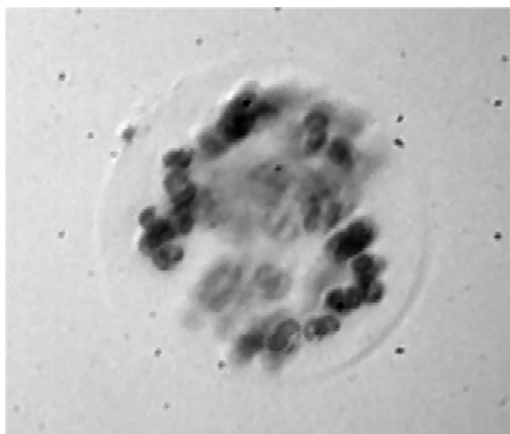


Flowcytometrie fytoplanktonmonitoring 2001a

Evaluatie van flowcytometrie fytoplanktonmonitoring
januari t/m juni 2001



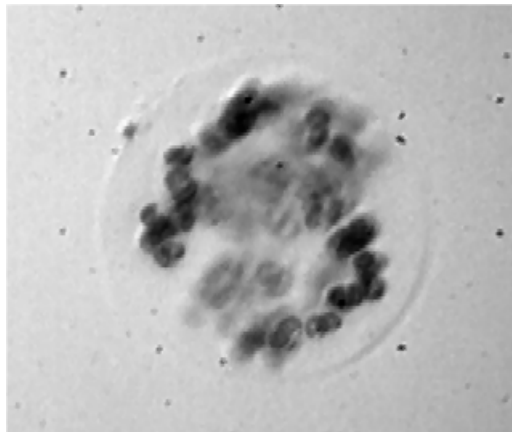
Rapport RIKZ/2003.012

September 2001

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

Flowcytometrie fytoplanktonmonitoring 2001a

Evaluatie van flowcytometrie fytoplanktonmonitoring
januari t/m juni 2001



Rapport RIKZ/2003.012

september 2001

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

Inhoudsopgave

Inhoudsopgave	2
Samenvatting	4
1. Inleiding	5
1.1 Dit verslag	5
1.2 Wat is nieuw in dit rapport ?	6
1.3 Vraagstelling van dit verslag	6
2. Materialen en Methoden	7
2.1 Beschrijving gehanteerde materialen en methoden	7
2.2 Uitwerken gegevens	9
2.2.1 Globale trends	9
2.2.2 Vergelijking met andere technieken	9
2.2.3 Uitwerken in scatterplots	9
3. Resultaten	11
3.1.1 Noordwijk 10, algemene trends	11
3.1.2 Noordwijk 10, flowcytometrische fytoplankton concentraties	13
3.1.3 Noordwijk 10, aantallen uit clusters van scatterplots	17
3.1.4 Noordwijk 10, imaging in flow en snelle microscopie	18
3.1.5 Noordwijk 10, vergelijking met referentietechnieken	21
3.1.6 Noordwijk 10, nutriëntenverloop	23
3.2.1 Noordwijk 2, algemene trends	24
3.2.2 Noordwijk 2, flowcytometrische fytoplankton concentraties	26
3.2.3 Noordwijk 2, imaging in flow en snelle microscopie	30
3.2.4 Noordwijk 2, vergelijking met referentietechnieken	33
3.2.5 Noordwijk 2, nutriëntenverloop	35
3.3.1 Terschelling 135, algemene trends	36
3.3.2 Terschelling 135, flowcytometrische fytoplankton conc.	37
3.3.3 Terschelling 135, imaging in flow en snelle microscopie	41
3.3.4 Terschelling 135, vergelijking met referentietechnieken	43
3.3.5 Terschelling 135, nutriëntenverloop	44
3.4.1 Schaar van ouden Doel, algemene trends	45
3.4.2 Schaar v.o. Doel, flowcytometrische fytoplankton conc.	46
3.4.3 Schaar v.o. Doel, imaging in flow en snelle microscopie	50
3.4.4 Schaar v.o. Doel, vergelijking met referentietechnieken	51
3.4.4 Schaar v.o. Doel, nutriëntenverloop	52
3.5.1 Vlissingen, algemene trends	53
3.5.2 Vlissingen, flowcytometrische fytoplankton concentraties	54
3.5.3 Vlissingen, imaging in flow en snelle microscopie	58
3.5.4 Vlissingen, vergelijking met referentietechnieken	59
3.5.5 Vlissingen, nutriëntenverloop	60
3.6.1 Zijpe, algemene trends	61
3.6.2 Zijpe, flowcytometrische fytoplankton concentraties	63
3.6.3 Zijpe, imaging in flow en snelle microscopie	67
3.6.4 Zijpe, vergelijking met referentietechnieken	68

3.6.5 Zijpe, nutriëntenverloop	70
4. Discussie	71
5. Aanbevelingen	76
6. Conclusies	77
7. Referenties	78

Samenvatting

Een vast onderdeel van het Rijkswaterstaat monitorings programma in de Nederlandse kustwateren bestaat uit fytoplanktontellingen. Deze worden uitgevoerd met behulp van microscopie en de laatste jaren aangevuld met flowcytometertellingen voor een zestal lokaties. Deze lokaties zijn: Noordwijk 2, Noordwijk 10, Terschelling 135, Schaar van ouden Doel, Vlissingen en Zijpe. De bevindingen zijn qua verschijningsdata onderverdeeld in drie categorieën: een zeer snelle rapportage van monitoringsgegevens binnen 48 uur en via een website te bekijken (flowcytometrie en snelle microscopie), een halfjaarlijkse uitgebreidere evaluerende rapportage van de eerste of tweede helft van een kalenderjaar (flowcytometrie, snelle microscopie, chemische technieken), en een uitgebreide éénjaarlijkse rapportage fytoplankton (uitbesteding microscopie). Het rapport dat voor u ligt behandelt de halfjaarlijkse rapportage van fytoplanktonmonitoringgegevens en evalueert deze in relatie met andere parameters zoals nutriënten, particulier organisch koolstof, chlorofyl-a en de snelle microscopische tellijst(en). Per lokatie wordt een samenvattende beschrijving van de algemene geconstateerde fytoplanktontrends gegeven. De standaard verwerking van flowcytometrische resultaten (concentraties autotrofe deeltjes en biomassa) door opdeling in groottefracties heeft aangetoond een goed monitoringsinstrument te zijn voor de vastlegging van de fytoplanktodynamiek in watersystemen. De concentratie autotrofe fytoplankton deeltjes, de biomassa hiervan en specifieke verzamelgroepen gebaseerd op het verschil in pigmentsamenstelling tonen overeenkomsten en verschillen tussen de eerste zes maanden van de jaargangen 2000 en 2001.

Dankzij de reproduceerbaarheid van de flowcytometrische meettechniek is een vergelijking tussen jaargangen goed mogelijk. Aanbevolen wordt om vergelijkingen tussen jaargangen ook tijdsgeïntegreerd te doen.

Imaging in flow, het maken van digitale foto's van algen in 'flow', wordt vanwege de geringe tijdswinst en verschillen ten opzichte van microscopie niet aangeraden als kwantitatieve teltechniek, maar is uitstekend bruikbaar voor de identificatie van clusters.

De vergelijking tussen flowcytometrie en chemische referentietechnieken toont over het algemeen een redelijke tot goede correlatie tussen de FCM-parameter $\ln FGR/ml$ en chlorofyl-a bepaald met HPLC. Voor meer heldere wateren wordt een redelijke tot goede relatie gevonden tussen $\ln FGR/ml$ en POC bepaald met Carlo Erba.

Informatie over soorten kan snel verkregen worden met behulp van de verkorte snelle microscopische analyse.

De verwerking van MWTL monsters in de eerste zes maanden van 2001 heeft aangetoond dat een snelle flowcytometrische analyse en verwerking tot de eindresultaten in combinatie met rapportage via grafieken op HTLM-sites goed te realiseren is binnen een kort tijdsbestek van gemiddeld één uur per monster.

De combinatie van de informatie afkomstig van flowcytometrie en snelle microscopie is op dit moment een goede methode om snel kwantieve en kwalitatieve informatie te verkrijgen over fytoplankton in watersystemen, die bovendien middels rapportage op internet/intranet binnen 48 uur beschikbaar

kan zijn.

1. Inleiding

1.1 Dit verslag

In dit verslag worden de resultaten van fytoplanktonanalyses van januari tot en met juni 2001 met behulp van flowcytometrie van zes lokaties, behorende tot het MWTL programma, gerapporteerd en besproken. Eerder dit jaar zijn de flowcytometrische resultaten uit het jaar 2000 ook verschenen (Rapport RIKZ/2001.034). De resultaten van 2000 en 2001 zijn uitgevoerd op de EurOPA n.s. flowcytometer met de 'imaging in flow' module, waarmee digitale foto's van algen gemaakt kunnen worden. Het streven is door middel van een schriftelijke rapportage, zoals dit verslag snel (binnen 2 maanden) een overzicht en een toelichting te geven op de fytoplanktongegevens over de eerste helft van het monitoringsjaar. Nog sneller en dus aktueller kwam een groot deel van de in dit verslag gepresenteerde resultaten beschikbaar voor de interne RIKZ-gebruiker (binnen één week na monsternamen) via een website. Op korte termijn zal dit ook voor externe geïnteresseerden via internet beschikbaar komen.

Het doel van de fytoplanktonmonitoring is tweeledig:

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

Het streven is de bevindingen van fytoplanktonmonitoring onder te verdelen in een drietraps-rapportage. Een zeer snelle rapportage van monitoringsgegevens binnen 48 uur, die via een website bekeken kunnen worden (flowcytometrie en snelle tellijst microscopie), een halfjaarlijkse uitgebreidere evaluerende



rapportage van de eerste of tweede helft van een kalenderjaar (flowcytometrie, snelle microscopie, chemische technieken) die binnen twee maanden verschijnt, en de uitgebreide éénjaarlijkse rapportage fytoplankton (microscopie).

1.2. Wat is nieuw in dit rapport ?

In het vorige verschenen rapport werden drie onderdelen specifiek voor de lokatie Noordwijk 10 uitvoerig toegelicht: 1) De globale trend in 2000 van autotrofe deeltjesconcentraties uitgesplitst naar groottefracties, van biomassa (chlorofyl-a) uitgesplitst naar groottefractie, biovolume naar groottefractie en de concentraties van autotrofe deeltjes met fycoerithrine en met fycocyanine/chlorofyl-b uitgeplitst naar groottefracties. 2) De vergelijking of correlatie met andere technieken (chlorofyl-a, zwevend stof, particulier organisch koolstof) 3) Bekeken werd in hoeverre er overeenkomst was tussen microscopie (snelle tellijst) en foto's genomen met de imaging in flow module. In dit rapport zal uitvoeriger ingegaan worden op het fytoplanktonsoortniveau en worden de overige vijf lokaties nu ook besproken. In dit rapport wordt een vergelijking met de 2000-resultaten uit dezelfde periode gemaakt. Verder zal worden besproken welke nieuwe opvallende innovaties zijn uitgevoerd (uitvoering in RIKZ project TNWMILLAB), voor verdere verbetering van de analyse en kwaliteit van de resultaten in relatie met de informatievraag.

1.3 Vraagstelling van dit verslag

Dit verslag beoogt uiteindelijk de volgende vragen te beantwoorden:

1. Welke concentraties fytoplankton onderverdeeld naar groottes worden op zes MWTL lokaties gemeten ?
2. Wat is de relatie van de flowcytometrische resultaten met resultaten uit 2000 ?
3. Wat is de relatie van de resultaten, die met flowcytometrie bepaald zijn, met referentietechnieken (bijvoorbeeld microscopie, HPLC) ?
4. Welke kwaliteit hebben de 'flowcytometrische getallen'?
5. Welke monitoringsstrategie wordt aanbevolen ?

2. Materialen en Methoden

2.1 Beschrijving gehanteerde materialen en methoden

Monsternamen worden gedaan per schip met een ringleiding, drie meter onder het wateroppervlak volgens RWS standaard (GSV B003). Monsters van circa 1 liter worden na monsternamen ongefixeerd (levend, zonder toevoegingen) gekoeld bij 4 °C en in het donker bewaard en aangeleverd in 1 liter PE plastic flessen. Bij aankomst op het laboratorium worden de monsters in het donker bij 4 °C opgeslagen (waarmee de invloed van biologische activiteit en fotoadaptatie geminimaliseerd wordt). Binnen 24 uur na binnenkomst bij ITL vindt in principe een flowcytometrische analyse plaats. Voor subsampling wordt het monster gehomogeniseerd door licht zwenken van de fles. Het subsamplevolume dat voor de flowcytometrische analyse gebruikt wordt is maximaal 5 ml.

Ter calibratie van de flowcytometeropstelling worden per analysedag standaardanalyses uitgevoerd met referentiebolletjes (7,9 µm FCSC chlorofylbolletjes (Flow Cytometry Standardization Corporation, USA) en 1,8 µm fluoresceerbrite PCRed-bolletjes (Polysciences Inc., USA)).

Drie druppels chlorofylbolletjes (FCSC) worden toegevoegd aan 5 ml calibratieoplossing van fluoresceerbrite PC red bolletjes. Bij een sample rate van 50 µl/min wordt bij standaardinstellingen van de apparatuur getriggerd op FGR (rode fluorescentie van de groene laser). Ter controle van de EurOPA n.s. flowcytometer worden voor beide bolletjes de lineaire waarden van alle optische parameters geregistreerd in digitale (Shewart)kaarten als ook de gemeten concentratie van de deeltjes. Bij een te grote afwijking in één van de optische kanalen, waarbij als referentie een vastgesteld gemiddelde en een waarschuwingsgrens (10%) en een actiegrens 15%) geldt, wordt de apparatuur nogmaals bijgesteld en wordt de analyse vervolgens opnieuw uitgevoerd. De laserintensiteiten van de Argon (Coherent, Innova 90, USA) en HeNe-lasers (Coherent, USA) worden elke analysedag gecontroleerd en bijgehouden op (Shewart)kaarten.

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

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

Van elke analyse wordt de gemiddelde concentratie deeltjes (fluorescerende als niet-fluorescerende) per ml berekend en worden de fluorescentieconcentraties (a.u./ml) en lichtverstrooi-concentraties (a.u./ml) berekend als functie van de deeltjesgrootte. Elk monster wordt opgedeeld in 17 fracties (deeltjesgrootteranges) en per fractie worden de eerder genoemde karakteristieken bepaald. Per analyse is een geautomatiseerde deeltjesclustering mogelijk voor de indeling van deeltjes naar hoofdclusters van deeltjes met optisch gelijke eigenschappen. Alleen voor Noordwijk 10 is dit toegepast. Dataverwerking vindt geautomatiseerd plaats in MATLAB software (v5.2, The Math Works, Cambridge) met behulp van het algoritme mwtlverwerk2 (v2.1).

Met behulp van imaging in flow (IIF) worden deeltjes gefotografeerd op grond van geselecteerde clusters in bivariate scatterplots in Spyro. Van visueel goed gescheiden clusters (van deeltjes) wordt tijdens de analyse een selectie gemaakt en worden de deeltjes gefotografeerd. In bivariate scatterplots treedt echter vaak (visueel) overlap op van verschillende soorten plankton waardoor het noodzakelijk is om opnames te maken van een vaste selectie (genaamd 'MWTL2') van alle autotrofe deeltjes > ca. 10 µm. Monsters met lage concentraties fytoplankton worden eerst geconcentreerd door middel van filtratie van ca 5000-1000 ml over een 10 µm gaas waarbij het fytoplankton residu geresuspendeerd wordt in een kleiner volume kunstmatig zeewater (30 g NaCl/l demiwater).

Per analyse worden circa 200 tot 300 opnames gemaakt die digitaal opgeslagen worden als tif-format en vervolgens door een laboratorium medewerker (geen microscopist) worden beoordeeld.

Uit het aantal foto's dat van een bepaalde soort wordt waargenomen is het percentage per soort in de selectie bepaald. Door de combinatie van de gehanteerde concentratiefactor, het selectiepercentage en de totaalconcentratie is de concentratie (c/ml) van de selectie berekend.

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

Snelle microscopische analyse vindt plaats op levend (ongefixeerd) monster, waarbij 30 tot 100 ml over 10 µm gaas gefilterd wordt (buitenshuis door Koeman en Bijkerk bv.). Tellingen zijn gebaseerd op 100 waarnemingen. Onderscheid wordt gemaakt in verschillende klassen namelijk deeltjes die dominant aanwezig zijn (+++/meer dan 10-maal waargenomen), algemeen aanwezig zijn (++/5-10-maal) en deeltjes die 2-5 (+) of éénmaal (.) waargenomen zijn. Alleen voor Noordwijk 2, Noordwijk 10 en Terschelling 135 zijn deze snelle tellingen met behulp van microscopie uitgevoerd.

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

2.2 Uitwerken gegevens

De verwerking van de flowcytometrische analyses wordt in verschillende onderdelen beschreven in paragrafen 2.2.1, 2.2.2 en 2.2.3.

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. De microscopische snelle tellijstresultaten 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, die geconstateerd zijn beschreven zijn.

2.2.1. globale trends

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

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

2.2.2 Vergelijking met andere technieken (Microscopie, HPLC, POC)

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 imaging in flow cytometrie wordt gemaakt voor de monsters van de lokaties Noordwijk 10, Noordwijk 2 en Terschelling 135. Hiertoe worden de soorten en aantallen op dezelfde wijze als de (snelle) microscopische tellijsten ingedeeld. Deze indeling bestaat uit '+++' (meer dan 10% aanwezig), '++' (5-10% in aantal aanwezig) en '+' (2-5% in aantal aanwezig). Aan de hand van kleuring wordt aangegeven of een goede overeenkomst (groen) of geen overeenkomst (rood) of verschil in overeenkomst (wel gevonden met imaging in flow niet met microscopie) (blauw) tussen beide technieken gevonden is.

Voor de lokatie Noordwijk 10 is specifiek nog gekeken naar het fycoerithrine cluster (een cluster dat uit deeltjes met fycoerithrine bestaat bijv. *Rhodomonas*) en het 'Phaeocystis-cluster.

Voor de vergelijking met chemische referentietechnieken zijn per lokatie de onderstaande correlaties onderzocht tussen een flowcytometrische parameter en een chromatografische techniek, te weten HPLC (Chlorofyl-A), uitgevoerd volgens Standaard Voorschrift A200 en GC (particulair organisch koolstof, POC) uitgevoerd volgens Standaard Voorschrift A067.

<u>Flowcytometrie</u>	versus	<u>Chromatografische techniek</u>
Lin FGR/mL		HPLC (Chlorofyl-A gehalte)
Lin FGR/mL		GC (POC-gehalte)
Lin FLS/mL		GC (POC-gehalte)

Door middel van lineaire regressie (excel + Analyse-it versie 1.62) is onderzocht wat de mate van correlatie is van bovenstaande combinaties. Indien er een acceptabele correlatie aanwezig is, wordt de grafiek gepresenteerd waarin ook de vergelijking van de trendlijn (blauwe lijn) wordt weergegeven. Door middel van stippellijnen worden de 95 % betrouwbaarheidsintervallen gevisualiseerd en door middel van zwarte lijnen de 95 % voorspelbaarheidsintervallen.

2.2.3 Uitwerken in scatterplots

Met behulp van scatterplots worden optische eigenschappen van fytoplanktondeeltjes ten opzichte van elkaar uitgezet. Deeltjes met gelijke optische eigenschappen clusteren in deze scatterplots en kunnen als zodanig verder verwerkt worden. Door geringe pigment- en volume verschillen van deeltjes bestaat een cluster zelden uit één enkele soort. Een opvallend cluster dat eenvoudig herkend wordt is een cluster dat ontstaat door sterk oranje fluorescerende deeltjes zoals *Rhodomonas sp.* Een tweede cluster is het *Phaeocystis sp.* cluster dat vooral ten tijde van *Phaeocystis*-bloei duidelijk onderscheidbaar is. Voor Noordwijk 10 zijn van deze twee clusters de concentraties bepaald met behulp van Spyro en/of het bij ITL ontworpen MATLAB-Algoritme clustervb (v2.01). Microscopische tellingen van *Phaeocystis sp.* (aantallen cellen afkomstig van solitaire cellen en kolonies) uit het Monisnel-project zijn gebruikt ter vergelijking. Ter controle zijn in de loop van het eerste halve jaar foto's van deeltjes behorend tot deze clusters genomen.

3. Resultaten

3.1 Noordwijk 10

3.1.1 Algemene trends

De **totaalconcentratie van deeltjes** met chlorofyl-a is tot en met februari stabiel (ca 8000/ml) en wordt gedomineerd door kleine deeltjes ($<10\ \mu\text{m}$). Vanaf medio maart wordt de totaalconcentratie ook door grotere fracties ($<50\ \mu\text{m}$) bepaald. Een eerste bloei start de tweede week van april en heeft een maximum in de derde week van april (concentratie ca 3,5 x hoger dan in de winterperiode namelijk circa 30000/ml). Hierna volgt een tweede bloeipiek (ca dezelfde concentratie als de eerste bloeipiek) in de eerste week van mei en neemt de concentratie gestaag af naar ca 5000 deeltjes/ml. Eind juni treedt een verdubbeling van de concentratie op, die hoofdzakelijk veroorzaakt wordt door kleine deeltjes ($<5\ \mu\text{m}$).

Biomassa: Vanaf medio maart vindt een toename in de chlorofyl-a concentratie plaats met een maximum in de tweede week van april (ca $7,5 \times 10^9$ au/ml), die vooral wordt veroorzaakt door grote deeltjes ($>200\ \mu\text{m}$). Deze grotere deeltjes lijken vanaf de derde week van april verdrongen te worden door kleinere deeltjes ($<50\ \mu\text{m}$), die een relatief grote totaalbijdrage in de chlorofyl-a concentratie hebben en numeriek dominant zijn. Tot juni fluctueert de chlorofyl-a concentratie rond de $1,5 \times 10^9$ au en neemt deze in juni toe, vooral veroorzaakt door middelgrote deeltjes (125-300 μm). De laatste week van juni is de chlorofyl-concentratie ineens lager.

Het biovolume geeft een beeld dat overeenkomt met de totaal concentratie van deeltjes, alleen is het aandeel grotere deeltjes nadrukkelijker aanwezig.

De **concentratie deeltjes met fycobilliproteinen** (fycoerithrine) begint in januari met een concentratie van 4000/ml en neemt gestaag af tot eind maart naar minder dan 1000/ml. Vanaf april tot en met de eerste week van juni schommelt de concentratie rond de 1000/ml. Medio en eind juni stijgt de concentratie, veroorzaakt door kleine deeltjes ($<5\ \mu\text{m}$) naar een waarde van 10000/ml.

De **concentratie deeltjes met fycocyanine-chlorofyl-b** vertoont een vergelijkbaar verloop als de totaalconcentratie autotrofe deeltjes.

De twee totaalconcentratie(voorjaars) maxima die in 2001 waargenomen zijn, waren in 2000 nauwelijks aanwezig. Daar tegenover staat dat in juni 2000 een grote bloei geconstateerd werd van 160000/ml eind juni en dat in dezelfde periode in 2001 slechts een lichte deeltjesconcentratietoename geconstateerd werd van slechts 15000/ml (meer dan factor 10 lager). Bij een biomassavergelijking tussen de twee jaren blijkt dat in 2001 een maand eerder (namelijk in april) een opvallende biomassa toename optrad, die bovendien in biomassa driemaal hoger was dan in 2000. De hoge deeltjesconcentratie en biomassaconcentratie medio juni in 2000 is niet in 2001 geconstateerd. In zowel 2000 als 2001 wordt vanaf medio juni een flinke toename waargenomen van kleine deeltjes ($<5\ \mu\text{m}$) met fycoerithrine. Groot verschil tussen de twee jaren is dat de toename in 2001 beperkt blijft tot 10000/ml en in 2000 oploopt tot 140000/ml.

Imaging in flow: In het eerste half jaar zijn de volgende soorten dominant: *Cerataulina* sp. (wk. 11 t/m 21), *Chaetoceros* sp. (wk. 11 t/m 23 en 25), *Nitzschia* sp. (wk. 3, 4 en 7), *Rhizosolenia delicatula* (wk. 15, 17 en 23 t/m 26), *Rhizosolenia shrubsolei* (wk. 15), *Rhizosolenia stolterfothii* (wk. 20 t/m 26), *Rhodomonas* (wk. 26), *Skeletonema costatum* (wk. 7), *Thalassionema* sp. (wk. 3) en *Thalassiosira* sp. (wk. 7). *Chaetoceros* sp. en *Cerataulina* sp. zijn gedurende een lange periode aanwezig op Noordwijk 10. Net als op Noordwijk 2 is het percentage detritus relatief hoog in het begin van het jaar maar neemt in de loop van het eerste half jaar af. De Imaging In Flow resultaten van de soorten *Asterionella* sp., *Cerataulina* sp., *Chaetoceros* sp., *Pseudonitzschia* sp., *Rhizosolenia stolterfothii*, *Skeletonema costatum* en *Thalassionema* sp. zijn goed vergelijkbaar met de snelle microscopische waarnemingen. Gedeeltelijk vergelijkbaar zijn de resultaten van *Rhizosolenia delicatula*, *Rhizosolenia shrubsolei* en *Thalassiosira* sp. Een aantal wordt door Imaging In Flow waargenomen en niet door snelle microscopie en vice versa. Opvallend is dat *Nitzschia* sp. voor de lokaties Noordwijk 2 en 10 wel wordt waargenomen met Imaging In Flow maar niet met snelle microscopie.

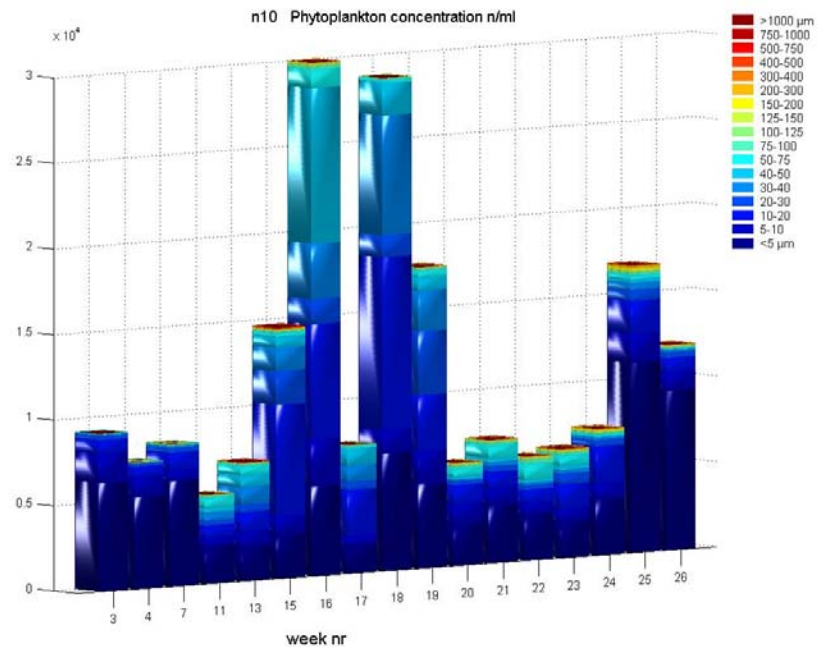
De **correlatie** tussen *linFGR/ml* (FCM) en *chlorofyl-a* (HPLC) is matig ($r^2=0,56$). De correlatie tussen POC en *linFGR/ml* en *linFLS/ml* is tevens matig ($r^2=0,41$ en $0,49$).

Het **nutriëntenverloop** vertoont een grillig afnemende trend voor alle nutriënten. Opvallend is een grote toename van NH_4 van week 18 naar 20. De N/P-ratio (opgelost) neemt toe tot een maximum van 60 in week 17 en neemt vervolgens weer af.

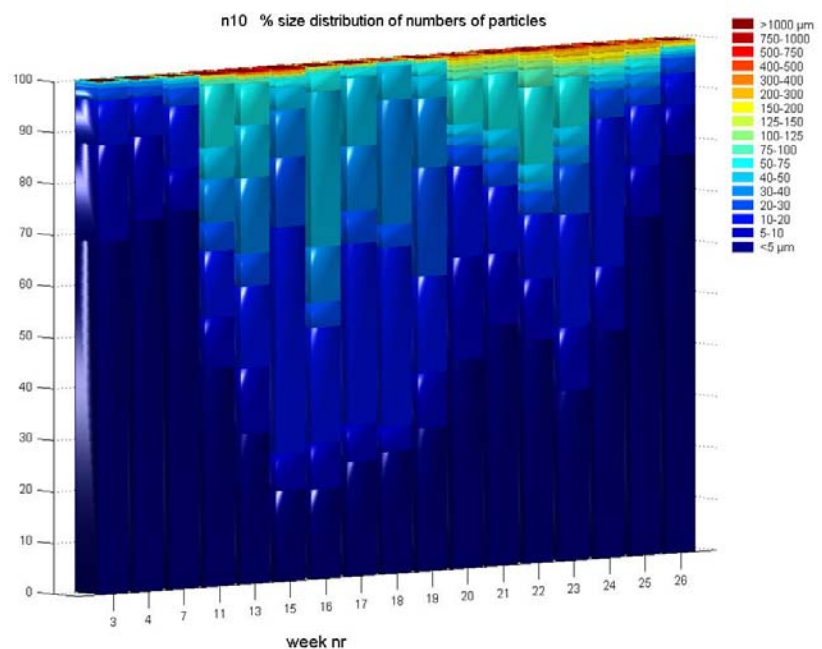
De **clusterresultaten** van Noordwijk 10 van het fycoerithrine-cluster heeft aan de hand van foto's van deeltjes binnen dit cluster aangetoond dat het bestaat uit *Rhodomonas* sp. deeltjes en kleinere ronde deeltjes van ca 5-10 μm . De aantallen in het cluster verschillen van de totaalconcentratie deeltjes met fycoerithrine, omdat deze aanzienlijk bepaald worden door kleinere oranje fluorescerende deeltjes. Het concentratieverloop van deeltjes uit het 'Phaeocystis'-cluster toont een goede overeenkomst tussen flowcytometrie en de microscopische tellingen. De absolute concentratie van de eerste bloeipiek is goed, de tweede toont voor flowcytometrie een onderschatting ten opzichte van microscopie. Dit wordt mogelijk veroorzaakt door een verschil in tellen van meerdere individuele cellen in kolonies (MIC) ten opzichte van kolonies tellen als één deeltje (FCM).

3.1.2 Flowcytometrische fytoplanktonconcentraties Noordwijk 10

Fytoplanktonconcentratie: de totaalconcentraties van deeltjes met chlorofyl-a zijn uitgesplitst in 16 groottefracties (deeltjes/ml.fractie) in FIGUUR 1 en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentraties van deeltjes met chlorofyl-a uitgesplitst in 16 groottefracties ($\% \text{ n.fractie/n}_{\text{totaal}}$) in FIGUUR 2.

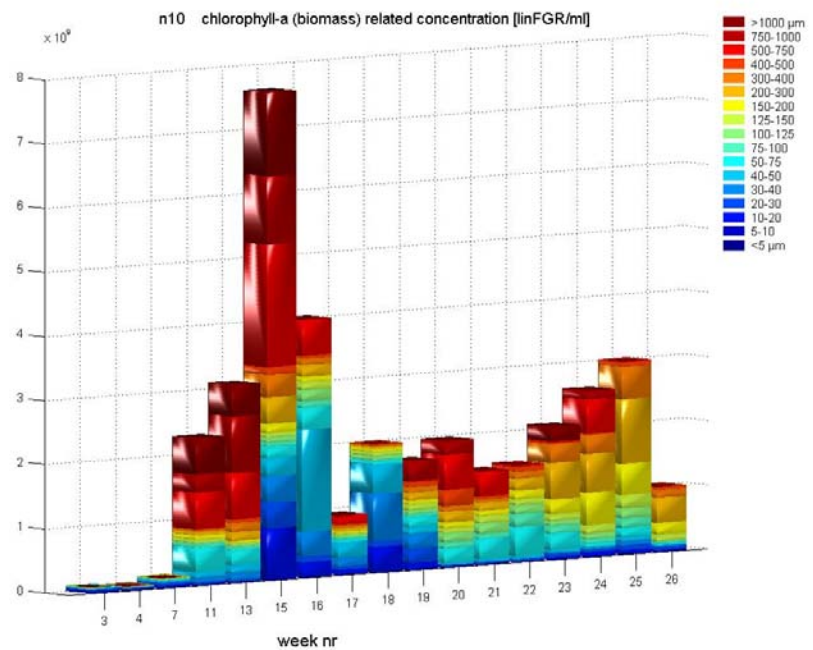


FIGUUR 1 Concentratie autotrofe deeltjes (met chlorofyl-a) per lengtefractie

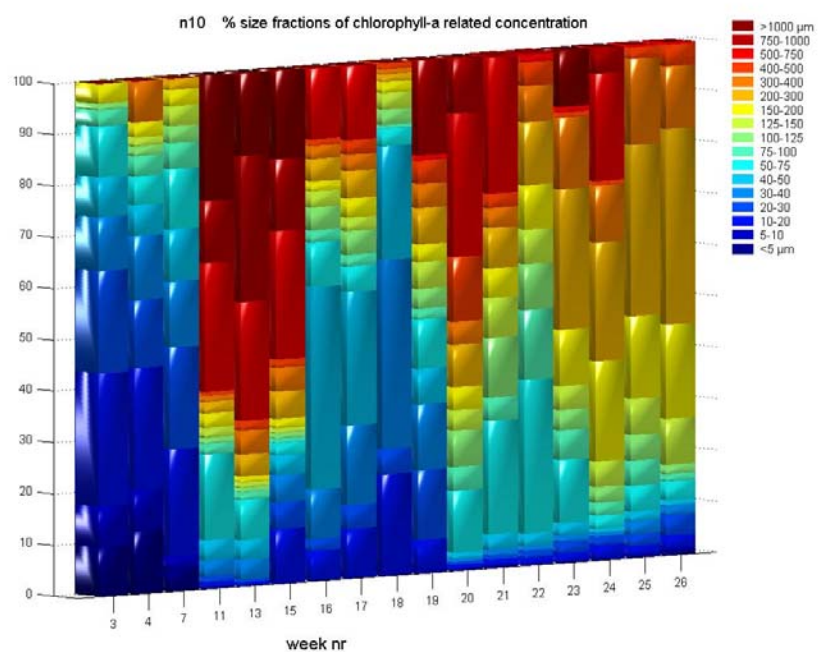


FIGUUR 2 % aantal autotrofe deeltjes met chlorofyl-a per lengtefractie
De **chlorofyl-a/ml concentraties** (biomassa) of flowcytometrische linFGR/ml variabele is uitgesplitst in 16 groottefracties (linFGR/ml.fractie) (FIGUUR 3) en de

percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentratie chlorofyl-a/ml
uitgesplitst in 16 groottefracties (% linFGR/ml.fractie/totaal-linFGR/ml) in FIGUUR
4.

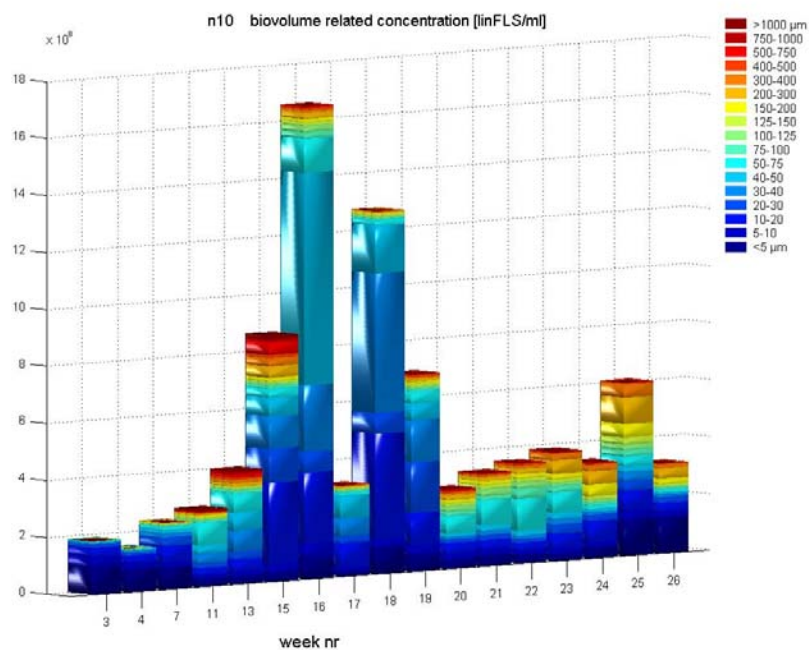


FIGUUR 3 totale LinFGR/mL (chlorofyl-a/m l) per lengtefractie

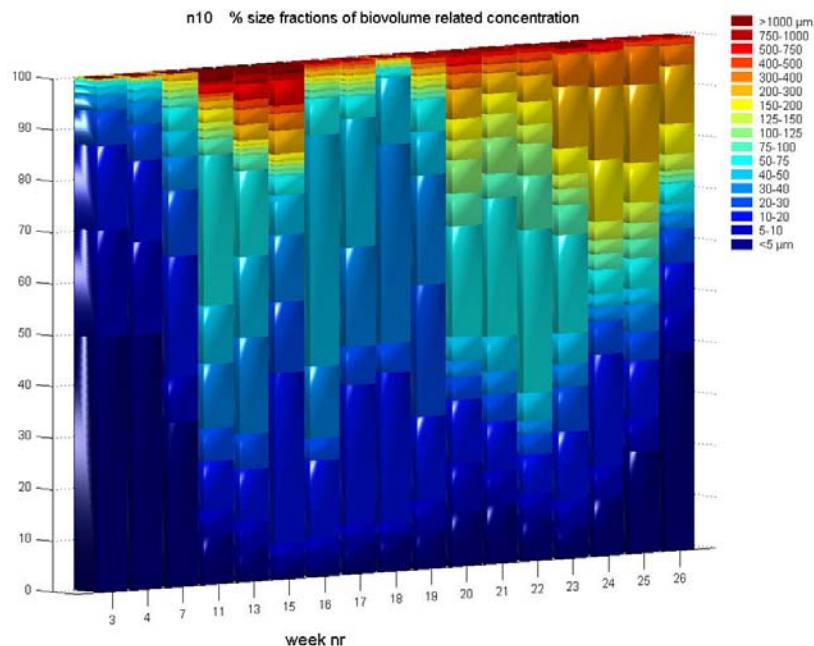


FIGUUR 4 % LinFGR/ml per lengtefractie

De **biovolumeconcentraties** (van deeltjes met chlorofyl-a)/ml uitgesplitst in 16 groottefracties (linFLS/ml.fractie) is weergegeven in FIGUUR 5 en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentratie biovolume/ml uitgesplitst in 16 groottefracties (% linFLS/ml.fractie/totaal-linFLS/ml) in FIGUUR 6.

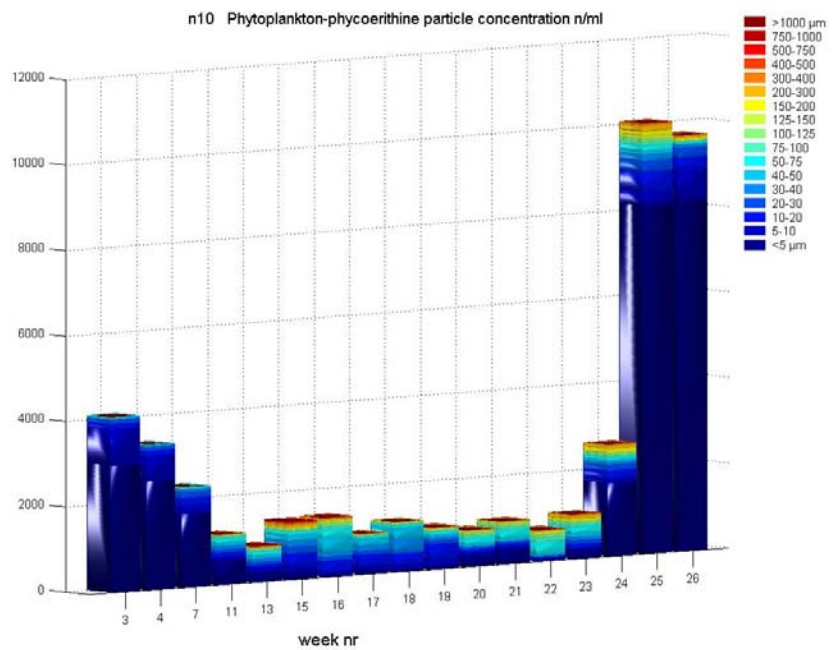


FIGUUR 5 totale LinFLS/ml per lengtefractie Noordwijk 10

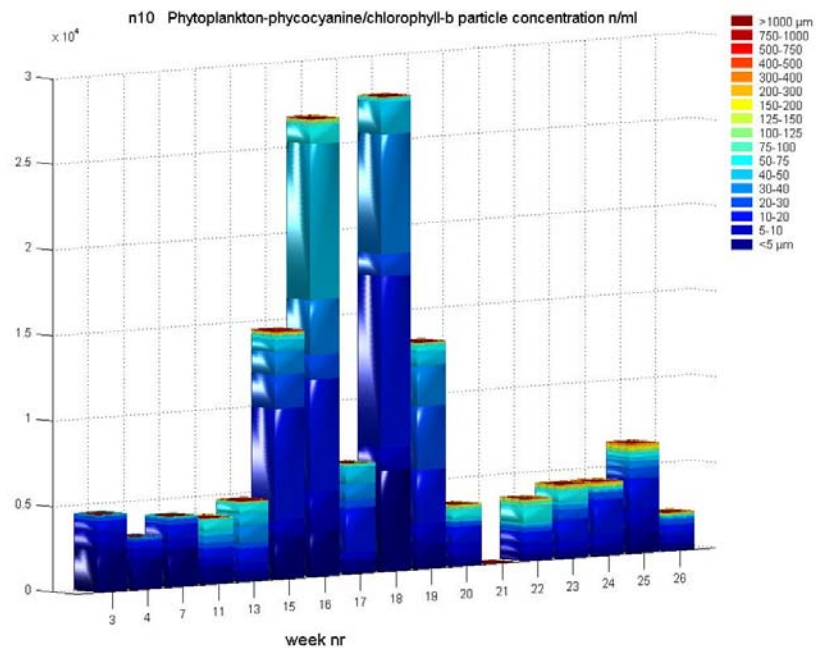


FIGUUR 6 % LinFLS/ml per lengtefractie Noordwijk 10

De concentraties van deeltjes met chlorofyl-a EN **fycobiliproteinen** uitgesplitst in 16 groottefracties ($n_{(FGR>0 \& FGO>0)}$ /ml.fractie) is gepresenteerd in FIGUUR 7 en de concentraties van deeltjes met chlorofyl-a EN **fycocyaninen-chlorofyl-b** in FIGUUR 8.



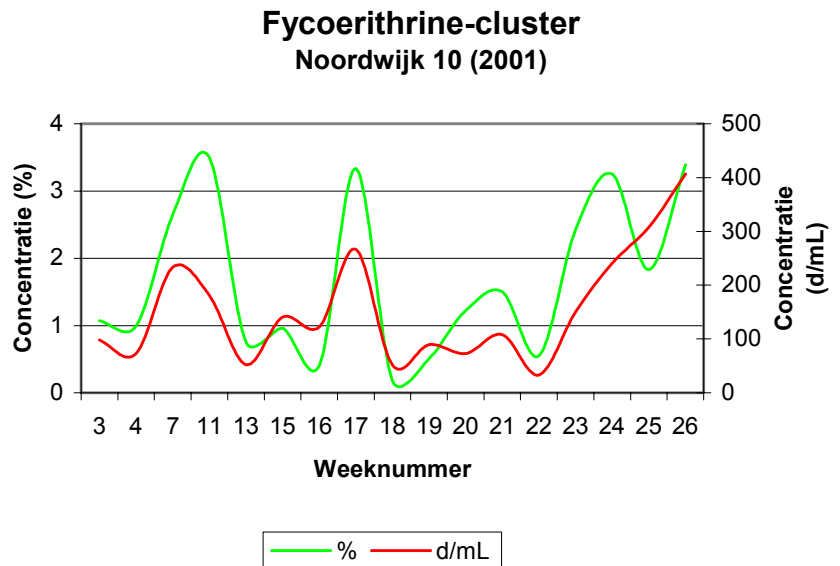
FIGUUR 7 absolute deeltjesconcentratie van deeltjes met FGR & FGO



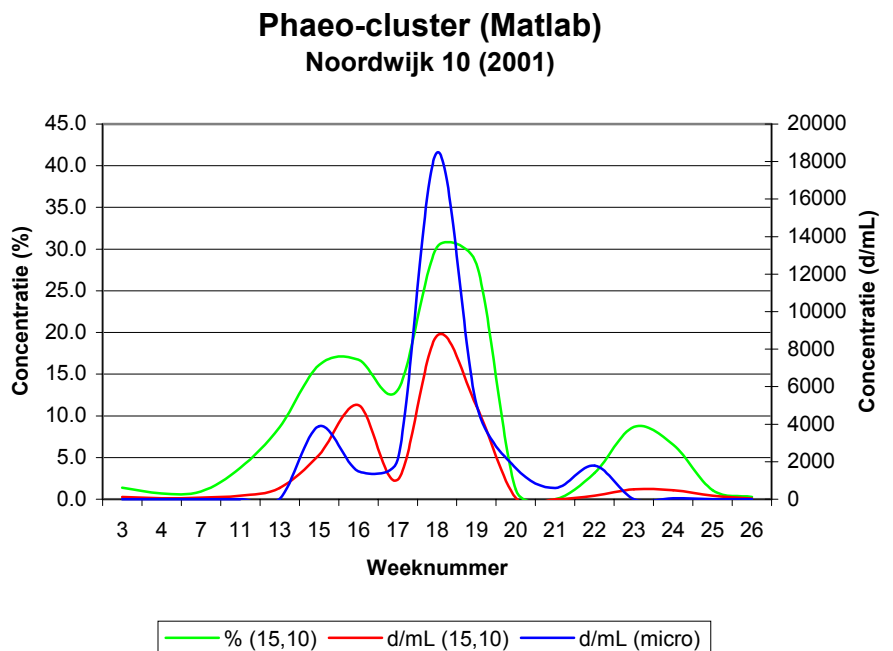
FIGUUR 8 absolute deeltjesconcentratie van deeltjes met FGR & FRR

3.1.3 Aantallen uit clusters van scatterplots

Alleen voor Noordwijk 10 is het cluster bestaande uit sterk oranje fluorescerende deeltjes (Fycoerithrine-cluster) eruit gelicht (Figuur 9). Dit blijken behalve Rhodomonas-deeltjes ook kleine ronde (ca 5 μm) deeltjes te zijn. Dit is ook voor het 'Phaeocystis-cluster' gedaan (Figuur 10). Het 'Phaeocystis-cluster' wordt duidelijk waargenomen ten tijde van bloei, maar buiten deze periode is door overlap met andere soorten de telling minder betrouwbaar.



FIGUUR 9 Concentratieverloop van deeltjes met sterke oranje fluorescentie



FIGUUR 10 Concentratieverloop van deeltjes uit het Phaeocystis-cluster

3.1.4 Imaging in flow en snelle microscopie

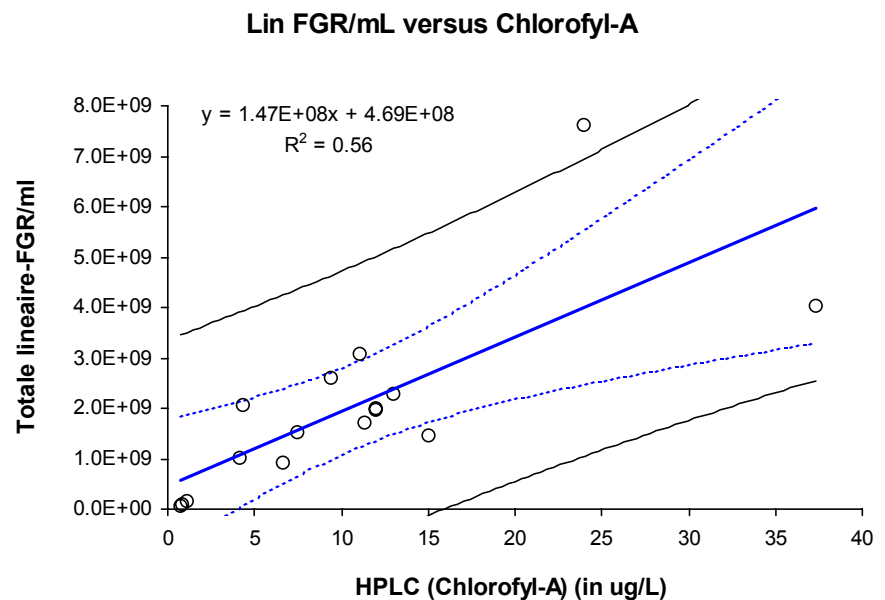
In onderstaande tabel zijn de resultaten van de digitale foto-opnames van de imaging in flow gegeven naast de resultaten van de snelle microscopische tellingen. De kleur geeft de aan of er overeenkomst is (groen) of deeltjes met imaging in flow gemist zijn (rood) of deeltjes alleen met imaging in flow zijn waargenomen (blauw). De plussen in de tabel geeft aan in welke mate deeltjes gevonden zijn waarbij '+++' >10%, '++' >5% en < 10%, '+' >2% en <5%. De daarop volgende tabel toont de percentages van de gevonden soorten, die digitaal gefotografeerd zijn in de vaste flowcytometrische selectie (Spyro, mwtl2-selectie) vanaf een bepaalde grootte en pigmentinhoud.

NOORDWIJK 10 - 2001	Week no.																															
	3		4		7		11		15		16		17		18		19		20		21		22		23		24		25		26	
Algensoort	IIF	MIC	IIF	MIC	IIF	MIC	IIF	MIC	IIF	MIC	IIF	MIC	IIF	MIC	IIF	MIC	IIF	MIC	IIF	MIC	IIF	MIC	IIF	MIC	IIF	MIC	IIF	MIC	IIF	MIC		
Actionoptychus senarius	+		+		+																											
Asterionella sp.																							+	++		+		+		+		
Brockmanniella brockmannii	+++		+		+																											
Cerataulina sp.							+	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Chaetoceros sp.					+		+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+		+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		+++	+++	++	+
Cylindrotheca closterium	+		+		+++																											
Coscinodiscus sp.																				+												
Craspedomonadaceae											+++																		++			
Delphineis minutissima	++		++																													
Dinobryon sp.															+		+															
Diplopsalis gr.														+																		
Ditylum brightwellii			+		+																											
Eucampia zoodiacus																							+	+	+	+					+	
Guinardia flaccida																															++	
Gymnodinium sp.			+												+		++															
Gyrodinium spirale																															++	
Leptocylindricus danicus																							+					+		+		
Meuniera membranacea							+																								+	
Mesodinium rubrum			+																													
Navicula sp.			+																													
Nitzschia sp.	++		++																													
Paralia marina	++		+++		+																+										+	
Pennate diatomee										++	++	++					+						+									
Phaeocystis cel									++	++	+++				+++		+		+													
Phaeocystis kolonie									++	+			+++	+		++				+		+										
Prorocentrum micans														+																		
Protomonadales sp.																			++													
Protoperdinium sp.														+++																		
Pseudonitzschia sp.																	+		+		++	+		+								
Rhaphoneis amphiceros			+																													
Rhizosolenia delicatula							+	+++				++	+						++				+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Rhizosolenia shrubsolei							++	+++	+++	+++	+								+					+	+	+	+				+	
Rhizosolenia stolterfothii							+											+			+		+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Rhodomonas																															+++	
Scenedesmus sp.																																
Skeletonema costatum					++	++																										
Thalassionema sp.	+++	++	++	+++	++	+++																										
Thalassiosira sp.	++	+++	+++	+++	++	+++	+++							+					+		++		++									
detritus	+++		+++		+++		++		+++		+++		+		+				+		+		+		+++		+		+		++	
cel indet	+++		+++		+++		+++		+++		+++		+++		+++		+		+++		+++		+++		+++		+++		+++		+++	
celresten							++						+													+		+				
onduidelijk	+++		+++								+				+								++		++		+		+++		++	

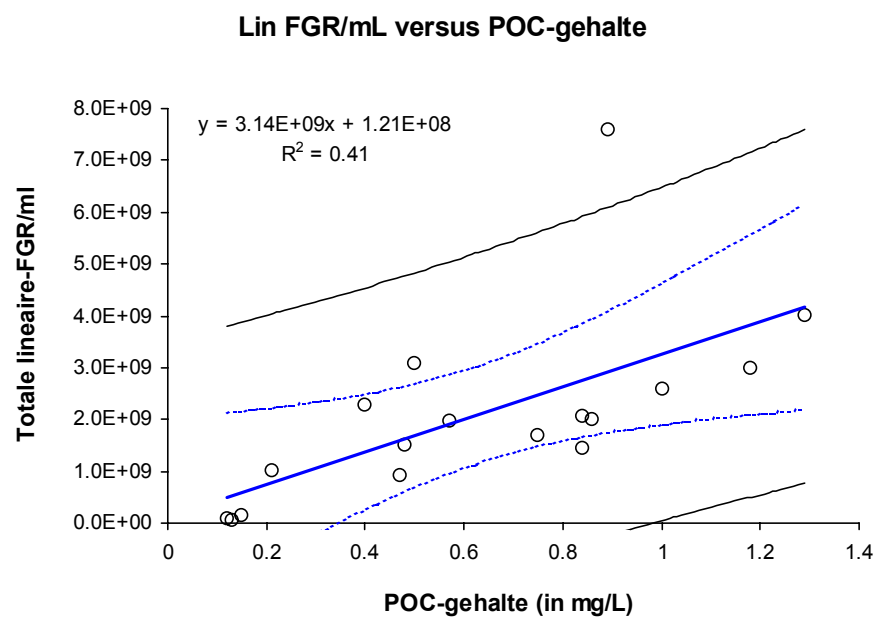
- 2001	Week no.															
	3	4	7	11	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
	1,6	0,9	0,4									3,6	1,2	1,4	0,5	
				2,5	7,2	16,6	43,0	71,8	71,5	40,6	54,2		0,4			
		0,9	1,8	56,6	28,8	35,0	18,5	4,0	15,2	39,3	21,7	22,6	5,9	0,5	13,4	7,3
		4,3	1,1			0,4			0,4							
						0,7					0,4	4,1	2,4	0,5	0,5	0,5
cus												1,0	1,6		3,0	1,0
	6,3	8,7	6,9	0,4											0,5	
		0,9														
					1,0	5,1							0,4			1,0
																1,6
					1,7				0,4	0,4		3,1				
							0,4	0,5	2,9	4,5	5,0	1,5				
a				1,1	10,6	1,1	8,3			0,8	0,4	1,5	11,8	14,3	21,9	7,3
lei				3,6	18,7	2,5	1,1				0,8	2,6	3,1	3,2	1,5	1,0
thii		0,9		0,7	0,2	0,7	0,4	0,5	0,7	0,8	0,8	19,5	16,5	38,2	17,9	11,9
									0,7							18,1
							0,4								0,5	
n	1,6		8,7													
	14,1	3,5	4,3													
	4,7		9,1				0,4					1,0				
	40,6	33,9	26,1	8,2	15,3	17,7	4,5	2,5	1,8	2,5	2,9	2,6	10,2	3,7	2,0	9,8
	12,5	20,9	41,7	21,1	15,1	17,3	18,5	16,3	4,0	11,1	12,5	28,2	37,0	30,0	24,4	33,2
				5,7	0,5	1,1	4,5	1,0					3,9	4,1		0,5
	18,8	21,7			0,5	2,5		3,5	1,8		1,3	9,7	5,5	4,6	13,4	6,2
erd(j/n)	j	j	j	j	j	j	j	j	j	j	j	j	j	j	n	n
	64	115	276	279	417	277	265	202	277	244	240	195	254	217	201	193
tie(c/ml)					484	635	138	151	278	531			381	401	1142	480

3.1.5 Vergelijking met referentietechnieken

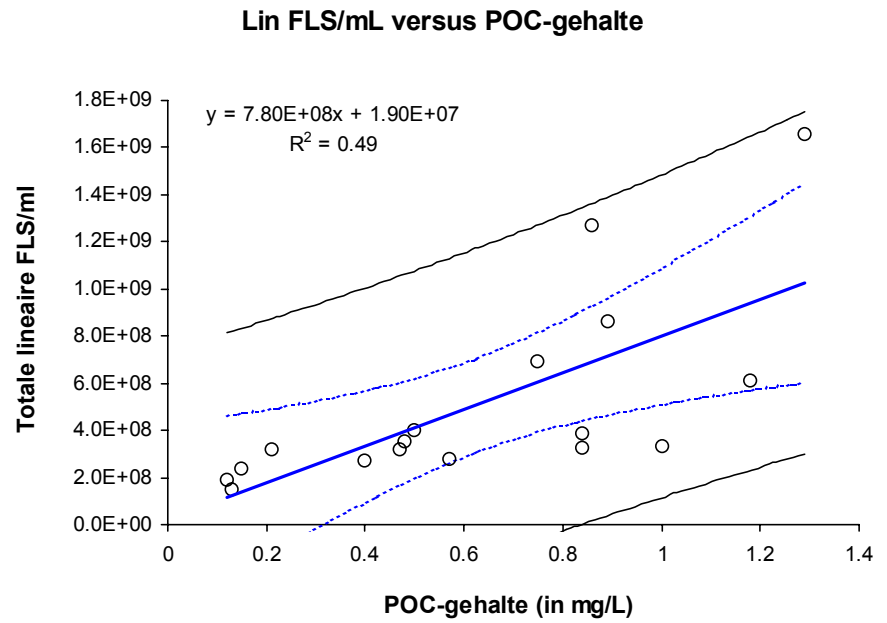
Relaties tussen flowcytometrie linFGR/ml en chlorofyl-a met behulp van High Performance Liquid Chromatography en tussen linFGR/ml of linFLS/ml en Particulair Organisch Koolstof met Carlo Erba Gas Chromatografie zijn weergegeven in onderstaande figuren.



FIGUUR 11 Vergelijking tussen LinFGR/mL en het gehalte aan Chlorofyl-A



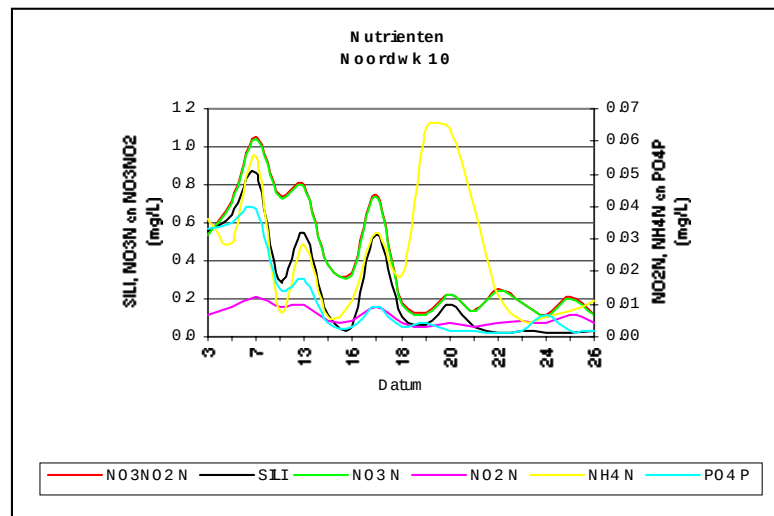
FIGUUR 12 Vergelijking tussen linFGR/mL en het POC-gehalte



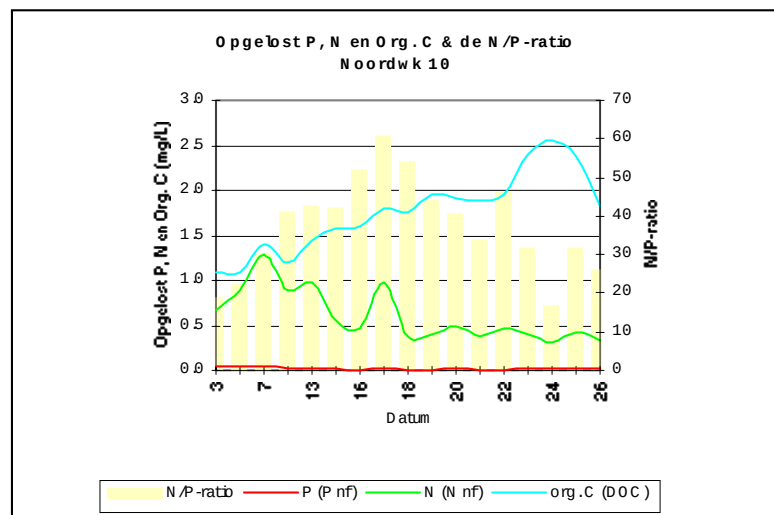
FIGUUR 13 Vergelijking tussen linFLS/mL en het POC-gehalte.

3.1.6 Nutrientenverloop

In onderstaande figuren zijn de nutriëntenconcentraties gegeven van de eerste zes maanden van 2001.



FIGUUR 14 Nutriëntenconcentraties



FIGUUR 15 Opgelost P, N en org. C

3.2 Noordwijk 2

3.2.1 Algemene trends

De **concentratie autotrofe deeltjes** wordt op Noordwijk 2 in de eerste zes maanden van 2001 vooral gedomineerd door één enorme bloeipiek in de eerste week van mei, waarbij de concentratie tot 150000/ml is toegenomen. Dit is ongeveer een factor 10 hoger dan het gemiddelde in de overige weken van het eerste halve jaar en een factor 5 hoger dan de hoogste bloeipiek op locatie Noordwijk 10. De fracties < 40 µm dragen voor het grootste deel bij aan de totaalconcentratie.

Het **biomassa**concentratieverloop (chlorofyl-a of linFGR/ml) toont een toename, die begint in de derde week van maart tot eind maart naar een waarde van ca 8×10^9 au/ml. Vervolgens neemt de biomassa iets (20%) af in de tweede week van april. In week 18 bereikt de biomassa de hoogste waarde (ca 11×10^9 au/ml) veroorzaakt door vooral kleinere deeltjes (< 50 µm). Vanaf medio mei t/m medio juni schommelt de biomassa rond de 4×10^9 au/ml en in de laatste week van juni neemt de biomassa af naar een vijfmaal lagere waarde.

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

De **concentratie deeltjes met fycobilliproteïnen** (fycoerithrine) begint in januari rond de 3000/ml en neemt langzaam af naar 1500/ml medio maart. In de eerste week van mei is er een opvallende bloeipiek (ca 6000/ml) van deeltjes in de fracties 40-75 µm. Deze bloeipiek wordt niet waargenomen op locatie Noordwijk 10. Eind juni is er, net als op Noordwijk 10, een bloeipiek veroorzaakt door kleine deeltjes (< 5 µm), maar in concentratie iets lager namelijk 7500/ml.

De **concentratie deeltjes met fycocyanine-chlorofyl-b** vertoont eenzelfde beeld als het totaalconcentratieverloop autotrofe deeltjes.

De bloeipiek van de totaalconcentratie autotrofe deeltjes in de eerste week van mei in 2001 ontbreekt in het jaar 2000. Daarentegen is de bloeipiek die optreedt eind juni 2000 afwezig in dezelfde periode in 2001. De biomassatoename in 2001 begint eerder(maart) dan in 2000(mei). De hoogste waarde in biomassa in de eerste zes maanden van 2000 (in mei) is ca 8x lager dan hoogste waarde in 2001 (ook in mei). De bloeipiek van deeltjes met fycoerithrine in 2001 in de tweede helft van juni wordt tevens in 2000 waargenomen in dezelfde periode maar is in 2000 ca 8x hoger dan in 2001 (ca 65000/ml tegenover 7500/ml)

Imaging in flow: De meest dominante soorten in het eerste half jaar zijn: *Cerataulina* sp.(wk. 15, 18 en 20), *Chaetoceros* sp.(wk. 4 t/m 26), *Nitzschia* sp.(wk. 3, 4 en 7), *Phaeocystis*(wk. 26), *Pseudonitzschia* sp.(wk. 20), *Rhizosolenia delicatula*(wk. 15 en 24), *Rhizosolenia shrubsolei*(wk. 15), *Rhizosolenia stolterfothii*(wk. 24), *Rhodomonas*(wk. 26) en *Thalassionema* sp.(wk. 4). *Chaetoceros* sp. is gedurende de eerste 6 maanden continu aanwezig op Noordwijk 2 met relatief hoge percentages en een maximum in week 22 van 79%.

Het percentage detritus is relatief hoog in het begin van het jaar maar neemt in de loop van het eerste half jaar af.

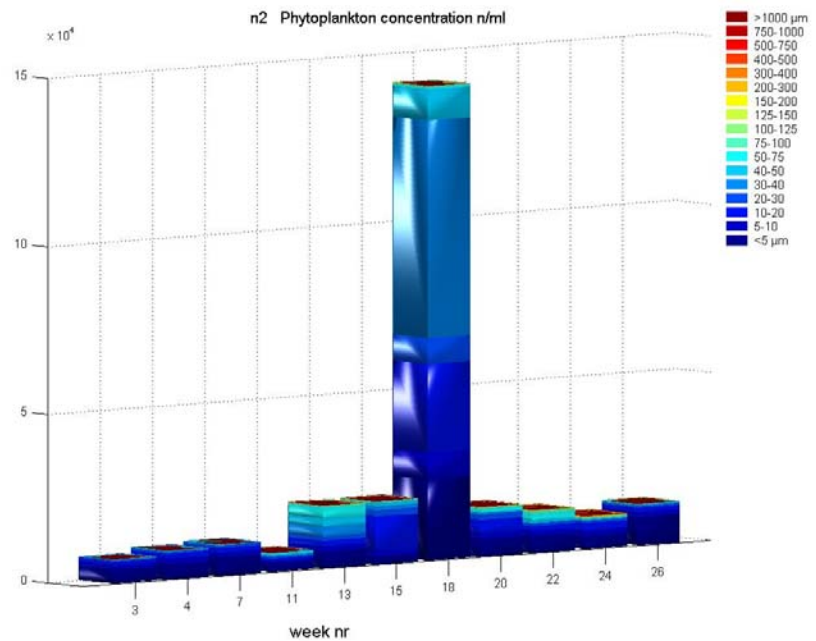
In vergelijking met de snelle microscopische telling worden voor een aantal soorten goede overeenkomsten gevonden en voor een aantal soorten worden verschillen gevonden. Een aantal wordt door Imaging In Flow waargenomen en niet door snelle microscopie en vice versa.

*De **correlatie** tussen linFGR/ml en chlorofyl-a (HPLC) en particulier organisch koolstof (POC) is redelijk tot goed ($r^2=0,78$ en $0,79$) en goed tussen linFLS/ml en POC ($r^2=0,89$), hoewel deze vooral door één hoge waarde bepaald wordt.*

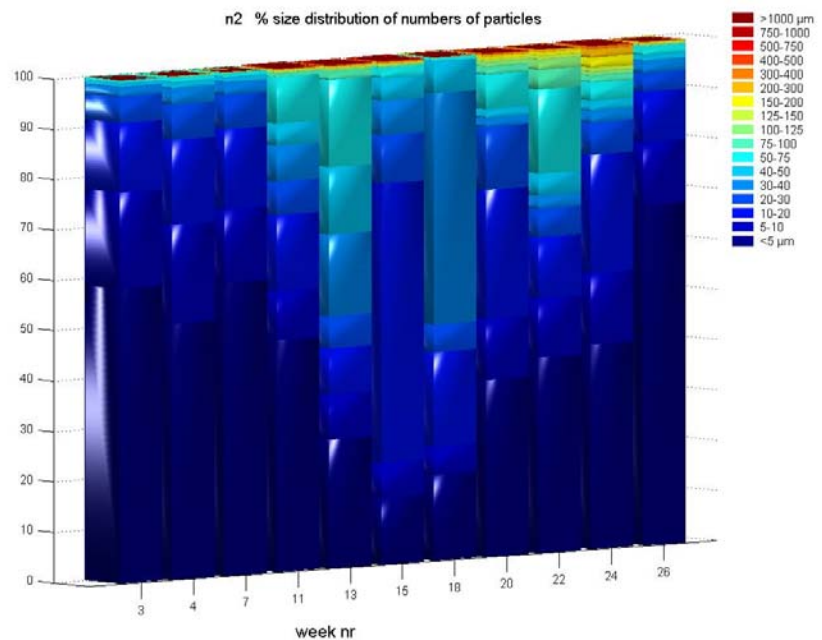
*Het **nutriëntenverloop** is erg grillig. Vanaf week 7 tot week 13 nemen alle nutriënten sterk af. Van week 13 tot en met week 15 nemen vooral $\text{NO}_3\text{NO}_2\text{N}$ en SiO_4 toe en naar week 18 weer af, weer toe naar week 20 en weer af naar het einde van week 26. In relatie met de flowcytometrische gegevens neemt tot en met week 13 het aandeel grote deeltjes toe. Opvallend in week 15 is dat naast de aanwezigheid van grotere deeltjes een toename van kleine deeltjes plaats vindt. Deze gaat gepaard met een toename van een aantal nutriënten ($\text{NO}_3\text{NO}_2\text{N}$, NO_3 , SiO_4). In de eerste drie maanden wordt een gestage toename van de N/P ratio (opgelost) geconstateerd met een maximum in week 15. De N/P-ratio blijft vervolgens hoog(m.u.v. week 18) t/m week 22 waarna een daling volgt in week 24 en 26. Deze laatste twee lage waarden gaan gepaard met een relatief groot aandeel van middelgrote deeltjes (200-300 μm).*

3.2.2 Flowcytometrische fytoplanktonconcentraties Noordwijk 2

Fytoplanktonconcentratie: De totaalconcentraties van deeltjes met chlorofyl-a zijn uitgesplitst in 16 groottefracties (deeltjes/ml.fractie) in FIGUUR 16 en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentraties van deeltjes met chlorofyl-a uitgesplitst in 16 groottefracties ($\% \text{ n.fractie}/\text{n}_{\text{totaal}}$) in FIGUUR 17.

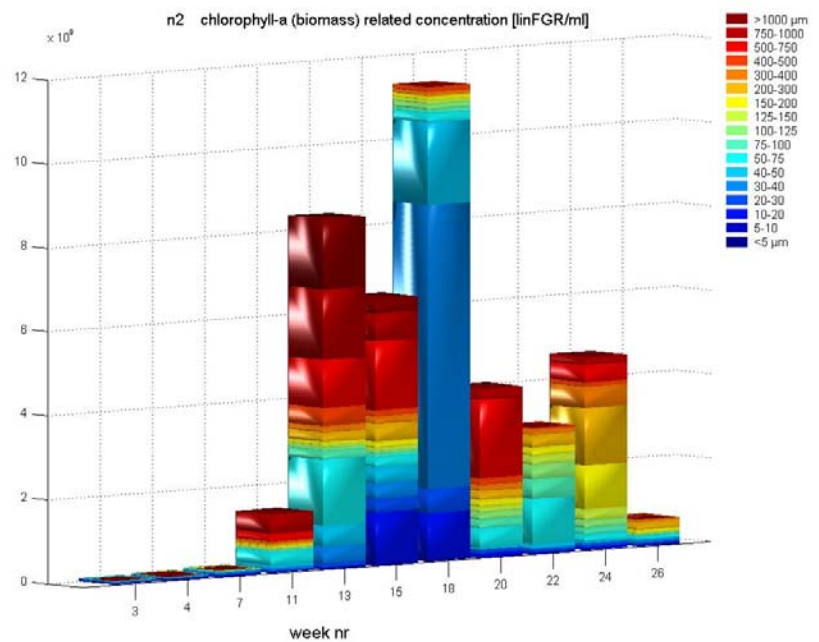


FIGUUR 16 Concentratie autotrofe deeltjes (met chlorofyl-a) per lengtefractie

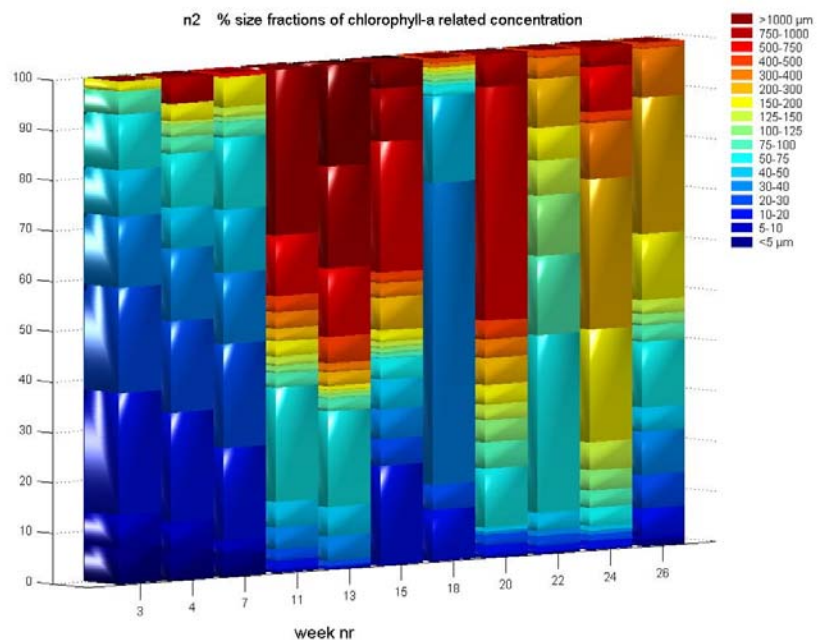


FIGUUR 17 % aantal autotrofe deeltjes met chlorofyl-a per lengtefractie

De **chlorofyl-a/ml concentraties** (biomassa) of flowcytometrische linFGR/ml variabele is uitgesplitst in 16 groottefracties (linFGR/ml.fractie) (FIGUUR 18) en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentratie chlorofyl-a/ml uitgesplitst in 16 groottefracties in FIGUUR 19.

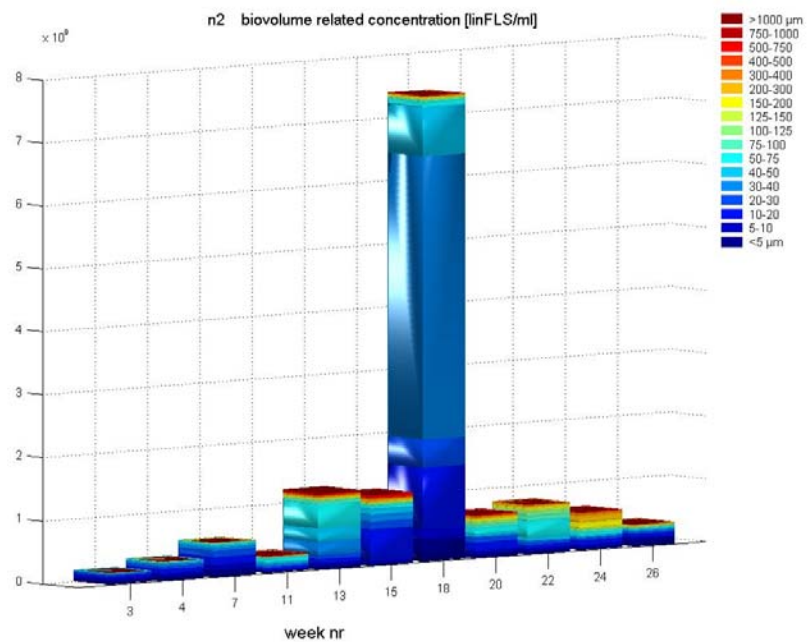


FIGUUR 18 totale LinFGR/mL (chlorofyl-a/ml) per lengtefractie Noordwijk 2

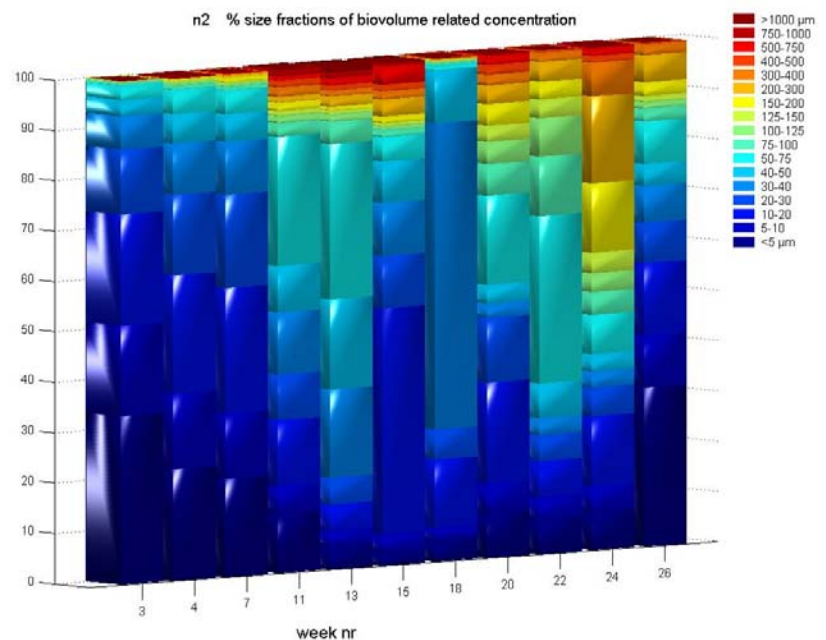


FIGUUR 19 % LinFGR/ml per lengtefractie Noordwijk 2

De **biovolumeconcentraties** (van deeltjes met chlorofyl-a)/ml uitgesplitst in 16 groottefracties (linFLS/ml.fractie) is weergegeven in FIGUUR 20 en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentratie biovolume/ml uitgesplitst in 16 groottefracties (% linFLS/ml.fractie/totaal-linFLS/ml) in FIGUUR 21.

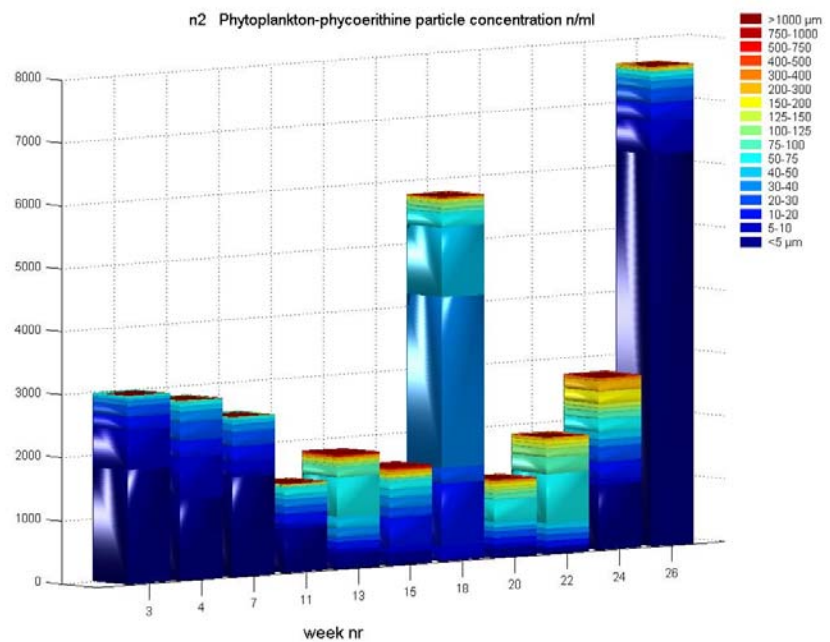


FIGUUR 20 totale LinFLS/ml per lengtefractie Noordwijk 2

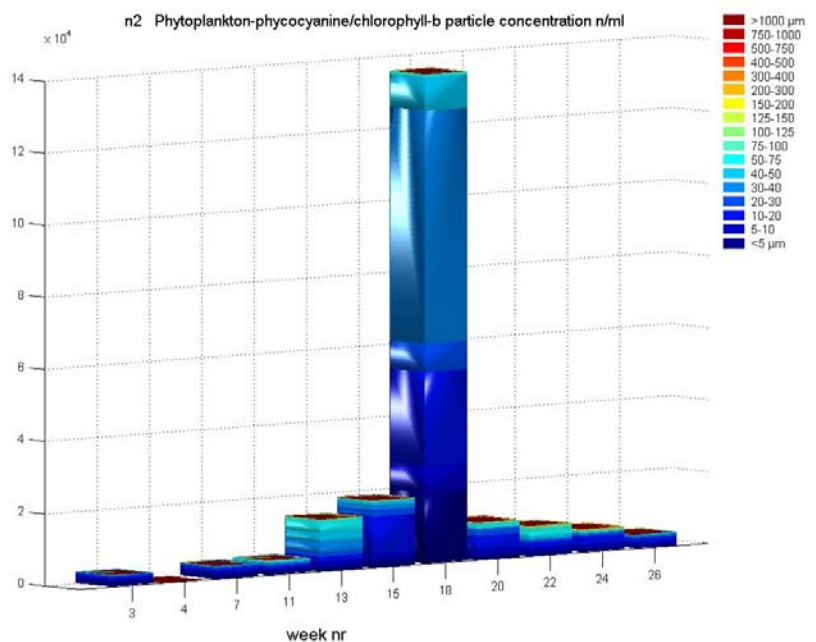


FIGUUR 21 % LinFLS/ml per lengtefractie Noordwijk 2

De concentraties van deeltjes met chlorofyl-a EN **fykobilliproteinen** uitgesplitst in 16 groottefracties ($n_{(FGR>0\&FGO>0)}$ /ml.fractie) is gepresenteerd in FIGUUR 22 en de concentraties van deeltjes met chlorofyl-a EN **fyrocyaninen en chlrofyl-b** in FIGUUR 23.



FIGUUR 22 absolute deeltjesconcentratie van deeltjes met FGR & FGO



FIGUUR 23 absolute deeltjesconcentratie van deeltjes met FGR & FRR

3.2.3 Imaging in flow en snelle microscopie

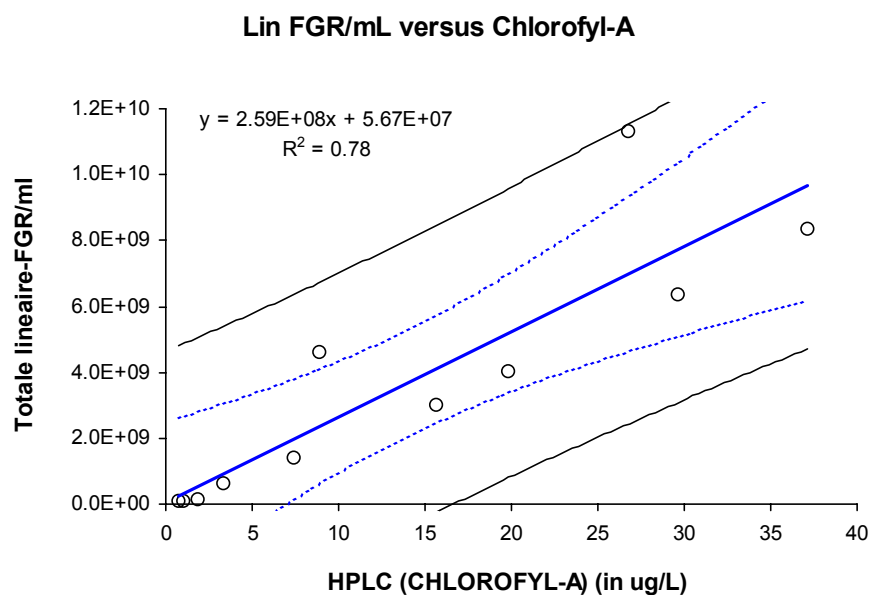
In onderstaande tabel zijn de resultaten van de digitale foto-opnames van de imaging in flow gegeven naast de resultaten van de snelle microscopische tellingen. De kleur geeft de aan of er overeenkomst is (groen) of deeltjes met imaging in flow gemist zijn (rood) of deeltjes alleen met imaging in flow zijn waargenomen (blauw). De plussen in de tabel geeft aan in welke mate deeltjes gevonden zijn waarbij '+++' >10%, '++' >5% en < 10%, '+' >2% en <5%. De daarop volgende tabel toont de percentages van de gevonden soorten, die digitaal gefotografeerd zijn in de vaste flowcytometrische selectie vanaf een bepaalde grootte en pigmentinhoud.

NOORDWIJK 2 - 2001	Week no.															
	3		4		7		11		15		18		20		22	
	IIF	MIC	IIF	MIC	IIF	MIC	IIF	MIC	IIF	MIC	IIF	MIC	IIF	MIC	IIF	MIC
Actionoptychus senarius	+		+		+++											
Asterionella sp.													+		+	+
Brockmanniella brockmannii	+++		+++		+++											
Cerataulina sp.							+		++	+	+++	+	+++	+++		
Centr. diatomee					+											
Chaetoceros sp.			+		++	+	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++
Chrysochromulina																+
Cylindrotheca closterium	++		+		+											
Cryptophyceae							+									+
Delphineis minutissima	+++				+++		+									
Diplopsalis gr.																+
Distephanus speculum			+													
Ditylum brightwellii					+								++			
Eucampia zoodiacus															+	
Eunotogramma dubium					+											
Eutreptiella sp.							+									
Guinardia flaccida																++
Gymnodinium sp.			+										+			
Gyrodinium spirale																
Leptocylindricus danicus															+	+
Nitzschia sp.	++		++		++											
Oblea rotunda																+
Odontella aurita	+															
Oxytoxum																+
Paralia marina	+++		+++		+++											
Pennate diatomee			+						+				+		+	
Phaeocystis cel									+++		+++					
Phaeocystis kolonie									+	+						
Prasinophyceae			+													
Plagiogrammopsis vanheurckii				+	+	++										
Protomonadales sp.			+													
Protoperdinium sp.													+			++
Pseudonitzschia sp.											+		++		+	
Rhaphoneis amphiceros			+++													
Rhizosolenia delicatula							++		++	+			+		+++	+++
Rhizosolenia shrubsolei							+++		++	+++					+	+
Rhizosolenia stolterfothii													++		+++	+++
Rhodomonas													+		+	+++
Scenedesmus sp.																
Skeletonema costatum					+								+		+	
Thalassionema sp.	+	+	+++	+	+											
Thalassiosira sp.	+++		+	+++	+	+++	+++		+				+++		++	+
detritus	+++		+++		+++		+++		+++		+++		++		++	+
cel indet	+++		+++		+++		++		+++		+++		+++		+++	+++
onduidelijk			+								+					+++

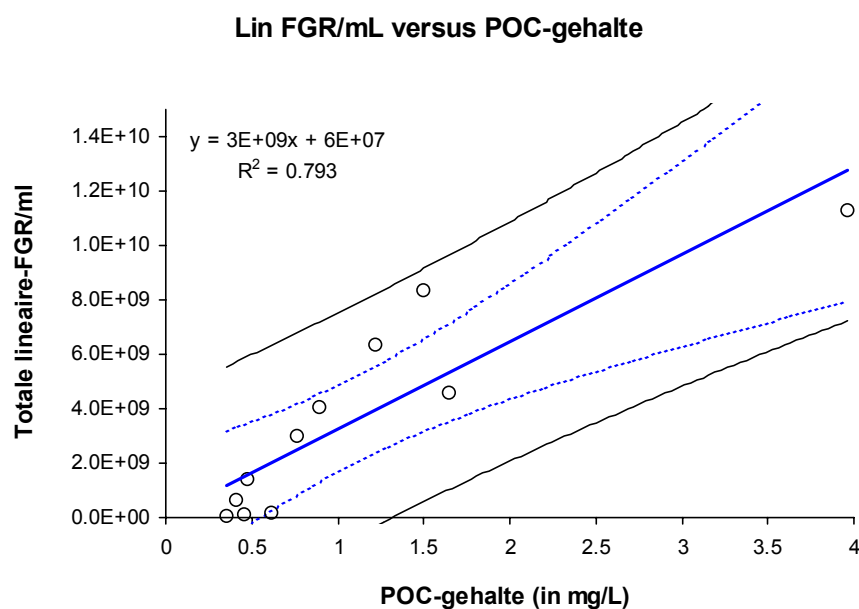
NOORDWK2 - 2001 % IIF-foto's	Week no.									
	3	4	7	11	15	18	20	22	24	26
Asterionella sp.								2,0	2,3	
Centr. diatomee			0,4							
Cerataulina sp.					5,7	19,0	11,2			
Chaetoceros sp.		2,8	7,9	71,6	52,9	27,0	55,9	78,8	5,4	18,6
Ditylum brightwellii		1,8	2,0	0,5		0,6				
Eucampia zoodiacus				0,9						0,6
Leptocylindricus danicus							0,6		2,7	
Nitzschia sp.	8,0	7,3	5,1			0,6				
Paralia marina										
Pennate diatomee		0,9	1,6			1,1				1,2
Phaeocystis cel										6,6
Phaeocystis kolonie					2,1					
Pseudonitzschia sp.						2,3	9,9	1,0		
Rhizosolenia delicatula			0,4	1,4	5,7		1,2	1,0	20,4	1,8
Rhizosolenia shrubsolei				2,4	9,3	1,7			2,3	
Rhizosolenia stolterfothii						0,6			29,9	3,6
Rhodomonas							3,7		4,5	25,1
Skeletonema costatum			3,6							
Thalassionema sp.	2,7	10,1	3,6							
Thalassiosira sp.	0,7	4,6	3,2				0,6			
Detritus	73,3	45,0	21,7	12,8	12,9	18,4	6,2	5,1	4,5	2,4
cel indet	14,0	22,9	50,6	9,5	11,4	25,3	10,6	11,1	27,6	23,4
onduidelijk	1,3	2,8				3,4				16,2
monster geconcentreerd(j/n)	j	j	j	n	j	j	n	n	n	n
totaal aantal foto's	150	109	253	211	140	174	161	99	221	167
concentratie IIF-selectie(c/ml)					1656	659	1643	2423	1201	719

3.2.4 Vergelijking met referentietechnieken

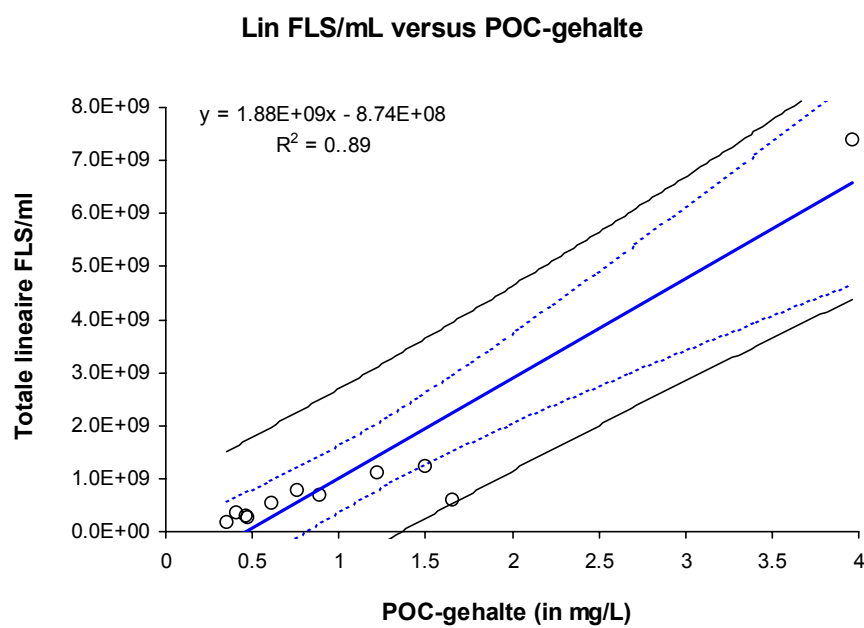
De relatie tussen flowcytometrie linFGR/ml en chlorofyl-a met behulp van HPLC en tussen linFGR/ml of linFLS/ml en particulier organisch koolstof (POC) zijn onderzocht en gepresenteerd in onderstaande figuren.



FIGUUR 24 Vergelijking tussen LinFGR/mL en het gehalte aan Chlorofyl-A



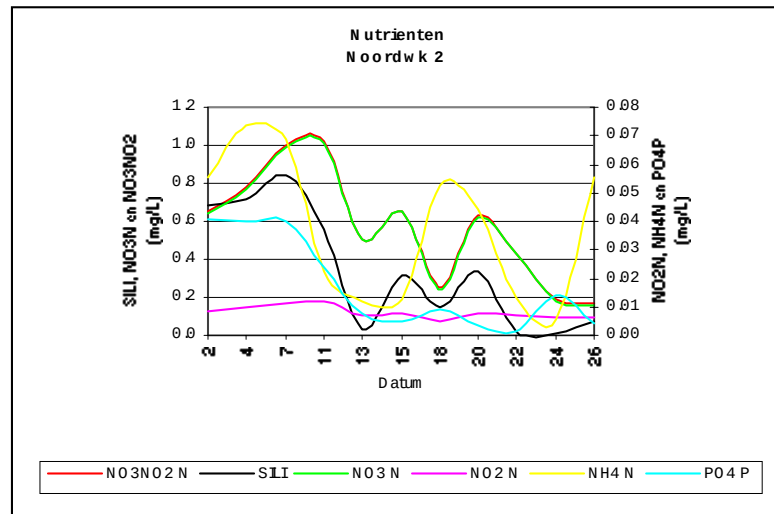
FIGUUR 25 Vergelijking tussen linFGR/mL en het POC-gehalte



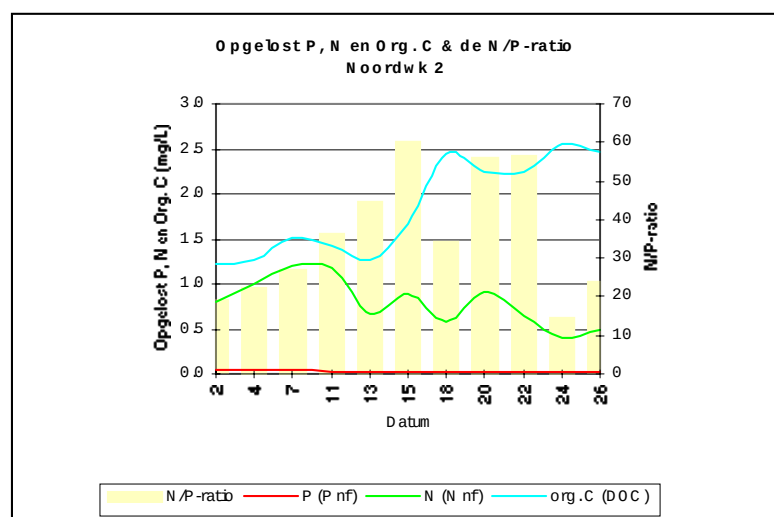
FIGUUR 26 Vergelijking tussen linFLS/mL en het POC-gehalte_

3.2.5 Nutrientenverloop

In onderstaande figuren is het nutriëntenverloop en de N/P-ratio weergegeven over de eerste zes maanden van 2001.



FIGUUR 27 Nutriëntenconcentraties



FIGUUR 28 Opgelost P, N en org. C

5.3 Terschelling 135

5.3.1 Algemene trends

Een algemene opmerking over Terschelling 135 is de matige aanvoer van monsters gedurende de eerste helft van het jaar, waardoor over de maanden februari, maart en april geen data beschikbaar is.

*De **totaalconcentratie autotrofe deeltjes** is in week 2 ca. 8000/ml. Van een waarde kleiner dan 1000/ml in week 18 neemt deze toe naar ca 8000/ml in week 22. In week 26 is de concentratie gedaald naar 3000/ml. De concentratie wordt voornamelijk bepaald door deeltjes kleiner dan 20 µm.*

*De **chlorofyl-a (linFGR/ml) concentratie** is het hoogst medio mei (bijna $0,2 \times 10^6$ au/ml). Daarvoor en daarna is deze een factor 2 tot 4 lager. Begin mei en eind juni worden relatief meer (middel) grotere deeltjes gevonden, die bijdragen aan de biomassa.*

*Het **biovolume (linFLS/ml)** verloop vertoont veel overeenkomst met het deeltjesconcentratie verloop.*

*De concentratie van autotrofe **deeltjes met fycoerithrine** is het hoogst begin januari (5000/ml) vooral veroorzaakt door kleine deeltjes (<5 µm). In de periode begin mei tot en met juni is de concentratie laag (ca 500/ml) op een bloeipiek na begin juni (2000/ml) veroorzaakt door deeltjes <5 µm.*

Ten opzichte het vorige jaar (2000) is de vergelijking door het wegvallen van monsters lastig. De absolute concentratie van autotrofe deeltjes in het begin van het jaar is in 2001 hoger (8000 tov 5000/ml), voor de overige periode niet opvallend afwijkend. De biomassapiek van medio mei in 2001 is in exact dezelfde periode ook aanwezig in 2000, maar is in 2001 circa 1,5 maal hoger. De deeltjes met fycoerithrine zijn in 2001 alleen bij aanvang van het jaar iets talrijker dan in 2000, maar lijken over de gehele linie niet veel van elkaar af te wijken.

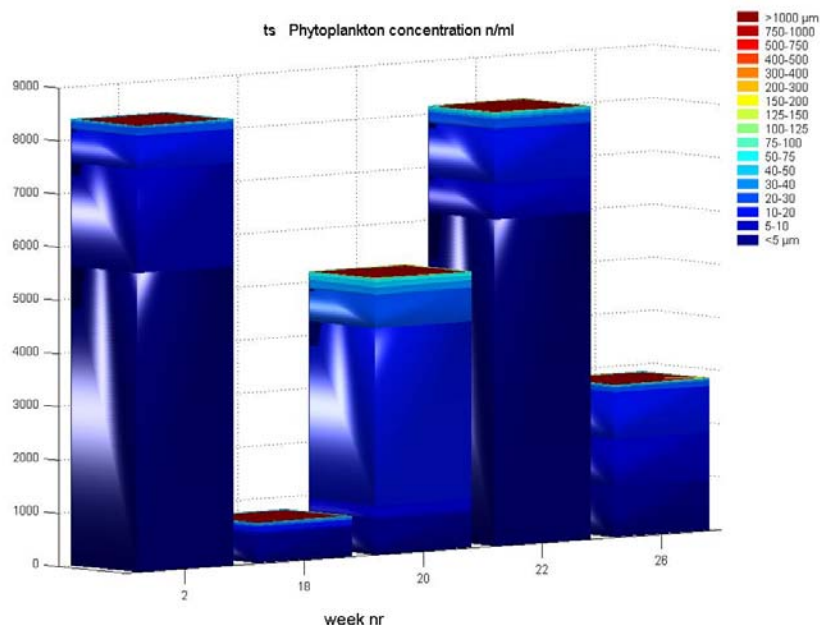
***Imaging in flow:** De meest dominante soorten die zijn waargenomen zijn *Chaetoceros* sp. (wk. 20,22), *Rhizosolenia delicatula* (wk. 18) en *Rhizosolenia shrubsolei* (wk 26). De overeenkomsten met microscopische waarnemingen zijn gering.*

***Correlatie** onderzoek en nutriëntenverloop in relatie met fytoplankton-gegevens worden beperkt door het geringe aantal waarnemingen/analyses. De conclusies hieromtrent dienen met enige reserves te worden geëvalueerd. Goede correlaties worden gevonden tussen linFGR/ml en chlorofyl-a (HPLC) en POC ($r^2=0,99$ en $0,82$).*

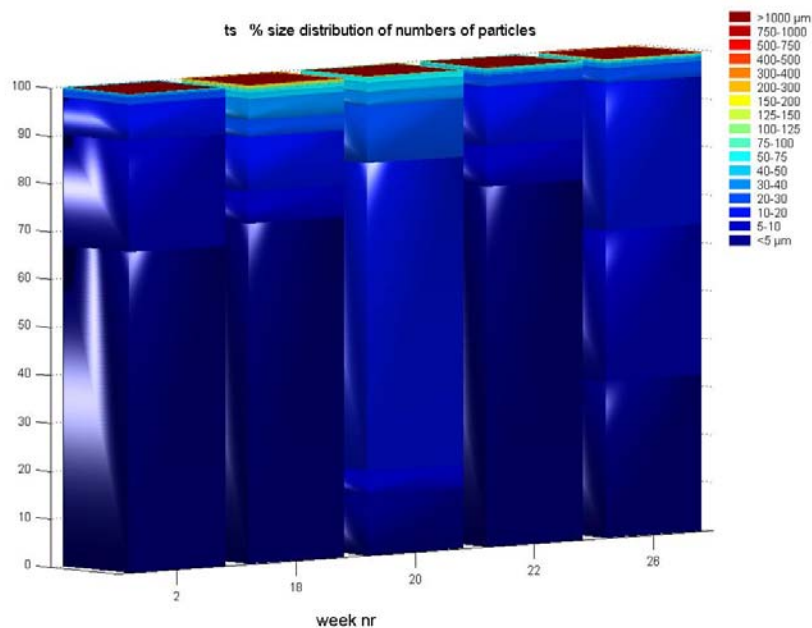
*De **nutriënten** $\text{NO}_3\text{NO}_2\text{N}$, SiO_4 , NO_3 en PO_4 dalen van week 2 naar week 18 sterk (slechts 2 meetpunten). De nutriënten NH_4 en NO_2 zijn constant relatief laag en vertonen weinig variatie. In week 18 wordt de hoogste N/P ratio opgelost gevonden.*

3.3.2 Flowcytometrische fytoplanktonconcentraties Terschelling 135

Fytoplanktonconcentratie: De totaalconcentraties van deeltjes met chlorofyl-a zijn uitgesplitst in 16 groottefracties (deeltjes/ml.fractie) in FIGUUR 29 en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentraties van deeltjes met chlorofyl-a uitgesplitst in 16 groottefracties ($\% \text{ n.fractie/n}_{\text{totaal}}$) in FIGUUR 30.

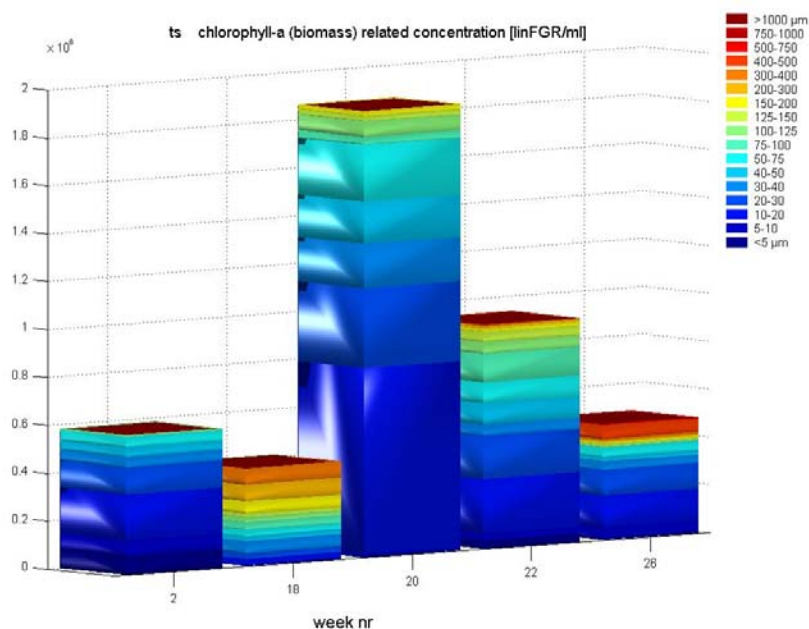


FIGUUR 29 Concentratie autotrofe deeltjes (met chlorofyl-a) per lengtefractie

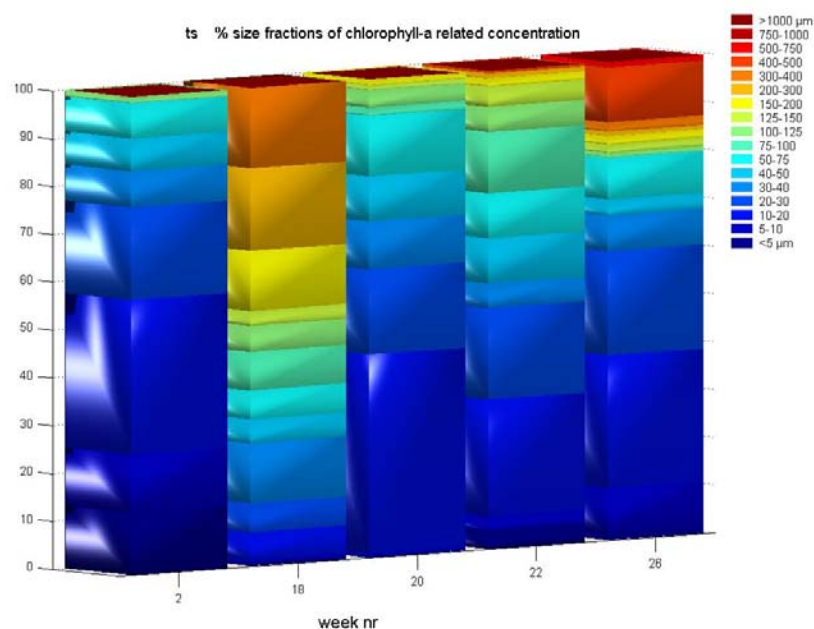


FIGUUR 30 % aantal autotrofe deeltjes met chlorofyl-a per lengtefractie

De **chlorofyl-a/ml concentraties** (biomassa) of flowcytometrische linFGR/ml variabele is uitgesplitst in 16 groottefracties (linFGR/ml.fractie) (FIGUUR 31) en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentratie chlorofyl-a/ml uitgesplitst in 16 groottefracties (% linFGR/ml.fractie/totaal-linFGR/ml) in FIGUUR 32.

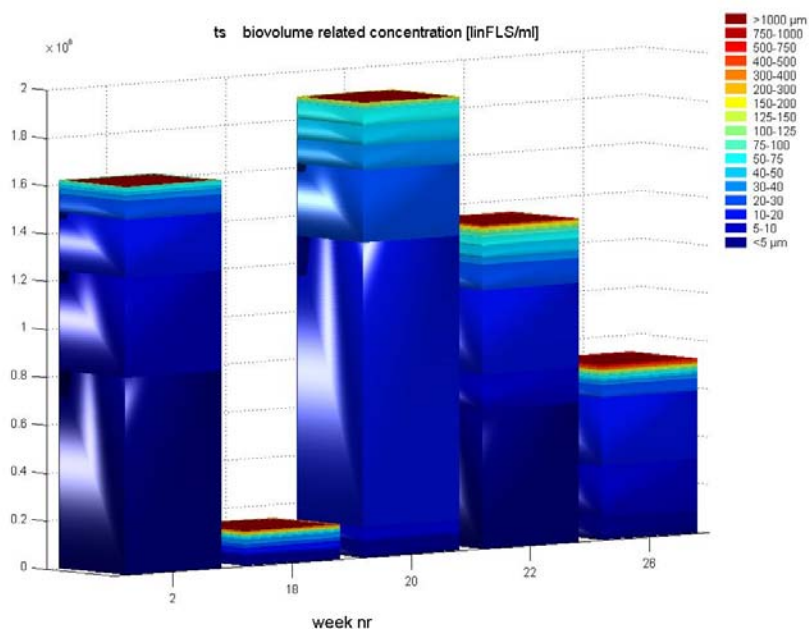


FIGUUR 31 totale LinFGR/mL (chlorofyl-a/ml) per lengtefractie

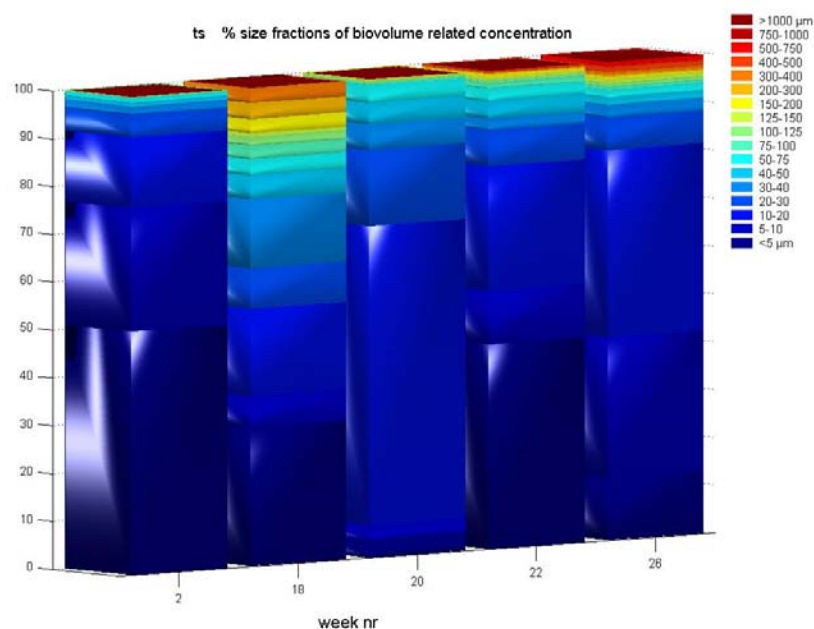


FIGUUR 32 % LinFGR/ml per lengtefractie Terschelling 135

De **biovolumeconcentraties** (van deeltjes met chlorofyl-a)/ml uitgesplitst in 16 groottefracties (linFLS/ml.fracties) is weergegeven in FIGUUR 33 en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentratie biovolume/ml uitgesplitst in 16 groottefracties (% linFLS/ml.fractie/totaal-linFLS/ml) in FIGUUR 34.

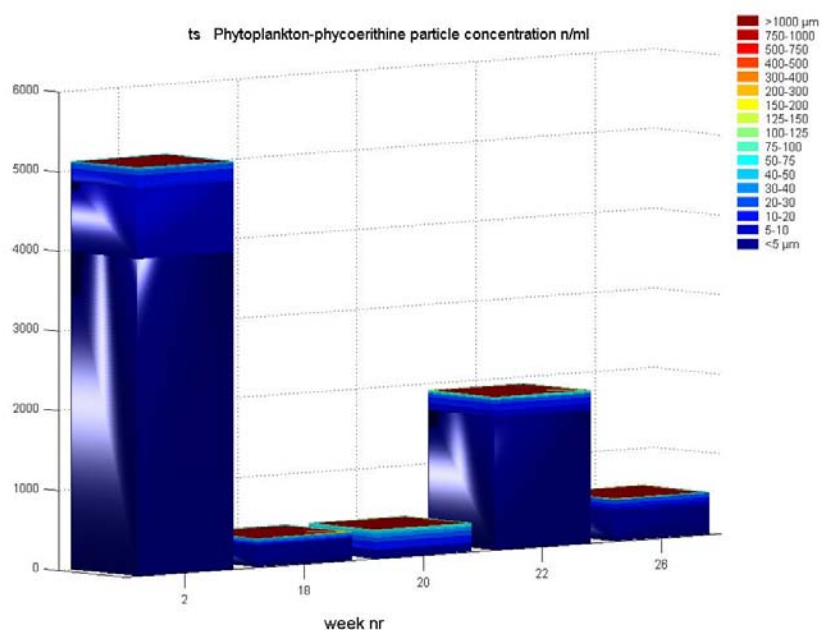


FIGUUR 33 totale LinFLS/ml per lengtefractie Terschelling 135

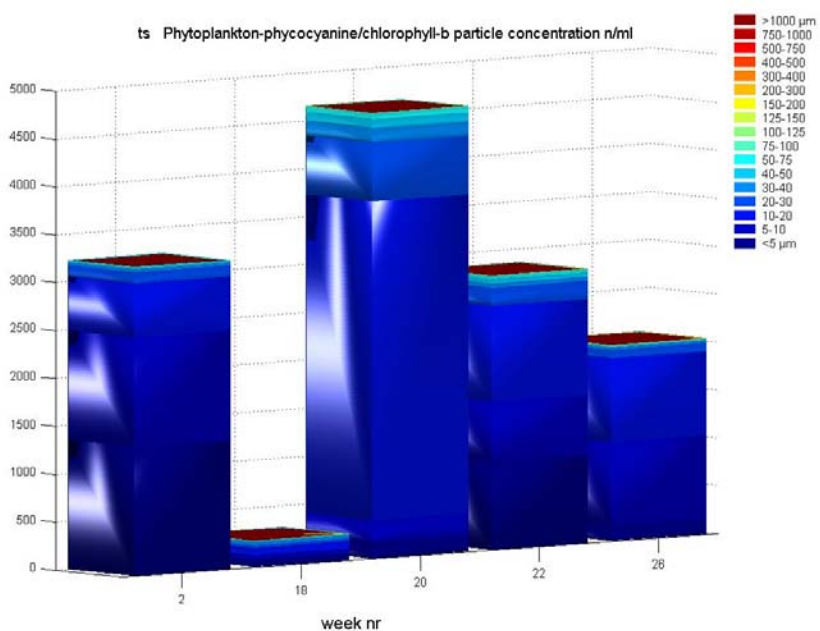


FIGUUR 34 % LinFLS/ml per lengtefractie Terschelling 135

De concentraties van deeltjes met chlorofyl-a ËN **fykobilliproteïnen** uitgesplitst in 16 groottefracties ($n_{(FGR>0 \& FGO>0)}$ /ml.fractie) is gepresenteerd in FIGUUR 35 en de concentraties van deeltjes met chlorofyl-a ËN **fyocyaninen en chlorofyl-b** in FIGUUR 36.



FIGUUR 35 absolute deeltjesconcentratie van deeltjes met FGR & FGO



FIGUUR 36 absolute deeltjesconcentratie van deeltjes met FGR & FRR

3.3.3 Vergelijking met referentietechnieken

In onderstaande tabel zijn de resultaten van de digitale foto-opnames van de imaging in flow gegeven naast de resultaten van de snelle microscopische tellingen. De kleur geeft de aan of er overeenkomst is (groen) of deeltjes met imaging in flow gemist zijn (rood) of deeltjes alleen met imaging in flow zijn waargenomen (blauw). De plussen in de tabel geeft aan in welke mate deeltjes gevonden zijn waarbij '+++' >10%, '++' >5% en < 10%, '+' >2% en <5%.

De daarop volgende tabel toont de percentages van de gevonden soorten, die digitaal gefotografeerd zijn in de vaste flowcytometrische selectie vanaf een bepaalde grootte en pigmentinhoud.

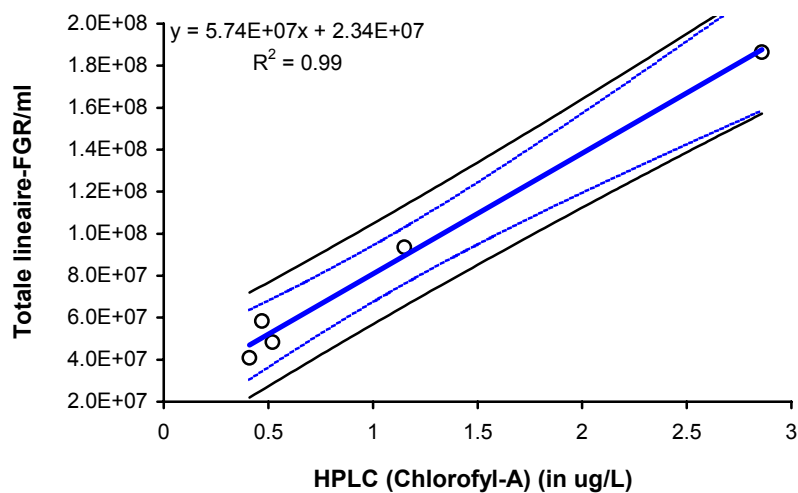
TSLG135 - 2001	Week no.									
	2		18		20		22		26	
Alaensoort	IIF	MIC	IIF	MIC	IIF	MIC	IIF	MIC	IIF	MIC
<i>Actiniscus pentasterias</i>										+
<i>Alexandrium</i> sp.			+							
<i>Brockmanniella brockmannii</i>	+									
<i>Cerataulina</i> sp.										
<i>Ceratium tripos</i>										+++
<i>Chaetoceros</i> sp.	+				+++	+	+++	+		
<i>Chrysochromulina</i> sp.			+++		+++		+++			
<i>Coronosphaera mediterranea</i>	+									
<i>Craspedomonadaceae</i>			+							
<i>Cylindrotheca closterium</i>	+++									
<i>Delphineis minutissima</i>	++									
<i>Dictyocha fibula</i>	+									
<i>Dinophysis accuminata</i>										++
<i>Dinophysis norvegica</i>					++		+			
<i>Diplopsalis</i> gr.			+							
<i>Entomoneis</i> sp.	++									
<i>Fragilidium subglobosum</i>										+
<i>Glenodinium danicum</i>					++					
<i>Guinardia flaccida</i>			+							++
<i>Gymnodinium</i> sp.			++		+					
<i>Gyrodinium calvotolyphe</i>							+			
<i>Gyrodinium</i> sp.			+							
<i>Leptocylindricus danicus</i>										+
<i>Nitzschia</i> sp.	+									
<i>Odontella regia</i>	+									
<i>Paralia marina</i>	++									
<i>Phaeocystis flagellata</i>							+			
<i>Plagiogrammosis vanheurckii</i>	+									
<i>Pleurosigma normanii</i>	+									
<i>Preperidinium meunierii</i>			+							
<i>Prorocentrum balticum</i>										+
<i>Protoperidinium</i> sp.			+++		++		+			++
<i>Pseudonitzschia</i> sp.										
<i>Rhaphoneis amphiceros</i>	++									
<i>Rhizosolenia alata</i>							+			+++
<i>Rhizosolenia delicatula</i>			+++	+++	+++		+			
<i>Rhizosolenia shrubsolei</i>									+++	+
<i>Scropsiella</i> sp.					++	+	+++			
<i>Thalassionema</i> sp.	+++									
<i>Thalassiosira</i> sp.	+++				+					
detritus	+++		+++		++		++		+++	
cel indet	++		+++		+++		+++		+++	
onduidelijk	+++				++		+++		+++	
celresten			+++							

TERSLG135 - 2001 % IIF-foto's	Week no.				
Algensoort	2	18	20	22	26
Cerataulina sp.			0,9		
Chaetoceros sp.	2,8	1,7	72,8	13,0	
Dinophysis sp.				1,6	
Nitzschia sp.	3,2				
Pseudonitzschia sp.		1,7			
Rhizosolenia delicatula		16,7	1,8		
Rhizosolenia shrubsolei				1,6	22,0
Scripsiella sp.				4,2	1,8
detritus	30,6	18,3	5,3	4,2	11,9
cel indet	6,4	61,7	13,2	59,6	42,2
onduidelijk	57,1		6,1	15,5	22,0
celresten		11,7			
monster geconcentreerd(j/n)	j	j	j	j	j
totaal aantal foto's	252	60	114	193	109
concentratie IIF-selectie(c/ml)		6	66	59	11

3.3.4 Vergelijking met referentietechnieken

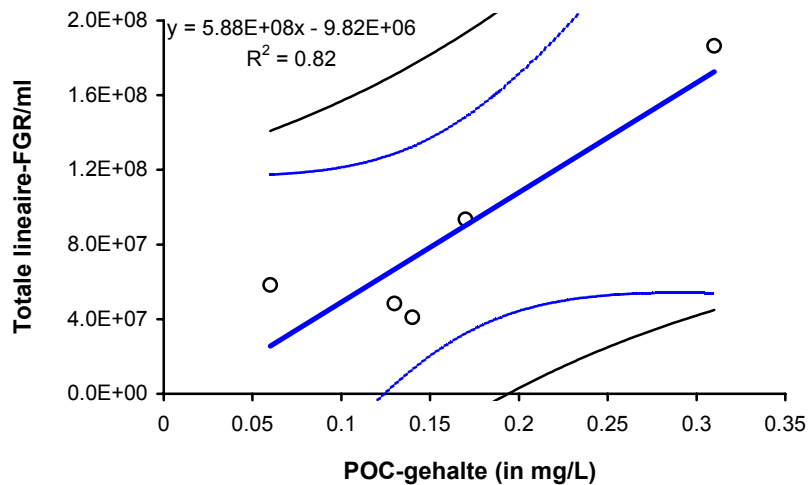
Voor de lokatie Terschelling 135 wordt goede correlatie tussen flowcytometrie linFGR/ml en chlorofyl-a met behulp van HPLC gevonden, maar geen goede correlatie tussen linFLS/ml en Particulair Organisch Koolstof (POC) ($r^2 < 0.2$). Het aantal meetpunten is erg gering om een betrouwbare correlatie te bepalen.

Lin FGR/mL versus Chlorofyl-A



FIGUUR 37 Vergelijking tussen LinFGR/mL en het gehalte aan Chlorofyl-A

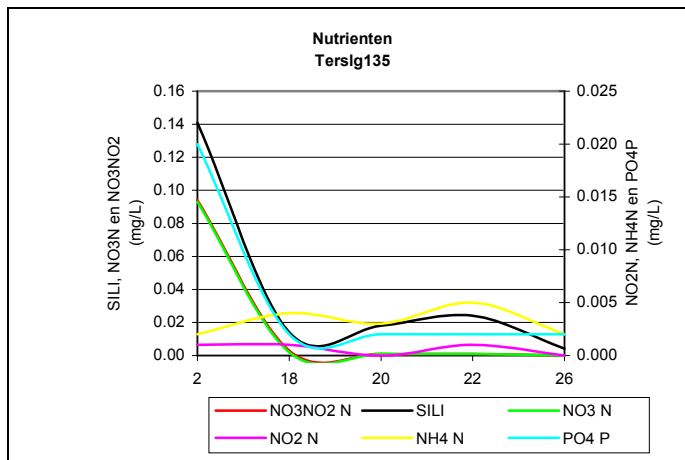
Lin FGR/mL versus POC-gehalte



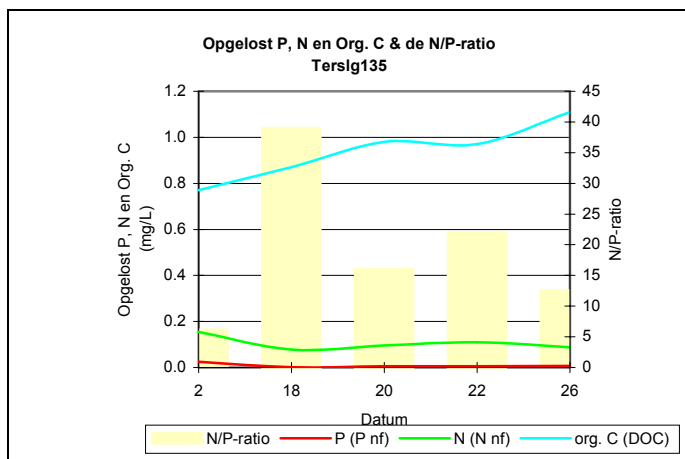
FIGUUR 38 Vergelijking tussen linFGR/mL en het POC-gehalte

3.1.5 Nutrientenverloop

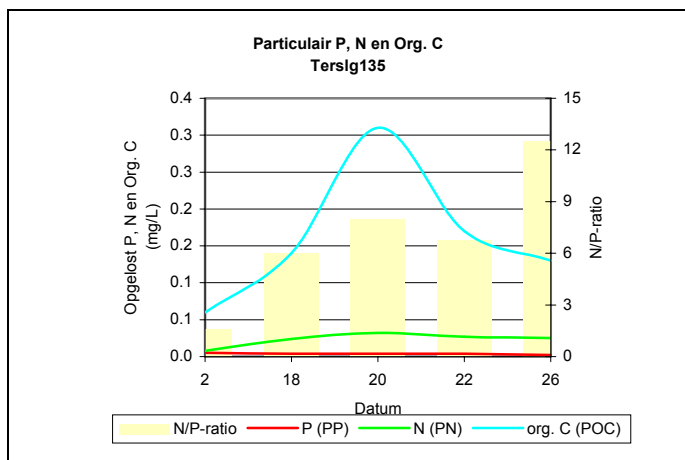
In onderstaande figuren zijn de nutriëntenconcentraties gegeven van de eerste zes maanden van 2001.



FIGUUR 39 Nutriëntenconcentraties



FIGUUR 40 Opgelost P, N en org. C



FIGUUR 41 Particulair P, N en org. C

3.4 Schaar van Ouden Doel

3.4.1 Algemene trends

De **totaalconcentratie** van autotrofe deeltjes (met chlorofyl-a) wordt gedomineerd door groottes kleiner dan 20 μm . De concentratie gedurende de eerste 6 maanden toont weinig variatie met alleen een lichte bloei midden juni (week 24) waarbij de concentratie circa driemaal hoger is dan in de eerste 5 maanden wordt waargenomen.

De **biomassa** of chlorofyl-a concentratie (linFGR/ml) blijft nagenoeg constant t/m midden mei (week 20) en neemt dan gestaag toe en wordt vooral bepaald door deeltjes in de grootteklasses tussen de 75 en 150 μm . De chlorofyl-a concentratie eind juni is ongeveer 7,5 maal hoger dan in de eerste 4 maanden van het jaar.

De **concentratie van deeltjes met fycobiliproteïnen** laat juist de hoogste concentratie zien gedurende de eerste twee maanden van het jaar, daarna is de concentratie ca een factor twee lager en wordt deze vooral gedomineerd door middelgrote deeltjes (<75 μm).

Deeltjes met **fycocyanine/chlorofyl-b** worden vooral gevonden in de kleinste grootteklasses (< 20 μm) en laten een gelijke trend zien als het totaalconcentratieverloop.

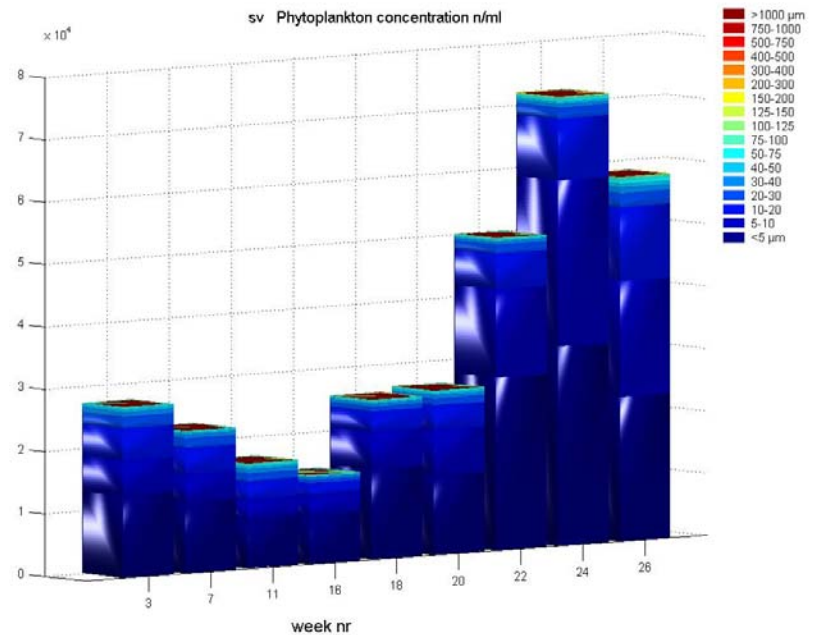
Ten opzichte van vorig jaar (2000) is de totaalconcentratie en de chlorofylconcentratie (linFGR/ml) en de grootteklasseverdeling vrijwel gelijk, maar is in 2001 de bloei van fytoplankton iets langzamer op gang gekomen. De deeltjesconcentratie van deeltjes met fycobiliproteïnen vertoont in 2001 meer dynamiek dan in 2000, maar zijn gemiddeld aan elkaar gelijk.

Imaging in flow: Over het algemeen valt op dat veel detritusdeeltjes gevonden worden op deze lokatie met een extreem in week 11, waarbij 96% van de foto's detritusvlokken waren. De detritusvlokken zijn waargenomen omdat ze chlorofylfluorescentie hebben en op deze parameter getriggerd is. Alleen in de laatste weken 24 en 26 is de detritusbijdrage lager (<13%). Visueel zijn de monsters vaak slibrijk. Opvallend aanwezig in de monsters, is de (zoetwater)soort *Scenedesmus* sp.. Er is een *Coscinodiscus* bloei in week 24, een *Chaetoceros* sp. bloei in week 22 en week 26 en een centrische diatomee-bloei in week 16 en 18. Een niet identificeerbare ketenachtige is gevonden.

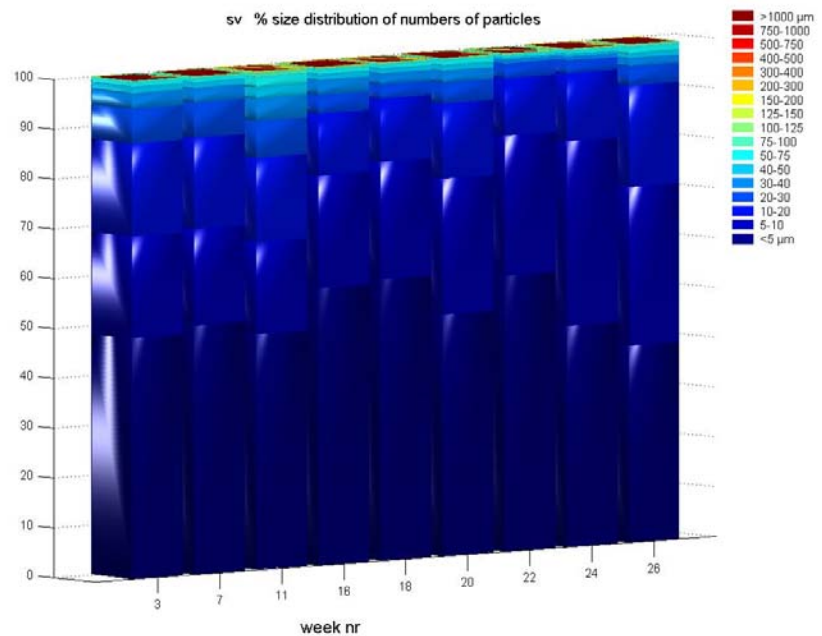
De **relatie met nutriënten** toont een aantal interessante aspecten. Er is een daling van de NH_4 -concentratie van week 11 naar week 20. Op grond van flowcytometrische gegevens is geen opvallende verandering te zien van de concentratie fytoplanktondeeltjes of biomassa. De langzaam dalende N/P-ratio van totaal opgelost N en P lijkt een tegengestelde trend te volgen met de de langzaam stijgende fytoplanktonconcentratie en de stijgende biomassaconcentratie veroorzaakt door grotere deeltjes (>50 μm). De N/P ratio piek van particulier N en P toont in week 18 een opvallende verhoogde ratiowaarde en gaat gepaard met een opvallende verhoogde biomassaconcentratie van zeer grote deeltjes (>500 μm).

3.4.2 Flowcytometrische fytoplanktonconcentraties Schaar van ouden Doel

Fytoplanktonconcentratie: De totaalconcentraties van deeltjes met chlorofyl-a zijn uitgesplitst in 16 groottefracties (deeltjes/ml.fractie) in FIGUUR 42 en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentraties van deeltjes met chlorofyl-a uitgesplitst in 16 groottefracties ($\% \text{ n.fractie/n}_{\text{totaal}}$) in FIGUUR 43.

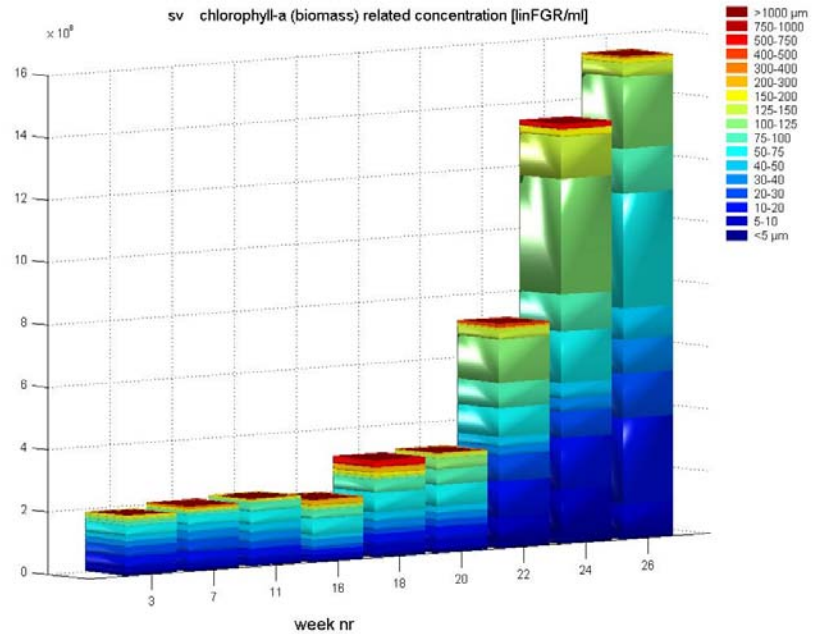


FIGUUR 42 Concentratie autotrofe deeltjes (met chlorofyl-a) per lengtefractie

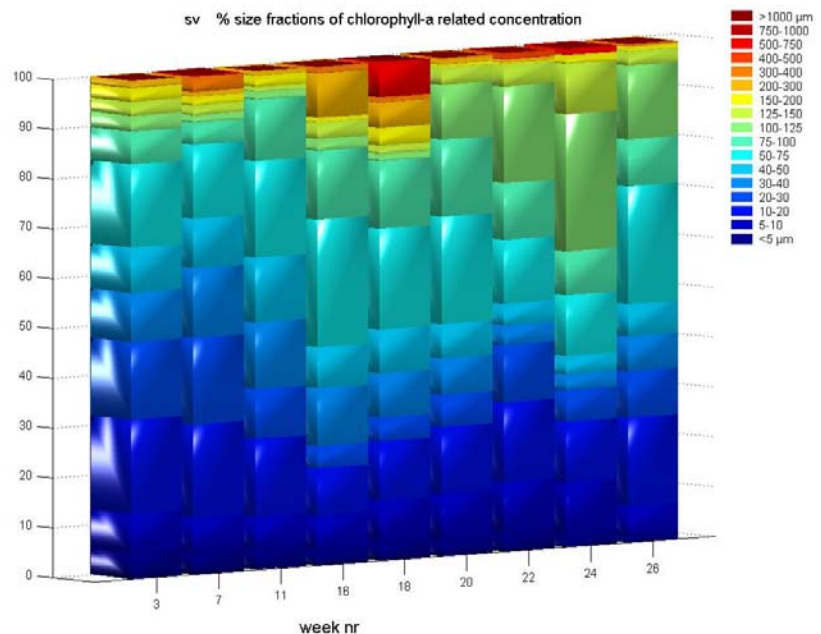


FIGUUR 43 % aantal autotrofe deeltjes met chlorofyl-a per lengtefractie

De chlorofyl-a/ml concentraties (biomassa) of flowcytometrische linFGR/ml variabele is uitgesplitst in 16 groottefracties (linFGR/ml.fractie) (FIGUUR 44) en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentratie chlorofyl-a/ml uitgesplitst in 16 groottefracties (% linFGR/ml.fractie/totaal-linFGR/ml) in FIGUUR 45.

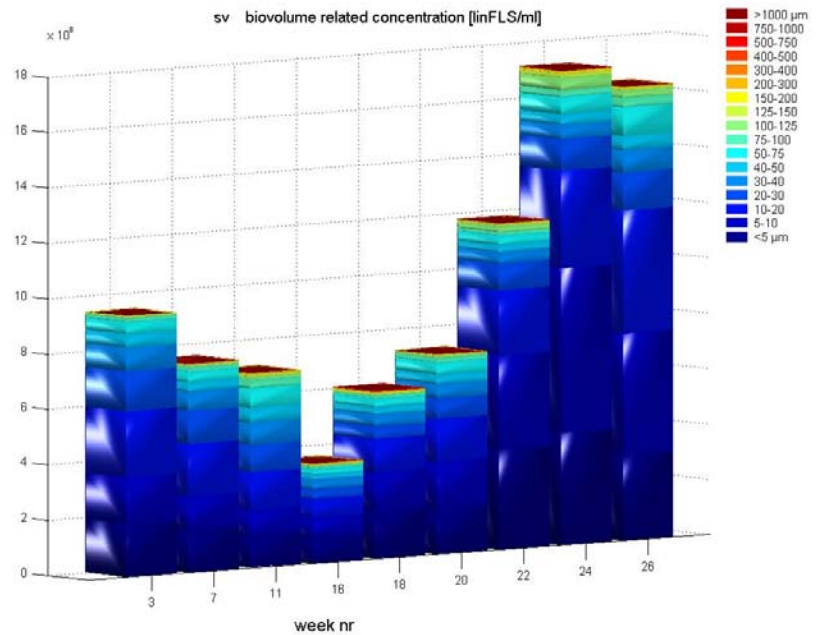


FIGUUR 44 totale LinFGR/mL (chlorofyl-a/ml) per lengtefractie

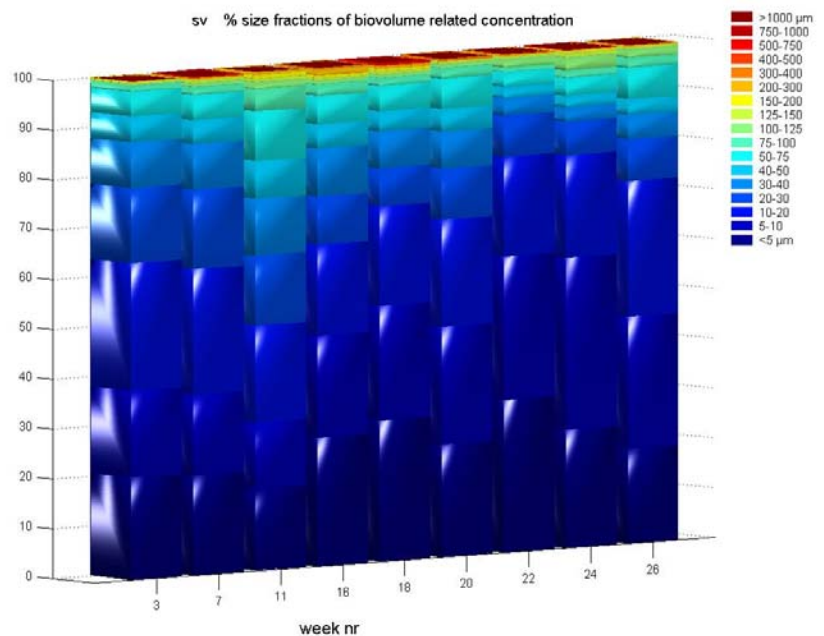


FIGUUR 45 % LinFGR/ml per lengtefractie Schaar van Oude Doel

De biovolumeconcentraties (van deeltjes met chlorofyl-a)/ml uitgesplitst in 16 groottefracties (linFLS/ml.fractie) is weergegeven in FIGUUR 46 en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentratie biovolume/ml uitgesplitst in 16 groottefracties (% linFLS/ml.fractie/totaal-linFLS/ml) in FIGUUR 47.

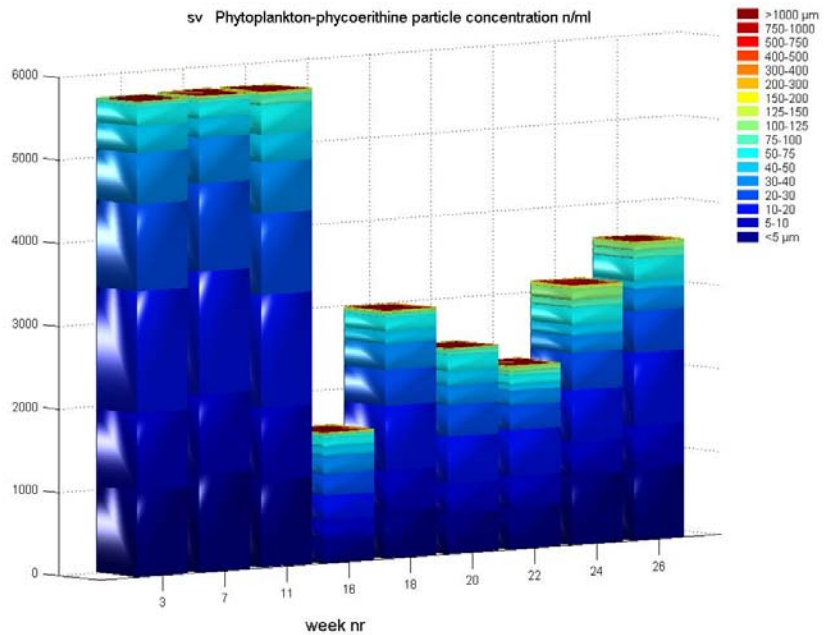


FIGUUR 46 totale LinFLS/ml per lengtefractie Schaar van Oude Doel

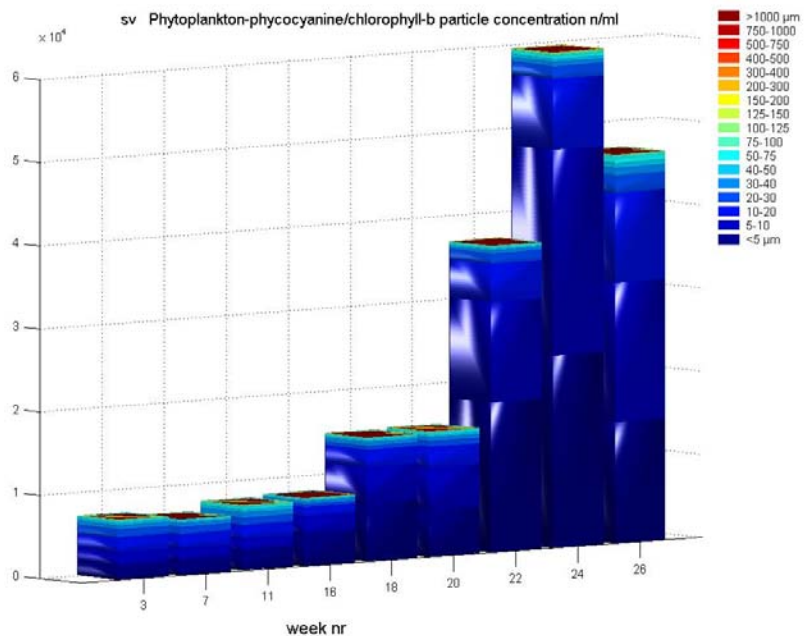


FIGUUR 47 % LinFLS/ml per lengtefractie Schaar van Oude Doel

De concentraties van deeltjes met chlorofyl-a EN **fycobilliproteinen** uitgesplitst in 16 groottefracties ($n_{(FGR>0 \& FGO>0)}$ /ml.fractie) is gepresenteerd in FIGUUR 48 en de absolute concentratie deeltjes met met chlorofyl-a EN **fycocyanine en chlorofyl-b** uitgesplitst in FIGUUR 49.



FIGUUR 48 absolute deeltjesconcentratie van deeltjes met FGR & FGO



FIGUUR 49 absolute deeltjesconcentratie van deeltjes met FGR & FRR

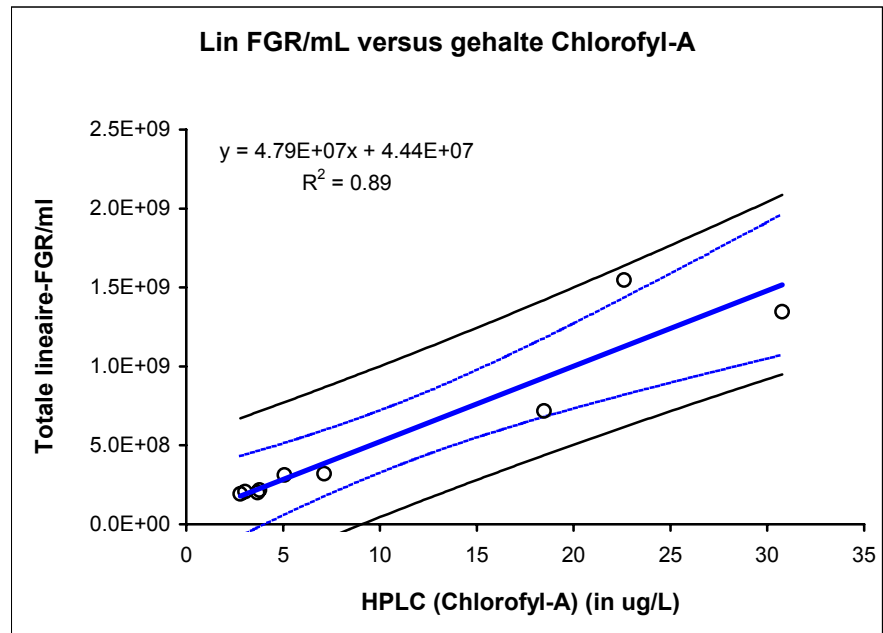
3.4.3 Imaging in flow en snelle microscopie

In onderstaande tabel zijn de resultaten van de digitale foto-opnames van de imaging in flow. De tabel toont de percentages van de gevonden soorten, die digitaal gefotografeerd zijn in de vaste flowcytometrische selectie vanaf een bepaalde grootte en pigmentinhoud.

SCHAARVOD - 2001 % IIF-foto's	Week no.								
Algensoort	3	7	11	16	18	20	22	24	26
Asterionella sp.				2,6	2,1	0,5	0,4	1,9	
Baccilaria paradoxa	0,6								
Cerataulina sp.					0,6	0,5			
Centr. diatomee				18,0	8,2				
Coscinodiscus sp.	0,6	1,3		1,3	4,2	13,0	1,5	31,6	12,1
Chaetoceros sp.				0,4	0,3	5,1	14,0	8,1	37,2
Ditylum brightwellii					0,3	0,3	0,4		
Eucampia zoodiacus					0,3				
Fragilaria sp.					0,6		0,4		
keten	9,0	7,1		4,8	3,9	0,8	0,4		0,9
Nitzschia sp.		0,9							
Paralia marina	1,2	1,8		1,3	0,9	1,6		1,0	
Pediastrum sp.				0,4	1,2	0,8			
Pseudonitzschia sp.		0,9		1,8					
Rhizosolenia delicatula					0,6	0,3			
Rhodomonas	1,8				0,3				
Scenedesmus sp.	6	17,4	0,5	9,6	9,1	6,0	7,0	7,2	2,6
Skeletonema costatum						0,8	0,4	0,5	
Thalassionema sp.					0,3	0,3		0,5	0,9
Detritus	56	28,1	96,1	27,6	41,2	27,1	36,2	12,9	13
cel indet	24,7	42,4	2,9	32,0	29,7	43,6	39,9	36,4	34,2
monster geconcentreerd(j/n)	n	j	n	j	j	j	j	j	j
totaal aantal foto's	166	224	205	228	330	369	271	209	231
concentratie IIF-selectie(c/ml)					71	91	437	333	307

3.4.4 Vergelijking met referentietechnieken

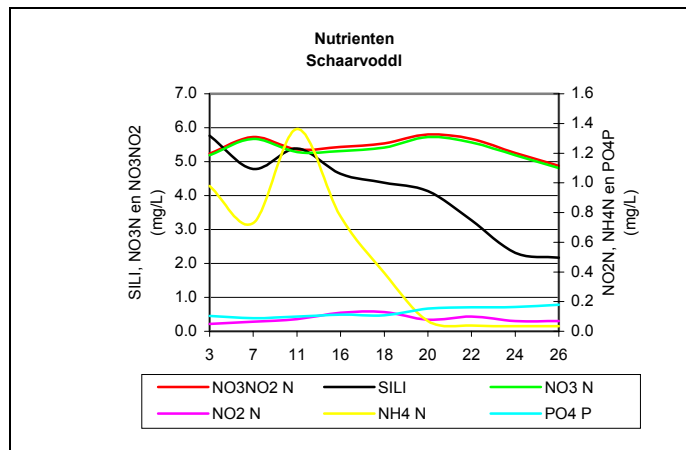
De relatie tussen flowcytometrie linFGR/ml en chlorofyl-a HPLC is weergegeven in onderstaande figuur. Tussen linFGR/ml of linFLS/ml en POC is net als in 2000 geen correlatie gevonden ($r^2 < 0.3$).



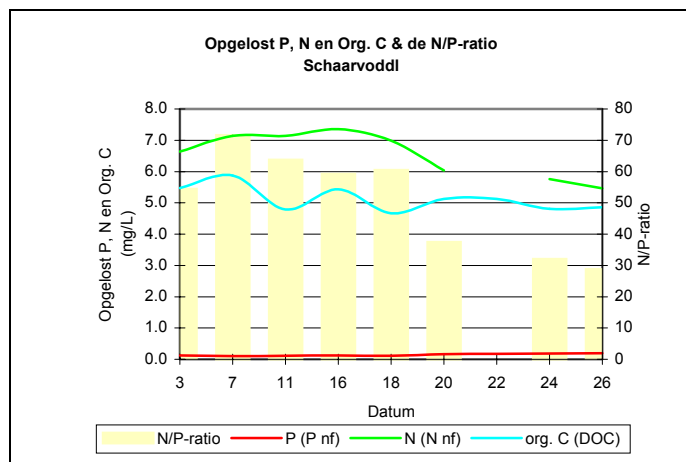
FIGUUR 50 Vergelijking tussen LinFGR/mL en het gehalte aan Chlorofyl-A

3.4.5 Nutriëntenverloop

In onderstaande figuren zijn de nutriëntenconcentraties weergegeven.

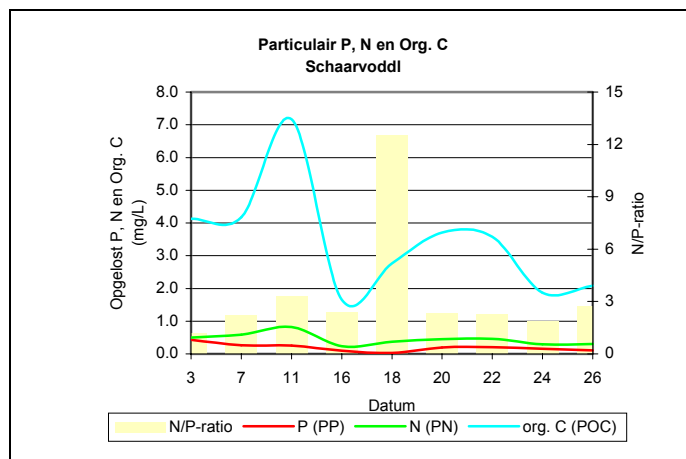


FIGUUR 51 Nutriëntenconcentraties



(opm: de analyse van N(N nf) in week 22 is mislukt (code -888))

FIGUUR 52 Opgelost P, N en org. C



FIGUUR 53 Particulair P, N en organisch C

5.6 Vlissingen

5.5.1 Algemene trends

De **concentratie autotrofe deeltjes** vertoont een grillig verloop, zonder echte bloeipieken met waarden die schommelen tussen ca 8000 deeltjes/ml midden juni en 35000 deeltjes/ml in de eerste week van mei. De concentratie wordt gedomineerd door kleine deeltjes ($< 50 \mu\text{m}$). Het deeltjesconcentratieverloop wijkt duidelijk af van het concentratieverloop bij Schaar van ouden Doel.

De **biomassa** (chlorofyl-a/ml of linFGR/ml) kent een sterke stijging (factor 10 toename tot $4,5 \times 10^9$ /ml) in de eerste week van mei vooral veroorzaakt door deeltjes groter dan $30 \mu\text{m}$ met een opvallende bijdrage van deeltjes in de fractie $> 750 \mu\text{m}$. In de periode mei t/m juni schommelt de linFGR-waarde rond de $2,5 \times 10^9$ /ml en neemt deze eind juni plotseling af naar ca $0,3 \times 10^9$ /ml. Dit is het gevolg van het wegvallen van deeltjes in de fractie $> 40 \mu\text{m}$.

Het **biovolume**verloop vertoont een gelijke trend als het totaal deeltjesconcentratie-verloop.

De concentratie van **deeltjes met fycoerithrine** fluctueert tot en met medio maart rond de 5000/ml, vervolgens is tot midden juni een concentratie van ca 2000/ml aanwezig en is er een duidelijke bloei eind juni veroorzaakt door vooral kleine deeltjes ($< 5 \mu\text{m}$) van 12000/ml. Ten opzichte van vorig jaar (2000) valt op dat de concentraties autotrofe deeltjes in 2001 hoger zijn, maar dat de uitschieter vorig jaar in juni (bijna 40000/ml) nu niet in dezelfde periode heeft plaats gevonden. Wel wordt begin mei een bloeipiek (ca 35000/ml) waargenomen en in 2000 begin april (ca 20000/ml).

De biomassatoename in 2000 vond 3 weken later plaats gedurende een kortere periode (2 weken) vergeleken met 2001 (5 weken). Beiden werden vooral bepaald door grotere deeltjes ($> 150 \mu\text{m}$).

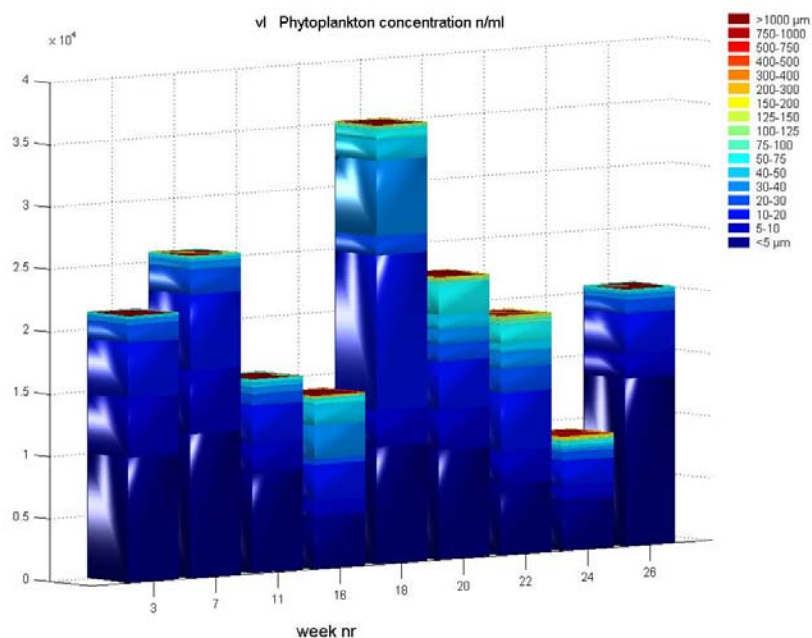
Voor deeltjes met fycoerithrine, Cryptophyceae, lijkt de concentratietrend van 2000 en 2001 hetzelfde. In het begin van het jaar wat hogere concentraties, vervolgens tot begin juni lagere concentraties met eind juni een sterke toename van kleine deeltjes tot een concentratie van ca 12000/ml (beide jaren).

Imaging in flow: Vlissingen is een lokatie met relatief hoge concentraties detritus vooral in weken 3, 7, 11 (begin van het jaar) en week 26. Een langere periode met hogere concentraties Chaetoceros sp. deeltjes wordt gevonden van week 16 tot en met 22. Er zijn tweemaal bloeien van Rhizosolenia delicatula. Ook werd een bloei van Rhizosolenia shrubsoleii waargenomen. In week 26 werd een lichte toename van Rhodomas cellen waargenomen. De categorie celindet, minder duidelijk te definiëren cellen, neemt in percentage toe gedurende het eerste halve jaar.

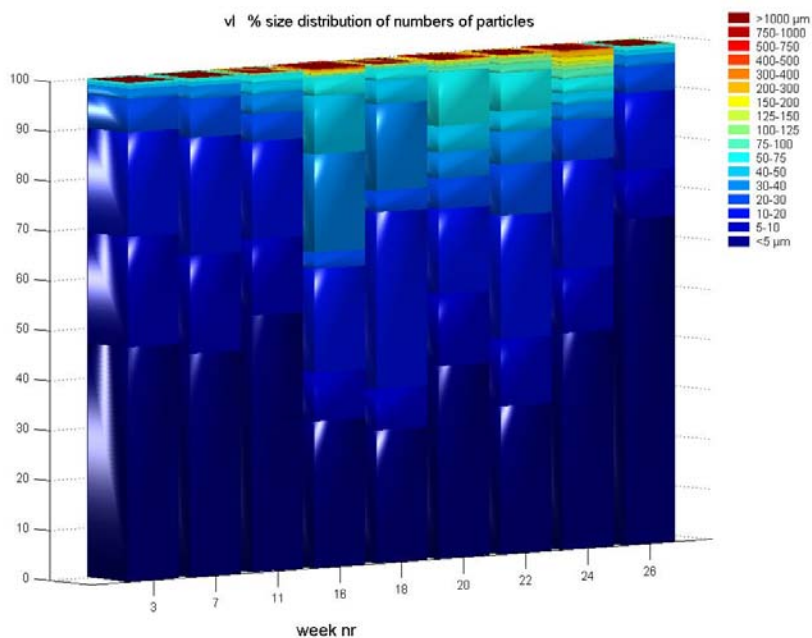
De **relatie met nutriënten** toont een daling van ammonium en silicaat vanaf week 7 tot week 16 voor ammonium en tot week 20 voor silicaat. In dezelfde periode volgt uit flowcytometrische analyses een toename van de chlorofyl-a concentratie of biomassa van met name middelgrote deeltjes. Vanaf week 16 gaat de toename van de N/P-ratio (opgelost) gepaard met een biomassatoename van zeer grote deeltjes. Een gelijke trend wordt gevonden voor opgelost organisch koolstof (DOC) en de totaal concentratie fytoplankton-deeltjes.

3.5.2 Flowcytometrische fytoplanktonconcentraties Vlissingen

Fytoplanktonconcentratie: De totaalconcentraties van deeltjes met chlorofyl-a zijn uitgesplitst in 16 groottefracties (deeltjes/ml.fractie) in FIGUUR 54 en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentraties van deeltjes met chlorofyl-a uitgesplitst in 16 groottefracties ($\% \text{ n.fractie}/\text{n}_{\text{totaal}}$) in FIGUUR 55.



FIGUUR 54 Concentratie autotrofe deeltjes (met chlorofyl-a)



FIGUUR 55 % aantal autotrofe deeltjes met chlorofyl-a

De **chlorofyl-a/ml concentraties** (biomassa) of flowcytometrische linFGR/ml variabele is uitgesplitst in 16 groottefracties (linFGR/ml.fractie) (FIGUUR 56) en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentratie chlorofyl-a/ml uitgesplitst in 16 groottefracties (% linFGR/ml.fractie/totaal-linFGR/ml) in FIGUUR 57.

FIGUUR 56 totale LinFGR/mL (chlorofyl-a/m l) per lengtefractie Vlissingen

FIGUUR 57 % LinFGR/ml per lengtefractie Vlissingen

De **biovolumeconcentraties** (van deeltjes met chlorofyl-a)/ml uitgesplitst in 16 groottefracties (linFLS/ml.fractie) is weergegeven in FIGUUR 58 en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentratie biovolume/ml uitgesplitst in 16 groottefracties (% linFLS/ml.fractie/totaal-linFLS/ml) in FIGUUR 59.

FIGUUR 58 totale LinFLS/ml per lengtefractie Vlissingen

FIGUUR 59 % LinFLS/ml per lengtefractie Vlissingen

De concentraties van deeltjes met chlorofyl-a ÈN **fycobilliproteinen** uitgesplitst in 16 groottefracties ($n_{(FGR>0 \& FGO>0)}$ /ml.fractie) is gepresenteerd in FIGUUR 60 en concentraties van deeltjes met chlorofyl-a ÈN **fycocyaninen en chlorofyl-b** in FIGUUR 61.

FIGUUR 60 absolute deeltjesconcentratie van deeltjes met FGR & FGO

FIGUUR 61 absolute deeltjesconcentratie van deeltjes met FGR & FRR

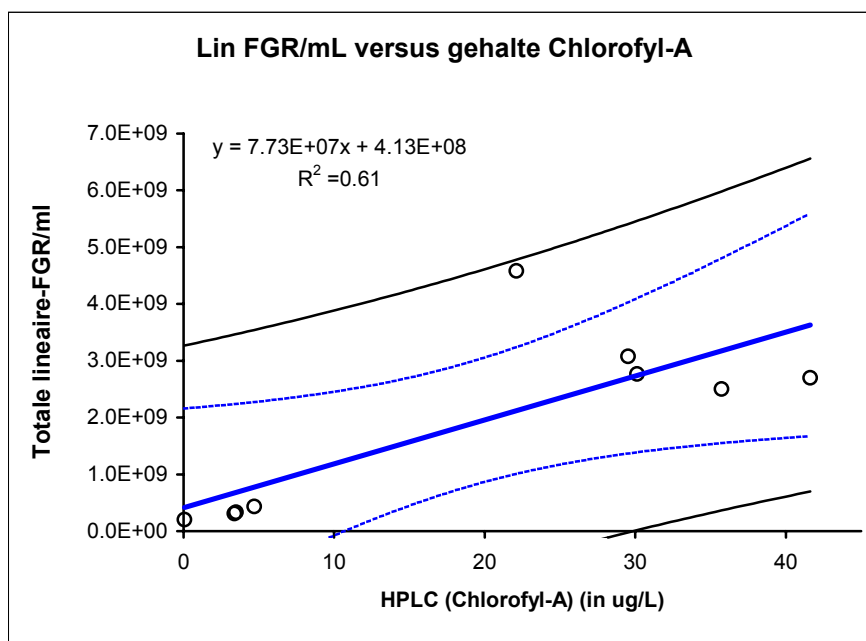
3.4.4 Imaging in flow en snelle microscopie

In onderstaande tabel zijn de resultaten van de digitale foto-opnames van de imaging in flow verwerkt, waarbij de percentages van de gevonden soorten, die digitaal gefotografeerd zijn met een vaste flowcytometrische selectie, gegeven zijn.

VLISSGBISSVH - 2001	Week no.								
% IIF-foto's									
Algensoort	3	7	11	16	18	20	22	24	26
Asterionella sp.					1,2		8,7	1,0	2,8
Cerataulina sp.				8,4	49,4	17,8			
Chaetoceros sp.		2,3	6,4	43,0	28,7	57,6	48,4		1,7
Ditylum brightwellii	0,5								
keten		3,9	1,1				0,5	2,0	
cf Leptocylindricus danicus							0,5	2,6	
Nitzschia sp.	0,5	2,8							
Phaeocystis kolonie				0,6		0,4			
Pseudonitzschia sp.									
Rhizosolenia delicatula				20,7			0,5	40,8	
Rhizosolenia shrubsolei				8,4	1,2		1,4	3,6	
Rhizosolenia stolterfothii		0,6						3,1	
Rhodomonas	1,5	0,6						2,0	6,1
Scenedesmus sp.									
Schroederella schroederi	0,5								
Thalassionema sp.		0,6				1,7	0,5		
Thalassiosira sp.	1,94			0,6	2,3	0,4			
Detritus	78,6	75,3	89,4	8,4	4,6	8,5	9,6	10,2	42,0
cel indet	16,5	14,0	3,2	10,1	12,6	13,1	29,7	34,7	47,5
monster geconcentreerd(j/n)	n	j	n	j	j	j	n	n	n
totaal aantal foto's	206	178	94	179	87	236	219	196	181
concentratie IIF-selectie(c/ml)				852	518	1034	2692	975	288

3.4.4 Vergelijking met referentietechnieken

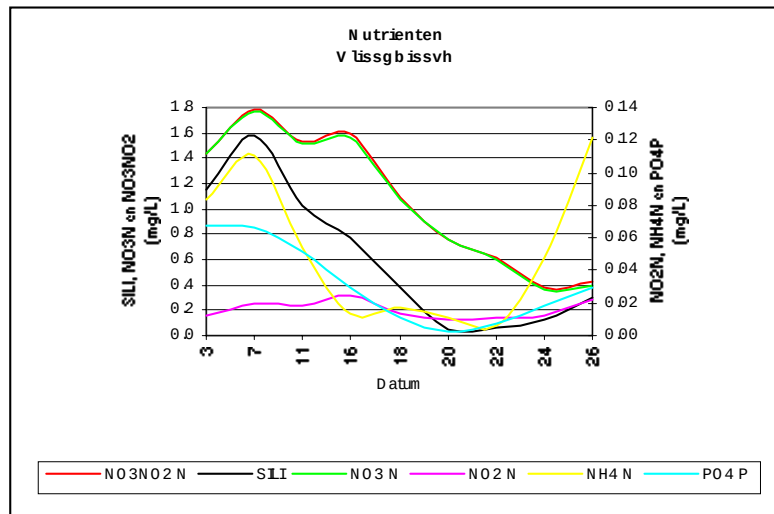
De relatie tussen flowcytometrie linFGR/ml en chlorofyl-a HPLC is weergegeven in onderstaande figuur. Zoals ook bij de andere lokatie op de Westerschelde (Schaarvodd) is er bij deze lokatie net als in 2000 geen correlatie aanwezig tussen het POC-gehalte en een flowcytometrische parameter ($r^2 < 0.1$).



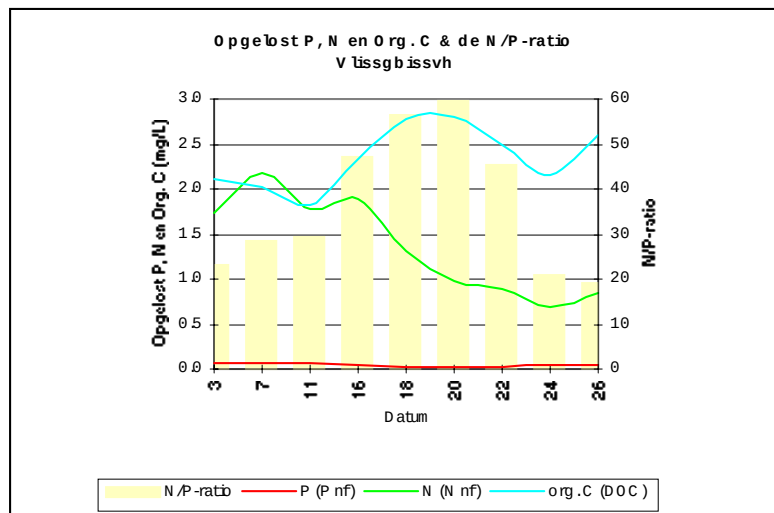
FIGUUR 62 Vergelijking tussen de Lin FGR/mL en het gehalte aan Chlorofyl-A.

3.4.5 Nutriëntenverloop

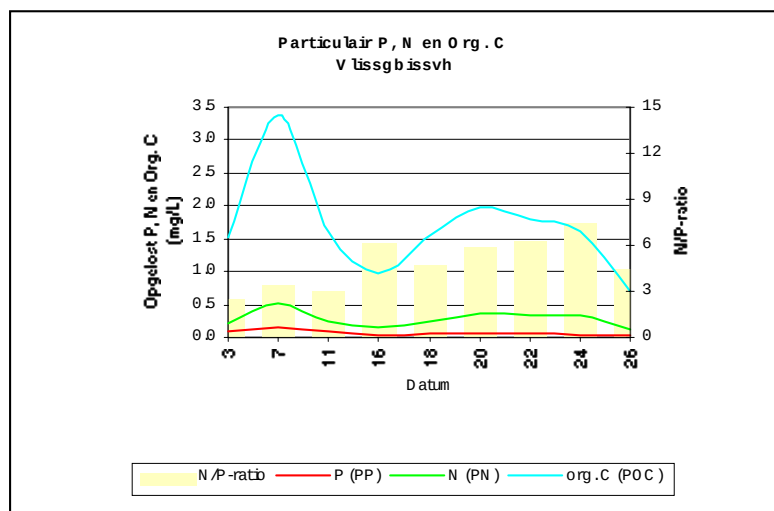
In onderstaande figuren zijn de nutriëntenconcentraties weergegeven



FIGUUR 63 Nutriëntconcentraties



FIGUUR 64 Opgeloste P, N en org. C



FIGUUR 65 Particulare P, N en org. C

3.6 Zijpe

3.6.1 Algemene trends

De **totaalconcentratie** autotrofe deeltjes heeft een lichte bloei (ca 12000/ml) van kleine deeltjes ($< 5\mu\text{m}$) in de tweede helft van maart, gevolgd door een grillig verloop van een verhoogde concentratie (ca 20000/ml). Eind april en in mei zijn er relatief wat grotere deeltjes die significant bijdragen aan de totaalconcentratie.

De **chlorofyl-a concentratie** of biomassa neemt toe in de tweede week van april met een maximum in de laatste week van april (ca $2,5 \times 10^9$ /ml). Vervolgens vertoont de biomassa een afname van ca 20-30% met een grillig verloop tot en met de eerste week van juni. Hierna daalt de chlorofyl-a concentratie in de derde week van juni met 75% ten opzichte van de maximum concentratie.

Voor het **biovolume** (linFLS/ml) is een vergelijkbare trend waarneembaar als het totaalconcentratieverloop, maar komt de bijdrage van grotere deeltjes duidelijker naar voren.

De concentratie van **deeltjes met fycoerithrine** schommelt tot medio mei rond een waarde van 1000/ml en neemt de tweede helft van mei iets toe naar 2000/ml, veroorzaakt door vooral wat grotere deeltjes ($40\text{--}75\mu\text{m}$). Vervolgens vindt een snelle toename plaats van vooral kleine deeltjes ($< 20\mu\text{m}$) naar ca 15000/ml.

Het **totaalconcentratie (autotroof)** verloop in 2000 wijkt af van 2001. De hogere concentratiewaarden in het eerste halve jaar liggen in beide jaren rond de 20000-30000/ml.

De biomassatoename (chlorofyl-a/ml) start in 2001 een maand eerder dan in 2000 en duurt in 2001 ook iets langer. Het maximum van de chlorofyl-a concentratie in het eerste halve jaar is voor beide jaargangen nauwelijks afwijkend (globaal rond de $2,5 \times 10^9$ au/ml). De absolute concentraties van deeltjes met fycoerithrine in 2001 verschilt t.o.v. 2000. De (lichte) bloeipiek die in beide jaren medio mei optrad is in 2001 een factor 3,5 lager dan in 2000. De bloeipiek eind juni in 2001 is iets hoger (factor 1,5) dan dezelfde bloeipiek in 2000.

Imaging in flow: Uit de imaging in flow opnames worden diverse bloeiperiodes van soorten onderscheiden. *Cerataulina* sp. neemt toe vanaf week 15 met een relatieve hoge bijdrage in week 19 (58%), *Chaetoceros* sp. is gevonden vanaf week 11 met hoge bijdragen in de weken 13 (76%), 15 (59%) en in week 20 t/m 25 (75, 34, 54%). Hoge percentages van *Rhizosolenia* del. en *R. shrub.* zijn gevonden in week 17 en week 23. *Skeletonema costatum* is aangetroffen in week 7, 11 en 13. De relatieve bijdragen van detritus zijn met name hoog in weken 2, 7 en 11.

De **correlatie** tussen linFGR/ml (FCM) en chlorofyl-a (HPLC) is matig tot redelijk ($r^2=0,62$) wat vooral veroorzaakt wordt door twee uitbijters. De correlatie tussen POC en linFGR/ml en linFLS/ml is goed ($r^2=0,9$ en $0,85$), dit in tegenstelling tot de lokaties Schaar van Ouden Doel en Vlissingen. Waarschijnlijk wordt een betere correlatie gevonden in helder water.

Een deel van de **nutriënten** (NH_4 , SiO_4 , PO_4) neemt vanaf januari direct af en het overige deel vanaf week 13 ($\text{NO}_3\text{NO}_2\text{N}$, NO_3). Opvallend is de gelijke trend tussen het opgelost koolstof (DOC) verloop en het totaal

fytoplanktonconcentratieverloop. Het maximum in de N/P ratio (opgelost) in week 17 valt samen met een maximum in het biomassamaximum.

3.6.2 Flowcytometrische fytoplanktonconcentraties Zijpe

Fytoplanktonconcentratie: De totaalconcentraties van deeltjes met chlorofyl-a zijn uitgesplitst in 16 groottefracties (deeltjes/ml.fractie) in FIGUUR 66 en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentraties van deeltjes met chlorofyl-a uitgesplitst in 16 groottefracties ($\% \text{ n.fractie}/n_{\text{totaal}}$) in FIGUUR 67.

FIGUUR 66 Concentratie autotrofe deeltjes (met chlorofyl-a) per lengtefractie

FIGUUR 67 % aantal autotrofe deeltjes met chlorofyl-a per lengtefractie

De **chlorofyl-a/ml concentraties** (biomassa) of flowcytometrische linFGR/ml variabele is uitgesplitst in 16 groottefracties (linFGR/ml.fractie) (FIGUUR 68) en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentratie chlorofyl-a/ml uitgesplitst in 16 groottefracties (% linFGR/ml.fractie/totaal-linFGR/ml) in FIGUUR 69.

FIGUUR 68 totale LinFGR/mL (chlorofyl-a/m l) per lengtefractie Zijpe

FIGUUR 69 % LinFGR/ml per lengtefractie Zijpe

De **biovolumeconcentraties** (van deeltjes met chlorofyl-a)/ml uitgesplitst in 16 groottefracties (linFLS/ml.fractie) is weergegeven in FIGUUR 70 en de percentuele bijdrage per fractie aan de totaalconcentratie biovolume/ml uitgesplitst in 16 groottefracties (% linFLS/ml.fractie/totaal-linFLS/ml) in FIGUUR 71.

FIGUUR 70 totale LinFLS/ml per lengtefractie

FIGUUR 71 % LinFLS/ml per lengtefractie

De concentraties van deeltjes met chlorofyl-a ÈN **fycobilliproteinen** uitgesplitst in 16 groottefracties ($n_{(FGR>0 \& FGO>0)}$ /ml.fractie) is gepresenteerd in FIGUUR 72 en concentraties van deeltjes met chlorofyl-a ÈN **fycocyaninen en chlorofyl-b** in FIGUUR 73.

FIGUUR 72 absolute deeltjesconcentratie van deeltjes met FGR & FGO

FIGUUR 73 absolute deeltjesconcentratie van deeltjes met FGR & FGR

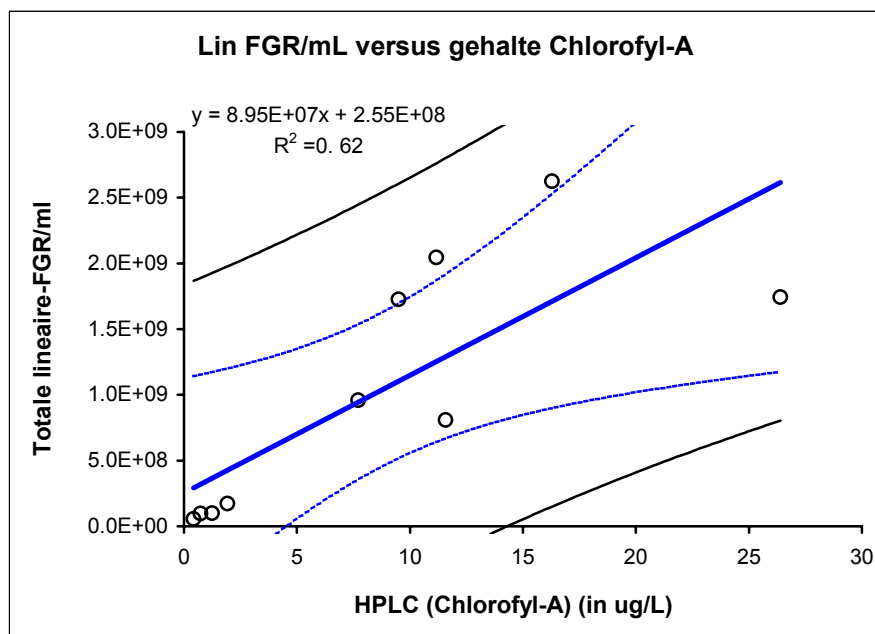
3.6.3 Imaging in flow en snelle microscopie

In onderstaande tabel worden de resultaten van de digitale foto-opnames van de imaging in flow getoond. De percentages van de gevonden soorten, die digitaal gefotografeerd zijn in de vaste flowcytometrische selectie zijn gegeven.

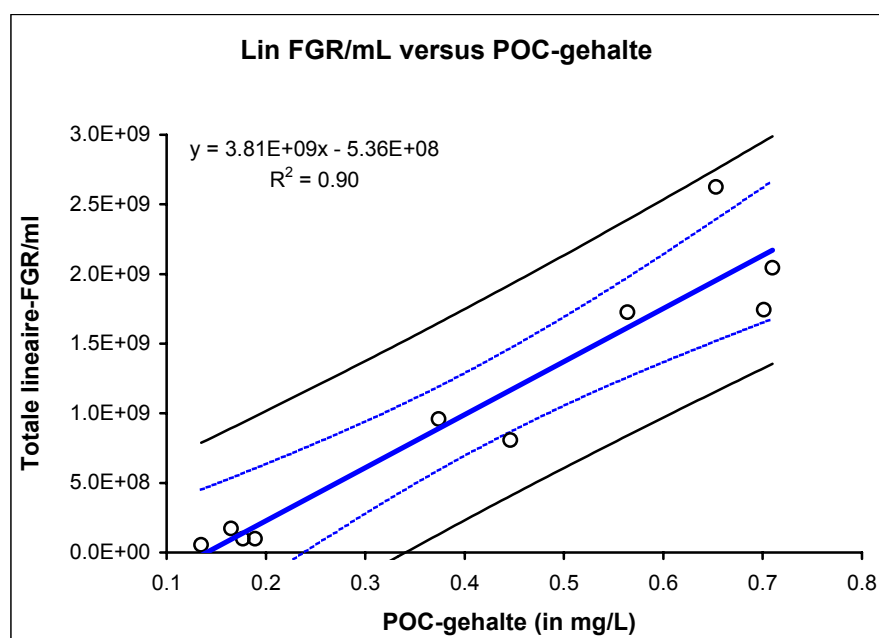
ZIJPE - 2001	Week no.									
% IIF-foto's										
Algensoort	2	7	11	13	15	17	19	20	23	25
Asterionella sp.			0,4	0,9					1,0	1,2
Cerataulina sp.					8,3	14,4	58,9	2,4	2,4	
Centr. diatomee			13,7	2,7	0,5					
Ovale diatomee			7,3							
Chaetoceros sp.			7,3	76,1	58,8	7,8	15,8	77,0	34,9	54,0
Ditylum brightwellii				0,9	1,4	0,6	1,2	0,5	9,6	
Eucampia zoodiacus									2,4	0,6
Nitzschia sp.		3,8	1,2			0,6				
Pseudonitzschia sp.							2,1		7,2	
Rhizosolenia delicatula					10,7	29,9	0,4		12,4	
Rhizosolenia shrubsolei				0,9	6,5	22,8	0,4		0,5	
Rhizosolenia stolterfothii									1,0	3,4
Rhodomonas	24,4	17,2	4,4	1,8		0,6			0,5	
Scenedesmus sp.		0,6								
Schroederella schroederi			0,4							
Scripsiella sp.										4,6
Skeletonema costatum		0,6	10,0	3,5						
Thalassionema sp.			1,2							
Thalassiosira sp.	0,6	0,6	1,2	0,9		1,8			1,44	
Detritus	58,3	47,1	18,5	1,8	3,2	4,2	1,7	1,0	4,8	9,2
cel indet	16,7	26,8	27,0	10,6	9,7	12,0	15,4	18,2	19,6	26,4
onduidelijk		3,2	7,3		0,5			1,4	2,4	
celresten						5,4	4,2			
monster geconcentreerd(j/n)	n	n	n	n	j	j	j	j	j	j
totaal aantal foto's	156	157	248	113	216	167	241	209	209	174
concentratie IIF-selectie(c/ml)						367	239	1162	705	121

3.6.4 Vergelijking met referentietechnieken

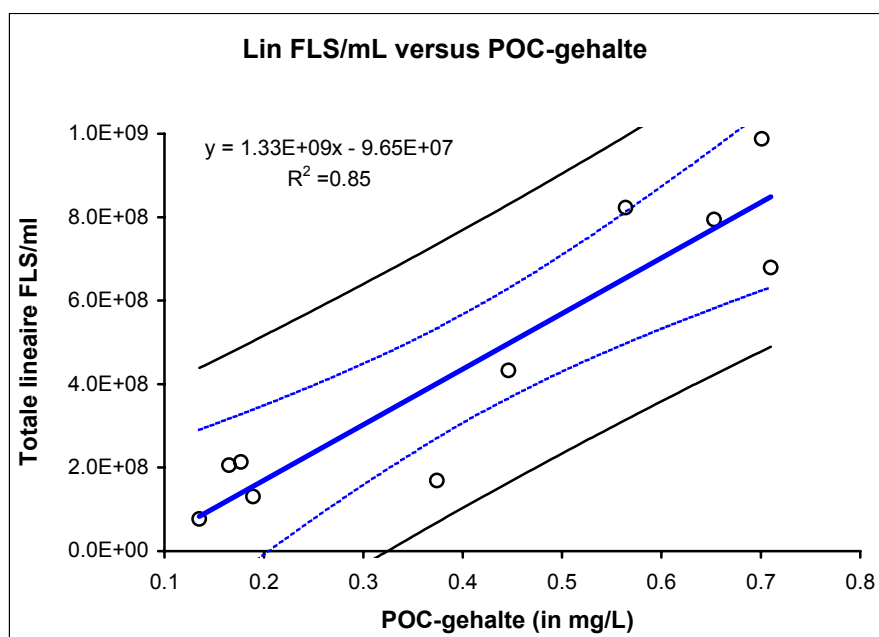
De relatie tussen flowcytometrie linFGR/ml en chlorofyl-a HPLC en de relatie tussen linFGR/ml of linFLS/ml en POC.



FIGUUR 74 Vergelijking tussen LinFGR/mL en het gehalte aan Chlorofyl-A



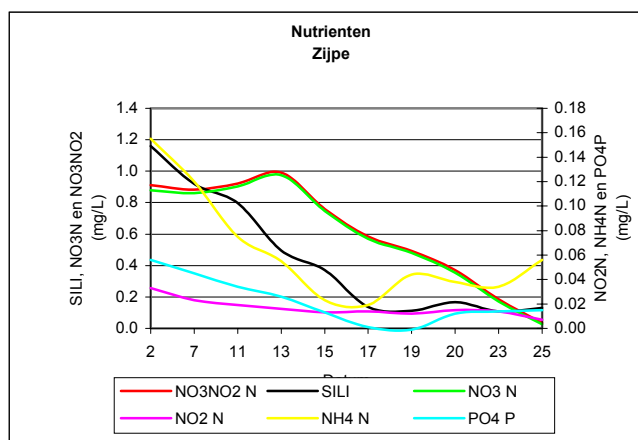
FIGUUR 75 Vergelijking tussen linFGR/mL en het POC-gehalte



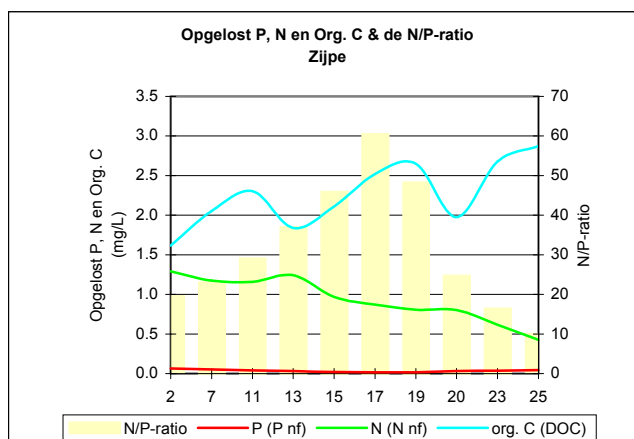
FIGUUR 76 Vergelijking tussen linFLS/mL en het POC-gehalte.

3.6.5 Nutriëntenverloop

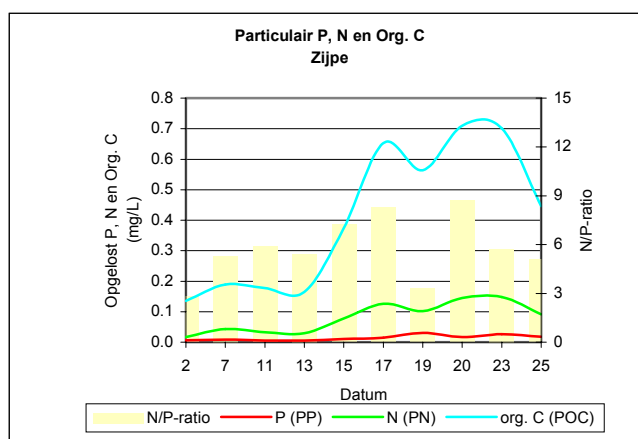
In onderstaande figuren zijn de nutriëntenconcentraties weergegeven over de eerste zes maanden van 2001.



FIGUUR 77 nutriëntenconcentraties



FIGUUR 78 Opgelost P, N en org. C balans



FIGUUR 79 Particulair P, N en organisch C

4. Discussie

De uitwerking van flowcytometrische resultaten opgesplitst in 17 groottefracties voor de totale concentratie autotrofe deeltjes, biomassa en overige gegevens laat zien dat een goede indruk gekregen kan worden over de dynamica van het fytoplankton op diverse lokaties, maar ook tussen de onderzochte jaren 2001 en 2000. Bloeien in aantallen of in biomassa veroorzaakt door bepaalde groottefracties kunnen duidelijk worden waargenomen. Een bloei van deeltjes met hoge aantallen gaat niet per definitie gepaard met een opvallende biomassastijging. Vooral voor kleine deeltjes (<10 µm) blijkt dit het geval.

Een biomassawaarde geïntegreerd in tijd levert mogelijk een tussen jaargangen goed te vergelijken biomassagetel op. Getallen uitgedrukt in dit totale tijdsgeïntegreerde biomassa en totale concentratie autotrofe deeltjes gemeten per jaargang zou dan inzicht kunnen geven in vragen over de ontwikkelingen in het totale fytoplankton gedurende diverse jaargangen. Een voorbeeld hiervan wordt in het grijze kader op de volgende bladzijde toegelicht voor de lokatie Noordwijk 10. Randvoorwaarde voor lange termijn vergelijkingen tussen jaargangen is dat (aantoonbaar) reproduceerbaar gemeten moet kunnen worden. Bij flowcytometrie is een goede reproduceerbaarheid van de analyse gegarandeerd, omdat gebruik gemaakt wordt van referentiemateriaal en standaarden, zoals voor MWTL-analyses sinds jaren wordt toegepast. De flowcytometrische techniek heeft aangetoond een bruikbaar instrument te zijn voor het volgen en vergelijken van algemene fytoplankton trends.

Met behulp van flowcytometrie is de voorjaars Phaeocystis-bloei op Noordwijk 10 in 2001 waargenomen, die als duidelijk cluster onderscheiden kon worden ten opzichte van de andere fytoplanktonsoorten. Deze Phaeocystis bloei is niet geconstateerd op lokaties in 2000. Voor andere lokaties is dit in deze verwerking niet bekeken.

Verschil (FCM en Microscopie) in aantallen

De concentratie autotrofe deeltjes gemeten met flowcytometrie bestaat uit alle deeltjes met chlorofyl-a fluorescentie in het groottebereik van ca 0,5 tot 1000 µm, die als één deeltje of aanéengesloten combinatie van deeltjes (keten, kolonie, wolk) de lasers passeren. Ketens, kolonies bestaande uit meerdere losse fytoplanktoncellen worden als één (groter) deeltje geteld. Ten opzichte van microscopie kunnen aantallen deeltjes van ketenvormige en kolonievormende cellen om deze reden verschillen in aantal. Verder valt op dat regelmatig detrituswolken met chlorofyl-a fluorescentie worden waargenomen, veroorzaakt door insluitingen van fytoplanktoncellen. Vooral in de eerste maanden van het jaar worden relatief hoge percentage detritus met chlorofyl-a waargenomen. Microscopisch worden deze deeltjes bij tellingen genegeerd, bij flowcytometrie worden ze wel meegeteld. Verder is bekend dat sommige planktonsoorten door chemische fixatie ineen schrompelen en dus niet bij de microscopische telling herkend of geteld worden. Daarnaast is de microscopische telling van fytoplanktondeeltjes kleiner dan 5 µm nauwelijks mogelijk. Deze punten kunnen aanleiding zijn voor verschillen die gevonden

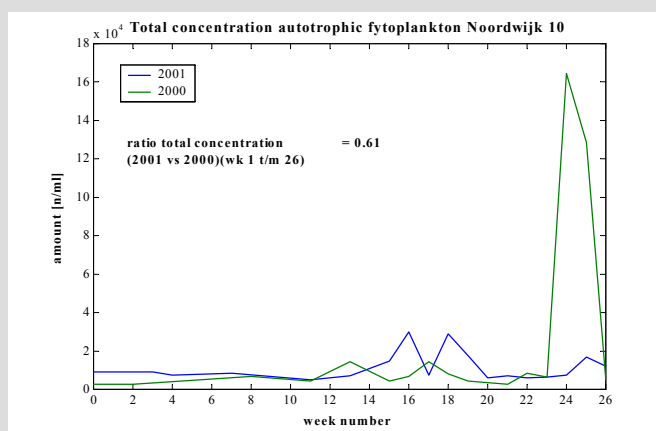
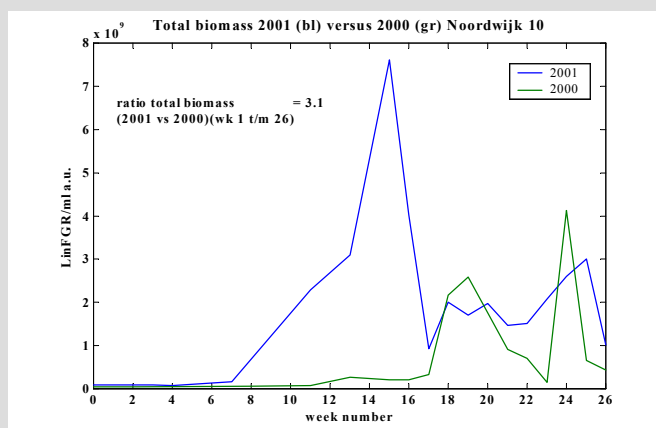
kunnen worden tussen flowcytometrie en microscopie.

FCM versus referentietechnieken

Voor de chlorofyl-a fluorescentie wordt de flowcytometrische linFGR/ml parameter gebruikt, die gedurende een aantal jaren redelijke tot goede correlaties heeft laten zien met de chlorofyl-a fluorescentiemetingen afkomstig van de HPLC-techniek. Ondanks het verschil in het gehanteerde monstervolume bij beide technieken (< 5 ml voor FCM, ca

Tijdsgeïntegreerde biomassa of concentratie

Een vergelijking van de totale biomassa geïntegreerd in tijd over de eerste zes maanden van 2001 en 2000 maakt het mogelijk aan te geven hoe de hoeveelheden fytoplankton onderling verhouden. Dit is dus niet hetzelfde als de optelling van alle biomassawaarden van de geanalyseerde monsters, want bij een verschil in monsteraantallen is een vergelijking tussen jaren onderling niet meer mogelijk. In onderstaand voorbeeld is dit gedaan voor de lokatie Noordwijk 10 en is de verhouding van de oppervlakte onder de curven berekend. Hieruit blijkt een totale biomassaratio (2001 t.o.v. 2000) van 3.1. Met andere woorden 'in de eerste zes maanden van 2001 wordt circa driemaal hogere biomassa gevonden als in dezelfde periode in 2000'. Opvallend is dat, op dezelfde manier blijkt dat de ratio van de concentratie autotrofe deeltjes (2001 vs 2000) 0,6 is. In 2001 zijn er 40% minder deeltjes aanwezig geweest dan in 2000 in dezelfde periode. Dit wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door de hoge bloeipek eind juni in 2000 van zeer kleine deeltjes, die nauwelijks bijdragen aan de totale biomassa.



1000 ml voor HPLC) en de mogelijke tijdsinvloed van de monsters onderling is de correlatie tussen beide technieken over het algemeen opvallend goed. De relatie tussen particulier organisch koolstof en de flowcytometrische linFGR/ml of de linFLS/ml lijkt een verband te hebben met de helderheid van het water. Naarmate er helderder water wordt geanalyseerd (dus minder slib en detritus) wordt een betere correlatie gevonden. Dit is logisch omdat het aandeel particuliere organische koolstof afkomstig van fytoplankton hoger wordt naarmate er minder detritus en slib in het water zijn en dus een correlatie met het particuliere organische koolstof beter wordt.

De biovolumeparameter linFLS/ml valt tegen, omdat deze te weinig biovolume representeert. De linFLS/ml parameter correleert vooral met aantallen en gevonden lengtes, maar minder met biovolume. Een alternatief om het biovolume uit te drukken is eventueel de linPLS/ml parameter of een omrekening uit de lengteparameter en de lichtverstrooiing van deeltjes. Onderzoek hierna wordt gedaan.

De deeltjes met fycoerithrine tonen een algemeen terugkerend verloop. Iets hogere aantallen in het begin van het jaar en sterke toenames van kleine deeltjes in juni. Deze kleine deeltjes behoren waarschijnlijk tot de verzamelgroep Cryptophyta.

Imaging in flow resultaten

De deeltjes die met imaging in flow zijn gefotografeerd zijn deeltjes met chlorofyl-a fluorescentie (FGR-triggering). Deeltjes zonder chlorofyl-a worden dus niet gefotografeerd zoals heterotrofe fytoplanktonsoorten, die wel in de tellijsten van de snelle microscopie voorkomen zoals de *Protomonadales sp.*, *Protoperidinium sp.* en Craspedomonadaceae. De filtratiestap over een 10 µm gaas, die gebruikt wordt om grotere deeltjes te concentreren, heeft tot gevolg dat kleinere deeltjes buiten de imaging in flow opnames vallen zoals Phaeocystis en Rhodomonas cellen en andere cellen kleiner dan 10 µm. Hierbij dient dus rekening gehouden te worden bij de vergelijking van imaging in flow met microscopie.

Over het algemeen kan gesteld worden dat numeriek dominantere soorten (> 5-10%), die met imaging in flow zijn waargenomen, redelijke overeenkomsten vertonen met de snelle microscopische waarnemingen, maar dat dit veel tijd kost (circa 3 hr).

Chemische referentietechnieken

Voor alle lokaties is een relatie tussen nutriënten, chlorofyl-a, POC en de flowcytometrische parameters onderzocht met behulp van principaal componenten analyse. Vaker is geconstateerd dat N-gerelateerde nutriënten tegengesteld variëren met de toename van middelgrote en kleine algen, en P-gerelateerde nutriënten meer tegengesteld veranderen op middelgrote en grote algen. Ook is echter geconstateerd dat een toename in N-nutriënten gepaard ging met de toename van de kleinste algen. Verder wordt vaker gezien dat opgelost organisch koolstof (DOC) toeneemt met een toename van middelgrote en grotere algen en dat de N/P ratio toename gepaard gaat met een toename van grotere algen. Het gebruik van de principaal componenten techniek toonde desondanks geen duidelijke eenduidige trends voor alle zes lokaties.

Berekening lengte van deeltjes

De algemeen gebruikte indeling bij de verwerking van resultaten van fytoplanktoncellen in 17 grootteklassen is gebaseerd op de lengte of breedte van het signaal afkomstig van deeltjes in de langgerekte richting. Voor bepaalde type deeltjes is deze lengtebepaling onnauwkeurig, omdat het chlorofylfluorescentiesignaal breder of smaller is dan op grond van de werkelijke cellengte verwacht zou worden. Smaller als bijvoorbeeld chloroplasten geconcentreerd (geklonterd) voorkomen in een cel in plaats van homogeen verdeeld (bijv. soms geconstateerd bij *Prorocentrum micans*); breder indien cellen compact zijn, maar relatief veel homogeen verdeeld chloroplasten bevat (bijv. *Phaeocystis* sp.). Onderzoek (bij ITL) naar alternatieve omrekeningen naar lengte uit flowcytometrische signalen heeft inmiddels aangetoond dat de lengtebepaling nauwkeuriger en meer in overeenstemming met de microscopisch waargenomen lengtes mogelijk is. Eind 2001 wordt bekeken welke omrekenmethode definitief gebruikt zal gaan worden.

Efficiency

De verwerking van MWTL monsters in de eerste zes maanden van 2001 heeft aangetoond dat een snelle flowcytometrische analyse en verwerking tot de eindresultaten in combinatie met rapportage via grafieken op HTLM-sites goed te realiseren is binnen een tijdsbestek van gemiddeld één uur per monster. Bij grotere aanvoer van monsters wordt de verwerkingsduur korter omdat de overhead (calibratiemetingen) per monster geringer wordt. De benodigde tijdsduur voor het maken van 200-300 imaging in flow opnames en verwerking viel qua benodigde tijd tegen, want dit kostte circa 3 uur per monster. Handelingen als concentreren, het fotograferen en verwerking van honderden foto's zijn arbeidsintensief. Imaging in flow wordt daarom niet aangeraden als kwantitatieve teltechniek, maar is uitstekend bruikbaar gebleken voor de identificatie van clusters.

Fytoplankton deeltjes en clusters in scatterplots

Met behulp van scatterplots worden optische eigenschappen van fytoplanktondeeltjes ten opzichte van elkaar uitgezet. Deeltjes met gelijke optische eigenschappen clusteren in deze scatterplots en kunnen als zodanig verder verwerkt worden. Door geringe pigment- en volume verschillen van deeltjes bestaat een cluster zelden uit één enkele soort. Met behulp van pulse shape analysis (zie later) wordt verwacht dat meer clusters van deeltjes onderscheiden kunnen worden. De automatische clusterverwerking in MATLAB met het zelf ontworpen clustervb (v2.01) commando toonde redelijke overeenkomst tussen flowcytometrie en microscopie. Hieruit blijkt dat ondanks geringe pigmentverschillen clusters toch (goed) herkend kunnen worden, omdat gebruik gemaakt wordt van meer dan één scatterplot. De grootste beperking echter zit in de validatie van deze door het MATLAB-Algoritme herkende clusters. Achteraf is het namelijk lastig te controleren welke gefotografeerde deeltjes tot welke clusters behoren. Validatie van clusters achteraf wordt met de invoering van de pulse shape analysis electronica, mogelijk gemaakt.

Innovatieve ontwikkelingen

De invoering van het pulse shape analysis principe, waarbij meer informatie per deeltje gegenereerd wordt, zal leiden tot meer clusters van specifieke soorten en een betere soortherkenning. Hierbij zal de rol van de imaging in flow als extra validatie van de controle van de clusters per soort belangrijk(er) worden. De pulse shape analysis gegevens zullen worden gekoppeld aan een database en statistische verwerkingstechnieken, waarbij op soortniveau pulse shape kenmerken worden opgeslagen en herkend. De verwachte oplevering van de pulse shape analysis is eind 2001. (project TNMWMILLAB). De volgende stap is daarna de toepassing ervan en de introductie van dataverwerkings-programmatuur.

Een tweede ontwikkeling is het gebruik van labelling van specifieke (vaak toxische) soorten fytoplankton. Met behulp van de gebruikte technieken (antilichaam of RNA-probes) is in 2001 progressie geboekt voor de toepassing van deze technieken binnen monitoring (project MONISNEL). Bij calamiteiten van de onderzochte soorten kan snel flowcytometrisch hierop worden ingesprongen.

De aanwezigheid van één unieke flowcytometer (EurOPA n.s.) is een zwakte met betrekking tot voortgang van de analysegang bij uitval of defect raken van dit apparaat. In 2001 is de upgrade van de OPA nieuwe stijl in een bijna afgerond stadium beland en is er dus eind 2001 een tweede apparaat als backup beschikbaar.

De herkenning van deeltjes staat en valt met een geringe verschuiving in de optische eigenschappen van deeltjes. Het gebruik van absolute getalwaarden voor de vastlegging van de optische eigenschappen van deze deeltjes zou in principe beter uitgedrukt kunnen worden ten opzichte van een interne standaard teneinde kleine verschillen tussen meetdata te corrigeren. Ook zou gedacht kunnen worden aan het gebruik van dimensieloze getallen bijvoorbeeld de ratio van twee pigmentfluorescentiewaarden. De verdere verfijning van methoden voor de herkenning van soorten vergt nog onderzoek.

5. Aanbevelingen

Flowcytometrie en de geautomatiseerde verwerking van flowcytometrische resultaten (bijv. van concentraties autotrofe deeltjes en biomassa) door een opdeling van deeltjeslengtes in groottefracties wordt aanbevolen, omdat hieruit een goede indruk verkregen wordt over de dynamiek van fytoplankton. Deze resultaten geven echter nauwelijks informatie over soorten fytoplankton. Informatie over soorten kan snel verkregen worden met behulp van de verkorte snelle microscopische analyse. Combinatie van deze informatie afkomstig van beide technieken kan middels rapportage op internet/intranet binnen 48 uur beschikbaar zijn.

Op grond van de innovatieve ontwikkelingen bij ITL wordt aanbevolen om de uitbreiding van de optische kenmerken van fytoplanktonsoorten verkregen met pulse shape analysis gekoppeld aan een database, waarbij met een bepaalde 'matching' soorten gevonden zouden kunnen worden, operationeel te maken en te onderzoeken in 2002.

Een uitbreiding van het aantal monitoringslokaties (nu 6) wordt aanbevolen om over meer lokaties te kunnen beschikken voor de uitvoering van de drietraps-monitoring gekenmerkt door de snelle rapportage via een website en de halfjaarlijkse evaluerende rapportage voor het kunnen volgen van de fytoplanktontoestand in het water.

Het verdient aanbeveling te overwegen wat dient te gebeuren met de overige Terschelling 135 data, die bemonsterd zijn op halve diepte en drie meter boven de bodem. Deze zijn tot nu toe niet verwerkt of gerapporteerd.

6. Conclusies

In dit rapport wordt, voorafgaand aan de presentatie van de flowcytometrische fytoplanktonresultaten, per lokatie een korte samenvattende beschrijving gegeven, waarin de algemene trends, die geconstateerd zijn beschreven worden. De flowcytometrische analyses en de standaard verwerking van flowcytometrische resultaten (concentraties autotrofe deeltjes en biomassa) door opdeling in groottefracties heeft aangetoond een goed monitorings-instrument te zijn voor de vastlegging van de fytoplanktodynamiek in watersystemen. De concentratie autotrofe fytoplankton deeltjes, de biomassa hiervan en specifieke verzamelgroepen gebaseerd op verschil in pigmentsamenstelling tonen overeenkomsten en verschillen tussen de eerste zes maanden van de jaargangen 2000 en 2001.

Dankzij de reproduceerbaarheid van de flowcytometrische meettechniek is een vergelijking tussen de jaargangen mogelijk. Aanbevolen wordt om vergelijkingen tussen jaargangen ook tijdsgeïntegreerd te doen.

Deze flowcytometrische resultaten geven echter nauwelijks informatie over soorten fytoplankton. Informatie over soorten kan snel verkregen worden met behulp van de verkorte snelle microscopische analyse. Combinatie van de informatie afkomstig van beide technieken kan middels rapportage op internet/intranet binnen 48 uur beschikbaar zijn.

Imaging in flow, het maken van digitale foto's van algen in 'flow', wordt vanwege de geringe tijdswinst en verschillen ten opzichte van microscopie niet aangeraden als kwantitatieve teltechniek, maar is uitstekend bruikbaar voor de identificatie van clusters.

De verwerking van MWTL monsters in de eerste zes maanden van 2001 heeft aangetoond dat een snelle flowcytometrische analyse en verwerking tot de eindresultaten in combinatie met rapportage via grafieken op HTLM-sites goed te realiseren is binnen een tijdsbestek van gemiddeld één uur per monster.

Verder onderzoek en verfijning van de techniek is nodig.

7. Referenties

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

Anonymus, MAS-C0001,

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

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

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

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