



# Analys av kiselalgsmetoden

- Hur lång bör sedimenteringstiden vara

Sara Berthold 2015

MVEK03 - Examensarbete för kandidatexamen 15 hp

Miljövetenskap | Lunds Universitet

Bild av W. Watson & Sons, London

# Förord

Examensarbete, 15hp, för kandidatprogrammet Miljövetenskap, 180hp, på den Naturvetenskapliga Fakulteten, Lunds Universitet.

Arbetet är utfört på uppdrag av Maria Kahlert, forskare på Institutionen för vatten och miljö, Sveriges Lantbruksuniversitet, Uppsala.

Detta arbete är tilldelat Maria Kahlert och jag vill tacka dig för allt stöd och hjälp under arbetets gång och jag hoppas mina resultat gagnar dig.

Jag vill även tacka Ivana Rasic som vän och geografisk ledsagare på institutet samt att du tog dig tid med mina prover efter jag lämnat SLU.

Tack till Karin Rengefors, min handledare på Biologiska institutionen, och Yvonne Persson, studievägledare och studierektor för miljövetenskaplig utbildning på Lunds Universitet.

Utan er hade detta arbete inte varit möjligt.

## Abstract

Diatoms, water living, microscopic organisms with silicon shells, are used as bioindicators of water quality because they are diverse and influenced by their surroundings. The process is called The Diatom Method and is accomplished through a standard, a standard I have chosen to analyze.

The samples are taken from stones in water streams and then a preparation is made to fix the algae on slides that can be studied in a microscope by counting, measuring and identifying the species. A section in this method is a process where the collected samples, consisting of a mixture between water and sediment, are allowed to settle so that the prospective water can be decanted. Since, normally, it is the concentrated sediment that is investigated, the time of sedimentation is crucial. If the sample does not settle long enough, too many algae will follow the decanted water, thus leading to a loss of diatoms in the investigated samples. The consequence of this is that the water status can be misjudged since the status of the water is based on the species identified. I chose to do my tests on the decanted water and tested three different times for sedimentation; 30, 60 and 90 minutes since I found it interesting to see which algae that would have been decanted. I divided the results into four categories; all algae in all sizes and only small ( $<20\mu\text{m}$ ), medium ( $20\text{-}40\mu\text{m}$ ) and large ( $> 40\mu\text{m}$ ) algae. I also noted medium length and the most regularly occurring species. The questions were: 1) How long should the sample settle? And 2) Do the large algae settle faster than the small ones?

In some cases there proved to be a significant difference between samples depending on sedimentation time. From the p-values I derived that for all algae in all sizes and small algae the settling ceased after 60 minutes. For the medium sized algae the settling ceased after 90 minutes. There were no significant results regarding large algae, neither for the average sizes and sedimentation time in the fourth counting in which the algae where measured by medium length. One of the water streams consisted mainly of large algae and the sedimentation rate was higher there than for the algae in the other streams. Three common algae in the samples were *Mayamaea atomus* was. *permitis*, *Eolimna minima* and *Fistulifera saprophila*. I also came up with some methods for future analysing that could improve the validity of the results.

The work was done in Uppsala in Sweden's University of Agricultural Sciences at the Department of Water and Environment, and the University of Lund November 3, 2014 - May 20, 2015.

# Sammanfattning

Kiselalger, vattenlevande, mikroskopiska organismer med kiselskal, används som bioindikatorer för vattenkvalitet eftersom de är artrika och påverkas av sin omgivning. Processen kallas Kiselalgsmetoden och utförs genom en standard, en standard jag valde att analysera.

Proven tas från stenar i vattendrag och sedan görs ett preparat som är fixerat på objektglas som kan undersökas i mikroskop genom att räkna, mäta och bestämma arterna på dem. Ett moment i metoden går ut på att de insamlade proverna som består av en blandning av vatten och sediment skall stå och sedimentera så att överblivande vatten kan hållas av. Eftersom, normalt sett, det är det koncentrerade kiselalgsprovet som undersöks, är tiden för sedimentering avgörande. Får inte proverna sätta sig tillräckligt länge kan mindre alger i det vatten som sedan hålls av att gå förlorade. Konsekvensen av detta är att vattnets status kan felbedömas eftersom statusen grundas på vilka arter som kan identifieras i proverna. Jag valde att göra mina tester på det dekanterade vattnet och testade tre olika sedimenteringstider: 30-, 60- och 90 minuter. Eftersom jag ansåg det intressant att se vilka alger som i så fall hade hållts av. Jag delade upp resultaten i fyra olika kategorier: Alla alger i alla storlekar, bara små (<20 $\mu$ m), mellanstora (20-40 $\mu$ m) och stora (>40 $\mu$ m) alger. Jag noterade även medellängderna i en ytterligare räkning och några vanligt förekommande arter. Frågeställningarna var 1) Hur länge bör provet sedimentera? och 2) Sjunker de stora algerna fortare än de små?

I några av fallen visade det sig vara en signifikant skillnad mellan proven beroende av sedimenteringstid. Från p-värdena fann jag att för alla alger av alla storlekar och för de små upphörde avtagandet av alger efter 60 minuter. För de medelstora avtog sedimenteringen efter 90 minuter. Det fanns inga signifikanta resultat för de stora algerna, inte heller för medellängderna i den fjärde räkningen. En av vattendragen innehöll bara större alger och sedimentationshastigheten var där högre än i de andra. Tre vanligt förekommande alger i de räknade proverna var *Mayamaea atomus* var. *permitis*, *Eolimna minima* och *Fistulifera saprophila*. Jag kom på några metoder till framtida studier som kanske kan förbättra validiteten hos resultaten.

Arbetet utfördes i Uppsala på Sveriges Lantbruksuniversitet på Institutionen för vatten och miljö samt på Lunds Universitet 3 november 2014 - 20 maj 2015.

# Innehåll

1	Inledning .....	6
1.1	Bakgrund .....	6
1.2	Syfte .....	7
1.3	Frågeställning och hypotes .....	8
1.4	Avgränsningar .....	8
2	Metod .....	9
2.1	I fält .....	9
2.2	I laboratoriet .....	9
2.3	Analysering .....	10
3	Resultat .....	11
3.1	Algräkning .....	11
3.2	Algmätning .....	14
3.3	Algidentifiering .....	14
4	Diskussion .....	15
4.1	Algräkning .....	15
4.2	Algmätning .....	16
4.3	Algarter .....	16
4.4	Felkällor och alternativ .....	16
5	Slutsats .....	17
6	Referenser .....	18
6.1	Svensk standard .....	18
6.2	Bilder .....	18
7	Bilagor .....	19
7.1	Bilaga 1: Material .....	19
7.2	Bilaga 2: Kiselalgsräkning .....	20
7.3	Bilaga 3: Kiselalgsmätning .....	22

# 1 Inledning

## 1.1 Bakgrund

### Kiselalger - Bacillariophyta

Kiselalger är mikroskopiska organismer och finns i nästan all miljö med väta, oavsett till exempel pH, salthalt eller temperatur (Seckbach & Kociolek 2011). Kiselalger är encelliga fotosyntetiserande eukaryoter som spelar en avgörande roll som koldioxidfixerare och primärproducenter (Field & Behrenfeld 1998). Kiselalger har ett kiselskelett bestående av kiseldioxid och namnet "Diatom" kommer från grekiskans (dia) "genom" och (temnein) "att skära" eftersom de består av två parallella skal vilka har olika typer av filament som kan vara ovala, fyrkantiga, triangulära och runda etc. (Seckbach & Kociolek. 2011). Kiselalger kan vara ensamma eller koloniala och kan förekomma i väl bevarad, koncentrerad mängd (Seckbach & Kociolek. 2011). Eftersom deras kiselskal är så beständiga finns historisk data att hämta från avlagringar redan från tidigt jura (Seckbach & Kociolek. 2011).

Den egenskap som gör kiselalger till perfekta bioindikatorer är att det finns så stor diversitet av arter och dessa är väldokumenterade (Kahlert 2014). Eftersom generationstiden är så kort svarar kiselalgspopulationen snabbt på miljöombyten och eftersom alla arter har egna nisher och en gräns för hur toleranta de är mot olika faktorer leder detta till att de är mycket representativa för ett vattens aktuella status (Kahlert 2014). Genom att då vara specialiserade för olika miljöförutsättningar så som trofinivå, pH, ljustillgång eller näringsbelastningar av olika slag, spelar vattnets egenskaper in på vilka arter som dominerar. Genom artidentifiering får forskare och provtagare därmed en bra bild av vattnets karaktär (Smol & Stoermer. 2010). Biomassa, diversitet, taxonomisk komposition, gruppindelning eller olika arters autekologi är alla exempel på parametrar som kan analyseras och tolkas (Smol & Stoermer 2010. s.61). Viktigt för detta arbete är att nämna hur småalger så som *Navicula* är speciellt toleranta mot organiska föroreningar och skulle sannolikt upptäckas vid analys av vatten av sådan karaktär (Kelly 1998). Små alger är av vikt i just detta arbete eftersom det är främst dessa som provtagaren kan gå miste om ifall sedimenteringstiden inte är lång nog, om dessa sjunker långsammare än större alger vilket betyder att resultatet av provtagningen kan vara missvisande.

Patrick och Strawbridge menade redan 1963 att nyttan med ökad kunskap om kiselalgers olika arter var att det fanns många andra faktorer än bara förorening som kan ha antingen negativ eller positiv inverkan på dem och att detta betydde att användandet av kiselalger som bioindikatorer kunde komma att utökas.

## Kiselalgsmetoden

Kiselalgers historia att praktiskt användas som bioindikatorer är nästan 200 år gammal (Smol & Stoermer 2010). Kiselalgers olika egenskaper har lett till att dess ekologi är väl undersökt och detta har vidare lett till etablerade, nationella så väl som internationella standardmetoder, så som kiselalgsmetoden (Naturvårdsverket 2009). Dagens standardmetod, SS-EN 14407:2014, har titeln

"Vattenundersökningar - Vägledning för identifiering och kvantifiering av bentiska kiselalger i prover från sjöar och vattendrag". Metoden går ut på att samla in alger från vattendrag, ta med dem till ett laboratorium där ett preparat tillverkas så att algerna kan artbestäms och kvantifieras.

"Preparatet" är ett Naphraxinbäddat kiselalgsprov utan något organiskt innehåll som därmed är beständigt och fixerat mellan objekt- och täckglas och där algerna är lätta att identifiera. Fördelen med denna metod är att kiselalger är så lätta att få tag på och undersökningsprocessen är både billig och relativt enkel att genomföra (Naturvårdsverket 2009). Det viktigaste med metoden är artidentifieringen och kunskapen om arterna ökar ständigt (Naturvårdsverket 2009).

### 1.2 Syfte

Om provet inte får sedimentera tillräckligt länge kan som ovan nämnt detta innebära att vissa av de alger som sjunker saktare fortfarande sväva i det vatten som dekanteras. Det är svårt att veta vilken tid som gäller för sedimenteringen eftersom det står olika beroende på vilken manual som används. Manualen som jag använde i detta arbete var hämtad ur den svenska standarden "Vattenundersökningar - Vägledning för identifiering och utvärdering av prover av bentiska kiselalger från vattendrag" (SS-EN 14407:2005) och där stod "[...]Let the sample sediment for a couple of days[...]". Men om Naturvårdsverkets "Påväxt i rinnande vatten- kiselalgsanalys" används blir det mer tvetydigt: "[...](hellst ett par timmar)[...]", men även "[...]tills algerna hunnit sätta sig[...]". vilket kan tolkas väldigt fritt (Naturvårdsverket 2009). Efter samtal med handledare på SLU fick jag reda på att vissa provtagare tenderar att tolka detta som att de räcker med 30 minuter beslöt jag mig för att undersöka saken närmare (Kahlert 2014). Syftet var därmed att undersöka och jämföra tre olika sedimenteringstider (30-, 60- och 90 minuter) och både mäta och räkna algerna i de prover jag gör samt se några vanligt förekommande alger. På så sätt kunde jag undersöka hastigheten på sedimenteringen och hur länge provet borde behöva sedimentera samt vad det är för typ av vatten jag undersökte. Både det totala antalet alger var intressant samt hur hastigheten på de små, mellan eller stora algerna förhöll sig. Det vatten jag undersökte var det som hällades av (dekanterades) eftersom jag ville se vilka alger som skulle gått förlorade om en undersökning istället gjorts på det koncentrerade sedimentet som är standard.

### 1.3 Frågeställning och hypotes

1. Hur länge bör provet sedimentera vid utförande av kiselalgsmetoden?  
Med andra ord: När upphör avtagandet av antalet alger i det vatten som avlägsnats provet?
2. Sjunker de stora algerna fortare än de små?  
Med andra ord: Kommer medellängden på kiselalgerna minska med ökad sedimenteringstid i det vatten som avlägsnats provet

Hypoteserna är enligt följande:

$H_{0,1}$  = Det finns ingen skillnad på antalet kiselalger ju längre provet får sedimentera.

$H_{1,1}$  = Det finns en skillnad på antalet kiselalger ju längre provet får sedimentera.

$H_{0,2}$  = Det finns ingen skillnad på hur fort kiselalger sjunker i förhållande till dess längd.

$H_{1,2}$  = Det finns en skillnad på hur fort kiselalger sjunker i förhållande till dess längd.

### 1.4 Avgränsningar

Brist på tid och specialistkunskap innebar att jag undvek systematisk artidentifiering. Jag valde istället kvantitativ dokumentering i form av storlek och antal. Vid god tillgång observerade jag ett fåtal alger.



## 2 Metod

Material till metoderna finns i Bilaga 1.

### 2.1 I fält

Proverna som samlades in under detta moment blev jag tilldelad och de samlades in 20 Oktober 2014 och låg i ett mörkt kylrum för att bevaras innan jag fick dem.

De togs i vattendrag med kod: M36, M42, E21, N34 och O18 vilka alla låg kring Uppsala i ett av de 21 områden i Sverige där undersökningsprogrammet *Typområden på jordbruksmark* utförs och ingår i den svenska miljöövervakningen (Sveriges Lantbruksuniversitet 2012). Eftersom dessa vatten ligger nära jordbruksmark vill inte bönderna att vattendragen skall namnges i detta arbete då resultaten kan leda till negativa konsekvenser för dem personligen. Om det vatten som ligger nära motsvarande bondes åkermark har dåliga värden kan bonden komma att skyllas för detta.

#### Allmän beskrivning för fältarbetet

Provtagning på kiselalger görs i första hand på sten. I ett vattendrag plockas minst fem, otäckta stenar, 10-20cm i diameter, på ett sådant djup att stenarna varit under vatten i minst en månad. Stenarna sköljs av åvatten för att få bort löst sediment och läggs sedan i en vanna.

Vannan tas in till strandkanten och stenarna borstas av med en tandborste, en och en på den solbelysta sidan, i en annan vanna medan 200-500 ml åvatten hålls över för att skölja ned så mycket av algerna som möjligt. Borstningen och sköljningen skall återupprepas minst 3 gånger. Vattnet med alger förs över till en 250 ml behållare och märkes, för att sedan läggas kylt.

### 2.2 I laboratoriet

Sedimentproverna jag blev tilldelad stod i ett kylrum i bägare och innehöll ca 180 ml prov. Jag tog 30 bägare och namngav dem med vattendrag och sedimenteringstid och sedan skakade jag om proverna kraftigt så att jag kunde hälla över lika mängder sediment i de tre respektive bägarna a' 60 ml.

När proven sedimenterat hällde jag av 40 ml till ett 50ml centrifugrör. Bottensedimentet fick alltså inte följa med utan blandades med 40 ml 96 % EtOH för att konserveras, ev. för fortsatta undersökningar.

Jag placerade mina prover i en centrifug på 3500 varv/min och satte den på 15 minuter. Några fick centrifugera lite längre eftersom allt material inte samlats på botten. Efter detta pipetterade jag bort 35ml från rören med pasteurpipett (samma pipett fick inte användas till olika prov) så att bara 5 ml kvarstod, d.v.s. den koncentrerade mängden kiselalger, och tillsatte några droppar 10 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Efter att den kraftigaste reaktionen avstannat (ca 10 minuter) fyllde jag på med ytterligare väteperoxid upp till 10 ml - sträcket.

Jag ställde proverna i värmeskåp (80 C°) över natten och dagen därpå tvättade jag dem. Detta gjorde jag genom att tre gånger om fylla rören med destillerat vatten, centrifugera, åter igen 15 minuter, och sedan dekantera med pasteurpipett.

Jag pipetterade ut två droppar prov med en pasteurpipett på täckglas (samma pipett fick inte användas till olika prov) och sedan lät jag dem torka in.

För att förbereda preparatet tog jag 15 objektglas och namngav dem, d.v.s med vattendrag och tid, sedan pipetterade jag ca 2 droppar Naphrax på, jag arbetade med tre prover åt gången. Tillhörande täckglas vändes upp- och ned på det Naphraxföredda objektglaset och värmdes på värmeplatta. När det började koka lade jag dem på en kall yta så att bubblorna försvann. Detta upprepades tre- fyra gånger tills alla bubblor försvunnit. Jag lade dem att svalna upp- och ned och såg till så att täckglasen inte låg mot en yta.

### 2.3 Analysering

Räkning av alger fick jag hjälp med av Ivana Rasic vid SLU.

Under analyseringsprocessen använde jag ett mikroskop med 1000 X förstoring som var kopplad till en dator samt immersionsolja så att förstoringsglaset inte skulle fastna mot täckglaset.

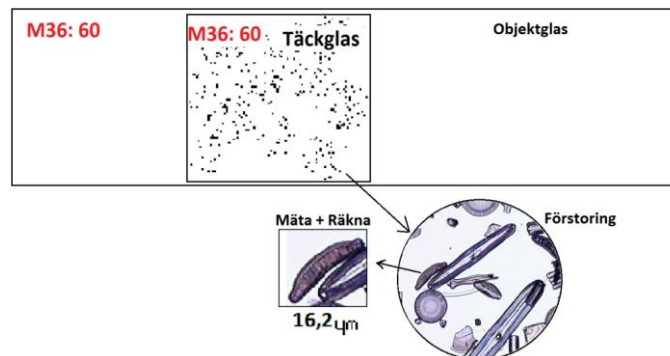
Analyseringen utfördes genom att titta på 20 fält per täckglas i ett bestämt mönster där alla hela alger räknades och delades in i små (<20µm), mellan (20-40µm) och stora (>40µm) celler. Detta gjordes tre gånger per täckglas. Figur 1 illustrerar en enkel modell hur analyseringen utfördes. Ett fåtal vanligt förekommande alger noterades även. En fjärde räkning där alla alger i de 20 fälten mättes även utan att delas in i grupper.

Jag använde Mikroskoff Office Excel 2007 för de uträkningar som krävdes och utförde tvåsidiga t-test för att bestämma p-värden. Utifrån dessa, tillsammans med antalet prov, frihetsgrader och väntevärdet räknades även standardavvikelse och standardfel och t-värde ut.

P-värden används i arbetet eftersom det är en stickprovstagning, d.v.s. hela populationen mäts inte. Om p-värdet är under 0,05 förkastas nollhypotesen.

I resultatet presenteras supernatanten och medelvärdet för varje tid. Supernatanten för varje tid är totala antalet alger (eller små, mellan resp. stora) på alla täckglasen tillsammans för respektive tid.

Medelvärdet blir då  $\text{supernatanten}/15 = x \text{ alger/prov}$  (15 eftersom det var 15 prov och 5 av dessa hade alla sedimenterat i samma tid och dessa räknades 3 gånger om).



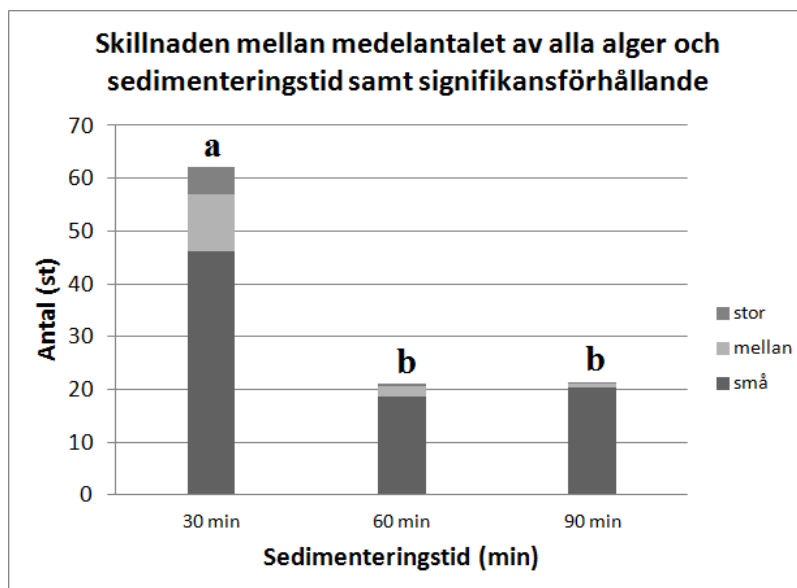
Figur 1: Visuell illustration av hur framställning av resultaten utförs.

## 3 Resultat

I bilaga 2 visas fyra tabeller som anger supernatanten för totala antalet alger, små alger, mellanstore alger samt stora alger tillsammans med sedimenteringstid, väntevärde, ev förkastning av nollhypotes, standardavvikelse, standardfel, p-värde och t-värde. Bilaga 3 behandlar mätningarna med medellängd för varje vattendrag samt innehåller även samma information som de fyra ovan nämnda tabellerna.

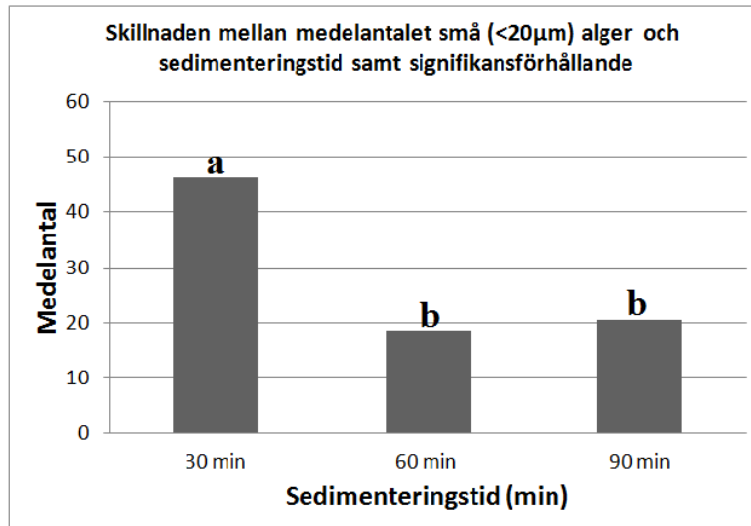
### 3.1 Algräkning

När totala antalet alger räknades behövdes minst 60 minuters sedimentering (figur 2). Supernatanten räknades till 930 efter 30 minuter med 62 alger/prov, 315 efter 60 minuter med 15,5 alger/prov och 319 efter 90 minuter med 14,6 alger/prov. T-test mellan 30- och 60 minuter gav  $p = 0,0007$ , mellan 30- och 90 minuter var  $p = 0,0016$  och mellan 60- och 90 minuter var  $p = 0,9623$ . Figur 2 visar medelvärdena och förhållandet mellan sedimenteringstid och antalet alger i form av signifikansförhållande.



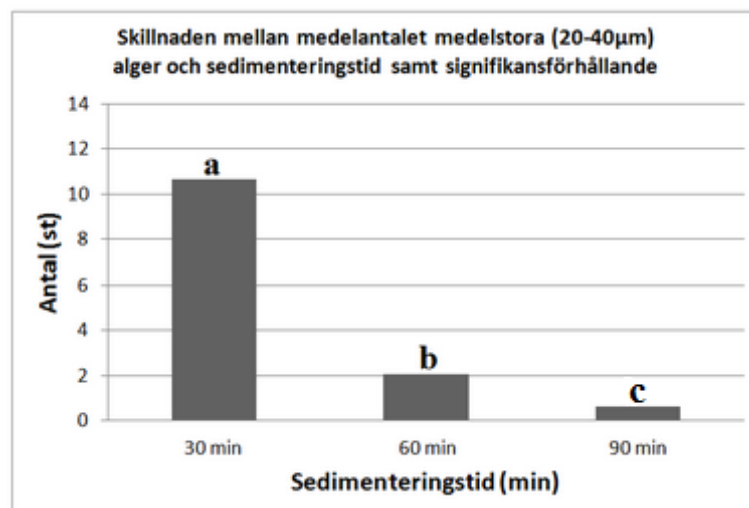
**Figur 2** visar ett histogram på medelantalet alger i alla vattendrag tillsammans och p-värdet (via 2-sidigt t-test) mellan antalet alger och sedimenteringstider. Kolumner med samma bokstav (a,b) är inte signifikant skilda.

Resultatet av de små algerna visade att det behövdes minst 60 minuters sedimentering (figur 3). Supernatanten räknades till 694 efter 30 minuter med 46,3 alger/prov, 279 efter 60 minuter med 18,6 alger/prov och 306 efter 90 minuter med 14,7 alger/prov. T-test mellan 30- och 60 minuter gav  $p = 0,0002$ , mellan 30- och 90 minuter var  $p = 0,0023$  och mellan 60-90 minuter var  $p = 0,4705$ . Figur 3 visar medelvärdena och förhållandet mellan sedimenteringstid och antalet alger i form av signifikansförhållande.



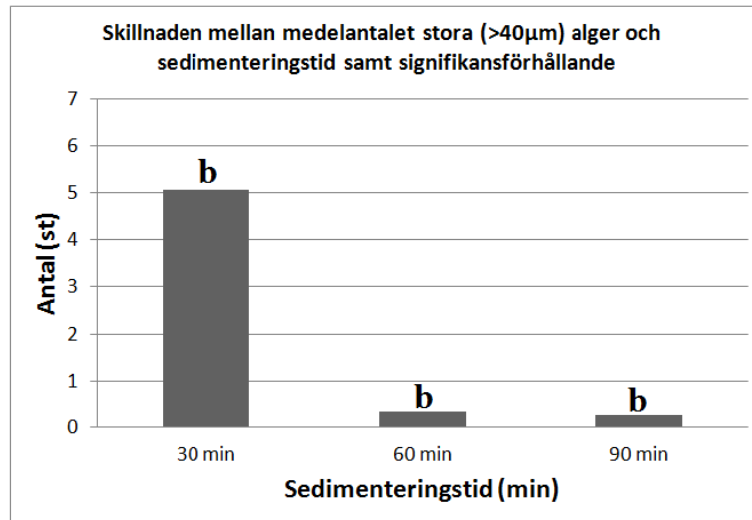
**Figur 3** visar ett histogram på medelantalet små (<20µm) alger i alla vattendrag tillsammans och p-värdet (via 2-sidigt t-test) mellan antalet alger och sedimenteringstider. Kolumner med samma bokstav (a,b) är inte signifikant skilda.

Resultatet av de mellanstora algerna visade att det behövdes minst 90 minuters sedimentering (figur 4). Supernatanten räknades till 160 stycken efter 30 minuter med 10,7 alger/prov, 31 stycken efter 60 minuter med 2,4 alger/prov och 9 stycken efter 0,6 minuter med 14,7 alger/prov. T-test mellan 30- och 60 minuter gav  $p=0,0487$  och 30- och 90 minuter var  $p=0,0243$  och mellan 60- och 90 minuter var  $p=0,0358$ . Figur 4 visar medelvärdena och förhållandet mellan sedimenteringstid och antalet alger i form av signifikansförhållande.



**Figur 4** visar ett histogram på medelantalet mellanstora (20-40 µm) alger i alla vattendrag tillsammans och p-värdet (via 2-sidigt t-test) mellan antalet alger och sedimenteringstider. Kolumner med samma bokstav (a,b) är inte signifikant skilda.

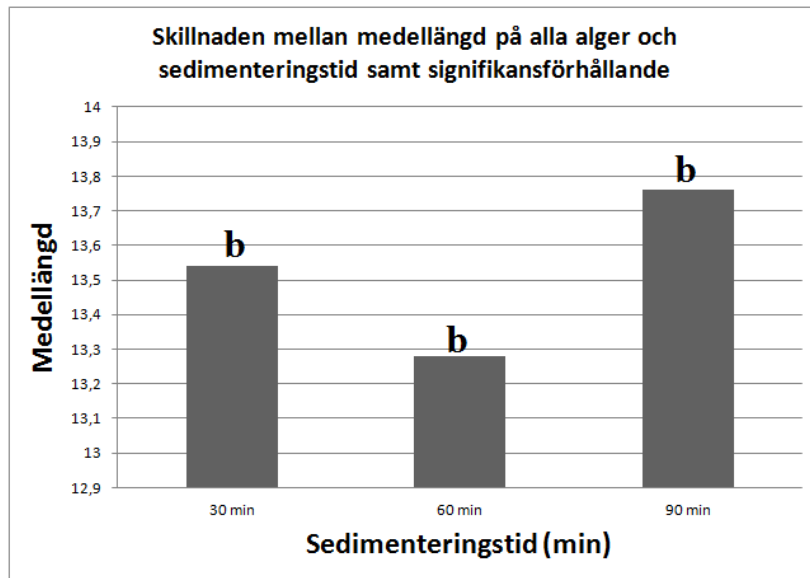
Resultatet av de stora algerna visade att det inte fanns någon signifikant skillnad mellan sedimenteringstid och antalet alger (figur 5). Supernatanten räknades till 76 stycken efter 30 minuter med 5,1 alger/prov, 5 stycken efter 60 minuter med 0,3 alger/prov och 4 stycken efter 90 minuter med 0,3 alger/prov. T-test mellan 30- och 60 minuter gav  $p=0,1732$ , mellan 30- och 90 minuter var  $p=0,1540$  och mellan 60-90 minuter var  $p=0,7744$ . Figur 5 visar medelvärdena och förhållandet mellan sedimenteringstid och antalet alger i form av signifikansförhållande.



**Figur 5** visar ett histogram på medelantalet stora (>40 µm) alger i alla vattendrag tillsammans och p-värdet (via 2-sidigt t-test) mellan antalet alger och sedimenteringstider. Kolumner med samma bokstav (a,b) är inte signifikant skilda.

### 3.2 Algmätning

Resultatet av algmätningen gav ingen signifikant skillnad mellan storlek och sedimenteringstid. Medelvärdet för storleken var efter 30 minuter 13,5  $\mu\text{m}/\text{alg}$ , efter 60 minuter 13,3  $\mu\text{m}/\text{alg}$  och efter 90 minuter 13,8  $\mu\text{m}/\text{alg}$ . T-test mellan 30- och 60 minuter visade  $p = 0,787$ , mellan 30- och 90 minuter var  $p = 0,881$  och mellan 60 - 90 minuter var  $p = 0,735$ . Figur 6 visar medellängderna och förhållandet mellan sedimenteringstid och längderna på alger i form av p-värden.



**Figur 6** visar ett histogram på medellängderna på algerna efter 30-, 60- och 90 minuters sedimentering samt förhållandet mellan medellängder och sedimenteringstid i form av p-värde (via ett 2-sidigt t-test). Kolumner med samma bokstav (a,b) är inte signifikant skilda.

### 3.3 Algidentifiering

Vid algidentifieringen hittades tre i antalet dominantarter: *Mayamaea atomus var. permitis* (Hustedt), *Eolimna minima* (Grunow) och *Fistulfera saprophila* (Lange-Bert. et Bonik).

## 4 Diskussion

Fokus på detta arbete var att undersöka om kiselalgsmetoden kan förbättras genom att justera den så kallade sedimenteringstiden för algprover. Mina huvudsakliga resultat var att en stor andel alger inte hinner sedimentera under de gängse 30 minuterna. Genom att förlänga sedimenteringstiden åtminstone till 90 minuter, förbättras beräkningen av totala antalet algceller signifikant. Detta betyder dock inte att jag härmed har kommit fram till ett bestämt minimum för sedimenteringstiden. Jag anser att detta borde undersökas vidare med en- och tvådagars sedimentering så att standardmetoden beprövas till fullo.

Jag har i detta arbete jämfört mina resultat från en tidigare undersökning, skrivet av Alexandra Vasquez Guerra på Sveriges Lantbruksuniversitet, där sedimentet undersöktes, vilket är standard, men inget preparat gjordes utan färska prover användes där "Lugols lösning" tillsattes för att algerna inte skulle föröka sig efter hennes 60- och 180 minuter. Då hon inte använde sig av samma metod som i det experiment jag utförde, förväntade jag mig kunna finna färre alger än henne (Vasquez Guerra 2010). Jag valde 90 minuter som min längsta tid, istället för 180 minuter. Dels efter vägledning från handledare men även för att en gradvis ökning på 30 minuter var logiskt.

### 4.1 Algräkning

Medelvärdena verkar minska mellan 30- och 60 minuter eller mellan 30- och 90 minuter för alla tester. Signifikansen för att det skall vara skillnad mellan tiderna följer ungefär samma mönster. För alla storlekar (tabell 1-3, figur 2-4) och för de minsta algerna kan nollhypotesen förkastas vad gäller skillnaden mellan medelantalet alger och sedimenteringstid mellan 30- och 60 minuter. För de medelstora algerna gällde att efter 90 minuter verkade minskningen av alger upphöra vilket betyder att det kan förlöpa en minskning även efter längre tider. För de stora algerna hittade jag ingen signifikant skillnad mellan sedimenteringstiderna och förmodligen var detta för att de efter ett tag blev så få i antal (tabell 4, figur 5).

Eftersom det för det totala antalet alger visade signifikans mellan 30- och 60 minuter men mellan 60- och 90 minuter för mellanstora alger innebär det att när alla storlekar läggs samman döljs skillnaden mellan de olika (små, mellanstora, stora) algerna (figur 2).

Med tanke på dessa skillnader och det faktum att de små algerna fortfarande är närvarande i ett ganska stort antal efter 90 minuter (14,7 alger/prov) borde experiment med en- eller två dagars sedimentering utföras. Anledningen är att det finns en möjlighet att sedimenteringen kan komma att förlöpa men att det krävs en mycket längre sedimenteringstid än den som tillåts. Först efter att detta gjort anser jag att det går att bestämma den minimala sedimenteringstiden vid utförande av kiselalgsmetoden.

## 4.2 Algmätning

Vad gäller algmätningen har jag fått ytterligare intressanta resultat. Det fanns inget signifikant bevis på att sedimenteringstiden berodde av storleken på algerna, men tittar vi direkt på de specifika vattendragen så som E21 ser vi att detta vatten innehåller större alger än de övriga fyra (Se tabell 3 i bilaga 3 efter E21\_antal resp. E21\_medellängd). Algerna i detta prov sjönk mycket fort. Från 130 alger till 6 och slutligen 1. Detta kan tyda på att större alger sjunker fortare än små. Men eftersom så få prover har tagits fanns ingen möjlighet att göra en bra statistisk analys. Jag kunde bara konstatera att eftersom större alger verkade sjunka fort i ett prov med bara stora alger finns det anledning att överväga att mindre alger sjunker saktare, vilket var det antagande jag även gjorde innan undersökningen var genomförd. Men bevis saknas.

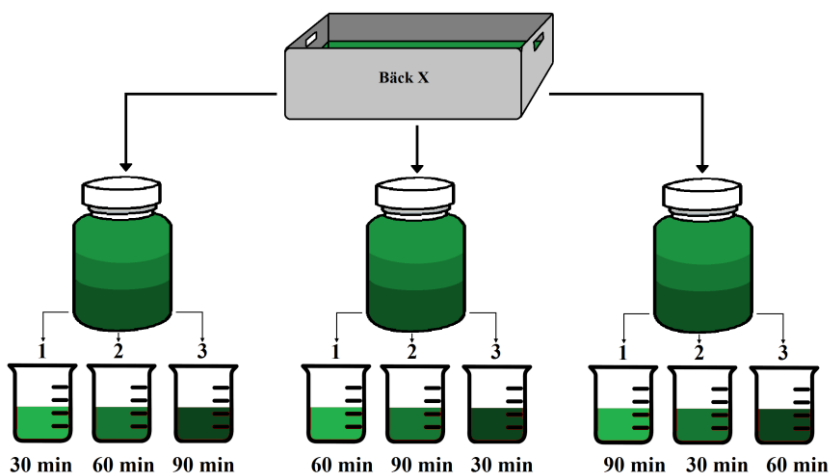
## 4.3 Algarter

De vanligt förekommande *Mayamaea atomus var. permitis*, *Eolimna minima* och *Fistulifera saprophila* noterades för att bedöma ungefär vilket typ av vatten som undersöktes. *Mayamaea atomus var. permitis* och *Eolimna minima* är två arter som förekommer i vatten med höga halter organiska föroreningar, och därmed i vissa eutrofa vatten (Zgrundo & Bogaczewicz-Adamczak 2004). Även *Fistulifera saprophila* är små alger som är toleranta mot förorenade, eutrofa vatten (Spaulding & Edlund 2008).

## 4.4 Felkällor och alternativ

Om hela täckglasat hade granskats, så att alla alger både räknas, mäts och artidentifieras skulle resultatet ha större validitet men tidsbegränsning är något som alltid är närvarande vid alla typer av studier.

Det största problemet var svårigheten att få sedimentet lika fördelat när det hälldes upp i de tre separata behållarna. Trots att jag skakade om burkarna ordentligt skedde kraftig sedimentering väldigt tidigt. Det kan komma att finnas mer eller mindre sediment beroende på vilken av de tre bägarna som blev fylld först. För att motverka detta kan följande lösning fungera (se figur 7):

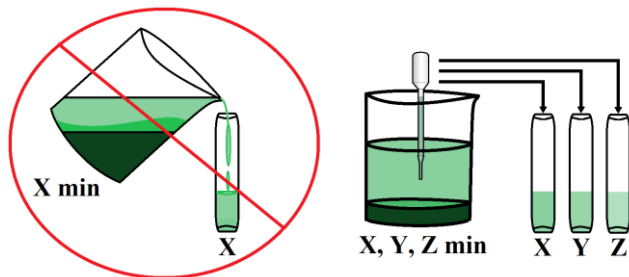


**Figur 7:** Ett alternativ till att bara använda tre bägare. Här fylls först tre burkar som sedan skakas för att hällas över i 3 bägare/burk. Ordningarna för hur bägarna fylls är 1, 2 resp. 3. Sedimenteringstid väljs sedan så att ordningen för hur bägarna fylls blir olika för var sedimenteringstid vilket ger 3 bägare för varje sedimenteringstid och därmed 9 preparat för varje vattendrag.



Detta innebär att var sedimenteringstid görs ur tre olika bägare vilket ger tre preparat per sedimenteringstid där var och en tagits ur alla tre ordningar. Detta skulle gjort att istället för 15 prover skulle jag haft 45 prover och detta hade jag inte haft tid med. Sedan hade jag inte tillräckligt med sediment att utgå från för att göra så många preparat. Jag hade bara en burk/vattendrag. Men för framtida experiment ger jag detta tips för att undvika svårigheten jag ställdes inför.

Likaså momentet där vatten avlägsnades från sedimentet är något att utveckla eftersom provet väldigt lätt rörde upp vid processen. En lösning kunde vara att inte alls dela upp proverna i tre bägare (eller 9 om metoden i figur 7 används) utan istället bara använda en enda och från denna bägare avlägsna provvatten efter önskad sedimenteringstid. Nackdelen med detta är att pipett måste användas och vid utförandet av detta kan kiselalger fastna på pipettens insida/utsida.



**Figur 8:** Ett alternativ för dekantering av vatten. Figuren visar hur pipettering av vatten till provrör utförs istället för att hålla över vatten direkt från bägaren. I denna metod används inte tre separata bägare för respektive sedimenteringstid utan efter att första sedimenteringen och dekanteringen utförts står bägaren i ytterligare 30 minuter för nästa dekantering och så vidare. Bokstäverna (X, Y, Z) representerar en sedimenteringstid.

## 5 Slutsats

Slutsatserna från denna undersökning är främst att metoden jag använt fungerade bra, trots mina misstankar om hur vissa delmoment borde förbättras. Jag fick signifikanta resultat som visade att efter 90 minuters sedimenteringstid har avtagandet av alger, så att alla storlekar hann sedimentera, i det dekanterade vattnet börjat avstanna. Att göra ett preparat som jag gjorde var bra eftersom det därmed inte förelåg risk för att proverna skulle förstöras under räkning eller att alger skulle föröka sig.

Intresset för detta ämne har växt i min värld och det skulle vara väldigt intressant att göra vidare tester med längre sedimenteringstid för att försöka förbättra metoden. Till exempel en- eller tvådagars långa tester för att se ifall de minsta alger verkligen sjunker eller om de helt enkelt är så lätta att det inte går att få med dem vid undersökning av sedimentet. Mina två alternativ (figur 7 och 8) vore också intressant att prova.

Jag fick således en hel del intressanta resultat och tydliga tendenser på att proven bör sedimentera i mer än 90 minuter. Eftersom de medelstora alger fortfarande verkade sjunka efter 90 minuter rekommenderar jag att längre sedimenteringstider beprövas. Det kan vara så att även de mindre fortsätter sjunka på en signifikant nivå om proven får stå i ytterligare en eller två dagar.

Eftersom kiselalger undersöks främst för deras artrikedom är det viktigt att alla arter får komma med i analysen så att vattendragen inte får fel bedömning.

## 6 Referenser:

- Field, C. B, Behrnenfeld M. J, Randerson J. T, Falowski, P. 1998. Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial Oceanic Components. *Heredity* 281: 237-240
- Jarlman, A. & Kahlert, M. 2009. Påväxt på rinnande vatten - kiselalgsanalys. Naturvårdsverket <https://www.havochvatten.se/download/18.64f5b3211343cffddb280004863/P%C3%A5v%C3%A4xt+i+rinnande+vatten-+kiselalgsanalys.pdf> Hämtad 10 januari 2015.
- Kahlert, M. 2014. Påväxtalger/bentiska kiselalger som miljöindikator. Sveriges Lantbruksuniversitet. <http://www.slu.se/sv/institutioner/vatten-miljo/laboratorier/biologiska-laboratoriet/biologiska-analysmetoder/pavaxtalger-som-miljoindikator/> Hämtad 2 juni 2015
- Kelley, M. G. 1998. Use of the Trophic Diatom Index to Eutrophication in Rivers. utg.32 ss. 236-242. Elsevier Science ltd, Storbritannien.
- Kusber, W.-H. & Jahn, R. 2003. Annotated list of diatom names by Horst Lange-Bertalot and co-workers - version 3.0. [http://www.algaterra.org/Names\\_Version3\\_0.pdf](http://www.algaterra.org/Names_Version3_0.pdf) Hämtad 3 mars 2015.
- Patrick, R. & Strawbridge, D. 1963. Methods of Studying Diatoms. utg.2 s.151. Water Environment Federation.
- Seckbach, J. & Kocioleck, P. J. (red) 2011. The Diatom World. The Springer, Dordrecht, Heidelberg, London, New York.
- Smol, J. P. & Stoermer, E. F. (red). 1999. The Diatoms: Applications for the Environmental and Earth Science. utg. 1. Cambridge university press, Cambridge.
- Smol, J. P & Stoermer, E. F. (red). 2010. Diatoms: Applications for the Environmental and Earth Science. utg. 2, ss.16,51,61. Cambridge university press, Cambridge.
- Spaulding, S. & Edlund, M. 2008. Diatoms of the United States - Fistulifera. <http://westerndiatoms.colorado.edu/taxa/genus/Fistulifera> Hämtad 21 april 2015
- Zgrundo, A. & Bogaczewicz-Adamczak, B. 2004. International Journal of Oceanography and Hydrobiology - Applicability of diatom indices for monitoring water quality in coastal streams in the Gulf of Gdansk Region, northern Poland. utg. 33 ss. 31-46. University of Gdansk, Gdansk.

### 6.1 Svensk standard

- SS-EN 14407:2005 " Vattenundersökningar - Vägledning för identifiering och kvantifiering av bentiska kiselalger i prover från sjöar och vattendrag
- SS-EN 14407:2014 " Vattenundersökningar - Vägledning för identifiering och utvärdering av prover av bentiska kiselalger från vattendrag"

### 6.2 Bilder

- Mach, M. 2000. Historical slide by W. Watson & Sons, London <http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/indexmag.html?http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/artapr00/machslide.html> Hämtad 1 juni 2015

# 7 Bilagor

## 7.1 Bilaga 1: Material

### Insamling av prover:

- Gummistövlar
- Måttband/mätsticka/linjal
- 2 vannor
- Tandborstar
- Flaska/behållare (ca 500ml)
- 250 ml behållare
- Markeringspenna

### Laborering:

- Behållare (minst 60 ml)
- Markeringspenna
- NaOH (96%)
- Centrifugrör
- Bordcentrifug (ca 3500 varv/min) och centrifugrör
- Pasteurpipetter
- Väteperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 40%)
- Värmeskåp
- Destillerat vatten
- Dragskåp
- Täckglas
- Pincett
- Naphrax
- Objektglas
- Protokoll

### Analys:

- Ljasmikroskåp: 1000x med oljeimmersionobjektiv med fas- eller interferenskontrast samt ett mätokular (10-15x) med kalibrerad skala. Mikroskåpet ska helst vara utrustat med kamera kopplat till en dator.
- Immersionsolja
- Litteratur
- Excel
- Protokoll

## 7.2 Bilaga 2: Kiselalgräkning

Tabell 1

Alla storlekar			
Tid	30 min	60 min	90 min
M36:1	150	24	31
M63:2	47	17	18
M36:3	52	28	16
O18:1	138	57	52
O18:2	98	41	38
O18:3	37	39	43
E21:1	95	12	3
E21:2	66	5	2
E21:3	65	3	1
N34:1	20	13	22
N34:2	4	4	21
N34:3	16	8	27
M42:1	44	13	22
M42:2	57	24	9
M42:3	41	27	14
Tot	930	315	319
Väntevärde	62	21	21,267
Relation	30-60 min	30-90 min	60-90 min
n	15	15	15
Frihetsgrader	14	14	14
$H_0 = \mu_1 - \mu_2$	$\neq 0$	$\neq 0$	$\approx 0$
St.avvikelse	40,755	15,463	14,567
St.fel	10,523	3,993	3,761
p - värde	0,001	0,002	0,962
t - värde	4,337	3,890	0,048

Tabell 2

Små (<20 $\mu$ m)			
Tid	30 min	60 min	90 min
M36:1	50	18	27
M63:2	43	17	14
M36:3	46	28	16
O18:1	136	56	52
O18:2	89	39	38
O18:3	36	38	43
E21:1	46	7	1
E21:2	40	5	2
E21:3	35	2	1
N34:1	18	13	20
N34:2	4	3	21
N34:3	15	8	26
M42:1	41	9	22
M42:2	56	18	9
M42:3	39	18	14
Tot	694	279	306
Väntevärde	46,267	18,6	20,4
Relation	30-60 min	30-90 min	60-90 min
n	15	15	15
Frihetsgrader	14	14	14
$H_0 = \mu_1 - \mu_2$	$\neq 0$	$\neq 0$	$\approx 0$
St.avvikelse	30,455	14,961	14,651
St.fel	7,864	3,863	3,783
p - värde	0,000	0,002	0,470
t - värde	5,065	3,716	0,742

Tabell 3

Medelstora (20-40µm)			
Tid	30 min	60 min	90 min
M36:1	50	6	4
M63:2	3	0	2
M36:3	3	0	0
O18:1	2	1	0
O18:2	8	1	0
O18:3	1	1	0
E21:1	42	4	1
E21:2	21	0	0
E21:3	23	1	0
N34:1	2	0	2
N34:2	0	1	0
N34:3	1	0	0
M42:1	3	4	0
M42:2	0	5	0
M42:3	1	7	0
Tot	160	31	9
Väntevärde	10,667	2,067	0,6
Relation	30-60 min	30-90 min	60-90 min
n	15	15	15
Frihetsgrader	14	14	14
$H_0 = \mu_1 - \mu_2$	$\neq 0$	$\neq 0$	$\neq 0$
St.avvikelse	15,555	2,351	1,143
St.fel	4,016	0,607	0,295
p - värde	0,049	0,024	0,036
t - värde	2,159	2,525	2,323

Tabell 4

Stora (>40 µm )			
Tid	30 min	60min	90min
M36:1	50	0	0
M63:2	1	0	2
M36:3	3	0	0
O18:1	0	0	0
O18:2	1	1	0
O18:3	0	0	0
E21:1	7	1	1
E21:2	5	0	0
E21:3	7	0	0
N34:1	0	0	0
N34:2	0	0	0
N34:3	0	0	1
M42:1	0	0	0
M42:2	1	1	0
M42:3	1	2	0
Tot	76	5	4
Väntevärde	5,067	0,333	0,267
Relation	30-60 min	30-90 min	60-90 min
n	15	15	15
Frihetsgrader	14	14	14
$H_0 = \mu_1 - \mu_2$	$\approx 0$	$\approx 0$	$\approx 0$
St.avvikelse	12,250	0,596	0,573
St.fel	3,163	0,154	0,148
p - värde	0,173	0,167	0,774
t - värde	1,435	1,457	0,292

### 7.3 Bilaga 3: Kiselalgsmätning

Tabell 5

Längd på alla alger			
Tid	30 min	60 min	90 min
M36_antal	65	18	35
E21_antal	130	6	1
N34_antal	20	44	41
M42_antal	52	20	38
O18_antal	123	67	47
M36_medellängd	13,9	11,2	11,2
E21_medellängd	21,3	21,3	26,7
N34_medellängd	13,5	12,3	12,2
M42_medellängd	9,4	12,2	9,6
O18_medellängd	9,6	9,4	9,1
Väntevärde	13,54	13,28	13,76
Relation	30-60 min	30-90 min	60-90 min
n	5	5	5
Frihetsgrader	4	4	4
$H_0 = \mu_1 - \mu_2$	$\neq 0$	$\neq 0$	$\neq 0$
St.avvikelse	4,313	4,143	6,564
St.fel	0,863	0,829	1,313
p - värde	0,787	0,881	0,735
t - värde	0,288	0,159	0,364