

Optische technieken voor de bepaling van fytoplankton in zeewater

J.W. Hofstraat

Dienst Getijdewateren, Postbus 20907, 2500 EX Den Haag

Samenvatting

Onder andere tengevolge van de overmatige aanwezigheid van voedingsstoffen in de Nederlandse oppervlakte water doen zich steeds vaker problemen voor met fytoplanktonbloeien. Met name de toenemende aantallen giftige algen geven reden tot zorg. Om adequate beleidsmaatregelen te kunnen nemen is onderzoek nodig naar de oorzaken van de algenproblematiek. Voorts moet inzicht verkregen worden in de ontwikkelingen die zich in de tijd voordoen. Zowel voor onderzoek als voor trendmonitoring zijn bepalingen van soort en aantal algen in zee- en kustwater nodig. Om deze gegevens te verkrijgen worden met name optische technieken toegepast. In dit artikel wordt aandacht geschonken aan de belangrijkste optische eigenschappen van fytoplankton waarvan bij deze bepalingen gebruik wordt gemaakt. Voorts zullen een aantal technieken, die bij Rijkswaterstaat worden toegepast, nader worden besproken. Ook de op dit moment in ontwikkeling zijnde methodieken worden aangeduid.

1. Inleiding

De laatste jaren wordt er regelmatig melding gemaakt van algenbloeien, die op steeds meer locaties in het oppervlaktewater steeds frequenter voorkomen. Bekende voorbeelden zijn de massale algenbloeien vorig jaar in de Adriatische Zee en de ieder voorjaar terugkerende bloeien in de Noordzee, die aanleiding geven tot schuimvorming op het strand. Algenbloeien zijn in principe een volkomen natuurlijk onder-

deel van het mariene ecosysteem. Toch zijn er een aantal aanwijzingen dat de eutrofiering, de aanwezigheid van een overmaat van voedingsstoffen (stikstofhoudende verbindingen en fosfaten), van de kustwateren leidt tot een toename van aantal en omvang van algenbloeien en tot een verandering in de species die erin voorkomen. Algenbloeien kunnen leiden tot een aantal ecologische problemen. In de eerste plaats zuurstoftekort, dat kan optreden wanneer algen massaal afsterven na een bloei; vooral in gebieden waar de waterkolom gestratificeerd is, kan dit leiden tot ernstige gevolgen, zoals sterfte van organismen. Hier in Nederland is het meest bekend de weinig aantrekkelijk ogende, maar onschuldige, schuimvorming die elk voorjaar op de stranden ontstaat. Het schuim ontstaat doordat de in grote aantallen voorkomende alg *Phaeocystis pouchetii* een eiwitachtige substantie afscheidt, die door de golfwerking wordt opgeklopt. De meest ernstige ontwikkeling, echter, is de toename van de aantallen toxische algen in het kustwater. Recentelijk zijn zelfs bloeien van dit soort algen voorgekomen, zoals in 1988 voor de Noorse en Zweedse kust van *Chrysochromulina polylepis*. Het massaal voorkomen van deze alg leidde met name voor de Noorse kust tot de dood van talloze invertebraten en vissen. Langs de Nederlandse kust zijn de laatste jaren geen massale bloeien van giftige algen geconstateerd, wel zijn in het afgelopen jaar op diverse plaatsen in het Nederlands continentaal plat concentraties van meer dan 1000

cellen per liter aangetroffen van de potentieel toxische algen *Prorocentrum micans* en *P. balticum*, van *Dinophysis acuminata* en *D. rotundata* en van *Gyrodinium aureolum*.

Om trends in de abundantie en in de soortensamenstelling van de in de Nederlandse wateren voorkomende algen te kunnen vaststellen is kort geleden een uitgebreid monitoringprogramma gestart. Op een groot aantal locaties worden in de zomerperiode, wanneer de algenconcentraties het hoogst zijn, eens per twee weken en in de winterperiode maandelijks monsters genomen; hierin worden vervolgens in het laboratorium de aanwezige algen gedetermineerd. Het monitoringsprogramma beoogt niet alleen trends vast te stellen in de ontwikkeling van de algenproblematiek. Een tweede doelstelling is meer inzicht te krijgen in de opeenvolging (successie) van de meest voorkomende soorten in de algenpopulatie, met name met het doel meer inzicht te verkrijgen in de oorzaak voor de aanwezigheid van steeds meer giftige algen. Een ander aandachtspunt is de studie van het ontstaan, het voorkomen en de aard van algenbloeien in de Nederlandse kustwateren.

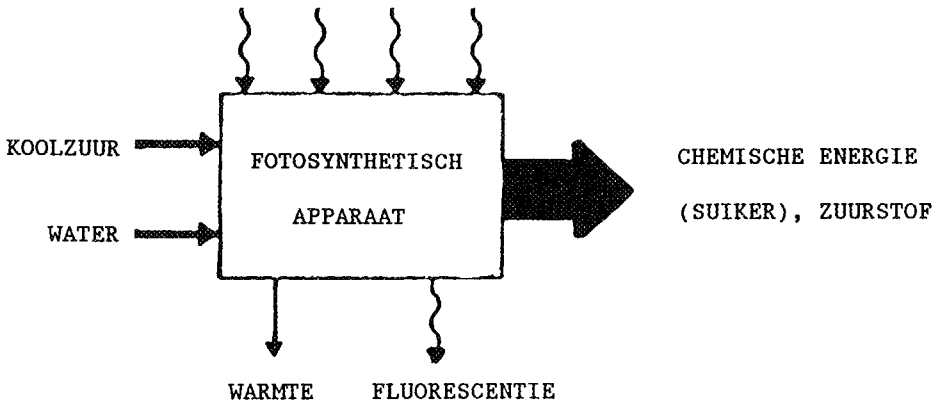
Zowel voor het monitoringsprogramma van fytoplankton als voor de studie van algenbloeien worden met name optische technieken ingezet. De toegepaste methodieken variëren van microscopische analyse en flow cytometrie, in het laboratorium, tot in situ metingen op zee en remote sensing waarnemingen vanuit de ruimte. In dit artikel zal in de eerste plaats worden ingegaan op de relevante optische eigenschappen van algen. Vervolgens zullen een aantal optische technieken die door de Dienst Getijdewateren worden toegepast, cq. ontwikkeld, voor de bepaling van fytoplankton nader worden besproken. Slotte zal gepoogd worden de samenhang van de verschillende benaderingen alsmede hun sterke en zwakke punten in kaart te brengen.

2. Optische eigenschappen van fytoplankton

De eigenschap van fytoplankton waarvan het meest veelvuldig gebruik gemaakt wordt bij optische bepalingen is de karakteristieke rode fluorescentie die de meeste algensoorten uitzenden. Dit emissielicht wordt gegenereerd door excitatie van het pigment chlorophyll *a*, dat een centrale rol speelt als "antenne" molecuul dat de voor de fotosynthese benodigde lichtenergie opvangt. Door selectieve meting van de rode fluorescentie van chlorophyll *a* kan het fytoplankton onderscheiden worden van andere fluorescerende substanties in het water (bijv. opgelost organisch materiaal of "yellow substance", dat maximale emissie vertoont in het blauw).

De intensiteit van de chlorophyll fluorescentie kan gebruikt worden als een grove indicatie van de algenbiomassa. Bij de toepassing van deze meting voor kwantitatieve doeleinden moet men zich echter realiseren dat de quantumopbrengst van de chlorophyll fluorescentie niet uitsluitend afhankelijk is van de hoeveelheid chlorophyll. Zoals schematisch is weergegeven in Fig 1 wordt de totale lichtenergie die uit het zonlicht door het fytoplankton wordt opgenomen op drie manieren "verbruikt". In de eerste plaats wordt de opgenomen energie omgezet in chemische energie; dit is de eigenlijke fotosynthese. Daarnaast komt echter een hoeveelheid energie weer onbenut vrij: deels in de vorm van warmte en deels als fluorescentielicht. De chlorophyll fluorescentie is dus een bijproduct van de fotosynthese, en is eigenlijk niet gewenst. In een gezonde, optimaal functionerende alg is de chlorophyll fluorescentie dan ook minimaal. Minder optimale omstandigheden kunnen resulteren in een verhoogde fluorescentiequantumopbrengst, hetgeen ten koste gaat van de fotosynthetische capaciteit. Door gebruik te maken van tijdsopgeloste fluorescentiemetingen blijken echter wel betrouwbare kwantitatieve bepalingen mogelijk: de prompte fluorescentie van chlorophyll blijkt

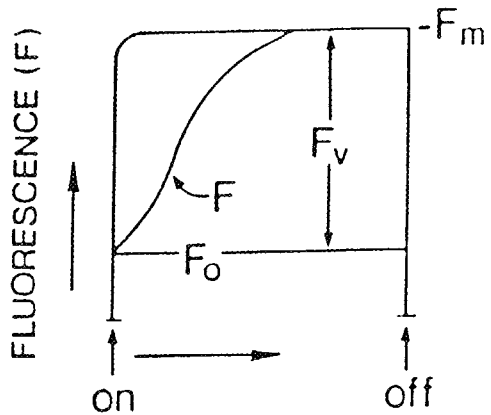
LICHT



Figuur 1

Schematische weergave van de fotosynthese in algen. Zonlicht wordt gebruikt om uit koolzuur en water chemische energie te produceren, dat in de algen beschikbaar is in de vorm van suikers. Als bijproducten ontstaan warmte en fluorescentie.

namelijk nauwelijks afhankelijk van de fysiologische toestand van het fytoplankton (zie Fig. 2). Aan de andere kant kan de meting van fluorescentie inductiecurven worden gebruikt als graadmeter voor de vervuiling van het watersysteem. Met name herbiciden en zware metalen hebben reeds bij relatieve lage concentraties een sterk effect op de tijdsafhankelijke fluorescentie-intensiteit. Een interessant aspect van deze benaderingswijze is dat met behulp van algen op eenvoudige wijze een globaal beeld van de waterkwaliteit kan worden verkregen. Dit beeld kan gebruikt worden ter indicatie van nader, meer specifiek, onderzoek. Tenslotte kunnen tijdsopgeloste metingen worden aangewend om een beeld te krijgen van de fotosynthetische capaciteit van het fytoplankton. De fotosynthetische capaciteit is direct gerelateerd met de primaire productie, de groeisnelheid van de algen. Op deze wijze kan direct een beeld verkregen worden van dynamische eigenschappen van een fytoplanktonpopulatie. Dit is van veel belang voor de studie van processen die het ontstaan van algenbloeiën bepalen.



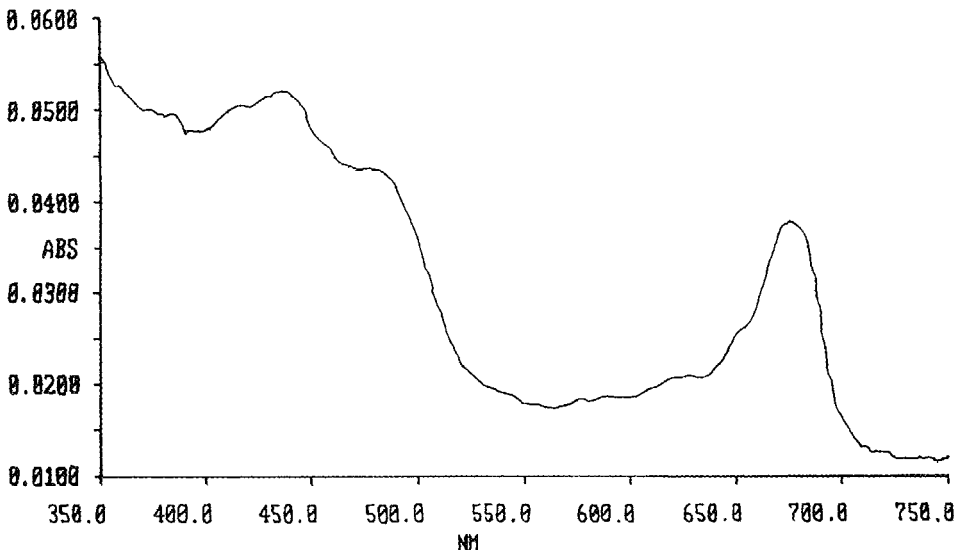
Figuur 2

Tijdsopgelost beeld van een fluorescentie inductiecurve. Als excitatie van het fytoplankton begint ontstaat momentaan de prompte fluorescentie F_0 . Vervolgens neemt de fluorescentie intensiteit verder toe volgens curve F , totdat de maximale fluorescentie F_m wordt bereikt. Het verschil in intensiteit tussen de prompte en maximale fluorescentie wordt de variabele fluorescentie, F_v , genoemd. Indien de fotosynthese, bijvoorbeeld door herbiciden, geblokkeerd is, neemt de fluorescentie intensiteit direct toe tot F_m . De totale fluorescentie inductiecurve beslaat een aantal seconden.

Behalve chlorophyll *a* bevatten alle fytoplanktonsoorten ook een scala van additionele, "accessoire" pigmenten. Met name op grond van de pigmentensamenstelling is een globale indeling van het fytoplankton in een aantal hoofdgroepen gemaakt. De pigmentsamenstelling beïnvloedt vooral het absorptiespectrum (of: fluorescentie excitatiespectrum) van algen. Het door de additionele pigmenten geabsorbeerde licht wordt in het algemeen met hoge efficiëntie overgedragen aan chlorophyll *a*. Daarnaast hebben veel pigmenten een lage fluorescentiequantumopbrengst. De meeste additionele pigmenten worden dan ook niet in het emissiespectrum waargenomen. Op grond van de specifieke absorptie-eigenschappen van de pigmenten worden de verschillende hoofdgroepen vaak gekenmerkt door een karakteristieke kleur. Bijvoorbeeld groenalgen (of Chlorophyceae) bevatten naast chlorophyll *a* ook chlorophyll *b* als additioneel pigment. Het absorptiespectrum van de groenalg *Dunaliella* sp. is afgebeeld in Fig. 3

Belangrijke absorpties treden op in het blauwe golflengtegebied (absorptiemaxima: 435 nm voor chlorophyll *a* en 480 nm voor chlorophyll *b*) en in het rood (absorptiemaxima: 680 nm voor chlorophyll *a* en 650 nm voor chlorophyll *b*). Suspensies van *Dunaliella* zijn dus groen gekleurd.

Een tweetal klassen van pigmenten blijken wel waargenomen te kunnen worden in het emissiespectrum: de phycoerythrinen en de phycocyaninen. Phycoerythrinen geven oranje fluorescentie (maximum bij 570-580 nm); het fluorescentiemaximum van de phycocyaninen is verder naar het rood verschoven (630-660 nm). Beide pigmenttypen komen voor in blauwalgen of Cyanophyceae, en in Cryptophyceae. In Fig. 4 zijn fluorescentie emissiespectra weergegeven van een drietal algen, die naast chlorophyll *a* ook een tweede fluorescerend pigment bevatten. Bij excitatie in het groen, bij 530 nm, wordt met name het additionele pigment in de aangeslagen toestand gebracht. *Synechococcus* sp. en *Rhodomonas* sp. bevatten beide phycoe-



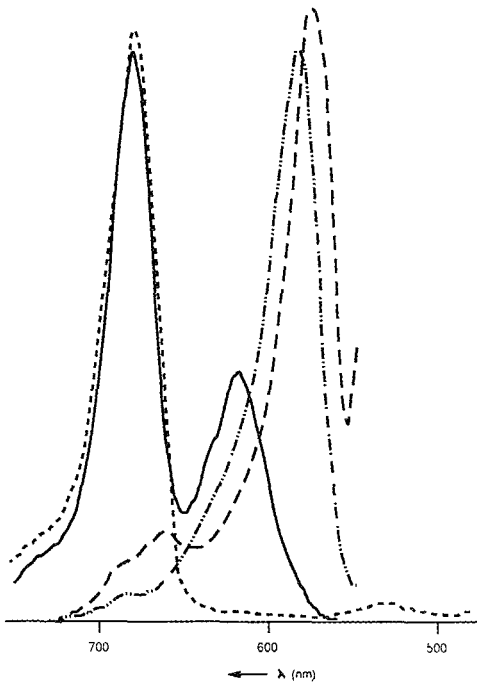
Figuur 3
Absorptiespectrum van een culture van de groenalg *Dunaliella* sp. Het spectrum is opgenomen met een Perkin Elmer Lambda 9, uitgerust met een accessoire voor de meting van sterk strooiende oplossingen.

rythrine en vertonen derhalve oranje fluorescentie. *Cryptomonas ovata* bevat phyco-cyanine; het meest kortgolvlige fluorescentiemaximum ligt bij 662 nm. Voor excitatie bij 530 nm wordt relatief weinig rode chlorophyll a fluorescentie waargenomen. Bij 450 nm absorbeert dit pigment echter sterk, in tegenstelling tot de phycoerythrienen en phycocyaninen.

Dinoflagellaten, een klasse van algen waartoe de meeste giftige soorten behoren, blijken vaak groene luminescentie te

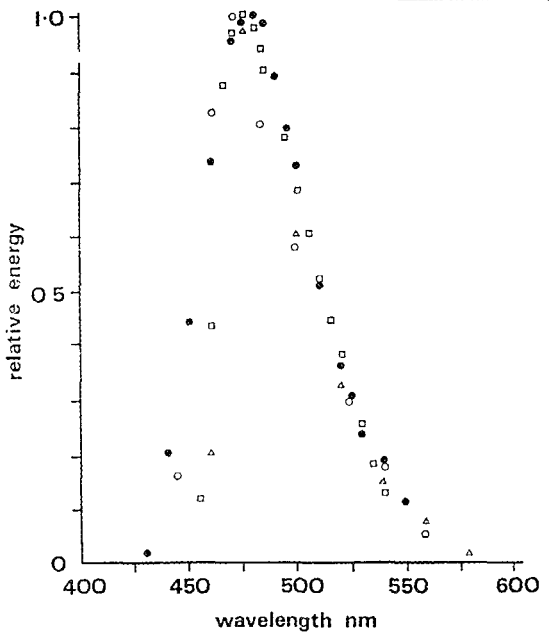
Fluorescence emission spectra

- Cryptomonas ovata, $\lambda_{exc} = 450$ nm
- Cryptomonas ovata, $\lambda_{exc} = 530$ nm
- - - Synechococcus sp, $\lambda_{exc} = 530$ nm
- · - Rhodomonas sp, $\lambda_{exc} = 530$ nm



Figuur 4

Fluorescentiespectra van cultures van de Cryptophyceae *Rhodomonas* sp. en *Cryptomonas ovata* en van de blauwalg *Synechococcus* sp. Al deze algen bevatten oranje-rood fluorescerende pigmenten. De spectra zijn opgenomen met een Perkin Elmer MPF 44 fluorescentie spectrofotometer



Figuur 5

Bioluminescentie spectra van een aantal veel voorkomende Dinoflagellaten (*Noctiluca scintillans*, *Pyrodinium bahamense*, *Gonyaulax polyedra* en *Pyrocystis lunula*). Uit: P.B. Tett and M.G. Kelly, Marine bioluminescence, Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev. Vol. 11, 1973, 89.

geven. Het exacte mechanisme is nog niet duidelijk, maar in het algemeen wordt aangenomen dat de luminescentie wordt veroorzaakt door een chemische reactie. Een vergelijkbaar proces is de oorzaak van de bekende bioluminescentie van de vuurvlug, die zijn oorsprong vindt in de omzetting van het moluciferaal luciferine onder invloed van het luciferase enzym. De bioluminescentie van de alg *Noctiluca scintillans* is op warme zomerdagen aan het strand zichtbaar als het blauwgroene "oplichten" van de zee. De chemische reactie die de bioluminescentie genereert wordt hier geïnduceerd door stress die het gevolg is van de golfbeweging. In Fig. 5 staan bioluminescentiespectra van een aantal veel voorkomende dinoflagellaten weergegeven.

Algen zijn kleine partikels die in het algemeen in suspensie gemeten worden. Voor optische metingen betekent dit dat rekening gehouden moet worden met het optreden van aanmerkelijke, golflengte afhankelijke, lichtverstrooiing (de afmetingen van algen kunnen variëren van minder dan 1 μm tot enkele μm) Wordt luminescentie gemeten aan weinig geconcentreerde monsters of in situ, dan kunnen lichtverstrooiingseffecten meestal verwaarloosd worden. Bij de meting van absorptiespectra, vaak aan meer geconcentreerde suspensies, zal lichtverstrooiing in belangrijke mate bijdragen aan de gemeten lichtverzwakking. Conventionele absorptiespectrometers zijn derhalve niet zo geschikt voor bestudering van algen. Het in Fig. 3 afgebeelde spectrum is verkregen met behulp van een speciale accessoire voor sterk strooiende monsters. In deze accessoire, die op eenvoudige wijze in een conventionele absorptiespectrometer kan worden aangebracht, wordt de verzwakte lichtbundel direct achter de cuvet gemeten. Op deze wijze wordt het voorwaarts verstrooide licht maximaal gedetecteerd. Een andere benadering is het monster te plaatsen in een bol, waarvan de binnenzijde voorzien is van een diffuus reflecterende oppervlaktelaag.

Lichtverstrooiing kan ook in positieve zin aangewend worden. Bij meting van individuele algen, zoals in een flow cytometer, kunnen specifieke lichtverstrooiingseigenschappen worden gebruikt voor identificatie. De Coccolithophoren, bijvoorbeeld, zijn een groep algen met een celwand die is opgebouwd uit een kalkskelet; dit soort algen geeft een zeer sterke *verstrooiing* van het opvallende licht. In een volgende paragraaf zal nader op mogelijkheden van flow cytometrische analyse van algen worden ingegaan.

3. Bepaling van fytoplankton in zee-water

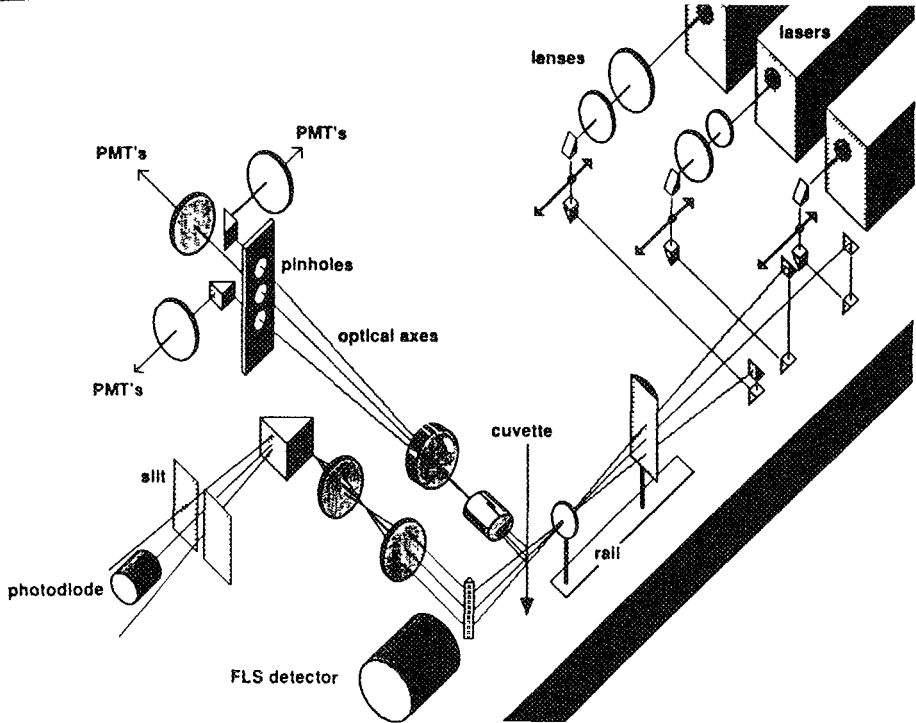
Op dit ogenblik worden een aantal bepalingmethoden voor fytoplankton bij de

Dienst Getijdewateren (DGW) toegepast en zijn een aantal nieuwe technieken in ontwikkeling. De methodieken hebben met name ten doel de biomassa en verspreiding alsmede de soortensamenstelling van het fytoplankton in het Nederlandse deel van het continentaal plat te bepalen. Achtereenvolgens zullen laboratoriumtechnieken, in situ methoden en remote sensing worden besproken

3.1 Laboratoriumtechnieken

In het kader van het biologische monitoringsprogramma van fytoplankton worden met behulp van meetschepen op tal van plaatsen in de Noordzee, het Deltagebied en in de Waddenzee watermonsters genomen. De monsters worden ter plaatse geconserveerd en ter analyse aangeboden aan het laboratorium van DGW. Deze monsters worden in eerste instantie visueel geïnspecteerd. In het oppervlaktewater zijn de meeste algen kleiner dan 50 μm , maar ook komen kolonievormende algen voor. Deze kunnen een grootte van enkele mm bereiken en zijn dus met het blote oog waarneembaar. Voor visuele identificatie is echter altijd gebruik van een lichtmicroscoop en — voor de kleinere soorten — soms van een elektronenmicroscoop noodzakelijk. De microscopische determinatie en telling van fytoplankton is een uitermate tijdrovend werk. Om met voldoende significantie de samenstelling van de monsters te bepalen moeten honderden algen worden bekeken; dit vergt ongeveer een halve dag per monster.

Om (een deel van) het telwerk te versnellen en te automatiseren wordt op dit ogenblik een flow cytometer bij DGW geoperationaaliseerd. Met behulp van een dergelijk apparaat kunnen met zeer hoge snelheid optische eigenschappen van individuele deeltjes in een watermonster worden gemeten. Op basis van de verkregen gegevens kunnen de deeltjes vervolgens worden geïdentificeerd en geteld. De flow cytometrische analyses worden uitgevoerd aan levend materiaal; ten gevolge van de toe-



Figuur 6

Diagram van het optisch ontwerp van de Optical Plankton Analyser. Uit G B J Dubelaar et al , Optical plankton analyser, a flow cytometer for plankton analysis, Cytometry, Vol 10, 1989, 529.

passing van conserveringstechnieken wordt namelijk de chlorofyll fluorescentie van de algen in negatieve zin beïnvloed. Een schematische weergave van de flow cytometer is afgebeeld in Fig. 6. Het centrale deel van een flow cytometer is een dunne monsterstroom die door een veel grotere stroom van een mantelvlloeistof verdund en hydrodynamisch gefocuseerd wordt. De deeltjes in het monster passeren dientengevolge stuk voor stuk een cuvet waarop een drietal lasers is gericht. De lasers, een Ar-ion laser (529 nm), een HeCd laser (442 nm) en een HeNe laser (633 nm), induceren fluorescentie en strooilight. De optische effecten worden geselecteerd qua golflengte met behulp van dichroïtische spiegels en kleurfilters en gedetecteerd door photomultipliers en fotodiodes. In totaal kunnen per deeltje 7 optische effecten worden bepaald. De meest gebruik-

te parameters staan vermeld in tabel 1. De parameters zijn zo gekozen dat maximale informatie over de aard van het deeltje wordt verkregen. De chlorofyll fluorescentie wordt gemeten met verschillende excitatiegolflengten om via spectraalanalyse de pigmentensamenstelling van de algen te kunnen bepalen. Ook worden de oranje en de groene luminescentie van de deeltjes gemeten, die kenmerkend zijn voor specifieke algenfamilies. De bepaling van de loodrechte lichtverstrooiing (PLS) levert een parameter op die afhankelijk is van de vorm van de deeltjes. Tevens wordt de tijdsduur bepaald van het optische effect dat wordt gebruikt om de meting te triggeren. Voor algen wordt meestal de rode fluorescentie van chlorofyll *a* als trigger gebruikt. De detectie van strooilight is in het algemeen hiervoor niet geschikt, aangezien ook andere deeltjes dan fyto-

Tabel 1. Flow cytometer parameters

Afkorting	Excitatiegolflengte (nm)	Detectiegolflengte (nm)
FBG	442	480 - 550
FBO	442	550 - 650
FBR	442	> 665
FGP	529	550 - 650
FGR	529	> 665
FRR	633	> 665
PLS	529	529

plankton in dat geval de bepaling zouden storen. De gemeten tijdsduur is een maat voor de lengte van het deeltje. Alle bepaalde meetwaarden worden per deeltje opgeslagen in een microcomputer, en zijn beschikbaar voor verdere verwerking en interpretatie.

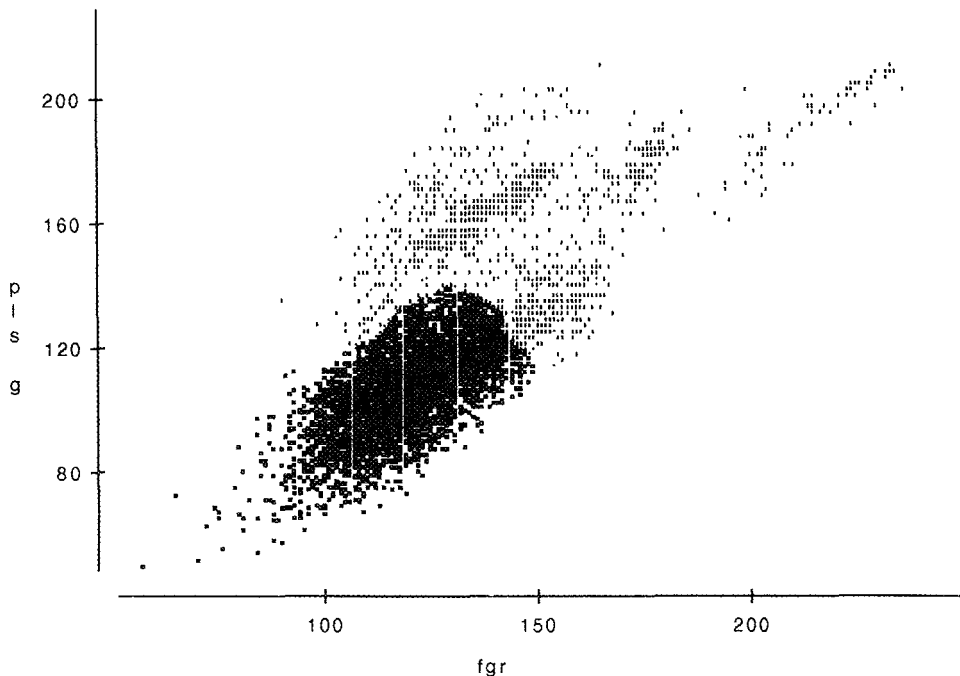
De flow cytometer die door DGW wordt toegepast is speciaal voor de bepaling van fytoplankton gebouwd door het Instituut voor Toegepaste Radiobiologie en Immunologie TNO. Commercieel verkrijgbare instrumenten bleken niet geschikt voor de meting van algen; zij zijn met name geconstrueerd voor de meting van dierlijke cellen, die veel kleiner en uniformer van vorm zijn dan planktoncellen. Met name kolonievormende algen, die veelvuldig voorkomen in het kustwater, die forse afmetingen kunnen hebben, zijn met de gebruikelijke flow cytometers niet te meten. In de algen flow cytometer OPA ("Optical Plankton Analyser") zijn een aantal speciale voorzieningen aangebracht om de bepaling van algen mogelijk te maken. Dit betreft vooral de constructie van de cuvet en de signaalverwerkingselectronica. Aangezien er nog weinig ervaring is met de flow cytometrische analyse van fytoplankton is voorts gekozen voor een flexibele en modulaire opzet van het apparaat.

De mogelijkheden van de OPA voor automatische telling van algen worden geïllustreerd in Fig. 7. Hier is een deel van de resultaten van de flow cytometrische bepaling van algen in een Noordzeemonster weergegeven (genomen 10 km uit de kust

ter hoogte van Noordwijk). Uit de figuur, een scatterplot waarin de PLS groen staat uitgezet tegen de FGR, komen een aantal clusters naar voren die na vergelijking met microscopische observatie geïdentificeerd kunnen worden. Uiteraard worden bij deze vergelijking ook andere met de flow cytometer bepaalde parameters ingezet. De figuur toont de resultaten van een meting van meer dan 10000 deeltjes, die in totaal ca. 15 minuten vergde. De microscopische determinatie van zoveel algen zou dagen duren. Behalve een belangrijke tijdswinst levert de flow cytometer dus ook een statistisch veel significantere bepaling op. Een ander voordeel van de OPA boven microscopische analyse is dat ook de kleinere algen, die een belangrijk aandeel van de totale biomassa vormen, goed bepaald kunnen worden. Vrijwel de gehele cluster vet afgedrukt linksonder in Fig. 7, die bestaat uit rood fluorescerende algen met afmetingen kleiner dan 15 μm , wordt niet gezien bij microscopische analyse. Deze kleine algen blijken meer dan 90% van het totale aantal algen te vormen.

Een andere benadering om de bepaling van fytoplankton te versnellen is de toepassing van video microscopie, eventueel gekoppeld aan geautomatiseerde beeldanalyse. Deze techniek wordt (nog) niet toegepast door DGW.

Aan de algenmonsters worden tenslotte een aantal meer chemische bepalingen uitgevoerd. Met name de bepaling van het totale chlorophyll *a* gehalte is hier relevant. Teneinde de problemen die het gevolg zijn



Figuur 7

Bivariate plot van door 529 nm laserlicht geïnduceerde zijwaartse lichtverstrooiing en rode chlorophyll fluorescentie. Gemeten door de OPA voor een watermonster genomen 10 km uit de kust ter hoogte van Noordwijk op 8 mei 1990. In de figuur zijn clusters geïdentificeerd van de diatomeen *Rhizosolenia delicatula* en *Rh. stolterfothii*, *Guinardia flaccida* en *Cerataulina bergonii*. De zeer veel algen bevattende cluster links onder bevat deeltjes die te klein zijn voor microscopische bepaling (onder 10 μm).

van de variabele fluorescentie in levende algen uit te sluiten, wordt deze bepaling gedaan aan een extract van chlorophyll *a* in aceton. Het extract wordt bovendien onderworpen aan een chromatografische scheiding om interferentie van andere rood fluorescerende verbindingen uit te sluiten.

3.2 *In situ* technieken

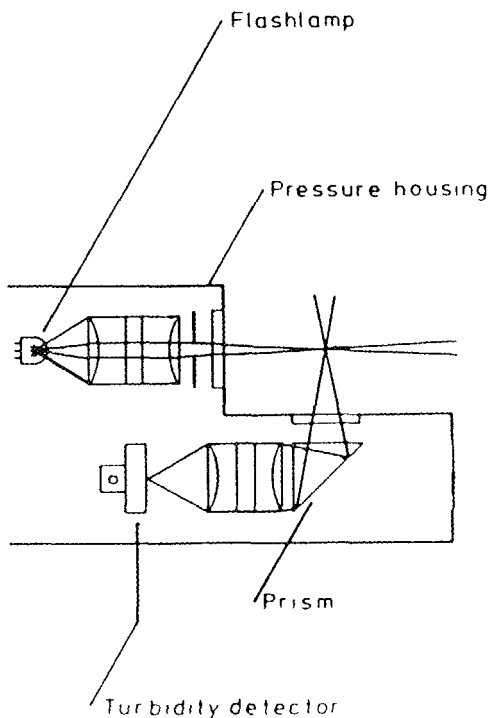
Laboratoriumbepalingen worden uitgevoerd aan monsters die op een bepaalde plaats op een bepaald tijdstip genomen zijn. De verkregen gegevens zijn derhalve zeer beperkt ten aanzien van grootschalige processen en zijn ook niet bij uitstek geschikt om korte termijn trends vast te stel-

len. Indien men zich realiseert dat sommige algensoorten zich, vooral in de zomerperiode, meermalen daags delen, dan is het duidelijk dat een bemonsteringsfrequentie van eenmaal per twee weken niet altijd adequaat is. Door toepassing van *in situ* technieken kan aan beide bezwaren van de laboratoriumtechnieken tegemoet gekomen worden.

In het fytoplanktononderzoek van Rijkswaterstaat worden twee benaderingen van metingen ter plaatse toegepast. In de eerste plaats wordt aan boord van een aantal meetschepen continu fluorescentie gemeten met behulp van een fluorimeter die is opgenomen in een circuit waardoor voortdurend water stroomt dat vanuit het oppervlaktewater wordt opgepompt. Op

deze wijze kan snel en eenvoudig een beeld worden verkregen van de verdeling van fytoplankton over grotere gebieden. De toegepaste fluorimeter is een Turner model 10 filter fluorimeter. Dit is een uitermate rigide apparaat, dat speciaal is ontwikkeld voor toepassing in het "veld". De Turner fluorimeter maakt gebruik van filters om een golflengteband in het blauw/groen te verkrijgen voor excitatie en om de rode chlorophyll fluorescentie te selecteren. Er wordt dus geen spectrale informatie verkregen die toegepast zou kunnen worden voor een nadere identificatie van het fytoplankton. Op dit moment wordt gewerkt aan de realisering van een continue fluorescentie meetopstelling aan boord van een veerboot. Uit deze metingen, die dagelijks plaats zullen vinden, zal naar verwachting zeer bruikbare informatie verkregen worden over de verspreiding van fytoplankton over grote ruimtelijke schalen met een goede resolutie in de tijd.

Een tweede benadering is de toepassing van meetinstrumenten die in situ, in het zeewater zelf dus, worden gebruikt. Dit soort apparaten, geheel ingebouwd in een waterdichte en drukbestendige behuizing, kan tot op grote diepte worden gebruikt. Een voorbeeld is de Aquatracka fluorimeter van Chelsea Instruments; het optische schema staat weergegeven in Fig. 8. Ook de Aquatracka is een filterinstrument. Door het excitatiefilter wordt een golflengteband van 450 ± 100 nm geselecteerd; het emissiefilter laat golflengten boven die 665 nm door. Toepassing van andere filtercombinaties maakt ook meting van troebelheid (via de lichtverzwakking; zelfde filters in excitatie en emissie) of olie (via UV excitatie) mogelijk. In de Aquatracka wordt een gepulste Xe-lamp gebruikt voor excitatie in combinatie met tijdsopgeloste detectie van de emissie, zodat geen storende effecten van het omgevingslicht kunnen optreden. De excitatie energie wordt per puls gemeten met behulp van een beamsplitter en referentiemeting, de referentiemeting



Figuur 8
Optisch ontwerp van de Chelsea Instruments
Aquatracka

wordt gebruikt om de gemeten fluorescentie per puls te corrigeren. Het instrument is bijzonder gevoelig: de detectiegrens is 10^{-11} g/ml chlorophyll in aceton.

Sinds kort bevindt een dergelijke in situ fluorimeter zich aan boord van een meetschip van Rijkswaterstaat, met vooral als doel de monsternamen van fytoplankton te sturen. In de zomerperiode, wanneer er weinig wind is en derhalve de golfbeweging beperkt, treedt er op tal van plaatsen in het Nederlandse continentaal plat stratificatie van de waterkolom op. In gestratificeerde wateren is de verdeling van het fytoplankton in de verticaal vaak uitermate inhomogeen. Om een goed beeld te krijgen van zowel de abundantie van het fytoplankton

als de dominante soorten moet in die gevallen de monstername gestuurd worden door in situ metingen. Daarnaast kunnen in situ fluorimeters gebruikt worden voor continue registratie van het fytoplankton.

De mogelijkheden voor onderzoek gebruik makende van commerciële verkrijgbare in situ fluorimeters zijn beperkt: de instrumenten zijn ontwikkeld voor bepaalde toepassingen en moeilijk aan te passen. Een nieuwe benadering van meting van fytoplankton ter plaatse bevindt zich op dit ogenblik bij DGW in een verkennend stadium: door toepassing van optische fibers is het mogelijk zonder al te grote verliezen licht naar en van de meetlocatie te transporteren. Intussen kan aan boord van het meetschip redelijk geavanceerde apparatuur worden gebruikt voor excitatie en voor detectie van het emissielicht. Op deze wijze kunnen nu in situ optische technieken worden toegepast, die voorheen uitsluitend in een laboratorium gebruikt konden worden. Metingen met behulp van optische fibers kunnen worden aangewend om nieuwe in situ meetprincipes te ontwikkelen. Hierbij moet men zich bedenken dat het in het algemeen zo is dat, hoe gering de verliezen tengevolge van lichttransport ook zijn, door de relatief kleine effectieve openingshoek de meting met behulp van optische fibers het qua gevoeligheid zal afleggen tegen een in situ instrument ontworpen voor dezelfde meting. Een erg interessante mogelijkheid van de meting met optische fibers is het bepalen van eigenschappen van fytoplankton in zijn natuurlijke omgeving. Het blijkt namelijk dat de optische eigenschappen van algen (bijvoorbeeld de fluorescentie intensiteit, zie boven) sterk afhankelijk zijn van omgevingsfactoren. Snel na de monstername blijken zich al veranderingen voor te doen in de fysiologische toestand van het fytoplankton.

3.3 Remote sensing

De nieuwste ontwikkeling bij DWG is de toepassing van remote sensing voor de be-

paling van fytoplankton. Met behulp van satellieten worden met hoge frequentie opnames gemaakt van het aardoppervlak. Met name de Amerikaanse NOAA satelliet die tweemaal daags een opname maakt van de Noordzee is bruikbaar voor monitoringsdoeleinden; andere satellieten bestrijken per overtocht een veel smallere band op het aardoppervlak en leveren dus slechts een beperkte hoeveelheid geschikte beelden op (overkomst ca. eenmaal per twee weken, met grote kans op uitval vanwege atmosferische omstandigheden).

De NOAA satelliet maakt als het ware een luchtfoto van de Noordzee: de intensiteit van het gereflecteerde zonlicht wordt in een aantal spectrale banden bepaald. Helaas is de spectrale resolutie van de NOAA opnamen gering; slechts een enkele band in het zichtbare gebied (580-680 nm) kan gebruikt worden om de verspreiding van algen vast te stellen. Voorlopige resultaten duiden erop dat met behulp van NOAA opnamen algenbloeien kunnen worden gedetecteerd. Voor nadere bepalingen is betere spectrale resolutie nodig.

De NOAA satelliet maakt gebruik van passieve remote sensing: de kleur van de Noordzee als gevolg van de instraling door de zon wordt gemeten. Een andere benadering, die veel gevoeliger is, maakt gebruik van een gepulste laser om algenfluorescentie te induceren. Toepassing van een gepulste laser in combinatie met tijdsopgeloste detectie maakt zelfs — beperkte — bepaling van de verdeling van het fytoplankton in de waterkolom mogelijk. Op dit ogenblik wordt actieve remote sensing, zoals deze benadering wordt genoemd, niet door DGW toegepast.

4. Evaluatie van optische methoden voor de bepaling van fytoplankton

Voor de bepaling van fytoplankton kunnen aantal, zeer uiteenlopende technieken toegepast worden, die allen hun sterke kanten en tekortkomingen hebben.

Laboratoriumtechnieken leveren de meest specifieke informatie op. Met behulp van visuele microscopische inspectie kunnen

grotere algen optimaal gedetermineerd worden. In combinatie met flow cytometrie worden statistisch significante kwantitatieve bepalingen mogelijk. Tevens kunnen met de OPA ook kleinere algen goed gemeten worden.

In situ metingen bieden beperktere informatie, tenzij gebruik gemaakt wordt van geavanceerde meetsystemen gekoppeld met optische fibers. Aan de andere kant is het mogelijk meer consistent processen in de tijd te volgen. Ook kunnen op eenvoudiger wijze dan met laboratoriumtechnieken, die gebaseerd zijn op manuele monsternamen, gegevens verkregen worden over grotere gebieden. Met in situ metingen kan ook onderzoek gedaan worden aan algen in hun natuurlijke habitat.

Remote sensing, tenslotte, geeft de meest geschikte informatie over ruimtelijke spreiding van algen. Aan de andere kant geven remote sensing beelden kwantitatief weinig betrouwbare informatie (absolute hoeveelheden worden met een onzekerheid van een factor 2-3 verkregen). Ruimtelijke trends kunnen wel goed uit de foto's worden afgeleid.

Slechts toegepast in combinatie geven de genoemde benaderingen een samenhangend beeld van de toestand van en de trends in de algenproblematiek. Deze geïntegreerde benadering poogt DGW op dit moment te realiseren.

Referenties

Algenproblematiek

K. Richardson, Algal blooms in the North Sea: the Good, the Bad and the Ugly, Dana, Vol. 8, 1989, 83.

Fotosynthese, optische eigenschappen
J.T.O. Kirk, Light and photosynthesis in aquatic ecosystems, Cambridge University Press, Cambridge, 1986.

Flow cytometrie

Het gehele Vol. 10, no. 5, september 1989 van het tijdschrift Cytometry is gewijd aan de toepassing van flow cytometrie in de aquatische oecologie. In dit nummer staat o.a. ook een gedetailleerde beschrijving van de OPA

In situ metingen

J. Aiken, A chlorophyll sensor for automatic, remote operation in the marine environment, Mar. Ecol. Prog. Ser., Vol. 4, 1981, 235.

Toepassing van optische fibers

S.D. Personick, Fiber optics, technology and applications, Plenum Press, New York, 1985.

R.M. Measures, ed., Laser remote chemical analysis, Wiley, New York, 1988

Remote sensing

T. Platt and A.W. Herman, Remote sensing of phytoplankton in the sea: surface-layer chlorophyll as an estimate of water-column chlorophyll and primary production, Int. J. Remote Sensing, Vol. 4, 1983, 343
R.M. Measures, ed., Laser remote chemical analysis, Wiley, New York, 1988.