

FLOWCYTOMETRISCHE BEPALING VAN DE FYTO- PLANKTON VOEDINGSSTATUS IN NEDERLANDSE MEREN

RAPPORT

2004

W01



Flowcytometrische bepaling van de fytoplankton
voedingsstatus in Nederlandse meren

RAPPORT

2004
W01

ISBN 90.5773.237.8



stowa@stowa.nl www.stowa.nl
TEL 030 232 11 99 FAX 030 232 17 66
Arthur van Schendelstraat 816
POSTBUS 8090 3503 RB UTRECHT

Publicaties en het publicatie overzicht van de STOWA kunt u uitsluitend bestellen bij:
Hageman Fulfilment POSTBUS 1110, 3300 CC Zwijndrecht,
TEL 078 629 33 32 FAX 078 610 610 42 87 EMAIL info@hageman.nl
onder vermelding van ISBN of STOWA rapportnummer en een duidelijk afleveradres.

COLOFON

Utrecht, 2004

UITGAVE STOWA, Utrecht

BEGELEIDINGSCOMMISSIE

Prof. dr. H.J. Laanbroek (NIOO-CL)

Dr. H.J. Gons (NIOO-CL)

Drs. B. van der Wal (STOWA)

Drs. J.J. Hofstra (DWR)

Drs. G.N.J. ter Heerdt (Waterleidingbedrijf Gemeente Amsterdam)

AUTEURS

Marco Dignum

Hans L. Hoogveld

Herman J. Gons

Hendrikus J. Laanbroek

DRUK Kruyt Grafisch Advies Bureau

STOWA rapportnummer 2004-W01

ISBN 90.5773.237.8

Het onderzoek waarvan in dit rapport verslag wordt gedaan is gefinancierd door:

- De Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer (STOWA),
- onder projectnummer STOWA 2003-0539-B.W.-443074
- De Dienst Waterbeheer en Riolering van de gemeente Amsterdam (DWR), onder projectnummer DWR WB-0001188

Het onderzoek is uitgevoerd van 12 mei tot 1 november 2003

aan het Nederland Instituut voor Ecologie – Centrum voor Limnologie (NIOO-CL)

onder projectnummer 3426 Limitatie, door

- Dr. M. Dignum
- Dhr. H.L. Hoogveld

INBEDDING VAN HET PROJECT

Het monitoren van nutriëntenbeschikbaarheid met fluorogene celmerkers is een nieuwe ontwikkeling in het waterkwaliteitsonderzoek, die relevante informatie toevoegt over de toestand van Nederlandse meren. Dit project is onderdeel van het 'Toolbox'-project, een samenwerking tussen het Nederlands Instituut voor Ecologie-Centrum voor Limnologie (NIOO-CL; Herman Gons, Hans Hoogveld en Riks Laanbroek) en Universiteit van Amsterdam-Aquatische Microbiologie (UvA-AMB; Hans Matthijs en Jef Huisman). Het Toolbox-project is begonnen met het promotieproject van Marco Dignum (NWO projectnr. 805-19-084). Het huidige project is een overbrugging naar een vervolgproject, waarvoor een aanvraag ligt bij de Stichting Technische Wetenschappen (STW). De inbedding van het project in een bredere context is samengevat in appendix A. Daarin worden verschillende complexiteitsniveaus onderscheiden: op beleidsmatig gebied van de Europese Kaderrichtlijn Water en de nationale waterkwaliteitsnormen tot de regionale en lokale waterbeheerders; op wetenschappelijk gebied van ecosysteem, fytoplanktongemeenschap en -populatie tot fytoplanktoncellen en hun moleculaire eigenschappen.

Opdrachtgever STOWA heeft verzocht om het onderzoek zo in te richten dat maximaal gebruik gemaakt kan worden van gegevens uit vergelijkbaar, flankerend onderzoek, zodat onderzoeksinformatie aan elkaar gekoppeld kan worden. De wens van opdrachtgever DWR was om het onderzoek in hun beheersgebied te laten plaatsvinden. Dit project spitst zich daarom toe op de Loosdrechtse Plassen. In hetzelfde gebied, de Noordelijke Vechtplassen, liggen ook de Loenderveense Plas en het gebied Terra Nova, welke worden beheerd door het Waterleidingbedrijf Gemeente Amsterdam. Monsters uit dit gebied werden meegenomen in het onderzoek.

Het project is afgesloten met een presentatie tijdens het minisymposium 'Van vraag naar Kennis – Potentie van fundamenteel onderzoek voor waterbeheer' dat plaatsvond op het NIOO-Centrum voor Limnologie te Nieuwersluis op 30 oktober 2003.

DE STOWA IN HET KORT

De Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer, kortweg STOWA, is het onderzoeksplatform van Nederlandse waterbeheerders. Deelnemers zijn alle beheerders van grondwater en oppervlaktewater in landelijk en stedelijk gebied, beheerders van installaties voor de zuivering van huishoudelijk afvalwater en beheerders van waterkeringen. In 2002 waren dat alle waterschappen, hoogheemraadschappen en zuiveringsschappen, de provincies en het Rijk (i.c. het Rijksinstituut voor Zoetwaterbeheer en de Dienst Weg- en Waterbouw).

De waterbeheerders gebruiken de STOWA voor het realiseren van toegepast technisch, natuurwetenschappelijk, bestuurlijk juridisch en sociaal-wetenschappelijk onderzoek dat voor hen van gemeenschappelijk belang is. Onderzoeksprogramma's komen tot stand op basis van behoefteinventarisaties bij de deelnemers. Onderzoekssuggesties van derden, zoals kennisinstituten en adviesbureaus, zijn van harte welkom. Deze suggesties toetst de STOWA aan de behoeften van de deelnemers.

De STOWA verricht zelf geen onderzoek, maar laat dit uitvoeren door gespecialiseerde instanties. De onderzoeken worden begeleid door begeleidingscommissies. Deze zijn samengesteld uit medewerkers van de deelnemers, znodig aangevuld met andere deskundigen.

Het geld voor onderzoek, ontwikkeling, informatie en diensten brengen de deelnemers samen bijeen. Momenteel bedraagt het jaarlijkse budget zo'n vijf miljoen euro.

U kunt de STOWA bereiken op telefoonnummer: +31 (0)30-2321199.

Ons adres luidt: STOWA, Postbus 8090, 3503 RB Utrecht.

Email: stowa@stowa.nl.

Website: www.stowa.nl.

INHOUD

COLOFON	
INBEDDING VAN HET PROJECT	
STOWA IN HET KORT	
INLEIDING	1
Casestudy Loosdrechtse Plassen	3
MONITORING LOOSDRECHTSE Plassen	
Ruimtelijke variatie in fytoplanktonsamenstelling	5
Temporele variatie in biomassa	6
ELF-KLEURING	
Fosfaatbeschikbaarheid in de Loosdrechtse Plassen	9
Observaties in andere meren	10
Optimalisatie van de ELF-kleuring	11
Ontwikkeling van nieuw kleuringsprotocol	12
CELCYCLUSANALYSE	
Experiment met PicoGreen	15
CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN	
Conclusies	18
Toekomstig werk	19
REFERENTIES	20
APPENDIX A	21

INLEIDING

Een meer dat door hoge externe fosfaattoevoer geëutrofiëerd is, wordt uiteindelijk vaak gedomineerd door een heel veerkrachtige populatie van cyanobacteriën. Om een omslag teweeg te brengen van deze troebele toestand naar helder water met macrofyten, moet de toevoer van fosfaat veel verder worden teruggebracht dan deze oorspronkelijk was (het hysterese effect). De vraag is wanneer zich een dergelijke omslag zal voordoen. Dit kan niet afgeleid worden uit gemeten fosfaat- of biomassaconcentraties. De gevolgen van het terugbrengen van de toevoer van fosfaat zijn wel meetbaar in de kenmerken van de fytoplanktoncellen zelf. In vergelijking met de geëutrofiëerde toestand, worden de fytoplanktoncellen nabij het omslagpunt gekenmerkt door fosfaat-gelimiteerde groei en verlaagde vitaliteit.

Het eerste deel van het Toolbox-project (Dignum 2003) was vooral gericht op de identificatie van enzymen die betrokken zijn bij fosfaatopname in cyanobacteriën, en het ontwikkelen van fluorescente technieken om de aanwezigheid van deze enzymen te detecteren met behulp van flowcytometrie. Drie processen bepalen de efficiëntie van fosfaatincorporatie in cellen: omzetting van organisch fosfaat (fosfatase activiteit zorgt voor fosfaatrecycling), opname van orthofosfaat (hoge affiniteit opname-systemen versus gefaciliteerde diffusie), en opslag in de vorm van polyfosfaat (polyfosfaat kinase/polyfosfatase systeem waarmee tijdelijke fosfaatpulsen maximaal gebruikt kunnen worden). Alkalisch fosfatase is een enzym aan het oppervlak van fytoplanktoncellen, dat zorgt voor de afbraak van organische fosfaatverbindingen. Dit enzym wordt door veel algensoorten alleen aangemaakt wanneer een cel een te lage beschikbaarheid van de voedingsstof orthofosfaat (P_i) waarneemt. Door de activiteit van fosfasen zichtbaar te maken kan op een eenvoudige manier worden aangetoond of de algen een gebrek hebben aan fosfaat. Een nieuw fosfatase substraat is nu commercieel verkrijgbaar als ELF[®] 97 fosfaat (ELFP; Huang et al. 1992). Na defosforylering precipiteert het product, ELF[®] 97 alcohol (ELFA), en vormt sterk groen fluorescente microkristallen op de plek van de enzymatische activiteit. Hierdoor kan de fosfatase activiteit voor het eerst worden toegekend aan individuele fytoplanktoncellen (Rengefors et al. 2003; Nedoma et al. 2003; zie figuur 1) en bovendien worden gemeten met een flowcytometer (Dignum et al. 2004). Dit geeft het voordeel dat in relatief korte tijd aan grote aantallen cellen metingen kunnen worden verricht. Door gelijktijdig de voornaamste fytoplanktongroepen te scheiden op basis van de eigen pigmenten (autofluorescentie; zie figuur 2), kan de enzymatische activiteit bovendien worden gemeten op populatieniveau.

Detectie van de vitaliteit van cellen met fluorescente kleurstoffen geeft een andere mogelijkheid om de voedingstoestand fytoplankton te bestuderen. Drie factoren bepalen de vitaliteit van fytoplanktoncellen: membraan integriteit (lekkage kan aangetoond worden door opname van fluorescente kleurstoffen), aanwezigheid van fotosynthese pigmenten (bleking kan gemeten worden door autofluorescentie intensiteit), en celcyclus (DNA synthese/afbraak kan bepaald worden door DNA kleuring; Veldhuis et al. 2001). In dit project hebben we de laatste mogelijk getest door batchculturen van de dominante soort in de Loosdrechtse Plassen te kleuren met de DNA-specifieke kleurstof PicoGreen.

In dit rapport beschrijven wij eerst een studie naar de variatie in fytoplanktensamenstelling in ruimte en tijd in de Loosdrechtse Plassen. Daarna beschrijven we innovatief onderzoek naar de voedingstatus van fytoplankton, met behulp van de fluorogene kleurstoffen ELF-fosfaat en PicoGreen.

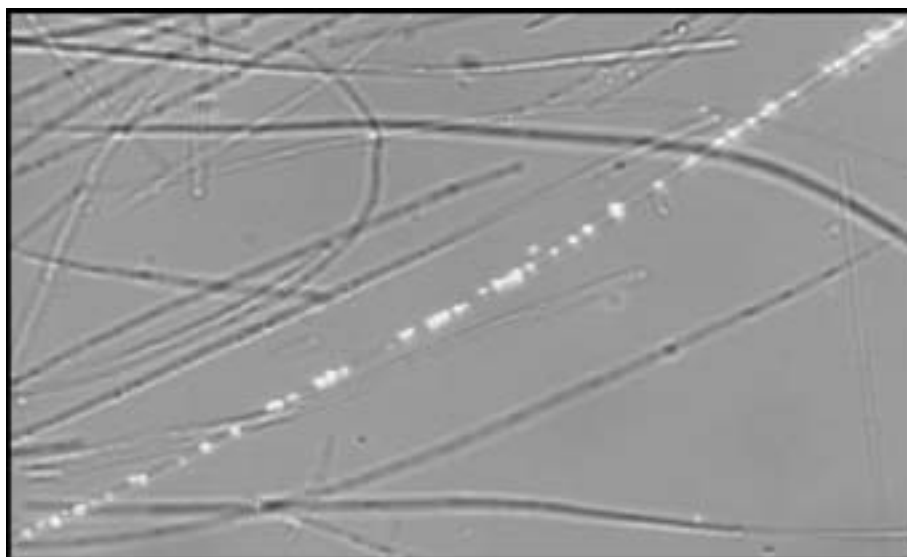
CASESTUDY LOOSDRECHTSE Plassen

De Loosdrechtse Plassen (figuur 3) bestaan uit een aantal met elkaar verbonden plassen, ontstaan door veenwinning, en verdere afkalving door wind- en golfwerking. De plassen zijn representatief voor veel Nederlandse laagveenwateren (Gulati en Van Donk 2002). Er is veel bekend over de geëutrofiëerde toestand van der plassen, door het Waterkwaliteit Onderzoek Loosdrechtse plassen (WOL 1979-1992; Van Liere et al. 1992). In verband met de Europese Kaderrichtlijn Water is het nog niet zeker of de plassen worden gedefinieerd als sterk veranderde wateren, zoals in een eerdere casestudy (Lorenz 2000), of als kunstmatig water. Het is nog niet zeker wat wordt aangewezen als ongestoorde referentietoestand: de oorspronkelijke oligotrofe toestand van voor 1920, toen er zelfs geen waterplanten groeiden vanwege nutriëntengebrek, of van de heldere, mesotrofe toestand van rond 1940 met waterplanten (Hofstra and Van Liere 1992).

Sinds 1984 zijn herstelmaatregelen van kracht om de externe fosfaatbelasting sterk te verlagen. De verlaagde toevoer heeft er toe geleid dat de biomassa iets lager is geworden, en het doorzicht iets is verbeterd. Er is echter nog veel gebonden fosfaat in het systeem achtergebleven, en het aantal gesuspendeerde deeltjes is vrijwel gelijk gebleven. Door hun dynamische aanpassingsvermogen zijn draadvormige cyanobacteriën dominant geworden. Aanvullende maatregelen zijn daarom nodig. Met het Herstelplan Loosdrecht zet DWR in op het aanleggen van plaatselijke verdiepingen, waarin zwevend slib opgevangen zal worden. In samenhang met de teruggebrachte fosfaatbelasting moeten deze maatregelen leiden tot een verbetering van het lichtklimaat en de voedingsstatus in het water, en daarmee de ontwikkelingskansen van waterplanten vergroten. Het Waterleidingbedrijf heeft een experimenteel gebied ingericht in Terra Nova om het effect van actief biologisch beheer te onderzoeken. Het is met traditionele chemische en biologische analyses echter moeilijk om de beschikbaarheid van interne fosfaatbronnen in te schatten voor de aanwezige populaties. Om het effect van de voorgenomen beheersmaatregelen aan te tonen, zijn daarom aanvullende analyses nodig.

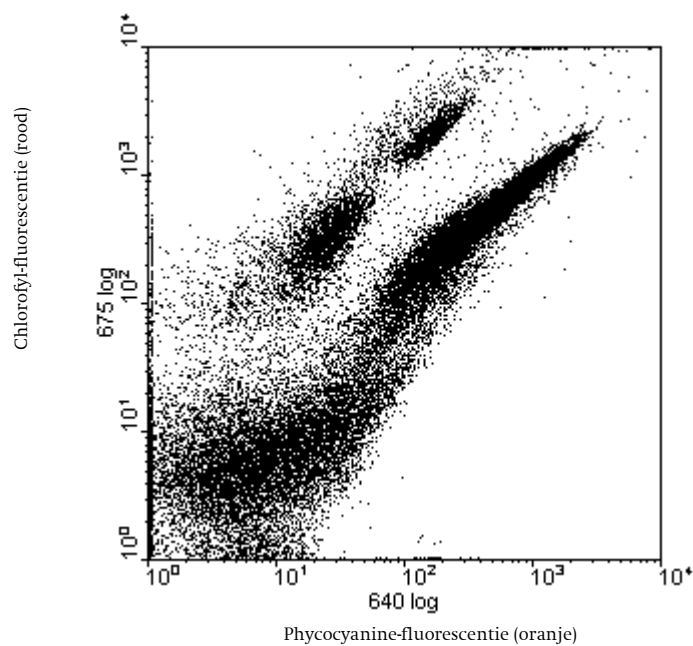
De ELF-kleuringsmethode hebben we al uitgetest met monsters uit de Loosdrechtse Plassen (Dignum 2003). In dit meer leven naast elkaar twee populaties van draadvormige cyanobacteriën, *Limnothrix* sp. en *Prochlorothrix hollandica*. Deze soorten kunnen op basis van hun autofluorescentie van elkaar en van de ook aanwezige (eukaryote) algen en dode cellen (detritus) worden onderscheiden (figuur 2). Uit onze experimenten blijkt dat *Limnothrix* wel fosfatase activiteit heeft, en *Prochlorothrix* niet (Dignum et al. 2004). In 2001 had de *Limnothrix*-populatie fosfaatgebrek, die varieerde in het groeiseizoen. Binnen de populatie traden ook verschillen op in de mate van kleuring, deze verschillen bleken gerelateerd te zijn aan de vitaliteit en de groeisnelheid van de cellen (Dignum et al, manuscript in voorbereiding).

FIGUUR 1 DRAADVORMIGE CYANOBACTERIËN UIT DE LOOSDRECHTSE Plassen MET ELFA-KLEURING (MICROSCOPISCHE FOTO; DUBBEL BELICHT MET HELDERVELD EN UV). HET TRICHOOM OP DE LINKSONDER-RECHTSBOVEN DIAGONAAL LAAT DUIDELIJK DE ELFA-FLUORESCENTIE ZIEN.



FIGUUR 2 FLOWCYTOMETRISCHE SCHEIDING VAN FYTOPLANKTONGROEPEN UIT DE LOOSDRECHTSE Plassen (WEST-END, 02-09-2003).

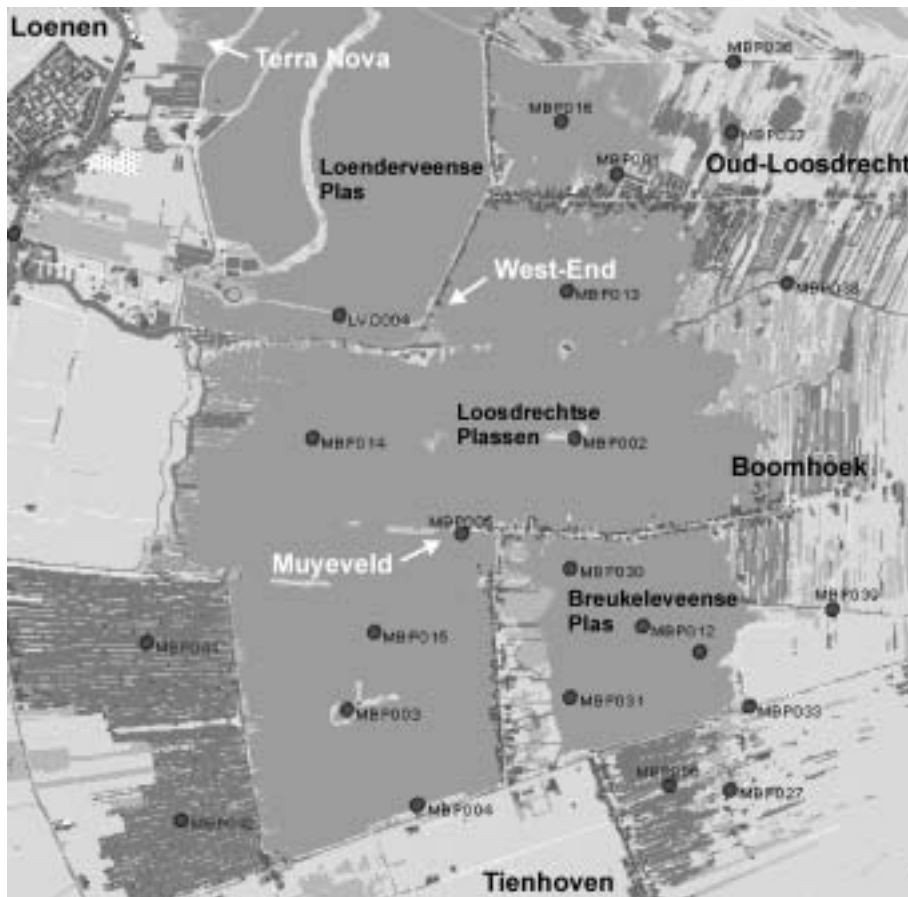
- A: EUKARYOTE ALGEN (ZOWEL GROENALGEN ALS DIATOMEEËN)
- B: DRAADVORMIGE CYANOBACTERIËN ZONDER PHYCOCYANINE (*PROCHLOROTHRIX HOLLANDICA*)
- C: CYANOBACTERIËN MET PHYCOCYANINE (VOORNAMELIJK DE DRAADVORMIGE *LIMNOTHRIX* SP.)
- D: DETRITUS (DODE CELLEN).



RUIMTELIJKE VARIATIE IN FYTOPLANKTONSAMENSTELLING

Het NIOO-CL en DWR hebben langlopende meetreeksen op verschillende meetpunten in de Loosdrechtse Plassen. Het NIOO-CL heeft een reeks fytoplankton tellingen in het meetpunt bij de jachthaven West-End (zie figuur 3). Het Gebiedsgerichte Monitoringsprogramma Loosdrechtse Plassen van DWR omvat meerdere meetpunten; de meetreeks van de landtong bij Muyevelt (meetpunt MBP005; zie figuur 3) heeft de grootste continuïteit van gegevens die relevant zijn voor ons onderzoek. Voordat de datareeksen met elkaar vergeleken kunnen worden, is het belangrijk na te gaan hoe groot de ruimtelijke variatie tussen beide meetpunten. Het elektrisch geleidend vermogen (EGV; 'conductivity') is een geschikte parameter voor bepaling van de ruimtelijke variatie. Andere parameters die in beide laboratoria gemeten worden zijn concentraties van chlorofyl en humuszuren.

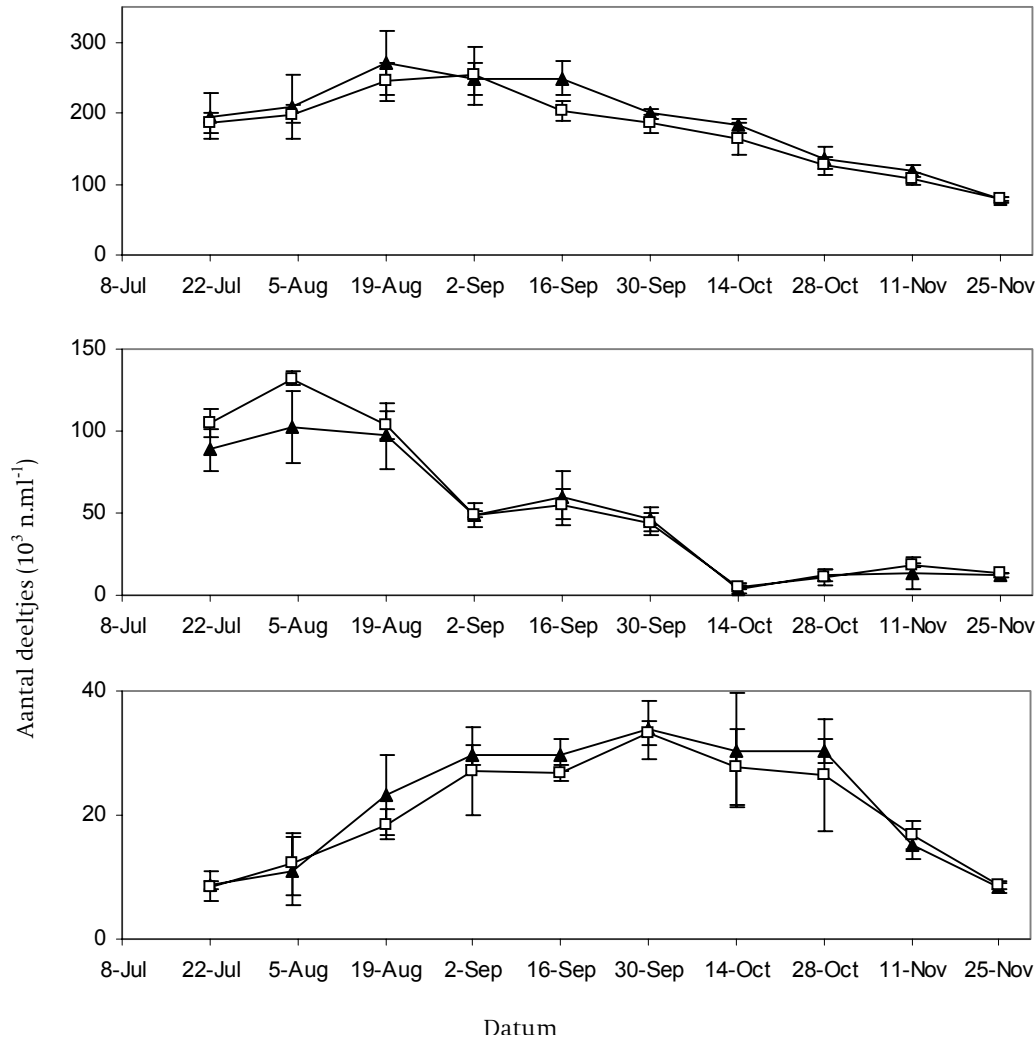
FIGUUR 3 MEETPUNTEN IN DE LOOSDRECHTSE PLASSEN. MEETPUNTEN WEST-END (NIOO-CL), MUYEVELD (DWR), EN HET EXPERIMENTELE PLASSENGEBIED TERRA NOVA (WATERLEIDINGBEDRIJF GEMEENTE AMSTERDAM) ZIJN AANGEGEVEN MET EEN PIJL, MEETPUNTEN IN HET GEBIEDSGERICHTE MONITORINGSPROGRAMMA (DWR) ZIJN AANGEGEVEN MET EEN RODE STIP (BRON: DWR).



DWR heeft van juni tot december 2003 tweewekelijks monsters uit West-End meegenomen in het Gebiedsgerichte Monitorings-programma. Voor beide meetpunten heeft de werkgroep Microbiële Ecologie (ME) EGV, droge stof, en chlorofyl-gehaltenes bepaald, en flowcytometrische fytoplankton tellingen uitgevoerd. Analyse van de gegevens laat zien dat de EGV-waarden van beide meetpunten heel dicht bij elkaar liggen (niet getoond). De chlorofyl-concentraties verschillen meer (tot ongeveer 23%). Het is echter bekend dat deze variabele een groot dynamisch bereik heeft en sterk beïnvloed wordt door lokale omstandigheden, en

daardoor minder geschikt is voor het maken van een vergelijking. Een vergelijking van flowcytometrische fytoplanktontellingen in beide meetpunten is weergegeven in figuur 4. Uit deze resultaten blijkt dat de aantallen in de meetpunten West-End en Muyevelde niet significant van elkaar verschillen. Op grond van deze uitkomsten concluderen we dat de meetreeksen in West-End en Muyevelde als aanvullend mogen worden beschouwd.

FIGUUR 4 VERGELIJKING VAN POPULATIEDICHTHEDEN VAN FYTOPLANKTONGROEPEN IN DE TWEEDE HELFT VAN 2001, GEMETEN MET DE FLOWCYTOMETER IN MEETPUNTEN WEST-END (ZWARTE DRIEHOEKEN) EN MUYEVELD (WITTE VIERKANTEN). BETROUWBAARHEIDINTERVALS (95%, 2 VRIJHEIDGRADEN) ZIJN VOOR IEDER PUNT AANGEGEVEN IN BALKJES. A: CYANOBACTERIËN (VOORNAMELIJK *LIMNOTHRIX* SP.) B: *PROCHLOROTHRIX HOLLANDICA* C: EUKARYOTE ALGEN.

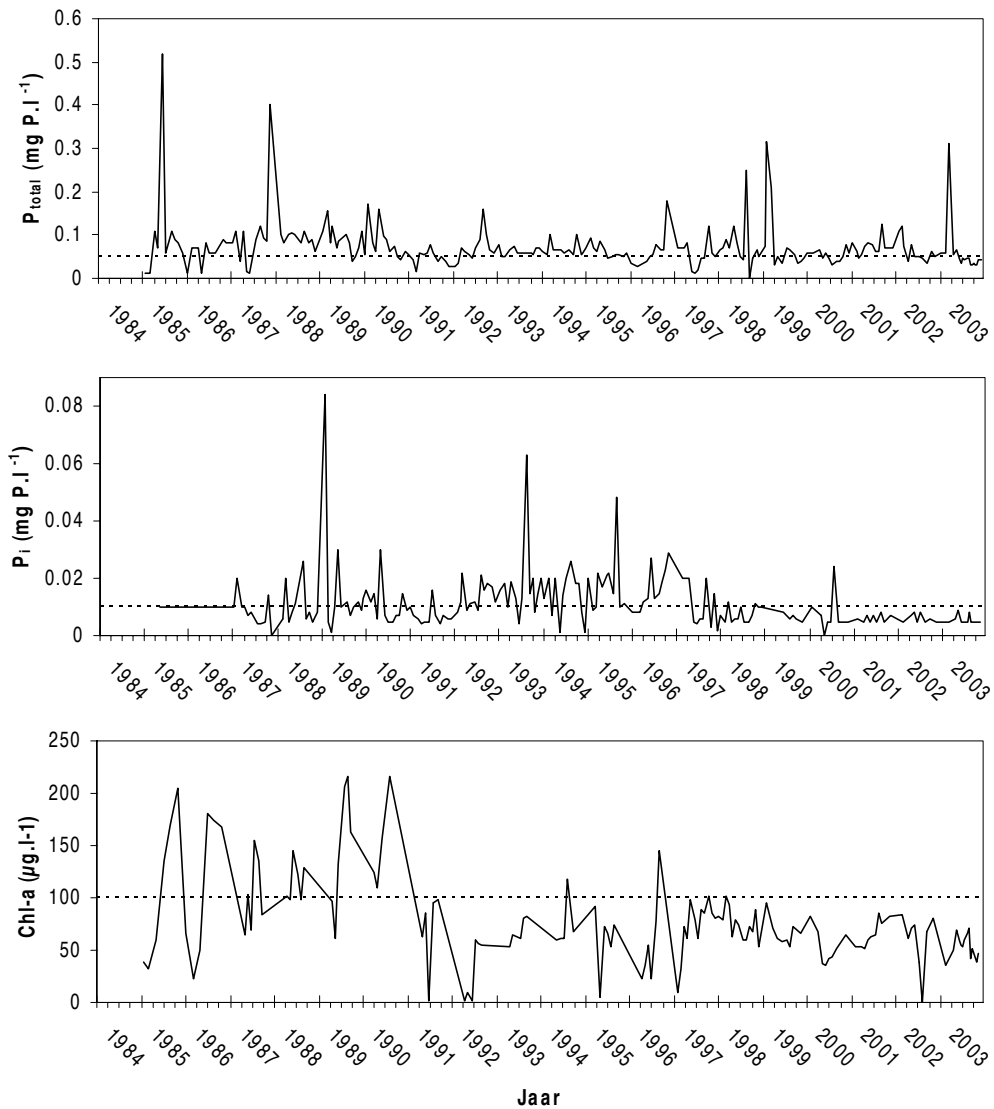


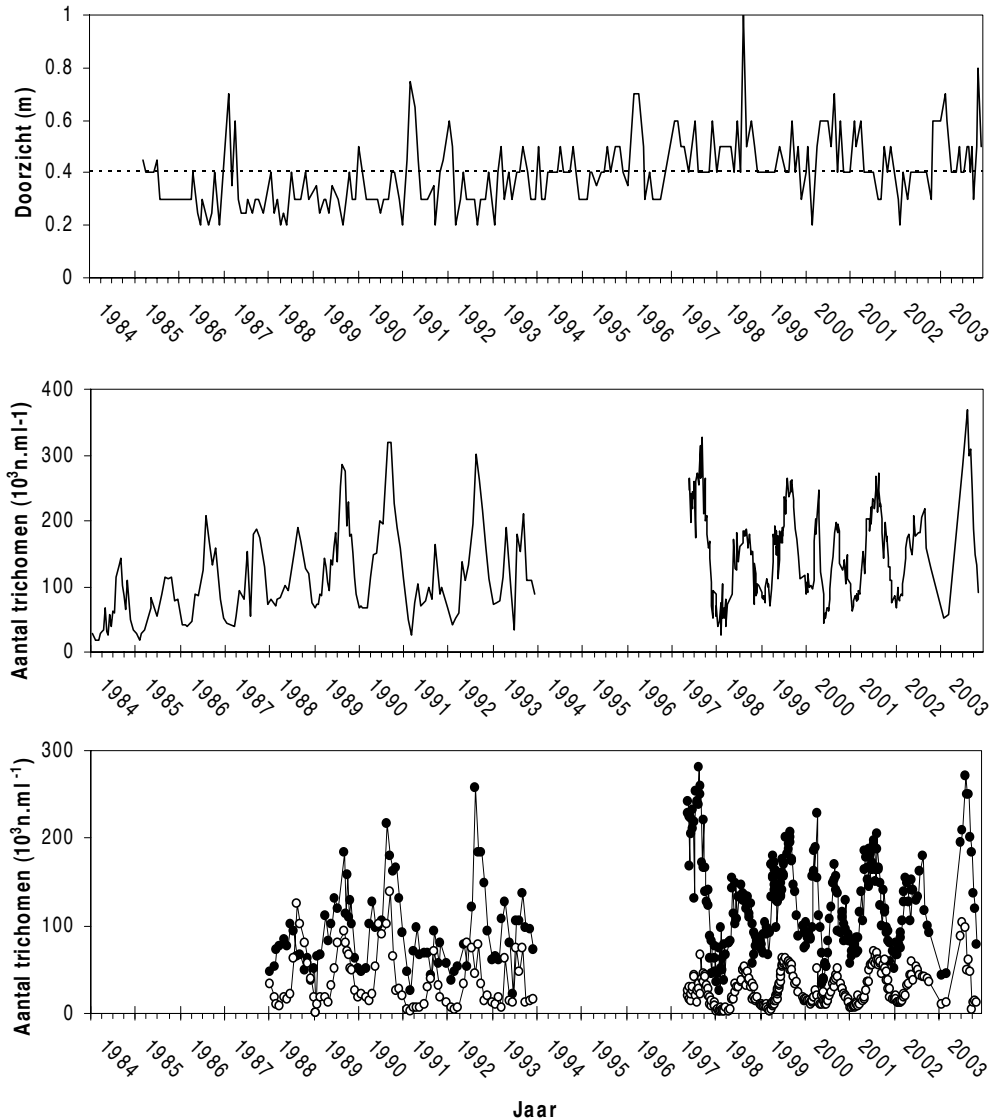
TEMPORELE VARIATIE IN BIOMASSA

De langlopende meetreeksen in de meetpunten West-End en Muyevelde laten de variatie van de belangrijkste waterkwaliteitsindicatoren in de tijd zien (figuur 5). De totaal-fosfaat concentraties (P_{total} ; zowel opgelost als particulier) in meetpunt Muyevelde verschilt niet significant van die in meetpunt West-End (niet getoond), de waarden liggen om en nabij de voorgestelde streefwaarde (0.05 mg P.l⁻¹; Van Liere en Van Donk 2002; zie figuur 5A). Omdat de totale fosfaatconcentratie voor een groot deel bepaald wordt door de hoeveelheid fosfaat in levende cellen, is deze variabele eerder een maat voor de biomassa dan voor de voedings-

status. Metingen van de concentratie opgelost orthofosfaat liggen sinds 1998 grotendeels onder de detectiegrens, en zijn daarom niet goed bruikbaar (figuur 5B). De metingen geven wel aan dat de concentratie opgelost fosfaat inmiddels zeer laag is.

FIGUUR 5 WATERKwaliteitsindicatoren in de Loosdrechtse plassen. A: TOTAAL-FOSFAAT, MEETREKKS MUYVELD (DWR). DE VOORGESTELDE STREEFWAARDE IS WEERGEGEVEN MET EEN STIPPELLIJK. B: OPGELOST ORTHOFOSFAAT. DE DETECTIEGREN IS WEERGEGEVEN MET EEN STIPPELLIJK. C: CHLOROFYL A CONCENTRATIE, DE MTR WAARDE IS WEERGEGEVEN MET EEN STIPPELLIJK. D: DOORZICHT, DE STREEFWAARDE IS WEERGEGEVEN MET EEN STIPPELLIJK. E: TOTAAL AANTAL DRAADVORMIGE CYANOBACTERIËN, MEETREKKS WEST-END (NIOO-CL). F: AFZONDERLIJKE AANTALLEN DRAADVORMIGE CYANOBACTERIËN *LIMNOTHRIX SP.* (DICHTE SYMBOLEN) EN *PROCHLOROTHRIX HOLLANDICA* (OPEN SYMBOLEN). FYTOPLANKONTELLINGEN ZIJN GEDAAN MET BEHULP VAN FLUORESCENTIE MICROSCOPIE (PERIODE 1988 T/M 1993), EN MET BEHULP VAN FLOWCYTOMETRIE (PERIODE 1997 T/M 2003).





De chlorofyl-concentratie ligt sinds 1991 onder de Maximaal Toegestaan Risico (MTR) waarde (figuur 5C). Het doorzicht is iets verbeterd, de Secchi-schijf diepte is sinds 1995 overwegend meer dan 0.4 meter (figuur 5D). Fytoplanktontellingen laten, naast een sterke seizoensvariatie, echter zien dat het aantal draadvormige cyanobacteriën in de periode 1984-1993 licht is toegenomen, en in de periode 1997-2003 stabiel is gebleven (figuur 5E), als in aanmerking wordt genomen dat beide meetmethoden (fluorescentie microscopie en flowcytometrie) resultaten opleveren die niet significant van elkaar verschillen (H.L. Hoogveld, ongepubliceerde resultaten). Onderscheid tussen de belangrijkste draadvormige cyanobacteriën *Limnothrix* sp. en *P. hollandica* was mogelijk na de ontdekking van de laatste soort in 1986. Tellingen zijn uitgevoerd door het NIOO-CL met behulp van fluorescentie microscopie van 1988 t/m 1993, en met behulp van flowcytometrie van 1997 t/m 2002 (figuur 5F; zie ook Dignum 2003). In maart 2003 is de werkgroep ME van het NIOO-CL gestart met een uitgebreider monitoringsprogramma in meetpunt West-End, met tweeweekelijks 1 bemonstering, waarbij ondermeer virustellingen (Marjolijn Tijdens), optische metingen waaronder absorptie-coëfficiënten van de hoofdbestanddelen in het water (Stefan Simis), en flowcytometrische fytoplanktontellingen (Hans Hoogveld en Marco Dignum; figuur 5C) verricht worden.

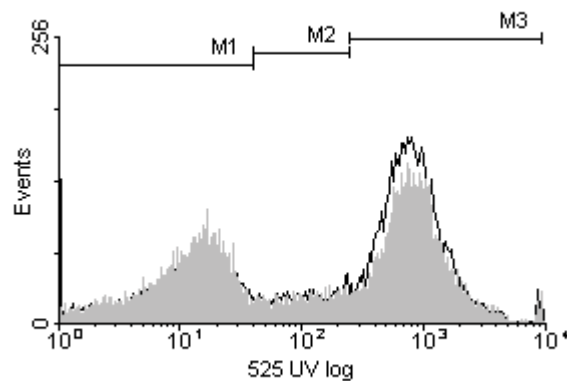
ELF-KLEURING

FOSFAATBESCHIKBAARHEID IN DE LOOSDRECHTSE Plassen

Alkalisch fosfatase activiteit is een goede indicator voor de mate van fosfaat-limitatie van fytoplankton. Het ELFP-substraat toont aan welke cellen fosfatase-activiteit vertonen (Dignum et al. 2004), doordat het sterk groen fluorescente microkristallen (ELFA-product) vormt op de plek van enzymatische activiteit. Excitatie van ELFA treedt op met Ultraviolet licht (UV; maximum 360 nm), en geeft een emissie-maximum bij 525 nm (groen licht, zie figuur 1). Het ELFA-signaal dat wordt gemeten met de flowcytometer kan, empirisch, worden ingedeeld in cellen met lage, intermediaire, en hoge intensiteit (figuur 6, respectievelijk M1, M2, en M3).

Watermonsters uit de Loosdrechtse Plassen (meetpunt West-End) die waren gekleurd met ELFP-substraat in mei/juni 2003, met 1:5 verdunde buffer en 30 minuten incubatietijd, gaven met de flowcytometer nauwelijks verschil tussen de ELF-gekleurde monsters en controles zonder ELFP-substraat (enkele procenten deeltjes in de hoogste 525 nm piek). De ELF-kleuring gaf voor beide monsterplekken (West-End en Muyevelde) een vergelijkbaar beeld. Het hoogste signaal werd gemeten op 25-06-2003 (West-End, aangeleverd door Babette Bontes, NIOO-CL): 7.8% deeltjes met een verhoogde fluorescentie bij 525 nm (figuur 6).

FIGUUR 6 CYTOGRAM VAN ELF-KLEURING VAN EEN WATERMONSTER UIT DE LOOSDRECHTSE Plassen (WEST-END 25-06-2003). DE ELF-KLEURING (30 MINUTEN MET 1:5 VERDUNDE BUFFER) IS IN ZWARTE LIJN WEERGEGEVEN, DE ONGEKLEURDE CONTROLE IN LICHTGRIJS OP DE VOORGROND.



Het ELFA-signaal lijkt minder sterk te zijn dan bij de metingen in 2001 (Dignum et al. 2004), en wordt overlapt door een sterk achtergrondsignaal. Het functioneren van de flowcytometer werd gecontroleerd met fluoresceïne-gecoate beads, die ongeveer dezelfde excitatie- en emissiegolflengte hebben als het ELFA-product. Hieruit bleek dat het signaal wel goed versterkt werd. Het achtergrondsignaal was ook aanwezig in onbehandelde monsters en in controles zonder ELFP-substraat, en bleef bestaan als de UV laser werd uitgezet.

Met de fluorescentiemicroscop (UV excitatie) zagen we wel duidelijk het karakteristieke ELFA-signaal (vgl. figuur 1); het was op het oog moeilijk in te schatten of het net zo sterk was als in eerdere metingen (Dignum et al. 2004). Kleuring met onverdunde buffer leek een iets beter signaal te geven. Zowel in de ELF-gekleurde monsters als de controlebehandeling

was een groenige zweem te zien, die egaal verdeeld was over de cellen. Met blauw licht excitatie was naast de rode fluorescentie (afkomstig van chlorofyl) een gelige fluorescentie te zien. Door het gebrek aan ELFA-sigitaal en de storende achtergrond lijken de data onbruikbaar. Omdat de kleuring er onder de microscoop wel goed uitzag, hebben we aanvullende experimenten opgezet om er achter te komen wat er mis was met de metingen. Deze staan beschreven in de paragraaf 'Optimalisatie van de ELF-kleuring'.

Op 08-06-2003 was in de meeste draadvormige cyanobacteriën in de Loosdrechtse Plassen (meetpunt West-End) geen ELFA-sigitaal zichtbaar onder de microscoop, met de flowcytometer maten we een verhoging van 1% deeltjes met hoge intensiteit van 525 nm fluorescentie. Dit wijst erop dat er op dat moment geen fosfaat-limitatie was.

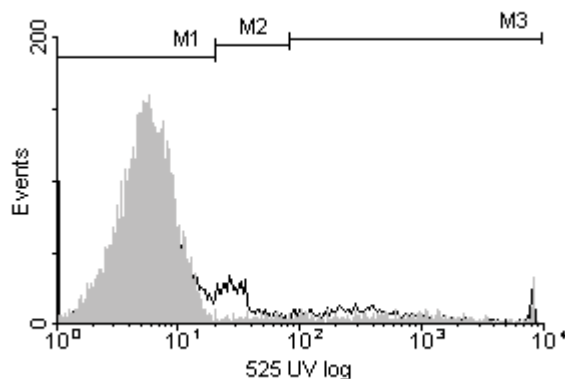
OBSERVATIES IN ANDERE MEREN

In dit project hebben wij ook monsters geanalyseerd uit het biomanipulatie experiment van het Waterleidingbedrijf Gemeente Amsterdam in Terra Nova, ten Noorden van de Loosdrechtse Plassen (figuur 3). In dit gebied zijn petgaten afgesloten en afgeschermd voor de wind, en op verschillende manieren behandeld. In het ene afgesloten proefgebieden werd alle witvis weggevangen, in het andere werd de vis weggevangen en teruggezet (bekende hoeveelheid vis). Ook werden monsters genomen in een referentiegebied waar de vis niet was weggevangen (onbekende hoeveelheid vis).

In de afgesloten proefgebieden zagen we microscopisch voornamelijk flagellaten met enig ELFA-sigitaal (enkele kristallen). De celdichtheid was heel laag, en er kwamen nauwelijks cyanobacteriën voor. Met de flowcytometer maten we nauwelijks ELFA-sigitaal. Alleen referentiemonsters, die veel hogere aantallen fytoplankton vertoonden, gaven verhoogde 525 nm fluorescentie: 15.2% van de deeltjes had ELFA-sigitaal op 19-05-2003 (figuur 7), en op 02-06-2003 had 13% van de deeltjes sterke 525 nm fluorescentie. Dit relatief sterke sigitaal werd waarschijnlijk veroorzaakt door de aanwezigheid van *Aphanizomenon* sp., een soort die een sterk ELF-sigitaal heeft (Dignum et al. 2004). Het is waarschijnlijk dat het grote aantal cellen in dit gebied de beschikbare hoeveelheid fosfaat snel opnam, waardoor er een indicatie was voor fosfaat-limitatie.

FIGUUR 7

CYTOGRAM VAN ELF-KLEURING VAN EEN WATERMONSTER UIT TERRA NOVA (REFERENTIEMONSTER 19-05-2003). DE ELF-KLEURING IS IN ZWARTE LIJN WEERGEGEVEN (30 MINUTEN MET 1:5 VERDUNDE BUFFER), DE ONGEKLEURDE CONTROLE IN LICHTGRIJS OP DE VOORGROND.



In monsters die we ten behoeve van een ander experiment hebben genomen uit de Amstelveense Poel waren diverse groenalgen en *Microcystis* aanwezig, maar geen draadvormige cyanobacteriën. Er was vrij veel diffuse groene achtergrond-fluorescentie, vooral in 'dode' cellen, zonder chlorofyl. Alleen in één soort groenalgen met ovale cellen, morfologisch gedetermineerd als *Oocystis* sp., kwam ELFA-sigitaal voor.

In monsters uit het IJsselmeer (monsternamenpunten bij Urk, Medemblik en Stavoren) maakten we de volgende observaties: *Microcystis* was dominant, maar vertoonde geen ELFA-sigitaal; in de minderheid waren *Scenedesmus* en *Diatoma* met enkele kristallen ELFA-sigitaal, en *Melosira* vertoonde wel ELFA-sigitaal. In de -ELF controle kwamen veel deeltjes voor met vaag-groene fluorescentie. In de IJsselmonding en het Ketelmeer was helemaal geen ELFA-sigitaal te zien; de monsters bevatten weinig cellen, en vooral detritus.

OPTIMALISATIE VAN DE ELF-KLEURING

Om de ELF-kleuring te optimaliseren met behulp van monsters waarvan we zeker wisten dat ze fosfaatgebrek hadden, hebben we op 09-06-2003 een batchcultuur ingezet met 300 ml mineraal medium zonder fosfaat, waaraan toegevoegd 30 ml van een cultuur van de dominante soort *Limnothrix* sp. isolaat MR1 in stationaire fase. Ter vergelijking hebben we op 10 juli ook monsters genomen uit een 10 L vat met exponentieel groeiende *Limnothrix* sp. isolaat MR1, die was aangeënt op 1 juli met overmaat fosfaat.

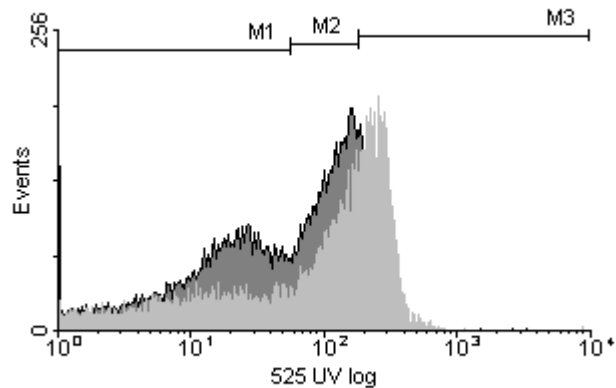
De *Limnothrix* batchcultuur zonder fosfaat (Lim -P) had op 23 juli (na 14 dagen) ELFA-sigitaal in ongeveer de helft van de filamenten. Er waren ook groepjes heterotrofe (pigmentloze) bacteriën te zien met sterk groene fluorescentie, en vaag groen-fluorescente filamenten zonder chlorofyl. De fosfaat-rijke exponentieel groeiende cultuur had helemaal geen ELFA-sigitaal, wel lichtgroene filamenten zonder chlorofyl. Deze waren met helderveld nauwelijks zichtbaar. Deze 'lege celhulzen' waren ook aanwezig in onbehandelde monsters, de vage groene fluorescentie was ook aanwezig in levende cellen, maar was daarin moeilijk zichtbaar door de overheersende rode chlorofyl-fluorescentie. Niet-gefixeerde monsters van de Lim -P cultuur hadden niet deze groene zweem, maar waren na ELF-kleuring uit elkaar gevallen in veel korte stukjes.

De buffer die bij de ELF-detectie kit geleverd wordt, bevat o.a. 3 M NaCl, deze hoge zoutsterkte kan leiden tot breken of lyseren van de cellen. Een eerder pilotexperiment wees erop dat 1:5 verdunning van de buffer nog steeds goede resultaten gaf, terwijl 1:10 verdunde buffer geen ELF-kleuring meer opleverde. Om meer gedetailleerd te kijken hoe het ELFA-sigitaal zich ontwikkelt, hebben we een aantal tijdreeksen van de kleuring gemeten met de fosfaat-gehongerde batchcultuur van *Limnothrix* sp. isolaat MR1. Onder de microscoop was met de 1:5 verdunde buffer pas na 30 minuten enig ELFA-sigitaal te zien. Met onverdunde buffer kwam het sigitaal iets sneller op. Na 10 minuten was er nog geen ELFA-sigitaal zichtbaar, wel vage groene vlekken. Na 15 minuten werden de eerste ELFA kristallen zichtbaar.

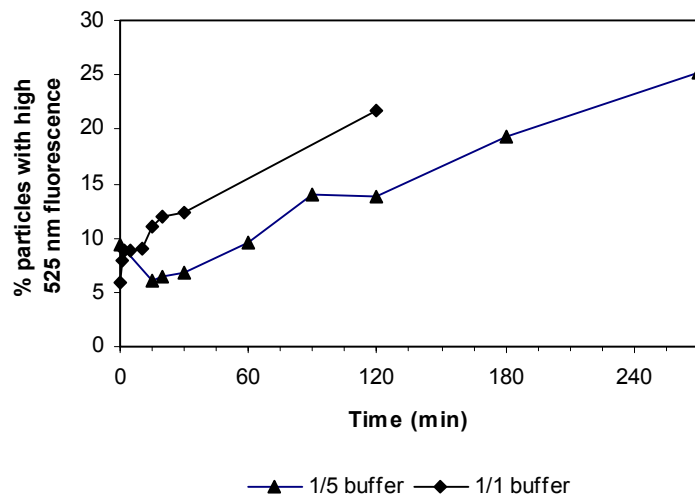
In de flowcytometrische histogrammen was heel moeilijk het verschil tussen ELF-gekleurde en controle monsters te zien. Met een spanning van 420 V op de fotodetector (photomultiplier tube; PMT) was de groene fluorescentie geheel niet zichtbaar. Met 1020 V was er wel verschil tussen de extremen ($t=0$ en $t=270$ minuten voor de 1:5 verdunde buffer, en tussen $t=0$ en $t=120$ voor de onverdunde buffer). Dit verschil uitte zich vooral in een afname van het aantal deeltjes in de basis-piek met lage 525 nm fluorescentie. Na samenvoegen van

data met behulp van WinMDI-software was te zien dat er wel verschuiving optreedt naar een hogere intensiteit, maar dat deze grotendeels verdwijnt onder de piek van de groene, door fixatief versterkte autofluorescentie (figuur 8). Door de grens precies tussen de twee pieken in te leggen (525 UV log = 590) kon de toename van het ELFA-sigitaal in de tijd worden ingeschat (figuur 9). Er bleek een vertraging op te treden in de ontwikkeling van het ELFA-sigitaal als een 1:5 verdunning van de buffer werd gebruikt.

FIGUUR 8 CYTOGRAM VAN ELF-KLEURING VAN EEN FOSFAAT-GEHONGERDE BATCHCULTUUR VAN *LIMNOTHRIX* SP. ISOLAAT MR1. IN DONKERGRIJS OP DE ACHTERGROND IS DE SITUATIE OP T=0 WEERGEGEVEN, IN LICHTGRIJS OP DE VOORGROND DE KLEURING NA 270 MINUTEN MET 1:5 VERDUNDE BUFFER.



FIGUUR 9 TIJDREEKS VAN DE ELF-KLEURING VAN EEN FOSFAAT-GEHONGERDE BATCHCULTUUR VAN *LIMNOTHRIX* SP. ISOLAAT MR1. HET AANTAL DEELTJES MET HOGE 525 NM FLUORESCENTIE (UV-EXCITATIE) MET 1:5 VERDUNDE BUFFER IS WEERGEGEVEN IN DRIEHOEKEN, MET ONVERDUNDE BUFFER IN RUITEN. DE SPANNING OP DE FOTODETECTOR DIE DE 525 NM EMISSIE NA UV EXCITATIE OPVING WAS 1020 V.



ONTWIKKELING VAN NIEUW KLEURINGS-PROTOCOL

Uit de tijdreeks van de ELF-kleuring (figuur 9) blijkt dat er bij de kleuring met 1:5 verdunde buffer een vertraging optreedt in het zichtbaar worden van het ELFA-sigitaal. Pas na een uur komt het signaal boven het basis-sigitaal uit. Ondanks het nadeel van de hoge zoutsterkte in de buffer (3M NaCl) verdient het dus toch de aanbeveling om te kleuren met onverdunde buffer. De vertraging in de kleurreactie komt overeen met de recente bevindingen van

Nedoma et al. (2003). In een kinetische studie van de ELF-kleuring met fluorescentiemicroscopie vonden deze auteurs dat de neerslag van ELFA niet lineair is, maar dat een variabele vertraging optreedt, die langer is naarmate de fosfatase activiteit lager is (zij vonden vertragingen van enkele uren). Een mogelijke oorzaak voor deze vertraging ligt in het feit dat na de enzymatische hydrolyse van ELFP eerst een niet-fluorescente, oplosbare fenol-vorm van ELFA ontstaat. Pas na vorming van een interne waterstofbrug wordt ELFA onoplosbaar in water en sterk fluorescent. Dit proces is dus niet afhankelijk van de enzymatische omzettingssnelheid, en hangt af van een kritische ELFA concentratie en nucleatie (Huang et al. 1992). Het beste zou zijn om in alle gevallen tijdreeksen te meten, zodat de uiteindelijke meting altijd in het lineaire gebied valt. Door de beperkte tijd die beschikbaar is voor het gebruik van de flowcytometer, moet er echter een andere experimentele opzet bedacht worden.

Daarnaast veroorzaakte de excitatie met UV-licht, zoals nodig voor de ELF-kleuringsmethode, een heel hoog achtergrondsignaal, waardoor het ELFA-signaal moeilijk te onderscheiden was. Het ELFA-signaal verdwijnt grotendeels onder een piek van groene achtergrondfluorescentie, die wordt veroorzaakt door de fixatie. Om te bepalen welk fixatief zorgt voor de verhoogde groene fluorescentie bij UV-excitatie, hebben we monsters apart met formaldehyde en glutaaraldehyde behandeld. Daaruit bleek dat formaldehyde concentraties van 0.005-0.02% geen verhoging van het 525 nm signaal gaven (figuur 10C), maar wel een samentrekking van de fytoplanktonclusters in tweedimensionale Chlorofyl vs. Phycocyanine histogrammen (figuur 10A). Glutaaraldehyde in concentraties van 0.05-0.2% w/v conserveert beter de clustering (figuur 10B), maar veroorzaakt wel verhoging van het 525 nm signaal (figuur 10D).

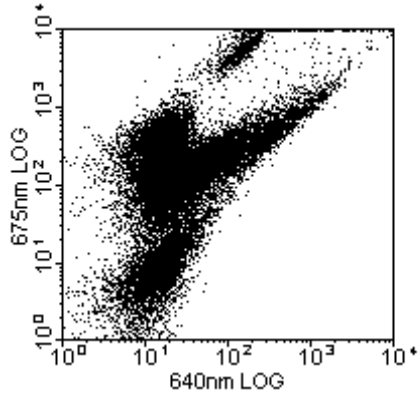
Kleuring van ongefixeerde monsters gaf een iets sterker ELFA-signaal, maar de deeltjes klonterden samen en filamenten gingen stuk. De overgebleven filamenten hadden nauwelijks ELFA-signaal. Uit flowcytometrische analyse bleek dat vooral de cyanobacteriën uit het monster waren verdwenen. Weglaten van de fixatiestap heeft dus grote nadelen: de filamenten breken gemakkelijker tijdens de kleuring en analyse, en de logistiek van monsternamen en kleuring zou veel moeilijker worden. Monsters kunnen na kleuring niet zonder fixatief bewaard worden. De combinatie van lage concentraties van de fixatiemiddelen formaldehyde en glutaaraldehyde is ideaal uit het oogpunt van conservering van cellen en autofluorescentie.

Wellicht kan gebruik gemaakt worden van de bevinding dat ELF-gekleurde cellen lang (ten minste 3 maanden; Nedoma et al. 2003; Rengefors et al. 2003) bewaard kunnen worden. Dit biedt de mogelijkheid om de cellen direct na monsternamen te kleuren, en daarna te bewaren voor latere analyse met de flowcytometer. Kleuring van ongefixeerde monsters, direct gevolgd door fixatie gaf een veel lagere groene achtergrondfluorescentie. Variatie van de incubatietemperatuur van langdurige ELF-kleuring (18 uur) bij verschillende temperaturen (onverdunde buffer) gaf geen grote verbetering. Wel was met de fluorescentiemicroscopie te zien dat bij 4°C het ELFA-signaal veel minder sterk was dan bij 18°C en 21°C. Bij 30°C waren de ELFA-kristallen uitgegroeid in stervormige uitlopers. Incubatie bij 21°C gaf het beste resultaat: 13% van de filamenten met chlorofyl had een verhoogd ELFA-signaal.

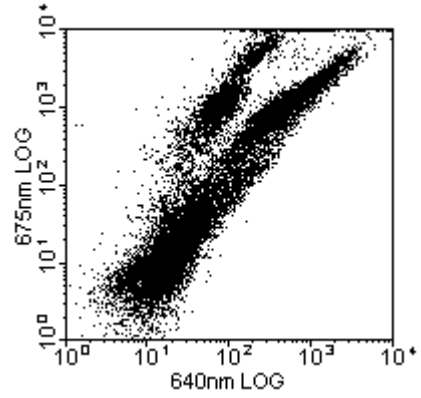
FIGUUR 10

INVLOED VAN DE AFZONDERLIJKE COMPONENTEN VAN HET FIXEERMIDDEL. TWEEDIMENSIONALE CYTOGRAMMEN (CHLOROFYL 675 NM VS. PHYCOCYANINE 640 NM FLUORESCENTIE; A,B) EN ELF-CYTOGRAMMEN (C,D) VAN LOOSDRECHTSE Plassen MONSTERS BEHANDELD MET 0.01 % W/V FORMALDEHYDE (A,C) EN 0.1 % W/V GLUTAARALDEHYDE (B,D).

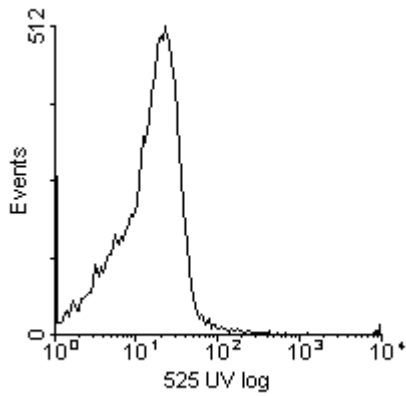
A



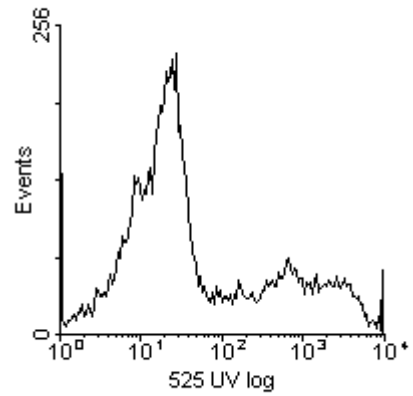
B



C



D

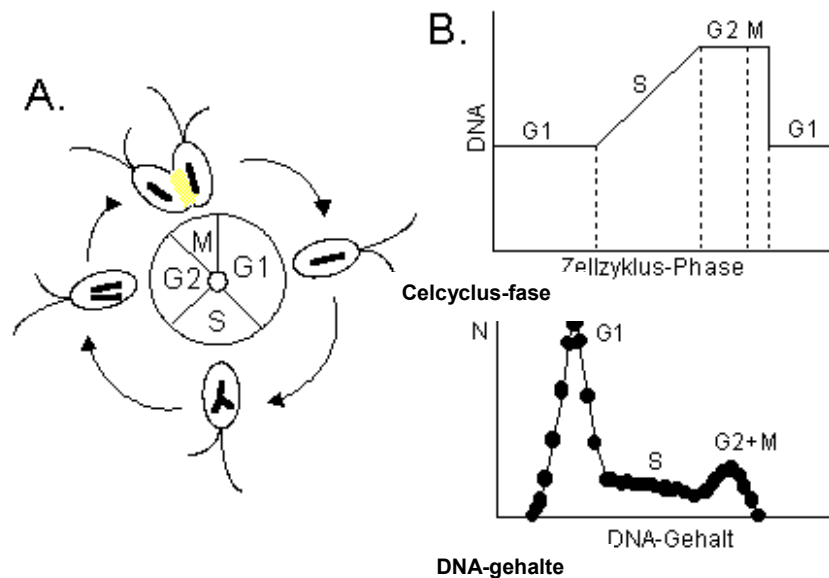


CEL CYCLUSANALYSE

EXPERIMENT MET PICOGREEN

Met behulp van flowcytometrie kan niet alleen een onderscheid gemaakt worden tussen populaties met verschillende kenmerken, maar kunnen ook sub-populaties onderscheiden worden. DNA celcyclus analyse is mogelijk door behandeling van de cellen met een kleurstof die specifiek is voor dubbelstrengs DNA. Niet-delende cellen zijn in de G1-fase (zie figuur 11), en bevatten meestal één set van het genoom. In de S-fase treedt DNA-replicatie op, zodat het DNA-gehalte per cel toeneemt. Vlak voor de deling (G2- en M-fase) bevatten de cellen theoretisch twee keer zoveel DNA als niet-delende cellen. Prokaryoten, waaronder ook cyanobacteriën ondergaan geen mitose (M-fase). Fosfaat-limitatie leidt tot een groeistop in de S-fase. De verdeling van een populatie over de verschillende fasen van de celcyclus geeft daarom informatie over de voedingsstatus.

FIGUUR 11 PRINCIPE VAN CELCYCLUS ANALYSE IN FYTOPLANKTON. A: MODEL VAN DE CELCYCLUS, MET NIET-DELENDE CELLEN (G1), DE DNA REPLICATIE FASE (S), CELDELING (G2) EN MITOSE (M; ALLEEN BIJ EUKARYOTEN). B: THEORETISCH DNA-GEHALTE PER CEL TIJDENS DE CELCYCLUS. C: DNA-GEHALTE IN EEN POPULATIE VAN CELLEN IN VERSCHILLENDE FASEN VAN DE CELCYCLUS, ZOALS GEDETECTEERD MET EEN FLOWCYTOMETER. MET DANK AAN DR. F.J. JOCHEM ([HTTP://WWW.JOCHEMNET.DE](http://www.jochemnet.de)).



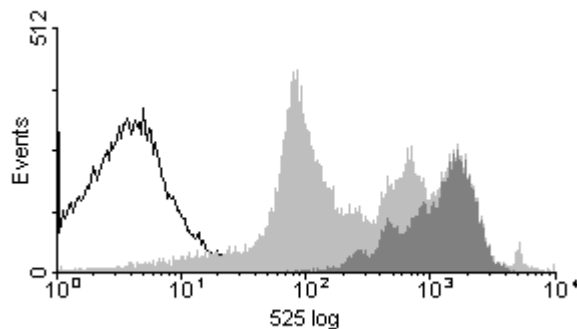
Uit fluorescentie microscopische observaties (blauwe excitatie) blijkt dat de filamenten van een exponentieel groeiende cultuur van *Limnothrix* sp. isolaat MR1 met en zonder voorbehandeling met Tween (0.05% w/v in PBS; 30 min 21°C) volledig worden gekleurd (1:1000 verdunning PicoGreen in Tris/EDTA-buffer, pH 7.5). De voorbehandeling met Tween, vaak gebruikt om de cellen 'lek' te maken zodat de kleurstof naar binnen kan, is hier dus niet nodig. Sommige trichomen in de exponentieel groeiende cultuur van isolaat MR1 hebben een cel die niet kleurt met PicoGreen. Toch bezit deze cel chlorofyl. In de stationaire fase (na 28 dagen) zijn de filamenten wel geheel gekleurd, maar niet alle filamenten in dezelfde mate. In een batchcultuur zonder toegevoegd fosfaat zijn de cellen binnen elk filament niet

allemaal gekleurd, maar de filamenten zijn wel gelijkmatig gekleurd. Er is dus een heel ander kleuringspatroon in fosfaat-gelimiteerde cellen dan in niet-gelimiteerde of licht-gelimiteerde cellen.

Flowcytometrische analyse van de PicoGreen gekleurde Loosdrecht-monsters gaf een complex patroon van pieken met groene fluorescentie (blauwe excitatie; figuur 12). De fluorescentie van PicoGreen heeft invloed op de ligging van de fytoplankton-clusters (675 nm vs. 640 nm; resultaten niet getoond), vooral de cluster van *P. hollandica* verschuift. Toch kon de cluster van cyanobacteriën apart worden weergegeven, deze geeft ook een patroon van meerdere pieken (figuur 12).

FIGUUR 12

CYTOGRAM VAN PICOGREEN-KLEURING (ZONDER VOORBEHANDELING MET TWEEN) VAN EEN WATERMONSTER UIT DE LOOSDRECHTSE Plassen (8 JULI 2003). IN ZWARTE LIJN MET WITTE ACHTERGROND IS EEN ONGEKEURD CONTROLEMONSTER WEERGEGEVEN. IN LICHTGRIJS IS HET SIGNAAL VAN ALLE CHLOROFYL-HOUDENDE DEELTJES WEERGEGEVEN, IN DONKERGRIJS OP DE VOORGROND ALLEEN DE CLUSTER VAN CYANOBACTERIËN.

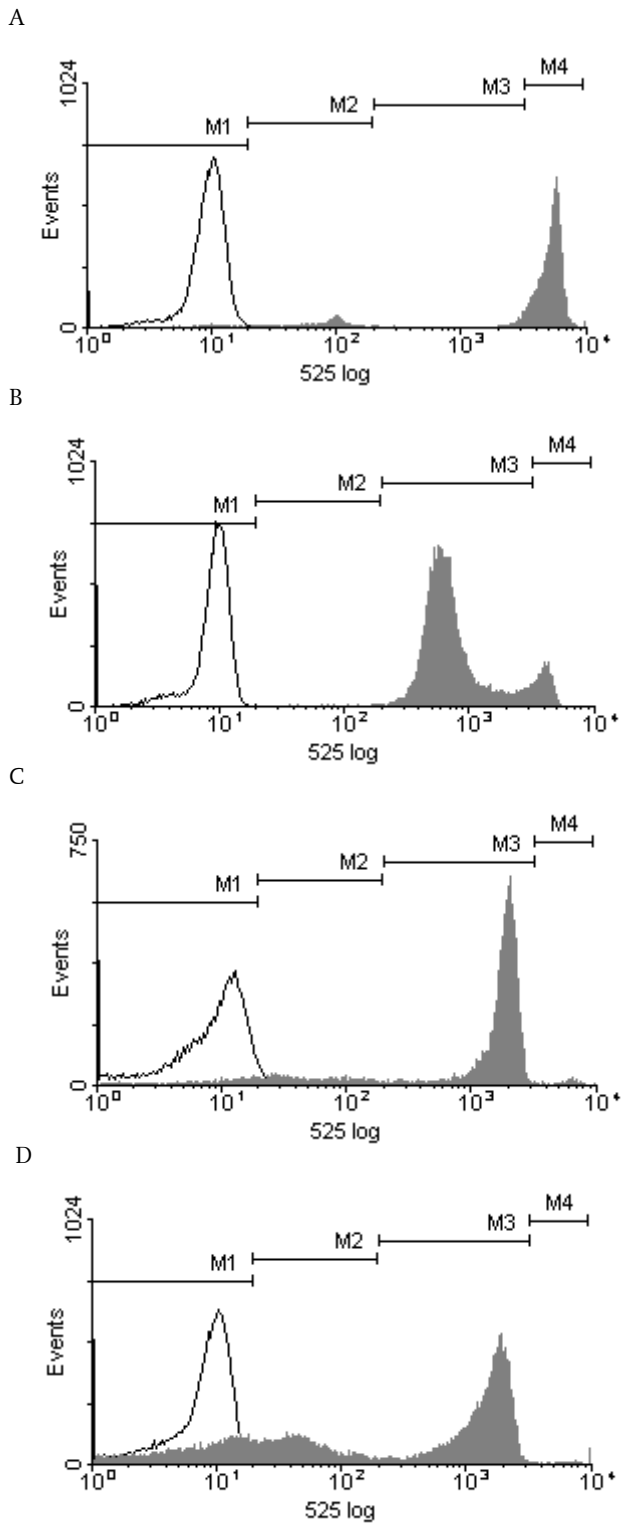


Flowcytometrische analyse van batchculturen van *Limnothrix* sp. isolaat MR1 is weergegeven in figuur 13. In de 8 dagen oude, exponentieel groeiende cultuur met overmaat fosfaat (figuur 13A) is na PicoGreen kleuring in 12% van de deeltjes de groene fluorescentie 10x verhoogd, en in 82% van de deeltjes 500x verhoogd. In dezelfde cultuur is na 28 dagen (stationaire fase; figuur 13B) in 78% van de deeltjes de groene fluorescentie 70x verhoogd, en in 8.5% van de deeltjes 400x verhoogd. In een cultuur met gebrek aan fosfaat is na 8 dagen in 25% van de deeltjes de groene fluorescentie niet verhoogd, in 10% van de deeltjes is de groene fluorescentie gemiddeld 5x verhoogd, in 62% van de deeltjes 170x verhoogd, en in 2% van de deeltjes 570x verhoogd (figuur 13C). In dezelfde cultuur is na 28 dagen in 37% van de deeltjes de groene fluorescentie niet verhoogd, in 19% van de deeltjes is de groene fluorescentie gemiddeld 5x verhoogd, in 43% van de deeltjes 135x verhoogd, en in 1% van de deeltjes 600x verhoogd (figuur 13D).

In de exponentieel groeiende cultuur zijn de meeste cellen aan het delen, en bevatten dan veel DNA (G2-fase). Binnen de filamenten zijn alle cellen sterk gekleurd (resultaten niet getoond). Als de cultuur ouder wordt, dus in de stationaire fase terechtkomt, stopt de deling en DNA replicatie. De meeste cellen zijn dan in de niet-delende G1-fase, sommige cellen sterven af, waarbij DNA afbraak optreedt. Fosfaat-gelimiteerde culturen groeien langzamer, bij veel cellen stopt de groei tijdens de DNA-replicatie-fase (S). De cellen binnen een filament hebben niet allemaal evenveel DNA. In de oudere, fosfaat-gehongerde cultuur treedt in veel meer cellen afbraak van het DNA op. Het DNA-gehalte van de cellen is dus bruikbaar als aanvullende indicatie voor de mate van fosfaat-limitatie in de onderzochte soort, *Limnothrix* sp.

FIGUUR 13

CYTOGRAM VAN PICOGREEN-KLEURING VAN BATCHCULTUREN VAN *LIMNOTHRIX* SP. ISOLAAT MR1. A: EXPONENTIEEL GROEIENDE CULTUUR MET OVERMAAT FOSFAAT (NA 8 DAGEN). B: STATIONAIRE CULTUUR MET OVERMAAT FOSFAAT (NA 28 DAGEN). C: CULTUUR MET GEBREK AAN FOSFAAT NA 8 DAGEN. D: CULTUUR MET GEBREK AAN FOSFAAT NA 14 DAGEN. IN ZWARTE LIJN MET WITTE ACHTERGROND ZIJN ONGEKLEURDE CONTROLE-MONSTERS WEERGEGEVEN, IN DONKERGRIJS HET SIGNAAL NA KLEURING MET PICOGREEN



CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN

CONCLUSIES

- Op basis van flowcytometrische tellingen blijkt dat de dichtheden van fytoplankton populaties in twee monsterpunten in de Loodrechtse Plassen niet significant van elkaar afwijken. Langlopende meetreeksen van DWR en NIOO-CL in deze monsterpunten mogen daarom als aanvullend worden beschouwd.
- Ondanks eerdere goede ervaringen heeft de ELF-kleuringsmethode in 2003 nauwelijks bruikbare resultaten opgeleverd. Dit werd waarschijnlijk veroorzaakt door twee problemen. Ten eerste was het fluorescente signaal minder intensief. Waarschijnlijk is dit te wijden aan een verouderde lichtdetector van de flowcytometer, omdat met fluorescentie microscopie wel het karakteristieke ELFA-sigitaal werd waargenomen. Ten tweede was er een verhoogd achtergrondsignaal, veroorzaakt door het gebruikte fixeermiddel. Verdere tests zijn nodig; de ELF-kleuringsmethode is dus nog niet geschikt voor routinematige toepassing. Dit past in het kader van het ingediende STW-voorstel voor continuering van het toegepaste onderzoek aan deze methode.
- DNA celcyclus analyse is een veelbelovende aanvullende techniek, waarmee groeisnelheid en voedingsstatus van individuele cellen/filamenten kunnen worden ingeschat.

TOEKOMSTIG WERK

- Ontwikkeling, validatie en calibratie van een ELF-kleuringsprotocol, dat geschikt is voor flowcytometrische analyse van zowel de autofluorescentie als het ELFA-sigitaal.
- Toepassing van flowcytometrische fytoplankton analyse (inclusief voedingsstatus) in routine monitoring programma's in het Loosdrechtse Plassen gebied, in het kader van voorgenomen herstelmaatregelen (samenwerking met DWR and WLB).
- Uitbreiding van de kennis over fosfatase activiteit van fytoplanktonsoorten die voorkomen in andere meren (opdracht STOWA).
- Ontwikkeling van aanvullende fluorescente kleuringstechnieken: bijv. voor detectie van fosfaatopnamestatus, fosfaatopslagstatus, beschikbaarheid stikstof, celvitaliteit (samenwerking met UvA-AMB).
- Experimenteel en theoretisch onderzoek naar de competitie om organisch fosfaat (samenwerking met UvA-AMB).
- Onderzoek naar variaties in de celcyclus binnen populaties van filamenteuze cyanobacteriën.

REFERENTIES

- Dignum, M. 2003. Phosphate uptake proteins as markers for the nutrient status of freshwater cyanobacteria. Academisch proefschrift Universiteit van Amsterdam ISBN 90-76894-30-2.
- Dignum, M., H.L. Hoogveld, H.C.P. Matthijs, H.J. Laanbroek, and R. Pel (2004). Alkaline phosphatase dependent fluorescence adds a nutrient status selection parameter to flow cytometric analysis of freshwater phytoplankton. FEMS Microbiol. Ecol., in press: doi:10.1016/j.femsec.2003.12.007.
- Dignum, M., H.L. Hoogveld, V. Floris, H.J. Gons, H.C.P. Matthijs, and R. Pel (200x). Localized fluorescent labeling of alkaline phosphatase activity in phytoplankton cells reflects their in situ growth potential. Submitted to Aquatic. Microbial Ecol.
- Gulati, R.D. and E. van Donk 2002. Lakes in the Netherlands, their origin, eutrophication and restoration: state-of-the-art review. Hydrobiol. **478**: 73-106.
- Huang, Z., E. Terpetschnig, W. You, and R.P. Haugland 1992. 2-(2'-phosphoryloxyphenyl)-4-(3H)-quinazolinone derivatives as fluorogenic precipitating substrates of phosphatases. Anal. Biochem. **207**: 32-39.
- Lorenz, C.M. 2000. Heavily Modified Waters in Europe. Case study on Lake Loosdrecht. Rapport Witteveen en Bos.
- Nedoma, J., A. Štrojsová, J. Vrba, J. Komárková, and K. Šimek 2003. Extracellular phosphatase activity of natural plankton studied with ELF97 phosphate: fluorescence quantification and labelling kinetics. Environ. Microbiol. **5**: 462-472.
- Rengefors, K., K.C. Ruttenberg, C.L. Hauptert, C. Taylor, B.L. Howes, and D.M. Anderson 2003. Experimental investigation of taxon-specific response of alkaline phosphatase activity in natural freshwater phytoplankton. Limnol. Oceanogr. **48**: 1167-1175.
- Van Liere, L. en D.A. Jonkers 2002. Watertypegerichte normstelling voor nutriënten in oppervlaktewater. RIVM Rapport 703715005/2002.
- Van Liere, L., S. Parma, and R. D. Gulati 1992. Working group Water Quality research Loosdrecht lakes: its history, structure, research programme, and some results. Hydrobiol. **233**: 1-9.
- Veldhuis, M.J.W., G.W. Kraay, and K.R. Timmermans 2001. Cell death in phytoplankton: correlation between changes in membrane permeability, photosynthetic activity, pigmentation and growth. Eur. J. Phycol. **36**: 167-177.

APPENDIX

Schaalniveau	Sleutelbegrip	Project/Organisatie	Onderzoeksvraag
1. Beleidscontext			
1.1 Internationaal	Beleidsvorming en financiering van onderzoek	Europese Unie (EU)	Wat zijn de implicaties van de EU Kaderrichtlijn Water op het beleid voor meren?
1.2 Nationaal	Beleidsvorming en financiering van onderzoek	Nationale instituten (V&W, RIVM, RIZA) and stichtingen (STOWA, NWO)	Zijn de huidige milieuvorderingen om nutriënten-belastingen terug te dringen effectief?
1.3 Provinciaal	Projectmanagement	Provincie (Provincie Noord-Holland)	Wat is het effect van veranderingen in nutriënten-stromen in stroomgebieden?
1.4 Regionaal	Waterkwaliteits- beheer	Waterschap (DWR)	Wat is het effect van verdere herstelmaatregelen op de waterkwaliteit?
1.5 Lokaal	Waterkwaliteits- beheer	Waterleidingbedrijf (WLB)	Treedt ecologisch herstel op in Nederlandse meren?
2. Wetenschappelijke context			
2.1 Ecosysteem	Voedselketen	OBN project (NIOO- CL)	Wat is de invloed van nutriëntenstromen door trofische niveaus op fytoplankton voorkomen?
2.2 Fytoplankton gemeenschap	Competitie om hulpbronnen	PIONEER project (UvA- AMB)	Wat is de relatie tussen fytoplankton soortensamenstelling en voedingsstatus in meren?
2.3 Populatie	Habitat differentiatie	Huidig voorstel (STW)	Wat is het effect van levensgeschiedenis op fytoplankton populatie dichtheid?
2.4 Cellulair	Fysiologische adaptatie	Huidig voorstel (STW)	Hoe kunnen adaptieve responsen van individuele fytoplankton cellen op veranderende nutriënten-beschikbaarheid worden aangetoond?
2.5 Moleculair	Detectie van merker eiwitten and soorten diversiteit	Huidig voorstel / DYNATOX (STW)	Welke moleculaire signalen kunnen worden gedetecteerd als een 'early warning' voor schadelijke bloei van cyanobacteriën?

