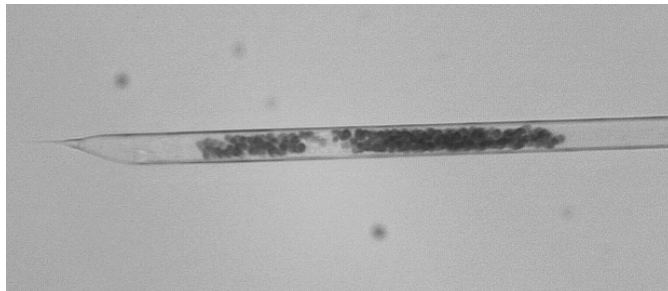


Flowcytometrie fytoplanktonmonitoring 2002a

Evaluatie van flowcytometrie fytoplanktonmonitoring
januari t/m juni 2002



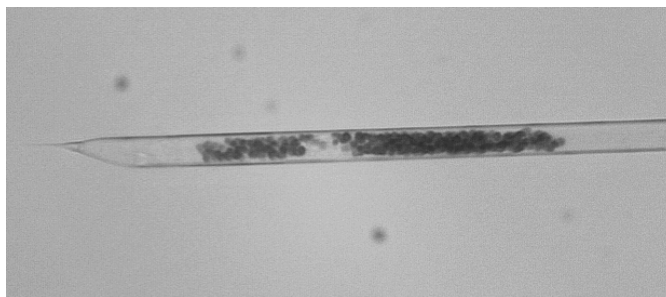
Rapport RIKZ/2003.014

Juli 2002

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

Flowcytometrie fytoplanktonmonitoring 2002a

Evaluatie van flowcytometrie fytoplanktonmonitoring
januari t/m juni 2002



Rapport RIKZ/2003.014

Juli 2002

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

Inhoudsopgave

Inhoudsopgave	2
Samenvatting	4
1. Inleiding	6
1.1 Dit verslag	6
1.2 Wat is nieuw in dit rapport ?	6
2. Materialen en Methoden	8
2.1 Beschrijving gehanteerde materialen en methoden	8
2.2 Uitwerken gegevens	8
2.2.1 Globale trends	8
2.2.2 Vergelijking met andere technieken	9
2.2.3 Uitwerken in scatterplots	9
3. Resultaten	10
3.1 Noordwijk 10	10
3.1.1 Algemene trends	10
3.1.2 Flowcytometrische fytoplankton concentraties	12
3.1.3 Snelle microscopische analyse	16
3.1.4 Fytoplanktonconcentratie van deeltjes > 10 µm	17
3.2 Noordwijk 2	18
3.2.1 Algemene trends	18
3.2.2 Flowcytometrische fytoplankton concentraties	20
3.2.3 Snelle microscopische analyse	24
3.2.4 Fytoplanktonconcentratie van deeltjes > 10 µm	25
3.3 Terschelling 135	26
3.3.1 Algemene trends	26
3.3.2 Flowcytometrische fytoplankton concentraties	27
3.3.3 Snelle microscopische analyse	31
3.3.4 Fytoplanktonconcentratie van deeltjes > 10 µm	32
3.4 Schaar van ouden Doel	33
3.4.1 Algemene trends	33
3.4.2 Flowcytometrische fytoplankton concentraties	34
3.4.3 Fytoplanktonconcentratie van deeltjes > 10 µm	38
3.5 Vlissingen	39
3.5.1 Algemene trends	39
3.5.2 Flowcytometrische fytoplankton concentraties	40
3.5.3 Fytoplanktonconcentratie van deeltjes > 10 µm	44
3.6 Zijpe	45
3.6.1 Algemene trends	45
3.6.2 Flowcytometrische fytoplankton concentraties	46
3.6.3 Fytoplanktonconcentratie van deeltjes > 10 µm	50

4. Discussie	51
4.1 Kwaliteitsborging en lange termijn data	51
4.1.1 Controlekaart	51
4.1.2 Lange termijn data	52
4.1.3 Vergelijking microscopie- en flowcytometrietellingen	53
4.1.4 Conclusie	54
4.2 Een kwantitatieve vergelijking tussen jaargangen en lokaties	55
4.2.1 Een vergelijking tussen jaargangen	55
4.2.2 Een vergelijking tussen lokaties	55
4.2.3 Conclusie	56
4.3 Analyse van pico- en naoplankton	57
4.3.1 Inleiding en methode	57
4.3.2 Resultaten	57
4.3.3 Conclusie	59
4.4 Ongeconcentreerd (onbehandeld) versus geconcentreerd	60
4.4.1 Inleiding	60
4.4.2 Biomassa en concentratie ongeconc. Vs geconcentreerd	60
4.4.3 Grootte van biomassa- en deeltjesconcentratieverliezen	63
4.4.4 Concentreren zinvol ?	67
4.4.5 Conclusie	68
4.5 Automatische clustering m.b.v. Matlab ongeconc. Vs geconc.	69
4.5.1 Inleiding	69
4.5.2 Materialen en methoden	69
4.5.3 Resultaten	70
4.5.4 Conclusie	72
4.6 <i>Phaeocystis</i> spp. eruit gelicht	73
4.6.1 Inleiding	73
4.6.2 Materialen en methoden	73
4.6.3 Resultaten en discussie	74
4.6.4 Conclusie	75
4.7 Efficiency	76
4.8 Hoe verder in 2002 ?	76
4.9 Innovatieve ontwikkelingen	77
5. Aanbevelingen	78
6. Conclusies	79
7. Referenties	81

Samenvatting

De resultaten van de fytoplanktonanalyses uit de periode van januari tot en met juni 2002, die met behulp van flowcytometrie zijn uitgevoerd, worden in dit rapport gerapporteerd en besproken als ook de evaluatie van 2002 gegevens ten opzichte van eerdere resultaten. Dit vindt plaats als onderdeel van het programma Monitoring Waterstaatkundige Toestand des Lands (MWTL) in de projecten MON*BIOLOGIE en TNWMILLAB. Per lokatie zijn fytoplanktonconcentraties en de biomassa, onderverdeeld in grootteklassen, uitgewerkt en wordt hiervan een samenvattende beschrijving van de belangrijkste geconstateerde fytoplanktontrends gegeven.

In dit rapport is tevens aandacht besteed aan de langere termijn kwaliteitsborging van de flowcytometrische analyse sinds 2000. Voor het opbouwen van reproduceerbare langere termijn datasets blijkt flowcytometrie een robuust instrument en een betrouwbare methode. Door gebruikmaking van calibratiebolstandaarden wordt inzicht verkregen in de (lange termijn) kwaliteit van datasets. Van de dataset sinds 2000 liggen, op één bewuste verschuiving begin 2000 na, de resultaten binnen een spreiding van 20%.

De totale autotrofe deeltjesconcentratie over de eerste helft van 2002 ten opzichte van 2001 zijn voor alle zes lokaties lager. De verhouding van de concentraties tussen de lokaties is nauwelijks afwijkend, behalve voor Noordwijk 2.

De biomassa is voor een viertal lokaties in 2002 lager (Noordwijk 2, Noordwijk 10, Zijpe, Vlissingen), voor een tweetal lokaties hoger (Terschelling 135, Schaar van ouden Doel) ten opzichte van 2001. Tussen de lokaties zijn de verhoudingen in beide jaren verschillend.

Omdat begin 2002 resultaten van de lugol gefixeerde monsters van het jaar 2000, die met microscopie geteld zijn, gerapporteerd zijn, is een vergelijking tussen microscopietellingen en flowcytometrietellingen voor Noordwijk 10 (2000) uitgevoerd. De resultaten tonen grote overeenkomsten in het totaalconcentratieverloop met een correlatie van $R^2=0,8$ indien bij flowcytometrie de fractie kleiner dan 5 μm wordt weggelaten.

Internationaal staat de monitoring van pico-nanoplankton steeds meer in de belangstelling. De standaard flowcytometriemetingen die RIKZ in het MWTL programma verricht, leveren een waardevolle bijdrage over de groep pico- en nanoplanktondeeltjes. De indeling van het picoplankton in diverse watersystemen, zoals in de literatuur en internationaal veelvuldig gebruikt wordt, blijkt ook van toepassing op de RIKZ-MWTL flowcytometrie-dataset. Deze groepen zijn 'Prochlorococcus, kleine Eukaryoten en Synechococcussen en zijn bovendien eenvoudig te identificeren met de standaard gebruikte clusteralgoritmes. Uit de flowcytometrie dataset wordt dus niet alleen informatie over de grotere fytoplanktondeeltjes gegeven, maar ook over deze kleine deeltjes en dus de onderlinge relatie, waarmee een unieke combinatie van data in één analyse beschikbaar is.

De toepassing van concentrering of fractionering met behulp van 10 μm gaas is gedurende de eerste zes maanden van 2002 voor alle zes lokaties extra uitgevoerd. Uit de resultaten van ongeconcentreerde en geconcentreerde

monsters blijkt dat juist door concentrering/ fractionering een groot celverlies (gemiddeld 65%) optreedt en dat dit verlies bovendien niet reproduceerbaar is. Celverlies lijkt groter naarmate monster meer detritus bevat. Mogelijk is dit te verklaren uit het uiteenvallen van detritusvlokken met chlorofyl-a in kleine deeltjes (kleiner dan 10 µm) bij gebruik van gaas. Ook is het waarschijnlijk dat celverlies optreedt door een hogere saliniteit van de afspoelvloeistof ten opzichte van het ongeconcentreerde monster (vooral op Schaar van ouden Doel). Daarom is besloten het concentreringsprincipe te verlaten en is gekozen voor een andere strategie. Van de ongeconcentreerde monsters zullen in totaal meer tellingen uitgevoerd worden, zodanig dat minimaal 2000 à 3000 grotere deeltjes geteld zijn.

De resultaten van de snelle microscopische tellijsten en de aantallen gevonden clusters bij flowcytometrische resultaten tonen een redelijke overeenkomst tussen microscopie en flowcytometrie qua aantallen gevonden dominantere soorten (MIC) en clusters van deeltjes (FCM). Tussen geconcentreerde en ongeconcentreerde monsters worden verschillen gevonden, die wijzen op de aanwezigheid van minder clusters van deeltjes in geconcentreerde monsters.

Voor *Phaeocystis* wordt goede overeenkomst gevonden tussen tellingen met behulp van flowcytometrie en microscopie (dataset 2000 en 2001), waarbij gebruik gemaakt is van nieuwe deeltjesherkenningssoftware.

Tot slot kan gemeld worden dat de analysegang in 2002 zonder problemen verlopen is.

1. Inleiding

1.1 Dit verslag

De resultaten van de fytoplanktonanalyses uit de periode van januari tot en met juni 2002, die met behulp van flowcytometrie zijn uitgevoerd, worden in dit rapport gerapporteerd en besproken. Binnen de twee projecten TNWMILLAB en MON*BIOLOGIE wordt gedurende drie jaar gemonitord op een zestal lokaties behorende tot het MWTL programma met de European Optical Plankton Analyzer nieuwe stijl (EurOPA n.s.). Na deze periode wordt bekeken hoe verder te gaan met flowcytometrie binnen monitoring. Eerdere rapportages van de jaargangen 2000 en 2001 zijn al uitgegeven (Rapport RIKZ 2001.034 en de rapporten RIKZ/2003.012 en 2003.013). Deze evaluerende schriftelijke rapportage over de eerste helft van 2002 geeft een overzicht van de meest opvallende resultaten en is een korte evaluatie van de fytoplanktonmonitoringresultaten, die al beschikbaar waren via een website voor de interne RIKZ-gebruiker (binnen 48 uur na monsternamen).

Het **doel** van de fytoplanktonmonitoring is hieronder samengevat:

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

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

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

1.2. Wat is nieuw in dit rapport ?

In dit rapport wordt naast de gebruikelijke halfjaarlijkse rapportage en toelichting bij de gestapelde staafdiagrammen van totaalconcentraties en biomassa een aantal onderwerpen uitvoeriger toegelicht. In deze uitgave zijn dat de onderwerpen kwaliteitsborging en de daaruit te volgen vergelijking en trends tussen datasets van de eerste halve jaren van 2001 en 2002. Verder wordt specifiek ingegaan op de flowcytometrische analyse en verwerking van de concentraties *Phaeocystis spp.*

Een ontwikkeling die zich internationaal voordoet is de analyse van de grote groep deeltjes kleiner dan 20 µm. Deze groep, bestaande uit nano- en picoplankton wordt in een aantal standaard groepen plankton onderverdeeld. In de huidige RIKZ dataset zou een dergelijke opsplitsing interessant kunnen zijn, mede omdat deze groep deeltjes onderbelicht blijkt bij de microscopische waarnemingen.

De groep grotere deeltjes (> 10 µm), die in aantal minder geteld worden door de numerieke dominantie van de kleinste deeltjes, krijgt in deze editie extra aandacht in verband met het concentreren van monsters met behulp van 10 µm gaas. De resultaten hiervan zijn weergegeven en worden geëvalueerd, met name het onderdeel celverlies.

2. Materialen en Methoden

2.1 Beschrijving gehanteerde materialen en methoden

De gehanteerde methoden en gebruikte materialen ten behoeve van de analyses uit de periode januari tot en met juni 2002 zijn ongewijzigd en beschreven in het rapport van de flowcytometrische halfjaarlijkse rapportage januari-juni 2001 (RIKZ/2003.012).

Nieuw vanaf 1 januari 2002 is dat een extra analyse heeft plaatsgevonden op monsters, die zijn voorgeconcentreerd. Concentratie van de monsters vindt plaats door een bepaald volume, variërend van 300 ml(hoog slibgehalte) tot 1000 ml(laag slibgehalte), over een 10 µm gaas te filteren. Het materiaal dat op het filter achterblijft wordt opgenomen in een 20-30 ml 30 ‰ NaCl. Imaging in flow is niet toegepast.

2.2 Uitwerken gegevens

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

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

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

2.2.1. Globale trends

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

- de concentraties van deeltjes met chlorofyl-a uitgesplitst in 17 groottefracties (n/ml.fractie)
- de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentraties van deeltjes met chlorofyl-a uitgesplitst in 17 groottefracties ($\% \frac{n.fractie}{n_{totaal}}$)
- de concentraties chlorofyl-a/ml (biomassa) uitgesplitst in 17 groottefracties (linFGR/ml.fractie)
- de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentratie chlorofyl-a/ml uitgesplitst in 17 groottefracties ($\% \frac{linFGR/ml.fractie}{totaal-linFGR/ml}$)
- de concentraties biovolume (van deeltjes met chlorofyl-a)/ml uitgesplitst in 17 groottefracties (linFLS/ml.fractie)

- de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentratie biovolume/ml uitgesplitst in 17 groottefracties ($\% \text{linFLS/ml.fractie} / \text{totaal-linFLS/ml}$)
- de concentraties van deeltjes met chlorofyl-a ÈN fycobiliproteïnen uitgesplitst in 17 groottefracties ($n_{(\text{FGR}>0 \& \text{FGO}>0)} / \text{ml.fractie}$)
- de concentraties van deeltjes met chlorofyl-a, chlorofyl-b ÈN fycocyanine uitgesplitst in 17 groottefracties ($n_{(\text{FGR}>0 \& \text{FGO}>0)} / \text{ml.fractie}$)
- de concentraties van gefractioneerde/geconcentreerde deeltjes groter dan 10 µm met chlorofyl-a uitgesplitst in 15 groottefracties ($n / \text{ml.fractie}$)

2.2.2 Vergelijking met microscopie

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

2.2.3 Uitwerken in scatterplots

Per deeltje worden 6 getalwaarden vastgelegd overeenkomend met de optische eigenschappen van elk deeltje. Door middel van scatterplot-presentaties worden de optische eigenschappen van fytoplanktondeeltjes ten opzichte van elkaar uitgezet. Deeltjes met gelijke optische eigenschappen vormen (in scatterplots) clusters. Verschillende clusters van fytoplanktondeeltjes vertegenwoordigen verschillende groepen met karakteristieke optische eigenschappen (bijv. pigmenten). Dit proces van clusteren vindt geautomatiseerd en objectief met behulp van in MATLAB geschreven algoritmes plaats (clusterfcm (v6.0) en fcluster (v3.0b) instelling 40,12). Alvorens te clusteren worden de analysefiles door een digitaal filter (fsieve (v1.0) instelling (5)) gehaald, waarbij alle deeltjes kleiner dan 5 µm uit de dataset worden verwijderd. Dit om de vergelijking met microscopie, waarbij deeltjes < 5 µm visueel nauwelijks waargenomen worden, eenvoudiger te maken en omdat bij de flowcytometrische analyse blijkt dat deze kleinste deeltjes numeriek dominant zijn en de relatieve bijdragen van grotere deeltjes daardoor ondergesneeuwd raakt. Op grond van de gevonden clusters werd een onderverdeling in talrijkheid gemaakt naar analogie van de snelle microscopische analyse. De resultaten van clustering zijn voor Noordwijk 10, Noordwijk 2 en Terschelling 135 vergeleken met de microscopische resultaten.

3. Resultaten

3.1 Noordwijk 10

3.1.1 Algemene trends

De **totaalconcentratie autotrofe deeltjes** wordt vooral bepaald door de kleinere deeltjes ($<10\ \mu\text{m}$). Het totaalconcentratieverloop wordt in de eerste helft van 2002 gekenmerkt door relatief lage concentraties in het voorjaar rond de 5000 d/ml. *Phaeocystis* spp. is nauwelijks waargenomen. Van de lage concentratie in het voorjaar is de hoogste circa viermaal lager dan de hoogste, die gevonden is in het voorjaar van 2001. De hoogste concentraties worden gevonden in januari en in juni met name ten gevolge van kleinere deeltjes (respectievelijk ca 23.000 en 35.000 d/ml) en zijn ten opzichte van dezelfde periode in 2001 hoger (ca tweemaal). De opkomst van grotere deeltjes in het voorjaar veroorzaakt een daling van het percentage kleinere deeltjes ($<10\ \mu\text{m}$) en verschilt hierin weinig van 2001. Met andere woorden de daling van de totaalconcentratie autotrofe deeltjes in het voorjaar wordt waargenomen over alle groottefracties. Wordt alleen gekeken naar de grotere deeltjes ($>10\ \mu\text{m}$) afkomstig van voorgeconcentreerde monsters, dan wordt de maximale concentratie in week 15 gevonden (2000 d/ml).

De **biomassa** neemt in de eerste helft van het jaar gestaag toe met in week 15 een maximum ($3,7 \times 10^8$), vervolgens neemt de biomassa weer af. Net als in 2001 is het relatieve aandeel van grote deeltjes (ketens) hoog in de periode van week 11 t/m 15. In week 19 wordt een zeer lage biomassa gevonden vergeleken met de week ervoor en na. Het biomassaverloop ten opzichte van 2001 verloopt bijna identiek (beide jaren een maximum in week 15), maar is in 2002 ca tweemaal lager. De biomassa loopt redelijk gelijk mee met het concentratieverloop van autotrofe deeltjes groter dan $10\ \mu\text{m}$ (voorgeconcentreerd). In week 24 'stort' de biomassa in, omdat de grotere fracties verdwenen zijn en alleen kleinere deeltjes de totale biomassa bepalen. In 2001 gebeurde dit pas in juli, in 2000 (ook) in juni.

Het verloop van het **biovolume** uitgedrukt in de linFLS/ml parameter toont een verloop dat niet lijkt op het concentratieverloop en niet op het biomassaverloop. De maximumbiovolumewaarde wordt gevonden in week 21. Een week waarin geen opvallende biomassa of deeltjesconcentratie gevonden is. Wel is in de geconcentreerde monsters (deeltjes $>10\ \mu\text{m}$) in week 21 een hogere concentratie gevonden. Relatief hoge biovolumeconcentraties zijn ook gevonden in januari en in juni, de perioden waarin het relatieve aandeel kleine deeltjes hoog was. Ook blijkt dat in de perioden waarin de biomassa door grotere deeltjes bepaald wordt dit ook tot uitdrukking komt in dezelfde periode voor het biovolume. Deze parameter geeft als het ware een gemiddeld beeld van totaal aantal concentratie en de biomassa.

De hoogste **concentratie deeltjes met fycobiliproteinen** (oranje fluorescerend vooral afkomstig van het pigment fycoerithrine) worden in januari gevonden (ca 16000 d/ml) voor het grootste gedeelte deeltjes $<5\ \mu\text{m}$. Vervolgens neemt de concentratie snel af af (februari <4000 d/ml tot de laagste waarde in week 19 (<200 d/ml) waarna de concentratie weer stijgt. In juni stijgt de concentratie naar

xxx d/ml Ten opzichte van 2001 is de concentratie in januari viermaal hoger en in juni x-maal.

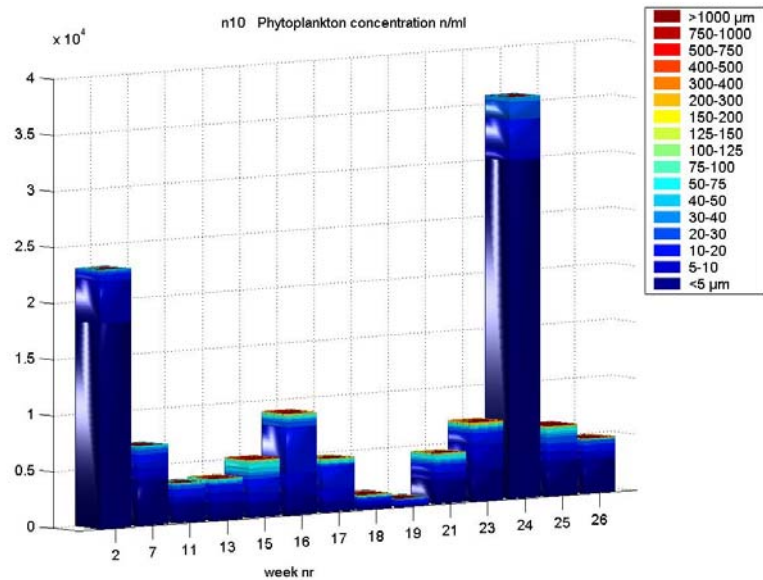
*De **concentratie deeltjes met fycocyanine-chlorofyl-b** vertoont in juni de hoogste waarden voornamelijk veroorzaakt door de kleine deeltjes (<5 µm). Ook in januari is het aandeel kleine deeltjes groot in tegenstelling tot de periode van week 7 t/m 23, waarin deeltjes >10 µm het grootste aandeel vormen van deeltjes met fycocyanine en chlorofyl-b.*

*Uit de resultaten van de **microscopische tellijsten** blijkt dat de volgende soorten op Noordwijk 10 in de periode januari t/m juni dominant (>5%) voorkwamen: Cerataulina pelagica (wk 11-23), Chaetoceros socialis (wk 11-15, wk 18, wk 21, wk 24-25), Paralia marina (wk 2, wk 7, wk 18, wk 24), Pseudonitzschia pungens cf (wk 11-16, wk 19-21), Rhizosolenia delicatula (wk 18-23, wk 25), Rhizosolenia shrubsolei (wk 15-18, wk 23, wk 25) en tenslotte Thalassiosira <30 µm (wk 2-11, wk 24-25). De concentratie van deeltjes >10 µm, die bepaald zijn uit flowcytometrische gegevens, varieert in deze periode tussen 300/ml en 2000/ml.*

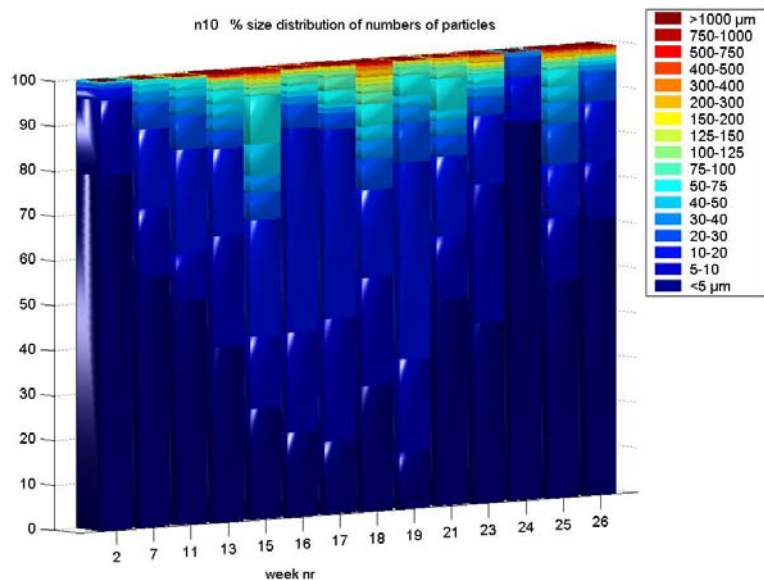
3.1.2 Flowcytometrische fytoplanktonconcentraties Noordwijk 10

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

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

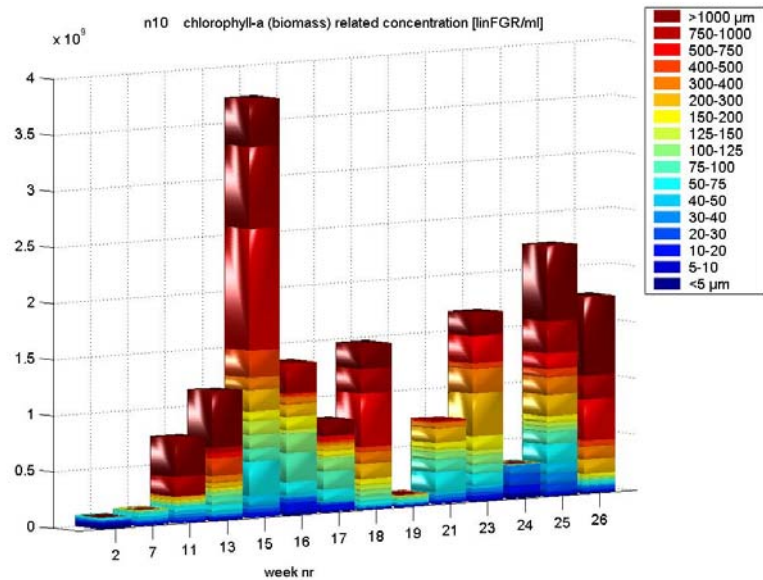


FIGUUR 3.1.2
Concentratie autotrofe
deeltjes (met chlorofyl-a)
per lengtefractie

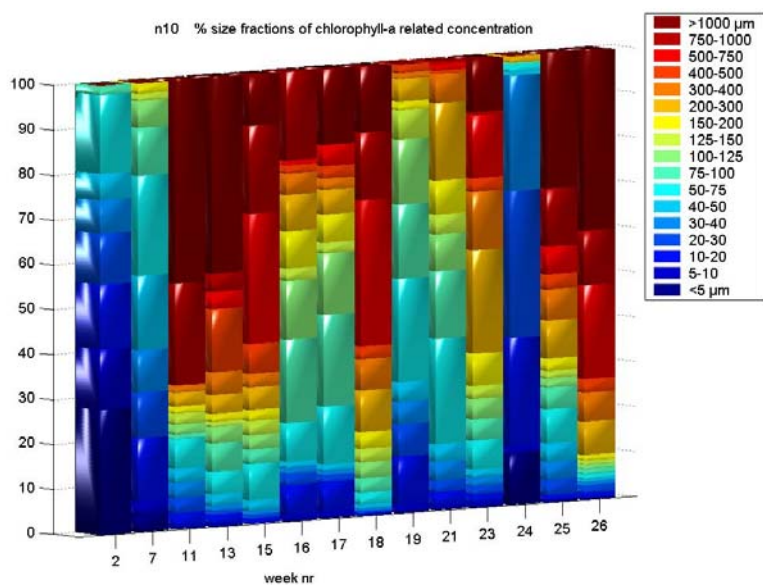


De **chlorofyl-a/ml concentraties** (biomassa) of flowcytometrische linFGR/ml variabele is uitgesplitst in 17 groottefracties (linFGR/ml.fractie) (FIGUUR 3.1.3) en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentratie chlorofyl-a/ml uitgesplitst in 17 groottefracties (% linFGR/ml.fractie/totaal-linFGR/ml)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

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

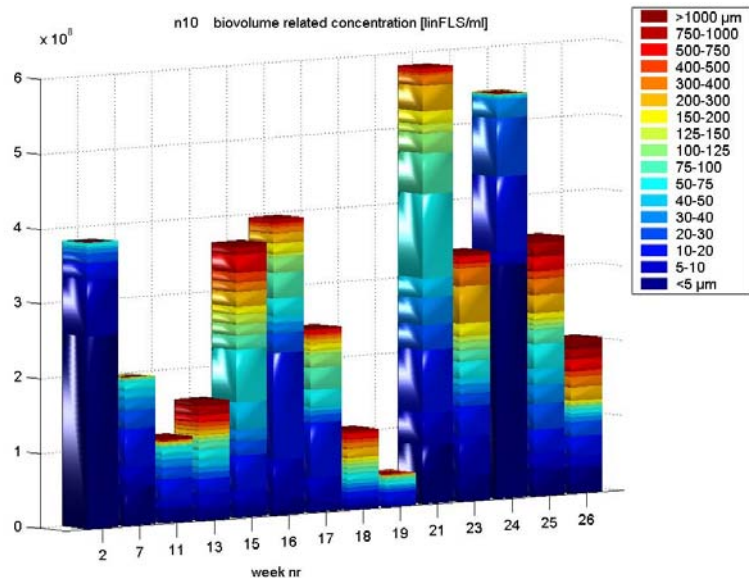


FIGUUR 3.1.4
% LinFGR/mL per
lengtefractie

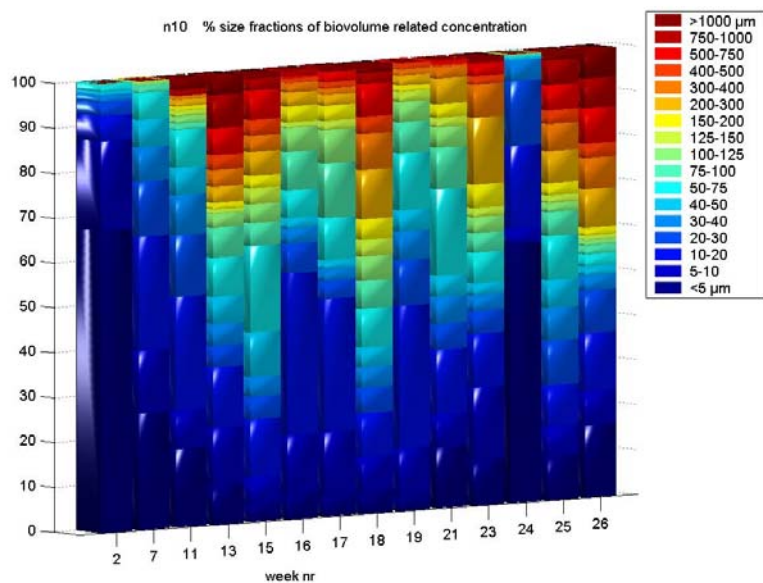


De **biovolumeconcentraties** (van deeltjes met chlorofyl-a)/ml uitgesplitst in 17 groottefracties (linFLS/ml.fractie) is weergegeven in FIGUUR 3.1.5 en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentratie biovolume/ml uitgesplitst in 17 groottefracties (% linFLS/ml.fractie/totaal-linFLS/ml)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

FIGUUR 3.1.5
Totale LinFLS/ml per
lengtefractie Noordwijk 10

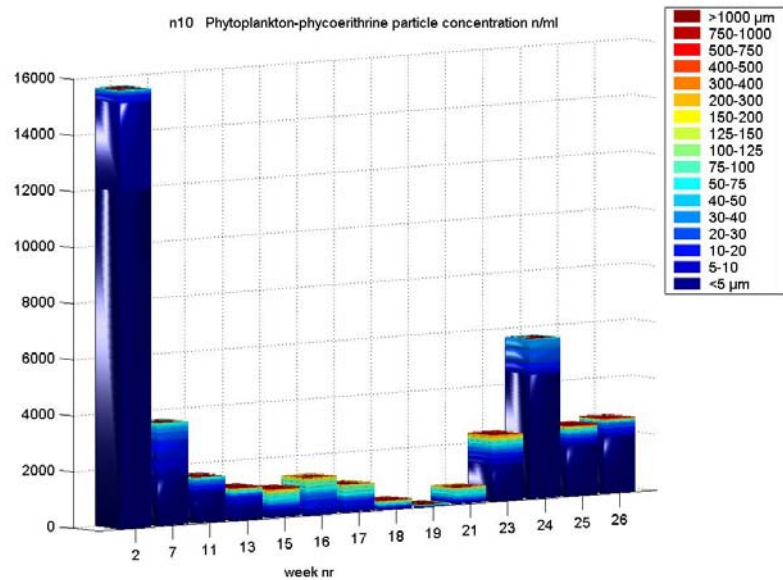


FIGUUR 3.1.6
Totale LinFLS/ml per
lengtefractie Noordwijk 10

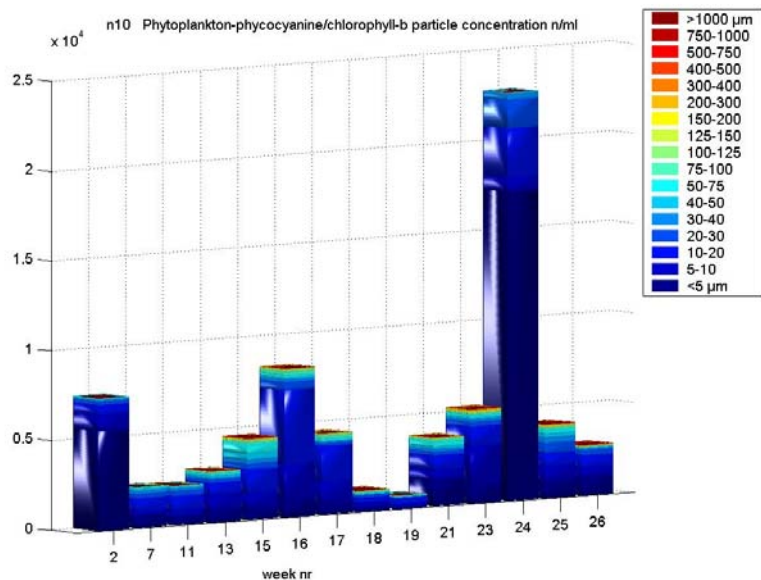


De concentraties van deeltjes met chlorofyl-a EN **fycobilliproteinen** uitgesplitst in 17 groottefracties ($n_{(FGR>0\&FGO>0)}/ml$.fractie) is gepresenteerd in FIGUUR 3.1.7 en de concentraties van deeltjes met chlorofyl-a EN **fycocyaninen-chlorofyl-b** in FIGUUR 3.1.8.

FIGUUR 3.1.7
Absolute
deeltjesconcentratie van
deeltjes met FGR & FGO



FIGUUR 3.1.8
Absolute
deeltjesconcentratie van
deeltjes met FGR & FRR



3.1.3 Snelle microscopische analyse

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

TABEL 3.1

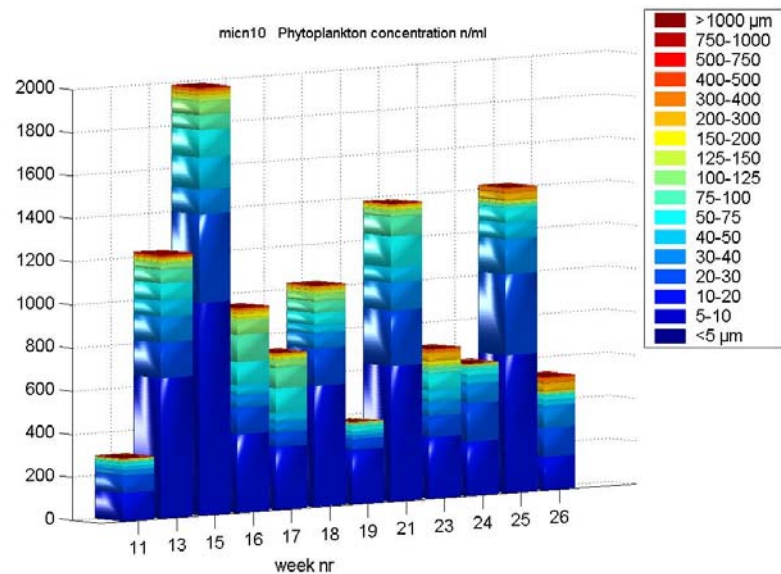
Resultaten van de
snelle microscopische
tellingen

NOORDWIJK 10 - 2002	Week no.													
Algensoort	2	7	11	13	15	16	17	18	19	21	23	24	25	26
Actionoptychus senarius	++													
Brockmanniella brockmannii		+++						+				++		
Cerataulina pelagica			+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++			
Chaetoceros socialis			+++	+++	+++	+		++		++		++	+++	
Craspedomonadaceae								+						
Cylindrotheca closterium			+					+						
Delphineis minutissima		+++		+				+				++		
Diplopsalis gr.						+								
Ditylum brightwellii			+					+						
Eucampia zoodiacus			+					+						
Guinardia flaccida					++	+	+							
Lauderia annulata								+	+	++				
Leptocylindricus danicus											+++			
Leptocylindricus minimus										++				
Myrionecta rubra					+									++
Odontella sinensis								+						
Paralia marina	+++	++						++				++		
Plagiogrammopsis vanheurckii		+	+											
Pleurosigma angulatum												+		
Preperidinium meunieri									++					
Protoperidinium 30 - 50 µm					+				+					
Protoperidinium bipes													+	
Protoperidinium conicum										+				
Pseudonitzschia fraudulenta													+	
Pseudonitzschia pungens cf			+++	+++	+++	+++			++	+++				
Pyramimonas	+													
Rhaphoneis amphiceros		+		+										
Rhizosolenia delicatula			+		+	+		+++	+++	+++	+++		++	+++
Rhizosolenia setigera												+	+	
Rhizosolenia shrubsolei					++	++	+++	+++	+		+++	+	+++	+++
Rhizosolenia stolterfothii						+								
Roperia tessellata	+													
Scenedesmus												+		
Scripsiella												+	+	
Thalassionema nitzschioides	+++	+	+											
Thalassiosira <30 µm	+++	+++	+++					+			+	+++	++	
Thalassiosira 30-80 µm		++										+		
Thalassiosira punctigera		+												

3.1.4 Fytoplanktonconcentratie van deeltjes groter dan 10 µm

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

FIGUUR 3.1.9
Absolute
deeltjesconcentratie van
deeltjes **groter dan 10 µm**
met FGR (chlorofyl-a)



3.2 Noordwijk 2

3.2.1 Algemene trends

De **concentratie autotrofe deeltjes** op Noordwijk 2 vertoont een vergelijkbaar verloop als op Noordwijk 10. In januari en juni worden de hoogste concentraties gevonden (respectievelijk ca 16000 en 29000 d/ml) voornamelijk veroorzaakt door kleine deeltjes <10 µm). In de ertussen gelegen weken neemt het aandeel grotere deeltjes toe. De totaalconcentratie in het voorjaar schommelt slechts rond de 5000 d/ml, wat laag is vergeleken met 2001, waarin gemiddeld driemaal hogere concentraties en in week 18 een concentratiepiek van 150.000 d/ml gevonden zijn. Meer overeenkomst wordt gevonden met het jaar 2000, waarbij net als in 2002 een hoge concentratiepiek ontbrak, hoewel de gemiddelde concentraties destijds in het voorjaar tweemaal hoger lagen. De concentraties deeltjes > 10 µm verkregen na concentrering/ fractionering laten de hoogste concentraties zien in weken 13 en 21, respectievelijk 1800 en 2300 d/ml. Het aandeel van de fracties neemt af naarmate deeltjes groter zijn.

De **biomassa** (linfgr/ml) heeft in de eerste helft van 2002 de hoogste waarde in week 16 (midden april) namelijk ca $3,4 \times 10^8$ a.u./ml en wordt vooral veroorzaakt door lange/grote deeltjes. Tot en met week 11 (half maart) is de biomassa laag, in week 13 wordt een hoge biomassa gevonden vooral veroorzaakt door grote/langere deeltjes. Na april fluctueert de biomassa en met een lage waarde in week 24 (eerste helft juni), waarbij het relatief grote aandeel kleine deeltjes opvalt. Ten opzichte van Noordwijk 10 valt op dat het aandeel van de allergrootste deeltjes op Noordwijk 2 kleiner is. De biomassa over de eerste helft van 2002 is minimaal tweemaal lager ten opzichte van de eerste helft van het jaar in 2001. Ten opzichte van 2000 is de biomassa ca tweemaal groter in 2002.

Het **biovolume** (uit linFLS/ml) kent net als op Noordwijk 10 de hoogste waarde in week 21 (half mei) met een waarde van $1,4 \times 10^8$ au/ml wat 2,5 hoger is dan op Noordwijk 10. In het voorjaar is de verdeling van alle groottefracties ongeveer dezelfde, maar in het begin van het jaar en eind juni is de fractie van kleinere deeltjes hoger.

De **concentratie deeltjes met fycobilliproteinen** (fycoerithrine) is het hoogst in januari (ca 10.000 d/ml) vooral ten gevolge van kleinere deeltjes < 10 µm. Daarna loopt de concentratie gestaag af via 6000 d/ml in februari tot lager dan 2000 d/ml in de periode maart tot juni, waarna de concentratie weer stijgt. Midden juni wordt een waarde van 6000 d/ml bereikt, vooral veroorzaakt door deeltjes kleiner dan 5 µm en bijna identiek aan de gelijktijdige situatie op Noordwijk 10. De concentraties in 2002 zijn in januari hoger (ca driemaal) dan in 2001 en nagenoeg gelijk in juni.

De **concentratie deeltjes met fycocyanine-chlorofyl-b** vertoont een grillig verloop met concentraties, die fluctueren tussen 3000 tot 8000 d/ml tot midden juni. In juni stijgt de concentratie tot een waarde van 16.000 d/ml. In 2001 is het concentratieverloop goed vergelijkbaar en werd ook in exact dezelfde week een bloeipiek waargenomen, die 1,5 maal hoger was dan in 2002.

Uit de **microscopische snelle analyseresultaten** valt op dat de soorten *Brockmanniella brockmannii* (wk 7, wk 11), *Cerataulina pelagica* (wk 13-22), *Chaetoceros socialis* (wk 11-24), *Delphineis minutissima* (wk 2-13, wk 24),

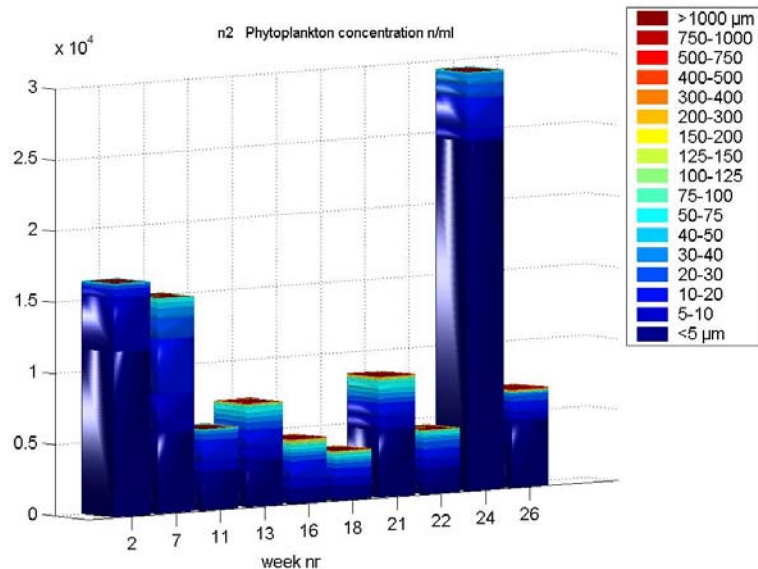
Pseudonitzschia pungens cf. (wk 13-22), *Rhizosolenia delicatula* (wk 16-22), *Rhizosolenia shrubsolei* (wk 16-24) en tenslotte *Thalassiosira* <30 µm (wk 2-11, wk 24) dominant (>5% aantal van totaal) aanwezig zijn. Deze soorten zijn ook gevonden op Noordwijk 10. De concentratie van deeltjes >10 µm, die bepaald zijn uit flowcytometrische gegevens, varieert in deze periode tussen 200/ml en 2300/ml.

3.2.2 Flowcytometrische fytoplanktonconcentraties Noordwijk 2

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

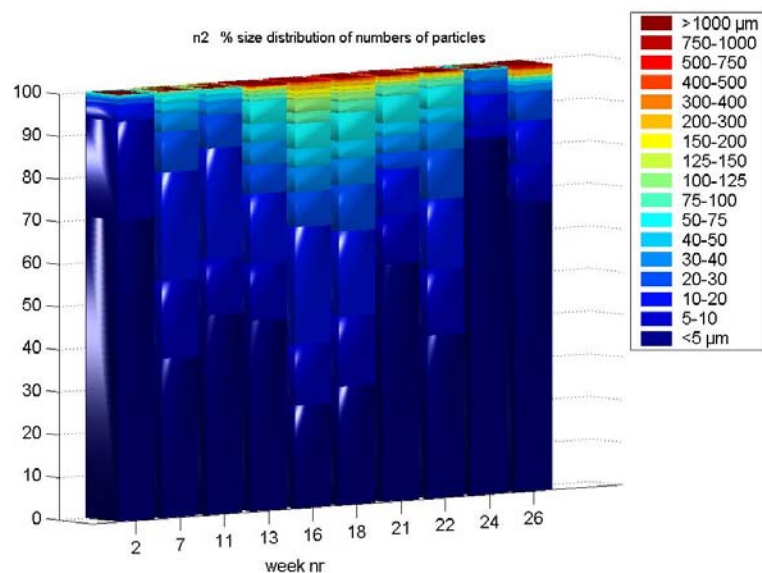
FIGUUR 3.2.1

Concentratie autotrofe deeltjes (met chlorofyl-a) per lengtefractie



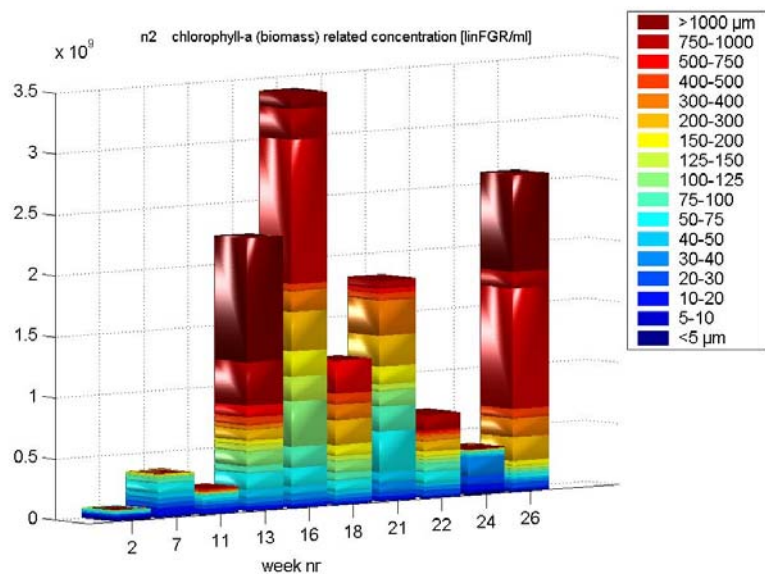
FIGUUR 3.2.2

% Aantal autotrofe deeltjes met chlorofyl-a per lengtefractie

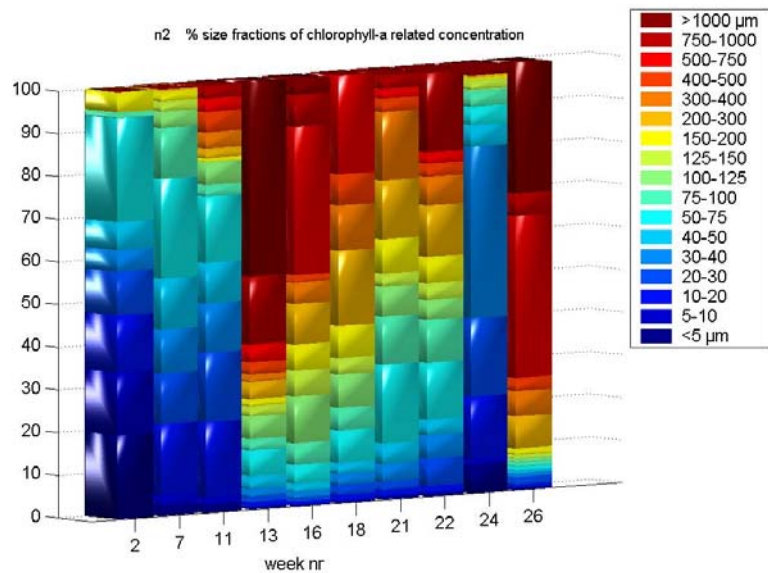


De **chlorofyl-a/ml concentraties** (biomassa) of flowcytometrische linFGR/ml variabele is uitgesplitst in 17 groottefracties (linFGR/ml.fractie) (FIGUUR 3.2.3) en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentratie chlorofyl-a/ml uitgesplitst in 17 groottefracties in FIGUUR 3.2.4.

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

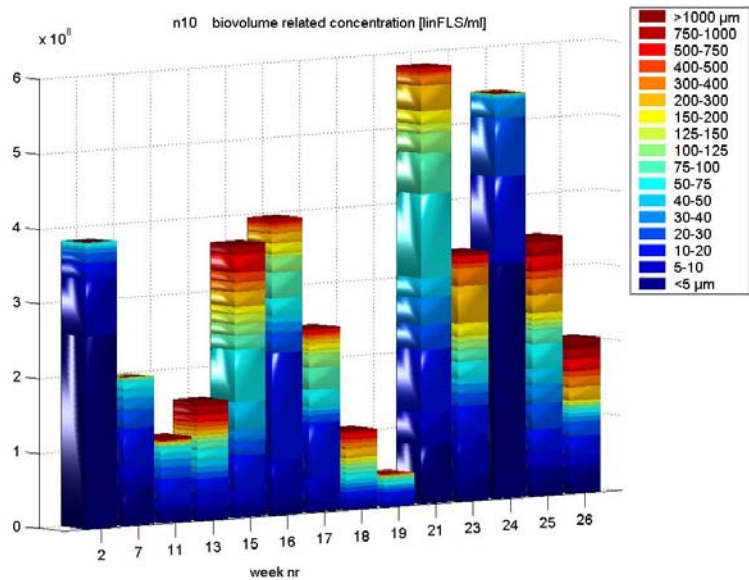


FIGUUR 3.2.4
% LinFGR/ml per
lengtefractie Noordwijk 2

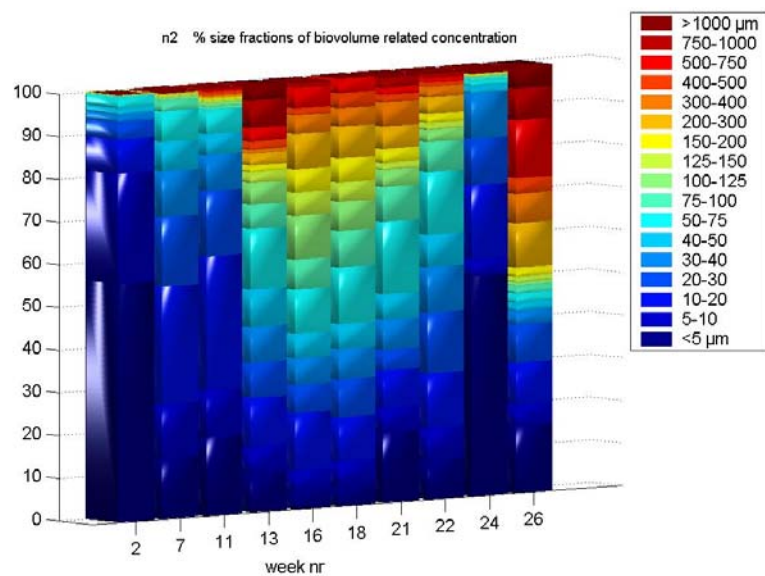


De **biovolumeconcentraties** (van deeltjes met chlorofyl-a)/ml uitgesplitst in 17 groottefracties (linFLS/ml.fractie) is weergegeven in FIGUUR 3.2.5 en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentratie biovolume/ml uitgesplitst in 17 groottefracties (% linFLS/ml.fractie/totaal-linFLS/ml)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

FIGUUR 3.2.5
Totale LinFLS/ml per
lengtefractie Noordwijk 2

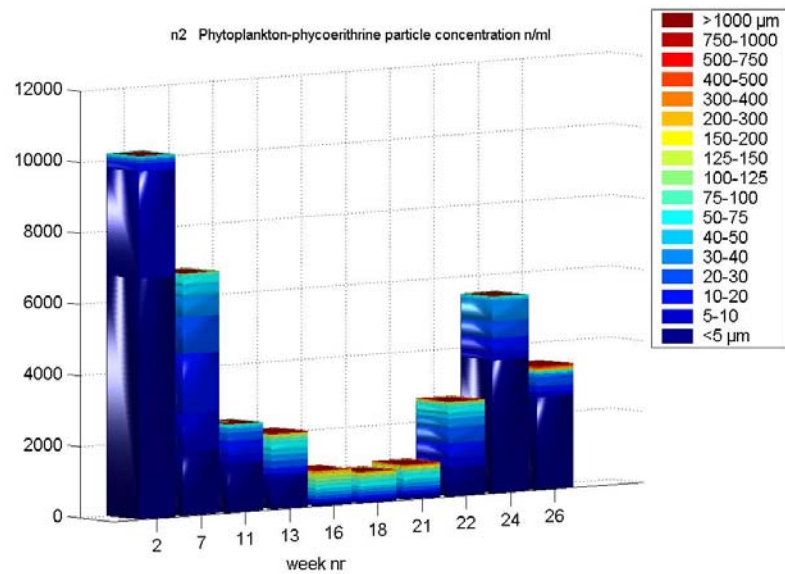


FIGUUR 3.2.6
% LinFLS/ml per
lengtefractie Noordwijk 2

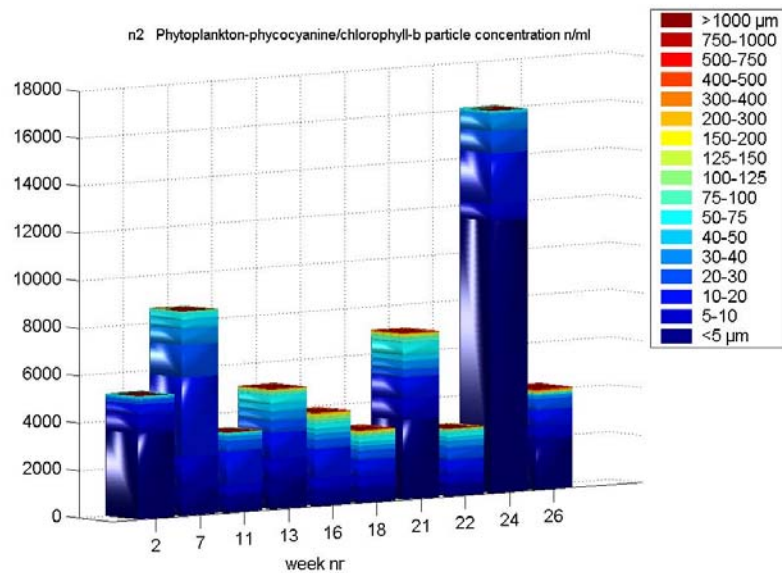


De concentraties van deeltjes met chlorofyl-a EN **fycobilliproteinen** uitgesplitst in 17 groottefracties ($n_{(FGR>0\&FGO>0)}/ml$.fractie) is gepresenteerd in FIGUUR 3.2.7 en de concentraties van deeltjes met chlorofyl-a EN **fycocyaninen en chlrofyl-b** in FIGUUR 3.2.8.

FIGUUR 3.2.7
Absolute
deeltjesconcentratie van
deeltjes met FGR & FGO



FIGUUR 3.2.8
Absolute
deeltjesconcentratie van
deeltjes met FGR & FRR



3.2.3 Resultaten snelle microscopische analyse

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

TABEL 3.2

Resultaten van de snelle microscopische tellingen

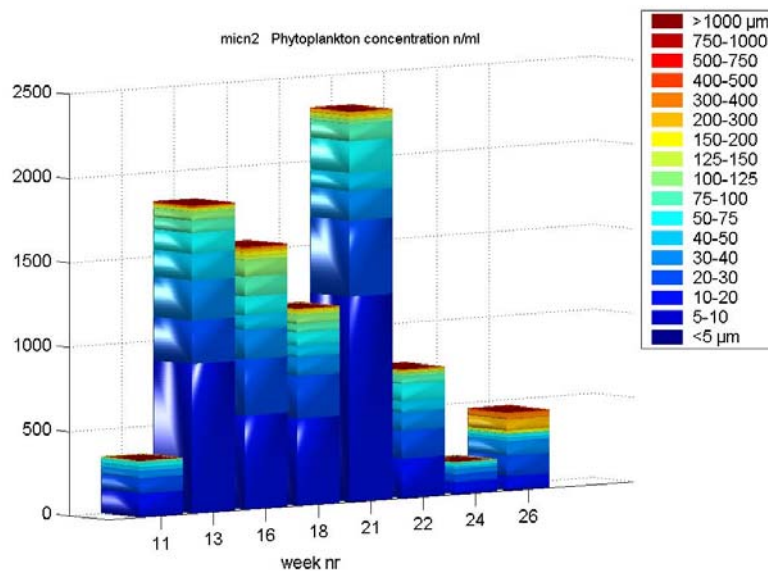
NOORDWIJK 2 - 2001	Week no.									
Algensoort	2	7	11	13	16	18	21	22	24	26
Actionoptychus senarius	+									
Brockmanniella brockmannii	+	+++	+++	+						
Cerataulina pelagica			+	+++	+++	+++	+++	+++		
Chaetoceros										+
Chaetoceros debilis	+									
Chaetoceros socialis			++	+++	++	+	+++	+	++	
Chlorophyceae	+									
Chrysochromulina									++	
Cylindrotheca closterium				+						
Delphineis minutissima	++	+++	++	++		+			++	
Diplopsalis gr.						+				
Ditylum brightwellii			++							
Eucampia zoodiacus					+	+		++		
Eunotogramma dubium			+							
Guinardia flaccida					+++					
Heterocapsa triquetra									+	
Lauderia annulata				+		+	+++	+	+	
Leptocylindricus danicus							+	+++		
Myrionecta rubra								+		++
Odontella aurita		+							+	
Odontella sinensis					+					
Paralia marina	+++	+	+							
Plagiogrammopsis vanheurckii		+	++							
Pleurosigma	+									
Protoperidinium bipes									+	
Pseudonitzschia pungens cf.			+	+++	+++		+++	+++		
Rhaphoneis amphiceros								+		
Rhizosolenia delicatula					+++	+++	+++	+++		+++
Rhizosolenia setigera						+		+	+	
Rhizosolenia shrubsolei					+++	+++		+++	++	+++
Scenedesmus									+	
scrippsiella									++	+
Thalassionema nitzschioides	+++	++	++							
Thalassiosira <30 µm	+++	+++	+++						+++	
Thalassiosira 30-80 µm		+								
Thalassiosira levanderi				+					++	
Thalassiosira rotula							+			

3.2.4 Fytoplanktonconcentratie van deeltjes groter dan 10 µm

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

FIGUUR 3.2.9

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



3.3 Terschelling 135

3.3.1 Algemene trends

De **totaalconcentratie deeltjes** met chlorofyl-*a* is stijgt in het begin van jaar naar een maximumconcentratie van 12000 d/ml eind maart hoofdzakelijk door de bijdrage van kleine deeltjes (vooral < 5 µm). Vervolgens daalt het aandeel kleine deeltjes en fluctueert de concentratie in de periode vanaf april tot en met juni tussen 800-2200 d/ml. In deze periode blijft het aandeel kleine deeltjes laag vergeleken met het begin van het jaar. Ten opzichte van 2001 en 2000 zijn de concentraties vergelijkbaar, maar zijn in de vorige jaren bloeipieken (>5000 d/ml) opgetreden, die in 2002 ontbreken. Voor de deeltjes > 10 µm na fractionatie/concentratie wordt de maximum concentratie half april (wk 16) gevonden (430 d/ml), maar zijn in de overige perioden de concentraties laag (<100 d/ml), vanaf half mei tot en met juni < 50 d/ml).

De **biomassa-concentratie** (LinFGR/ml) neemt in het begin van het jaar langzaam toe en heeft een maximum half april (ca 7×10^8 au/ml), gelijktijdig met de hoogste concentratie deeltjes > 10 d/ml. Vooral de bijdrage van grote lange deeltjes draagt in wk 16 bij aan de totale biomassa. Ook is de bijdrage van grote deeltjes opvallend hoog in week 17 en wk 22. Vanaf half mei zit de biomassa op een waarde vergelijkbaar met het begin van het jaar. Ten opzichte van 2001 en 2000 worden hogere biomassa's gevonden, wat vooral veroorzaakt lijkt te worden door meer grote/ lange deeltjes op Terschelling 135 in 2002 dan in 2001 en 2000.

Het **biovolume (linFLS/ml)** toont een enigszins vergelijkbare trend als de totaalconcentratie, alleen komt de bijdrage van grotere fracties iets duidelijker naar voren. De verschillen tussen de weken van de biovolumeconcentraties zijn daardoor minder groot (max vs gemidd.: factor 3) dan bij de totaalconcentraties (max vs gemidd.: factor 6)

Het verloop van autotrofe **deeltjes met fycoerithrine** wordt vooral gekenmerkt door de deeltjesfractie < 5 µm en is het hoogst eind maart en half april (ca 4500 d/ml). In de overige periode ervoor en daarna is de concentratie laag (< 500 d/ml). Het relatieve aandeel van deeltjes met fycoerithrine aan de totale concentratie autotrofe deeltjes is eind maart 70% en is in de overige perioden < 40%. Vorig jaar (2001) werd een bloeipiek in januari van dezelfde orde grootte geconstateerd, in 2000 waren de concentraties gedurende ca 3000 d/ml en meer uitgemiddeld over de eerste vier maanden.

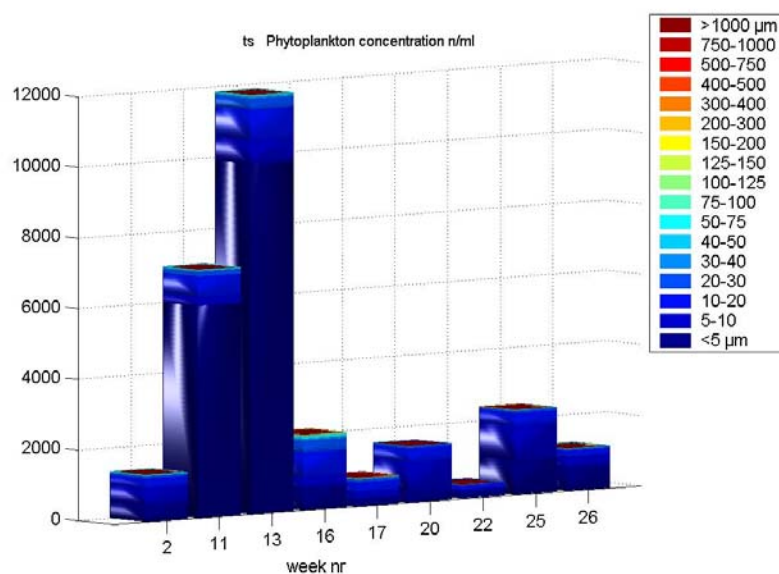
De concentratie van **autotrofe deeltjes met fycocyanine** volgt exact het verloop van de totaalconcentratie, alleen liggen concentraties lager.

Uit de **microscopische snelle tellijsten** volgt dat de soorten *Chaetoceros socialis* (wk 16-17), *Delphineis minutissima* (wk 11, wk 13), *Protoperdinium steinii* (wk 20 wk 22), *Pseudonitzschia delicatissima* cf (wk 11, wk 13), *Rhizosolenia alata* (wk 22-25), *Rhizosolenia delicatula* (wk 17-22), *Rhizosolenia hebetata* f. *semispina* (wk 16-22), *Thalassionema nitzschioides* (wk 2, wk 13, wk 16), *Thalassiosira* <30 µm (wk 2, wk 13, wk 16). De gevonden flowcytometrische concentraties geselecteerd op fytoplankton > 10 µm, schommelt tussen 430 (half april) juli tot ca 10/ml (half mei).

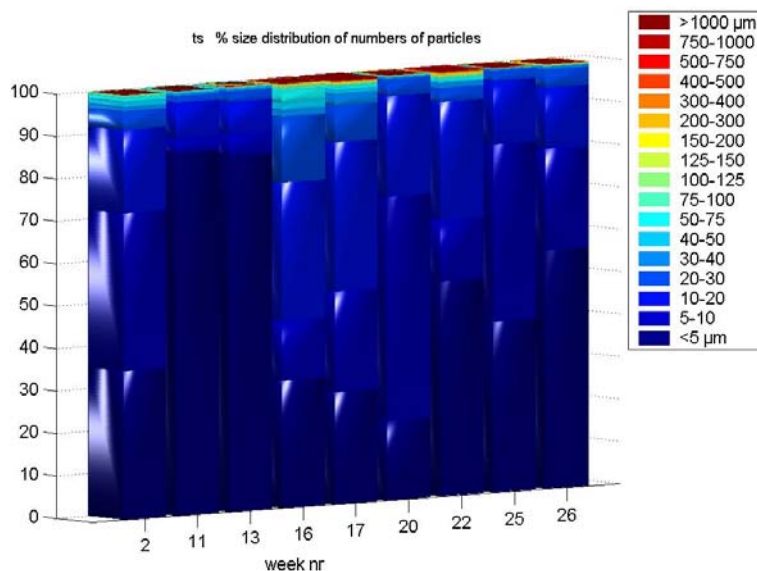
3.3.2 Flowcytometrische fytoplanktonconcentraties Terschelling 135

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

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

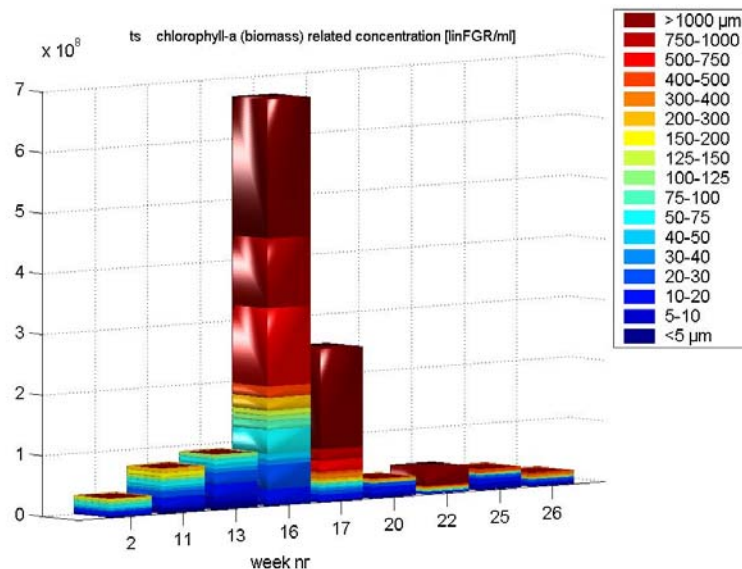


FIGUUR 3.3.2
% Aantal autotrofe deeltjes
met chlorofyl-a per
lengtefractie

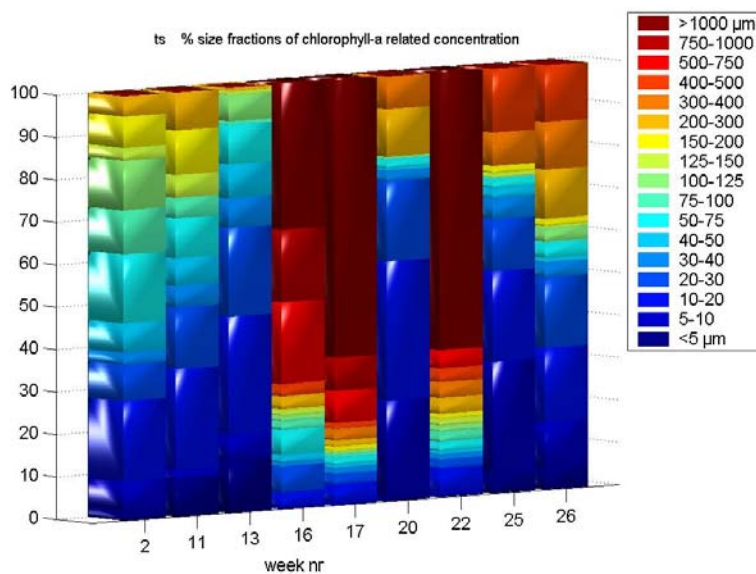


De **chlorofyl-a/ml concentraties** (biomassa) of flowcytometrische linFGR/ml variabele is uitgesplitst in 17 groottefracties (linFGR/ml.fractie) (FIGUUR 3.3.3) en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentratie chlorofyl-a/ml uitgesplitst in 17 groottefracties (% linFGR/ml.fractie/totaal-linFGR/ml)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

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

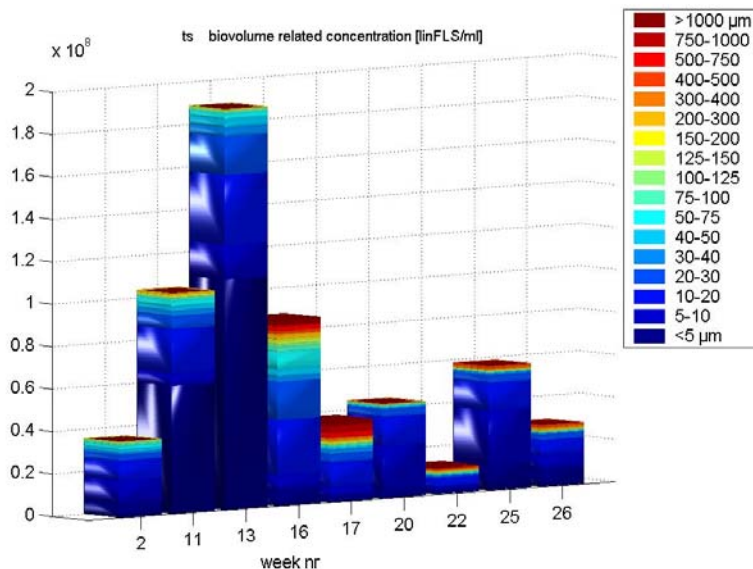


FIGUUR 3.3.4
% LinFGR/ml per
lengtefractie

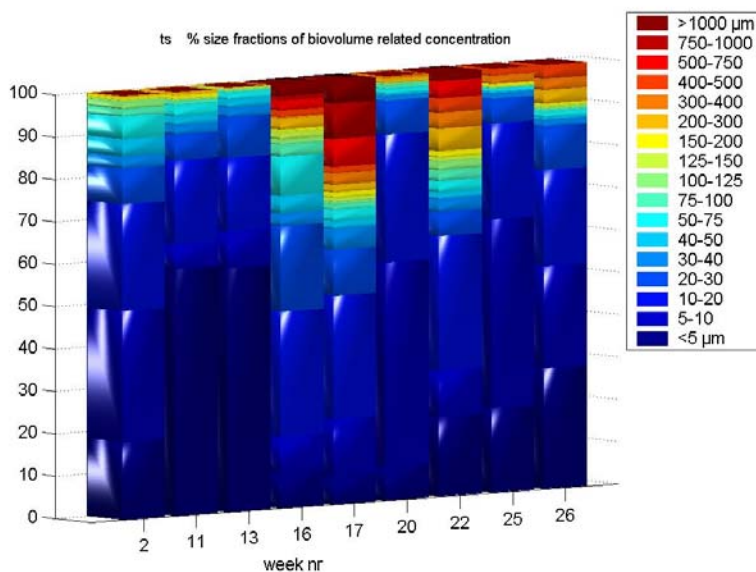


De **biovolumeconcentraties** (van deeltjes met chlorofyl-a)/ml uitgesplitst in 17 groottefracties (linFLS/ml.fracties) is weergegeven in FIGUUR 3.3.5 en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentratie biovolume/ml uitgesplitst in 17 groottefracties (% linFLS/ml.fractie/totaal-linFLS/ml)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

FIGUUR 3.3.5
totale LinFLS/ml per
lengtefractie

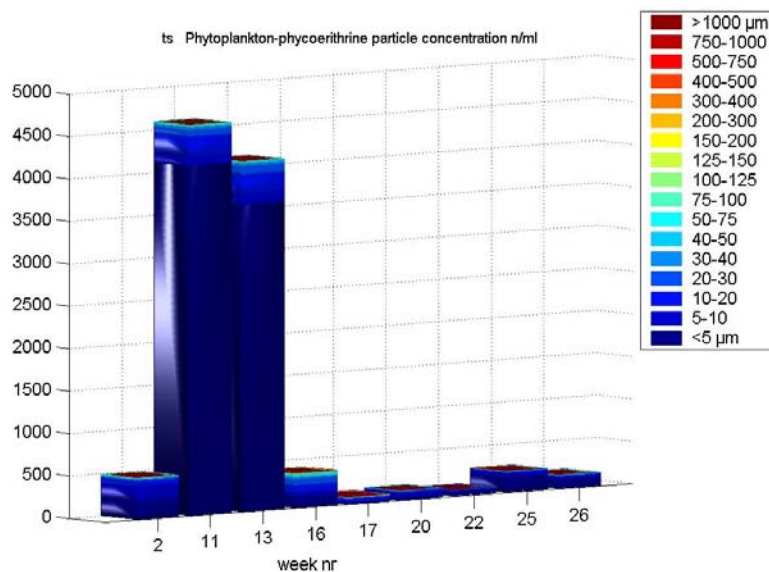


FIGUUR 3.3.6
% LinFLS/ml per
lengtefractie

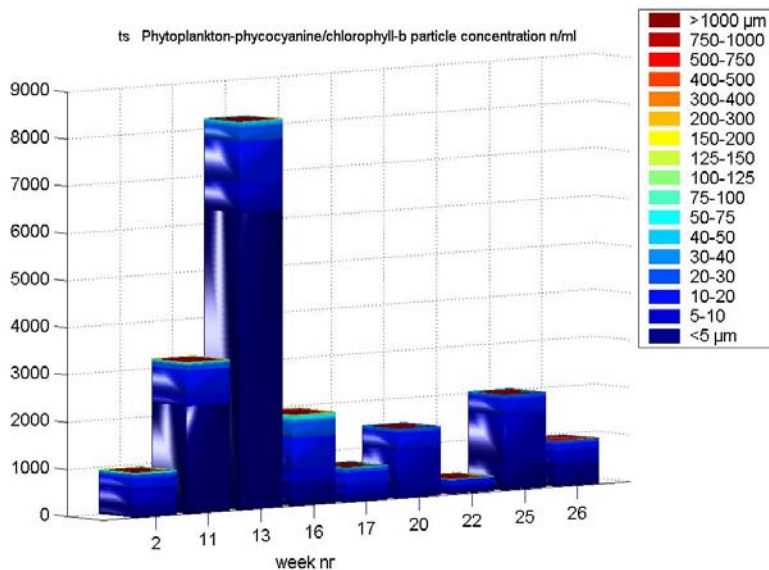


De concentraties van deeltjes met chlorofyl-a ËN **fycobilliproteïnen** uitgesplitst in 17 groottefracties ($n_{(FGR>0\&FGO>0)}/ml$.fractie) is gepresenteerd in FIGUUR 3.3.7 en de concentraties van deeltjes met chlorofyl-a ËN **fycocyaninen en chlorofyl-b** in FIGUUR 3.3.8.

FIGUUR 3.3.7
Absolute
deeltjesconcentratie van
deeltjes met FGR & FGO



FIGUUR 3.3.8
Absolute
deeltjesconcentratie van
deeltjes met FGR & FRR



3.2.4 Resultaten snelle microscopische analyse

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

TABEL 3.3

Resultaten van de snelle microscopische tellingen

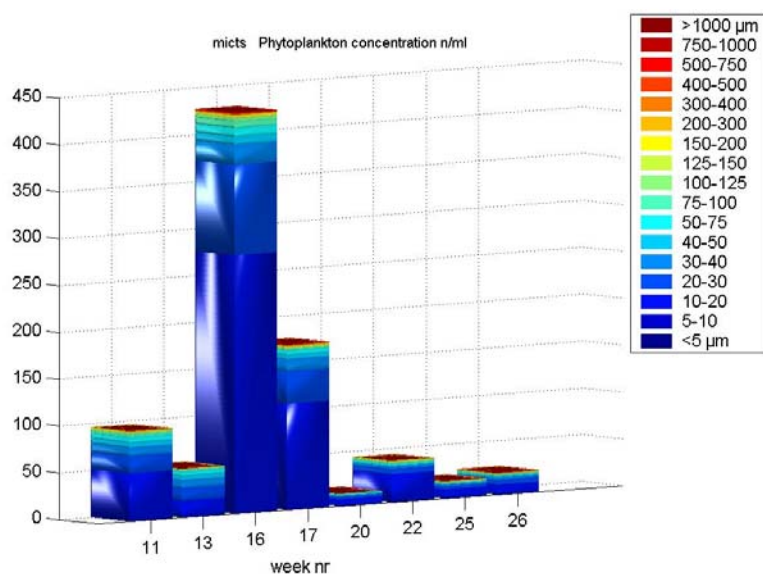
TSLG135 - 2001	Week no.								
Algensoort	2	11	13	16	17	20	22	25	26
Asterionella glacialis		+							
Brockmanniella brockmannii		+	+						
Cerataulina pelagica							++		
Ceratium furca						+	+	++	+++
Ceratium fusus									++
Ceratium horridum						++	+		
Ceratium macroceros								+	
Ceratium tripos						++			
Chaetoceros debilis				+					
Chaetoceros socialis				+++	+++				
Chrysochromulina								++	
Craspedomonadaceae							+		
Cylindrotheca closterium			+++						
Delphineis minutissima	+	+++	+++						
Dinophyceae cyste						++			
Dinophysis norvegica						+			
Dinophysis rotundata						+	+		++
Ditylum brightwellii		+	+						
Entomoneis		+	++						
Fragilidium subglobosum									++
Glenodinium danicum					+				
Gonyaulax spinifera						+			
Gymnodinium						+		+	
Lauderia annulata		+		+++	+				
Leptocylindricus danicus							++		
Leptocylindricus minimus							++		
Mesoporos perforatus								++	+
Myrionecta rubra			+	+++					
Navicula distans	+		+						
Paralia marina	+		+						
Phaeocystis flagellaat						+	+		
Phaeocystis kolonie				++					
Pleurosigma	++			+					
Pleurosigma angulatum			++						
Podosira stelliger	+								
Protoceratium reticulatum						+	+		
Protoperidinium brevipes			+						
Protoperidinium pellucidum					+				
Protoperidinium steinii						+++	+++		+
Protoperidinium subinermis		+				+	+		
Pseudonitzschia delicatissima cf		+++	+++		+				
Rhaphoneis amphiceros	+	+	+						
Rhizosolenia alata					+	++	+++	+++	+++
Rhizosolenia delicatula					+++	+++	+++		
Rhizosolenia hebetata f. semispina				+++	+++	+++	++		
Rhizosolenia shrubsolei							+++	+	
Scrippsiella						+	++	+	
Spatulodinium pseudonociluca						+			
Thalassionema nitzschioides	+++	+++	++						
Thalassiosira <30 µm	+++	+++	++						
Thalassiosira 30-80 µm		+++							
Triceratium alternans		+							

3.3.4 Fytoplanktonconcentratie van deeltjes groter dan 10 µm

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

FIGUUR 3.3.9

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



3.4 Schaar van Ouden Doel

3.4.1 Algemene trends

De **totaalconcentratie** van autotrofe deeltjes (met chlorofyl-a) neemt in de eerste helft van 2002 toe met het weeknummer (op een lichte bloeipiek na half april) en heeft een maximum eind juni (wk 25) van 34.000 d/ml. De fracties < 20 µm dragen hoofdzakelijk bij aan de totaalconcentratie, maar het aandeel grotere deeltjes is hoger dan wordt waargenomen op de 'zee-lokaties'. Ten opzichte van 2001 liggen de maximumconcentraties ca tweemaal lager in 2002 en 1,5-maal lager ten opzichte van 2000.

De **biomassa** of chlorofyl-a concentratie (linFGR/ml) neemt gestaag toe vanaf januari ($1,5 \times 10^8$ au/ml) tot en met juni (9×10^8 au/ml) met één opvallende biomassapijk in week 11 ten gevolge van (één ?) groot/grote deeltjes. Opvallend is, net als in vorige jaargangen dat de middelgrote fracties duidelijk bijdragen aan de totale biomassa en nauwelijks de grootste fracties zoals kenmerkend is voor 'zeelokaties'. In mei (wk 19-23) is de verhouding tussen de groottefracties nagenoeg constant, daarvoor en daarna is het aandeel van de kleinere fracties iets groter. De biomassa's in 2002 zijn lager dan in 2001 en gelijk aan de biomassa's in 2000.

Het **biovolume-concentratieverloop** (LinFLS/ml) vertoont een gelijke trend met het totaalconcentratieverloop. Het aandeel kleine deeltjes is minder prominent aanwezig. Voorbeeld: Het relatieve aandeel van de fractie < 10 µm is bij de biovolume parameter gemiddeld ca 45 %, bij de totaal concentratie autotrofe deeltjes ca 70 %.

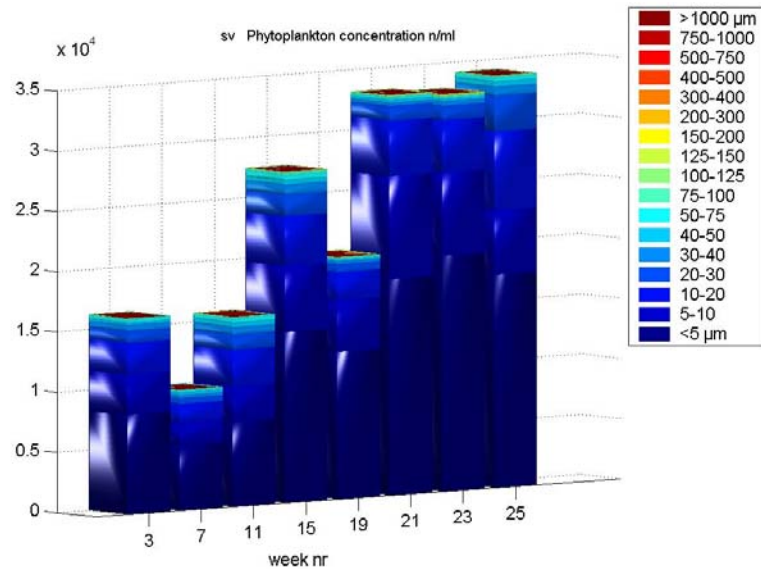
De **concentratie van deeltjes met fycobilliproteïnen** ligt rond een waarde van ca 3000 d/ml en heeft viermaal een verhoogde concentratiewaarde in januari (wk 2), in week 11, in week 15 en eind juni (wk 25). Gemiddeld is over het eerste halve jaar de bijdrage autotrofe deeltjes met phycobilliproteïnen 30% van de totale autotrofe deeltjesconcentratie en zit hier minder fluctuatie in dan de 'zeelokaties'. Ten opzichte van 2001 is de concentratie iets hoger en duurt dit langer, ten opzichte van 2000 is 2002 grilliger met de voorjaarsbloeipiek en de daarop volgende lagere concentratiewaarden, maar lijken de gemiddelde concentraties gelijk.

De **deeltjesconcentratie met fycocyanine/chlorofyl-b** wordt gekenmerkt door een constante toename van januari (ca 5000 d/ml) tot en met juni (ca 26.000 d/ml) via twee trappen van maart naar april (wk 11 naar 15) en van begin mei naar midden mei (van wk 19 naar 21). Het percentage van deze deeltjes ten opzichte van de totaal autotrofe deeltjesconcentratie neemt ook gestaag toe van 35% in januari naar ca 80% in juni. Concentraties in 2002 zijn een fractie lager dan in 2001.

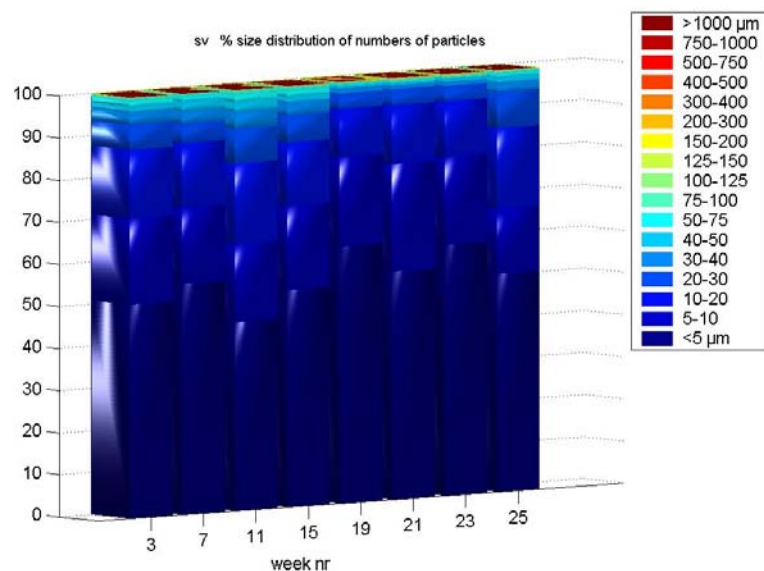
3.4.2 Flowcytometrische fytoplanktonconcentraties Schaar van ouden Doel

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

FIGUUR 3.4.1
Concentratie autotrofe
deeltjes (met chlorofyl-a)
per lengtefractie

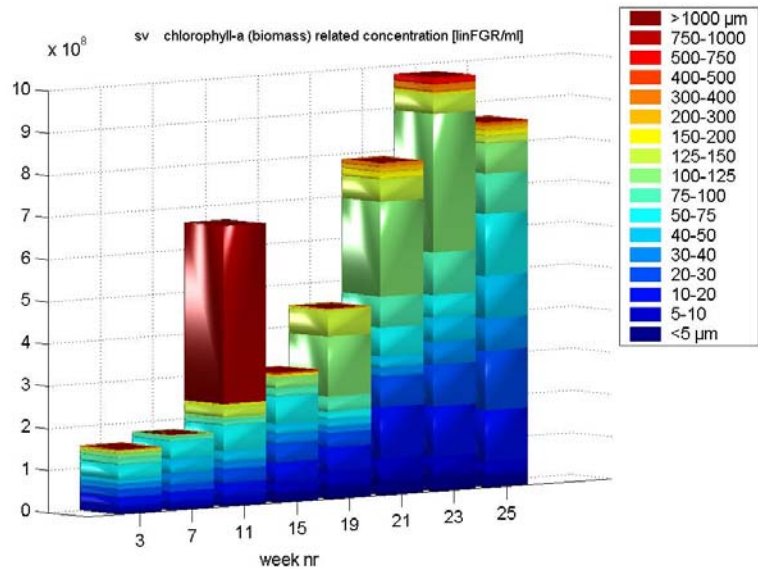


FIGUUR 3.4.2
% Aantal autotrofe deeltjes
met chlorofyl-a per
lengtefractie

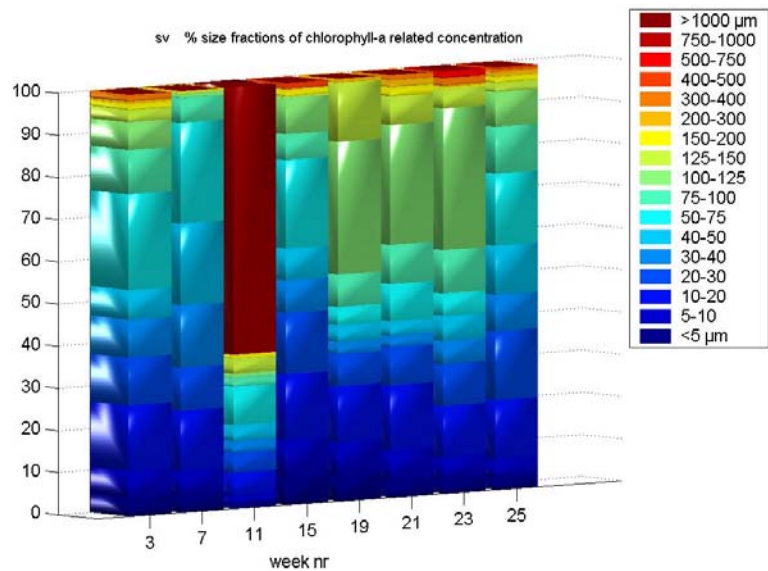


De chlorofyl-a/ml concentraties (biomassa) of flowcytometrise linFGR/ml variabele is uitgesplitst in 17 groottefracties (linFGR/ml.fractie) (FIGUUR 3.4.3) en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentratie chlorofyl-a/ml uitgesplitst in 17 groottefracties (% linFGR/ml.fractie/totaal-linFGR/ml)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

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

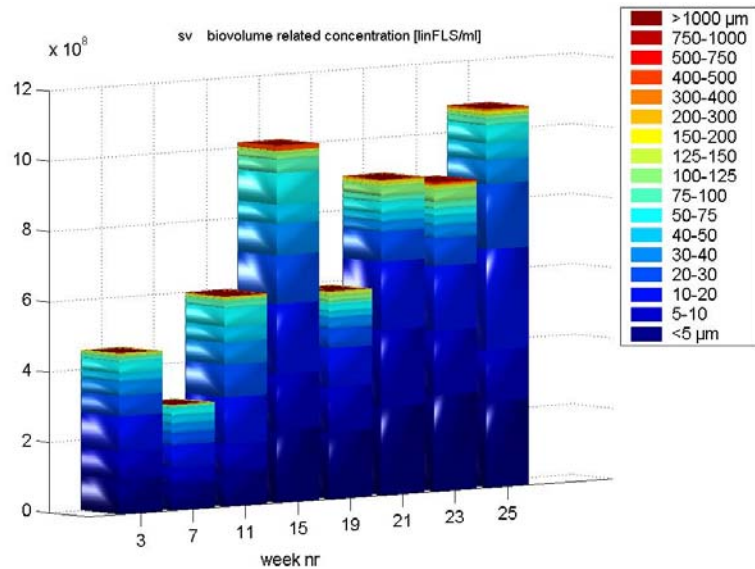


FIGUUR 3.4.4
% LinFGR/ml per
lengtefractie Schaar van
Oude Doel

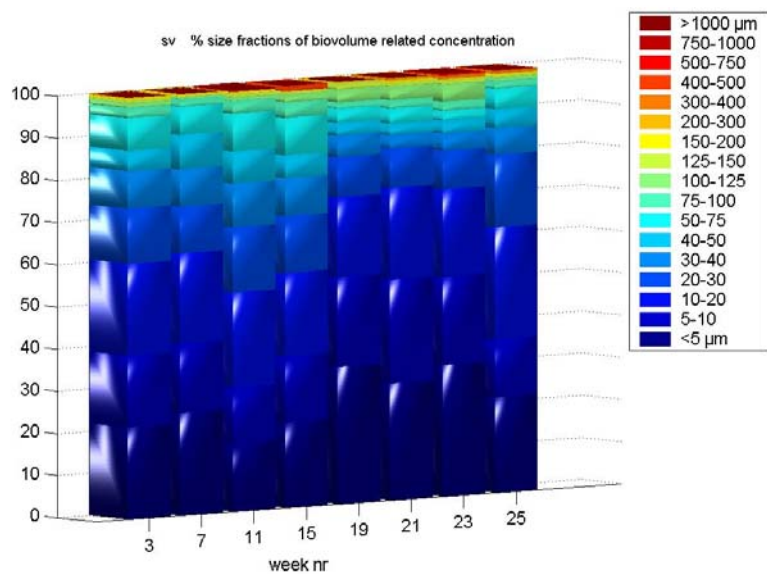


De biovolumeconcentraties (van deeltjes met chlorofyl-a)/ml uitgesplitst in 17 groottefracties (linFLS/ml.fractie) is weergegeven in FIGUUR 3.4.5 en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentratie biovolume/ml uitgesplitst in 17 groottefracties (% linFLS/ml.fractie/totaal-linFLS/ml) in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

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

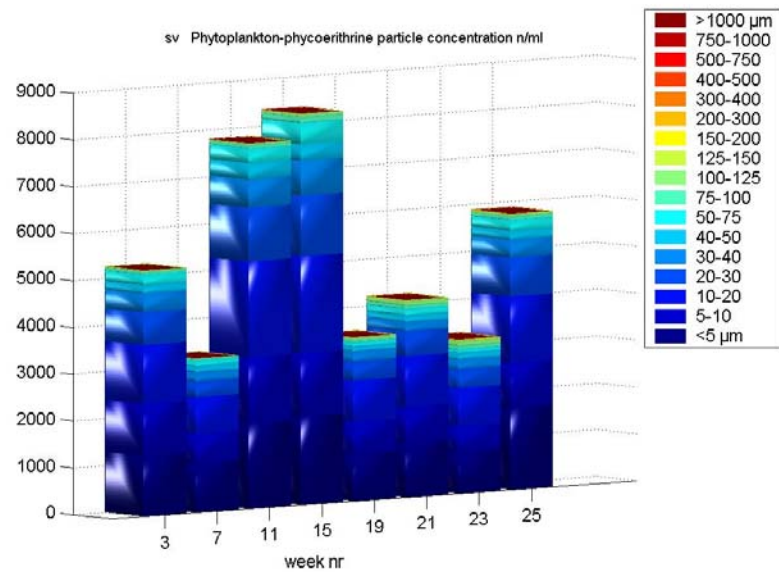


FIGUUR 3.4.6
% LinFLS/ml per
lengtefractie Schaar van
Oude Doel

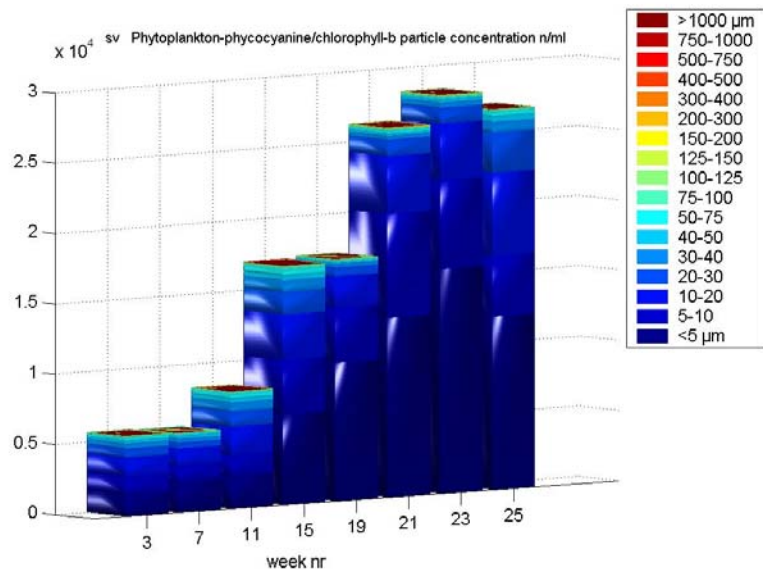


De concentraties van deeltjes met chlorofyl-a EN **fycobilliproteinen** uitgesplitst in 17 groottefracties ($n_{(FGR>0\&FGO>0)}/\text{ml.fractie}$) is gepresenteerd in FIGUUR 3.4.7 en de absolute concentratie deeltjes met met chlorofyl-a EN **fycocyanine en chlorofyl-b** uitgesplitst in FIGUUR 3.4.8.

FIGUUR 3.4.7
Absolute
deeltjesconcentratie van
deeltjes met FGR & FGO



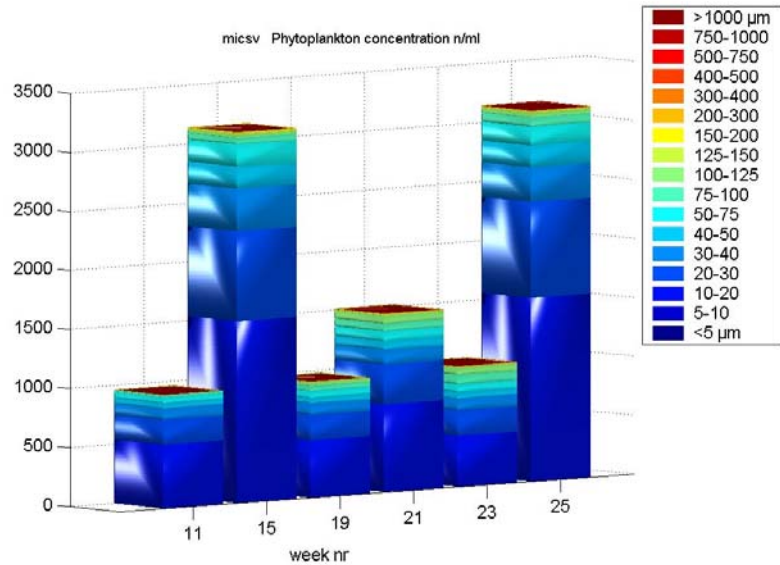
FIGUUR 3.4.8
Absolute
deeltjesconcentratie van
deeltjes met FGR & FRR



3.4.4 Fytoplanktonconcentratie van deeltjes groter dan 10 µm

De flowcytometrische totaalconcentraties van deeltjes met chlorofyl-a > 10 µm zijn uitgesplitst in 15 groottefracties (deeltjes/ml.fractie) in FIGUUR 3.4.9. De fracties < 5 µm en 5-10 µm zijn verwijderd uit de dataset.

FIGUUR 3.4.9
Absolute
deeltjesconcentratie van
deeltjes **groter dan 10 µm**
met FGR (chlorofyl-a)



3.5 Vlissingen

3.5.1 Algemene trends

*In januari (wk 3) wordt de hoogste **concentratie autotrofe deeltjes** van de eerste helft van het jaar 2002 op lokatie Vlissingen gevonden (26.000 d/ml). Daarna dalen de concentraties naar de laagste waarde begin mei (7500 d/ml) om vervolgens weer te stijgen naar de tweede hoogste concentratie eind juni (20.000 d/ml). De totaalconcentratie wordt vooral bepaald door deeltjes kleiner dan 20 μm . Ten opzichte van 2001 zijn de maximumconcentraties gelijk en waren in 2001 de concentraties in het voorjaar hoger. In 2000 liggen de concentraties in het begin van het jaar lager dan 2002 en over de rest van de periode ongeveer gelijk.*

*De **biomassa** (chlorofyl-a/ml of linFGR/ml) is in tegenstelling tot de deeltjesconcentratie in het begin van het jaar (van wk 3-11) laag. Half april (wk 15) wordt een forse verhoogde biomassa waargenomen, die de hoogste is op deze lokatie in het eerste halve jaar ($4,7 \times 10^9$ au/ml) en vooral door de drie grootste deeltjesfractie bepaald wordt. In de twee opeenvolgende meetdata in mei (wk 19 en 21) worden lage biomassa's waargenomen. In juni stijgt de biomassa wederom fors van $0,6 \times 10^9$ naar $3,5 \times 10^9$ au/ml vooral veroorzaakt door grotere deeltjes.. Ten opzichte van 2001 valt op dat de biomassa in het begin van het jaar ook zeer laag was, gevolgd door een plotselinge stijging van exact dezelfde ordegrootte. Daar waar de biomassa in 2002 in mei instort, blijft deze in 2001 aanwezig.*

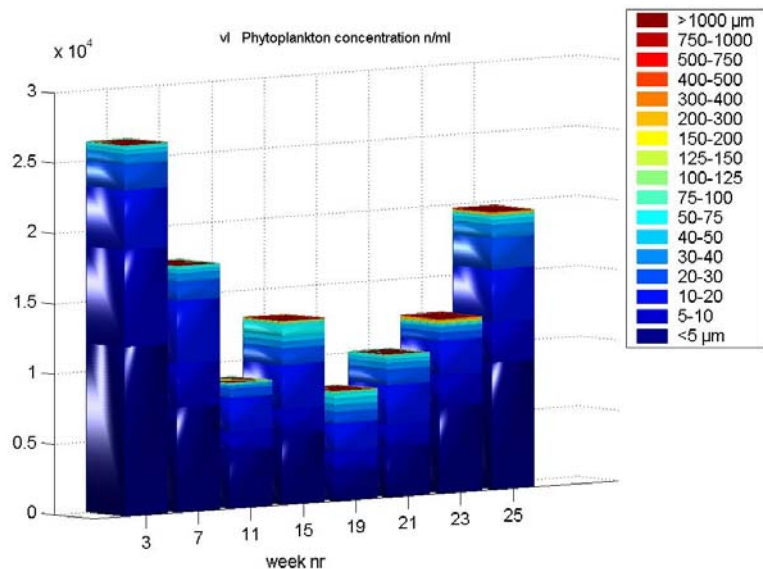
*Het **biovolume**verloop uitgedrukt in LinFLS/ml vertoont een iets afwijkende trend van de totale autotrofe deeltjesconcentratie. De maximumwaarde wordt in juni gevonden en de invloed van middelgrote deeltjes is duidelijker zichtbaar.*

*Het verloop van de concentratie van autotrofe **deeltjes met fycoerithrine** vertoont dezelfde trend als de totaalconcentratie autotrofe deeltjes. Alleen het percentage deeltjes met fycoerithrine is lager en schommelt tussen 20 en 45 % van de totaalconcentratie. Bij aanvang van het jaar is de concentratie het hoogst (ca 12.000 d/ml) daalt vervolgens naar ca 1500 d/ml half mei, stijgt daarna weer om te eindigen bij een concentratie van bijna 6000 d/ml eind juni. Ten opzichte van 2001 zijn de aantallen in de eerste weken van het jaar in 2002 ca tweemaal hoger dan in 2001, de erop volgende periode verschilt niet noemenswaardig. Wel wordt in 2001 eind juni een hoge concentratie waargenomen die in week 25 in 2002 (nog ?) niet wordt waargenomen. De concentratie autotrofe **deeltjes met fycocyanine-chlorofyl-b** schommelt van januari tot en met begin juni rond de 8000 d/ml. Er zijn geen opvallende uitschieters. Eind juni wordt een lichte verhoging geconstateerd (14.000 d/ml) vooral veroorzaakt door middelgrote deeltjes (20-30 μm). In 2001 werd eind juni nauwelijks een verhoging waargenomen, maar wel in mei, die in 2002 ontbrak. Het lijkt erop dat de fracties van de middelgrote deeltjes op deze lokatie groter zijn dan in 2001.*

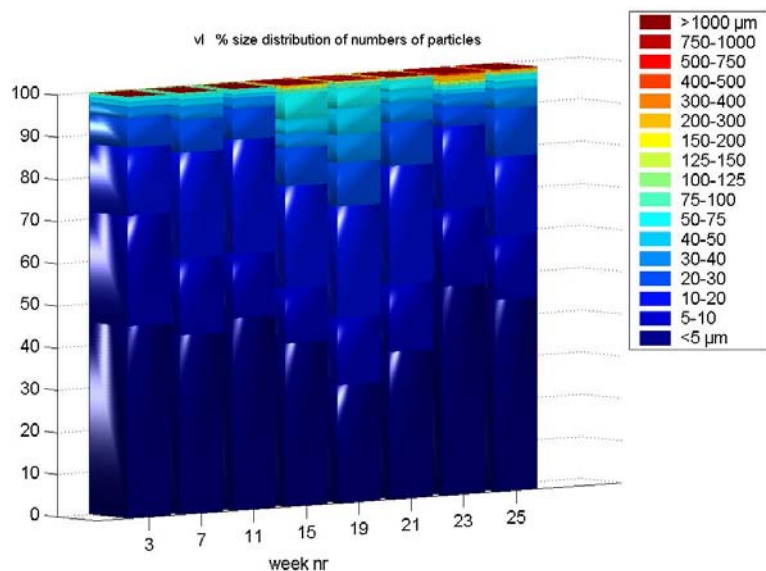
3.5.2 Flowcytometrische fytoplanktonconcentraties Vlissingen

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

FIGUUR 3.5.1
Concentratie autotrofe
deeltjes (met chlorofyl-a)

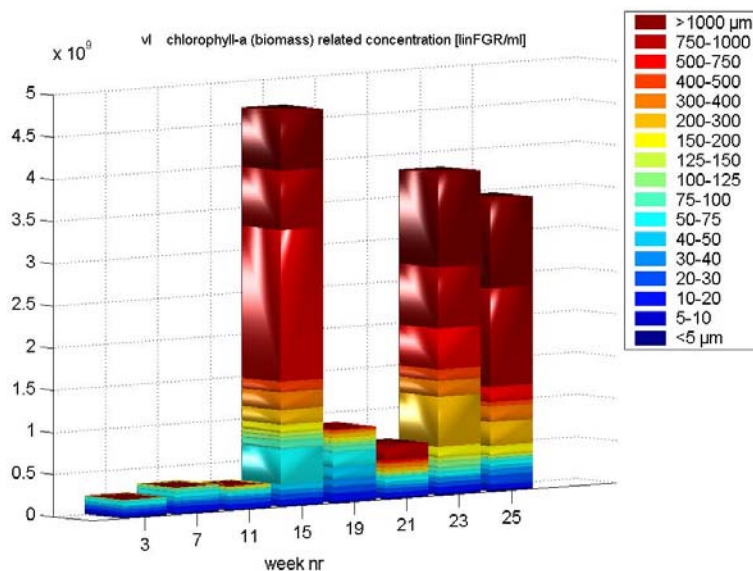


FIGUUR 3.5.2
% Aantal autotrofe
deeltjes met chlorofyl-a

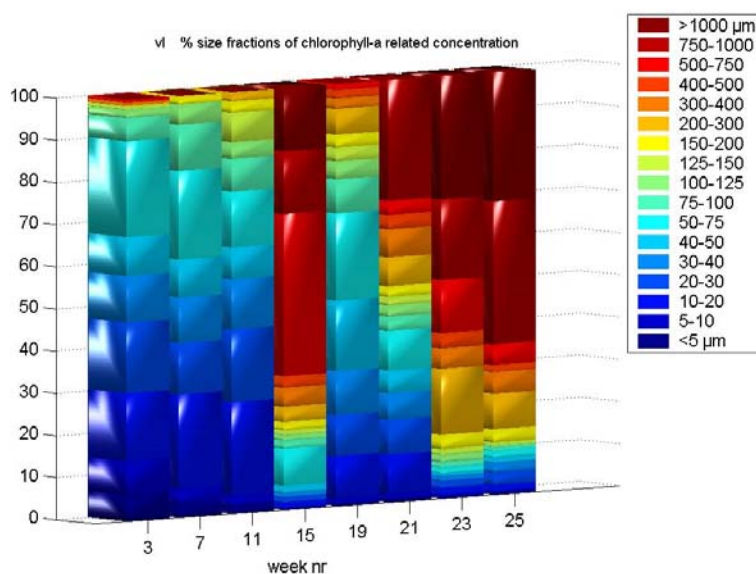


De **chlorofyl-a/ml concentraties** (biomassa) of flowcytometriscie linFGR/ml variabele is uitgesplitst in 17 groottefracties (linFGR/ml.fractie) (FIGUUR 3.5.3) en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentratie chlorofyl-a/ml uitgesplitst in 17 groottefracties (% linFGR/ml.fractie/totaal-linFGR/ml)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

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



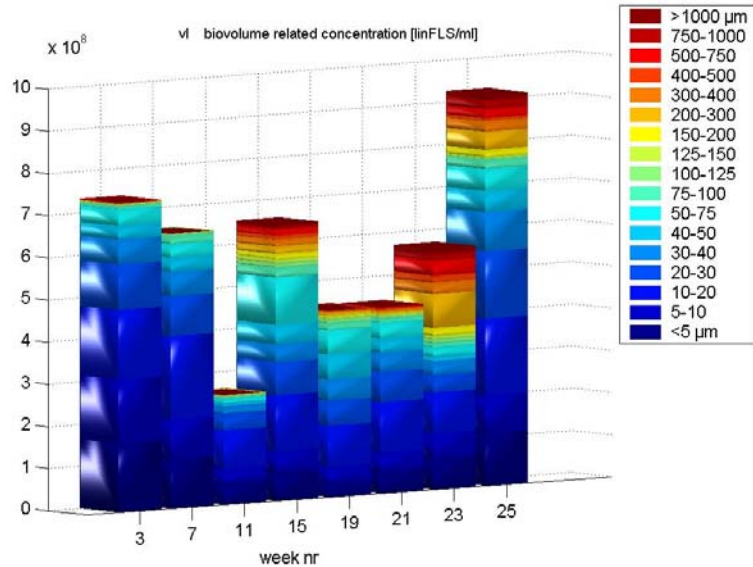
FIGUUR 3.5.4
% LinFGR/ml per lengte-
fractie



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

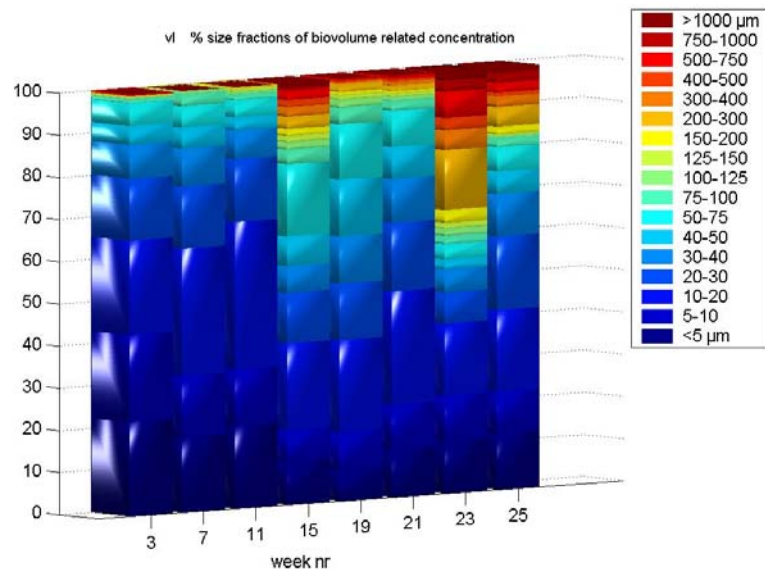
FIGUUR 3.5.5

Totale LinFLS/ml per lengtefractie



FIGUUR 3.5.6

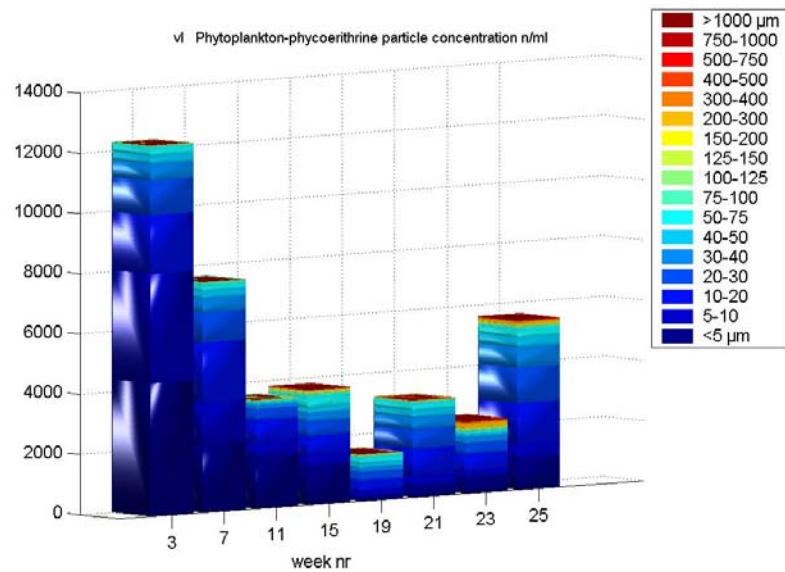
% LinFLS/ml per lengtefractie



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

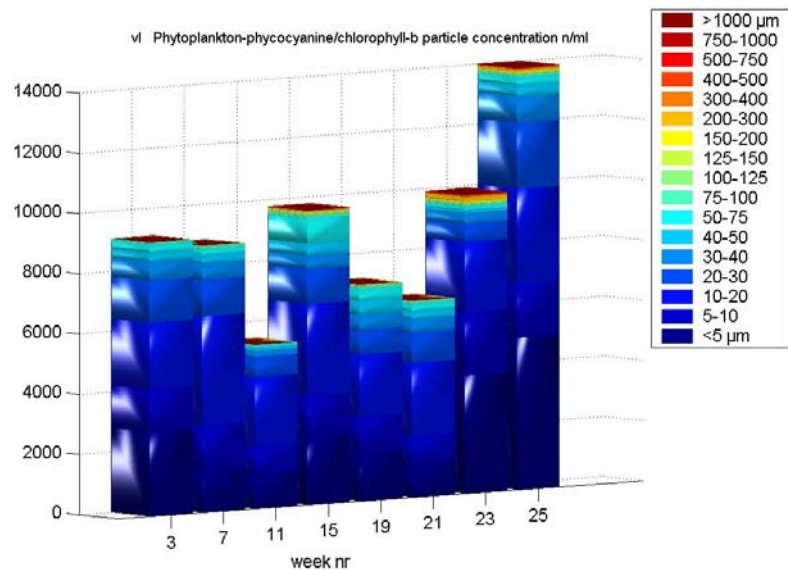
FIGUUR 3.5.7

Absolute deeltjesconcentratie van deeltjes met FGR & FGO



FIGUUR 3.5.8

Absolute deeltjesconcentratie van deeltjes met FGR & FRR

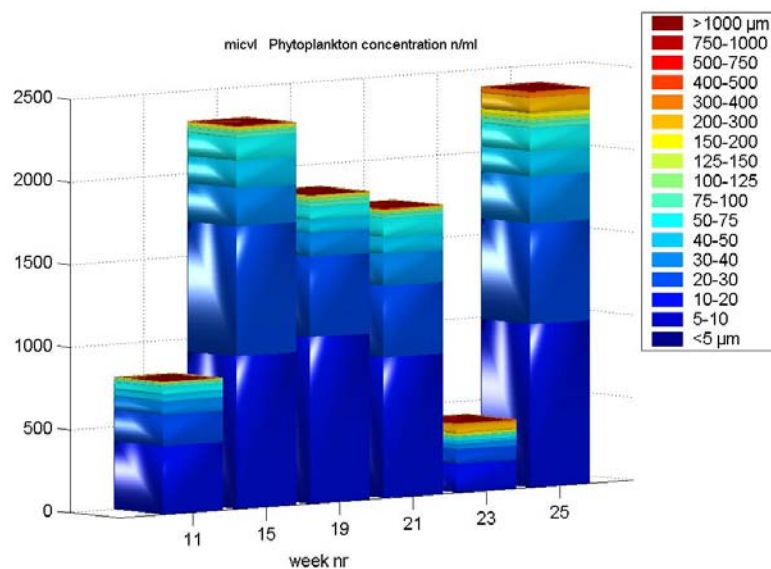


3.5.4 Fytoplanktonconcentratie van deeltjes groter dan 10 µm

De flowcytometrische totaalconcentraties van deeltjes met chlorofyl-a > 10 µm zijn uitgesplitst in 15 groottefracties (deeltjes/ml.fractie) in FIGUUR 3.5.9. De fracties < 5 µm en 5-10 µm zijn verwijderd uit de dataset.

FIGUUR 3.5.9

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



3.6 Zijpe

3.6.1 Algemene trends

*De **totaalconcentratie** deeltjes met chlorofyl-a schommelt in het eerste kwartaal rond de 5000 d/ml en stijgt fors in april naar de hoogste waarde in de eerste helft van 2002 naar 22.000 d/ml, voornamelijk veroorzaakt door deeltjes kleiner dan 5 µm. Na april stort de totaalconcentratie in naar ca 4000 d/ml en neemt daarna geleidelijk weer toe tot eind juni (12.000 d/ml). Ten opzichte van 2001 zijn de totaalconcentraties lager (ca tweemaal) en ten opzichte van 2000 eveneens lager. Het concentratieverloop laat ten opzichte van 2001 en 2000 weinig overeenkomst zien.*

*De **biomassa of chlorofyl-a concentratie** wordt gekenmerkt door lagere waarden in het eerste kwartaal vooral veroorzaakt door deeltjes kleiner dan 75 µm. Vervolgens stijgt de biomassa begin april met een factor 3 naar een waarde van $5,6 \times 10^8$ a.u./ml vooral door fractie tussen 50 en 400 µm. Tot begin juni is het biomassaverloop grillig en stijgt midden juni naar de hoogste waarde op de lokatie Zijpe van de eerste helft van het jaar (7×10^8 a.u./ml). Ook in 2001 waren de biomassawaarden in het eerste kwartaal laag, gevolgd door een snelle toename in april. De orde grootte van de biomassa in de periode april tot juni lag in 2001 echter vijf maal hoger dan in 2002. De orde grootte van de biomassa in juni toont weer redelijke overeenkomst.*

*Het verloop van de **biovolume** (linFLS/ml) gerelateerde variabele is vergelijkbaar met de totaalconcentratie, hoewel de bijdrage van grotere deeltjes nadrukkelijk aanwezig is.*

*De concentratie van **deeltjes met fycoerithrine** kent geen duidelijke trend. De hoogste concentratie (5700 d/ml) wordt midden maart gevonden en niet eind juni, zoals vaak op andere lokaties het geval is. De laagste concentratie is eind april geconstateerd (400 d/ml). In de overige weken werden concentraties gevonden tussen 1000 en 3000 d/ml. In 2001 werd nauwelijks verhoging of verlaging waargenomen tot eind juni en was de gemiddelde concentratie lager dan 1500 d/ml. 2002 is dus veel actiever met betrekking tot deeltjes met fycoerithrine in de eerste helft van het jaar. De sterk verhoogde concentratie (naar 15.000 d/ml) in juni in 2001 is hoog vergeleken met de hogere concentraties die in 2002 gevonden zijn (max was 5700 d/ml) zijn. Ook in 2000 werden in juni hogere concentraties gevonden dan in 2002.*

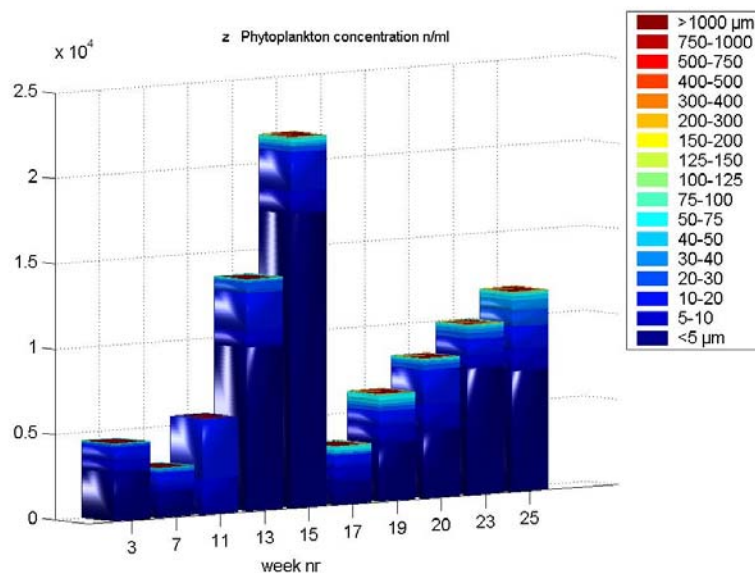
*Het verloop van de concentratie van autotrofe deeltjes met **fyocyanine/chlorofyl-b** is identiek aan het verloop van de totaalconcentratie autotrofe deeltjes, alleen liggen de absolute niveaus ca 75% lager. De hoogste concentratie wordt begin april gevonden (ca 18.000 d/ml). Het zijn hoofdzakelijk kleine deeltjes die de concentratie bepalen. Ook vorig jaar was het verloop bijna identiek aan het verloop van de totaalconcentratie autotrofe deeltjes.*

*Voor de **gefractioneerde** (>10 µm) geconcentreerde monsters worden concentraties gevonden tussen 100 d/ml medio maart (wk 11) en 1100 d/ml begin mei (wk 19).*

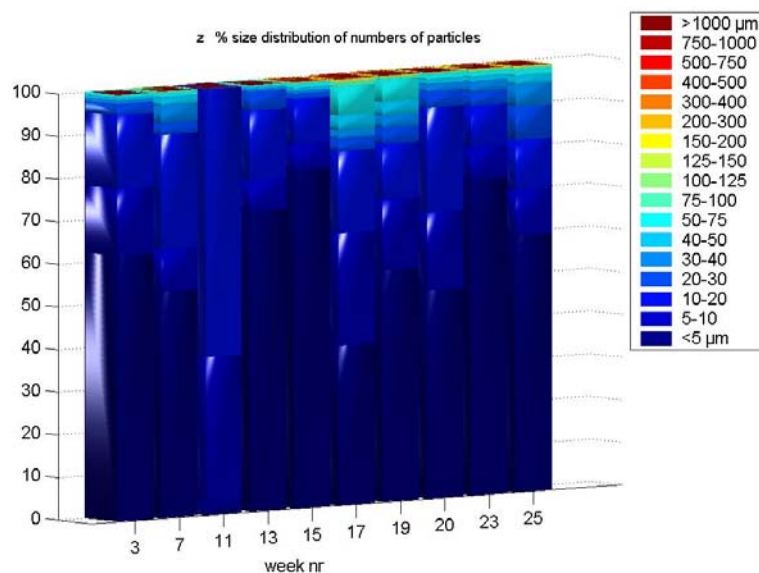
3.6.2 Flowcytometrische fytoplanktonconcentraties Zijpe

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

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

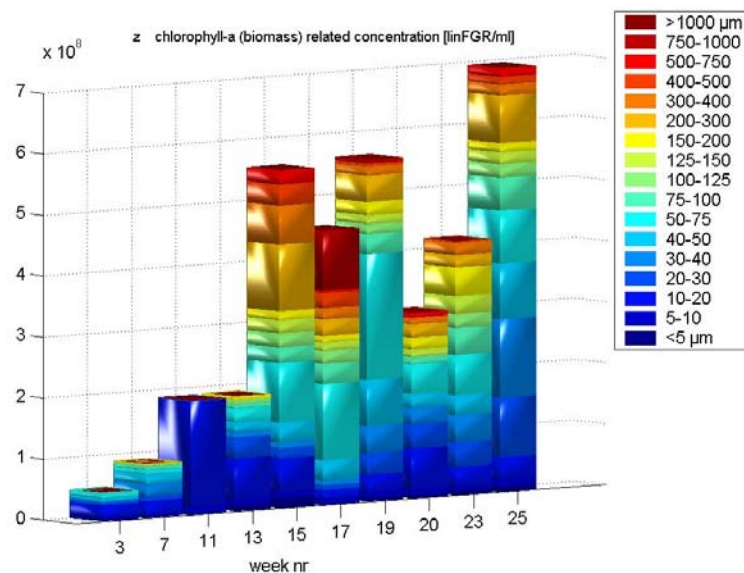


FIGUUR 3.6.2
% Aantal autotrofe deeltjes
met chlorofyl-a per
lengtefractie

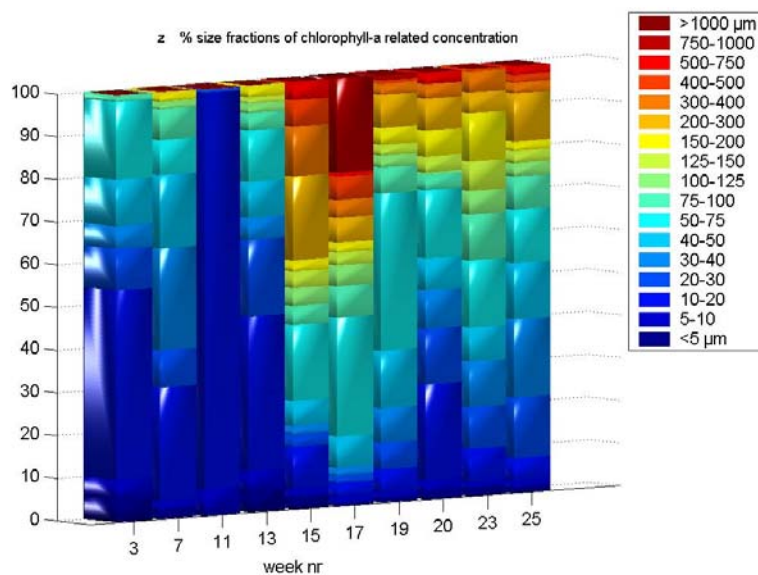


De **chlorofyl-a/ml concentraties** (biomassa) of flowcytometrische linFGR/ml variabele is uitgesplitst in 17 groottefracties (linFGR/ml.fractie) (FIGUUR 3.6.3) en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentratie chlorofyl-a/ml uitgesplitst in 17 groottefracties (% linFGR/ml.fractie/totaal-linFGR/ml)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

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

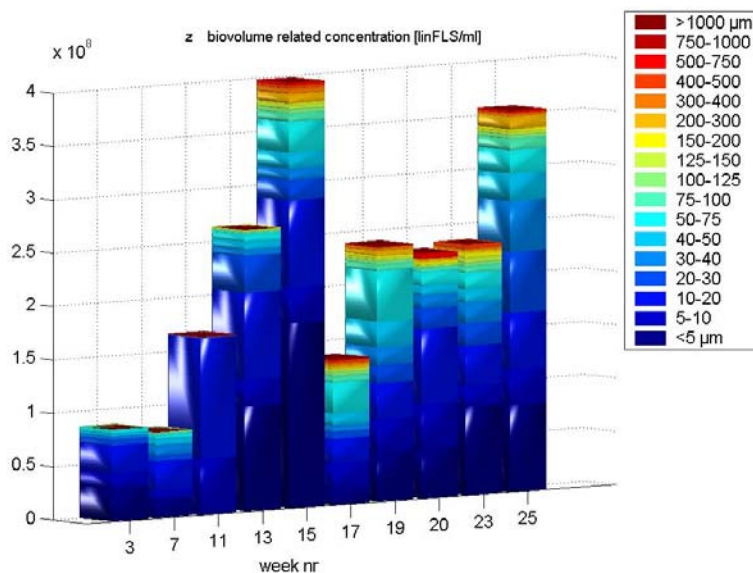


FIGUUR 3.6.4
% LinFGR/mL per
lengtefractie

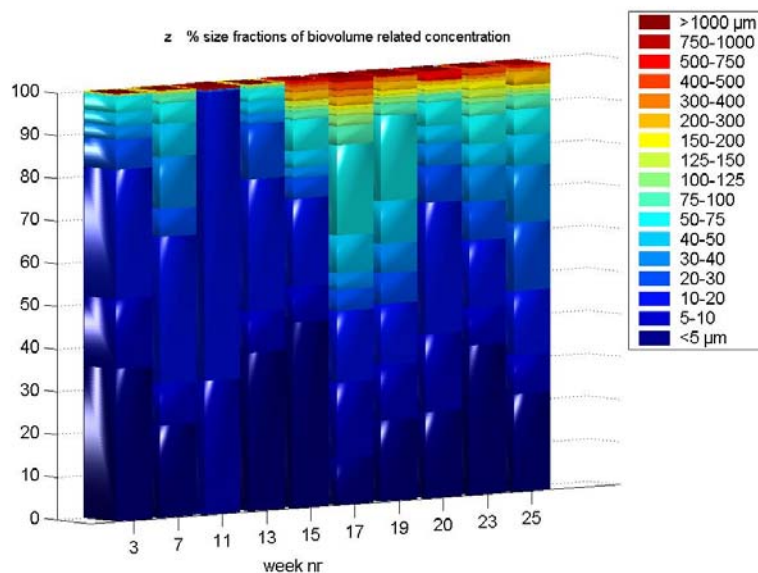


De **biovolumeconcentraties** (van deeltjes met chlorofyl-a)/ml uitgesplitst in 17 groottefracties (linFLS/ml.fractie) is weergegeven in FIGUUR 3.6.5 en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentratie biovolume/ml uitgesplitst in 17 groottefracties (% linFLS/ml.fractie/totaal-linFLS/ml)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

FIGUUR 3.6.5
Totale LinFLS/ml per
lengtefractie

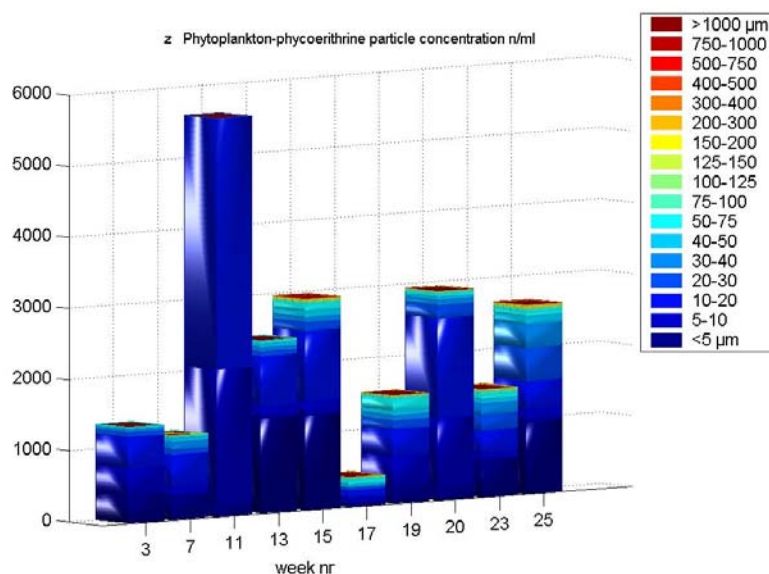


FIGUUR 3.6.6
% LinFLS/ml per
lengtefractie

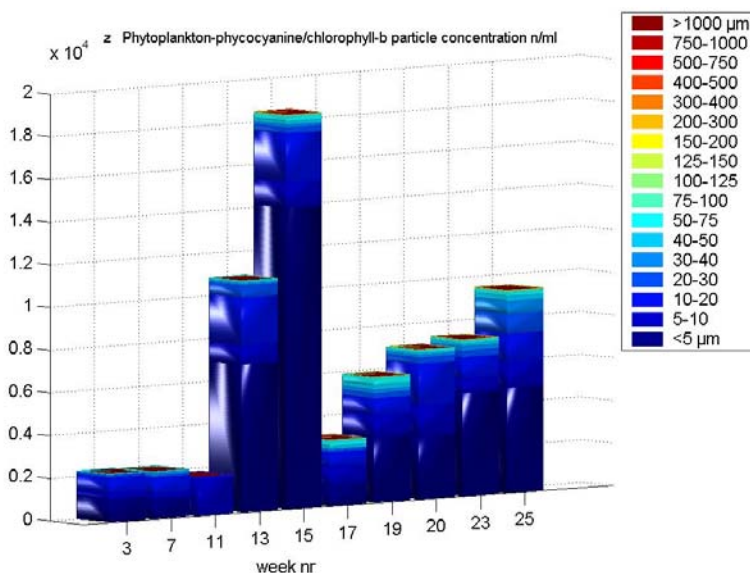


De concentraties van deeltjes met chlorofyl-a ÈN **fycobilliproteïnen** uitgesplitst in 17 groottefracties ($n_{(FGR>0 \& FGO>0)}$ /ml.fractie) is gepresenteerd in FIGUUR 3.6.7 en concentraties van deeltjes met chlorofyl-a ÈN **fycocyaninen en chlorofyl-b** in FIGUUR 3.6.8.

FIGUUR 3.6.7
Absolute
deeltjesconcentratie van
deeltjes met FGR & FGO



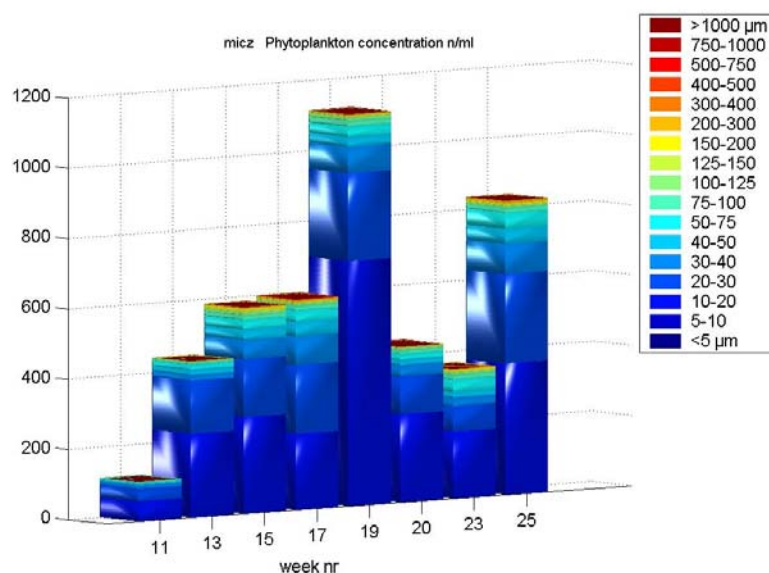
FIGUUR 3.6.8
Absolute
deeltjesconcentratie van
deeltjes met FGR & FRR



3.6.4 Fytoplanktonconcentratie van deeltjes groter dan 10 µm

De flowcytometrische totaalconcentraties van deeltjes met chlorofyl-a > 10 µm zijn uitgesplitst in 15 groottefracties (deeltjes/ml.fractie) in FIGUUR 3.6.9, waarbij de fracties < 5 µm en 5-10 µm verwijderd zijn uit de dataset. De legenda laat nog wel de fracties <5 en 5-10 µm zien, maar de eerste balk in de figuur is de fractie deeltjes 10-20 µm. Dit is gedaan om de kleur per fractie niet te laten veranderen ten opzichte van andere grafieken.

FIGUUR 3.6.9
Absolute
deeltjesconcentratie van
deeltjes **groter dan 10 µm**
met FGR (chlorofyl-a)



4. Discussie

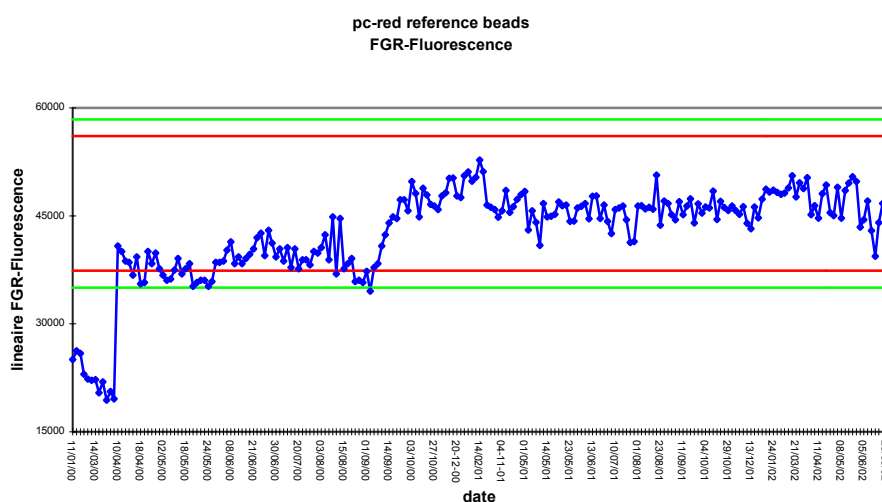
4.1 Kwaliteitsborging en lange termijn data

Een voorwaarde voor het vaststellen van trends of voor het verkrijgen van informatie uit menselijk handelen is dat gedurende langere termijn reproduceerbare data verkregen is. De reproduceerbaarheid van data dient aangetoond te kunnen worden. Flowcytometrie heeft als voordeel dat de kwaliteitsborging met behulp van standaardbollen inzicht geeft in de langere termijn reproduceerbaarheid en robuustheid van de flowcytometrie monitorings dataset.

4.1.1 Controlekaart

Elke analysedag wordt sinds jaren een standaardbollentest uitgevoerd en worden alle gegevens geregistreerd in een controlekaart. In de onderstaande controlekaart (Figuur 1.4.1) zijn de (lineaire FGR) fluorescentiewaarden van de pc-red calibratiebollen uitgezet. De rode (waarschuwingsgrens) en de groene lijnen (aktiegrens) zijn de 20 respectievelijk 25 procentlijnen. Deze lijnen zijn berekend ten opzichte van een vastgestelde gemiddelde waarde welke in juni 2002 wordt gehanteerd. Uit de kaart blijkt dat vanaf 050900 alle waarden binnen de 20 procentlijnen vallen. In de periode van 100400 tot 050900 vallen de waarden globaal binnen de 20 procent, maar zijn er wel enkele overschrijdingen die echter wel binnen de 25 procentlijnen blijven. In de periode voor 100400 vallen alle waarden onder de 25 procentlijnen (circa 50 % lager dan het gehanteerde gemiddelde). Er zijn dus in de kaart "verschuivingen" te zien, namelijk op 100400 en op 050900. Deze verschuivingen zijn te wijten aan veranderingen aan de optiek en de cuvetstand van het systeem, welke tweemaal toegepast zijn om een hogere gevoeligheid te verkrijgen en dus verklaarbaar. De verschuiving op 100400 is fors, maar

FIGUUR 4.1.1
Controlekaart van de
lineaire FGR-fluorescentie
van de pc-red
calibratiebollen, periode
2000 tot juli 2002



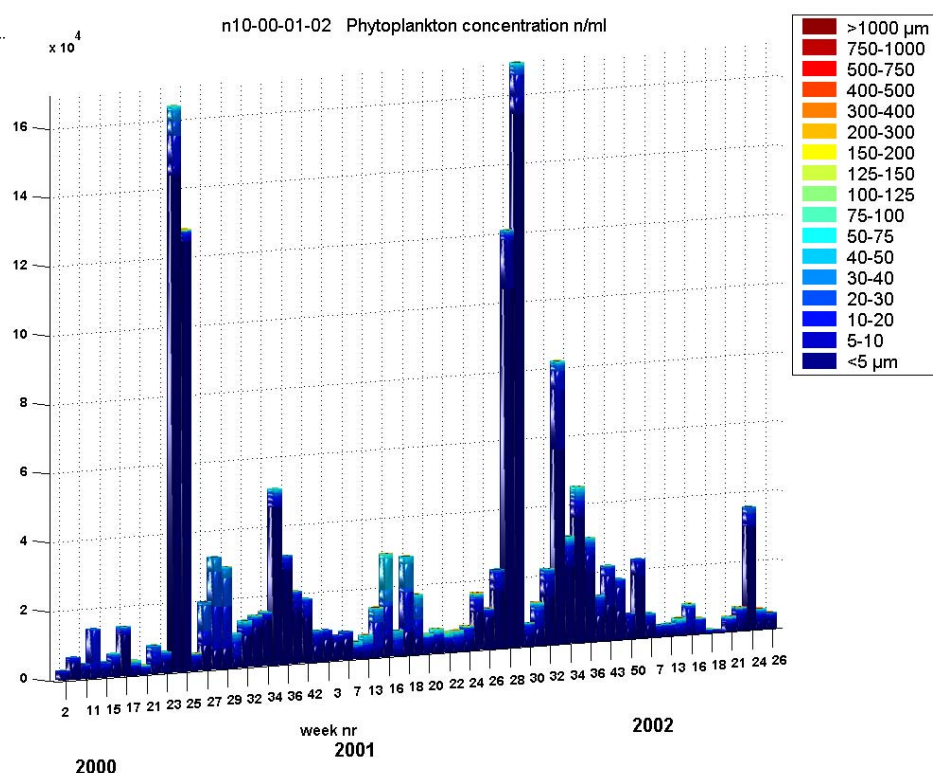
omdat
het enkel analyses betreft van metingen in de winterperiode (lage FGR-

fluorescentiewaarden) zal het effect hiervan op het totale beeld (met bloeien) minimaal zijn.

4.1.2 Lange termijn data

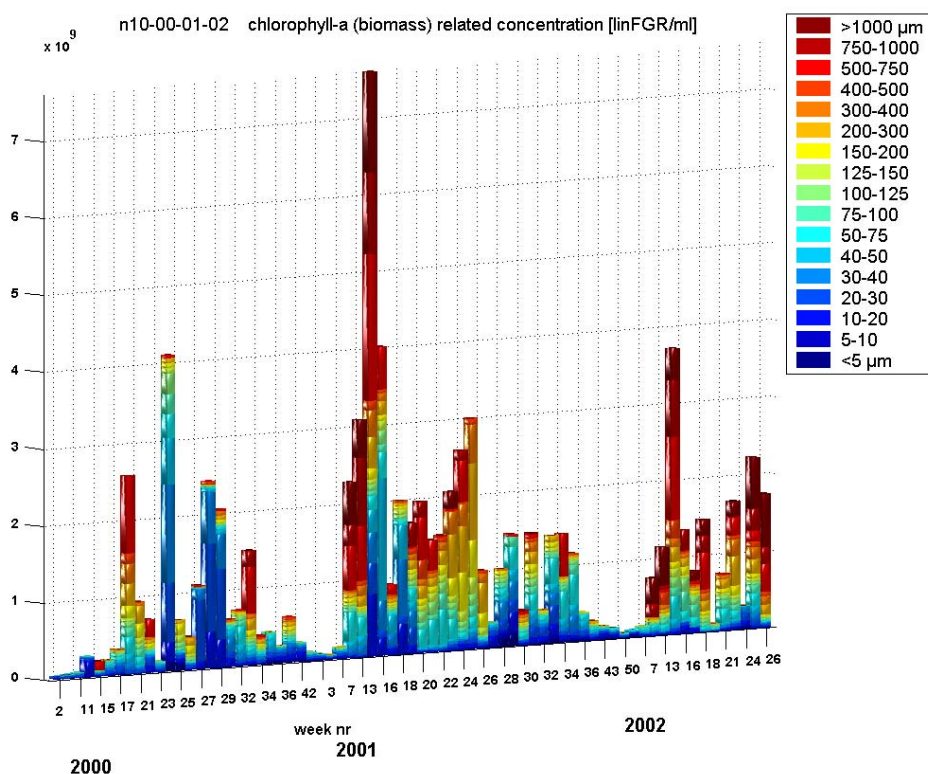
Op grond van de controlekaart mag geconcludeerd worden dat een vergelijking tussen jaargangen zinvol is, omdat de veranderingen in de dataset toe te schrijven zijn aan natuurlijke variaties en niet aan variaties van het meetsysteem (op één grotere verschuiving na begin 2000). Het is illustratief om de totaalconcentratie autotrofe deeltjes vanaf 2000 tot en met juni 2002 in één figuur te presenteren (Figuur 4.1.2). Duidelijk valt op dat in de jaargangen 2000 en 2001 in juni zeer hoge concentraties gevonden worden, die voornamelijk toegeschreven kunnen worden aan kleine oranje fluorescerende deeltjes (*Synechococcus*). In 2002 is de bloei laag (wk 24) of laat nog op zich wachten.

FIGUUR 4.1.2
Lange termijn overzicht van de totaalconcentratie autotrofe deeltjes uitgesplitst in verschillende groottefracties van de lokatie Noordwijk 10 over de periode 2000 tot juli 2002



Voor de biomassa is tevens een meerdere jaargangen overzicht gepresenteerd (Figuur 4.1.3). Uit de onderlinge variaties blijkt dat 2001 een biomassarijker jaar was in vergelijking met 2000 en 2002. In de eerste helft van 2002 wordt meer biomassatoename geconstateerd dan in 2000 vooral veroorzaakt door grotere of langere deeltjes.

FIGUUR 4.1.3
Lange termijn overzicht van de totale biomassa concentratie autotrofe deeltjes (LinFGR/ml) uitgesplitst in verschillende groottefracties van de lokatie Noordwijk 10 over de periode 2000 tot juli 2002



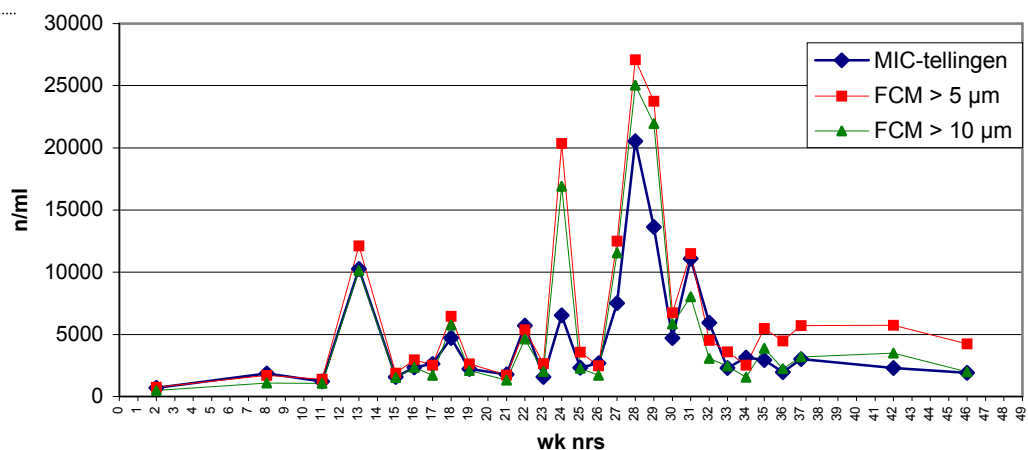
4.1.3 Vergelijking microscopietellingen en flowcytometrietellingen 2000

De microscopietellingen op lugol gefixeerde monsters van het jaar 2000 zijn in februari 2002 verschenen in een rapport en zijn in deze uitgave gebruikt voor een vergelijking tussen microscopietellingen en flowcytometrietellingen. Voor de lokatie Noordwijk 10 zijn de microscopietellingen van 2000 uitgezet tegen de flowcytometrietellingen uit 2000. De onderstaande figuur (Figuur 4.1.4) spreekt voor zichzelf. De gevonden correlatie tussen microscopie en flowcytometrie $R^2=0,8$. Het verschil in week 24 wordt veroorzaakt door een soort (*Myrionecta rubra*) die gevoelig is (uit elkaar spat) bij lugolfixatie. In de onderstaande figuur 4.1.4 is bij de flowcytometrie resultaten de fractie van kleinste deeltjes (< 5 µm en < 10 µm) weggelaten. Dit pico- en nanoplankton staat echter internationaal steeds meer in de belangstelling en wordt dus bij de RIKZ flowcytometrie-analyse binnen MWTL wel gemeten.

Daarnaast worden goede correlaties met chlorofyl-a gevonden en wordt een grootteverdeling van het fytoplankton standaard gemeten.

Noordwijk 10-2000

Figuur 4.1.4
Noordwijk 10: yr 2000
Microscooptellingen op
lugol-gefixeerde
monsters (blauw)
versus
flowcytometrietellingen
van autotrofe deeltjes
van 5 µm en hoger
(rood) of 10 µm en
hoger (groen)



4.1.3 Conclusie

Voor het opbouwen van reproduceerbare langere termijn datasets is flowcytometrie een robuust instrument en betrouwbare methode. Door gebruikmaking van standaarden wordt inzicht verkregen in de (lange termijn) kwaliteit van datasets.

De vergelijking tussen microscopietellingen en flowcytometrietellingen toont voor Noordwijk 10 (2000) grote overeenkomsten.

4.2 Een kwantitatieve vergelijking tussen jaargangen en tussen lokaties

In de vorige paragraaf werd aangegeven dat een vergelijking tussen jaargangen of lokaties mogelijk is indien er beschikking is over een robuuste en reproduceerbare dataset. In deze paragraaf wordt kwantitatief ingegaan op de verschillen tussen jaargangen en lokaties.

4.2.1 Een vergelijking tussen jaargangen

Van elke lokatie en jaargang is gebruik gemaakt van een per week lineair geïnterpoleerde dataset over de eerste helft van het jaar. Hiervan wordt de oppervlakte onder de totaalconcentratie- en totaalbiomassacurve gebruikt om kwantitatieve verschillen te berekenen. Dit is gedaan om het verschil in monsterfrequentie en tijdstip zoveel mogelijk uit te middelen. In tabel 4.2.1 zijn de verschillen van 2002 ten opzichte van 2001 weergegeven.

TABEL 4.2.1
Vergelijking 2002 (wk 1-26)
ten opzichte van 2001 (wk
1-26) van de totale
autotrofe deeltjesconcentratie en biomassa

	<i>n10</i>	<i>n2</i>	<i>ts135</i>	<i>sch vod</i>	<i>vliiss</i>	<i>zijpe</i>
aant.conc						
.	-15 %	-56 %	-23 %	-25 %	-30 %	-39 %
biomassa	-53 %	-69 %	+80 %	+17 %	-6 %	-66 %

De concentraties autotrofe deeltjes zijn op alle zes lokaties in 2002 lager dan in 2001. Voor de biomassa worden meer dan tweemaal lagere waarden in 2002 gevonden op de lokaties Noordwijk 2 en 10 en Zijpe. Op Vlissingen wordt een zeer lichte daling van de biomassa geconstateerd. Op Terschelling en Schaar van ouden Doel worden hogere biomassa's gevonden in 2002 ten opzichte van 2001. Een lagere concentratie deeltjes gecombineerd met een stijgende biomassa betekent een relatief groter aandeel van grotere deeltjes in 2002 ten opzichte van 2001.

4.2.2 Een vergelijking tussen lokaties

De lineair geïnterpoleerde datasets van alle zes lokaties (over de eerste zes maanden van 2002 en 2001) zijn onderling vergeleken (tabel 4.2.2 (2002a) en 4.2.3 (2001a)). De hoogste waarden zijn op 100% gesteld. De hoogste concentratie autotrofe deeltjes wordt in beide jaren gevonden op Schaar van ouden Doel. Ten opzichte van Schaar v.o.D. worden op de overige lokaties relatieve percentages gevonden die in 2002 en 2001 onderling vergelijkbaar zijn, ondanks dat de totaalconcentraties over de gehele linie zijn afgenomen. Alleen Noordwijk 2 vertoont een significant lager percentage (ca -30%) ten opzichte van Schaar v.o.D. Op Terschelling worden wederom het laagste percentage gevonden met ca 5-6 maal lagere concentraties dan op Schaar v.o.D.

TABEL 4.2.2
Vergelijking tussen
lokaties van 2002 (wk 1-
26) van de totale
autotrofe deeltjes-
concentratie en biomassa

	n10	n2	ts135	sch vod	vliss	zijpe
aant.conc	40 %	51 %	18 %	100 %	64 %	37 %
Biomassa	56 %	70 %	7 %	29 %	100 %	19 %

De hoogste biomassa (100%) wordt in 2002 gevonden op de lokatie Vlissingen, gevolgd door Noordwijk 2 (70%) en 10 (56%). De laagste biomassa in 2002 wordt (wederom) gevonden op Terschelling 135, die ca 15 maal lager is dan op Vlissingen. Opvallend is de verschuiving van de onderlinge verhoudingen in de biomassa-concentraties vergeleken met het jaar 2001, waar Noordwijk 2 en 10 de hoogste biomassa's vertegenwoordigden in de eerste helft van het jaar. Mogelijk heeft dit te maken met het uitblijven van een *Phaeocystis-bloei* in 2002.

TABEL 4.2.3
Vergelijking tussen
lokaties van 2001 (wk 1-
26) van de totale
autotrofe deeltjes-
concentratie en biomassa

	n10	n2	ts135	sch vod	vliss	zijpe
aant.conc	35 %	87 %	17 %	100 %	68 %	45 %
biomassa	52 %	100 %	2 %	11 %	47 %	24 %

4.2.3 Conclusie

De totale autotrofe deeltjesconcentratie over de eerste helft van 2002 ten opzichte van 2001 zijn voor alle zes lokaties lager. De verhouding van de concentraties tussen de lokaties is nauwelijks afwijkend, behalve voor Noordwijk 2.

De biomassa is voor een viertal lokaties lager (Noordwijk 2, Noordwijk 10, Zijpe Vlissingen), voor een tweetal lokaties hoger (Terschelling 135, Schaar van ouden Doel) ten opzichte van 2001. Tussen de lokaties zijn de verhoudingen in beide jaren verschillend.

4.3 Analyse van pico -en nanoplankton

4.3.1 Inleiding en methode

De groep deeltjes kleiner dan 20 μm , waarvoor internationaal het laatste decennium de belangstelling sterk is toegenomen, kan onderverdeeld worden in het nanoplankton ($> 2 \mu\text{m}$, $< 20 \mu\text{m}$) en het picoplankton ($< 2 \mu\text{m}$).

Picoplankton, de groep die met standaard lichtmicroscopie niet wordt waargenomen, bestaat uit 4 hoofdgroepen: heterotrofe prokaryoten, prochlorophyten (prochloro-coccus), cyanobacteriën (Synechococcus) en eukaryoten. Heterotrofe prokaryoten (bacteriën) bevatten geen fluorescerende pigmenten en worden daardoor niet in onbewerkte levende monsters gemeten met flowcytometrie. De Synechococcus groep wordt onderscheiden van de andere planktongroepen op grond van hun oranje fluorescentie veroorzaakt door de aanwezigheid van het pigment fycoerythrine. Prochlorococcus cellen zijn kleiner en fluoresceren minder dan picoeukaryoten waardoor een scheiding gebaseerd op lichtverstrooiing en rode fluorescentie mogelijk is (Marie et al., 2000).

In de RIKZ monitoringsdata wordt altijd een bepaalde groep deeltjes gevonden die kleiner is dan 5 μm . Deze groep, waarvan de bijdrage aan de totaal concentratie fluorescerende deeltjes op kan lopen tot 95%, is nog niet eerder onderzocht. Voor de lokatie Noordwijk 10 is onderzocht of deze groep deeltjes verder onderverdeeld kan worden in de hierboven beschreven subgroepen.

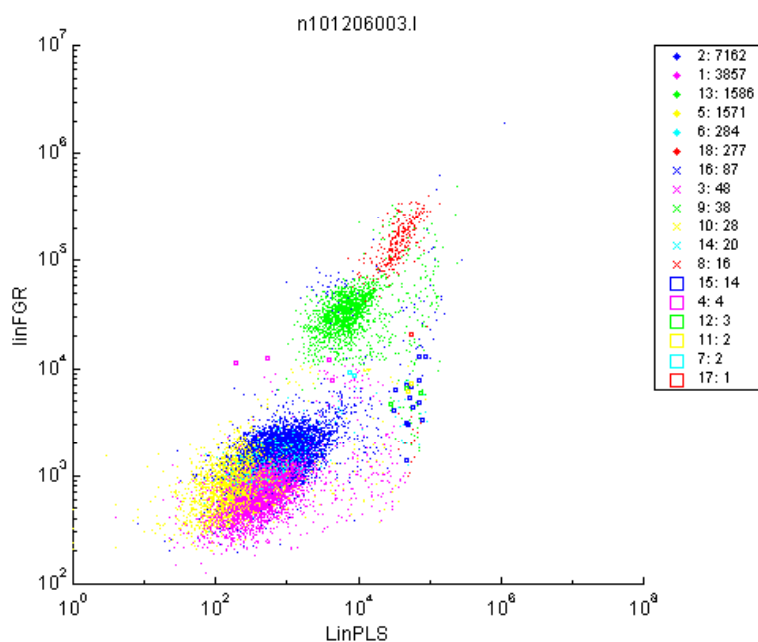
Indien dit het geval is, is uitgezocht of deze subgroepen qua pigmentsamenstelling en grootte geïdentificeerd kunnen worden als een picoplankton hoofdgroep. Tevens is de relatieve bijdrage aan de totaalconcentratie onderzocht. Gebruik is gemaakt van het geautomatiseerde clustering-algoritme (clusterfcm (v5.0)) in Matlab software.

4.3.2 Resultaten

In de lichtverstrooiings-chlorofyl-a fluorescentie (PLS-FGR) scatterplot (Figuur 4.3.1) is altijd een verzameling autotrofe deeltjes aanwezig, die de kleinste deeltjes (lage FGR en PLS) vertegenwoordigt. Deze verzameling deeltjes draagt bij aan de totaal concentratie fluorescerende deeltjes variërend in aantal van 0,4% (week 18) tot 89,7% (week 2). Bij nadere bestudering blijkt deze verzameling deeltjes uit drie groepen te bestaan die duidelijk te onderscheiden zijn op grond van hun fluorescentie-eigenschappen. Groep A bestaat uit deeltjes die geen oranje fluorescentie (FGO) en rode fluorescentie van rode laser (FRR) bezitten, groep B heeft geen FGO maar wel FRR terwijl groep C wel FGO maar geen FRR bezit (tabel 4.3.1)

FIGUUR 4.3.1

Lichtverstrooiing vs
fluorescentie scatterplot
met daarin de
onderverdeling van de drie
clusters van picoplankton
(linksonder: clusters in geel,
roze en blauw)



TABEL 4.3.1

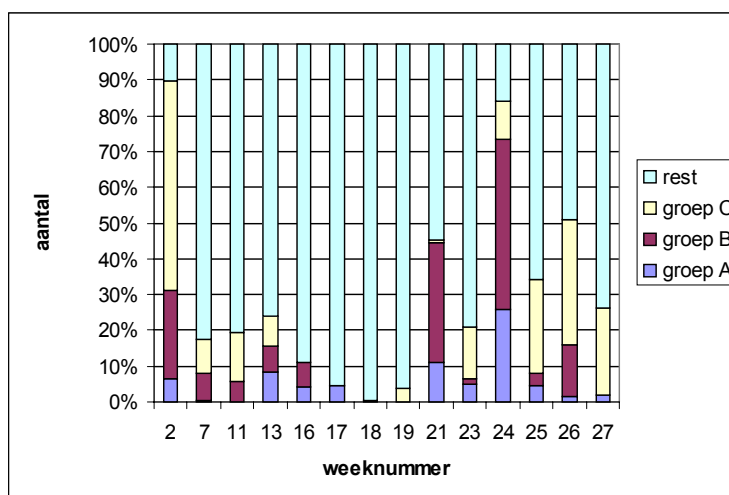
Noordwijk 10: Picoplankton
clusteranalyse

Groep	LogTOF (n=14)	LogFGR (n=14)	LogFGO (n=14)	LogFRR (n=14)	Mogelijke groep picoplankton
A	1311 ± 98	1382 ± 104	4 ± 28	0 ± 1	Prochlorococcus
B	1438 ± 89	1530 ± 111	8 ± 47	999 ± 180	Picoeukaryoten
C	1349 ± 120	1465 ± 156	1263 ± 376	0 ± 3	Synechoccus

In de eerste 6 maanden is er twee keer een hogere concentratie gemeten
namelijk in week 2 (23067 d/ml) en week 24 (35800 d/ml). Deze hoge
concentraties worden voornamelijk veroorzaakt door de groep kleine
deeltjes die in week 2 en 24 een relatieve bijdrage van respectievelijk 89,7%
en 83,9% aan de totale concentratie levert.

FIGUUR 4.3.2

Relatieve bijdragen van de
picoplanktongroepen aan
de totale autotrofe
deeltjesconcentratie op
Noordwijk 10



De groep pico- en nanoplankton heeft veel aandacht (Li et al. 2001, Gregori et al. 2001). Over deze groep deeltjes wordt veel gepubliceerd, ook in monitoringskader, en vaak ook gecombineerd met metingen aan heterotrofe prokaryoten, waarbij (DNA-RNA) kleuring wordt gebruikt (Marie et al. 1999, www.sb_roscoff.fr/Phyto/cyto_examples.html). Deze groep kleine deeltjes wordt niet geteld met standaard lichtmicroscopie, maar met flowcytometrie, veelal met behulp van standaard commerciële flowcytometrie-apparaten, die in vele (internationale) aquatische laboratoria gebruikt worden. De beperking voor grotere deeltjes van deze commerciële apparaten heeft waarschijnlijk een focus op kleiner autotroof plankton veroorzaakt. Opvallend is dat met behulp van de EurOPA n.s. deze kleine deeltjes ook geteld worden naast de grote deeltjes en daarmee de kracht van het grote dynamisch bereik van de EurOPAS n.s. is aangetoond. Het is aanbevelenswaardig een vergelijkend (ring)onderzoek uit te voeren tussen de EurOPA n.s. en commerciële flowcytometers om de ondergrens (gevoeligheid) van beide instrumenten te testen. De EurOPA n.s. metingen hebben plaatsgevonden onder standaard instellingen, maar de gevoeligheid van de EurOPA n.s. kan nog aanzienlijk worden verhoogd. Het grote bereik van de EurOPA n.s. stelt ons niet alleen in staat om alleen grotere deeltjes te bestuderen, maar ook de relatie tussen de pico- en nanoplankton soorten te bestuderen in relatie tot het grotere fytoplankton en is daarmee een nuttige en unieke aanvulling op bestaande monitoringsstudies op het gebied van picoplankton. Een voorbeeld is de symbiose tussen het picoplankton *Synechococcus* en de grotere heterotrofe *Myrionecta rubra* (was *Mesodinium rubrum*). Uit de gegevens van de hoogste bloeipiek in 2000 in juni, blijkt dat 96% van de totaalconcentratie bestond uit de deeltjes met de eigenschappen van de in 2002 gevonden groep C, dus de *Synechococcus*en. Gelijktijdig werden destijds de hoogste concentraties *Myrionecta rubra* gevonden.

4.3.3 Conclusie

Flowcytometrie levert een waardevolle bijdrage over de groep pico- en nanoplanktondeeltjes, die tot dusverre letterlijk onzichtbaar en onvermeld bleven. De standaardmetingen die RIKZ in het MWTL programma verricht geven niet alleen informatie over de grotere fytoplanktondeeltjes, maar ook over deze kleine deeltjes en dus de onderlinge relatie, waarmee een unieke combinatie van data in één analyse beschikbaar is. De indeling van het picoplankton in diverse watersystemen, zoals in de literatuur en internationaal veelvuldig gebruikt wordt, blijkt ook van toepassing op de RIKZ-MWTL flowcytometrie-dataset. Deze groepen zijn 'Prochlorococcus, kleine Eukaryoten en *Synechococcus*en en zijn bovendien eenvoudig te identificeren met de standaard gebruikte clusteralgoritmes.

4.4 Ongeconcentreerd (onbehandeld) versus geconcentreerd

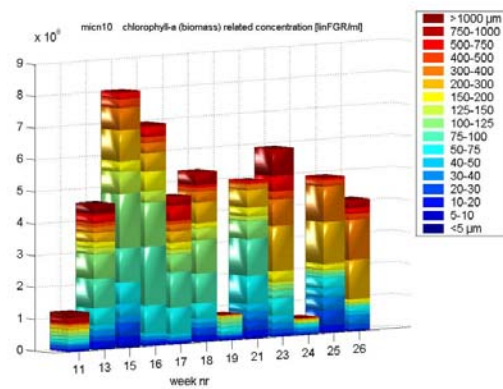
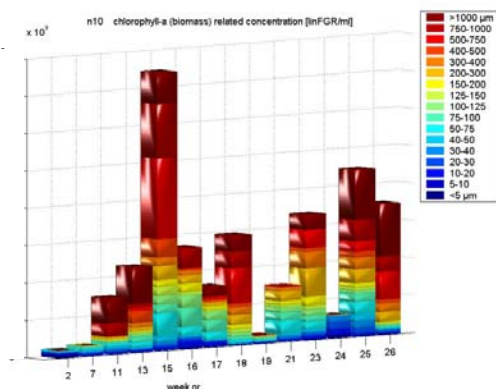
4.4.1 Inleiding

Flowcytometrie zoals bij het RIKZ wordt toegepast, geeft een overzicht van autotrofe deeltjes in water variërend in grootte van 0,5 tot ca 1000 μm . Dit geeft een beeld van de talrijkste soorten in een monster. Vaak zijn dit kleinere deeltjes ($<10 \mu\text{m}$), zoals uit de monitoringsresultaten van afgelopen jaargangen en uit de vorige paragraaf gebleken is. Het aandeel van de grotere autotrofe deeltjes verdwijnt dus als het ware in de grote aantallen van de talrijkste/kleinere deeltjes. Dit statistische 'voordeel' van de talrijksten maakt de vergelijking met microscopie lastig, waarbij de kleinere deeltjes niet gezien en geteld worden. Daarom is besloten om in 2002 monster tevens te concentreren/fractioneren door het over een 10 μm gaas te leiden. Een vraag is echter welke invloed de handelingen van concentreren hebben op de concentratie en biomassa. In deze paragraaf wordt aandacht besteed aan de resultaten vóór en ná concentreren en de eventuele verliesfactoren.

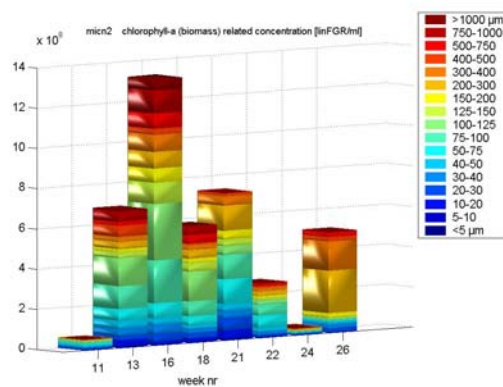
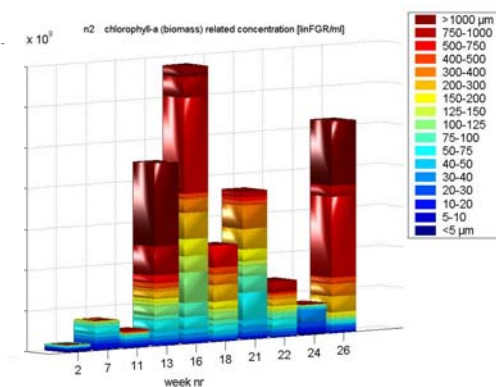
4.4.2 Biomassa en concentratie ongeconcentreerd versus geconcentreerd

In voorgaande monitoringsresultaten bleek dat de biomassa voornamelijk afkomstig is van de fracties $> 10 \mu\text{m}$. Men verwacht dus op grond hiervan nauwelijks verschil in de biomassa gevonden in het ongeconcentreerde monster ten opzichte van het geconcentreerde monster. Dit blijkt wel het geval. In de hoge fracties lijkt materiaal verloren te gaan, zoals blijkt uit de figuren 4.4.1 t/m 4.4.6 waar de donkerrode/bruine biomassabijdragen afkomstig van de (grootste) deeltjeslengtefracties in het geconcentreerde monster ten opzichte van de ongeconcentreerde monsters sterk zijn afgenomen en verdwenen. Worden in de ongeconcentreerde monsters de grootste twee fracties weggelaten, dan nog blijkt dat de biomassa ca tweemaal lager is in het geconcentreerde monster dan in het ongeconcentreerde monster. Dit betekent dat ook over overige fracties biomassa verloren gaat. Opvallend is wel dat over het algemeen de trend intact blijft. Dit zou inhouden dat de afname over de fracties en per weeknummer ongeveer dezelfde is.

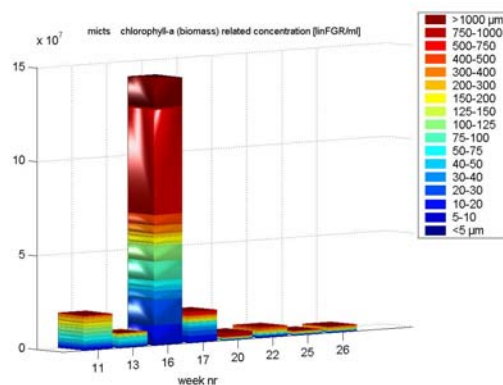
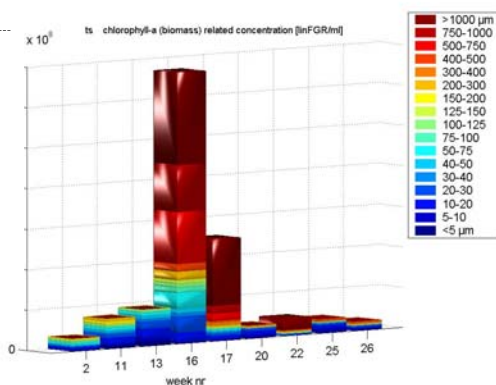
FIGUUR 4.4.1
Noordwijk 10
 Totale LinFGR/ml
 (chlorofyl-a/ml)
 per lengtefractie
 ongeconcentreerd
 (links) en
 geconcentreerd
 (rechts)



FIGUUR 4.4.2
Noordwijk 2
 Totale LinFGR/ml
 (chlorofyl-a/ml)
 per lengtefractie
 ongeconcentreerd
 (links) en
 geconcentreerd
 (rechts)



FIGUUR 4.4.3
Terschelling 135
 Totale LinFGR/ml
 (chlorofyl-a/ml)
 per lengtefractie
 ongeconcentreerd
 (links) en
 geconcentreerd
 (rechts)

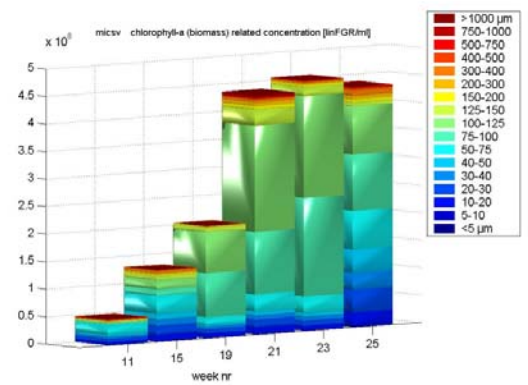
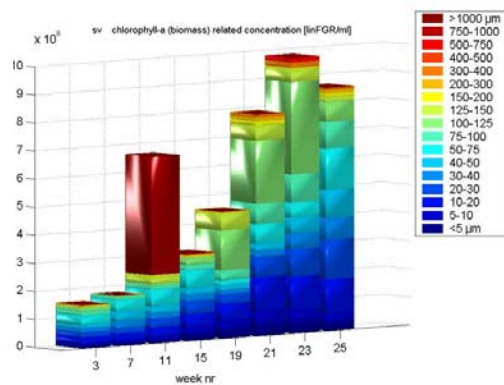


FIGUUR 4.4.4

Schaar v.oud.

Doel

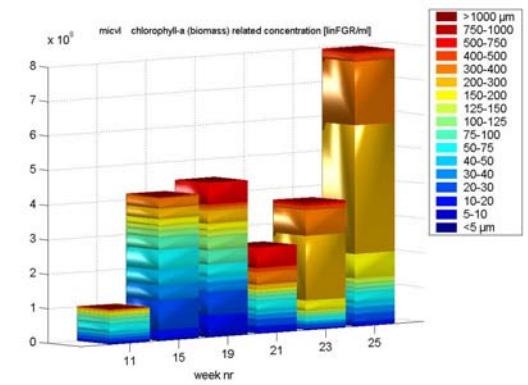
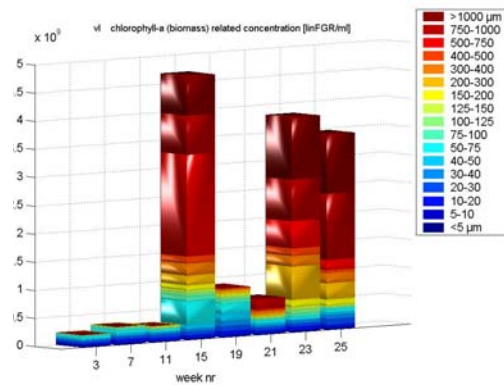
Totale LinFGR/ml
(chlorofyl-a/ml)
per lengtefractie
ongeconcentreerd
(links) en
geconcentreerd
(rechts)



FIGUUR 4.4.5

Vlissingen

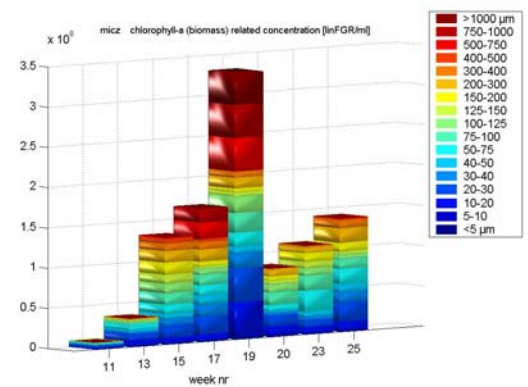
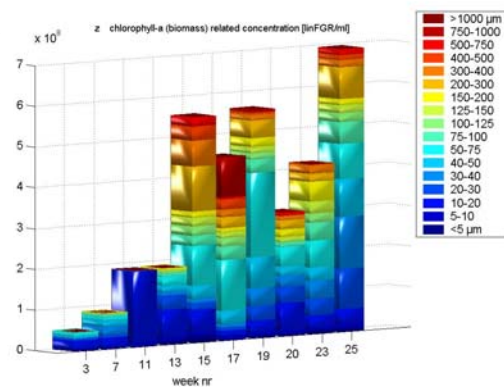
Totale LinFGR/ml
(chlorofyl-a/ml)
per lengtefractie
ongeconcentreerd
(links) en
geconcentreerd
(rechts)



FIGUUR 4.4.6

Zijpe

Totale LinFGR/ml
(chlorofyl-a/ml)
per lengtefractie
ongeconcentreerd
(links) en
geconcentreerd
(rechts)



Uit de figuren van de totaal autotrofe deeltjesconcentraties (zie HS 3) wordt in het geconcentreerde monster naar verwachting een veel lagere concentratie van deeltjes gevonden, omdat immers de talrijkste fracties < 5 µm en tussen 5-10 µm in geconcentreerde monster ontbreken. De trends van de ongeconcentreerde en de geconcentreerde monsters zijn, in tegenstelling tot wat bij de biomassa geconstateerd werd, verschillend. Indien van het ongeconcentreerde monster de fracties <10 µm worden weggefilterd zou men zonder celverlies een nagenoeg gelijke concentratie voor deeltjes groter dan 10 µm, verwachten tussen ongeconcentreerde en geconcentreerde monsters. Dit blijkt niet het geval. De concentratie gevonden cellen in het geconcentreerde monster liggen lager dan het onbehandelde = ongeconcentreerde monster.

Kortom, er treedt celverlies op. De vragen luiden: Hoe groot is ongeveer het verlies na concentrering ? Waardoor treedt celverlies op ?

4.4.3 Grootte van biomassa- en deeltjesconcentratieverliezen

Om te bepalen hoe groot de biomassa- en het celverlies zijn, worden de biomassa concentratie (LinFGR/ml) en de totaal autotrofe deeltjesconcentratie vóór en ná concentrering vergeleken van een viertal lokaties. De procentuele hoeveelheid gevonden ná concentrering is berekend ten opzichte van het ongeconcentreerde monster per week als ook de procentuele verschillen indien de grootste en kleinste fracties worden weggelaten. De resultaten van de biomassa en de totaalconcentratie zijn weergegeven in de tabellen 4.4.1 t/m 4.4.8 voor de lokaties Noordwijk 10 , Noordwijk 2, Vlissingen en Schaar van ouden Doel.

TABEL 4.4.1
Noordwijk 10
Biomassa
Geconcentreerd vs
ongeconcentreerd

N10 Biomassa	Weeknr	% geconc tov ongeconc.	% geconc. tov ongeconc. Fracties >10 & <750 µm	%geconc. tov ongeconc. Fracties >10 & <500 µm
	11	16	49	49
	13	40	76	82
	15	22	31	54
	16	51	64	65
	17	57	68	73
	18	36	52	96
	19	73	73	73
	21	66	67	68
	23	35	40	48
	24	17	17	17
	25	22	38	43
	26	24	49	88
Gemiddelde % aanwezig t.o.v. ongeconcentreerd		38	52	63

TABEL 4.4.2
Noordwijk 10
 Autotrofe
 deeltjesconcentratie
 Geconcentreerd vs
 ongeconcentreerd

N10 Totaalconc. Weeknr	% geconc tov ongeconc.	% geconc. tov ongeconc. Fracties > 10 & <750 µm	%geconc. tov ongeconc. Fracties >10 & <500 µm
11	8	21	21
13	32	90	90
15	38	65	65
16	10	18	18
17	15	27	27
18	77	161	161
19	50	75	75
21	30	76	76
23	10	34	34
24	2	13	13
25	23	60	60
26	11	42	42
Gemiddelde % aanwezig t.o.v. ongeconcentreerd	26	57	57

TABEL 4.4.3
Noordwijk 2
 Biomassa
 Geconcentreerd vs
 ongeconcentreerd

N2 Biomassa Weeknr	% geconc tov ongeconc.	% geconc. tov ongeconc. Fracties >10 & <750 µm	%geconc. tov ongeconc. Fracties >10 & <500 µm
11	25	26	27
13	31	79	89
16	39	44	72
18	49	49	64
21	40	42	43
22	39	49	50
24	9	9	9
26	19	30	74
Gemiddelde % aanwezig t.o.v. ongeconcentreerd	31	41	53

TABEL 4.4.4
Noordwijk 2
 Autotrofe
 deeltjesconcentratie
 Geconcentreerd vs
 ongeconcentreerd

N2 Totaalconc. Weeknr	% geconc tov ongeconc.	% geconc. tov ongeconc. Fracties >10 & <750 µm	%geconc. tov ongeconc. Fracties >10 & <500 µm
11	6	15	15
13	25	60	60
16	34	56	56
18	33	59	59
21	27	82	82
22	17	36	36
24	1	5	5
26	7	28	28
Gemiddelde % aanwezig t.o.v. ongeconcentreerd	19	43	43

TABEL 4.4.5

Vlissingen

Biomassa

Geconcentreerd vs
ongeconcentreerd

VI Biomassa	Weeknr	% geconc tov ongecon.	% geconc. tov ongecon. Fracties >10 & <750 µm	%geconc. tov ongecon. Fracties >10 & <500 µm
	11	35	35	35
	15	9	13	28
	19	51	51	52
	21	39	55	58
	23	10	19	25
	25	23	64	75
Gemiddelde % aanwezig t.o.v. ongeconcentreerd		28	39	45

TABEL 4.4.6

Vlissingen

Autotrofe

deeltjesconcentratie

Geconcentreerd vs
ongeconcentreerd

VI Totaalconc.	Weeknr	% geconc tov ongecon.	% geconc. tov ongecon. Fracties >10 & <750 µm	%geconc. tov ongecon. Fracties >10 & <500 µm
	11	9	23	23
	15	18	37	37
	19	24	43	43
	21	17	35	35
	23	3	11	11
	25	12	31	31
Gemiddelde % aanwezig t.o.v. ongeconcentreerd		14	30	30

TABEL 4.4.7

Schaar v.o. Doel

Biomassa

Geconcentreerd vs
ongeconcentreerd

SV Biomassa	Weeknr	% geconc tov ongecon.	% geconc. tov ongecon. Fracties >10 & <750 µm	%geconc. tov ongecon. Fracties >10 & <500 µm
	11	7	19	19
	15	42	42	42
	19	45	45	45
	21	55	55	55
	23	46	46	47
	25	51	51	51
Gemiddelde % aanwezig t.o.v. ongeconcentreerd		41	43	43

TABEL 4.4.8

Schaar v.o. Doel

Autotrofe

deeltjesconcentratie

Geconcentreerd vs
ongeconcentreerd

SV Totaalconc.	Weeknr	% geconc tov ongecon.	% geconc. tov ongecon. Fracties >10 & <750 µm	%geconc. tov ongecon. Fracties >10 & <500 µm
	11	6	17	17
	15	11	40	40
	19	5	27	27
	21	5	22	22
	23	3	16	16
	25	9	28	28
Gemiddelde % aanwezig t.o.v. ongeconcentreerd		7	25	25

Voor de vier lokaties geldt dat de biomassa in het geconcentreerde monster gemiddeld circa 35 % is van de onbehandelde monsters (biomassaverlies = ca 65%). Het corrigeren voor de grootste fracties, waar veel biomassabijdrage is, heeft voor Noordwijk 10, Noordwijk 2 en Vlissingen een positief effect, maar dan nog treedt een biomassaverlies op van circa 37-55 %, die dus plaatsvindt in de fracties kleiner dan 500 µm. Op Schaar van ouden Doel wordt nauwelijks effect van deze correctie voor grote deeltjes verwacht, omdat ze relatief weinig aanwezig zijn. Dit bleek ook het geval, het biomassaverschil met of zonder grote deeltjes is slechts 2%. In sommige weken is het biomassaverlies groot (>75%), vooral op Noordwijk 2 en 10 en Vlissingen in juni. Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt door soorten die kwetsbaar zijn en de gaas-concentrerings niet overleven of door deeltjes die uiteenvallen in kleine deeltjes (<10 µm), die het gaas passeren. Ook week 11 laat op de meeste lokaties een lage opbrengst zien.

De verliezen van de autotrofe deeltjesconcentraties zijn fors. De voor de kleine fracties gecorrigeerde vergelijking (>10 µm) tussen geconcentreerde en ongeconcentreerde monsters, toont een toename van het celverlies in de volgorde Noordwijk 10 (48%), Noordwijk 2 (57%), Vlissingen (70%) en Schaar van ouden Doel (75%). Het hoge celverlies op Schaar v.o. Doel en Vlissingen is dus het grootst. Hiervoor zijn twee mogelijke verklaringen:

1. Deze lokaties zijn detritusrijk en de met chlorofyl-a bevattende slibvlokken vervallen mogelijk tot kleinere (kleiner dan 10 µm) deeltjes, die het gaas passeren.
2. Het verschil in zoutgehalte, waarmee deeltjes van het gaas worden afgespoeld is te groot ten opzichte van het oorspronkelijke ongeconcentreerde monster en veroorzaakt door osmoseverschillen celverliezen.

Uit DONAR zijn de saliniteitsgegevens en zwevend stof gegevens van de betreffende lokaties bekeken (Tabel 4.4.9). Het saliniteitsverschil tussen Schaar van ouden Doel en Vlissingen en overige mariene lokaties is groot. Bij het resuspenderen van geconcentreerd planktonmateriaal wordt een saliniteit van 30 ‰ gebruikt. Het geconstateerde hoge celverlies lijkt deels hier uit verklaard te kunnen worden.

TABEL 4.4.9
Saliniteit en
Zwevend stof uit
DONAR

		Schaar v.o. Doel	Vlissingen	Noordwijk 2	Noordwijk 10
Saliniteit	Gemiddelde	7,36	27,23		
	Stdev	3,93	2,31		
	Max	16,66	30,99		
	Min	0,81	20,99		
Zwevend stof	Gemiddelde	60,02	50,92	11,26	5,71
	Stdev	21,57	50,29	9,05	2,99
	Max	102,00	254,00	53,00	16,00
	Min	25,00	5,00	3,00	2,00

Schaar van ouden Doel en Vlissingen zijn detritus-rijke lokaties, vergeleken met Noordwijk 2 en 10. Ook valt op dat Schaar v.o.D. gemiddeld nauwelijks hogere concentraties zwevend stof bevat dan Vlissingen. Wel is de variatie op Vlissingen veel groter. Het celverlies op Schaar v.o.D. en Vlissingen is groter

dan op Noordwijk 2 en 10 als de fractie groter dan 10 µm van het ongeconcentreerde (onbehandelde) en geconcentreerde monster beschouwd worden. Kortom, een kleiner celverlies met het dalen van het zwevend stof gehalte. Dit zou dus mogelijk bovenstaande hypothese onderschrijven en kan gecontroleerd worden door het aantal deeltjes in het filtraat te meten. Hiervan zou de concentratie kleine deeltjes en de biomassa significant moeten toenemen.

Het saliniteitsverschil van monsters afkomstig van Schaar v.o. Doel met de 30^{0/00} afspoelvoeistof is inderdaad fors, namelijk ca 22^{0/00}. Het is zeer goed mogelijk dat een deel van de cellen niet bestand zijn tegen de osmoseschok en uit elkaar spatten door opname van (teveel) water. Afspoelen met water van geringere saliniteit zal een verbetering van het celverlies geven.

4.4.4 Concentreren zinvol ?

Er wordt geconcentreerd omdat de dominantie van kleine deeltjes zodanig groot is, dat van de grotere fytoplanktondeeltjes relatief weinig geteld worden. Bij een totaal aantal getelde deeltjes van 10000 en een dominantie van 90% van deeltjes kleiner dan 5 µm, worden 'slechts' 1000 grotere deeltjes geteld. Een deel hiervan bestaat uit detritusvlokken (met chlorofyl-a), waardoor er nog minder fytoplanktondeeltjes overblijven. De vergelijking met microscopie, waarbij deeltjes groter dan 5-10 µm geteld worden, is dan gebaseerd op relatief weinig flowcytometrische tellingen terwijl dit juist de kracht van flowcytometrie is.

Nu blijkt dat juist door concentrering/ fractionering een groot celverlies (gemiddeld 65%) optreedt, en is dit verlies bovendien niet reproduceerbaar. Daarom is het middel erger dan de kwaal. Het is misschien zinvol naar verdere optimalisatie te zoeken bij de fractioneringsprocedure, echter het is bekend dat altijd verlies optreedt en dat sommige fytoplanktonsoorten zeer kwetsbaar zijn en nauwelijks intact gelaten kunnen worden.

De resultaten tussen microscopie- en flowcytometrietellingen zonder concentrering en dus gebaseerd op ongeconcentreerde monsters, liet een uitstekende correlatie tussen beiden zien (Figuur 4.1.4). Het gebruikte aantal grotere deeltjes, waarop de tellingen gebaseerd waren, bleek in dit voorbeeld aanvaardbaar genoeg.

Het is gewenst een voldoende hoog aantal getelde grotere deeltjes te meten als representatieve groep ter vergelijking met microscopie. Hoeveel deeltjes dat zijn is lastig te onderbouwen, maar dit wordt geschat op minimaal 2000-3000 tellingen. Dit getal is gebaseerd op het gemiddeld voorkomen van circa 5 dominante grotere soorten in een monster, waarvan voor duidelijke clustervorming minimaal 100-200 in aantal aanwezig moeten zijn. Het totaal (5*200=1000) wordt verdubbeld in verband met de ervaring dat de helft van de deeltjes detritus kan zijn en levert een eindtotaal van grotere deeltjes van minimaal 2000. Om hieraan te voldoen wordt gekozen voor een andere strategie. Van de ongeconcentreerde monsters zullen in totaal meer tellingen uitgevoerd worden, zodanig dat minimaal 2000 à 3000 grotere deeltjes geteld zijn. Dit betekent voor sommige monsters dat het totaal aantal waarnemingen wordt verdubbeld. Hiermee neemt de analysetijd toe, echter de winst van het

niet meer concentreren levert een tijdsbesparing op. Bovendien is er de mogelijkheid om tijd te besparen door een monster bij hogere doorvoersnelheden aan het systeem aan te bieden, zolang maar aan de randvoorwaarde voldaan wordt dat de snelheid van 500 deeltjes/seconde niet wordt overschreden (Validatierapport EurOPA n.s.) met een maximum doorvoersnelheid van circa 0,5 ml/min.

Voor imaging in flow zijn lagere snelheden noodzakelijk in verband met de kans op onscherpte bij hogere snelheden. Bij lage concentraties van grotere deeltjes werd geconcentreerd om onaanvaardbare lange wachttijden te voorkomen. Voor imaging in flow zal in een dergelijke situatie wel geconcentreerd moeten worden met dien verstande dat celverlies zal optreden.

Voor monitoring in het algemeen wordt geadviseerd om ongeconcentreerde monsters te analyseren.

4.4.5 Conclusie

Uit de resultaten van ongeconcentreerde en geconcentreerde monsters blijkt dat juist door concentrering/ fractionering een groot celverlies (gemiddeld 65%) optreedt en dat dit verlies bovendien niet reproduceerbaar is. Daarom wordt het concentreringsprincipe verlaten en gekozen voor een andere strategie. Van de ongeconcentreerde monsters zullen in totaal meer tellingen uitgevoerd worden, zodanig dat minimaal 2000 à 3000 grotere deeltjes geteld zijn. Dit betekent dat het totaal aantal getelde deeltjes per monster in sommige situaties zal toenemen van bijvoorbeeld 10.000 naar 20.000.

4.5 Automatische clustering m.b.v. Matlab ongeconc. vs geconc.

4.5.1 Inleiding

Clusters van flowcytometrische waarnemingen (autotrofe deeltjes) ontstaan in scatterplots op grond van overeenkomstige lichtverstrooiing en fluorescentie-eigenschappen. Deze clusters kunnen één of meerdere soorten fytoplankton vertegenwoordigen en kunnen gekwantificeerd worden. Handmatige clustering in diverse scatterplot combinaties is echter tijdrovend. Om deze reden wordt Matlab gebruikt, waarvoor een algoritme geschreven is, welke clusters identificeert en gebruik maakt van drie scatterplot combinaties (PLS vs FGR, FGR vs FGO, FGR vs FRR). Met de snelle microscopische analyse worden fytoplanktonaantallen van soorten in drie groepen ingedeeld: '+++' meer dan 10% van de totaalconcentratie aanwezig, '++' tussen 5 en 10% aanwezig en '+' is tussen 2 en 5 % aanwezig. De flowcytometrische clustering wordt in deze paragraaf in dezelfde klassindeling naast de resultaten van microscopie gepresenteerd.

4.5.2 Materialen en Methoden

Van Noordwijk 10, Noordwijk 2 en Terschelling 135 worden de flowcytometrische resultaten van de ongeconcentreerde en geconcentreerde monsters gebruikt voor clustering. Vóór clustering wordt in Matlab een digitale zeef over de data gebruikt (sieve (5), fsieve(5) beiden versie 1.1)), waarbij autotrofe deeltjes kleiner dan een berekende lengte van 5 µm uit de dataset worden verwijderd. Vervolgens wordt in Matlab het clusteralgoritme fcluster (40,12) (versie 3.0b) gebruikt, welke gebruik maakt van het clusterprincipe clusterfcm (versie 6.0). Met fcluster worden alle files automatisch ingelezen, wordt geclusterd, worden scatterplots getekend met geclusterde waarnemingen en wordt de resultaatfile opgeslagen. In Excel kunnen de resultaatfiles worden ingelezen en met behulp van een macro (clusterrapportage-extra) wordt een indeling naar aantallen en overeenkomstige '+++', '++' en '+' indeling gemaakt naar analogie van de microscopische tellijsten. Per week worden de resultaten van flowcytometrie en clustering en microscopie in een tabel gepresenteerd.

4.5.3 Resultaten

Voor Noordwijk 10 is het resultaat weergegeven in tabellen 4.5.1 en 4.5.2, voor Noordwijk 2 in tabellen 4.5.3 en 4.5.4 en voor Terschelling 135 in tabellen 4.5.5 en 4.5.6.

TABEL 4.5.1

Noordwijk 10 :yr 2002a

Gevonden groepen m.b.v. flowcytometrie en soorten

m.b.v. microscopie in de eerste helft van 2002.

Monster is geconcentreerd

NOORDWIJK 10 2002 deeltjes 5 µm en hoger

wk	2		7		11		13		15		16		17		18		19		21		23		24		25		26		
	FCM	MIC	FCM	MIC	FCM	MIC	FCM	MIC	FCM	MIC	FCM	MIC	FCM	MIC	FCM	MIC	FCM	MIC	FCM	MIC	FCM	MIC	FCM	MIC	FCM	MIC	FCM	MIC	
	+++		+++		+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++		+++		+++	+++	+++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	+++	++	+++	++	+++	+++	+++
	+++		+++		+++	+++	++	+++	+	+++	+	+++	+	++	+	+++	++	+++	++	+++	++	+++	+++	++	+++	+	++	+++	+++
	++		++		++	+++	+	+	+	++	+	+	+	+	++	++	+	++	+	++	+	++	++	++	+	++	++	++	++
	+				++	++	+	+	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	++	++	+	+	++	++	++
					+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	++				+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+
					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+

Noordwijk 2:yr 2002a
Gevonden groepen
m.b.v. flowcytometrie
en soorten m.b.v.
microscopie in de
eerste helft van 2002.
Monster is
geconcentreerd

NOORDWIJK 2 2002 deeltjes 5 µm en hoger

[illegible]

Noordwijk 2:yr 2002a
 Gevonden groepen
 m.b.v. flowcytometrie
 en soorten m.b.v.
 microscopie in de
 eerste helft van 2002.
 Monster is
ongeconcentreerd

NOORDWIJK 2 2002 deeltjes 5 µm en hoger

[illegible]

TABEL 4.5.5
Terschell135 :yr 2002a
Gevonden groepen
m.b.v. flowcytometrie
en soorten m.b.v.
microscopie in de
eerste helft van 2002.
Monster is
geconcentreerd

Terschelling 135 2002 deeltjes 5 µm en hoger

wk	2		11		13		16		17		20		22		25		26	
	FCM	MIC	FCM	MIC	FCM	MIC	FCM	MIC	FCM	MIC	FCM	MIC	FCM	MIC	FCM	MIC	FCM	MIC
	+++		+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++		+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++
	++		++	+++	++	+++	+	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	++	++	++
	+		+	+++	+	++	+	+++	+	+	++	++	+	+++	++	++	++	++
	+		+	+	+	++		++	+	+	+	++	+	++	++	+	++	+
	+		+	+	+	++		+	+	+	+	++	+	++	+	+	+	+
	+		+	+	+	+					+	+	+	++	+	+	+	+
			+	+	+	+					+	+	+	++	+	+	+	+
			+	+	+	+					+	+	+	++	+	+	+	+
+++ >10%			+	+		+					+	+		+	+		+	
++ 5-10%					+		+					+		+	+		+	
+ 2-5%					+		+					+		+				
												+		+				
												+		+				
												+		+				
												+		+				
geconc, na dig.sieve (5)												+		+				
methode clusterfcm_v6.0 40,12												+		+				

TABEL 4.5.6
Terschell135 :yr 2002a
Gevonden groepen
m.b.v. flowcytometrie
en soorten m.b.v.
microscopie in de
eerste helft van 2002.
Monster is
ongeconcentreerd

Terschelling 135 2002 deeltjes 5 µm en hoger

wk	2		11		13		16		17		20		22		25		26	
	FCM	MIC	FCM	MIC	FCM	MIC	FCM	MIC	FCM	MIC	FCM	MIC	FCM	MIC	FCM	MIC	FCM	MIC
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	+++	+++	++	++	++	+++
	++	++	+++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	+++	+++	+	++	++	++
	++	+	++	+++	+	++	++	+++	+	+	+	++	++	+++	++	++	++	++
	++	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	++	++	++	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	++	+	+	+	+	++	+	++	++	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	++	+	+	+	+
	+		+	+	+	+					+	+	++	+	+			
	+		+	+	+	+					+	+	+	++	+			
+++ >10%				+		+						+		+				
++ 5-10%					+		+					+		+				
+ 2-5%					+		+					+		+				
												+		+				
												+		+				
												+		+				
ongeconc, na dig.sieve (5)												+		+				
methode clusterfcm_v6.0 40,12												+		+				

4.5.4 Conclusie

Uit de vergelijking tussen de snelle microscopische tellijsten en de aantallen gevonden clusters en onderlinge verdeling hiertussen blijkt een redelijke tot goede overeenkomst tussen microscopie en flowcytometrie. Tussen geconcentreerde en ongeconcentreerde monsters worden verschillen gevonden, die wijzen op de aanwezigheid van minder clusters in geconcentreerde monsters.

4.6 *Phaeocystis* eruit gelicht

4.6.1 Inleiding

Uit het rapport "Flowcytometrie fytoplanktonmonitoring 2001a" (RIKZ/2003.012) bleek dat de flowcytometrische bepaling van de plaagalg *Phaeocystis* redelijk overeenkwam met de microscoop gegevens. Destijds was een Matlab-clustering vergeleken met de tellingen van het project "Monisnel". Omdat in 2002 de flowcytometer, simultaan naast de microscoop, werd ingezet om de *Phaeocystis* te monitoren bij de Brouwersdam in het kader van het project "Monisnel" is de flowcytometrische bepaling van *Phaeocystis* verder verfijnd. Hiervoor zijn er metingen verricht aan monoculturen van de *Phaeocystis*-cel en de *Phaeocystis*-flagelaat. Na deze metingen zijn er spikingen verricht aan veldmonsters (zie werkdocument RIKZ/IT-2002.819.x). De resultaten toonden goede overeenkomsten met microscopie (< 10 %).

4.6.2 Materialen en methoden

Voor de flowcytometrische analyse van *Phaeocystis* vindt geen aanpassing plaats. De resultaten van de geanalyseerde monitoringsmonsters worden gebruikt voor het aantonen van de eventuele aanwezigheid van *Phaeocystis* hierin. De bepaling van *Phaeocystis* waarnemingen gebeurt door middel van een speciaal geschreven algoritme "Phaeocheck". Middels dit algoritme worden de aantallen *Phaeocystis* bepaald met behulp van twee methoden aan de hand van *Phaeocystis*-gegevens, die in een database zijn vastgelegd.

In de database staan nu 4 "soorten" van *Phaeocystis*, namelijk;

M1: gegevens van een monocultuur in april 2001 van een *Phaeocystis*-cel

M2: gegevens van een monocultuur in april 2002 van een *Phaeocystis*-cel

M3: gegevens van een monocultuur van 16 mei 2002 van een *Phaeocystis*-flagelaat

V1: gegevens van een veldmonster van 200401 (het monster bevatte veel *Phaeocystis*, bevestigd door directe microscopieanalyse)

Bij de eerste methode worden de datapunten geclusterd in Matlab met behulp van een door het laboratorium zelf ontwikkeld algoritme "clustervb" (clusterfcm(v5.0)). De instellingen van dit algoritme zijn rastergrootte = 20 en threshold = 10. Wanneer de softwarematige clustering van data is gebeurd, worden de parametergemiddelden van de optische eigenschappen van de clusters gemeten met de flowcytometer, vergeleken met de waarden uit de genoemde database. Indien de waarden van een cluster (binnen een bepaalde spreiding) overeenkomen met alle zes parameterwaarden uit de database, dan wordt verondersteld dat dit cluster bij de overeenkomstige "soort" behoort uit de database. Tevens wordt er een getal gerapporteerd welke de mate van overeenkomst uitdrukt tussen de eigenschappen van een cluster en een soort uit de database, waarbij het getal 1000 de maximale overeenkomst vertegenwoordigt. Bij de uitwerkingen van de resultaten wordt alleen gekeken naar toekenningen welke minimaal een overeenkomst van het getal 850

bezitten. Wanneer een cluster binnen de gestelde criteria van twee of meer soorten valt, wordt dit cluster toegewezen aan de soort waarbij de hoogste mate van overeenkomst is.

Bij de tweede methode worden van elk deeltje de parameterwaarden vergeleken met de waarden uit een database. Wanneer de waarden (binnen een bepaalde spreiding) overeenkomen met alle zes parameterwaarden uit de database, dan wordt er verondersteld dat dit deeltje bij de overeenkomstige soort behoort uit de database. Ook hierbij wordt er een getal gerapporteerd welke de mate van overeenkomst uitdrukt. Het getal 1000 vertegenwoordigt de maximale overeenkomst. Bij de uitwerkingen wordt alleen gekeken naar toekenningen welke minimaal een overeenkomst van het getal 850 bezitten. Wanneer een deeltje binnen de gestelde criteria van twee of meer soorten valt, wordt dit deeltje toegewezen aan de soort waarbij de hoogste mate van overeenkomst is.

In dit rapport zijn de gegevens van het laatste half jaar van 2000 (bloei), het eerste half jaar van 2001 (bloei) en de gegevens van het eerste half jaar van 2002 (geen bloei) gerapporteerd. De flowcytometrische gegevens van 2000 en van 2001 zijn uitgezet tegen;

- de gegevens van microscopische tellingen ten bate van het project "MWTL", Koeman en Bijkerk bv (sommatie van *Phaeocystis*-cel en *Phaeocystis*-flagelaat)
- de gegevens van microscopische tellingen t.b.v. het project "Monisnel"

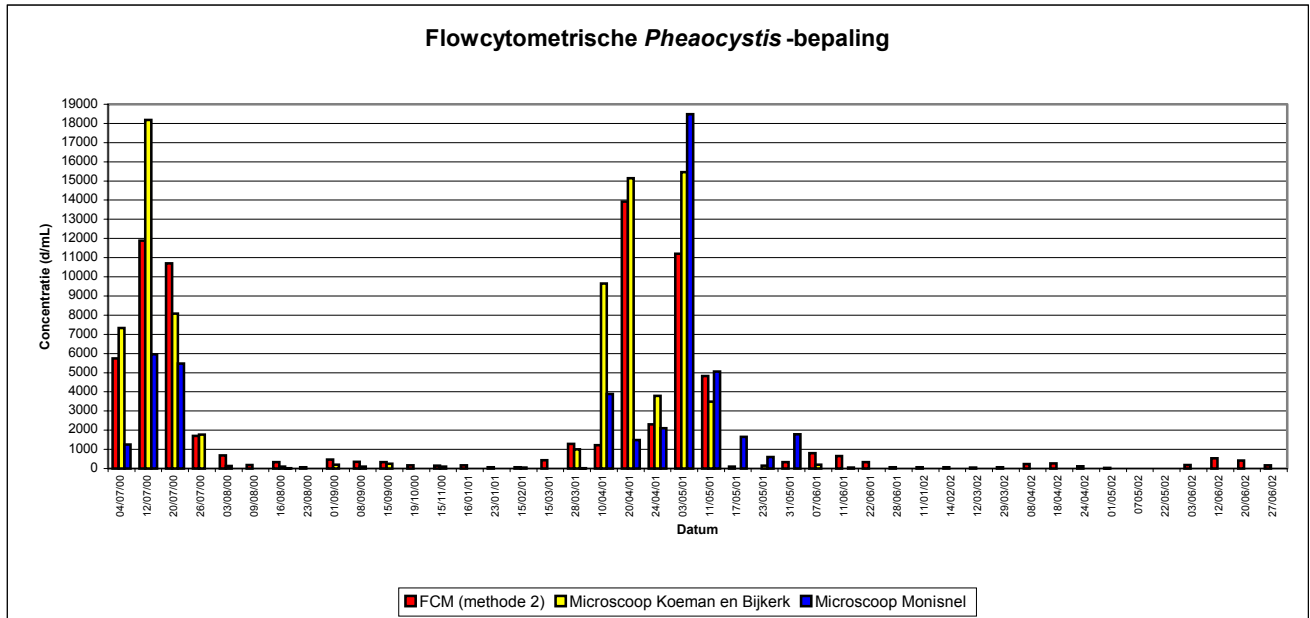
4.6.3 Resultaten en discussie

Tijdens de uitwerkingen bleek dat de resultaten van de twee methoden die bij de flowcytometrische bepaling worden gehanteerd niet veel van elkaar verschillen, maar dat de tweede methode (vergelijking van elk deeltje met de database) toch iets betere resultaten opleverden, vergelijkend met de microscopische gegevens. Om deze redenen wordt in dit rapport enkel de uitkomsten van de tweede methode vergeleken met de microscopische waarnemingen in de onderstaande grafiek (Figuur 4.6.1)

Echter, er dient wel opgemerkt te worden dat de clusteringwerkwijze waarvan gebruik gemaakt wordt bij de eerste methode nog verder verfijnd kan worden.

FIGUUR 4.6.1

Phaeocystis-aantallen van 2000 t/m 2002 op Noordwijk 10
bepaald met flowcytometrie en microscopie (t/m 2001) Bijkerk en
Koeman bv en microscopie (Monisnel)



Zoals uit de bovenstaande grafiek blijkt zijn de bloeien van *Phaeocystis* goed te detecteren met behulp van de flowcytometer. In het geëvalueerde tijdsbestek van 1,5 jaar worden de bloeien goed gedetecteerd en vinden er geen vals positieve detectie plaats. De detectiegrens van de flowcytometrische gegevens ligt rond de 1000 *Phaeocystis* deeltjes/mL op een totaal concentratie van 5000 tot 35000 deeltjes/ml. Een opmerking, die bij de flowcytometrische bepaling gemaakt moet worden, is dat de *Phaeocystis*-cellen die zich (nog) in een kolonie bevinden, niet worden herkend door de software. In de grafiek blijkt dit bij het monster van 104001, waarin relatief veel kolonies voorkwamen (Koeman en Bijkerk). Uit de geëvalueerde dataset bleek echter dat, met uitsluitel van het monster van 100401, er relatief weinig bijdrage is aan de *Phaeocystis*-cellen concentratie afkomstig van cellen uit de kolonies. Toch kan de software hiervoor nog verbeterd worden.

4.6.4 Conclusie

Uit het bovenstaande blijkt dat de flowcytometer een goed instrument is voor een eerste en snelle detectie van de *Phaeocystis*.

4.7 Efficiency

Niet-gefixeerde monsters worden tot nog toe bij voorkeur gebruikt voor de flowcytometrische analyse. Nadeel is dat de monsterlogistiek ingewikkelder wordt in verband met sneller transport, omdat monsters binnen 30 uur geanalyseerd dienen te zijn. Introductie van een geschikte conserveermethode zou de monsterlogistiek voor flowcytometrische monsters vereenvoudigen. In verband met de vereenvoudiging van de monsterlogistiek worden momenteel (in 2002) testen uitgevoerd met fixatie in relatie met de houdbaarheid van een monster. Gekeken wordt naar de kwantitatieve verschillen/verliesfactoren (celaantallen) en pigmentveranderingen (bijv. biomassa LinFGR/ml) en fysische veranderingen (detritus) van een monster ten opzichte van niet-gefixeerde (=levende) monsters.

De verwerking van MWTL-monsters in de eerste zes maanden van 2002 heeft geen problemen gekend. De snelle flowcytometrische analyse en (geautomatiseerde) verwerking tot de eindresultaten bleek goed te realiseren in een tijdsbestek van ongeveer één uur per monster. Ook de realisatie van de rapportage via grafieken op een website kende geen problemen.

4.8 Hoe verder in 2002

Monsters zullen niet meer worden geconcentreerd. Wel zullen voortaan meer tellingen worden uitgevoerd, zodanig dat van de grotere deeltjes ($>10\ \mu\text{m}$) minimaal 2000-3000 in aantal gemeten zullen zijn. Door digitale fractionering zal de fractie van grotere deeltjes ($>10\ \mu\text{m}$) in kaart worden gebracht.

De flowcytometrie monitoringswebsite wordt in de zomer van 2002 aangeboden middels een verbeterde opzet via de www.watermarkt.nl site. Houdbaarheidsproeven (zie paragraaf 4.7) met monitoringsmonsters zullen worden uitgevoerd in 2002.

De toegepaste methode van de standaard monitoring zal in 2002 gecontinueerd worden.

4.9 Innovatieve ontwikkelingen

In 2002 hebben softwarematige innovaties plaatsgevonden. Zo is er een algoritme 'Phaeocheck' gemaakt, waarbij specifiek Phaeocystis met behulp van verschillende methoden uit de dataset kunnen worden geëxtraheerd. Volgens hetzelfde principe kunnen meerdere plaag- en toxische soorten aan bod komen. In de tweede helft van 2002 zal hier verder naar worden gekeken.

Voor de internet-pagina is een pijlpresentatie-programma geschreven waarbij de lengte en de kleur van de pijl aangeven in welke mate een actuele concentratie of biomassa op een lokatie hoger respectievelijk lager is dan in de twee voorgaande jaren.

Zoals eerder al beschreven in paragraaf 4.7 zijn en zullen fixatie/houdbaarheidsproeven gedaan (worden).

Een nieuwe calibratiebol is getest en in gebruik genomen met dusdanige

eigenschappen dat deze als interne standaard gebruikt kan gaan worden voor zowel de groene als de rode laser-waarden. Dit zal de spreiding op de dataset nog controleerbaarder en smaller maken, omdat gecorrigeerd kan worden voor laserintensiteitsverschillen.

Preventief onderzoek zal plaatsvinden naar de upgrade van de electronica van de EurOPA n.s. Deze functioneert weliswaar uitstekend, maar zal bij defect raken vervangen moeten kunnen worden. Hoe dit gebeurt dient te worden uitgezocht.

5. Aanbevelingen

Monsters worden niet meer geconcentreerd over gaas, maar er worden meer waarnemingen opgeslagen, desnoods bij hogere monstertoevoersnelheden (mits lager dan 500 d/s) om lange analysetijden te verkorten.

Het gebruik van een nieuwe geteste calibratiebol als interne standaard verdient een aanbeveling voor de verdere optimalisatie van de kwaliteitsborging.

Het verdere gebruik van geïnterpoleerde datasets en de tijdsgeïntegreerde waarden (oppervlak onder de curve) verstrekt de aanbeveling voor vergelijkingen tussen lokaties en jaargangen in verband met het verschil in monsterfrequenties en tijdstippen.

Verdere uitwerking van het pico- en nanoplankton, zoals in de literatuur wordt beschreven en het doen van ringonderzoeken voor deze groep van kleine deeltjes met andere laboratoria verdient aandacht.

Uitbreiding van het gebruik van de flowcytometrische soortendatabase verdient een aanbeveling in verband met de goede resultaten met *Phaeocystis*.

Een aanbeveling van de vorige rapportage blijft staan: validatie van de gemeten lengte en de werkelijke lengte van deeltjes.

De tijd lijkt aangebroken voor verdere integratie met microscopie. Deze laatste techniek voor de vaststelling van de belangrijkste soorten in een monster. Flow cytometrie voor de vaststelling van totale autotrofe deeltjesconcentraties, biomassa, grootteverdeling en bijdrage van de groep pico en nanoplankton. Voor de komende jaren wordt dan ook een uitbreiding van de lokaties voor flowcytometrie voorgesteld gecombineerd met een eenvoudigere verkorte semikwantitatieve microscopische telling.

6. Conclusies

Uit de resultaten van de monitoring van fytoplankton met behulp van flowcytometrie blijkt:

- ✓ Voor het opbouwen van reproduceerbare langere termijn datasets is flowcytometrie een robuust instrument en een betrouwbare methode. Door gebruikmaking van standaarden wordt inzicht verkregen in de (lange termijn) kwaliteit van datasets.
- ✓ De vergelijking tussen microscopietellingen en flowcytometrietellingen toont voor Noordwijk 10 (2000) grote overeenkomsten.
- ✓ De totale autotrofe deeltjesconcentratie over de eerste helft van 2002 ten opzichte van 2001 zijn voor alle zes lokaties lager. De verhouding van de concentraties tussen de lokaties is nauwelijks afwijkend, behalve voor Noordwijk 2.
- ✓ De biomassa is voor een viertal lokaties in 2002 lager (Noordwijk 2, Noordwijk 10, Zijpe, Vlissingen) voor een tweetal lokaties hoger (Terschelling 135, Schaar van ouden Doel) ten opzichte van 2001. Tussen de lokaties zijn de verhoudingen in beide jaren verschillend.
- ✓ Flowcytometrie levert een waardevolle bijdrage over de groep pico- en nanoplanktondeeltjes, die tot dusverre letterlijk onzichtbaar en onvermeld bleven. De standaardmetingen die RIKZ in het MWTL programma verricht geven niet alleen informatie over de grotere fytoplanktondeeltjes, maar ook over deze kleine deeltjes en dus de onderlinge relatie, waarmee een unieke combinatie van data in één analyse beschikbaar is. De indeling van het picoplankton in diverse watersystemen, zoals in de literatuur en internationaal veelvuldig gebruikt wordt, blijkt ook van toepassing op de RIKZ-MWTL flowcytometrie-dataset. Deze groepen zijn 'Prochlorococcus, kleine Eukaryoten en Synechococcussen en zijn bovendien eenvoudig te identificeren met de standaard gebruikte clusteralgoritmes.
- ✓ Uit de resultaten van ongeconcentreerde en geconcentreerde monsters blijkt dat juist door concentrering/ fractionering een groot celverlies (gemiddeld 65%) optreedt en dat dit verlies bovendien niet reproduceerbaar is. Daarom wordt het concentreringsprincipe verlaten en gekozen voor een andere strategie. Van de ongeconcentreerde monsters zullen in totaal meer tellingen uitgevoerd worden, zodanig dat minimaal 2000 à 3000 grotere deeltjes geteld zijn.
- ✓ Uit de vergelijking tussen de snelle microscopische tellijsten en de aantallen gevonden clusters en onderlinge verdeling hiertussen blijkt een redelijke tot goede overeenkomst tussen microscopie en flowcytometrie. Tussen geconcentreerde en ongeconcentreerde

monsters worden verschillen gevonden, die wijzen op de aanwezigheid van minder clusters in geconcentreerde monsters.

- ✓ Voor *Phaeocystis* wordt goede overeenkomst gevonden tussen flowcytometrie en microscopie (dataset 2000 en 2001).

7. Referenties

- Anonymus, MONITOR-programma voor de zoute wateren. Nota GWIO-87.018, 1987
- Dubelaar G.B.J., Cunningham A., Groenewegen A.C., Klijnstra J., Jonker R.R., Ringelberg J., Rutten T.P.A., Peeters J.C.H., Vriezekolk G.A., Roy van R.H.M., Tascioglu B., Wietzorrek J., Kachel V., König J.W., Veen van J.J., Boddy L., Wilkins M.F., Morris C.W., Carr M.R., Tarran G.A., Burkill P.H., Beeker A.E.R.: A European Optical Plankton Analysis System: Flow cytometer based technology for automated phytoplankton identification and quantification. Final Report MAS2-CT91-0001, 1995.
- G Grégori G, Colosimo A, Denis M, Phytoplankton Group Dynamics in the Bay of Marseilles During a 2-Year Survey Based on Analytical Flow Cytometry. *Cytometry*, 44, 3, 247-256, 2001
- Hofstraat, J.W., M. Rademaker & R.P.T. Koeman, Standaardvoorschrift B001: Oppervlaktewater - Voorschrift voor de verzameling en conservering van fytoplankton in het mariene milieu - Ringleiding en sampler, 1991a
- Hofstraat, J.W., M. Rademaker & R.P.T. Koeman, Standaardvoorschrift B003: Oppervlaktewater - Voorschrift voor de verzameling van levend fytoplankton (kwantitatief) in het mariene- en brakwater milieu - Ringleiding 1991b
- Koeman R.P.T., Bijkerk R., Fockens K., Esselink P., de Haan A.L., Biomonitoring van fytoplankton in de Nederlandse zoute wateren 2000, rapport 2001-21, 2002
- Li, WKW, Dickie, PM, Monitoring Phytoplankton, Bacterioplankton, and Virioplankton in a Coastal Inlet (Bedford Basin) by Flow Cytometry. *Cytometry*, 44, 3, 236-246, 2001
- Marie D., Partensky F., Vaultot D., Brussaard C., 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 cytometry. Supplement 10, Unit 11.11. New York: John Wiley & Sons; 1999. p1-15.
- Rutten T.P.A., Sandee A., Hofman A.R.T., Evaluatie van flowcytometrie fytoplanktonmonitoring 2000, Rapport RIKZ/2001.034, 2001
- Rutten T.P.A., Sandee A., Hofman A.R.T., Flowcytometrie fytoplanktonmonitoring 2001a, Rapport RIKZ/2003.012
- Rutten T.P.A., Sandee A., Hofman A.R.T., Flowcytometrie fytoplanktonmonitoring 2001b, Rapport RIKZ/2003.013