

Omkostningseffektiv overvågning af alger

I de seneste 4 årtier er der i Danmark indsamlet >10.000 marine vandprøver, hvor mængden og artssammensætningen af planktonalger er analyseret med mikroskop. Denne traditionelle analysemetode er dyr sammenlignet med nye optiske metoder, som gør det muligt at analysere flere prøver på kortere tid. Nye instrumenter kan ikke helt erstatte mikroskopet, men en kombination vil forbedre overvågningen.

JACOB CARSTENSEN, LUMI HARAGUCHI
& HANS JAKOBSEN

Encellede planktonalger, også kaldet fytoplankton, udgør fundamentet for det marine fødenet som fødegrundlag for højere organismer. Men det er ikke kun mængden af planktonalger, som har betydning for, hvor produktivt vores marine økosystemer er. Størrelsessammensætningen af algesamfundet har også stor betydning for planktonalgernes omsætning i fødenettet. Derudover spiller sammensætningen af arter en afgørende rolle for produktionen af flerumættede fedtsyrer, som varierer betydeligt mellem de forskellige grupper af planktonalger /1/. Specielt kiselalger og furealger har et meget højt indhold af flerumættede fedtsyrer, hvilket er en del af forklaringen på, hvorfor kystnære områder har en højere produktion af fisk i forhold til primærproduktionen, når man sammenligner med søer og de åbne oceaner /2/. En stor produktion af planktonalger kan også give anledning til iltsvind, når de døde alger synker til bunden og bliver omsat ved dertil hørende iltforbrug. Nogle alger danner store opblomstringer, som om sommeren kan være til stor gene for badegæster og andre brugere af det danske havmiljø. Der er derfor al mulig grund til at overvåge planktonalgerne, for at beskrive og forstå de forandringer, som ændrede næringssaltstilførsler og klimaforandringer har på vores havmiljø.

Planktonalger indgår derfor som en naturlig del af det danske overvågningsprogram. Siden den første vandmiljøplan og frem til i dag er

mængden og sammensætningen af planktonalger bestemt ved at udtage en vandprøve, som fikseres med jod (Lugol's). Derefter udtages en delmængde af prøven, som analyseres i mikroskop, og de enkelte celler i delprøven identificeres efter størrelse og art af en person kyndig i planktonalgernes taksonomi. Oparbejdelsen af en enkelt prøve tager typisk 2-4 timer, afhængig af mængden af celler i prøven og artsdiversiteten, men resultaterne kan variere meget mellem personerne bag mikroskopet /3/. Fikseringen af prøven bevirker også, at cellerne skrumper og misfarves, nogle celler ødelægges, og flere kan ikke artsbestemmes, hvilket påvirker den samlede vurdering af artsammensætningen /4/. Ydermere er det vanskeligt at bestemme celler <5 μm i mikroskop, hvilket betyder, at mange små planktonalger ikke bliver talt og identificeret /5/.

Typisk indsamles prøver hver 14. dag eller

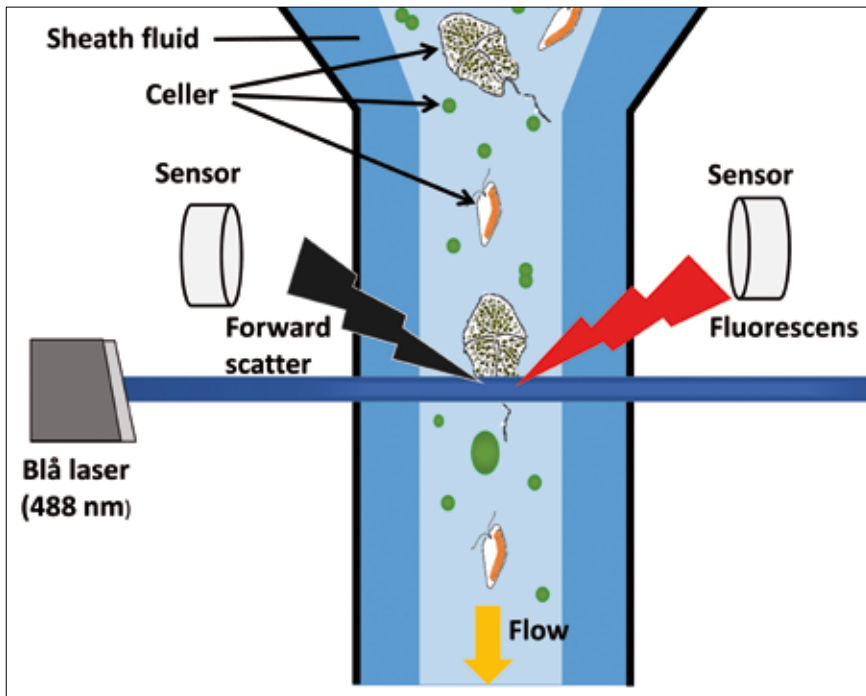
hver måned i overvågningsprogrammet, og de indsamles for et fåtal af alle overvågningsstationer. Prøvetagningsfrekvensen skal sammenholdes med generationstider på omkring 1 døgn for de fleste planktonalger. Dette betyder, at planktonalgensamfundet kan ændre sig på få dage, selvom dette naturligvis ikke sker hele tiden. De relativt store omkostninger ved oparbejdelse af planktonalgeprøver er årsagen til, at overvågningen er meget begrænset sammenlignet med andre målinger i overvågningsprogrammet.

Nye metoder til overvågning

I løbet af de seneste årtier er der udviklet en række nye instrumenter, baseret på optiske metoder, som kan anvendes til overvågning af planktonalger. Disse metoder har allerede fundet indpas i forskningsprojekter rundt omkring i verden, såvel som i Danmark, og der er



Figur 1: Pulse-shape recording FlowCytometer (PFCM) fra CytoSense, som er anvendt i denne artikel.



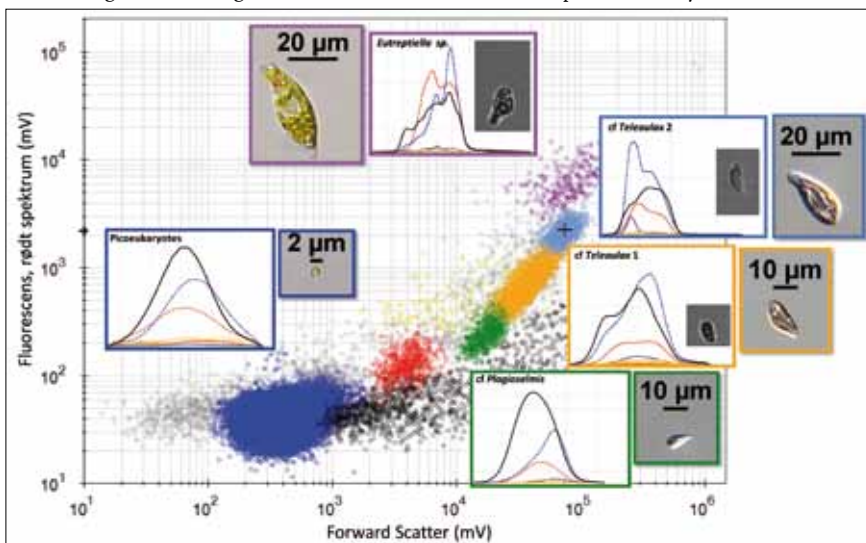
Figur 2: Principskitse af metoden i PFCM. I et tyndt strømningsslag bliver partikler, eksempelvis planktonalger, ført forbi en række optiske sensorer. De optiske profiler for hver celle lagres og kan efterfølgende analyseres med dertil hørende software.

opbygget tilpas erfaring med metoderne til at de vil kunne indgå i overvågningen. Vi vil her fokusere på et Pulse-shape recording FlowCytometer (PFCM), som vi har arbejdet med de seneste 5 år (se fig. 1).

Princippet i PFCM er, at alle celler i vandprøven føres forbi en række forskellige optiske sensorer i et tyndt væskelag der betegnes "sheath fluid" (se fig. 2). Sensorerne registrerer partiklens størrelse, samt en række optiske egenskaber, når cellen passerer forbi en laser, hvorved der dannes en digital puls profil af cellen (se fig. 3), som til en vis grad er arts-specifik. PFCM registrerer partikler fra $\sim 0,5 \mu\text{m}$ og op til $800 \mu\text{m}$, hvilket dækker størrelsesfordelingen for naturligt forekommende

planktonalgensamfund. Kombinationen af cellens størrelse, morfologi og optiske egenskaber (puls profilen, se fig. 3), benyttes til at klassificere de enkelte celler i et antal grupper, som i nogle tilfælde vil indeholde flere arter. Ydermere tages billeder af cellerne, som kan bruges til at identificere de mest karakteristiske arter. Det er dog ikke muligt at artsbestemme alle celler med PFCM. I forhold til det gældende overvågningsprogram vil muligheden for at undersøge planktonalger $< 5 \mu\text{m}$ være et stort skridt fremad.

Analysen af planktonalger i PFCM foretages på vandprøver, som ikke er fikseret, idet Lugol's påvirker cellernes optiske egenskaber. Derfor skal prøverne analyseres umiddelbart



Figur 3: Eksempel på opdeling af celler i grupper ud fra optiske egenskaber indikeret ved puls profiler. For hver gruppe er tilknyttet en art bestemt ved mikroskopi.

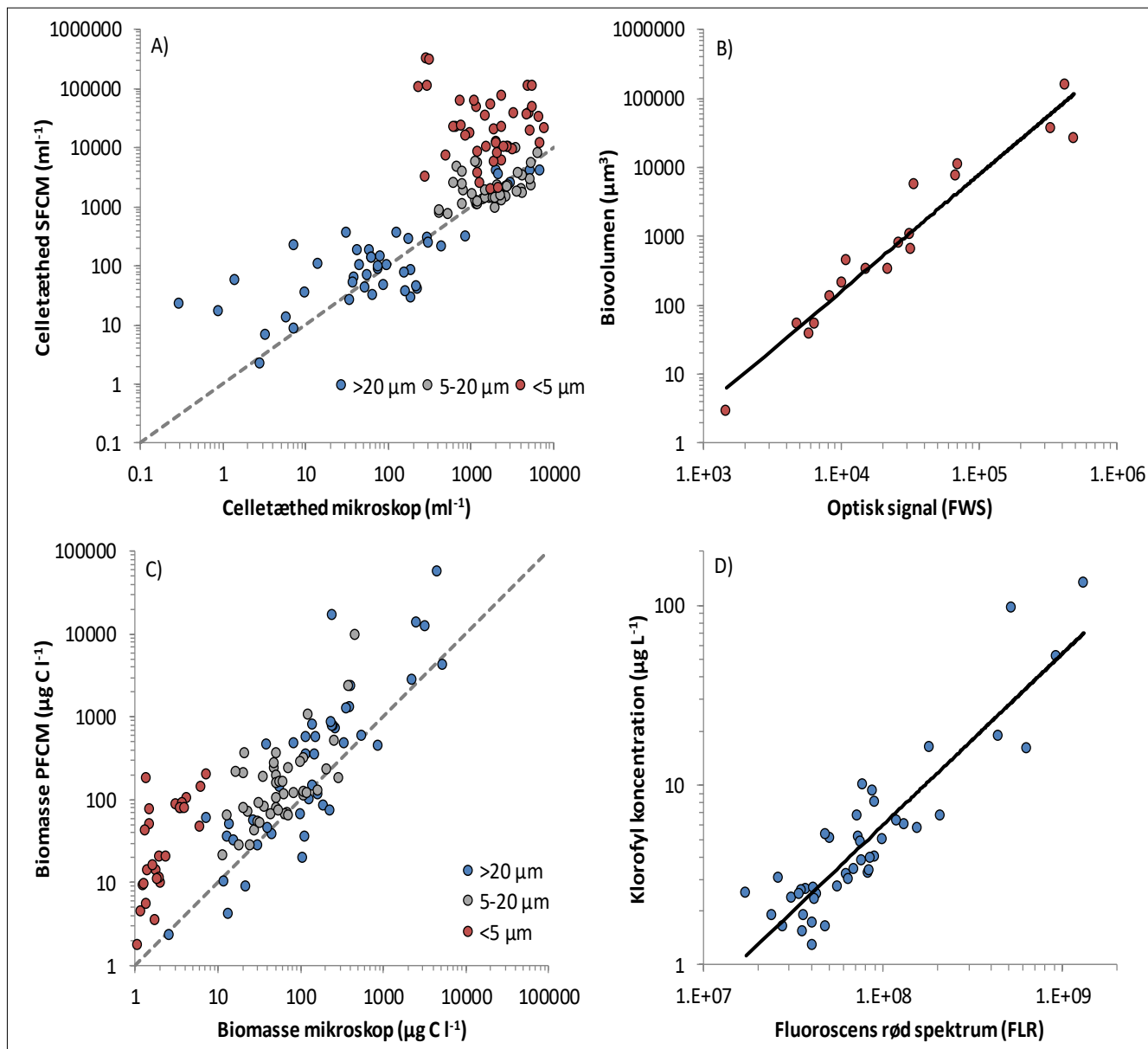
efter prøvetagning, helst indenfor 4 timer, da algesamfundet ellers vil kunne ændre sig. Instrumentet er "bærbart" og ikke større end, at det placeres ombord på de fartøjer, som benyttes i den danske overvågning. Det kan endvidere installeres på bøger til kontinuert måling af planktonalger. Typisk analyseres mellem 0,5 og 20 ml af vandprøven, afhængig af cellekoncentration, hvilket giver mulighed for meget præcise bestemmelser af de vigtigste algearter. Det tager typisk kun et par minutter at analysere en prøve med PFCM.

Algoritmen, som anvendes til at inddelle cellerne i grupper, konfigureres ud fra en række parametre. Eksempelvis sættes en nedre grænseværdi for de optiske egenskaber, som indikerer klorofyl pigment, for at skelne autotrofe planktonalger fra andre organismer. Da der er forskel på den typiske sammensætning af planktonalger i de danske farvande og deres optiske egenskaber, skal algoritmen konfigureres til specifikke områder. Dette gøres ved at sammenholde PFCM grupperingen med de mere detaljerede mikroskopanalyser, således at antallet af grupper og deres fordeling svarer til mikroskopanalysen (se fig. 3). Da indsamlet data gemmes digital, kan data genanalyseres senere, hvis det skulle vise sig nødvendigt. Denne mulighed er ikke mulig med fikserede prøver, der kasseres efter endt analyse.

Sammenligning med eksisterende overvågningsdata

Introduktion af nye metoder vækker altid bekymring, fordi der er usikkerhed om, hvorvidt nye typer af data er sammenlignelig med data fra eksisterende metoder, og dermed om eksisterende tidsserier bliver brudt. Vi har derfor undersøgt, om data fra PFCM er sammenlignelig med målinger af celledæthed, cellevolumen og kulstofbiomasse ud fra planktontællinger i mikroskop foruden klorofyl (se fig. 4). Til dette formål indsamlede vi vandprøver langs en saltgradient i Roskilde Fjord, således at vandprøverne repræsenterede stærkt varierende samfund /5/.

Tætheden af celler i vandprøverne fra PFCM og mikroskop var meget sammenlignelige for store ($> 20 \mu\text{m}$) og mellemstore ($5-20 \mu\text{m}$) planktonalger (se fig. 4A). Derimod blev der registreret mange flere små planktonalger ($< 5 \mu\text{m}$) med PFCM, hvilket understreger, at små celler i det nuværende overvågningsprogram er groft underestimeret. Sammenligning af gennemsnitlig cellevolumen for en række forskellige planktonarter (ikke fikserede prøver) viste stor overensstemmelse mellem mikroskop og PFCM instrumentets optiske sensorer. Denne relation (se fig. 4B) anvendte vi



Figur 4: Sammenligning af målinger fra PFCM med mikroskop. A) Celletæthed, B) gennemsnitlig biovolumen for en række karakteristiske arter, C) kulstofbiomasse og D) klorofyl mod fluorescens i det røde spektrum. Observationerne i A), C) og D) er analyseret fra vandprøver fra Roskilde Fjord og B) er baseret på analyser af algekulturer.

derfor som kalibreringskurve for at omsætte det mest egnede signal (forward scatter; FWS) for hver enkelt celle til et celle volumen, som efterfølgende blev omregnet til kulstofbiomasse ud fra videnskabeligt etablerede relationer, der er de samme, som anvendes for prøver analyseret med mikroskop /6/. Igen fandt vi en god overensstemmelse mellem de to metoder for kulstofbiomassen af store celler. Derimod var kulstofbiomassen for mellemstore alger ca. dobbelt så stor med PFCM, og meget større for de små alger (se fig. 4C). Samlet var kulstofbiomassen ca. dobbelt så stor, når den blev målt med PFCM. Disse resultater peger på, at den samlede biovolume og kulstofbiomasse af planktonalger bliver underestimeret, når prøverne fikseres med Lugol's og analyseres efterfølgende med mikroskop. Ydermere kan mængden af klorofyl i

vandprøven bestemmes med PFCM ud fra en sensor, som måler fluorescensen i det røde spektrum (se fig. 4D). Fordelen ved PFCM er, at man kan beregne klorofylindholdet for forskellige størrelsesgrupper direkte fra vandprøven, hvor det kræver filtreringer af vandprøven før en traditionel klorofylmåling.

PFCM kan ikke levere data med samme høje taksonomiske opløsning som mikroskopi, så det er nødvendigt at bibeholde mikroskopi-analyser, hvis der er behov for detaljeret taksonomisk viden om planktonalgensammensætning. Til dette formål ser vi en kombination af de to metoder som en oplagt overvågningsstrategi. Vandprøver kan indsamles og PFCM benyttes til at screene disse for væsentlige ændringer i planktonalgerne med langt større tidslig opløsning, end det er muligt for nærværende. En fikseret prøve kan op-

bevares til efterfølgende analyse, såfremt der er behov for at undersøge samfundet i detaljer på senere tidspunkt. Med en sådan kombineret strategi bliver det muligt at opnå tidsserier for planktonalger med højere frekvens.

En kombineret strategi vil gøre det muligt at styrke overvågningsprogrammet til at omfatte flere af vores fjorde, hvor vi i dag ingen viden har om samfundet af planktonalger, ud over måling af klorofyl. Klorofyl er dog ikke et særligt godt mål for mængden af planktonalger, da forholdet mellem biomasse og klorofyl varierer væsentligt henover året og som funktion af tilgængeligheden af næringsstoffer /7/.

Konklusion

Overvågningen af planktonalger i Danmark, og mange andre lande, er i dag baseret på analyse med mikroskopi – en 60 år gammel

metode, hvis begrænsninger er blevet mere og mere åbenlyse igennem årene. Specielt er der problemer med at benytte denne metode til at opnå kvantitative målinger, som beskriver mængden og størrelsesfordelingen af hele samfundet af planktonalger. Derimod er mikroskopi velegnet til at opnå specifik viden om de mest repræsentative arter og diversiteten blandt planktonalgerne. Nye optiske metoder, såsom PFCM, giver bedre kvantitative estimater af mængden og størrelsesfordelingen, også på et overordnet taksonomisk gruppeniveau, men kan ikke beskrive artssammensætningen i detaljer. Fordelen ved PFCM er en hurtig og billig analyse af vandprøver, som med fordel kan kombineres med en kvalitativ analyse af vandprøven i mikroskop for at knytte den specifikke taksonomiske information til grupperne identificeret med PFCM. En kvalitativ oparbejdning af vandprøver medfører en væsentlig besparelse i forhold til en fuldstændig kvantitativ analyse i mikroskop, hvilket vil frigøre ressourcer til PFCM analyser. Derved bliver det muligt at overvåge planktonalger i flere danske havområder og med en hyppighed, som bedre afspejler de

tidlige ændringer, som planktonsamfundet gennemgår henover året. Vores anbefaling er at anvende optiske metoder som PFCM til mere præcise kvantitative målinger, kombineret med mikroskopi til kvalitativ vurdering af artssammensætning.

Referencer:

- /1/ Winder, M., Carstensen, J., Galloway, A.W.E., Jakobsen, H.H. og Cloern J.E., 2017: The land–sea interface: A source of high-quality phytoplankton to support secondary production. *Limnology & Oceanography*. doi: 10.1002/lno.10650
- /2/ Nixon, S.W. og Buckley, B.A., 2002: "A strikingly rich zone"—nutrient enrichment and secondary production in coastal marine ecosystems. *Estuaries* 25: 782–796.
- /3/ Jakobsen, H.H., Carstensen, J., Harrison, P.J. og Zingone, A., 2015: Estimating time series phytoplankton carbon biomass: inter-lab comparison of species identification and comparison of volume-to-carbon scaling ratios. *Estuarine Coastal Shelf Science* 162: 143–150.
- /4/ Jakobsen, H.H. og Carstensen, J. 2011: FlowCAM: sizing cells and understanding the impact of size distributions on biovolume of planktonic community structure. *Aquatic Microbial Ecology* 65: 75–87.

- /5/ Haraguchi, L., Jakobsen, H.H., Lundholm, N., og Carstensen, J., 2017: Monitoring natural phytoplankton communities: a comparison between traditional methods and pulse-shape recording flow cytometry. *Aquatic Microbial Ecology* 80: 77–92.
- /6/ Menden-Deuer, S. og Lessard, E.J., 2000: Carbon to volume relationships for dinoflagellates, diatoms, and other protist plankton. *Limnology & Oceanography* 45: 569–579.
- /7/ Jakobsen, H. H. og Markager, S., 2016: Carbon-to-chlorophyll ratio for phytoplankton in temperate coastal waters: Seasonal patterns and relationship to nutrients. *Limnology & Oceanography* 61: 1853-1868.

JACOB CARSTENSEN (jac@bios.au.dk) er professor og arbejder med at beskrive den menneskelige påvirkning af havmiljøet ud fra overvågningsdata.

HANS JAKOBSEN (hhja@bios.au.dk) er seniorforsker og arbejder med plankton økologi.

LUMI HARAGUCHI (luh@bios.au.dk) er PhD studerende og arbejder med at beskrive, hvordan planktonalgesamfundet påvirkes af fysiske og kemiske forhold.

Alle tre er ansat ved Aarhus Universitet, Institut for Bioscience, Frederiksborgvej 399, 4000 Roskilde.



Bæveren som naturgenopretter

I 1999 blev 18 bævere sat ud i Flynder Å-systemet ved Klosterheden. Dermed var bæveren tilbage i den danske natur efter mere end 1.000 års fravær.

I 2009 og 2010 kom bæveren også til Sjælland igen. Her blev 14 bævere sat ud i Nord-sjælland, blandt andet ved Dronningholm Mose og Arresø.

Målet med at genudsætte bævere i Danmark er, at bæverne kan hjælpe med at genskabe noget af den natur, som igennem flere hundrede år er forsvundet fra Danmark, nemlig de mange skovsumpe, småsøer, det døde ved i skovene og lysningerne i tætte krat. Det giver bedre levevilkår for mange af vores truede plante- og dyrearter.

Nationalt Center for Miljø og Energi (DCE) ved Aarhus Universitet har lavet et notat om status for bæverbstandens udvikling og udbredelse i Vestjylland siden udsætningen i 1999 og frem til foråret 2017 for Miljøstyrelsen (MST) /1/. MST forventer at skulle revidere forvaltningsplanen for bæver i nærmeste frem-

tid. For at kunne fastlægge konkrete forvaltningstiltag ønskede MST at kende den aktuelle udbredelse og bestandsudvikling af bæver. Status for bestandsudbredelse og -udviklingen skal danne grundlag for vurdering af det potentielle omfang af skader forvoldt af bæver samt om bestanden er levedygtig.

Bæver er optaget på den nationale referenceliste for Danmark for arter, der er beskyttet via EU Habitatdirektivet. Prioritering af mulige indsatser i en forvaltningsplan afhænger af om der er en levedygtig bestand samt det potentielle omfang af skader forvoldt af bæver. MST havde derfor brug for et opdateret videnskabeligt grundlag om bævers udbredelse og bestandsudvikling.

Ifølge notatet vurderer man, at antallet af bæver er vokset til mellem 166 og 202 individer. Man konkluderer endvidere at bæveren i foråret 2017 er udbredt i hele Flynder Å-systemet. Der er endvidere etableret yngleterritorier i de andre vandløb omkring Nissum Fjord,

Karup Å-systemet og i Himmerland. Desuden er der spredte forekomster i vandløb og vådområder fra Vejlerne i Hanherred i nord til Varde Å-systemet i syd. Bæverbstanden er fortsat stigende. Bestanden er formentlig stabil i Flynder Å-systemet, fordi de egnede territorier er besat, men efterhånden som bæverne etablerer ynglefokomster i flere vandløbssystemer, vil bestandsstigningen fortsætte.

Der er fundet flere tydelige tegn på, at bæveren har fundet op i en række tilløb til Storå i

blandt andet Herning Kommune. Således fortæller en åmand, at han blev "forfulgt" af en bæver tæt på Herning i efteråret 2017. I februar 2018 er der netop blevet set træer, der er fældet og afbarket nogle få hundrede meter fra et indkøbscenter tæt ved Herning. Det er uvist om der er tale om en enlig strejfende bæver og hvor den er på vej hen.

Der er mange delte meninger om udsætningen af bæver, og meningene går lige fra en fascination til et egentlig had. Således havde en lodsejer lagt sag an mod Miljøstyrelsen, fordi bæverne havde sat tænderne i træerne på hans ejendom, der ligger tæt på Klosterhede Plantage. Blandt andet bævernes dæmninger var et problem for lodsejeren. I december 2017 tabte han en civilsag til Miljøstyrelsen ved Retten i Holstebro. SB

- /1/ Elmeros, M., 2017. Bestandsudvikling og udbredelse af bæver i Jylland i foråret 2017.

