

Titel: Fytobenthos i vandløb			
Dokumenttype: Teknisk Anvisning	TA. nr.: V21	Version: 4	Oprettet: 23.4.2014
Forfattere: Peter Wiberg-Larsen & Liselotte Sander Johansson	Gyldig fra: 1.5.2014		
	Sider: 21		
	Sidst ændret: 23.4.2019		
TA henvisninger: V02			

0 Indhold

1	Indledning	1
2	Metode	2
2.1	Prøveindsamling: Tid, sted og periode	2
2.2	Prøveindsamling: Udstyr	2
2.3	Prøveindsamling: Procedure	3
2.3.1	Indsamling fra naturlige substrater	3
2.3.4	Konservering, etikettering, opbevaring af prøver.....	4
2.4	Tjekliste til prøveindsamling	6
2.5	Særlige forholdsregler – faldgruber ved prøveindsamling	6
2.6	Oparbejdning af prøver: Udstyr.....	6
2.7	Procedure ved oparbejdning af prøver.....	7
2.7.1	Generelle bemærkninger.....	7
2.7.2	Sedimentation	7
2.7.3	Foreløbig undersøgelse	7
2.7.4	Oprensning af prøve.....	7
2.7.5	Fremstilling af præparat	9
2.7.6	Optælling af prøve	9
2.7.7	Tælleskema.....	10
2.4	Vedligeholdelse af instrumenter	10
3	Databehandling	11
3.1	Beregninger.....	11
3.2	Data og koder.....	11
4	Kvalitetssikring	12
4.1	Kvalitetssikring af metode	12
4.2	Kvalitetssikring af data og dataaflevering	12
4.3	Ekstern kontrol	12
5	Referencer	13
6	Bilag	14
Bilag 6.1	Følgeskema til fytobenthos undersøgelser i vandløb.....	15
Bilag 6.2	Bestemmelseslitteratur til bentiske kiselalger.....	16
Bilag 6.3	Fremstilling af Lugolopløsning	19
7	Oversigt over versionsændringer	20

1 Indledning

Bundlevende alger (fyto-benthos) udgør en del af det biologiske kvalitets-element "makrofyter og bundvegetation" ("macrophytes and phytobenthos"), som ifølge Vandrammedirektivet forventes anvendt i vandløb.

Denne tekniske anvisning beskriver indsamling og bearbejdning af prøver af fyto-benthos - mere præcist gruppen af kiselalger (diatomeer) - i vandløb. Metoden bygger på erfaringer og metoder udviklet i andre EU-lande (Kelly et al. 2001, European Standard 2003, Kelly et al. 2008).

Metoden er designet til at beskrive den relative artssammensætning af kiselalger, som er til stede i de udtagne prøver. Herudfra beregnes indeks-værdier efter "Dansk Vandløbs Kiselalge Indeks", som er baseret på de tilstedeværende algers eutrofieringsoptima. Beregningerne er ikke omtalt i nærværende tekniske anvisning.

2 Metode

Metoden er som nævnt ovenfor designet til at danne grundlag for beregning af "Dansk Vandløbs Kiselalge Indeks". Algerne bestemmes typisk til art/underart, til nød et kompleks af arter, eller slægt. Rationalet bag dette detaljeringsniveau er, at indekset bygger på tilstedeværelsen af arter og deres respektive indikatorværdi. Den anvendte indsamlingsmetode opgør altså ikke tætheden af kiselalger.

Bearbejdningen af de indsamlede prøver bygger på DS/EN 13946:2014 "Vandundersøgelse – Prøvetagning og oparbejdning af bundlevende diatomeer fra floder" og anvisninger fra Amelie Jarlman, Jarlman Konsult AB, Lund, Sverige og Gina Henderson, Henderson Ecology, England.

2.1 Prøveindsamling: Tid, sted og periode

Prøverne indsamles én gang i et givet prøvetagningsår ved hver vandløbsstation (NOVANA's kontrolovervågning Udvikling stationer).

Prøverne udtages fra de allerede udpegede 100 m strækninger, som repræsenterer stationerne, og hvor samtlige undersøgelser under kontrolovervågningen foretages (se i øvrigt V02).

Indsamlingerne gennemføres som udgangspunkt i tidsrummet 1.-15. maj. I år, hvor løvspringet sker tidligt, kan indsamlingsperioden udvides til 15. april-15. maj.

2.2 Prøveindsamling: Udstyr

- Tandbørste ("hård")
- Plastikbakke
- Prøveflasker (i klart glas eller plastik (se afsnit 2.3.4)) med skruelåg, 500 ml + 100 ml
- Tragt
- Lugol (til fiksering af prøver)
- Kraftig saks (beskærersaks)
- Kraftig pincet til fastholdning af plantestængler
- Sprøjteflaske (til skylning)
- De-ioniseret vand
- Fortrykte selvklæbende etiketter
- Blyant/vandfast marker
- Kølekasser
- Køleelementer
- Waders

2.3 Prøveindsamling: Procedure

På hver station indsamles kiselalger fra i prioriteret rækkefølge: (1) sten, (2) makrofytter. Algeprøverne konserveres og opbevares indtil senere bearbejdning (identifikation og optælling af de forekommende arter af kiselalger).

2.3.1 Indsamling fra naturlige substrater

Der indsamles én puljet prøve fra hver station. Som substrat vælges i prioriteret rækkefølge: (1) sten, (2) neddykkede dele af emergente makrofytter. Dvs. at hvis der forekommer sten på lokaliteten, indsamles der én puljet prøve herfra: Er det ikke muligt, indsamles der én puljet prøve fra makrofytter. Forekommer der hverken sten eller makrofytter, indsamles der ingen prøve.

Indsamling fra sten:

Indsaml mindst 5 sten (64-256 mm) så vidt muligt tilfældigt fra steder, hvor hovedstrømmen passerer og hvor der er helt eller periodevis lysåbent. Stenene bør indsamles i områder med forskellig dybde, men undgå at samle sten på større dybder end 0,5 m. Om muligt skal de valgte sten være nogenlunde jævnt fordelt over 100 m strækningen. Stenene skal have en tydeligt udviklet biofilm, men undgå sten med tydelig påvækst af trådalger, dække af silt, eller hvor algefilmen ser "død" ud. Fjern løstsiddende partikler ved at vaske sten kortvarigt i vandløbsvandet (bevæges blot lidt frem og tilbage i vandet).

Stenene håndteres en efter en. Placer stenen i en plastikbakke (figur 1). Fyld ca. 400 ml vandløbsvand i bakken. Derefter børstes oversiden af stenen kraftigt med en tandbørste (hård type). Børst kun de steder som er fri for trådalger og silt. Er det umuligt at undgå sten med påvækst af trådalger, fjernes disse alger, før mikroalgerne afbørstes. Under afbørstningen skal den flade der børstes være vanddækket (se figur 1). Proceduren fortsættes med de følgende 4 sten. Efter afbørstningen af de 5 sten, hældes vandet over i én prøveflaske (500 ml, klart glas evt. plastik med skruelåg (se afsnit 2.3.4)). Brug en tragt, når der hældes. Der indsamles således én – og kun én - samleprøve fra hver lokalitet.

Bakke og tragt renses og skylles **GRUNDIGT**, inden de bruges ved efterfølgende lokaliteter. Der **ANVENDES NY UBRUGT** tandbørste for hver station.



Figur 1. Afbørstning af sten i praksis.

Indsamling fra makrofyter:

Indsaml fra neddykkede dele af emergente planter. Anvend kun én art fra den pågældende lokalitet. Egnede emergente arter er: tagrør, enkelt/grenet pindsvineknop, høj sødgræs, manna-sødgræs, dunhammer. Planterne skal have en tydeligt udviklet biofilm, men undgå sådanne, som har tydelig påvækst af trådalger, eller som er dækket af silt/mudder/sand. Visne, faste, men ikke henrådende, planter må gerne benyttes.

Afskær (klip) mindst 5 stykker plantestængler så tæt ved bunden som muligt. Ser algelaget ud til at være tyndt, tages 10 stykker. Plantestykkerne indsamles så vidt muligt tilfældigt, og om muligt skal de indsamles nogenlunde jævnt fordelt over 100 m strækningen. Sørg for at indsamle fra planter fra vanddybder på 0,25-0,50 m's vanddybde og som vurderes har været dækket med vand over længere tid. For hver bortskæres og kasseres først den del, som er oven for vandet. Afskær dernæst et ca. 10 cm langt stykke af den del, som er under vand. Dette overføres forsigtigt til plastikbakken med ca. 400 ml vand og rystes kraftigt for at frigøre kiselalgerne (brug enten vand fra vandløbet eller hvis det er meget "beskidt" medbragt deioniseret vand). Afbørst desuden alger med tandbørste. Når alle 5 stykker er afbørstet, hældes vandet forsigtigt over i én prøveflaske (500 ml, klart glas eller plastik med skrue låg (se afsnit 2.3.4)). Brug en tragt, når der hældes. Der indsamles således én - og kun én - samleprøve fra hver lokalitet.

Bakke, saks og tragt renses og skylles **GRUNDIGT**, inden de bruges ved efterfølgende lokaliteter. Der **ANVENDES NY UBRUGT** tandbørste for hver station.

2.3.4 Konservering, etikettering, opbevaring og forsendelse af prøver

Hver prøveflaske forsynes med etikette indeholdende følgende oplysninger:

Observationssted nr.	
Lokalt stations nr.	
Vandløbsnavn	
Lokalitetsnavn	
Substrattype	
Dato for indsamling af algeprøve	
Navn på indsamler	

Sørg for en sikker afmærkning: Brug blyant/vandfast marker, vandfast mærkat, og sørg for at denne sidder godt fast. Sørg også for at afskylle og tørre flasken grundigt, inden etiketten påsættes.

Prøveflasken placeres mørkt og køligt (kølekasse med køleelementer) og hjemtages. Indholdet ses efter for grove plantestykker og lignende. Disse pilles fra eller prøven hældes gennem en køkkensi (maskevidde ca. 0,5 mm) og over i en beholder, som kan lukkes med låg. Den stilles i køleskab til sedimentation i 1 døgn. Herefter fjernes den overskydende klare væske, uden at hvirvle det sedimenterede materiale op, som overføres til mindre glas- eller plastikflaske (100 ml). Se anvendelse af plastikflaske ved forsendelse nedenfor. Flaskens indhold fikseres med Lugol væske (se bilag 6.3), således at der opnås en lugolkoncentration på 2% i den konserverede prøveflaske, som fyldes til 1 cm under skruegevindet.

Den "nye" prøveflaske etiketteres som ovenfor angivet.

Udfyld følgeskema (bilag 6.1). Noter hvis der er særlige forhold af betydning ved prøvetagningen (hvis det har været nødvendigt at afvige fra metodebeskrivelsen, vanskelige prøvetagningsforhold med høj vandstand, okkerbelægninger, uklart vand eller lign.).

Prøveflaskerne opbevares mørkt og køligt (f.eks. i en kælder) for at undgå at Lugolen fordamper indtil senere bearbejdning.

Hvis prøverne skal sendes med pakkepost, skal der anvendes plastikflasker, lavet af polyethylen. Hvis de pågældende prøver opbevares mere end fire uger inden oparbejdning, skal de tilses jævnligt og evt. genfikseres. Ved længere tids opbevaring (mere end 6 mdr.) skal de under alle omstændigheder hældes på glasflasker.

2.4 Tjekliste til prøveindsamling

Vigtige punkter at iagttage i forbindelse med indsamling af prøverne i feltet, samt efterfølgende behandling af de indsamlede prøver:

- Udpegning af stationer (på kontoret)
- Pakning af bil: Husk alt udstyr – jf. udstyrslisten
- Indsamling af naturlige substrater (1. sten ELLER 2. makrofytter)
- Afbørstning af alger og overførsel af algesuspension til prøveflaske
- Etikettering af prøveflaskerne
- Efter hjemkomst: placering af prøveflasker mørkt og køligt til sedimentation
- Dekantering af overskydende væske og omhældning til 100 ml flasker efter 1 døgn
- Fiksering og etikettering af prøveflasker
- Udfyldelse af følgeskema med oplysninger om indsamlede prøver (Se tabel øverst i afsnit 2.3.4).

2.5 Særlige forholdsregler – faldgruber ved prøveindsamling

Vær omhyggelig under indsamling af naturlige substrater. Husk at skifte tandbørste mellem hver station. Husk desuden at rense bakke, saks og tragt grundigt, inden de anvendes ved næste station. Sørg for, at prøverne er tilstrækkeligt konserverede (undgå silt, trådalger m.v. af hensyn til tilstrækkelig konservering).

2.6 Oparbejdning af prøver: Udstyr

- Vandbad
- Stinkskab
- Kogeplade
- Pincet
- Plastikvials med låg
- Engangspipetter
- Finnpipette, 1 og 5 ml
- Mikroskop (min 100x forstørrelse) med olie-imersionslinse, Nomarski interferens og/eller fasekontrast
- Evt. centrifuge (kapacitet 1200 omdr/min) og centrifugerør
- Evt. prøveglas med låg, 10-15 ml med tilhørende låg, hvis centrifuge ikke anvendes
- Varmefast holder til centrifugerør/prøveglas
- Hydrogenperoxid (H₂O₂), 30%
- Saltsyre (HCl), 50%
- Dækglas
- Objektglas
- Alkohol
- Naphrax ("mounting agent")
- Lugol til genfiksering af prøverest

Bemærk! Hvis der vælges en anden oprensningsmetode (se nedenfor) end den her beskrevne, skal udstyrslisten evt. justeres – se DS/EN 13946:2014.

Med hensyn til bestemmelseslitteratur henvises til bilag 6.2.

2.7 Procedure ved oparbejdning af prøver

Ud fra de indsamlede prøver produceres mikroskopslides, som efterfølgende anvendes til identifikation af kiselalgetaxa og optælling af disse.

2.7.1 Generelle bemærkninger

Under alle arbejdsgange skal muligheden for kontaminering af prøverne med "fremmede" kiselalger undgås. Glas- og metaludstyr skal derfor rengøres meget grundigt mellem hver prøve. Brug éngangs plastikvials med låg og éngangs pipetter og kassér dem efter brug. Brug separate pipetter til de forskellige prøver. Læg i videst muligt omfang låg på prøver. Undgå at præparere prøver fra forskellige stationer samtidig. Husk at mærke alle flasker/vials/rør/objektglas m.m. grundigt. Genfikser og gem altid prøveresten.

2.7.2 Sedimentation

De lugol-fikserede flasker skal stå koldt til sedimentation i mindst 48 timer, før de tages under behandling. Hæld herefter forsigtigt så meget af supernatanten fra, som det kan lade sig gøre uden at det sedimenterede materiale ophvirvles. Det kontrolleres, at der ikke findes kiselalger heri. Hvis det alligevel er tilfældet, skal supernatanten hældes tilbage og sedimentationstiden skal forlænges. Alternativt centrifugeres prøven.

2.7.3 Foreløbig undersøgelse

Efter frahældning af supernatanten homogeniseres prøven ved at ryste den. Et par dråber udtages til foreløbig mikroskopisk undersøgelse med henblik på at finde den mest hensigtsmæssige fortynding, idet tætheden af algerne vurderes og det noteres, hvis der fx er mange tomme eller ødelagte kiselalgeskaller i prøven. NB! Prøveresten skal gemmes, så husk at genfikser prøven, når der er udtaget det volumen, der er behov for.

2.7.4 Oprensning af prøve

Prøven omrystes igen og en delprøve på 5 ml overføres til et centrifugerør, og centrifugeres i 10 min. ved 1200 omdr./min. Efter centrifugering skal der være en synlig mængde materiale på bunden af røret. Hvis der ikke er tilstrækkeligt materiale, suges supernatanten fra centrifugerøret, algeprøven omrøres/rystes, og der tilsættes yderligere 5 ml prøve fra denne til centrifugerøret hvorefter der centrifugeres igen. Dette kan gentages indtil der er tilstrækkeligt materiale i centrifugerøret.

Hvis man ikke har en centrifuge til rådighed kan man lade prøven sedimentere i glasrør i stedet for. I så fald skal hver "centrifugegang" (også hvis det

er nødvendigt med flere som ovenfor beskrevet) erstattes med en sedimentation på 12 timer.

Nedenstående metode til oprensning er velafprøvet og anbefales. Det er dog tilladt at følge de metoder, der er anvist i DS/EN 13946: 2014.

1. Placer hvert centrifugerør - indeholdende en delprøve - i en holder og sug det mulige overliggende vand fra som muligt. For at tjekke for krydskontaminering kan man have centrifugerør uden algeprøve med mellem de faktiske prøver, som behandles og analyseres på samme måde som prøverne.
2. Tilsæt 1-2 dråber 30% H_2O_2 til hvert prøveglas. Der vil herefter ske en reaktion (brusen). Vent til denne ophører. Tilsæt yderligere 30% H_2O_2 og gentag indtil der er ca. 10 ml i røret. Dette kan tage lang tid, hvis reaktionen med H_2O_2 er kraftig, og man kan evt. tilsætte H_2O_2 over flere dage, med løst påsat låg, alt efter hvor kraftig reaktionen er.
3. Sæt holderne med rørene med løst påsat låg, i et varmebad natten over ved $80^\circ C$, undgå at prøverne ikke tørrer ud.
4. Tag prøverne op af vandbadet og lad dem afkøle.
5. Hvis der stadig er organisk materiale tilbage, centrifugeres/sedimenteres prøverne igen og proceduren med H_2O_2 gentages. Dvs. efter centrifugering suges væsken i delprøven fra og Punkt 1-4 gentages indtil der kun er få rester af organisk materiale tilbage (Uhrnholt 2008 og referencer heri).
6. Hvis en prøve er brunlig (fx pga. jernforbindelser) tilsættes et par dråber 50% HCl, som samtidig fjerner resterende H_2O_2 fra prøven og eventuelle kiselalger som klistre til rørene. Vent et par minutter. Hvis prøven stadig er gullig tilsættes endnu et par dråber HCl.
7. Prøven vaskes (H_2O_2 og evt. HCl fjernes) ved at tilsætte ionbyttet/destilleret vand og derefter centrifugere i 4 min ved 1200 omdr/min. Overliggende vand dekanteres og denne vask gentages fire gange. Hvis der er meget ler i prøverne kan man tilsætte 1-2 dråber svag NH_3 -opløsning med den sidste vask for at undgå at algerne klumper sammen på præparatet. *Centrifugering kan erstattes af simpel sedimentering som beskrevet ovenfor (altså op til fem gange 12 timer).*
8. Efter sidste vask fjernes det overliggende vand, bortset fra ca. 2 ml. Prøven omrystes forsigtigt og indholdet skal nu være en mellemting mellem gennemsigtig og mælkehvid. Det kræver noget øvelse at få den rigtige koncentration.
9. For at finde den mest hensigtsmæssige fortynding af prøven og for at kontrollere, at skallerne er pæne, overføres én dråbe til et objektglas og prøven undersøges under mikroskop. Hvis prøven er for "tæt" for-

tyndes den med ionbyttet/destilleret vand. Er prøven for tynd, centrifugeres/sedimenteres den, og det overliggende vand pipetteres fra, så den bliver mere koncentreret. Når der ved 100x forstørrelse er ca. 5 skaller har prøven den rette koncentrationen.

2.7.5 Fremstilling af præparat

1. Rens et dækglas med alkohol, så overfladen er fedtfri. Dette kan kontrolleres ved, at en dråbe vand nemt spreder sig på overfladen.
2. Der fremstilles en serie af præparater for hver prøve. Prøven rystes godt inden der med finpipette overføres 0.3, 0.5 og 0.7 ml prøve på et dækglas. Fremstilling af tre præparater med forskellig tæthed sikrer, at der produceres et, der er egnet til tælling (ikke for koncentreret) og et, der er mere koncentreret som giver mulighed for at undersøge visse arter nærmere. NB – husk at anvende ny pipettespids for hver prøve.
3. Lad dækglassene lufttørre et tildækket og uforstyrret sted – pas på ikke at røre ved dem med fingrene, brug pincet. Dette kan tage op til to dage.
4. Overfør en dråbe Naphrax på et objektglas som er forsynet med tydelig etikette med angivelse af: DMU nr., vandløbsnavn, lokalitet, dato, og bearbejdersnavn. Læg dækglasset med de tørrede kiselalger over dråben.
5. Opvarm en kogeplade til ca. 130 °C og læg forsigtigt objektglasset med prøve og dækglas på kogepladen i et stinkskab. Vær meget forsigtig - farlige dampe – følg sikkerhedsanvisningerne på Naphrax etiketten! Objektglasset skal ligge på kogepladen i ca. 15 min.
6. Præparatet afkøles, hvorefter der tjekkes at dækglasset ikke flytter sig når man skubber til det med en fingernegl. Hvis dette er tilfældet skal objektglasset varmes i lidt længere tid.
7. Husk; Samtlige slides skal være forsynet med tydelig etiket med angivelse af: DMU nr., vandløbsnavn, lokalitet, dato, og bearbejdersnavn.

2.7.6 Optælling af prøve

1. Prøven tælles i lysmikroskop med mulighed for Nomarski interferens og/eller fasekontrast, ved min. 100x forstørrelse.
2. Der skal som udgangspunkt tælles i alt 400 intakte kiselalgeskaller, dvs. halve individer. Derudover skal der være mindst 200 skaller som ikke dominerer prøven, hvorfor det endelige antal talte skaller vil variere mellem prøver. Beskadigelse af skallerne i forbindelse med prøvetagning, oprensning og fremstilling af slides er normalt minimal. Hvis der alligevel er flere ødelagte skaller end der blev observeret ved den foreløbige undersøgelse (afsnit 2.3.7), skal skaller som kan bestemmes medtælles, dvs. hvis både den central del og den ene spids er intakt. For taxa uden definerbar central del, skal man tælle spidserne og dividere med to. Visse arter (*Asterionella formosa*, *Synedra ulna*, *Synedra acus*, og tyndskallede arter *Nitzschia* som fx *N. acicularis*) går særlig let i stykker og vil, hvis der kun tælles hele skaller, blive underrepræsenteret.

3. Der tælles diagonaler eller felter på glasset, således at hvert individ kun tælles én gang.
4. Samtlige individer SKAL som udgangspunkt identificeres til art og hvis muligt også til underart. Hvis der er tvivl om, hvor vidt et individ tilhører én ud af fx 2-3 mulige arter, angives dette (fx som *Navicula lanceolata* /*pseudolanceolata*/*peregrina*) eller man kan angive "cf" sammen med artsnavnet, hvis man er usikker på bestemmelsen. Kun hvis der ikke er andre muligheder, kan arten bestemmes til slægt.
5. Det noteres, hvor mange skaller, der er af hver art. Brug fx tælleur.
6. Resultaterne indføres i tælleskema (se 2.7.7) og indsendes elektronisk til AU Bioscience (lsj@dmu.dk).

2.7.7 Tælleskema

Som tælleskema anvendes SÆRSKILT EXCEL-REGNEARK (V21_Diatom counting scheme.xlsx).

2.4 Vedligeholdelse af instrumenter

Generel vedligeholdelse af mikroskop (Køhler indstilling mv.).

3 Databehandling

3.1 Beregninger

Ikke relevant

3.2 Data og koder

Ikke relevant

4 Kvalitetssikring

4.1 Kvalitetssikring af metode

Ved indsamling af prøver: Tjek om du nøje har fulgt metoden. Kontroller at oplysningerne på hhv. etikette og i følgeskema stemmer overens for hver enkelt station. Undgå at indsamle algeprøve, som må formodes at indeholde stort indhold af døde alger m.v. Skyl så vidt muligt sådant materiale af, inden der børstes.

Ved prøvebearbejdning: Sørg for at der optalt og identificeret mindst 400 intakte (se dog 2.7.6, pkt. 2) kiselalgeskaller. Ved tvivl om identifikation af en art, konsultér om muligt flere bestemmelsesværker. Indhent om nødvendigt en "second opinion" fra person med de nødvendige kompetencer.

4.2 Kvalitetssikring af data og dataaflevering

Kontroller at alle relevante oplysninger er indføjet i tælleskemaet. Kontrollér artsnavne for stavefejl.

4.3. Ekstern kontrol

Miljøstyrelsen/Bioscience forbeholder sig retten til at lade udføre en ekstern kvalitetskontrol på en del af de bearbejdede prøver. Samtlige slides og prøverester skal derfor opbevares sikkert, således at denne kontrol er mulig.

5 Referencer

Dansk Standard DS/EN 14407 (2014) Vandundersøgelse – Vejledning i påvisning, bestemmelse og tolkning af bundlevende diatoméer fra strømmende vand.

European Standard (2003) Water quality – Guidance standard for the routine sampling and pretreatment of benthic diatoms from rivers. EN 13946. European Committee for Standardization. Ref. No. EN 13946:2003E.

Kelly, M.G., Adams, C., Graves, A.C., Jamieson, J., Krokowski, J., Lycett, E.B., Murray-Bligh, J., Pritchard, S. & Wilkins, C. (2001) The Trophic Diatom Index: A User's Manual. Revised edition. Environment Agency, Research and Development, Technical Report E2/TR2.

Kelly, M.G., Juggins, S., Bennion, H., Burgess, A., Yallop, M., Hingst, H., King, L., Jamieson, J., Guthrie, R. & Rippey, B. (2007) Use of Diatoms for Evaluating Ecological Status in UK Freshwaters. Environment Agency Science Report SCO301030.

Dansk Standard DS/EN 13946 (2014) Vandundersøgelse – Prøvetagning og oparbejdning af bundlevende diatoméer fra floder.

Uhrenholt, J.K. (2008) Fotoautotrofe komponenters fordeling i vandløb i forhold til lys, størrelsesdimensioner og oplandsudnyttelse. Specialrapport, Biologisk Institut & DMU, Aarhus Universitet.

6 Bilag

- 6.1 Følgeskema til brug ved indsamling af prøver
- 6.2 Bestemmelseslitteratur til bentiske kiselalger
- 6.3 Fremstilling af Lugols væske

Bilag 6.1 Følgeskema til fytobenthos undersøgelser i vandløb

Observationssted nr.	Vandløbsnavn	Lokalitet
Dato for indsamling af algeprøve (åååå.mm.dd)	Indsamlet substrattype (sten eller makrofyter)	Indsamling udført af:
Bemærkninger til indsamling af substrat m.v.:		

Bilag 6.2 Bestemmelseslitteratur til benthiske kiselalger

ALLES, E., NÖRPEL-SCHEMPP, M & LANGE-BERTALOT, H. 1991. Zur Systematik und Ökologie charakteristischer Eunotia-Arten (Bacillariophyceae) in elektrolytarmen Bachoberläufen. *Nova Hedwigia* 53(1-2):171-213.

HOUK, V. 2003. Atlas of freshwater centric diatoms with a brief key and descriptions. Part 1. Melosiraceae, Orthoseraeae, Paraliaeae and Aulacoseiraceae. *Czech Phycology Supplement*. Volume 1. 2003.

HOUK, V. & KLEE, R. 2007. Atlas of freshwater centric diatoms with a brief key and descriptions. Part 2. Melosiraceae and Aulacoseiraceae (Supplement to Part I) *Fottea* 7:2. 170 pp.

HOUK, V., KLEE, R and Hiroyuki, T 2010: Atlas of freshwater centric diatoms, with a brief key and descriptions. Part 3: Stephanodiscaceae A, Cyclotella, Tertiaris, Discostell. *Fottea* 10 (Supplement): 1-498, 2010.

HÅKANSSON, H. 2002. A compilation and evaluation of species in the genera *Stephanodiscus*, *Cyclostephanos* & *Cyclotella* with a new genus in the family Stephanodiscaceae. *Diatom Research* 17(1):1-139

KRAMMER, K. 1997. Die cymbelloiden Diatomeen. Eine Monographie der weltweit bekannten Taxa. Teil 1. Allgemeines und *Encyonema* part. *Bibliotheca Diatomologica* Band 36. J Cramer Stuttgart. 382 pp.

KRAMMER, K. 1997. Die cymbelloiden Diatomeen. Eine Monographie der weltweit bekannten Taxa. Teil 2. *Encyonema* part., *Encyonopsis* und *Cymbellopsis*. *Bibliotheca Diatomologica* Band 37. J Cramer Stuttgart. 469 pp.

KRAMMER, K. 2000. Diatoms of Europe. Diatoms of the European Inland Waters and Comparable Habitats. Vol. 1. The genus *Pinnularia*. A.R.G. Gantner Verlag K. G, Ruggell. 703 pp.

KRAMMER, K. 2002. Diatoms of Europe. Diatoms of the European Inland Waters and Comparable Habitats. Vol. 3. *Cymbella*. A.R.G. Gantner Verlag K. G, Ruggell. 584 pp.

KRAMMER, K. 2003. Diatoms of Europe. Diatoms of the European Inland Waters and Comparable Habitats. Vol. 4. *Cymbopleura*, *Delicata*, *Navicymbula*, *Gomphocymbellopsis*, *Afrocymbella*.. A.R.G. Gantner Verlag K. G, Ruggell. 530 pp.

KRAMMER, K. & LANGE-BERTALOT, H. 1986. Bacillariophyceae. 1. Teil: Naviculaceae. *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Band 2/1. Durchgesehener Nachdruck der 1.Auflage 1997, 1999. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin. 876 pp.

- KRAMMER, K. & LANGE-BERTALOT, H. 1988. Bacillariophyceae. 2. Teil: Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 2/2. Ergänzter Nachdruck der 1. Aufl. 1997, 1999. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin. 611 pp.
- KRAMMER, K. & LANGE-BERTALOT, H. 1991. Bacillariophyceae. 3. Teil: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 2/3. 2nd suppl. ed. 2000. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin. 599 pp.
- KRAMMER, K. & LANGE-BERTALOT, H. 1991. Bacillariophyceae. 4. Teil: Achnanthesaceae, Kritische Ergänzungen zu Achnanthes s.l., Navicula s.str., Gomphonema, Gesamtliteraturverzeichnis Teil 1-4. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 2/4. Ergänzter Nachdruck 2004. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin. 468 pp.
- LANGE-BERTALOT, H. 1993. 85 Neue Taxa und über 100 weitere neu definierte Taxa ergänzend zur Süßwasserflora von Mitteleuropa Vol. 2/1-4. Bibliotheca Diatomologica 27. J. Cramer, Stuttgart. 393 pp.
- LANGE-BERTALOT, H. (ed). 1996. Iconographia Diatomologica. Annotated Diatom Micrographs Vol. 2. Indicators of Oligotrophy, by Lange-Bertalot, H. & Metzeltin, D. Koeltz Scientific Books. 390 pp.
- LANGE-BERTALOT, H. (ed). 1999. Iconographia Diatomologica. Annotated Diatom Micrographs Vol. 6. Diatoms from Siberia I. Islands in the Arctic Ocean, by Lange-Bertalot, H. & Genkal, S.I. Koeltz Scientific Books. 304 pp.
- LANGE-BERTALOT, H. (ed). 1999. Iconographia Diatomologica. Annotated Diatom Micrographs Vol. 8. Reichardt, E. 1999. Zur Revision der Gattung Gomphonema. Die Arten um *G. affine/insigne*, *G. angustatum/micropus*, *G. acuminatum* sowie gomphonemoide Diatomeen aus dem Oberoligozän in Böhmen. A.R.G. Gantner Verlag K.G. 203 pp.
- LANGE-BERTALOT, H. 2001. Diatoms of Europe. Diatoms of the European Inland Waters and Comparable Habitats. Vol. 2. Navicula sensu stricto. 10 Genera Separated from Navicula sensu lato. Frustulia. A.R.G. Gantner Verlag K. G, Ruggell. 526 pp.
- LANGE-BERTALOT, H. (ed). 2004. Iconographia Diatomologica. Annotated Diatom Micrographs Vol 13. Diatoms in springs from Central Europe and elsewhere under the influence of hydrogeology and anthropogenic impacts, by Werum, M. & Lange-Bertalot, H. Eine bemerkenswerte Diatomeenassoziation in einem Quellhabitat im Grazer Bergland, Österreich, by Reichardt, E. A.R.G. Gantner Verlag, K. G. Ruggell. 479 pp.
- LANGE-BERTALOT, H. 2009. Diatoms of Europe. Diatoms of the European Inland Waters and Comparable Habitats. Vol. 5. Z. Levkov. Amphora sensu lato. A.R.G. Gantner Verlag K. G. 916 pp.

LANGE-BERTALOT, H. 2011. Diatomeen im Süßwasser - Benthos von Mitteleuropa. Bestimmungsflora Kieselalgen für die ökologische Praxis. Über 700 der häufigsten Arten und ihre Ökologie. Gabriele Hofmann, Marcus Werum und Horst Lange - Bertalot. 2011. 3522 Fig. auf 133 Tafeln. A.R.G. Gantner Verlag. 908 pp.

LANGE-BERTALOT, H. 2011. Diatoms of Europe. Diatoms of the European Inland Waters and Comparable Habitats. Volume 6: Lange-Bertalot, H., Malgorzata Bak, Andrzej Witkowski, and Nadia Tagliaventi: Eunotia and some related genera. 2011. 5053 figs. on 237 plates. A.R.G. Gantner Verlag. 747 p.

LANGE-BERTALOT, H. & KRAMMER, K.. 1989. Achnanthes.. Monographie der Gattung mit Definition der gattung Cocconeis und Nachträgen zu den Naviculaceae. Bibliotheca Diatomologica 18(mit 2590 Figuren auf 100 Tafeln). J. Cramer, Stuttgart.

LANGE-BERTALOT, H. & MOSER, G. 1994. Brachysira. Monographie der Gattungen. Bibliotheca Diatomologica 29. J. Cramer, Stuttgart. 212 pp.

REICHARDT, E. 1997. Taxonomische Revision des Artenkomplexes um Gomphonema pumilum (Bacillariophyceae). Nova Hedwigia 65(1-4):99-129.

REICHARDT, E. & LANGE-BERTALOT, H. 1991. Taxonomische Revision des Artenkomplexes um Gomphonema angustum – G. dichotomum – G. intricatum – G. vibrio und ähnliche Taxa (Bacillariophyceae). Nova Hedwigia 53(3-4):519-544.

VAN de VIJVER, B., BEYENS, L. & LANGE-BERTALOT, H 2004. The genus Stauroneis in the Arctic and (Sub-) Antarctic Regions. 2004. Bibliotheca Diatomologica band 51, 109 plates. 7 tabs. 317 p. Stuttgart 2004

Bilag 6.3 - Fremstilling af Lugolopløsning

220 ml sur Lugolopløsning (Willén 1962):

20 g kaliumjodid
200 ml destilleret vand
10 g resublimeret jod
20 g eddikesyre (konc. CH_3COOH)

Destilleret vand måles af. Heri opløses kaliumjodid og resublimeret jod.
Derefter tilsættes eddikesyre.

7 Oversigt over versionsændringer

Version	Dato	Emne:	Ændring:
2	18-03-2015		Det er anført, at det er tilladt at anvende plastikflasker under visse betingelser.
	18-03-2015		Flasken skal fyldes til én cm under skruegevindet
	18-03-2015		Det er understreget, at koncentrationen af lugol under alle omstændigheder skal være 2%.
3	04-05-2017		Tydliggørelse af sedimentationstid samt mindre tekstmæssige opdateringer.
4	23-04-2019		Revidering af metoder samt større tekstmæssig opdatering.