



INTERKALIBRERING AF FYTOPLANKTON- UNDERSØGELSER I MARINE OMRÅDER 2018

Teknisk rapport fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi

nr. 128

2019



AARHUS
UNIVERSITET

DCE - NATIONALT CENTER FOR MILJØ OG ENERGI

[Tom side]

INTERKALIBRERING AF FYTOPLANKTON- UNDERSØGELSER I MARINE OMRÅDER 2018

Teknisk rapport fra DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi

nr. 128

2019

Hans H. Jakobsen

Aarhus Universitet, Institut for Bioscience



AARHUS
UNIVERSITET

DCE – NATIONALT CENTER FOR MILJØ OG ENERGI

Datablad

Serietitel og nummer:	Teknisk rapport fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi nr. 128
Titel:	Interkalibrering af fytoplanktonundersøgelser i marine områder 2018
Forfatter:	Hans H. Jakobsen
Institution:	Aarhus Universitet, Institut for Bioscience
Udgiver:	Aarhus Universitet, DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi ©
URL:	http://dce.au.dk
Udgivelsesår:	Maj 2019
Redaktion afsluttet:	10-10-2018
Faglig kommentering:	Jørgen L. S. Hansen
Kvalitetssikring, DCE:	Susanne Boutrup
Sproglig kvalitetssikring:	Anne van Acker
Finansiel støtte:	Miljø- og Fødevarerministeriet
Bedes citeret:	Jakobsen, H.H. 2019. Interkalibrering af fytoplanktonundersøgelser i marine områder 2018. Aarhus Universitet, DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi, 28 s. - Teknisk rapport nr. 128 http://dce2.au.dk/pub/TR128.pdf
	Gengivelse tilladt med tydelig kildeangivelse
Sammenfatning:	En interkalibrering af fytoplankton blev udført i løbet af sommeren 2018. Der var i alt 4 deltagere i interkalibreringen, hvis formål var at beskrive variationen mellem deltagerne samt variationen indenfor for den enkelte deltager. Interkalibreringen var designet således, at det var muligt at skelne effekten af prøvehåndtering, fra variationen, der opstår ved arbejdet ved mikroskopet. Der blev fundet statistisk signifikante forskelle mellem deltagerne i bestemmelsen af totalbiomassen. På trods af, at forskellen var signifikant, var den meget lille. Der var forskelle mellem deltagerens opgørelse af arter, cellestørrelser og cellekoncentrationen mellem alle 4 deltagere. Prøvehåndteringen var ligeledes en kilde til variation. Forskellen mellem deltagerne bestemt som similiaritet, dannede et fingeraftryk, der adskilte 2 deltagere fra de øvrige 2 deltagere.
Emneord:	Interkalibrering, fytoplankton
Layout:	Anne van Acker
Illustrationer:	Hans H. Jakobsen
Foto forside:	Fytoplankton indsamlet med net på lavt vand og fotograferet i lysmikroskop. Foto Hans H Jakobsen
ISBN:	978-87-7156-363-4
ISSN (elektronisk):	2244-999X
Sideantal:	28
Internetversion:	Rapporten er tilgængelig i elektronisk format (pdf) som http://dce2.au.dk/pub/TR128.pdf

Indhold

Forord	5
Sammenfatning	7
Summary	9
1. Materialer og metoder	10
2. Resultater og analyser	13
2.1 Taksonomi	13
2.2 Biomasser, cellestørrelser: klasse og art	15
2.3 Diversitet	19
3. Konklusion og anbefalinger	23
3.1 Generelt	23
3.2 Taksonomi	23
3.3 Diversitet	23
3.4 Biomasser	24
3.5 Sammenligningen med tidligere interkalibreringer af marint fytoplankton	24
4. Referencer	26
5. Appendiks	27
5.1 Deltager	27
5.2 Blandet model test	27

[Tom side]

Forord

Overvågning og vurdering af eutrofiering i de danske farvande er et nøgleelement i miljøovervågningen af de danske marine områder. Overvågningen er traditionelt baseret på følgende parametre: næringsstoffer, lysforhold og koncentrationen af klorofyl i de frie vandmasser, fyto- og zooplankton, undervandsvegetation, blødbundsfauna og iltkoncentrationer i bundvandet.

Kvaliteten af de indsamlede miljødata, i denne forbindelse fytoplankton, er afgørende for, at de kan anvendes til vurdering af effekten på havmiljøet af vandmiljøplanerne, der blev vedtaget af Folketinget og iværksat i 1989. Fytoplanktondata omfatter taksonomiske arts-/slægtsbestemmelser og opgørelse af biomasse på arts-/slægtsniveau. Ligeledes indgår indsamlede miljødata i rådgivende modelstudier og miljøprojekter samt rådgivningsunderstøttende forskningsprojekter. Resultaterne heraf danner grundlag for regulering af en række samfundsaktiviteter, eksempelvis anbefalinger vedr. tilførslen af næringsstoffer til vandmiljøet samt forståelse af samspillet mellem klima- og miljøpåvirkninger og initiativer rettet mod miljøforbedringer.

Siden Folketingets beslutning i 1989 er der øget fokus på internationalt samarbejde inden for havmiljø. Dette foregår typisk i HELCOM regi, men også i forbindelse med implementeringer af EU's havstrategi forgår der allerede et omfattende arbejde med at dele data samt udvikle metoder til fælles fastsættelse af grænseværdier for god miljøtilstand "GES" indenfor OSPAR. Det betyder, at landende omkring Østersøen deler miljødata via ICES dataportal (HELCOM) samt via EMODNET dataportal (OSPAR) i tilfældet med stationer, der forefindes i havområderne, der hører under OSPAR.

Indenfor rammerne af HELCOM bidrager Danmark med data for blågrønalger for NOVANA stationerne ved Bornholms dyb og fra stationen i Arkona bassinet (Wasmund et al. 2018) til beregning af indikatorer for forekomst af blågrønalger (Anttila m.fl. 2018).

EU's havstrategi fokuserer på diversitet og fødekæder i langt højere grad end EU's vandrammedirektiv, hvor fokus ligger på biomasser og puljer. Diversitet og anvendelse af specifikke arter og grupper vil derfor fremadrettet være fokus i arbejdet med at udvikle målemetoder og indikatorer til at bestemme grænseværdier for god miljøtilstand inden for rammerne af EU's havstrategi (McQuatters et al. 2019).

Det betyder overordnet, at fytoplankton data indsamlet under NOVANA programmet forventes at bidrage til EU's havstrategi deskriptorer D2 (ikke hjemmehørende arter), D5 (Eutrofiering) og til tilstandsvurdering D1 (Biodiversitet) samt at kunne indgå i udviklingen af D4 (havets fødenet), der er under udvikling.

Taksonomisk bestemmelse, optælling og opmåling af fytoplankton er tidskrævende og kræver stor erfaring og omhu. Regelmæssige træningskurser og interkalibreringer efterfulgt af evaluering og evt. justering af de tekniske anvisninger er et element i forbindelse med sikring af, og om muligt, forbedring af datakvaliteten fra overvågningen af fytoplankton. Resultaterne og de høstede erfaringer fra nærværende interkalibrering udgør det faglige grundlag

for at udvikle og sikre kvaliteten af såvel selve overvågningen som de indsamlede data.

Formålet med denne interkalibrering er således at undersøge præcisionen og akkuratheden af data fra fytoplanktonundersøgelser gennemført efter den gældende tekniske anvisning.

Af hensyn til sammenligneligheden på tværs af de deltagende konsulenter er der foretaget en kritisk gennemgang af data med henblik på harmonisering af data. Desuden er der i det omfang, hvor der har været begrundelse for det, samlet forskellige artsangivelser (se nedenstående). Artsidentifikation og optællingen er undersøgt med de til rådighed værende statistiske metoder og værktøjer.

Konsulenter, der er involveret i den marine planktonovervågning, blev inviteret til at deltage i interkalibrering af fytoplankton. Deltagerne blev anonymiseret ved tildeling af et deltagernummer, der muliggør genkendelse af egne resultater uden kendskab til de øvrige deltageres identitet.

I det omfang normal kvalitetskontrol omfatter verifikation hos kolleger, er konsulenterne blevet bedt om at undlade dette ved indeværende interkalibrering. Dette skyldes ønsket om at kunne vurdere de enkelte konsulenter, frem for det deltagende konsortiums arbejde.

Sammenfatning

Til understøttelse af Det Nationale Program for Overvågning af Vandmiljø og Natur (NOVANA) blev der i efteråret 2018 afholdt en fytoplankton interkalibrering med fokus på artsidentifikation og optælling af fytoplankton, samt beregning af fytoplanktons kulstofbiomasse og diversitetsindeks. Fytoplankton interkalibreringen er en del af den nationale kvalitetssikring og indgår som en del af rammeaftalen mellem DCE/Aarhus Universitet og Miljøstyrelsen. Fire personer (konsulenter) fra Danmark deltog i interkalibreringen (appendiks 5.1). Data blev indrapporteret via Miljøstyrelsens datarapporteringsportal STOQ, hvorfra data i denne rapport er trukket. Væsentlige resultater af interkalibreringen er:

Ud fra antallet af optalte celler samt opmåling af de dominerende arter leverede alle fire konsulenter data efter retningslinjerne angivet i de tekniske anvisninger med den enkelte undtagelse, at en konsulent kun opmålte cellestørrelserne i en enkelt af de triplikate oparbejdede prøver.

Artssammensætning blev overvejende domineret af kiselalger og andre arter (dinoflagellater og rekylalger) udgjorde en meget lille fraktion.

Der blev i alt identificeret 27 arter i det indsamlede prøvemateriale, hvoraf der var sammenfald mellem 11 arter (nøglearter) på tværs af alle konsulenter. Nøglearternes biomasse udgjorde > 95 % af den total biomasse. Den gennemsnitlige fytoplanktonbiomasse på klasseniveau varierede tilsvarende på tværs af alle deltagere og viste en svag statistisk forskel mellem deltagerne for kiselalger ($P = 0,03$) og furealger ($P=0,01$), men ikke for rekylalger. Datamaterialet for rekylalger og dinoflagellaten *Heterocapsa rotundata* er minimalt på grund af prøvens årstidsbestemte beskaffenhed, hvilket medfører større variation som følge af en lille prøvestørrelse. Forskellen mellem konsulenternes biomasse bestemmelse af kiselalger er 11%, hvilket er minimalt i forhold til de sæsonbetingede variationer i kiselalgebiomasse, der typiske er af størrelsesordenen 200 – 300%.

Similaritetsanalyser på basis af tilstedeværelse – fravær af arter giver et overordnet billede af "ensartetheden" (similariteten), af konsulenternes artbestemmelse på prøveniveau som en helhed. Her fandtes en similaritet >80% mellem tre af de deltagende fire konsulenter. Der findes ingen endelig facitliste på hvad der er tilfredsstillende, men ud fra studier i primærlitteraturen anses dette for at være tilfredsstillende (Culverhouse mfl. 2003).

Prøvestørrelsen har indflydelse på antallet af arter¹, der observeres i en given prøve. Dette kan der korrigeres for med en såkaldt "rare faction"-korrektion. Efter denne korrektion reduceredes den indbyrdes forskel mellem konsulenternes bestemmelse af artsrigdomme fra 40% til 17%, hvilket peger på forskelle i tællestrategierne, som en af faktorerne i bestemmelse af artsrigdommen.

¹ Artsrigdom er betegnelsen for antallet af arter i en givne prøve

I forhold til tidligere interkalibreringer afholdt i 2004 og 2012, er variationen i konsulenternes opmåling af cellestørrelser væsentligt reduceret. Dertil er biomasse variationen mellem konsulenternes biomassebestemmelse faldet fra ≈ 40 til $\approx 11\%$.

Interkalibreringen blev afsluttet med et konkluderende møde på Aarhus Universitet, Institut for Bioscience (Roskilde). På mødet blev data fra nærværende rapport fremlagt og diskuteret.

Summary

In support of the Danish Nationwide Monitoring and Assessment Program for the Aquatic and Terrestrial Environments (NOVANA), a phytoplankton inter-calibration was executed in the summer of 2018 focusing on species identification and enumeration, species diversity index calculations and calculation of phytoplankton carbon biomass. Inter-calibration is a part of the national quality assurance procedure where all consultants and data providers have to participate regularly. Phytoplankton inter-calibration is a part of the framework agreement between DCE/Aarhus University and the Danish Environmental Protection Agency. Four participants from Denmark participated in the intercalibration (appendix 5.1). Data were reported to the data portal 'STOQ' operated by the Danish Nature Agency, and from where data used in this report were drawn. Significant results of the phytoplankton inter-calibration are:

Based on the number of cells counted and the volume measurements of the dominant cells, all four consultants provided data accordingly to the guidelines stated in the technical instructions. However, one exception was that one of the consultants apparently only measured the cell sizes in one of the analyzed triplicate samples.

The species composition was overwhelmingly dominated by diatoms whereas other species (dinoflagellates and cryptophytes) made a small fraction.

A total of 27 species were identified in the sample, of which 11 species (key species) were identified by all consultants. The key species biomass accounted for > 95% of the total biomass. The average phytoplankton biomass at class level varied accordingly across all participants and showed a slight statistical difference between the participants for diatoms ($P = 0.03$) and dinoflagellates ($P = 0.01$), but not for cryptophytes.

Similarity analysis based on presence/absence of species gives an overall picture of the "uniformity (similarities), of the sample at the level as a whole community composition. There was a similarity > 80 % between three of the participating four consultants. There is no general accepted level of satisfactory performance, but based on studies in the primary literature, 80% is concluded satisfactory (Culverhouse et al. 2003).

The sample size affects the number of species observed in a given sample. This can be corrected for, so-called "rare faction" correction. After this correction, the mutual difference between the consultants' species count was reduced from 40% to 17%, which points to differences in the counting strategies.

Compared to previous inter-calibrations held in 2004 and 2012, were the variation in measurements of cell sizes significantly by the consultants' significantly reduced. In addition, the variation between consultants' biomass determination has decreased from ≈ 40 to 11% since 2012.

The inter-calibration was concluded with a concluding meeting at Aarhus University, Department of Bioscience (Roskilde). At the meeting, data from the present report were presented and discussed.

1. Materialer og metoder

Hver deltager fik tilsendt materiale indsamlet iht. TA M09 (Jakobsen og Fos-sing, 2017) af Miljøstyrelsen i Aarhus Bugt marts 2018. Prøverne blev indsamlet af Miljøstyrelsen efter samme principper der normalt anvendes til indsamling af planktonprøver².

De indsamlede prøver blev blandet til én fælles på prøvetagningsskibets dæk og derefter fordelt og fikseret i brune flasker.

Miljøstyrelsen sendte prøverne til konsulenterne, der oparbejdede prøverne efter TA M09. Oparbejdningen omfattede bestemmelse af cellekoncentrationer, biomasser og diversitets indeks. Fytoplanktonprøven skulle tælles i et 25 ml Uthermöl-kammer efter gældende retningslinjer iht. TA M09.

Den tekniske anvisning TA09 angiver, at der medfølger en kvalitativ prøve indsamlet med net. Denne prøve er ikke medtaget i interkalibreringen, da formålet med interkalibreringen, er at sammenligne konsulenternes kvantitativt. En netprøve er indsamlet kvalitativt dvs. uden kendskabet til prøvestørrelsens volumen, og dens formål er at konsulenterne skal bruge prøven til at danne sig et overblik over arternes taksonomi. Der er derfor ikke mulighed for at fortage beregninger på netprøvens data til sammenligningen af konsulenterne i denne interkalibrering.

Prøven var karakteriseret af opblomstringer af én enkelt dominerende art samt flere andre kiselalgearter i lave koncentration, én enkelt art af furealger samt rekyalger. Da mindre flagellater typisk ikke kan identificeres til artsniveau, og oftest end ikke til slægtsniveau, er denne gruppe efter aftale med Miljøstyrelsen udeladt fra analysen. Deltagerne blev derfor inviteret til at identificere og opmåle alle kiselalger, rekyalger samt optælle dinoflagellaten *Heterocapsa rotundata* oparbejdet efter retningslinjerne i TA M09. Øvrige arter kunne således ignoreres.

Den tekniske anvisning tillader, at der anvendes tællekamre af varierende størrelse, men deltagerne blev pålagt at anvende et fast kammerstørrelse for at resultaterne kunne sammenlignes på tværs af deltagerne. 25 ml Uthermöl-kammeret anvendes bredt i overvågningsprogrammet. Dette er en begrænsning i forhold til TA M09, der tillader frit valg af tællekammer.

Konsulenterne har i forbindelse med interkalibreringen tilkendegivet, at der var tale om en usædvanlig kraftig opblomstring af *Skeletonema costatum*/*Skeletonema* sp., som normalt ville blive talt i et 10 ml kammer. I et 25 ml kammer lå algerne delvist i lag, hvilket besværliggjorde tællingen og muligheden for at opdage andre arter, der var til stede i meget lave koncentrationer.

² Prøveindsamlingen fortaget efter TA M01, som pt ikke er offentligt tilgængelig og der henvises til tidligere TA http://www2.dmu.dk/1_om_dmu/2_tvaer-funk/3_fdc_mar/programgrundlag/TekAnv2004_2009/Del2/TA04_2_1_Proevetagning.pdf

For at vurdere variationen inden for den enkelte konsulent og deltagerne i mellem blev hver deltager bedt om at oparbejde den udleverede blandingsprøve fra marts tre gange. Prøverne blev talt separat i triplikat af hver konsulent. Konsulenterne blev bedt om at tælle hver prøve efter følgende retningslinjer: Tællekammeret skulle hensættes i mørke. Dernæst hældes og oparbejdes en ny prøve i et 25 ml Uthermöl-kammer. Til sidst oparbejdes første prøve igen. Det betyder, at hver deltager talte samme prøve to gange samt samme prøve i to forskellige kamre. Procedure med optælling i triplikat er en afvigelse fra TA M09, i det der i det daglige arbejde normalt kunne tælles en prøve *per* NO-VANA station. Optællingen i triplikat er nødvendig for at bestemme variationen *inden for* og på *tværs* af konsulent.

Statistiske metoder

Det kan være væsentligt at undersøge variationen i data, der skyldes faktorer, der ikke er relateret til konsulenternes arbejde, men i stedet kan knyttes til prøvehåndteringen. Ved at optælle prøven som angivet, oparbejdes data i et split plot design, hvor variation *inden for* og *mellem* deltagerne kvantificeres tillige med variationen, der skyldes *prøvehåndteringen*. Data blev derfor undersøgt med en blandet model³, der er en statistisk metode, egnet til at arbejde med split plot test design. Analysen er ledsaget af en P-værdi, der giver et samlet udtryk for præcisionen af analysen (*inden for* delprøven og *mellem* delprøverne) samt kvantificerer variationen, der er drevet af prøvehåndteringen.

I de forskellige test i rapporten anvendes et P niveau på 0,05 som signifikans niveau. Det betyder at P-værdier under 0,05 anses for statistisk signifikant forskellig, hvorimod P-værdier >0,05 anses som ikke signifikante forskellig. Det skal bemærkes, at P-værdier mellem 0,01 og 0,10 bør tolkes med en vis forsigtighed, da minimale ændringer i data kan forskyde P-værdien.

Ifølge TA M09 skal der i en planktonprøve som minimum optælles 500 celler. I TA M09 er angivet hvordan artbestemmelsen og optællingen bør forgå, men processen er generelt præget af et element af tilladt subjektivitet, hvad angår optællingsstrategi. Eksempelvis optælles de mest almindelige arter i ét enkelt eller få diagonaler af tællekammerets bundplader, indtil mindst 50 celler er optalt. Sjældnere arter optælles fra hele bundpladen. I tilfælde af at >50 optælles af sjældnere arter, kan optællingen indstilles, når ½ bundplade er optalt. Overordnet betyder dette, at de enkelte arter kan være bestemt ud fra varierende prøvevolumener, hvilket kan påvirke præcisionen af biomassebestemmelsen, cellekoncentrationen og artsdiversiteten i prøven.

Efterfølgende omregnes tælle tallene til specifikke cellekoncentrationer og biomasser ved at korrigere med faktorer, der omregner fra antallet af talte diagonaler eller bundpladens areal. Se evt. i TA M09 for detaljer.

³ blandet model metode (UK: MIXED MODEL, Lineære blandede modeller), er en udvidelse af simple lineære statistiske modeller til at undersøge effekten af en givne respons og anvendes her i stedet for den velkendte ANOVA. En blandet model tillader både faste og tilfældige effekter og anvendes især, når der ikke er uafhængighed i dataene, som stammer fra en hierarkisk struktur som eksempelvis et Split plot design. I dette eksempel er det arter der indsamles fra en prøver. Appendiks b beskriver i detaljer nærværende forsøgsdesign.

Antallet af arter stiger med prøvestørrelse⁴. Det betyder, at hvis der tælles eksempelvis en halv bundplade i Uthermöl-kammer, bestemmes færre arter end hvis hele Uthermöl-kammerets bundplade var blevet optalt. Det betyder, at konsulenternes tællestrategi påvirker antallet af arter samt præcisionen af tællertallene.

Det er muligt at "normalisere" antallet af fundne arter samt beregne diversitets indicies med en "rare-faction" korrektion for delvist at korrigere for usikkerheden, der opstår som følge af varierende tællestrategi. I denne rapport anvendes en rare faction korrektion svarende til en prøvestørrelser på 1000 celler talt i en prøve svarende til ½ bundplade, således at konsulenternes bestemmelse af artsrigdom vurderes på et fælles grundlag svarende til en standard prøvestørrelse.

Der er anvendt softwarepakken Primer 7 til analyserne af de forskellige diversitet parametre. Primer 7 er en softwarepakke, der er specielt udviklet til analyser af feltdata af bl.a. artssammensætninger.

Data skulle indtastes i STOQ efter gældende retningslinjer, jf. DT03 (Holmboe et al. 2015).

Alle resultater blev analyseret med SAS software samt Primer7 til similaritetsanalyser.

⁴ I denne sammenhæng er prøvestørrelsen antallet af talte celler

2. Resultater og analyser

2.1 Taksonomi

Der blev i alt indrapporteret fire datasæt med hver tre optællinger. Konsulenterne havde fået oplyst, at de kun skulle bestemme og optælle arter inden for klasserne kiselalger (Bacillariophyceae), furealger (Dinophyceae), og rekylalger (Cryptophyceae).

Slægter

De identificerede slægter omfattede én furalgeslægt (Dinophyceae), én enkelt slægt af rekylalger (Cryptophyceae identificeret til klasse) samt 15 slægter af kiselalger (Bacillariophyceae).

Heraf er 8 slægter identificeret af alle konsulenter, 2 slægter er identificeret af tre konsulenter, mens der er 7 slægter, som kun er set en enkelt gang af én konsulent (Tabel 1).

Tabel 1. Slægter fundet i prøven

Klasse	Slægt	Konsulent 1	Konsulent 2	Konsulent 3	Konsulent 4
Bacillariophyceae	<i>Attheya</i>	X	X	X	X
Bacillariophyceae	<i>Bacillaria</i>		X		
Bacillariophyceae	<i>Chaetoceros</i>	X	X	X	X
Bacillariophyceae	<i>Coscinodiscus</i>	X			
Bacillariophyceae	<i>Detonula</i>	X	X	X	
Bacillariophyceae	<i>Leptocylindrus</i>		X		
Bacillariophyceae	<i>Licmophora</i>		X		
Bacillariophyceae	<i>Melosira</i>		X		
Bacillariophyceae	<i>Navicula</i>		X		
Bacillariophyceae	<i>Nitzschia</i>		X		
Bacillariophyceae	<i>Pseudo-nitzschia</i>	X	X	X	
Bacillariophyceae	<i>Rhizosolenia</i>	X	X	X	X
Bacillariophyceae	<i>Skeletonema</i>	X	X	X	X
Bacillariophyceae	<i>Thalassionema</i>	X	X	X	X
Bacillariophyceae	<i>Thalassiosira</i>	X	X	X	X
Cryptophyceae	Cryptophyceae	X	X	X	X
Dinophyceae	<i>Heterocapsa</i>	X	X	X	X

Arter

Der i alt fundet 26 arter (Tabel 2 og 3). Arten *Skeletonema costatum* var i det oprindelige datasæt identificeret enten som *Skeletonema* eller som *Skeletonema costatum*. Det blev efter dialog med konsulenterne besluttet ved databehandlingen at behandle dem som én enkelt art. Lignende overlap i arter fandtes hos *Chaetoceros brevis*, *Chaetoceros brevis/diadema* samt *Chaetoceros diadema* og også her blev arterne samlet til én enkelt art *Chaetoceros brevis/diadema*. Andre arter som *Chaetoceros sol.* er en samlegruppe af små kiselalger af slægten *Chaetoceros* med ligheder af arten *Chaetoceros solitarus* og er *de facto* og *per konsensus* i STOQ samlet som *Chaetoceros sol.*

Antallet af arter eller morfotyper (identificeret til højest mulig taksonomisk tilhørsforhold) er vist i Tabel 2 og Tabel 3. Det højeste antal arter er 24 bestemt af konsulent 2, mens det mindste antal er 12 bestemt af konsulent 4. Blandt de optalte arter er 11 arter optalt og målt af alle fire konsulenter, syv arter er optalt og målt af tre konsulenter og ni arter er optalt og målt af én konsulent.

Tabel 2. Det samlede antal arter identificeret indenfor klasserne kiselalger, furealger og rekylalger af konsulenterne.

Konsulent	Antal arter
1	18
2	24
3	17
4	13

Tabel 3. Cellekoncentrationer (celler L⁻¹) for arter talt i prøven. Værdier er gennemsnitsværdi ± standardafvigelse. Antallet a replikater er angivet i Tabel 4. Alle arter er bestemt som middelværdien af tre replikater. Hvor ingen standardafvigelse er angivet, er arten kun set i et enkelt tilfælde.

Art	Klasse	Konsulent 1	Konsulent 2	Konsulent 3	Konsulent 4
<i>Attheya septentrionalis</i>	Bacillariophyceae	40320±14250	24910±11620	23560±1571	124400±153000
<i>Bacillariophyceae</i>	Bacillariophyceae		960±400		
<i>Chaetoceros</i>	Bacillariophyceae	2531±1058	160	45900±3564	
<i>Chaetoceros brevis/diadema</i>	Bacillariophyceae	1571	80	200	
<i>Chaetoceros decipiens</i>	Bacillariophyceae	620±141	160±113	220±28	120
<i>Chaetoceros phaeoceros gruppen</i>	Bacillariophyceae		187±92		
<i>Chaetoceros similis</i>	Bacillariophyceae	1396±400	667±333	1571±314	
<i>Chaetoceros sol.</i>	Bacillariophyceae	97910±32090	152900±25030	156600±14600	160700±14880
<i>Chaetoceros subtilis</i>	Bacillariophyceae	183500±82450	426000±67260	267600±85770	251500±10500
<i>Chaetoceros wighamii</i>	Bacillariophyceae	16670±11630	1080±283	6851±384	
<i>Coscinodiscus</i>	Bacillariophyceae	80			
<i>Detonula confervacea</i>	Bacillariophyceae	8901±3434	373±92	9425±1047	
<i>Leptocylindrus danicus</i>	Bacillariophyceae		1360		
<i>Licmophora</i>	Bacillariophyceae		80		
<i>Melosira arctica</i>	Bacillariophyceae		32		
<i>Navicula</i>	Bacillariophyceae		80		
<i>Nitzschia longissima</i>	Bacillariophyceae		80		
<i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i>	Bacillariophyceae	2444±842	453±201	4189±363	
<i>Rhizosolenia hebetata var. semispina</i>	Bacillariophyceae				53±23
<i>Rhizosolenia setigera</i>	Bacillariophyceae	387±220	533±46	387±46	507±92
<i>Skeletonema costatum</i>	Bacillariophyceae	15210000±2487000	13800000±594100	18290000±1024000	13580000±533100
<i>Thalassionema nitzschioides</i>	Bacillariophyceae	2967±1442	373±370	1653±1198	173±83
<i>Thalassiosira</i>	Bacillariophyceae	96200±120700	87940±203200	71380±74330	67±40
<i>Thalassiosira angustelineata</i>	Bacillariophyceae	733±23	827±482	267±23	840±80
<i>Thalassiosira minima</i>	Bacillariophyceae				263200±33070
<i>Cryptophyceae</i>	Cryptophyceae	45120±22710	33930±32420	34450±29670	105000±5267
<i>Heterocapsa rotundata</i>	Dinophyceae	20940±2618	36630±5828	26600±2020	29180±3432

Koncentrationer

I cellekoncentrationerne, der afspejler prøvens kvantitative artssammensætning, er der forskelle mellem konsulenternes bestemmelser (Tabel 3). Kiselalgearten *Skeletonema costatum*, der er kvantitativt dominerende i prøven, blev bestemt til koncentrationer mellem $13,6 \times 10^6$ og $18,3 \times 10^6$ celler L^{-1} .

Nogle arter er identificeret og talt i meget lave koncentrationer, og det kan derfor af statistiske årsager, ikke forventes at sjældnede arter findes af alle konsulenter. Det skal alligevel bemærkes at i flere tilfælde har konsulent et, to og tre identificeret og talt sjældnede arter, som ikke er identificeret og talt af konsulent fire. Dette gælder for kiselalgerne *Chaetoceros similis* (talte individer 2 – 8), *Chaetoceros wighamii* (talte individer 44 – 117), *Detonula confervacea* (talte individer 4 – 31) og *Pseudo-nitzschia delicatissima* (talte individer 6 – 9 celler). Værdierne i parentes angiver gennemsnitligt lavest – største antal talte celler. Et andet eksempel er *Thalassiosira minima*, hvor der er talt gennemsnitligt 164 celler af konsulent fire, men den er ikke fundet af de øvrige konsulenter. Formentligt er *Thalassiosira minima* noteret på slægtsniveau som *Thalassiosira* af de øvrige konsulenter.

2.2 Biomasser, celledørrelser: klasse og art

Opmåling af korrekte celledørrelser er vigtig for at kunne beregne biomasser på arts-, klasse- og prøveniveau.

Biovolumen på artsniveau

Volumenbestemmelsen af enkelte arter er vist i Tabel 4. De 11 arter, der er talt af alle konsulenter, er vist først og markeret med * foran artsnavn, og betegnes efterfølgende som nøglearter.

Tabel 4. Cellevolumen (μm^3 celle $^{-1}$) for alle arter talt i prøven. Værdier er gennemsnitsværdi \pm standardafvigelse. Antallet a replikater er angivet med parentes. Alle arter er bestemt som middelværdien af tre replikate prøver, i tilfælde hvor antallet overstiger 3, indikerer dette at gruppen er en samlegruppe, bestående af flere forskelle men ikke identificerbare arter. Hvor ingen standardafvigelse er angivet, er arten kun set i et enkelt eller få tilfælde. Arter der er talt af alle konsulenter er noteret øverst i tabellen med * foran artnavn.

Klasse	art	Konsulent 1	Konsulent 2	Konsulent 3	Konsulent 4
Bacillariophyceae	* <i>Thalassiosira anguste-lineata</i>	29220,0 \pm 10170(3)	28280,0 \pm 906,6(3)	27880,0 \pm 5097(3)	22930,0 \pm NA(3) 42150,0 \pm 24550(9)
Bacillariophyceae	* <i>Thalassiosira</i>	9574,0 \pm 17270(14)	19110,0 \pm 21850(17)	2702,0 \pm 2668(12)	9)
Bacillariophyceae	* <i>Thalassionema nitzschioides</i>	1590,0 \pm 394,4(3)	4880,0 \pm 457,0(3)	1650,0 \pm 155,9(3)	1813,0 \pm NA(3)
Bacillariophyceae	* <i>Skeletonema costatum</i>	152,4 \pm 36,1(3)	194,9 \pm 9,8(3)	126,4 \pm 8,8(3)	256,7 \pm 0,1(3)
Bacillariophyceae	* <i>Rhizosolenia setigera</i>	326700 \pm 97890(3)	225400 \pm 58000(3)	182500 \pm 25930(3)	201800 \pm NA(3)
Dinophyceae	* <i>Heterocapsa rotundata</i>	281,9 \pm 31,5(3)	308,8 \pm 7,8(3)	215,0 \pm 45,1(3)	142,7 \pm NA(3)
Cryptophyceae	* <i>Cryptophyceae</i>	104,5 \pm 73,0(6)	171,0 \pm 144,7(9)	126,3 \pm 110,1(12)	112,3 \pm 0,0(3)
Bacillariophyceae	* <i>Chaetoceros subtilis</i>	60,9 \pm 24,7(3)	43,0 \pm 0,1(3)	44,5 \pm 9,4(3)	15,6 \pm NA(3)
Bacillariophyceae	* <i>Chaetoceros sol.</i>	130,1 \pm 11,0(3)	78,8 \pm 0,8(3)	191,4 \pm 62,7(3)	129,2 \pm NA(3)
Bacillariophyceae	* <i>Chaetoceros decipiens</i>	11590,0 \pm 3986(2)	2168,0 \pm 1377(2)	5890,0 \pm 1666(2)	10210,0 \pm NA(3)
Bacillariophyceae	* <i>Attheya septentrionalis</i>	73,6 \pm 6,6(3)	35,3 \pm NA(3)	450,3 \pm 182,6(3)	49,6 \pm NA(3)
Bacillariophyceae	<i>Thalassiosira minima</i>				516,5 \pm NA(3)
Bacillariophyceae	<i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i>	238,0 \pm 6,9(3)	151,2 \pm NA(3)	288,0 \pm 124,7(3)	
Bacillariophyceae	<i>Rhizosolenia hebetata</i> var. <i>semispina</i>				8791,0 \pm NA(3)
Bacillariophyceae	<i>Nitzschia longissima</i>		80,1 \pm NA(2)		
Bacillariophyceae	<i>Navicula</i>		7550,0 \pm NA(1)		
Bacillariophyceae	<i>Melosira arctica</i>		11910,0 \pm NA(2)		
Bacillariophyceae	<i>Licmophora</i>		5044,0 \pm 2666(2)		
Bacillariophyceae	<i>Leptocylindrus danicus</i>		848,2 \pm NA(1)		
Bacillariophyceae	<i>Detonula confervacea</i>	1605,0 \pm 238,2(3)	1257,0 \pm NA(3)	1872,0 \pm 98,8(3)	
Bacillariophyceae	<i>Coscinodiscus</i>	5234000 \pm 379000(2)			
Bacillariophyceae	<i>Chaetoceros wighamii</i>	469,0 \pm 151,1(3)	84,8 \pm NA(2)	2313,0 \pm 184,4(3)	
Bacillariophyceae	<i>Chaetoceros similis</i>	640,4 \pm 128,7(3)	392,7 \pm NA(3)	279,6 \pm 71,9(3)	
Bacillariophyceae	<i>Chaetoceros phaeoceros</i> gruppen		2651,0 \pm NA(3)		
Bacillariophyceae	<i>Chaetoceros brevis</i> / <i>diadema</i>	4657,0 \pm 2883(2)	1689,0 \pm 170,0(3)	7069,0 \pm NA(1)	
Bacillariophyceae	<i>Chaetoceros</i>	101,1 \pm 70,3(3)	2588,0 \pm NA(1)	128,6 \pm 34,7(3)	
Bacillariophyceae	<i>Bacillariophyceae</i>		3693,0 \pm 66,2(3)		

Biomasse på klasseniveau

Den gennemsnitlige biomasse for de tre undersøgte klasser er beregnet som middelværdien af summen af de artsspecifikke observationer for hver replikat prøve for hver konsulent (Tabel 5). Der blev fundet statistisk signifikante forskelle i de gennemsnitlige biomasser for kiselalger og furealger mellem konsulenterne ($P < 0,05$), hvorimod konsulenternes biomasseopgørelse for rekyalger ikke afveg signifikant (Tabel 5). For rekyalger er variationen i den gennemsnitlige biomasse ikke statistisk signifikant ($P=0,06$) og meget lav (0,3%). Andelen af identificeret biomasse er 100 % eller tæt på 100% på klasse niveau (Tabel 5), idet prøven indenfor for hver af de tre klasser var domineret af få arter hhv. *Skeletonema costatum*, rekyalge og *Heterocapsa rotundata* (Tabel 5).

Tabel 5. Andelen af identificeret biomasse med angivelse af \pm standardafvigelse mellem replikater. P-værdien angiver signifikansniveauet mellem konsulenterne.

Klasse	% identificeret biomasse	$\mu\text{g C L}^{-1}\pm\text{std}$	P
Bacillariophyceae	98,3 \pm 1,4	239,2 \pm 28,7	0.03
Cryptophyceae	100	1,6 \pm 0,4	0.06
Dinophyceae	100	0,7 \pm 0,3	0.01

Forskellen mellem konsulenterne parvis viste ikke noget konsistent mønster. Dvs. inden for kiselalger og furealger var der parvis statistisk signifikante forskelle mellem konsulenterne.

Tabel 6 Biomasser beregnet på prøveniveau

konsulent	$\mu\text{g C L} \pm \text{standardafvigelse}$
1	219.3 \pm 27.6
2	242.0 \pm 6.2
3	224.5 \pm 13.8
4	280.5 \pm 8.3
gennemsnit	241.6 \pm 27.7

Datamaterialet for rekyalger og dinoflagellaten *Heterocapsa rotundata* er minimalt på grund af prøvens årstidsbestemte beskaffenhed, hvilket medfører større variation som følge af en lille prøvestørrelse. Forskellen mellem konsulenternes biomassebestemmelse af kiselalger er $\approx 11\%$, hvilket er minimalt i forhold til de sæsonbetingede variationer i kiselalgebiomasse, der typisk er af størrelsesordenen $\approx 200 - 300\%$.

Biomassen på prøveniveau var gennemsnitlig $\approx 241\pm 27 \mu\text{g C L}^{-1}\pm$ standardafvigelse, svarende til en variationskoefficient på $\approx 11\%$. Denne forskel er lav og må anses som tilfredsstillende.

Nøglearter

Cellekoncentrationerne for hver af de 11 nøglearter (markeret med * i Tabel 4) blev logaritmetransformeret og sammenlignet med en lineær blandet model test for at kunne opdele variationen, der skyldes underopdelingen af prøven i transportflasker, transport, opbevaring og ophældningen i tællekamre (prøvehåndtering) og variationen, der skyldes mikroskoperingen (konsulent). En kort beskrivelse af den anvendte blandede model findes i Appendiks 5.2.

For ni arter fandtes der ingen samlet signifikant statistisk forskel mellem konsulenterne ($P > 0,05$), hvorimod de to resterende nøglearter viste signifikante forskelle i cellekoncentrationerne (Tabel 7). Tre arter, *Chaetoceros sol.*, *Skeletonema costatum* samt *Thalassiosira anguste-lineata* har P værdier i grænseområdet mellem 0,05 og 0,1.

Tabel 7. Liste over nøglearter, der blev identificeret og talt af alle konsulenter. Kolonnerne 'Variation prøvehåndtering' og 'Variation mikroskop' behandles i nedenstående tekst. Datagrundlag er den artsspecifikke kulstofbiomasse. NA indikerer in variation fundet

Klasse	Art	variation prøvehåndtering	variation mikroskop	P
		%[lav - høj (%)]	%[lav - høj (%)]	
Bacillariophyceae	<i>Attheya septentrionalis</i>	NA	100,4[63-134]	0.28
Bacillariophyceae	<i>Chaetoceros decipiens</i>	52,4[9-80]	17,8[0-26]	0.17
Bacillariophyceae	<i>Chaetoceros sol.</i>	NA	23,7[16-30]	0.10
Bacillariophyceae	<i>Chaetoceros subtilis</i>	NA	38,5[26-49]	0.11
Bacillariophyceae	<i>Rhizosolenia setigera</i>	41,8[20-58]	5,6[3-7]	0.85
Bacillariophyceae	<i>Skeletonema costatum</i>	6,6[0-11]	7,7[4-10]	0.08
Bacillariophyceae	<i>Thalassionema nitzschioides</i>	49,9[0-133]	119,3[53-179]	0.06
Bacillariophyceae	<i>Thalassiosira</i>	NA	774,3[592-980]	0.01
Bacillariophyceae	<i>Thalassiosira anguste-lineata</i>	51,3[22-73]	14,7[8-20]	0.15
Cryptophyceae	<i>Cryptophyceae</i>	NA	162,1[127-197]	0.18
Dinophyceae	<i>Heterocapsa rotundata</i>	8,0[0-14]	10,9[6-14]	0.03

Kiselalgen *Skeletonema costatum* var den overvejende art i prøven og den udgjorde mellem 85 og 94% af total kulstofbiomassen hos de fire konsulenter (Tabel 8). De øvrige arter udgør en minimal andel og med få undtagelser mindre end 0,05 og op til 1% for de enkelte arter, hvorved prøvestørrelsen er den største kilde til variation. For tre arter udgjorde prøvehåndteringen den højeste variation, i de tilfælde var der ingen signifikante forskelle mellem konsulenterne. Det er alligevel bemærkelsesværdigt, at den miksede statistiske model peger på, at prøvehåndteringen er endnu en kilde til variation.

Tabel 8. Procentvise bidrag til total kulstofbiomasse i prøven for hver af konsulenterne. Værdier er bestemt som middelværdien af tre replikater. Hvor ingen standardafvigelse er angivet, er arten kun set i et enkelt eller få tilfælde. Arter der er set af alle konsulenter er noteret øverst i tabellen ned * foran artnavn.

Klasse	Art	Konsulent 1	Konsulent 2	Konsulent 3	Konsulent 4
Bacillariophyceae	* <i>Attheya septentrionalis</i>	0,1±0,0	<0,05	0,3±0,1	0,2±0,3
Bacillariophyceae	<i>Bacillariophyceae</i>		0,1±0,0		
Bacillariophyceae	<i>Chaetoceros</i>	<0,05	<0,05	0,2±0,1	
Bacillariophyceae	<i>Chaetoceros brevis/diadema</i>	0,1±0,0	<0,05	<0,05	
Bacillariophyceae	* <i>Chaetoceros decipiens</i>	0,1±0,0	<0,05	<0,05	<0,05
Bacillariophyceae	<i>Chaetoceros phaeoceros gruppen</i>		<0,05		
Bacillariophyceae	<i>Chaetoceros similis</i>	<0,05	<0,05	<0,05	
Bacillariophyceae	* <i>Chaetoceros sol.</i>	0,4±0,1	0,4±0,1	0,9±0,3	0,5±0,1
Bacillariophyceae	* <i>Chaetoceros subtilis</i>	0,4±0,1	0,8±0,1	0,5±0,1	0,2±0,0
Bacillariophyceae	<i>Chaetoceros wighamii</i>	0,2±0,1	<0,05	0,3±0,0	
Bacillariophyceae	<i>Coscinodiscus</i>	2,7±0,2			
Bacillariophyceae	<i>Detonula confervacea</i>	0,4±0,2	<0,05	0,4±0,1	
Bacillariophyceae	<i>Leptocylindrus danicus</i>		<0,05		
Bacillariophyceae	<i>Licmophora</i>		<0,05		
Bacillariophyceae	<i>Melosira arctica</i>		0,1±0,0		
Bacillariophyceae	<i>Navicula</i>		<0,05		
Bacillariophyceae	<i>Nitzschia longissima</i>		<0,05		
Bacillariophyceae	<i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i>	<0,05	<0,05	0,1±0,0	
Bacillariophyceae	<i>Rhizosolenia hebetata var. semispina</i>				<0,05
Bacillariophyceae	* <i>Rhizosolenia setigera</i>	1,3±0,5	1,2±0,4	0,8±0,2	0,9±0,2
Bacillariophyceae	* <i>Skeletonema costatum</i>	85,4±1,8	92,4±1,7	89,2±1,4	94,1±1,0
Bacillariophyceae	* <i>Thalassionema nitzschioides</i>	0,2±0,1	<0,05	0,1±0,1	<0,05
Bacillariophyceae	* <i>Thalassiosira</i>	8,6±1,0	3,5±1,0	6,1±0,9	0,1±0,0
Bacillariophyceae	* <i>Thalassiosira anguste-lineata</i>	0,3±0,1	0,3±0,2	0,1±0,0	0,2±0,0
Bacillariophyceae	<i>Thalassiosira minima</i>				3,2±0,5
Cryptophyceae	* <i>Cryptophyceae</i>	0,6±0,2	0,8±0,0	0,9±0,0	0,5±0,0
Dinophyceae	* <i>Heterocapsa rotundata</i>	0,3±0,1	0,5±0,1	0,3±0,1	0,2±0,0

2.3 Diversitet

Der eksisterer en række indeks, der anvendes bredt i biologiske analyser til at undersøge og sammenligne artsrigdommen og diversiteten i et givent økosystem, herunder også planktonsamfund. Antallet af arter (artsrigdom) og diversitet regnes for entydige mål for et økosystems kvalitet og funktion, og ændringen heri antages derfor at afspejle ændringer i økosystemet.

Diversitetsindeksene kan anvendes som et mål til sammenligning af artsidentifikation og registrerede artsantal.

Artsrigdom, udtrykt som antallet af arter⁵ (*S*), er det simpleste udtryk for diversitet i givne prøver og beregnes som:

⁵ Ofte anvendes udtrykket "species richness", til at beskrive antallet af arter i den peer reviewed litteratur

$$S = \sum S_n \quad \text{formel 1}$$

hvor S angiver summen af arter og S_n angiver art.

Dernæst blev *Margalefs* indeks beregnet:

Prøvestørrelsen har indflydelse på antallet af arter, der observeres i en given prøve. Det betyder, at jo større prøve der oparbejdes, jo flere arter og individer vil der blive registreret. Dette vil i et vist omfang påvirke beregningen af artsrigdommen.

$$\text{Margalef} = \frac{S-1}{\ln(n)} \quad \text{formel 2}$$

hvor n er antallet af observationer.

Shannon-Weaver diversitetsindeks (H') er beregnet som:

$$H' = -\sum \left[\left(\frac{n_i}{n} \right) \left(\ln \frac{n_i}{n} \right) \right] \quad \text{formel 3}$$

hvor n_i er talletallet af den i 'de art oparbejdet i prøven. Formel 3 har den fordel, over de øvrige indekser, at alle arters relative individantal (her cellekoncentration) medtages i beregningen.

For at imødekomme dette, kan data 'rare-faction'-korrigeres, hvorved artsrigdommen normaliseres til sammenlignelige talletal, og derved fjernes usikkerheden, der skyldes variationer i talletal som følge af forskelle i tællestrategier samt artsbestemmelser.

Tabel 9 Gennemsnitlige indeks \pm standard afvigelse beregnet vha. formel 1, 2 og 3. Der var statistiske forskelle mellem konsulenterne inden for alle indekser (ONE-WAY ANOVA $P < 0,001$).

Konsulent	Artsrigdom (formel 1)	Rare-faction korr. antal arter	Margalef artssrigdoms indeks (formel 2)	Shannon -Weaver diversitet indeks (H') (formel 3)
1	17.00 \pm 1.73	8.32 \pm 0.47	1.24 \pm 0.12	0.31 \pm 0.06
2	20.33 \pm 0.58	7.07 \pm 0.17	1.51 \pm 0.05	0.40 \pm 0.06
3	16.00 (NA)	8.45 \pm 0.24	1.15 \pm 0.00	0.29 \pm 0.01
4	13.00 (NA)	6.94 \pm 0.06	0.94 \pm 0.00	0.34 \pm 0.07

Data er rare-faction korrigeret til en prøvestørrelse, der svarer til at tælle 1000 tilfældige celler inden for en $\frac{1}{2}$ bundplade. Tabel 9 viser de beregnede diversitet indices, inklusiv Shannon-Weaver indeks. Der indgår ikke rare-faction korrektion i beregningen af Margalefs indeks og Shannon-Weaver indekset.

En one-way ANOVA efterfulgt af en *ad hoc* Tukey's t-test blev udført på artsrigdommen for at identificere signifikante forskelle mellem konsulenterne. Det viste, at konsulent 2 og 4 adskilte sig statistisk signifikant fra de øvrige konsulenter ($P < 0,001$). Når artsrigdomme rare faction korrigeres og der tages højde for uens prøvestørrelse, var artsantallet bestemt af konsulent 1 og konsulent 3 statistisk signifikant ens, samt konsulent 2 og 4 var statistisk signifikant ens ($P < 0,0002$).

Der blev fundet gennemsnitligt 16,3 arter med omkring 40% forskel mellem konsulent 4 (13 arter) og konsulent 2 (20,3 arter) (Tabel 9). Efter rare-faction korrektion var forskellen reduceret til 17% mellem højest og lavest antal arter. Det peger på, at lidt under halvdelen af forskellen mellem konsulenterne skyl-

des, at konsulenterne optalte forskellige prøvestørrelser. Den resterende forskel (23%), kan henføres til specifikke forskelle mellem konsulenternes tællestrategi og artsbestemmelse.

Optællingen blev foretaget i et 25mL kamre og det kan argumenteres, at den usædvanligt store forekomst af *Skeletonema* sp./*Skeletonema costatum* gjorde, at materialet delvist lå i lag og muligvis skyggede for fåtallige celler af andre arter. Denne forklaring udfordres af, at forskellen mellem højeste og laveste antal arter var mellem 20 og 13 fundne arter (Tabel 9).

De arter, der ikke er set af alle konsulenter, er almindeligt forekommende arter. Det vurderes derfor, at forskellen ikke skyldes, at konsulenterne ikke har kunnet kende arterne. De arter, som ikke er talt af alle konsulenter, er arter, som fandtes i meget lave koncentrationer i prøven. Rare-fraction korrektionen reducerede forskellen mellem konsulenterne. Dette betyder, at nogle af konsulenterne var i stand til at finde fåtallige arter, mens andre i højere grad overså disse. Resultatet peger også på, at selvom alle konsulenter fulgte de tekniske anvisninger, har konsulenternes individuelle tællestrategi⁶ indflydelse på det endelige resultat.

Similaritet

Similaritet kan udtrykkes som ligheden mellem konsulenter. I denne analyse er similariteten beregnet vha. Bray-Curtis similaritet (herefter 'similaritet'), se formel 4, ud fra tilstedeværelse - fravær i en prøve.

Similariteten udtrykker forskellen mellem den *j*de og *k*de prøve. Det betyder, at y_{ij} repræsenterer tilstedeværelse (eller fravær) af en art (*i*) i den *j*de prøve. Lignende repræsenterer y_{ik} den *i*de art i den *k*de prøver. I formelen anvendes den numeriske værdi for differencen således, at rækkefølgen af den *j*de og *k*de prøve er uden betydning (uden fortegn).

$$Bray - Curtis = 100 \left\{ 1 - \frac{\sum_{i=1}^P |y_{ij} - y_{ik}|}{\sum_{i=1}^P (y_{ij} + y_{ik})} \right\} \quad \text{formel 4}$$

Ved at beregne similariteten ud fra tilstedeværelse - fravær, bestemmes et relativt mål for den indbyrdes lighed mellem de fire deltagende konsulenter *taksonomisk* præstation, uden indflydelse af forskelle der skyldes varierende tælletal og volumenbestemmelser. Similariteterne angiver derfor et overordnet mål for ligheden mellem konsulenternes artbestemmelse på prøveniveau.

De beregnede similariteter danner en værdi mellem 0 og 100, hvor 100 angiver fuldstændig overensstemmelse mellem to prøver. Tilstedeværelse af de enkelte arter indgår således som individuelle variable i formel 4. Konsulenternes præstationer er vist i Tabel 10. De gråskraverede felter i Tabel 10 indikerer similariteten indenfor de enkelte konsulenter, hvorimod de øvrige værdier indikerer den gennemsnitlige similaritet på tværs af konsulent. Konsulent 4 har 100% similaritet indenfor egen artbestemmelse, hvilket betyder at denne konsulent ikke fandt forskelle i artssammensætningen indenfor egen artbestemmelse, de øvrige viser tilsvarende høje similariteter indenfor egne bestemmelser mellem 87 til 94%. Når similariteten beregnes på tværs af konsulenterne, viser konsulent 4 derimod den største forskel i forhold til de øvrige

⁶ Med tællestrategi peges der særligt på optælling af antal transekter, hvilket påvirker prøvestørrelse og derved antallet af fundende arter.

konsulenter (69- 74%), hvorimod similariteten på tværs af de øvrige tre konsulenter var mellem 81 -95%. De tre konsulenter havde i deres artsbestemmelse similariteter, der på tværs af konsulenterne kun var svagt mindre end similiarteten indenfor konsulenterne (gennemsnitligt 88% mod gennemsnitligt 89%, Tabel 10).

En forklaring på, at konsulent 4 har 100 % overensstemmelse mellem egen replikater og den mindste overensstemmelse med de øvrige kan være, at konsulenten ikke har de sjældne arter med i bestemmelsen.

Tabel 10. Beregnede similariteter af tilstedeværelse – fravær af arter (%). Værdier er gennemsnit af triplikat bestemmelser. Grå skraverede felter markerer similariteter inden for konsulenterne. Øvrige værdier viser similariteter på tværs af konsulenterne.

Konsulent	1	2	3	4
1	94	81	95	71
2		87	81	69
3			87	74
4				100

3. Konklusion og anbefalinger

3.1 Generelt

Det kræver stor taksonomisk erfaring at oparbejde planktonprøver i omvendt mikroskop. Fremgangsmåden ved NOVANA er defineret af de tekniske anvisninger (TA M09), som angiver en nedre grænse for, hvornår en prøve er tilfredsstillende oparbejdet. Det betyder, at de dominerende arter skal tælles i mindst 50 individer, samt at der samlet skal tælles mindst 500 celler i hver prøve. Dette krav er opfyldt til fulde af alle deltagende konsulenter.

Hvis en konsulent oparbejder en større del af prøven end angivet i de tekniske anvisninger, vil konsulenter, der løser opgaven præcist efter de tekniske anvisninger, fremstå som præsterende dårligere. Ved at rare-faction korrigerer artsrigdomme i forhold til prøvestørrelsen, er den specifikke forskel mellem konsulenternes bestemmelse af artsrigdommen ved nærværende interkalibrering reduceret fra omkring 40% til 17%, hvilket peger på, at omhu ved mikroskopet og tællestrategi er vigtige faktorer.

3.2 Taksonomi

Deltagernes bestemmelse af artsrigdommen viste en del variation mellem konsulenterne. Der blev samlet set optalt 27 arter, hvoraf 24 arter blev optalt af den konsulent, der talte flest, mens der kun blev optalt 13 arter af den konsulent, der talte færrest. I alt blev 11 arter optalt af alle fire konsulenter. Disse betegnes nøglearter. Forskellen i artsrigdom peger på heterogenitet i den mikroskopiske analyse på tværs af konsulenterne. Det skal noteres, at forskellen i artsrigdommen mellem konsulenterne er inden for den erfaringsmæssige forskel i forhold til forrige fytoplankton interkalibrering, hvor der blev bestemt mellem 24 og 52 arter (Jakobsen 2012).

De arter, der ikke er set af alle konsulenter, er almindeligt forekommende arter. Det vurderes derfor, at forskellen ikke skyldes, at konsulenterne ikke har kunnet kende arterne. De arter, som ikke er talt af alle konsulenter, er arter, som fandtes i meget lave koncentrationer i prøven. Forskellen skyldes derfor formentlig forskelle i tællestrategi eventuelt kombineret med, at de fåtallige arter kunne være skjult under de tætte forekomster af *Skeletonema* sp./*Skeletonema costatum* i tællekammeret. Hvis tætheden *Skeletonema* sp./*Skeletonema costatum* har spillet en rolle, vurderes det, at omhu og tællestrategi er vigtige faktorer, der spiller ind på det endelige resultat.

Forskellen mellem konsulenternes navngivning har ikke afspejles i bestemmelse af totalbiomassen, i inddelingen i overordnede algeklasser, i beregningen af Shannon – Weaver diversitets indekset eller i beregning af artsrigdommen.

3.3 Diversitet

I monitoringsammenhæng pågår løbende en dialog inden for EU samt i de regionale havkonventioner (HELCOM, OSPAR) omkring udvikling af indikatorer, hvor bl.a. fytoplanktonarter, klasser og biomasser indgår i bestemmelse af bl.a. vandsøjlens økologiske/miljømæssige tilstand samt for at identificere ændringer over tid i tilstanden.

Der findes overraskende få undersøgelser, der systematisk adresserer den menneskelige faktors indflydelse på usikkerheder i forbindelse med navngivningen under oparbejdningen af planktonprøver. I en undersøgelse blev det fundet, at den mest kompetente gruppe af eksperter kunne genkende mellem 84% - 95% af fytoplankton arter fra billedmateriale (Cluverhouse m.fl. 2003). Selvom nærværende interkalibrering ikke er direkte sammenlignelig med studiet af Cluverhouse m.fl. (2003) idet der ikke arbejdes med billeder, men med komplekse naturlige prøver, så anses similariteter >80% som værende tilfredsstillende. Konsulent 4 har en gennemsnitlig similaritet på 71% i forhold til de øvrige konsulenter, og scorer således lavere end 80%. Dette kan forklares ved, at denne konsulent bestemte færre arter end de øvrige deltagerer.

3.4 Biomasser

Den blandede statistiske model fandt forskelle i biomasser bestemt på arts- og klasseniveau mellem konsulenterne. Det skal bemærkes, at 1) antallet af deltagere kun er fire, og 2) den fundne P-værdi er 0,03, hvilket peger på risikoen for en falsk, positiv signifikans.

Derudover er datamaterialet for rekylalger og dinoflagellaten *Heterocapsa rotundata* minimalt på grund af prøvens årstidsbestemte beskaffenhed, hvilket medfører større variation som følge af en lille prøvestørrelse.

Der blev observeret forskelle i størrelsesbestemmelser af arterne, som konsulenterne var enige om. Slægten *Thalassiosira* og gruppen Cryptophyceae består af flere arter, og cellevolumen vil derfor variere mere. Hvis bidraget fra *Thalassiosira* og Cryptophyceae ignoreres, er det tydeligt, at der stadig er forskelle i konsulenternes størrelsesbestemmelse. For den dominerende art *Skeletonema costatum* varierer cellevolumen med omkring en faktor 2. For de øvrige arter er forskellen større, men det kan meget vel skyldes, at der for disse arter er opmålt få individer. Derudover peger den miksedede statistiske model på, at prøvehåndteringen er endnu en kilde til variation.

Forskellen mellem konsulenternes biomassebestemmelse af kiselalger samt bestemmelsen af prøvernes total biomasse er $\approx 11\%$, hvilket er minimalt i forhold til de sæsonbetingede variationer i kiselalgebiomasse, der typiske er af størrelsesordenen $\approx 200 - 300\%$. Det vurderes derfor, at biomassebestemmelserne er præcise.

3.5 Sammenligningen med tidligere interkalibreringer af marint fytoplankton

Der blev afholdt interkalibrering inden for det marine fytoplankton i 2004 (Henriksen m.fl. 2006) og i 2012 (Jakobsen 2012). I interkalibreringen i 2004 var der i alt 16 deltagere, i 2012 var der seks deltagere, og nærværende interkalibrering havde fire deltagere.

I interkalibreringen 2012 blev der opmålt langt flere arter end i 2018 interkalibreringen. Dette skyldes forskelle i indsamlingstidspunkt og lokalitet og kan ikke henføres til de deltagende konsulenter. Variationen mellem deltagerens

opmåling af nøglearter⁷ varierede med en faktor to i 2018, hvorimod opmålingen af nøglearter varierede med en helt op til faktor 10 i 2012 interkalibreringen. Der var ligeledes mindre variation mellem konsulenterne (inklusive konsulent 4), som i 2012 var $\approx 43\%$ hvorimod den var $\approx 11\%$ i 2018 interkalibreringen.

Ifølge MST er der siden interkalibreringen i 2012 lagt ekstra vægt på konsulenternes interne kvalitetskontrol ved udbud af opgaver. I det omfang den interne kvalitetskontrol omfatter verifikation hos kolleger er konsulenterne blevet bedt om at undlade denne del af den interne kvalitetskontrol i indeværende interkalibrering, og det kan ikke udelukkes at en del af de fremkomne forskelle i taxonomi og diversitet derfor ville kunne være fanget i denne interne kontrol.

⁷ Heri er kun konsulent 1-3 medtaget, da konsulent 4 ikke opmålte nøglearter i alle replikater

4. Referencer

- Anttila, S., V. Fleming-Lehtinen, J. Attila, S. Junttila, H. Alasalmi, H. Hallfors, M. Kervinen, and S. Koponen 2018. A novel earth observation based ecological indicator for cyanobacterial blooms. *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation* 64: 145-155.
- Clarke, KR, Gorley RN, Somerfield P, Warwick RM (2014). *Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation*, 3 ed. PRIMER-E.
- Culverhouse, P. F., N. Macleod, Williams, M. C. Benfield, R. M. Lopes, and M. Picheral 2014. An empirical assessment of the consistency of taxonomic identifications. *Mar Biol Res* 10: 73-84.
- Culverhouse, P. F., R. Williams, B. Reguera, V. Herry, and S. Gonzalez-Gil 2003. Do experts make mistakes? A comparison of human and machine identification of dinoflagellates. *Mar Ecol Prog Ser* 247: 17-25.
- Henriksen P, Nielsen TG & Andersen JH (2006) Interkalibrering af planktonundersøgelser i marine områder 2004. Arbejdsrapport fra DMU nr. 221, Danmarks Miljøundersøgelser, 37 s.
- Holmboe N, Sørensen HM, Jensen H, Fugl K, Johansson LS, Bøgestrand J, Sortkjær L, Fossing H & Manscher O (2015) Fytoplankton og zooplankton. Datateknisk anvisning DT03, version 1, 22s.
- Jakobsen HH (2012) Interkalibrering af fytoplanktonundersøgelser i marine områder 2012. Teknisk rapport fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi nr. 17, 20 s.
- Jakobsen HH & Fossing H (2017) Fytoplankton. Teknisk anvisning M09, version 4, 34 s.
- McQuatters, A., A. Atkinson, A. Aubert, J. Bedford, M. Best, E. Bresnan, K. Cook, M. Devlin, R. Gowen, D. G. Johns, M. Machairopoulou, A. McKinney, A. Mellor, C. Ostle, C. Scherer, and P. Tett 2019. Plankton lifeforms as a biodiversity indicator for regional-scale assessment of pelagic habitats for policy. *Ecological Indicators* 101: 913-925.
- Wasmund, N., S. Busch, J. Göbel, S. Gromisz, H. Högländer, S. Huseby, A. Jaanus, H. H. Jakobsen, M. Johansen, I. Jurgensone, W. Krasniewski, I. Oleina, and M. Von Weber (2018). *Cyanobacteria biomass 1990-2017. HELCOM Baltic Sea Environment Fact Sheets* 2018.

5. Appendiks

5.1 Deltager

Per Andersen
NIRAS
Ceres Allé 3
8000 Aarhus C

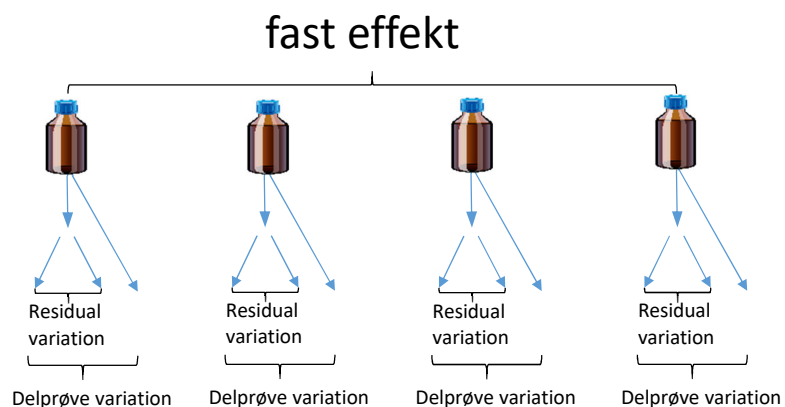
Jytte Hørning
NIRAS
Ceres Allé 3
8000 Aarhus C

Kirsten Olrik
Miljøbiologisk Laboratorium ApS
Henningsens Allé 2C
DK-2900 Hellerup

Gert Hansen
NIRAS
Ceres Allé 3
8000 Aarhus C

5.2 Blandet model test

Blandede model test, er en udvidelse af simple lineære statistiske modeller til at undersøge effekten af en givne respons og anvendes her i stedet for den velkendte ANOVA. En blandet model tillader både faste og tilfældige effekter og anvendes bla. til at undersøge data indsamlet i et split plot design, som er anvendt i denne rapport. I dette eksempel er konsulenterne den faste effekt, der testes. Variansen med tilhørende P værdier, som er **variationen** (variansen) af opdelingen af prøven i to separate **delprøver**, og **residual variationen**, som er variansen af optællingen af prøven i samme kammer to gange. **Delprøve variationen** fortolkes som variationen, der skyldes at prøven bestemmes to gange og fortolkes hidrørende fra konsulenternes arbejde ved mikroskopet. Det betyder at **residual variation** er den del af variansen, der ikke kan forklares med at prøven optælles separate, og fortolkes som variationen, der skyldes håndteringen af prøve.



INTERKALIBRERING AF FYTOPLANKTON- UNDERSØGELSER I MARINE OMRÅDER 2018

En interkalibrering af fytoplankton blev udført i løbet af sommeren 2018. Der var i alt 4 deltagere i interkalibreringen, hvis formål var at beskrive variationen mellem deltagerne samt variationen indenfor for den enkelte deltager. Interkalibreringen var designet således, at det var muligt at skelne effekten af prøvehåndtering, fra variationen, der opstår ved arbejdet ved mikroskopet. Der blev fundet statistisk signifikante forskelle mellem deltagerne i bestemmelsen af totalbiomassen. På trods af, at forskellen var signifikant, var den meget lille. Der var forskelle mellem deltagernes opgørelse af arter, celledørrelser og cellekoncentrationen mellem alle 4 deltagere. Prøvehåndteringen var ligeledes en kilde til variation. Forskellen mellem deltagerne bestemte som similitet, dannede et fingeraftryk, der adskilte 2 deltagere fra de øvrige 2 deltagere.