

HPLC til kvantificering af fytoplankton- biomasse

Et litteraturstudie

Notat fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi

Dato: 8. marts 2018

Eti Levi

Institut for Bioscience

Rekvirent:
Miljøstyrelsen
Antal sider: 20

Faglig kommentering:
Louise Schlüter ²⁾
Liselotte Sander Johansson ¹⁾
Torben Linding Lauridsen ¹⁾

¹⁾Institut for Bioscience

²⁾DHI, Agern Allé 5, 2970 Hørsholm

Kvalitetssikring, centret:
Susanne Boutrup



AARHUS
UNIVERSITET

DCE - NATIONALT CENTER FOR MILJØ OG ENERGI

Tel.: +45 8715 0000
E-mail: dce@au.dk
<http://dce.au.dk>

Indhold

1	Baggrund	3
2	Indledning	4
2.1	Markørpigmenter i fytoplankton	4
3	Analyse af markørpigmenter, identifikation og kvantificering	5
3.1	Pigmentundersøgelser – opmærksomhedspunkter	7
4	Litteratursøgning	10
5	Resume	16
6	Referencer	18

1 Baggrund

Fytoplankton er et af de fire kvalitetselementer, der ifølge vandrammedirektivet skal bidrage til at klassificere den økologiske kvalitet i en given sø. Til dette formål er der udarbejdet et indeks (Søndergaard et al., 2013), der henfører søen til en af de økologiske klasser: høj, god, moderat, ringe eller dårlig. I dette indeks indgår indikatorerne klorofyl a koncentrationen, procentvis andel af biomassen af henholdsvis blågrønalger og gualger samt tilstedeværelsen af specifikke indikatorarter, der indikerer henholdsvis lav eller høj koncentration af totalfosfor.

Opgørelsen af fytoplanktonbiomassen foregår efter de nuværende retningslinjer ved at tælle og opmåle et antal individer af hver af de fundne arter og derefter beregne individbiomassen vha. specifikke geometriske formler. Dette er en tidskrævende proces; ofte findes der mange forskellige arter i en prøve, og for mange arter skal der måles flere dimensioner på hvert individ.

Med baggrund i dette har Miljøstyrelsen v/FKG-Sø anmodet DCE om at foretage et litteraturstudie, der klarlægger "state of the art", dvs. litteraturstudier af publicerede resultater vedrørende bestemmelse af fytoplanktonbiomasse på gruppeniveau ud fra pigmentanalyser foretaget vha. HPLC. Der fokuseres på arbejde udført i ferskvandssøer, men der skeles også til marine undersøgelser, hvor langt de fleste studier er foretaget.

Dette notat omfatter en beskrivelse af vigtige studier og undersøgelser, der er foretaget i fortrinsvis udenlandske, men også i danske vandområder, i løbet af de seneste ca. 15 år.

2 Indledning

2.1 Markørpigmenter i fytoplankton

Fytoplankton (alger) er en fællesbetegnelse for fotosyntetiske mikroorganismer, der findes i havområder, søer, damme og floder (Findlay & Kling, 2003; Reynolds, 2006). De er vigtige primærproducenter og udgør et væsentligt element i akvatiske økosystemer (Bellinger & Sigee, 2010). Deres rolle i næringsstofcyklussen og energiflowet er af stor betydning, og deres forekomst påvirker egenskaberne (fx vækst og reproduktionskapacitet) hos andre organismer (Azari et al., 2010). Fytoplanktons respons på ændringer i økosystemerne kan være både kvalitativ og kvantitativ (Reynolds, 2006).

Fytoplankton er et af de biologiske kvalitetselementer, der anvendes til vurdering af søers økologiske status i forbindelse med EU's vandrammedirektiv (VRD), og udgør i denne forbindelse en af de væsentligste og hyppigst undersøgte organismegrupper (Poikane et al., 2015). Næsten alle VRD-medlemsstater har udviklet og interkalibreret et fytoplanktonindeks for søer med henblik på at vurdere graden af menneskelig påvirkning, primært eutrofiering (Carvalho et al., 2013; Poikane et al., 2015). Disse indekser omfatter mange målinger, fx af fytoplanktons forekomst (klorofyl a, total biovolumen/biomasse) og artssammensætningen (fx blågrønalgers biomasse eller procentandel af den samlede biomasse) (Carvalho et al., 2013). Indekset, der er udviklet til danske søer, anvender koncentrationen af klorofyl a, den procentvise andel af blågrønalger og gulalger af den totale fytoplanktonbiomasse, samt tilstedeværelsen af udvalgte indikatorarter (Søndergaard et al., 2013; Poikane et al., 2015).

Den taksonomiske bestemmelse af fytoplankton har i mange år været baseret på mikroskopi (Higgins et al., 2011), og arternes biovolumen beregnes i henhold til algernes geometriske former eller en tilnærmelse til disse (Hillebrand et al., 1999). Denne form for oparbejdning er imidlertid tidskrævende, kræver et højt niveau af taksonomisk ekspertise, og præcisionen (usikkerhed som følge af tilfældige fejl) afhænger af antallet af celler, der tælles (400 celler, for 95 % konfidensgrænse og 10 % præcision for hver art) (Higgins et al., 2011). Higgins et al. (2011) tilføjede, at mikroskopi er mest pålidelig for større celler, hvorimod mindre celler kan være umulige at identificere eller kan blive overset, samt at de gennemsnitlige resultater af cellevolumener vil være mere unøjagtige, hvis der er stor forskel i cellestørrelsen inden for den enkelte prøve (fx kiselalger).

For at afhjælpe disse problemstillinger har man derfor i de senere år i kombination med mikroskopi forsøgt at anvende pigmentanalyser ("chemotaxonomi"), baseret på markørpigmenter, til identifikation af fytoplanktongrupper (fx Buchaca et al., 2005). Disse pigmentanalyser af fytoplanktonprøver er foretaget ved hjælp af HPLC (High Performance Liquid Chromatography) og gør det muligt at analysere hundredvis af prøver på relativt kort tid (Wright & Jeffrey, 2006). Præcisionen ved HPLC-analyse af replikate prøver kan være så høj som 1 %, men de enkelte delprocesser såsom udtagning af delprøver, filtrering og ekstraktion kan mindske præcisionen (Higgins et al., 2011). I undersøgelsen foretaget af Hooker et al. (2005) gennemførtes en sammenligningsøvelse med deltagelse af otte laboratorier, og den viste en gennemsnitlig variationskoefficient (CV) på 7,4 % for de vigtigste pigmenter (Higgins et al., 2011). Ud over den forholdsvis gode præcision kan HPLC-baseret analyse også give information om små celler, såsom pico- og nanoplankton (Higgins et al., 2011), der som nævnt ofte kan overses ved mikroskopiske analyser.

3 Analyse af markørpigmenter, identifikation og kvantificering

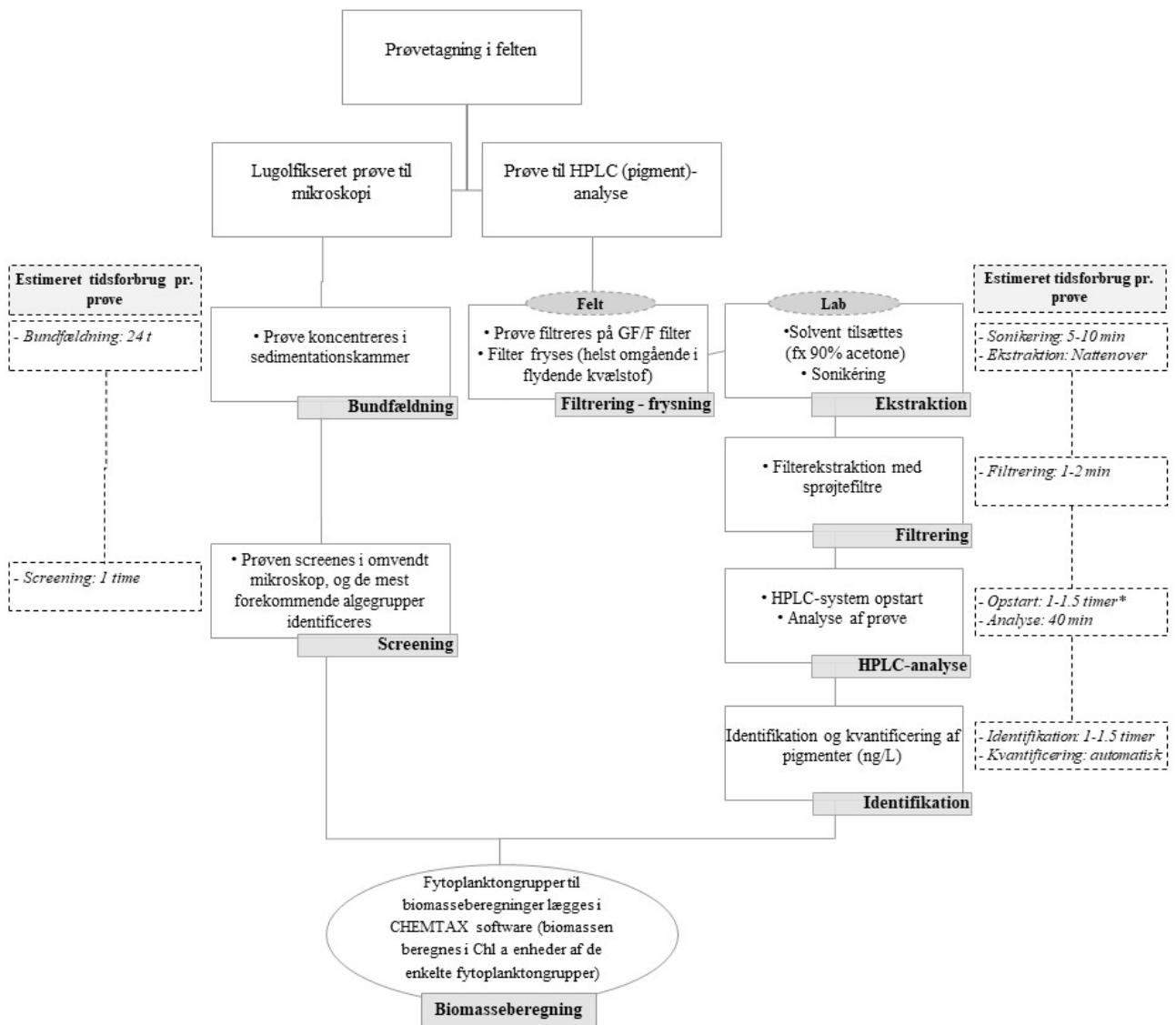
Fotosyntetiserende organismer kan påvises vha. markørpigmenter, herunder forskellige former af klorofyl (Chls) og karotenoider (Jeffrey et al., 1997; McGowan, 2013). Disse pigmenter gør det muligt at adskille alger fra andre mikrobielle elementer (fx bakterier) (Wright & Jeffrey, 2006).

Den grundlæggende håndtering af vandprøverne til pigmentidentifikation omfatter følgende trin (de enkelte delprocesser kan afvige fra undersøgelse til undersøgelse) (Descy et al., 2009; Lauridsen et al., 2011; Schlüter et al., 2016; Simmons et al., 2016):

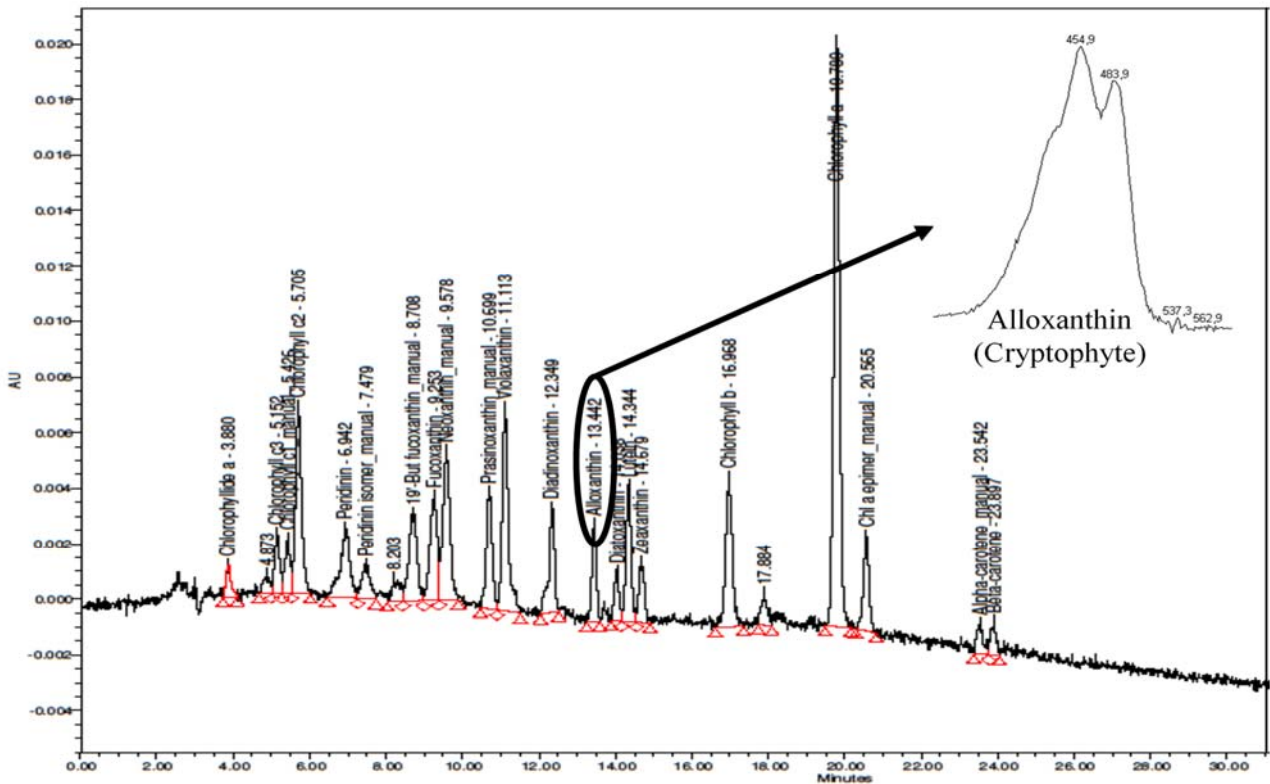
- Efter prøveudtagningen filtreres en kendt mængde (ca. 50-3000 ml) vand gennem Whatman GF/F-filtre. Filtreringen skal foretages så hurtigt som muligt efter prøveudtagningen, idet pigmentændringer (fotoadaptation) vil forekomme i algecellerne, hvis prøverne opbevares i mørke gennem længere tid.
- Efter filtrering bliver pigmenterne følsomme over for nedbrydning pga. cellernes tendens til at gå i stykker på filtrene. Derfor bør filtrene fryses straks (fx vha. flydende kvælstof) og kan opbevares ved ca. -80 °C i mindst 12 måneder indtil analyse. Hvis filtrene ikke fryses straks, skal de opbevares mørkt og koldt, og viderebehandling skal foregå inden for *højst et par timer* (Tamm et al., 2015; Schlüter et al., 2016).
- Før HPLC-analysen ekstraheres alle pigmenter fra de frosne filtre i 90 % acetone eller 100 % metanol og opbevares koldt. Ekstrakterne sonikeres og filtreres gennem sprøjtefiltre til HPLC-vials. Metanolekstraktion kræver hurtig analyse efter ekstraktionen på grund af den hurtige nedbrydning.
- Et HPLC-system skal opstilles, og kalibrering skal foretages med anvendelse af kommercielle pigmentstandarder.
- Pigmentseparering udføres almindeligvis med omvendt-fase (reverse phase) HPLC. Det tager ca. 40-50 minutter for hver prøve, afhængig af HPLC-systemets egenskaber og den valgte gradient-elueringsmetode.
- Identifikation af markørpigmenter foretages ved sammenligning af pigmenternes relative retentionstid og absorptionsspektre (Fig. 2) med referencespektre fra kendte algekulturer.

NB Det kræver tid at opbygge erfaring med pigmentidentifikation!

Fremgangsmåden er illustreret i flowdiagrammet i Fig. 1.



Figur 1. Fremgangsmåde fra prøvetagning i felten til beregning af biomassen af fytoplanktongrupper vha. HPLC-analyse og CHEMTAX- software, samt estimeret tidsforbrug. Det estimerede tidsforbrug kan variere. *). Dette trin skal ikke nødvendigvis udføres for hver enkelt prøve. Se tekst for detaljer.



Figur 2. Kromatogram af algepigmenter fra en DHImix-standard, adskilt vha. HPLC. Kromatogrammet viser pigmenternes retentionstider sammen med et eksempel på absorptionsspektrum for pigmentet alloxanthin, som er en indikator for rekylalger.

Fytoplanktongrupperes biomasse kan beregnes som klorofyl a (Chl a) enheder ud fra koncentrationerne af de identificerede markørpigmenter i vandsøjlen (Descy et al., 2009). Denne kvantitative analyse kan udføres vha. fem forskellige metoder: multipel lineær regression, inverse simultane ligninger (ISE), Excel solver, CHEMTAX software og den bayesianske metode (BCE). CHEMTAX, som er et matrix-faktoriseringsprogram (Mackey et al., 1996), er den hyppigst anvendte metode (Higgins et al., 2011). CHEMTAX beregninger kræver et start-input, omfattende i) pigmentkoncentrationer fra forskellige fytoplanktongrupper bestemt ud fra markørpigmenter, ii) den forventede taksonomiske sammensætning bestemt ud fra mikroskopi samt iii) estimerede pigment/Chl a ratioer for de eksisterende fytoplanktongrupper (dvs. de forventede arters forventede pigmentsammensætning) bestemt ud fra algekulturer (Schlüter et al., 2006; Lauridsen et al., 2011; Higgins et al., 2011). For at estimere biomassen justerer programmet derefter gentagne gange hver pigment/Chl a ratio (relativ forekomst af fytoplanktongrupper i forhold til total Chl a), indtil forskellen mellem de beregnede og observerede koncentrationer af Chl a er minimeret (Higgins et al., 2011; Tamm et al., 2015). Derfor er anvendelse af optimale start-ratioer og valget af de fytoplanktongrupper, der skal indgå i analyserne, af afgørende betydning for at opnå den korrekte fytoplanktonbiomasse (Descy et al., 2009).

3.1 Pigmentundersøgelser – opmærksomhedspunkter

Pigmentanalyse muliggør identifikation af fytoplanktonklasser. Undersøgelser har dog vist, at brugen af pigmenter som markører har visse ulemper (Higgins et al., 2011).

Selv om pigmentdiversiteten mellem de forskellige fytoplanktongrupper er høj, forekommer mange pigmenter hos mere end én fytoplanktongruppe (se Tabel 1). Dette medfører, at pigmenterne kan være flertydige, og det komplicerer fortolkningen af pigmentdata (Wright & Jeffrey, 2006; Higgins et al., 2011). CHEMTAX programmet fordeler imidlertid pigmenterne mellem de forskellige fytoplanktonklasser ud fra de pigment/Chl a ratioer og algegrupper, som programmet indledningsvis er blevet "fodret" med.

Tabel 1. Eksempler på pigmenter og algegrupper (ifølge Higgins et al., 2011). (+) angiver det pigment, der anvendes som markørpigment for gruppen.

Markør-pigmenter	Bacillariophyceae	Chrysohyceae	Eustigmatophyceae	Chlorophyceae	Prasinophyceae	Cryptophyceae	Cyanophyceae	Prochlorophyte	Dinophyceae	Euglenophyceae	Prymnesiophyceae
Alloxanthin						(+)					
Aphanizophyll							+				
Astaxanthin				+							
Canthaxanthin			+				+		+		
Chlorophyll-a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Chlorophyll-b				(+)	+			+	+	+	
Chlorophyll-c1	+	+									+
Chlorophyll-c2	+	+				+			+		+
Chlorophyll-c3	+										+
Divinyl Chl-a								(+)			
Divinyl Chl-b								(+)			
Diadinoxanthin	+								+	+	+
Diatoxanthin	+								+	+	+
Echinenone							+	+			
Fucoxanthin	(+)	+							+		+
19'-hexanoyloxyfucoxanthin									+		(+)
Lutein				(+)	+						
Myxoxanthophyll								(+)			
Neoxanthin				+	+				+		
Peridinin									(+)		
Prasinoxanthin					(+)				+		
Violaxanthin		+	+	+	+				+		
Zeaxanthin		+	+	+	+		(+)	+	+		
β,α-carotene				+	+	+		+	+	+	
β,β-carotene	+	+	+	+	+		+		+	+	+

Noget andet, der er værd at bemærke, er at genetiske og fysiologiske (fx størrelse) forhold, samt miljøfaktorer såsom lysforhold og næringsstofstatus, ændrer en algecelles pigmentsammensætning (Higgins et al., 2011). For eksempel vil høj lyseksponering betyde, at cellernes indhold af lyshøstende pigmenter (dvs. pigmenter, der direkte absorberer sollys), som omfatter mange vigtige markører, covarierer med Chl a, mens indholdet af pigmenter, der indgår i lysbeskyttelsen (dvs. den proces, der forhindrer fotoinhibering og oxidativ stress som følge af overskydende/fluktuerende lys), stiger (Descy et al., 2000). Sidstnævnte kan forårsage variationer i cellernes totale pigmentmængde,

hvilket resulterer i variationer i pigment/Chl a ratioerne, som udgør grundlaget for CHEMTAX programmet, der anvendes til at estimere fytoplanktonbiomassen (Wright & Jeffrey, 2006; Schlüter et al., 2016). Desuden kan regionale forskelle, som kan forårsage variation i arter, også påvirke fytoplanktongruppernes pigmentkoncentrationer (Wright & Jeffrey, 2006). For at imødegå dette problem kan datasættene grupperes i forhold til lysets intensitet og/eller næringsstatus på undersøgelsesstederne, og start-pigmentratioerne kan vælges i overensstemmelse hermed (fx Lauridsen et al., 2011; Schlüter et al., 2016).

På grund af ovennævnte variation i pigment/Chl a ratioer ville den ideelle løsning være at definere start-ratioerne ud fra algekulturer, der er repræsentative for artspuljen på undersøgelsesstedet. Hvis nogle af de ratioer, der er tilgængelige i litteraturen, stammer fra sammenlignelige steder eller regioner, er det dog også muligt at anvende disse publicerede ratioer for de pågældende undersøgelsesområder. For eksempel har Schlüter et al. (2016) med succes anvendt ratioer for danske oligotrofe-eutrofe søer (Schlüter et al., 2006; Lauridsen et al., 2011) i deres undersøgelse af i alt 42 søer i Tyskland og Østrig.

4 Litteratursøgning

Kvantitativ pigmentanalyse af fytoplanktongrupper begyndte i 1970'erne (Jeffrey, 1974). Ved at sammenligne resultater fra pigmentanalyser og mikroskopiske undersøgelser er der gennem årene foretaget mange undersøgelser af egnetheden af kvantitativ pigmentanalyse til påvisning af ændringer i fytoplanktonsamfund og økologiske forhold i vandområder. De fleste af disse undersøgelser har omhandlet marine miljøer, men pigmentstudier af ferskvandsmiljøer forekommer i dag hyppigere og hyppigere.

De undersøgelser, der er blevet gennemført i marine miljøer med henblik på at undersøge egnetheden af pigmentanalyser (HPLC-CHEMTAX) til kvalitativ og kvantitativ identifikation af fytoplanktongrupper, har overordnet set udvist sammenlignelige resultater mellem pigmentanalyser og mikroskopiske undersøgelser (fx Wright et al., 1996; Schlüter et al., 2000; Garibotti et al., 2003). Alle undersøgelser har dog også fundet uoverensstemmelser, især vedr. den kvantitative del af analysen. Disse er blevet tilskrevet enten mikroskopi (dvs. tællefejl) eller HPLC (fx ikke-egne pigmenter og/eller flerfyldige pigmenter) (Wright & Jeffrey, 2006). Især zeaxanthin, der anvendes som markørpigment for blågrønalger, har udvist uoverensstemmelser i undersøgelser foretaget i havet (fx Schlüter et al., 2006) (muligvis fordi det er et lysbeskyttende pigment, se ovenfor), samt i forsøg udført i forsøgsindhegninger (fx Havskum et al., 2004). Uoverensstemmelser som følge af flerfyldige markørpigmenter er også blevet påvist (fx fucoxanthinpigment i kiselalger; Garibotti et al., 2003).

Til belysning af fordelene ved pigmentanalyser til identifikation af små cellers tilstedeværelse har Schlüter et al. (2000) og Kozłowski et al. (2011) fundet uoverensstemmende resultater mellem mikroskopi og pigmentanalyser, når fytoplanktonsamfundene er domineret af små celler. Schlüter et al. (2000) fandt også uoverensstemmelser mellem mikroskopieresultater i en sammenligning af tælledata for de samme prøver fra to forskellige laboratorier. En anden kilde til uoverensstemmelse er, at sammenligningerne mellem de to metoder mestendels er foretaget af resultater med forskellige enheder (omregning fra cellevolumen til kulstofindhold og $\mu\text{g Chl } a$) (Wright & Jeffrey, 2006), og at estimeringen af cellernes kulstofbiomasse på basis af mikroskopiundersøgelser kan variere mellem 15 % og 50 % (Schlüter et al., 2000; Wasilowska et al., 2014). I overensstemmelse hermed fandt Garibotti et al. (2003) i deres undersøgelse omfattende 58 stationer på kontinentalsoklen vest for den Antarktiske halvø, at den største forskel i relationen mellem kulstof og Chl *a* forekom i områder med lav biomasse sammenlignet med regioner med middel til høj biomasse.

Higgins et al. (2011) fremhævede pigmentanalyserns anvendelighed i et indhegningsforsøg udført af Lassen et al. (2010), der havde til formål at belyse virkningen af en temperaturstigning på fytoplanktonsamfund identificeret vha. både mikroskopi og pigmentanalyser i kontrollerede (dvs. ikke-naturlige forhold) forsøgsindhegninger. Deres resultater viste, at begge metoder påviste det forventede successionsmønster ved begyndelsen af forårsopblomstringen (skift fra dominans af flagellater til dominans af kiselager). Resultaterne viste imidlertid også, at små flagellater ikke kunne identificeres vha. mikroskopi, og deres antal blev derfor underestimeret sammenlignet med resultaterne fra pigmentanalyserne. Således "overså" de mikroskopiske tællinger nogle af de væsentlige

ændringer, der fandt sted i sammensætningen af fytoplanktonsamfundene i temperatureksperimenterne. Til gengæld påviste pigmentanalysen effekten af den forholdsvis beskedne temperaturstigning (3 °C), der førte til en ændring i flagellaternes (forskellige grupper) relative forekomst. Higgins et al. (2011) tilføjede, at Lassen et al.'s undersøgelse (2010) påviste en langt større variation i de HPLC-bestemte fytoplanktongrupper i forsøgsindhegningerne ved højere temperaturer, mens der ikke var nogen signifikant variation mellem samfundene, der blev identificeret ved brug af mikroskopi.

Pigmentanalyse til kvantitativ bestemmelse af fytoplankton er blevet gennemført med succes i marine miljøer, hvilket har banet vej for lignende undersøgelser i ferskvand. I en undersøgelse af 10 søer med varierende næringsstofniveauer (TP: 15-85 $\mu\text{g L}^{-1}$), størrelser (ca. 0,2-600 km^2) og dybder (gennemsnitlig dybde: 2-92 m) i det sydlige Tyskland blev der foretaget sammenligninger mellem pigmentkoncentrationer og biomassen af fytoplankton, bestemt ved mikroskopi af 103 prøver (Schmid et al., 1998). To af søerne var mesotrofe-eutrofe, dybe og store (i: 15 $\mu\text{g P L}^{-1}$, areal: 571 km^2 , middeldybde: 92 m; ii: 30 $\mu\text{g P L}^{-1}$, areal: 46,6 km^2 , gennemsnitlig dybde: 37 m), to var meget eutrofe og små (i: 70 $\mu\text{g P L}^{-1}$, areal: 1,94 km^2 ; ii: 85 $\mu\text{g P L}^{-1}$, areal: 0,36 km^2), mens resten var små (areal: 0,20-1,34 km^2) og varierede i næringsstofniveau fra oligotrof til eutrof (26-65 $\mu\text{g P L}^{-1}$). I undersøgelsen blev omregningsfaktorer (μm^3 biovolumen/ μg pigment) bestemt vha. lineær regression anvendt til beregning af biovolumener ud fra markørpigmenter ($\mu\text{g L}^{-1}$). Resultaterne viste, at biovolumener beregnet vha. pigmentkoncentrationer var tilstrækkelig nøjagtige til at foretage en kvantitativ fytoplanktonbestemmelse, og at metoden kan anvendes til analyse af forskellige søtyper. Imidlertid var det kun de store/dominerende fytoplanktonklasser, der blev påvist med pigmentanalyser, hvilket viser, at disse ikke giver en nøjagtig artsbestemmelse, og at mikroskopi derfor er en bedre metode til at bestemme artssammensætningen og beregne biomassen.

Efter udviklingen af CHEMTAX programmet har nogle undersøgelser sammenlignet de to kvantificeringsmetoder, multipel regression og CHEMTAX. Til dette formål gennemførte Descy et al. (2000) en undersøgelse i det nordlige Wisconsin, hvor der blev taget prøver på otte undersøgelsessteder (to moser, seks søer, middeldybde mellem 1,7 og 14,6 m) i slutningen af maj, hvor søerne, der hovedsagelig var oligotrofe, var tæt på at være fuldt opblandede. I alt analyserede de ca. 180 prøver fra fortrinsvis epilimnion, og dataene blev behandlet sammen (med undtagelse af de to moser) som en fuldstændig tidsserie og som tidsserier opdelt i ni underenheder. Dataene blev yderligere underinddelt i grupper med lavt og højt indhold af phaeopigmenter for at kigge nærmere på græsning og forskelle i pigmentnedbrydning. Desuden blev hele vandsøjlen analyseret for to af søerne (en klar og en mindre klar) vha. prøver taget på forskellige dybder. Resultaterne viste, at CHEMTAX, sammenlignet med multipel regression, tilvejebragte mere detaljerede kvantitative oplysninger for vandsøjleprøverne, fordi man vha. CHEMTAX kunne bestemme biomassen for fytoplanktongrupper uden unikke pigmenter. Ved at opdele prøverne i underenheder blev også forskelle i fytoplanktongruppernes pigment/Chl a ratioer detekteret, muligvis på grund af skiftende lysforhold (med dybde og over tid). Descy et al. (2000) tilskrev den store uoverensstemmelse mellem mikroskopi og CHEMTAX resultaterne, især for grønalger og fucoxanthinholdige algers vedkommende, mulige problemer vedr. celletællingerne. De tilføjede, at der sandsynligvis også var tale om analytiske fejl (fx manglende fund af pigmenter). De fremhævede også behovet for at indhente flere data vedr. sammensætningen af algepigmenter ved at validere biomassestimaterne via en sammenligning af CHEMTAX og mikroskopi-data.

Efter ovennævnte undersøgelser er anvendelsen af CHEMTAX software blevet mere udbredt, og forskellige studier, hvor man sammenligner resultaterne med mikroskopiske resultater er blevet gennemført for at belyse styrker og mangler ved CHEMTAX baseret biomassekvantificering. Et af disse studier blev udført af Buchaca et al. (2005) i en oligotrof og dimiktisk sø, beliggende i den centrale del af Pyrenæerne i Spanien, med en gennemsnitlig dybde på 32 m og et areal på 24 ha. Prøveudtagning med et dybdeinterval på 9 m blev gennemført i en isfri periode (på nær én måned), både da søen var lagdelt, og da den var opblandet. I undersøgelsen blev der anvendt pigment/Chl a ratioer fra litteraturen, undtagen for gulalger, hvor ratioerne stammede fra en *Ochromonas* sp. kultur. For at optimere programmets ydeevne estimeredes Chl a for hver algeklasse ved at kombinere alle prøvedata. Buchaca et al. (2005) konkluderede, at der var god overensstemmelse mellem de to metoder for furealger, rekylalger og gulalger, mens der var markante forskelle for grønalger. Disse forskelle tillagde de metodemæssige svagheder og forskellene i pigment/Chl a ratioer, men tilføjede, at disse sandsynligvis ikke skyldtes mangler ved softwaren. For grønalgernes vedkommende kunne uoverensstemmelserne også skyldes deres lave biovolumen eller forekomsten af kolonidannende arter.

Pigment/Chl a ratioer varierer på grund af miljøfaktorer og regionale forskelle, der giver udslag i forskelle inden for de enkelte fytoplankton taxa. Derfor understregede Fietz og Nicklish (2004) behovet for at tilvejebringe supplerende pigment/Chl a ratioer. Med henblik på dette gennemførte Schlüter et al. (2006) en undersøgelse omfattende to faser, hvor i) forskellige fytoplanktonarter (i alt 20 ferskvandsarter) blev dyrket for at bestemme pigment/Chl a ratioer for stationær (én lysintensitet) og eksponentiel vækst (tre forskellige lysintensiteter) over fire dage, og hvor ii) ratioerne blev testet (med CHEMTAX) på dybdeintegrerede månedlige (to sommerperioder) prøver taget i seks lavvandede, eutrofe danske søer. Undersøgelsen viste, at de forskellige lysbehandlings virkning på de lyshøstende pigmenter generelt var ubetydelig, hvorimod forekomsten af lysbeskyttende pigmenter (fx zeaxanthin, alloxanthin, diatoxanthin) steg ved højere lysintensiteter. Forfatterne fandt også, at gennemsnitsratioen for rekylalger (alloxanthin:Chl a) var sammenlignelig med ratioen for marine kulturer, hvorimod variationen i gennemsnitsratioen for blågrøn alger (zeaxanthin:Chl a) var høj. Sammenligningen af de to metoder viste ensartede resultater for flere vigtige fytoplankton grupper, såsom blågrøn grøn alger (på trods af stor variation i gennemsnitsratioen), rekylalger, kiselalger og gulalger, mens korrelationen for en anden vigtig gruppe, grøn alger, var lav. Denne lave korrelation blev tilskrevet små celler, som ikke kunne bestemmes ved mikroskopi. Den samme fortolkning gjaldt også de sparsomt repræsenterede fytoplankton grupper, stilkalger og dinoflagellater, som ikke blev registreret med mikroskopi, men derimod med HPLC via deres pigmenter. Schlüter et al. (2006) konkluderede, at pigmenter tilvejebringer vigtige oplysninger om forekomsten af indikatorgrupper, og at disse kan medvirke til at bestemme vandmiljøets økologiske status. De understregede imidlertid også behovet for flere undersøgelser af pigment/Chl a ratioer, især for søer med forskellig trofisk status.

En opfølgende undersøgelse foretaget af Lauridsen et al. (2011) havde til formål at tilvejebringe de nødvendige oplysninger for oligo-mesotrofe søer, som foreslået af Schlüter et al. (2006). Lauridsen et al. (2011) brugte ferskvandsalgekulturer (15 arter dyrket ved tre forskellige lysintensiteter og for stationær vækst ved én lysintensitet over fire døgn) for at bestemme pigment/Chl a ra-

tioer for oligo-mesotrofe søer og for at validere disse ratioer. De repræsentative arter i algekulturerne for de oligo-mesotrofe danske søer blev valgt ud fra 19 års overvågningsdata. Et andet mål var at finde ud af, om de fundne ratioer kunne anvendes til pigmentanalyse af bentiske alger fra både vandløb og søer. Undersøgelsen omfattede udtagning af pelagiske (både sommer og efterår) og bentiske prøver i fem søer og bentiske prøver i tre vandløb. Resultaterne viste, at de forskellige lysbehandlinger kun havde en meget lille indvirkning på pigment/Chl a ratioerne, med undtagelse af zeaxanthin, som også observeret af Schlüter et al. (2006). Ud over dette var pigmentratioerne sammenlignelige med ratioerne bestemt for algekulturer fra marine områder og eutrofe ferskvandsmiljøer. De nye pigment/Chl a ratioer blev indlæst i CHEMTAX softwaren, og Chl a biomasser blev beregnet for de forskellige algegrupper. Sammenligningen af resultater opnået ved mikroskopiering og pigmentanalyse viste også signifikant ensartede resultater. I modsætning til Schlüter et al. (2006) blev der fundet større forskelle for blågrønalger, og dette blev tilskrevet variationen i zeaxanthin/Chl a ratioerne eller muligvis de små celler, der ikke blev registreret med mikroskopi, men med HPLC. For de bentiske algers vedkommende blev der identificeret flere grupper med HPLC end med mikroskopi, enten på grund af små celler eller algenedbrydning, hvilket kun kunne detekteres med HPLC. Samlet set og i overensstemmelse med Schlüter et al. (2006) viste kombinationen af HPLC og mikroskopi sig at være nyttig for både søer og vandløb til kvantificering af sæsonmæssige ændringer i de bentiske algesamfund. Lauridsen et al. (2011) understregede også betydningen af at "fodre" CHEMTAX softwaren med de nødvendige ratioer og algegrupper for at opnå anvendelige resultater.

Tamm et al. (2015) gennemførte en anden sammenligningsundersøgelse i den store (270 km²), lavvandede (gennemsnitsdybde 6 m), eutrofe (TP: 54 µg L⁻¹, TN: 1,6 mg L⁻¹) sø Vörtsjärv i Estland. Denne undersøgelse omfattede fem års prøver taget hver fjortende dag/måned, der gjorde det muligt at identificere sæsonmæssige ændringer. Publicerede pigment/Chl a ratioer samt oplysninger om sammensætningen af søens fytoplanktonsamfund blev anvendt til CHEMTAX beregningerne. Generelt udviste resultaterne af pigmentanalyser og mikroskopi pæn korrelation (Cyanobacteria: $r^2=0,87$ $p<0,001$; Chlorophytes: $r^2=0,77$ $p<0,001$; Diatoms: $r^2=0,74$ $p<0,001$; Cryptophytes: $r^2=0,52$ $p<0,001$; Chrysophytes: $r^2=0,27$ $p<0,05$; Dinoflagellates: $r^2=0,21$ $p>0,05$) især hvad angik de dominerende grupper af blågrønalger og kiselalger, men også for grøn-alger og rekyalger. Begge metodikker detekterede de sæsonmæssige algetoppe. For de mindre hyppigt forekommende fytoplanktongrupper, gulalger og dinoflagellater, var korrelationen meget mindre. Dette blev tilskrevet mulige tællefejl for de mindre hyppigt forekommende arter eller kvantificeringsfejl for de mindre hyppigt forekommende pigmenter (delt mellem få grupper); også variationer i pigment/Chl a ratioer på grund af skiftende lysforhold blev angivet som en mulig årsag. Tamm et al. (2015) konkluderede, at detaljeret mikroskopiering tilvejebringer mere ensartede resultater end pigmentanalyser, hvorimod HPLC-CHEMTAX mindsker usikkerheden ved kvantificering af fåtalligt forekommende grupper.

For yderligere at teste brugen af etablerede pigment/Chl a ratioer (Schlüter et al., 2006; Lauridsen et al., 2011) udførte Schlüter et al. (2016) en undersøgelse i 42 ultra-oligotrofe til eutrofe (TP: 2,3-120 µg L⁻¹) søer i Sydtysskland og Østrig. Til den kvantitative analyse opdelte de søerne i to grupper - oligotrofe og meso-eutrofe - ved at anvende to sæt start-ratioer, bestemt af Lauridsen et al. (2011) og Schlüter et al. (2006). Deres resultater stemte overens med resultaterne af andre undersøgelser og viste relativ god overensstemmelse mellem

resultaterne opnået vha. de to metoder. Forfatterne fremhævede, at opdelingen af søerne i to undergrupper gav meget bedre resultater, end hvis kun ét sæt indledende ratioer havde været anvendt. Resultaterne var mere ensartede for oligotrofe end for meso-eutrofe søer, og for sidstnævnte var der ringe overensstemmelse mellem de to metoders resultater for gulalger. Ifølge forfatterne skyldtes denne uoverensstemmelse fejl i tællingen af rekylalger, den mindst repræsenterede algegruppe i meso-eutrofe søer, såvel som nogle mindre tydelige uoverensstemmelser på grund af ukendte nanoflagellater såsom grønalger og rekylalger. Desuden viste Shannon diversitetsindeks, beregnet ud fra de algeklasser, der blev detekteret vha. de to metoder, signifikant lavere diversitet for mikroskopi end for pigmentanalyser, hvilket viser, at pigmentanalyser detekterede flere algegrupper. Schlüter et al. (2016) beskriver også vanskelighederne ved at sammenligne resultaterne fra to metoder, da biovolumen (mikroskopi) og biomasse (HPLC-CHEMTAX) er baseret på forskellige parametre, hhv. kulstof og af Chl a, der kan variere afhængig af miljøfaktorer og cellernes næringsstofstatus.

Ovennævnte undersøgelser viste generelt god overensstemmelse mellem de to metoder, dog med visse afvigelser. Hertil kommer, at fytoplanktonbaserede undersøgelser af miljøtilstand ofte har fokuseret på de dominerende taxa på slægts- eller højere taksonomiske niveauer (Sarmiento & Descy, 2008). Sarmiento og Descy (2008) gennemførte en undersøgelse, hvor HPLC-CHEMTAX og mikroskopidata blev anvendt til bestemmelse af økologisk status i henhold til vandrammedirektivet (VRD) i søer i det sydlige Belgien beliggende på de vestlige sletter og vestlige højlande, som er VRD-økoregioner. Over otte måneder blev der udtaget 12 vandprøver i 12 reservoirer på det dybeste sted, på forskellige dybder (dybe søer: hver 2,5 m, lavvandede søer: hver 1 m). De anvendte mikroskopiske undersøgelser til at identificere grupperne baseret på dominerende taxa og pigmentdata til at bestemme den relative forekomst af fytoplanktongrupperne. Forfatterne fandt, at de detekterede algesammensætninger viste klar overensstemmelse med de grupper, der blev defineret af Reynolds et al. (2002), men de påpegede, at klassificeringen kan være en udfordring for nogle grupper, fordi identifikation ud fra pigmenter kan pege hen på flere forskellige grupper. For at imødegå denne udfordring blev de algearter, der afstedkommer en sådan flertydighed, hurtigt talt under mikroskopet, så de nødvendige justeringer kunne foretages. Sarmiento og Descy (2008) fandt, at en kombination af pigmentanalyser og mikroskopiering er velegnet til at definere søers økologiske tilstand. Desuden henledte de opmærksomheden på, at man kan opnå en markant tidsbesparelse med pigmentanalyse i forhold til detaljerede mikroskopiske tællinger. Således tog deres analyse af fytoplanktondata fra 480 prøver med relativt god tidslig og vertikal opløsning alt i alt ét år (to fuldtidsansatte – én forsker og én tekniker med udførelse af alt arbejde lige fra indsamling af prøver i felten til fortolkning af resultater).

Selv om flere undersøgelser har vurderet kombinationen af pigmentanalyser og mikroskopi positivt, påpeger Simmons et al. (2016) i en nylig publiceret undersøgelse, trods anerkendelse af pigmentanalysernes værdi, at HPLC/CHEMTAX ikke er egnet som en "genvej til detaljerede taksonomiske data". De mener, at der er en tendens til at overdrive graden af overensstemmelsen mellem de to metoder. Deres undersøgelse omfattede årstidsbestemte fytoplanktonprøver udtaget på to forskellige steder (parvise prøver nær ved og langt fra bredden, sidstnævnte inddelt i to dybdegrupper) i Lake Michigan. De etablerede pigment/Chl a ratioer ud fra kontrollerede algekulturer (samme lysintensitet og næringsstofniveau) og konverterede biovolumendata til Chl a i henhold til Montagnes et al. (1994), således at de to datasæt

(mikroskopi og HPLC-CHEMTAX) havde samme enheder. Resultaterne viste, at selv om begge metoder påviste den sæsonbestemte variation i sammensætningen af fytoplanktontaxa, var der alligevel betydelige uoverensstemmelser, idet HPLC overvurderede andelen af gulalger, og undertiden også af rekyalger og dinoflagellater, og undervurderede andelen af kiselalger. Forfatterne påpegede, at en af grundene til disse overensstemmelser kunne være, at de etablerede ratioer var beregnet ud fra algekulturer, og tilføjede, at mikroskopi sandsynligvis ikke var den største fejlkilde. I det fytoplanktonsamfundet for det meste bestod af store celler (kiselalger og gulalger), men også arter, der omfatter små celler (blågrønalger og rekyalger), indgik i mikroskoptællingerne, og da der for Lake Michigan findes en god oversigt over de forekommende algearter, blev det antaget, at der ikke var de store problemer med identifikationen af algerne vha. mikroskopi. Alt i alt anbefaler Simmons et al. (2016) for nærværende brugen af mikroskopi.

5 Resume

Der findes forskellige metoder til at identificere/kvantificere fytoplankton-taxa i vandområder, og de har alle deres fordele og ulemper. Ud over mikroskopi og pigmentanalyser, som der er fokus på i dette studie, findes der metoder som fx flowcytometri, som er hurtig til optælling, men dårlig til identifikation, og DNA-analyse er god til identifikation, men langsom og kompleks (Wright & Jeffrey, 2006).

I øjeblikket er den mest anvendte teknik mikroskopi, som også har sine ulemper. Ifølge nogle undersøgelser (fx Reynolds et al., 2002; Padisák et al., 2006) kan man for at reducere omkostningerne og det tidskrævende arbejde ved mikroskopisk analyse anvende en grovere taksonomisk opløsning ved fortolkning af ferske vandes økologiske tilstand. En meget detaljeret artsidentifikation ved brug af lysmikroskopi er muligvis ikke nødvendig ved belysning af fytoplanktonsamfundenes sammensætning (Sarmiento & Descy, 2008). Undersøgelser har vist, at en kombination af pigmentanalyse og mikroskopi kan bruges til pålideligt og relativt hurtigt at bestemme fytoplanktonbiomassen i ferskvands- eller havmiljøer (fx Schlüter et al., 2014) (se Tabel 2). Pigmentanalyse er hurtig, udviser god præcision og tilvejebringer oplysninger om små celler, men den taksonomiske identifikation kan kun udføres til klasseniveau. Mikroskopi er langsom og tidskrævende, men giver mulighed for høj taksonomisk opløselighed (med undtagelse af små celler) (Higgins et al., 2011). Mikroskopiering kan derfor anvendes til at bestemme forekomsten af algetaxa i prøverne, til at etablere de rette pigment/Chl a ratioer og vælge, hvilke fytoplanktongrupper der skal indlæses i CHEMTAX softwaren (Higgins et al., 2011). Undersøgelserne beskrevet i nærværende notat har altså påvist ulemper ved begge metoder. Således er en af de væsentligste ulemper ved pigmentanalyse de komplikationer, der kan opstå ved etablering af pigment/Chl a ratioer og valg af arter til CHEMTAX beregningerne. Der skal derfor udvises stor omhu for at opnå pålidelige resultater.

Tabel 2. Fordele og ulemper ved pigmentanalyse (HPLC-CHEMTAX)

Fordele	Ulemper
Kan registrere alle algegrupper (såsom gualger og grønalger).	Identifikation er ikke på artsniveau.
Høj præcision, især for pigmenter, der er til stede i høje koncentrationer (store toppe).	Lave pigmentkoncentrationer (lave toppe) kan forårsage usikkerhed.
Muliggør analyse af et større vandvolumen, hvilket tillader identifikation af sjældne/små taxa.	Muligvis ringe taksonomisk pålidelighed (flertydige pigmenter, fordelt på forskellige grupper).
Diversitet beskrives godt.	Kompliceret at vælge grupper til CHEMTAX beregningerne (pga. flertydige pigmenter).
Muliggør algebiomasse-beregning i Chl a enheder (hvis der vælges passende pigment/Chl a ratioer).	Mulige komplikationer, da pigment/Chl a ratioer afhænger af faktorer som lys og næringsstatus.
Automatiseret (lavere sandsynlighed for uoverensstemmelser som følge af forskelle i ekspertise eller laboratoriefejl).	
Mindre tidskrævende. Alle algegrupper kan detekteres i ét analysetrin.	
Omkostningseffektiv.	
Velegnet til miljøovervågning i stor skala.	

6 Referencer

Azari, A. M., Mohebbi, F. & Asem, A. (2011). Seasonal changes in phytoplankton community structure in relation to physico-chemical factors in Bukan dam reservoir (northwest Iran). *Turkish Journal of Botany*, 35(1), 77-84.

Bellinger, E. G. & Sigeo, D. C. (2010). *Freshwater Algae: Identification and Use as Bioindicators*, Wiley-Blackwell, New Jersey.

Buchaca, T., Felip, M. & Catalan, J. (2005). A comparison of HPLC pigment analyses and biovolume estimates of phytoplankton groups in an oligotrophic lake. *Journal of Plankton Research*, 27(1), 91-101.

Carvalho, L., Poikane, S., Lyche-Solheim, A., Phillips, G., Borics, G., Catalan, J., et al. (2013). Strength and uncertainty of lake phytoplankton metrics for assessing eutrophication impacts in lakes. *Hydrobiologia*, 704, 127-140.

Descy, J. P., Sarmiento, H. & Higgins, H. W. (2009). Variability of phytoplankton pigment ratios across aquatic environments. *European Journal of Phycology*, 44(3), 319-330.

Descy, J. P., Higgins, H. W., Mackey, D. J., Hurley, J. P. & Frost, T. M. (2000). Pigment ratios and phytoplankton assessment in northern Wisconsin lakes. *Journal of Phycology*, 36(2), 274-286.

Fietz, S. & Nicklisch, A. (2004). An HPLC analysis of the summer phytoplankton assemblage in Lake Baikal. *Freshwater Biology*, 49(3), 332-345.

Findlay D. L. & Kling H. J. (2003). *Protocols for measuring biodiversity: phytoplankton in freshwater*. Department of Fisheries and Oceans, Freshwater Institute, University Crescent, Winnipeg, Manitoba.

Garibotti, I. A., Vernet, M., Kozlowski, W. A. & Ferrario, M. E. (2003). Composition and biomass of phytoplankton assemblages in coastal Antarctic waters: a comparison of chemotaxonomic and microscopic analyses. *Marine Ecology Progress Series*, 247, 27-42.

Havskum, H., Schlüter, L., Scharek, R., Berdalet, E. & Jacquet, S. (2004). Routine quantification of phytoplankton groups – microscopy or pigment analyses? *Marine Ecology Progress Series*, 273, 31-42.

Higgins, H. W., Wright, S. W. & Schluter, L. (2011). Quantitative interpretation of chemotaxonomic pigment data. *Phytoplankton pigments: Characterization and applications in oceanography*. Cambridge University Press.

Hillebrand, H., Dürselen, C. D., Kirschtel, D., Pollingher, U. & Zohary, T. (1999). Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology*, 35, 403-424.

Hooker, S. B., Van Heukelem, L., Thomas, C. S., Claustre, H., Ras, J., Barlow, R., ... & Stuart, V. (2005). The second SeaWiFS HPLC analysis round-robin experiment (SeaHARRE-2). *NASA Tech. Memo*, 212785, 124.

- Jeffrey, S. W., Mantoura, R. F. C. & Wright, S. W. (1997). In: *Phytoplankton Pigments in Oceanography*, UNESCO, Paris, France, 661 pp.
- Jeffrey, S. W. (1974). Profiles of photosynthetic pigments in the ocean using thin-layer chromatography. *Marine Biology*, 26(2), 101-110.
- Kozłowski, W. A., Deutschman, D., Garibotti, I., Trees, C. & Vernet, M. (2011). An evaluation of the application of CHEMTAX to Antarctic coastal pigment data. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 58(4), 350-364.
- Lassen, M. K., Nielsen, K. D., Richardson, K., Garde, K. & Schlüter, L. (2010). The effects of temperature increases on a temperate phytoplankton community – a mesocosm climate change scenario. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 383(1), 79-88.
- Lauridsen, T. L., Schlüter, L. & Johansson, L. S. (2011). Determining algal assemblages in oligotrophic lakes and streams: comparing information from newly developed pigment/chlorophyll a ratios with direct microscopy. *Freshwater Biology*, 56(8), 1638-1651.
- Mackey, M. D., Mackey, D. J., Higgins, H. W. & Wright, S. W. (1996). CHEMTAX—a program for estimating class abundances from chemical markers: application to HPLC measurements of phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series*, 144, 265-283.
- McGowan, S. (2013). Pigment Studies. In: Elias, S. A., Mock, C. J. (Eds.), *Encyclopedia of Quaternary Science*, pp. 2029-2039, Elsevier-Amsterdam.
- Montagnes, D. J. S., Berges, J. A., Harrison, P. J. & Taylor, F. J. R. (1994). Estimating carbon, nitrogen, protein, and chlorophyll a from volume in marine phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, 39, 1044-1060.
- Padisák, J., Borics, G., Grigorszky, I. & Soroczki-Pinter, E. (2006). Use of phytoplankton assemblages for monitoring ecological status of lakes within the Water Framework Directive: the assemblage index. *Hydrobiologia*, 553(1), 1-14.
- Poikane, S., Birk, S., Böhmer, J., Carvalho, L., de Hoyos, C., Gassner, H., et al. (2015). A hitchhiker's guide to European lake ecological assessment and inter-calibration. *Ecological Indicators*, 52, 533-544.
- Reynolds, C. S., Huszar, V., Kruk, C., Naselli-Flores, L. & Melo, S. (2002). Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. *Journal of Plankton Research*, 24(5), 417-428.
- Reynolds, C. S. (2006). *Ecology of Phytoplankton*, First Edition. Cambridge University Press, Cambridge, 552pp.
- Sarmiento, H. & Descy, J. P. (2008). Use of marker pigments and functional groups for assessing the status of phytoplankton assemblages in lakes. *Journal of Applied Phycology*, 20(6), 1001-1011.
- Schlüter, L., Møhlenberg, F., Havskum, H. & Larsen, S. (2000). The use of phytoplankton pigments for identifying and quantifying phytoplankton groups in coastal areas: testing the influence of light and nutrients on pigment/chlorophyll a ratios. *Marine Ecology Progress Series*, 192, 49-63.

Schlüter, L., Lauridsen, T. L., Krogh, G. & Jørgensen, T. (2006). Identification and quantification of phytoplankton groups in lakes using new pigment ratios—a comparison between pigment analysis by HPLC and microscopy. *Freshwater Biology*, 51(8), 1474-1485.

Schlüter, L., Møhlenberg, F. & Kaas, H. (2014). Temporal and spatial variability of phytoplankton monitored by a combination of monitoring buoys, pigment analysis and fast screening microscopy in the Fehmarn Belt Estuary. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186(8), 5167-5184.

Schlüter, L., Behl, S., Striebel, M. & Stibor, H. (2016). Comparing microscopic counts and pigment analyses in 46 phytoplankton communities from lakes of different trophic state. *Freshwater Biology*, 61(10), 1627-1639.

Schmid, H., Bauer, F. & Stich, H. B. (1998). Determination of algal biomass with HPLC pigment analysis from lakes of different trophic state in comparison to microscopically measured biomass. *Journal of Plankton Research*, 20(9), 1651-1661.

Simmons, L. J., Sandgren, C. D. & Berges, J. A. (2016). Problems and pitfalls in using HPLC pigment analysis to distinguish Lake Michigan phytoplankton taxa. *Journal of Great Lakes Research*, 42(2), 397-404.

Søndergaard, M., Lauridsen, T.L., Kristensen, E.A, Baattrup-Pedersen, A., Wi-berg-Larsen, P., Bjerring, R. & Friberg, N. (2013). Biologiske indikatorer til vurdering af økologisk kvalitet i danske søer og vandløb. Aarhus Universitet, DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi, 76 s. - Videnskabelig rapport fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi nr. 59. (In Danish).

Tamm, M., Freiberg, R., Tönno, I., Nöges, P. & Nöges, T. (2015). Pigment-based chemotaxonomy - a quick alternative to determine algal assemblages in large shallow eutrophic lake? *PLoS ONE*, 10(3), e0122526.

Wasiłowska, A., Kopczyńska, E. E. & Rzepecki, M. (2015). Temporal and spatial variation of phytoplankton in Admiralty Bay, South Shetlands: the dynamics of summer blooms shown by pigment and light microscopy analysis. *Polar Biology*, 38(8), 1249-1265.

Wright, S. W. & Jeffrey, S. W. (2006). Pigment markers for phytoplankton production. In *Marine organic matter: biomarkers, isotopes and DNA*, pp. 71-104. Springer Berlin Heidelberg.

Wright, S. W., Thomas, D. P., Marchant, H. J., Higgins, H. W., Mackey, M. D. & Mackey, D. J. (1996). Analysis of phytoplankton of the Australian sector of the Southern Ocean: Comparisons of microscopy and size frequency data with interpretations of pigment HPLC data using the 'CHEMTAX' matrix factorisation program. *Marine Ecology Progress Series*, 144, 285-298.