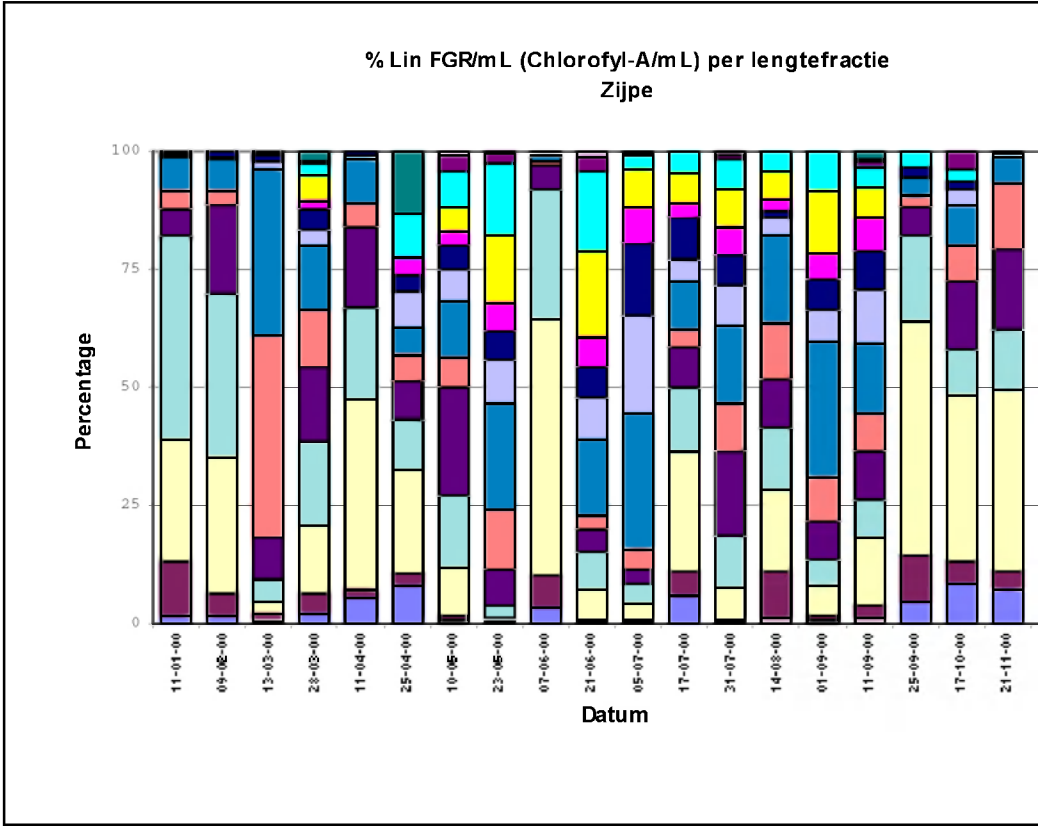
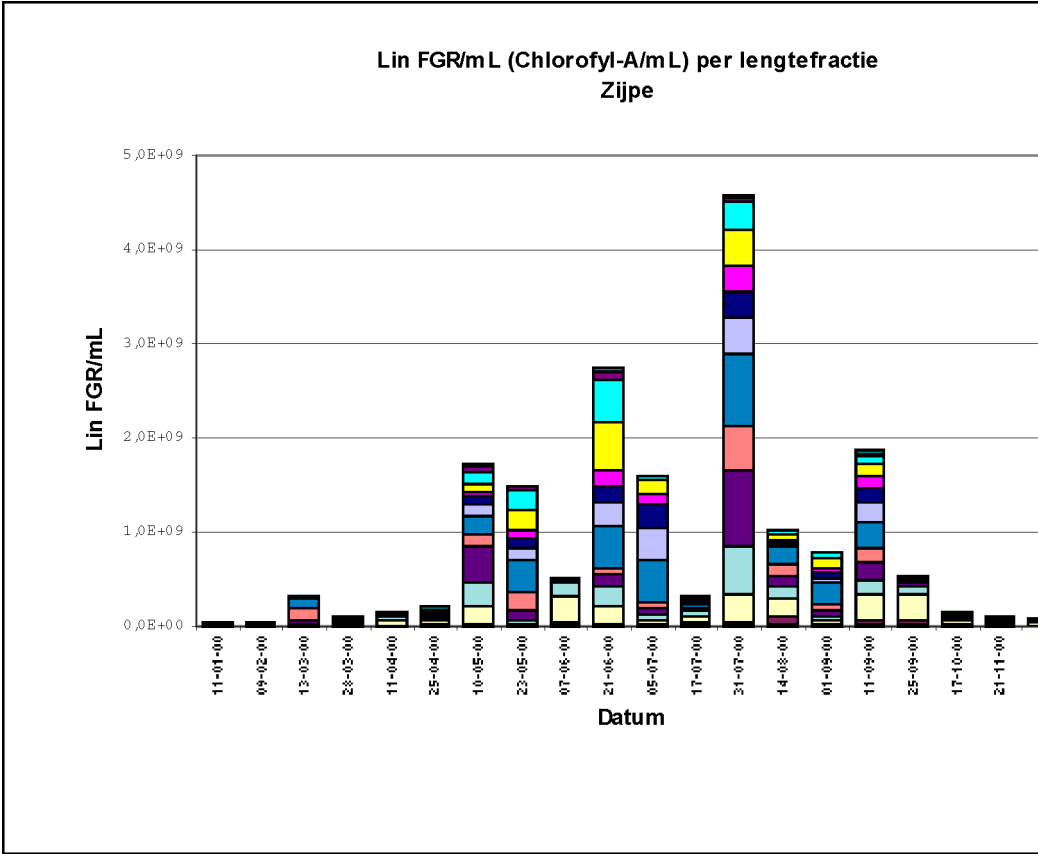
Deeltjesconcentratie (alleen met Chlorofyl-A) Zijpe

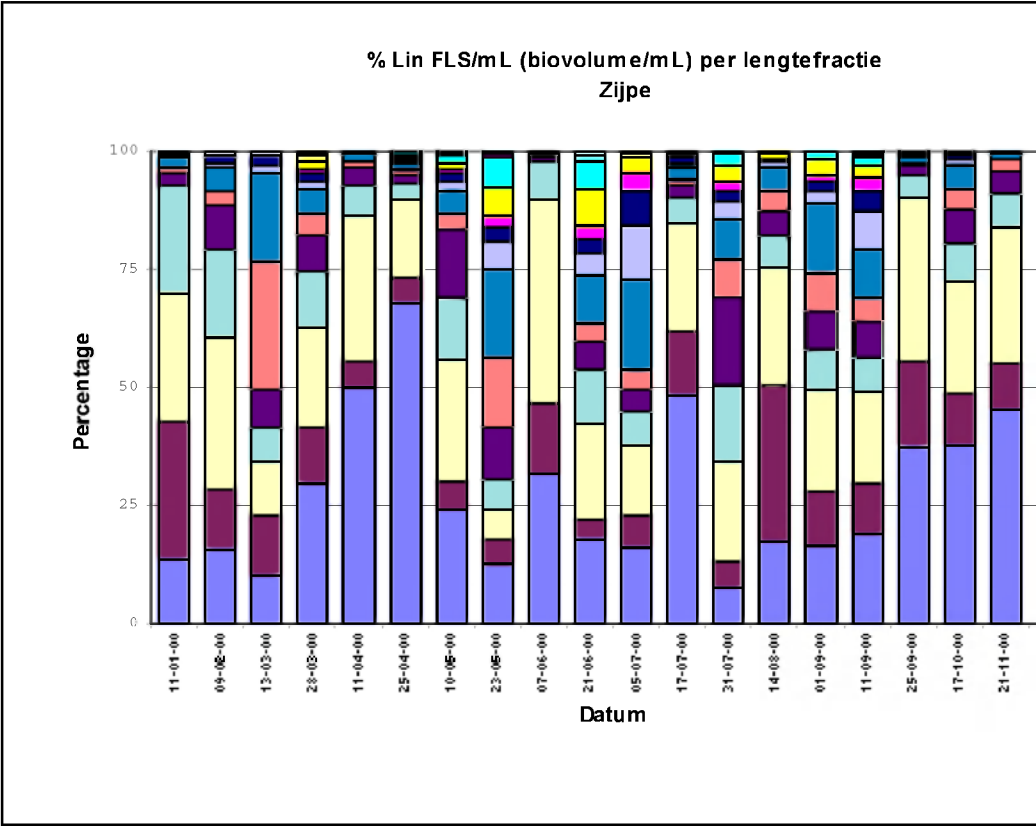
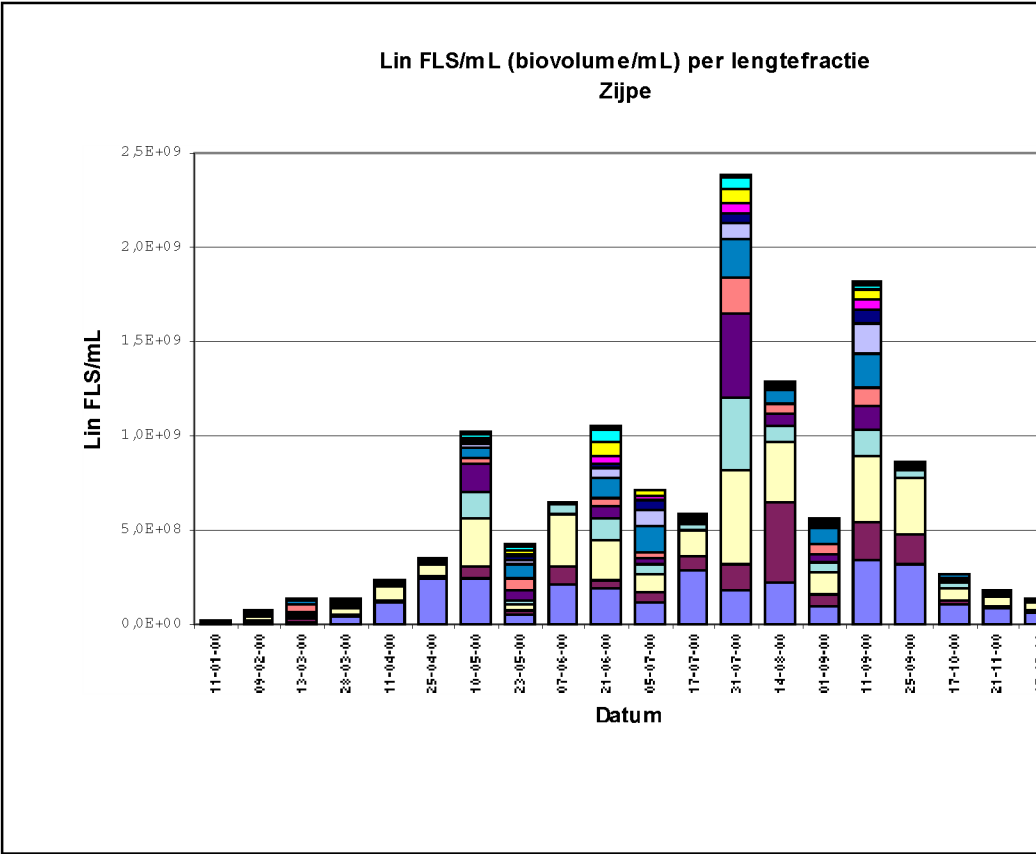


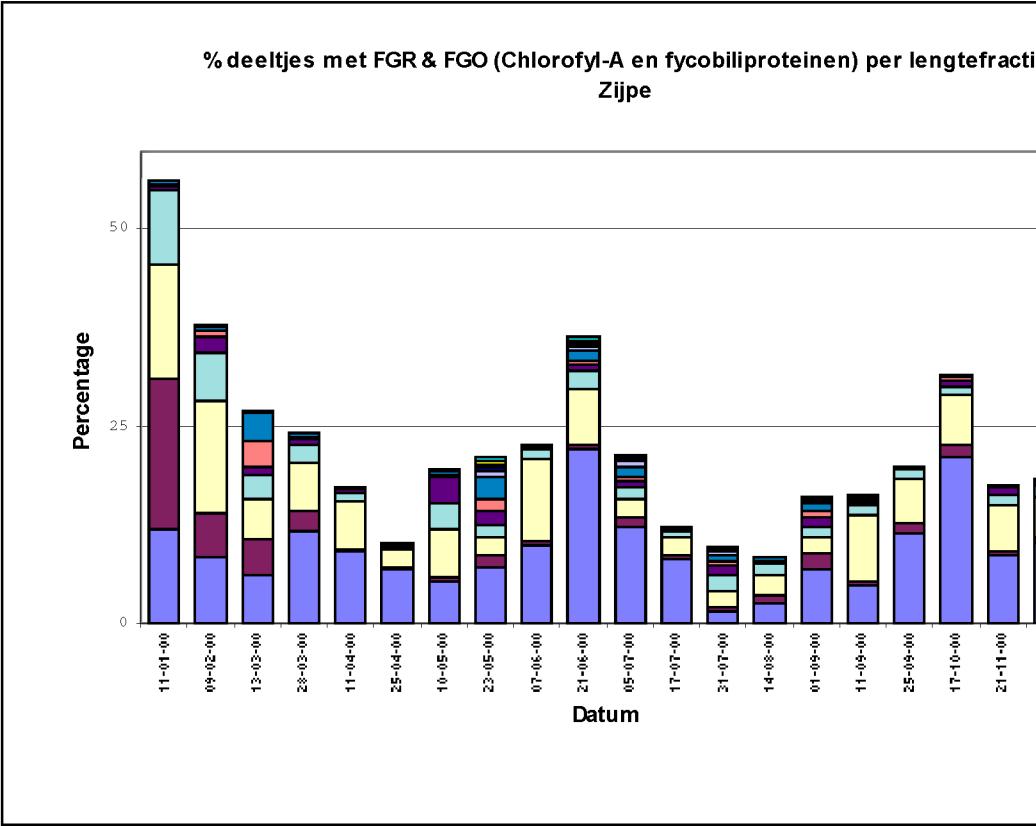
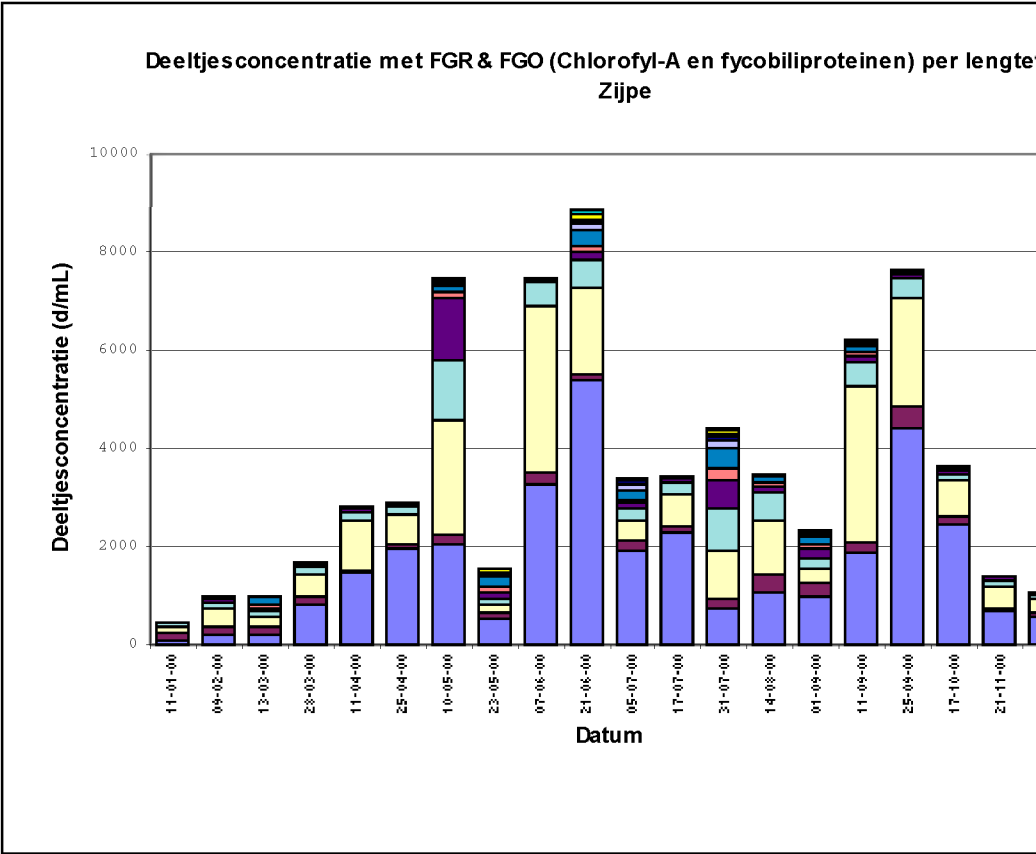
Deeltjesconcentratie (alle deeltjes) Zijpe





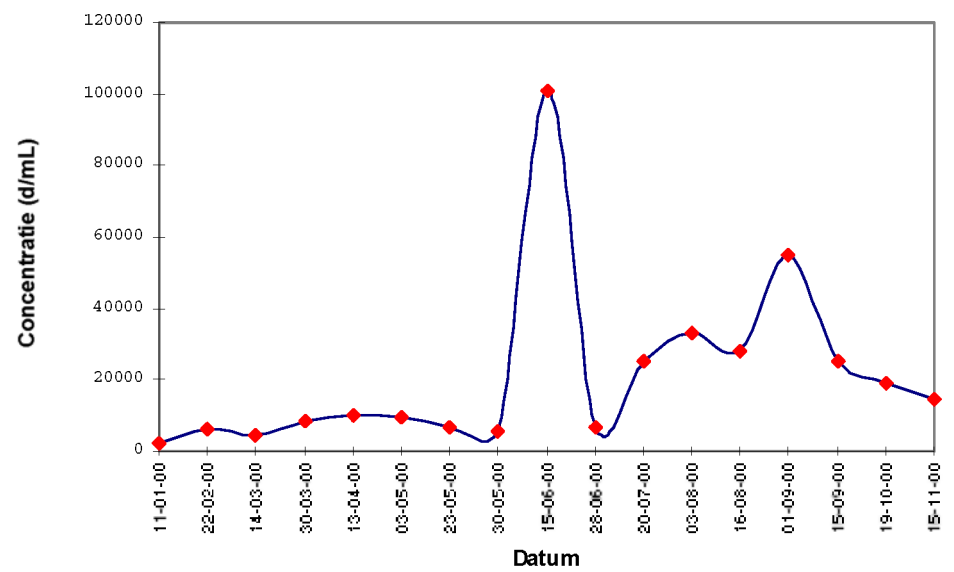




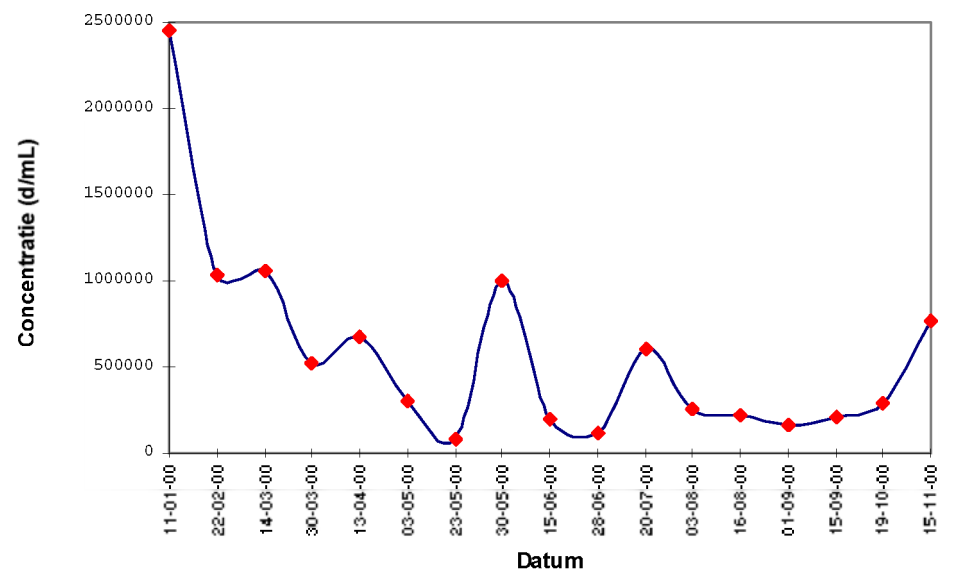


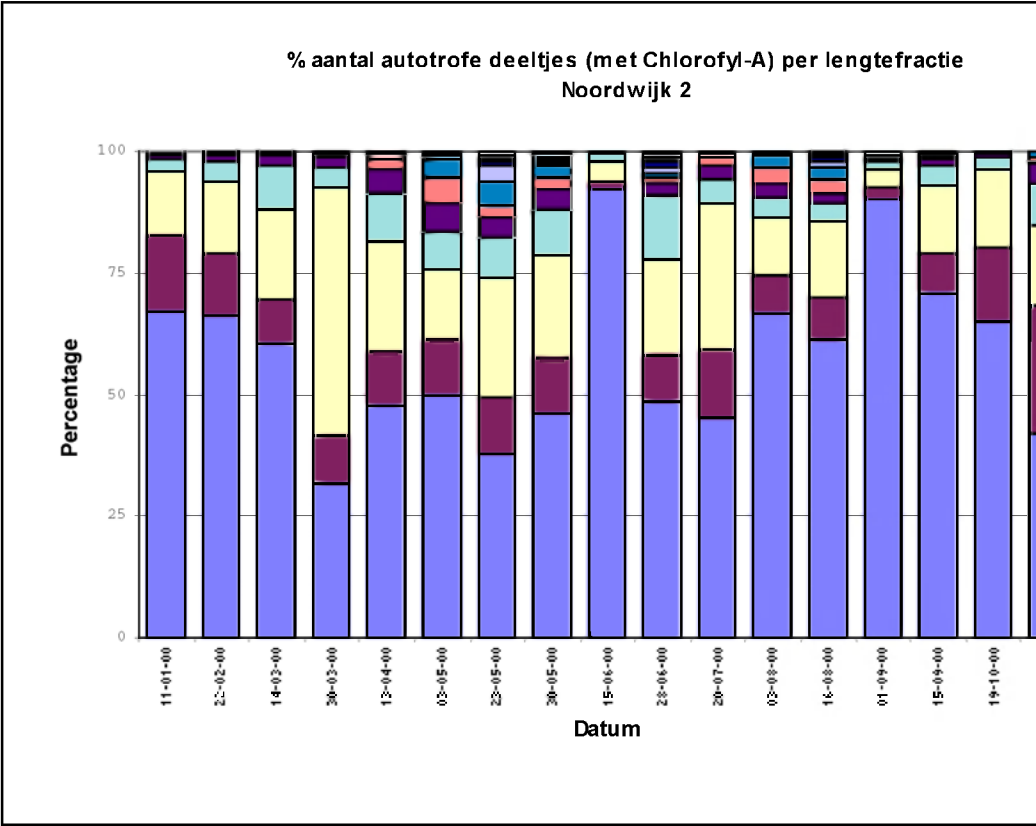
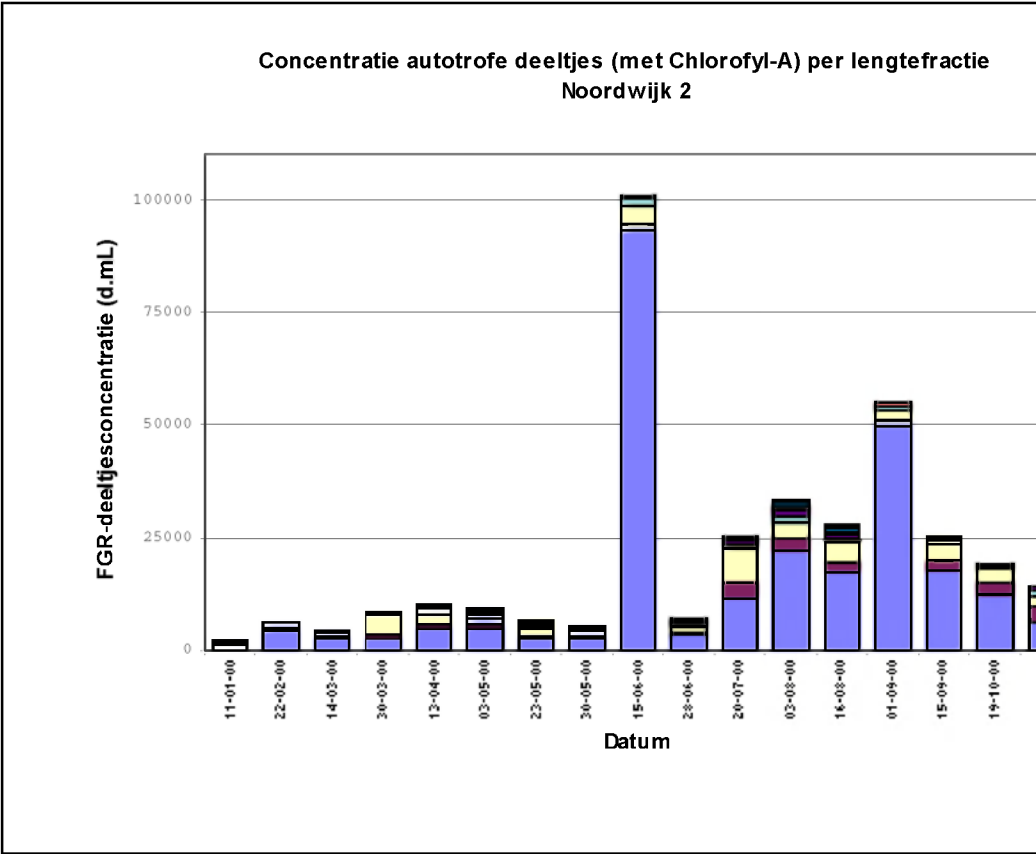
NOORDWIJK 2

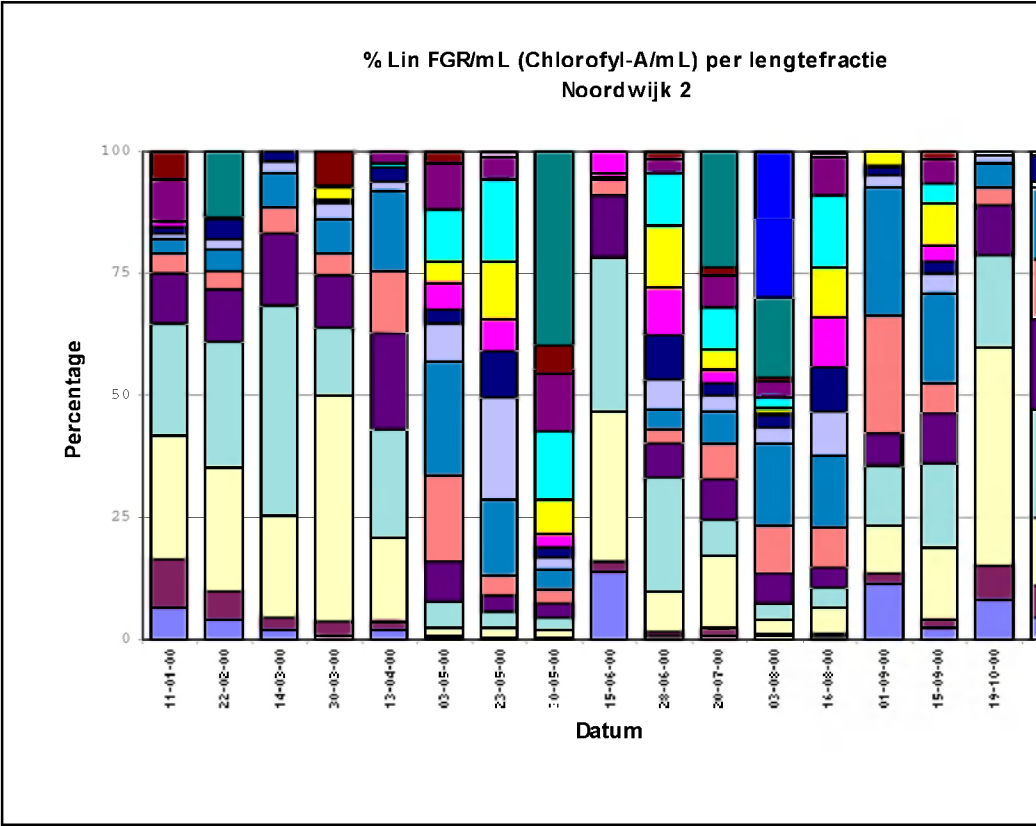
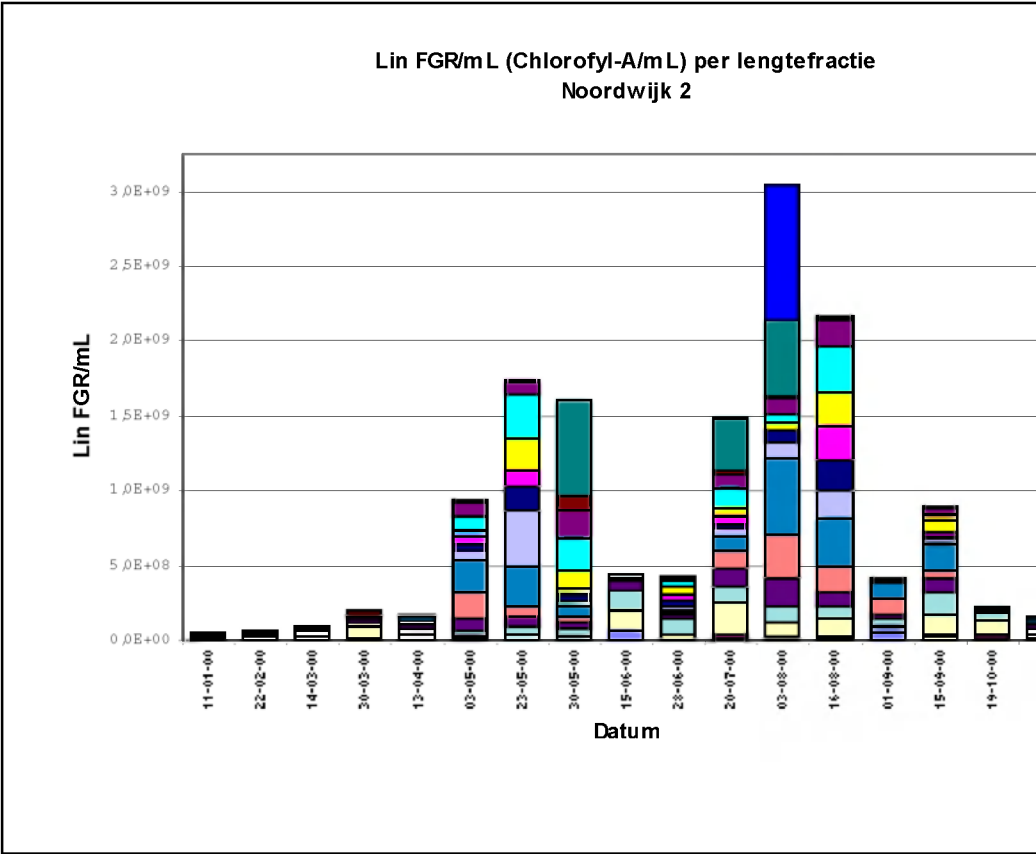
**Deeltjesconcentratie (alleen met Chlorofyl-A)
Noordwk 2**

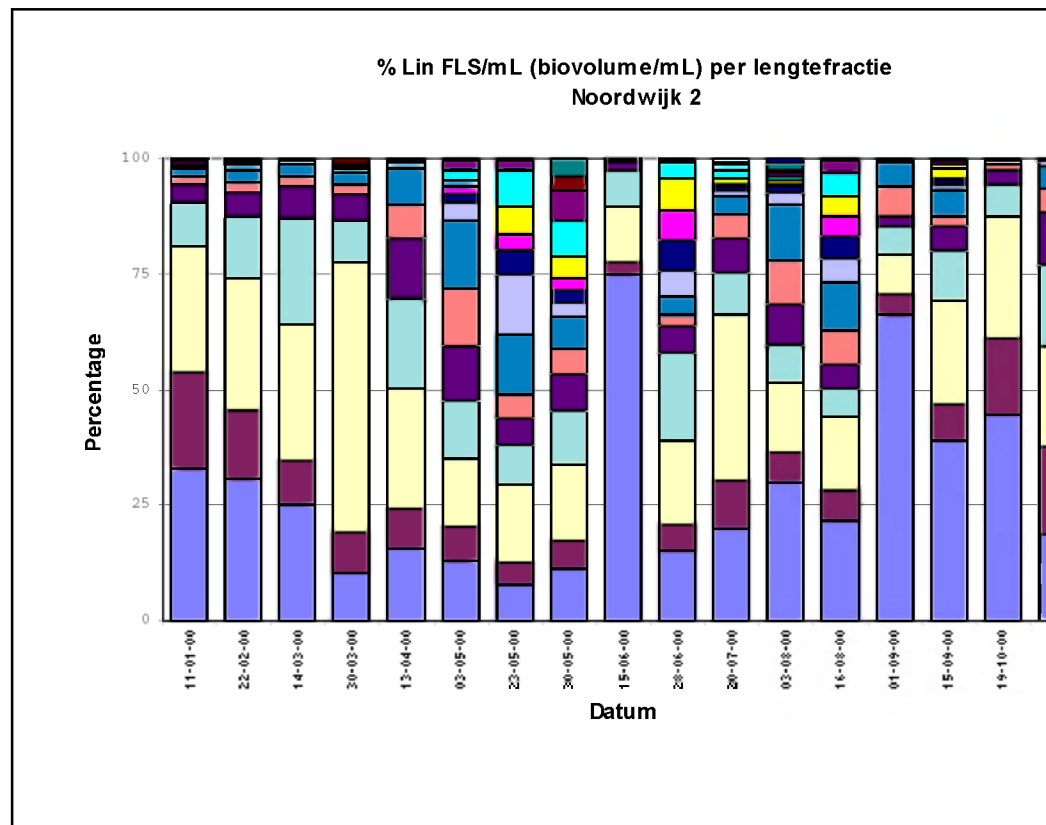
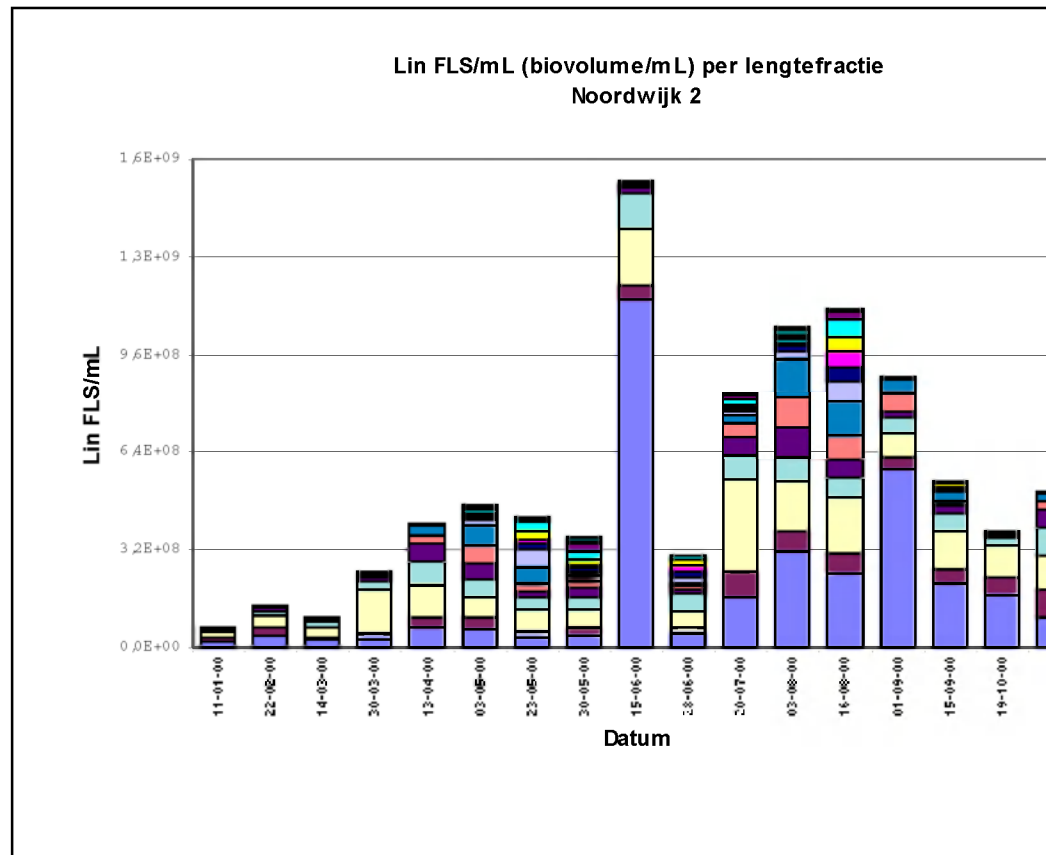


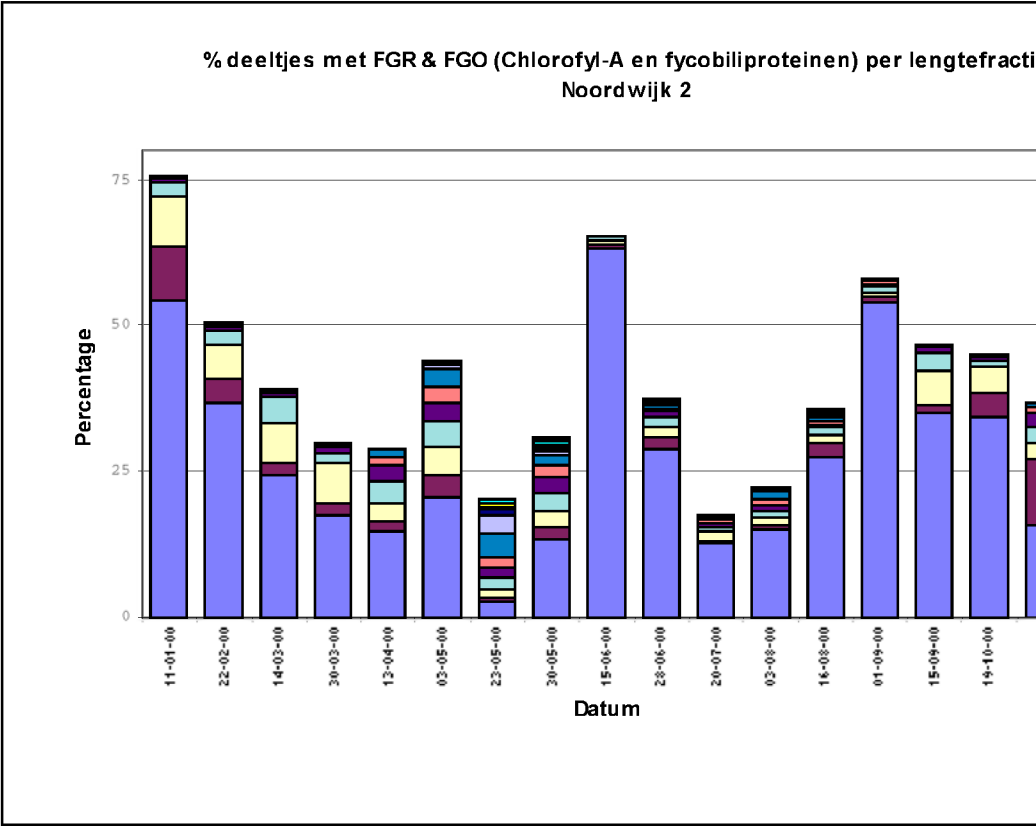
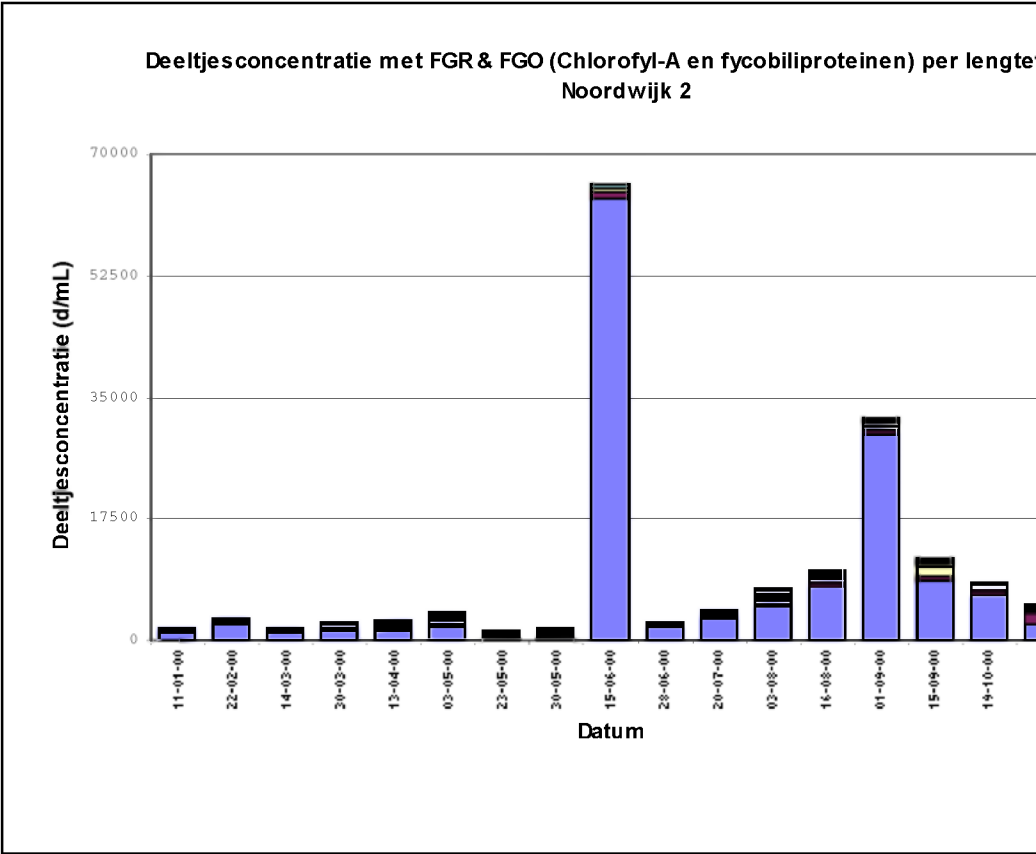
**Deeltjesconcentratie (alle deeltjes)
Noordwk 2**



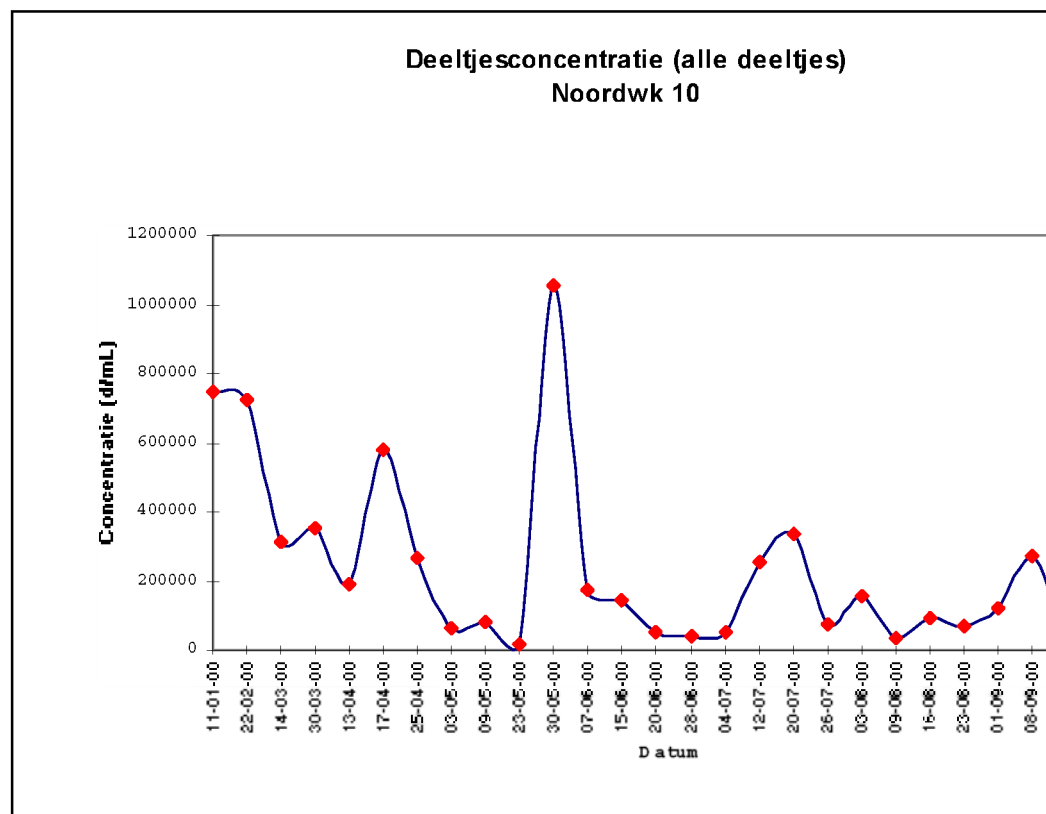
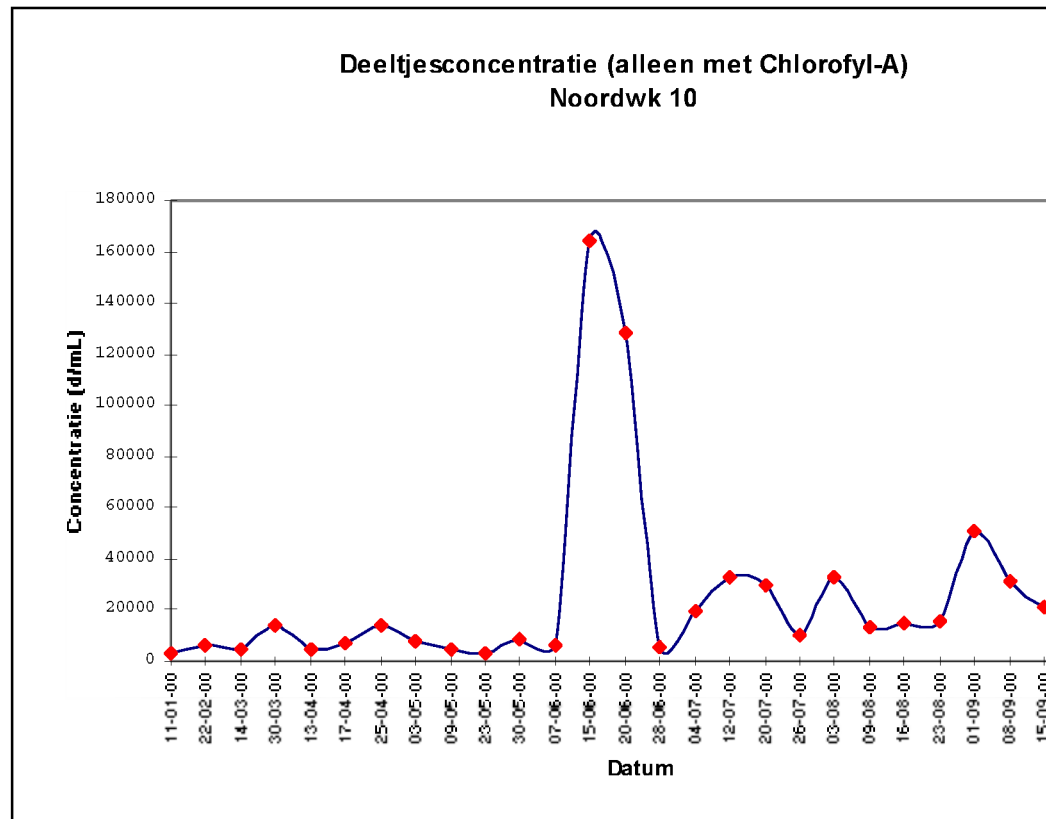


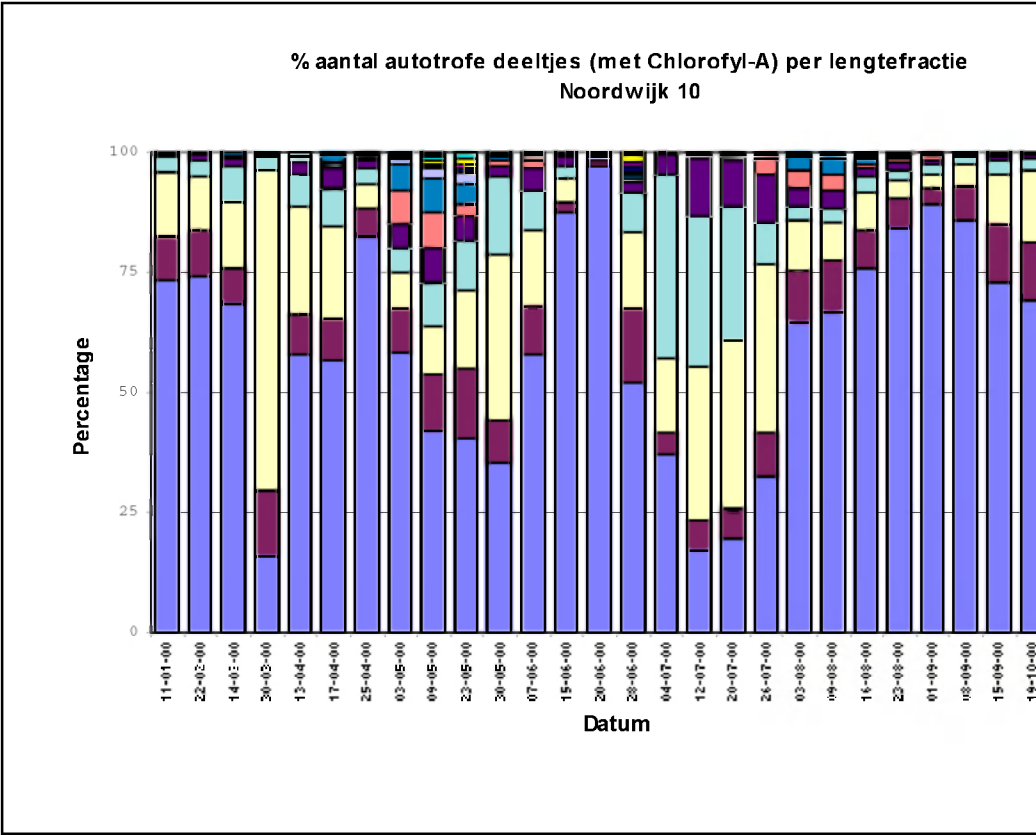
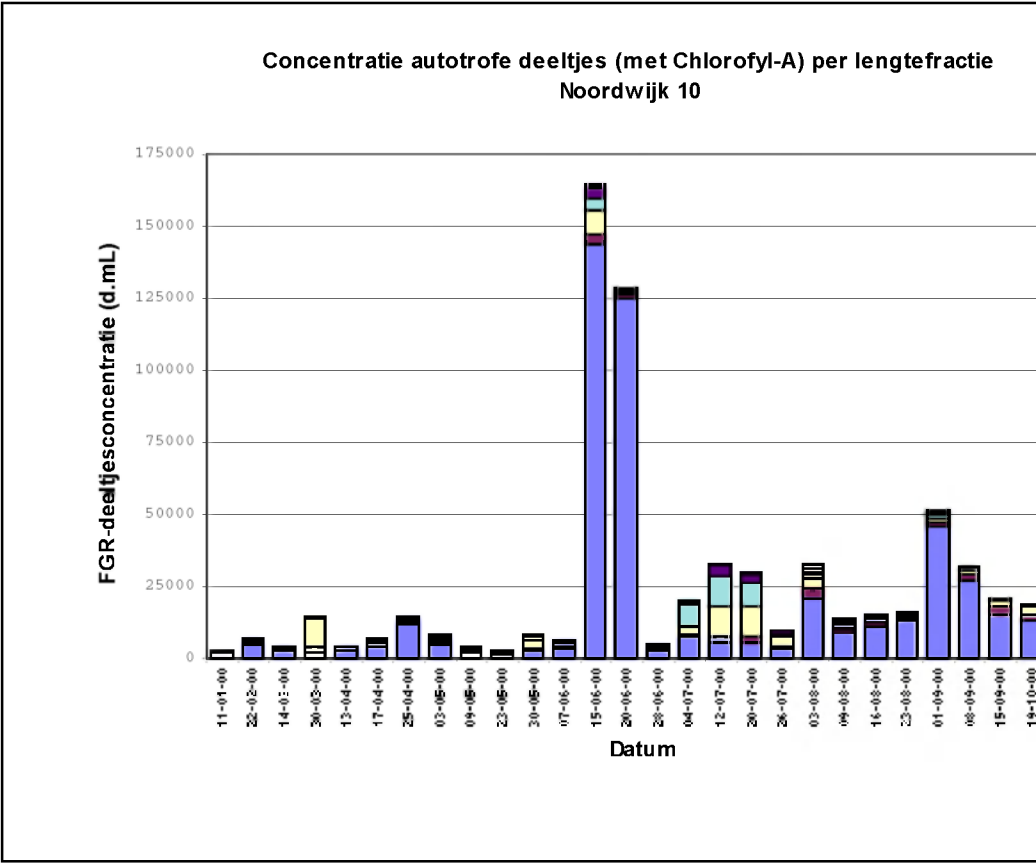


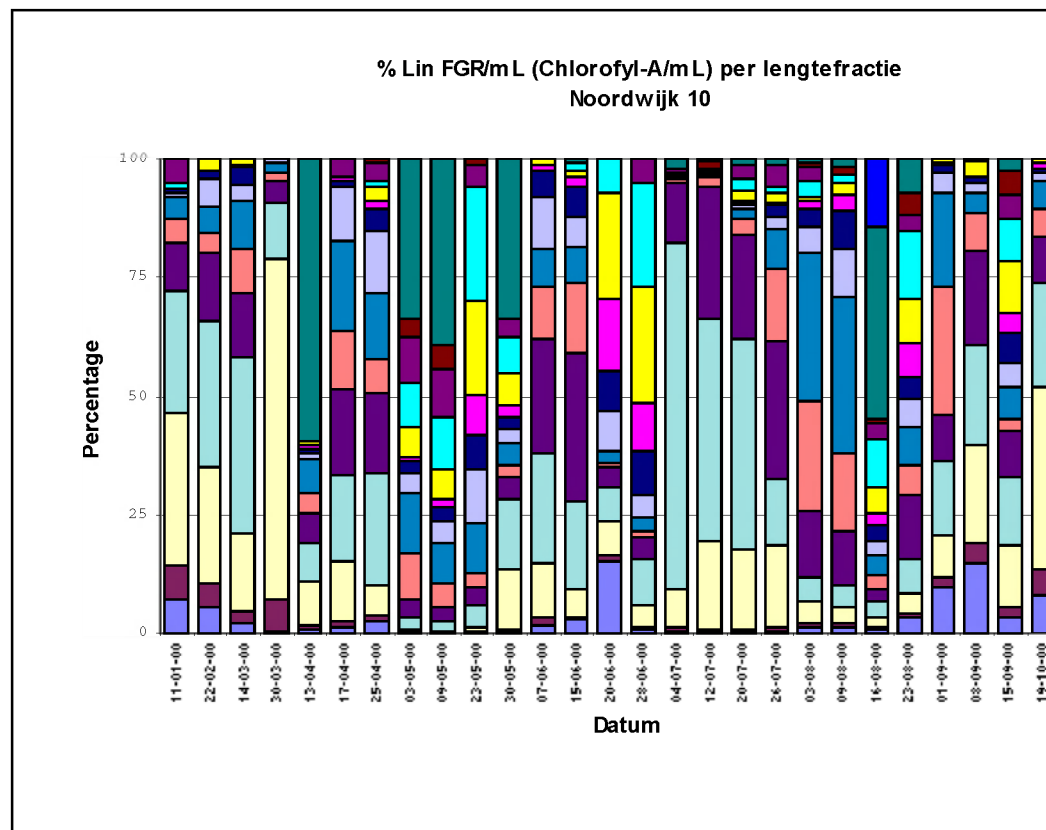
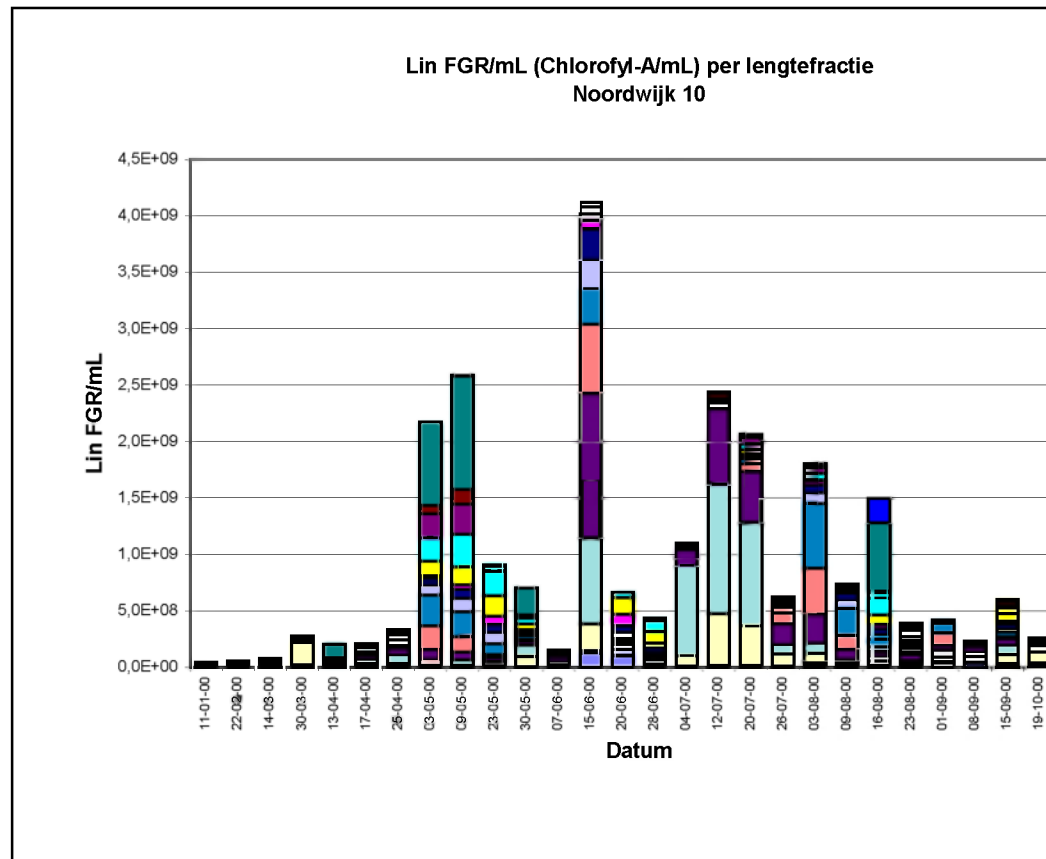


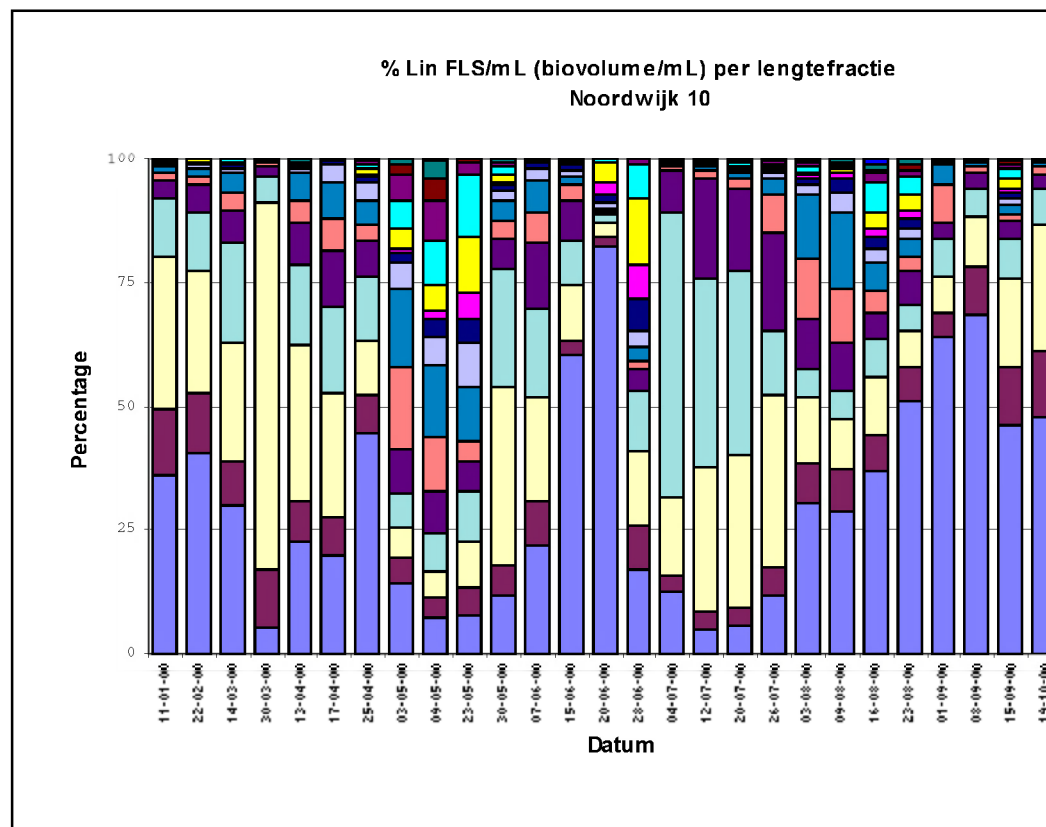
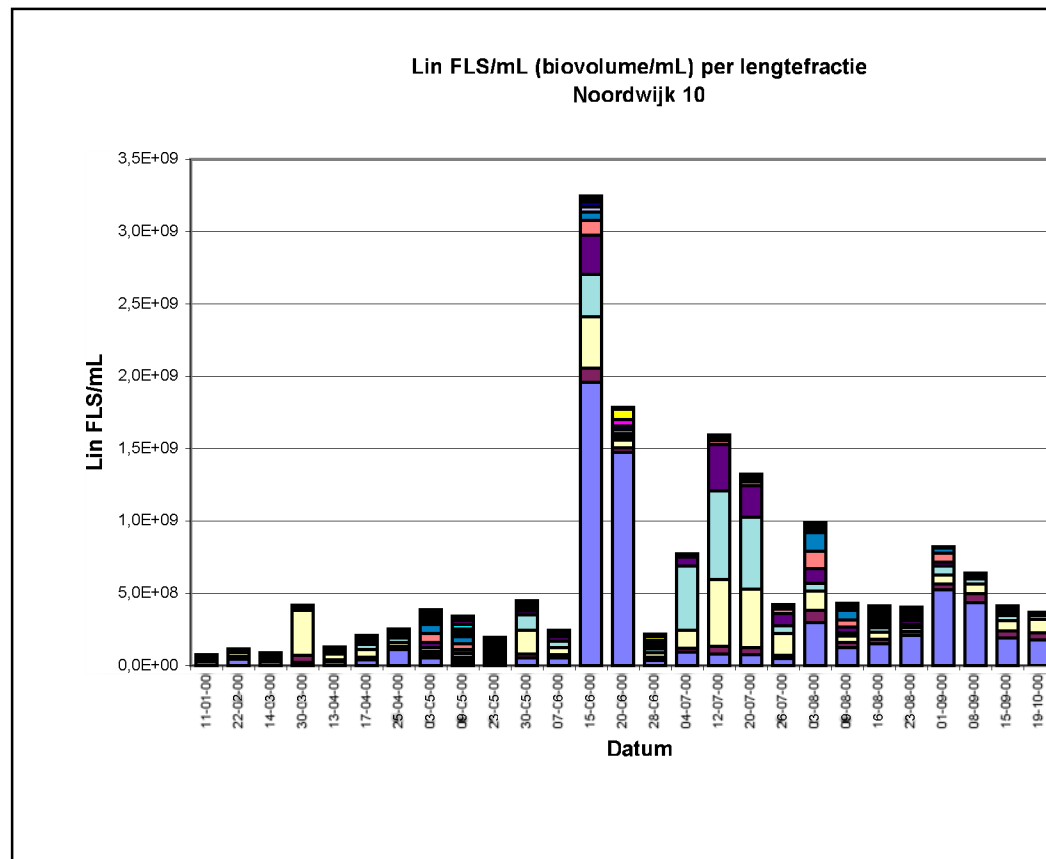


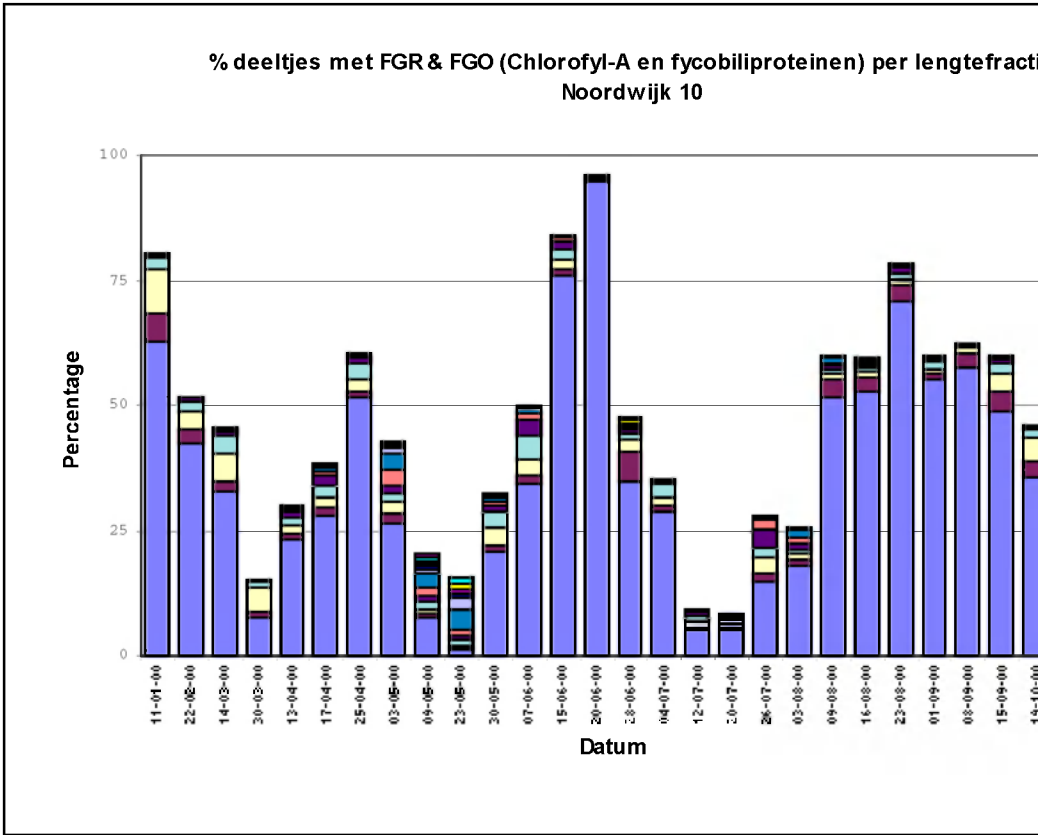
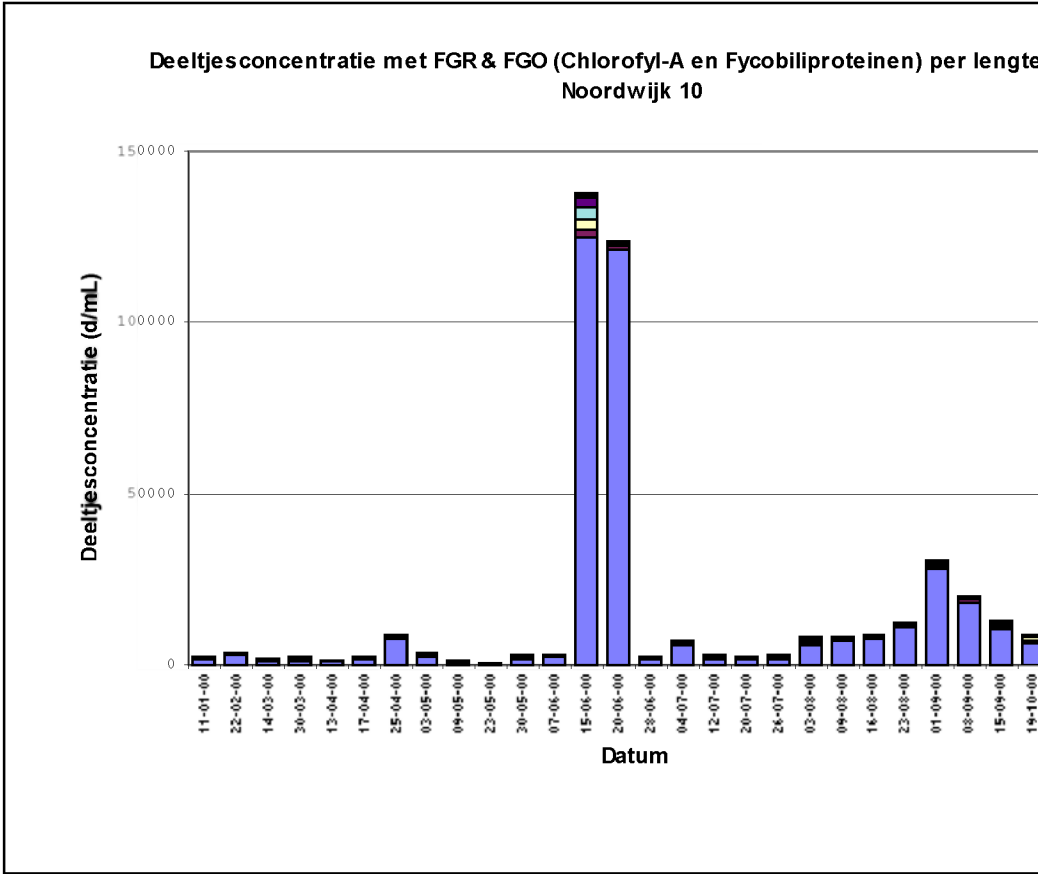
NOORDWIJK 10











TERSLG 135

(Oppervlakte)

(Spronglaag)

(Bodem + 3 m)

