

Kasviplanktonseurannan menetelmäohje vesien- ja merenhoitoon

Kristiina Vuorio, Sirpa Lehtinen, Marko Järvinen ja Heidi Hällfors

Suomen ympäristökeskus (Syke)

21.10.2022

ALUKSI

Tämä ohje kuvaa kasviplanktonin näytteenoton sekä mikroskopointimenetelmän, joita on käytettävä vesien- ja merenhoidon seurannassa järvillä ja Itämerellä. Ohjeessa kuvattuja menetelmiä on tärkeä noudattaa myös muussa kasviplanktonseurannassa, kuten velvoitetarkkailussa. Näin varmistetaan, että ympäristöhallinnon Hertta-tietokantaan tallennettavat kasviplanktonituloset ovat vertailukelpoisia ja niiden käyttö vesien- ja merenhoitotyössä ja tutkimuksessa on mahdollista.

Tämä menetelmäohje korvaa aiemmassa kasviplanktonin laskentamenetelmäohjeessa Järvinen ym. (2011) kohdassa 5.1.1 esitetyn laajan kvantitatiivisen laskentamenetelmän. Tämä päivitetty ohje sisältää mikroskopointimenetelmän lisäksi merenhoidon kasviplanktonseurannan näytteenotto-ohjeen. Järvikasviplanktonin näytteenotto on kuvattu ohjeessa Järvinen ym. (2022) ”Jokien ja järvien biologinen seuranta – näytteenotosta tiedon tallentamiseen”.

Sisällysluettelo

Kasviplanktonseurannan menetelmäohje vesien- ja merenhoitoon	1
1 Tausta, tarkoitus ja kohderyhmä	3
2 Näytteenotto ja näytteiden säilöntä, säilytys, kirjaaminen Hertta-tietokantaan ja lähettäminen mikroskoipoitavaksi	3
2.1 Näytteenottajan pätevyys	3
2.1 Näytteenotto ja näytteiden säilöntä sisävesillä	4
2.2 Näytteenotto ja näytteiden säilöntä merialueilla	4
2.3 Näytteiden säilyttäminen ennen mikroskopointia	5
2.4 Näytteiden lähettäminen mikroskoipoitavaksi ja näytepullon tietojen kirjaaminen Herttaan	5
3 Mikroskopointi	2
3.1 Mikroskopijan pätevyys	3
3.2. Laitteisto ja tarvikkeet	3
3.2.1 Mikroskooppi	3
3.2.2 Mittaokulaari ja okulaariruudukko	4
3.2.3 Laskeutuskammiot, jatkosylinterit ja peitinlasit	4
3.3 Näytteen valmistaminen mikroskopointia varten	5
3.3.1 Sopivan laskeutustilavuuden määrittäminen koelaskeutuksen avulla	6
3.3.2 Laskeutusaika	6
3.3.3 Laskeutustarvikkeiden huoltaminen	6
3.4 Laaja kvantitatiivinen analyysi	7
3.4.1 Laskentayksiköt ja kokoluokat	7
3.4.2 Järvinäytteiden analysointi	8
3.4.2.1 Sisävesilistä	8
3.4.2.2 Laskeutetun näytteen alkutarkastelu	9
3.4.2.3 Käytettävät suurennukset, laskenta-alueet ja kokoluokat	9
3.4.2.4 Laskenta-alueen reunoilla olevien laskentayksiköiden laskeminen	11
3.4.2.6. Eri laskentayksiköiden laskeminen	13
3.4.3 Itämeren rannikko- ja avomerinäytteiden analysointi	14
3.4.3.1 Merilajilista	14
3.4.3.2 Laskeutetun näytteen alkutarkastelu	15
3.4.3.3 Käytettävät suurennukset, laskenta-alueet ja kokoluokat	15
3.4.3.4 Okulaariduudukon reunoilla olevien laskentayksiköiden laskeminen	17
3.4.3.5 Määrittystarkkuus	18
3.4.3.6 Erittäin harvasoluisen näytteen laskeminen	19
3.4.3.7 Erittäin runsaana esiintyvän kokoluokan laskeminen	19
3.5 Tulosten tarkistaminen ja tallentaminen ympäristöhallinnon Hertta-tietokantaan	20
3.6 Analysoitujen näytteiden säilyttäminen ja hävittäminen	21
4 Kirjallisuus – menetelmät ja laskenta	22

1 Tausta, tarkoitus ja kohderyhmä

Euroopan Unionin (EU) vesipolitiikan puitedirektiivi (VPD, European Commission 2000) ja EU:n meristrategiadirektiivi (MSD, European Commission 2008) edellyttävät kasviplanktonin määrän ja yhteisökoostumuksen seurantaan järvillä ja merialueilla. Sisä- ja rannikkovesien kasviplanktonituloja käytetään VPD:n edellyttämässä ekologisen tilan luokittelussa ja toimenpiteiden vaikuttavuuden arvioinnissa. Merenhoidon seurantaan kuuluvia merialueiden eli rannikon, saariston ja avomeren kasviplanktonituloja käytetään MSD:n edellyttämässä meren tilan arvioissa. Kasviplanktonin käyttö vesien tilan seurannassa, vertailuolujen määrittämisessä ja ihmistoiminnan aiheuttamien muutosten tila-arvioinnissa edellyttää, että näytteet on otettu, säilytetty, säilytetty, analysoitu ja muunnettu biomassatuloksiksi noudattaen yhtenäistä ohjeistusta siten, että kasviplanktonin laskentatulokset ovat keskenään vertailukelpoisia.

Ohjeen kohderyhmänä ovat vesien- ja merenhoidon kasviplanktonseurannan tahot. Ohje kuvaa vesien- ja merenhoidon kasviplanktonseurannan näytteenoton, säilönnän, säilytyksen, näytetietojen kirjaamisen Hertta-tietokantaan, näytteiden mikroskoppoinnin ja tulosten Hertta-tietokantaan tallentamisen. Ohje tarkentaa standardissa SFS-EN 15204 (2006) (<http://www.cen.eu/>) "Water quality – Guidance on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy (Utermöhl technique)" (SFS-EN 15204 (2006)) esitettyä kasviplanktonin laajaa kvantitatiivista laskentamenetelmää. Suomen merenhoidon kasviplanktonseurannan osalta ohje tarkentaa myös "Seurantakäsikirja Suomen merenhoitosuunnitelman seurantaohjelmaan vuosille 2020–2026" (Rantajärvi ym. 2020; osio "6.5.2. Kasviplanktonin koostumus ja määrä ja leväkukintojen lajisto") ohjeistusta ja HELCOM COMBINE -seurannan menetelmäohjetta "Guidelines for monitoring of phytoplankton species composition, abundance and biomass" (HELCOM 2021) sekä se vastaa sisällöltään Meren kasviplanktonseuranta -ohjetta (Lehtinen ym. 2019).

2 Näytteenotto ja näytteiden säilöntä, säilytys, kirjaaminen Hertta-tietokantaan ja lähettäminen mikroskopoitavaksi

2.1 Näytteenottajan pätevyys

ELY-keskukset kilpailuttavat näytteenoton järvien sekä rannikon ja saariston näyteasemilla huomioiden näytteenottajien ammattitaidon, pätevyyden ja sertifiointivaatimukset. Syken tutkimusala R/V Arandalla otetaan pääasiassa avomerenäytteitä.

Mikäli esim. mikroskopiija havaitsee näytteenottoon liittyviä ongelmia (esim. puutteellisia tai virheellisiä merkintöjä, sekoitusvaran puuttuminen, väärä säilöntä, vääränlainen tai vuotava näytepullo) on oltava välittömästi yhteydessä näytteenottoa koordinoivaan ELY-keskukseen. Näin työn tilaaja voi ratkaista ongelman näytteenotosta ja säilönnästä vastaavan toimijan kanssa ja ongelmalta voidaan välttyä jatkossa.

2.1 Näytteenotto ja näytteiden säilöntä sisävesillä

Kasviplanktonin näytteenotto ja näytteiden säilöntä sisävesillä on kuvattu erillisessä ohjeessa, joka löytyy ympäristöhallinnon kotisivulta: http://www.ymparisto.fi/fi-FI/Vesi/Pintavesien_tila/Pintavesien_tilan_seuranta/Biologisten_seurantamenetelmien_ohjeet

2.2 Näytteenotto ja näytteiden säilöntä merialueilla

ELY-keskukset tai ELY-keskusten palkkaamat alihankkijat ottavat rannikon ja saariston kasviplanktonnäytteet vesinäytteenoton yhteydessä kokoomanäytteenä, eli kasviplanktonnäyte otetaan samasta kokoomanäytteestä kuin a-klorofyllin kokoomanäyte. Näytteenotossa käytetään Limnos-tyyppistä vedennoudinta. Kokoomanäyte kootaan alla olevan listan mukaisesti 4-6 eri syvyydeltä otetusta osanäytteestä. Jokaisesta osanäytesyvyydestä mitataan sama vesimäärä kokoomanäytteeseen. Kokoomanäytteen osasyvyydet ja alasyvyys määräytyvät näkösyvyyden (Secchi-syvyys, Rantajarvi ym. (2020) osio "6.5.4. Vesipatsaan fysikaalinen seuranta") perusteella alla olevan listan mukaisesti siten, että näytteenoton alaraja on maksimissaan 10 m:

0; 2; 4; 6; 8 ja 10 m:n osanäytteistä, jos näkösyvyys	väh. 4,1 m
0; 2; 4; 6 ja 8 m:n osanäytteistä, jos näkösyvyys	3,1-4,0 m
0; 2; 4 ja 6 m:n osanäytteistä, jos näkösyvyys	2,1-3,0 m
0; 1; 2; 3 ja 4 m:n osanäytteistä, jos näkösyvyys	1,1-2,0 m
0; 0,5; 1; 1,5 ja 2 m:n osanäytteistä, jos näkösyvyys	alle 1,0 m

Kokoomanäyte sekoitetaan huolellisesti ennen kuin siitä erotetaan varsinainen kasviplanktonnäyte (ja a-klorofyllin kokoomanäyte) erilliseen näytepulloon. On tärkeää, että näytepulloon jätetään sekoitusvara (**Kuva 1**).

Tutkimusalus R/V Arandalla kasviplanktonnäytteet otetaan sekä avomereltä että rannikolta Syken laatukäsikirjan ohjeiden mukaisesti Limnos- tai Rosette-tyyppisellä putkinoutimella otetusta kokoomanäytteestä, jonka osanäytesyvyydet ovat 1 m, 2,5 m, 5 m, 7,5 m ja 10 m. Myös R/V Arandalla kasviplanktonnäyte otetaan samasta kokoomanäytteestä kuin a-klorofyllin kokoomanäyte.

Näytepulloihin tulee merkitä selvästi:

- näytteenottopäivämäärä
- kellonaika
- näytteenottoaika
- näytteenottosyvyys
- säilöntäaine
- näytteenottajan nimikirjaimet
- koordinaatit (tarvittaessa)
- kunta (tarvittaessa)
- vesistöalue (tarvittaessa)
- näytteenotin (tarvittaessa)

- näytteenottolaitos (tarvittaessa)
- mahdolliset lisätiedot (tarvittaessa)

Näyte säilötään välittömästi näytteenoton yhteydessä lisäämällä hapanta Lugolin liuosta noin 1 ml/200-300 ml näytettä. Säilötyn näytteen väri on vaalean ruskehtava (**Kuva 1**). Lugolin liuosta käsiteltäessä käytetään suojakäsineitä ja suojataan silmät ja vaatteet. Lugolin liuos voidaan tarvittaessa annostella tyhjän näytepullon pohjalle jo ennen näytteenottoa. Tällöin näytepullot on pidettävä pystyasennossa, ja näytettä lisättäessä on varottava läikkymistä ja ylitäyttöä.

Näytepulloina käytetään mieluiten kirkkaita lasipulloja, joista näytteen säilönnän riittävyyden näkee hyvin. Pulloissa tulee olla tiiviit korkit ja pullot kierretään kiinni huolellisesti. Näytteet kuljetetaan näytteenotto paikalta kannellisessa kylmälaulukussa, jonka lämpötilana pidetään mieluiten noin +4 - + 10°C.



Kuva 1. Esimerkkikuva kirkkaasta, lasisesta 300 ml kasviplanktonnäytepullost, johon on lisätty 1 ml hapanta Lugolin liuosta sekä jätetty riittävästi sekoitusvaraa. Pulloon kiinnitetään vielä etiketti, josta selviävät kaikki tärkeät tiedot, kuten näytteenottopäivämäärä, kellonaika, näytteenotto paikka, näytteenotto syvyys, säilöntäaine, näytteenottajan nimi ja mahdolliset lisätiedot. Siinä yhteydessä, kun näytepullon tiedot kirjataan Hertta-tietokantaan, kirjaaja lisää Herttan antaman näytepullon numeron (id-numero) vedenpitävällä tussilla selkeästi etikettiin. (Kuva Sirpa Lehtinen, SYKE).

2.3 Näytteiden säilyttäminen ennen mikroskopointia

Näytteitä säilytetään valolta suojattuina viileässä, mieluiten jääkaappilämpötilassa. Näytteiden mikroskopointi suositellaan suorittavan vuoden sisällä näytteenotosta. Mikäli tämä ei ole mahdollista, näytteiden väri on tarkistettava vuosittain ja näytepulloihin on lisättävä tarvittaessa hapanta Lugolin liuosta, jotta näytteen sisältämät leväsolut eivät ala hajota.

2.4 Näytteiden lähettäminen mikroskoitavaksi ja näytepullon tietojen kirjaaminen Herttaan

ELY-keskukset teettävät pääosan vesien- ja merenhoidon kasviplanktonnäytteiden mikroskooppisista analyyseistä konsulteilla. ELY-keskusten tulee huomioida **Luvussa 3.1** kuvatut pätevyysvaatimukset mikroskopioiden valinnassa ja edellyttää konsultteja noudattamaan tätä

ohjetta. Syke huolehtii avomerinäytteiden sekä tiettyjen järvi- ja rannikonäytteiden mikroskooppisista analyyseistä.

Näytteet tulee lähettää sellaisen palvelun kautta, joka toimittaa näytteet suoraan mikroskopoinnista vastaavalle konsultille tai sovittuun Syken laboratorioon. Näytteiden lähettämisestä tulee ilmoittaa vastaanottajalle etukäteen, jotta vastaanottaja osaa odottaa näytteitä. Toimitusta varten näytteet pakataan huolellisesti siten, että pullot eivät pääse vuotamaan, rikkoutumaan tai altistu lämmölle tai valolle.

Näytteen tiedot voidaan kirjata Hertta-tietokantaan joko näytteenottajan tai mikroskopioijan toimesta. Näytepullojen kirjaamisesta Hertta-tietokantaan sovitaan ELY-keskuksen ja konsulttien kesken. Avomerinäytteet kirjataan mikroskopioijan toimesta Sykessä. Näytteen kirjaamisen yhteydessä Hertan antama näytenumero (id-numero) tulee kirjoittaa vedenpitävällä tussilla selkeästi näytepullon etikettiin. Näytteen kirjaajan tulee tarkistaa, että kenttälomakkeiden, näytepullon etiketin, Hertan kasviplanktonrekisterin ja Veslan tiedot ovat yhdenmukaiset. Mikäli Sykeen mikroskopoitavaksi lähetettävien näytteiden tiedot kirjataan näytteenotosta vastaavan konsultin toimesta Hertta-tietokantaan, tulee kirjaajan muistaa lisätä ylläpitäjäorganisaatioksi myös Syke.

Vesienhoidon seurantaan kuuluvat sisävesien kasviplanktonnäytteet kirjataan Herttaan. Kirjaa kaikki näytteeseen kuuluva tieto. Hanke-kohtaan voi valita yhden tai useamman hankkeen seurannasta riippuen.

Merenhoidon seurantaan kuuluvat rannikko- ja avomerinäytteet kirjataan Herttaan seuraavasti:

- Hanke: 04 - MERENHOIDON SEURANTA XM1003.
- Yhden näytteen kohdalla voi valita useampiakin eri hankekoodeja, mikäli näyte on osa myös jotakin muuta seurantaohjelmaa Merenhoidon seurannan lisäksi.

3 Mikroskopointi

Analyysi suoritetaan Utermöhl-menetelmällä (Utermöhl 1958, Oirik ym. 1998, HELCOM 2021, SFS-EN 15204 (2006) käänteismikroskoopilla käyttäen kirkaskenttäoptiikkaa, vaihevastakohtaoptiikkaa (faasikontrasti), tai differentiaali interferenssikonstrasti optiikkaa (DIC). Näytteistä lasketaan auto- ja miksotrofiset planktonlevät, sinilevät (syanobakteerit), kaikki (myös heterotrofiset) panssariimalevät ja flagellaatit sekä merinäytteistä myös miksotrofinen *Mesodinium rubrum* -ripsieläin. Näytteistä ei lasketa <2 µm -kokoisia yksittäisiä pikoplanktonsoluja, koska käytettävä menetelmä ei sovellu autotrofisen pikoplanktonin erottamiseen heterotrofisista bakteereista.

3.1 Mikroskopiijan pätevyys

Kasviplanktonanalyysijä tekevä henkilö voi osoittaa menetelmäpätevyytensä esimerkiksi esittämällä hyväksytysti suoritettua kasviplanktonin pätevyyskokeen tulokset lajintunnistuksen ja laskentamenetelmän osalta. Esimerkiksi ProfTest Syken pätevyyskokeessa hyväksytysti suoritettu järvilajiston tunnistusosio yhdessä hyväksytysti suoritettujen laskenta- ja mittausosioiden kanssa osoittaa pätevyyttä järvinäytteiden mikroskopointiin. Vastaavasti hyväksytysti suoritettu Itämeren lajiston lajintunnistusosio yhdessä hyväksytysti suoritettujen laskenta- ja mittausosioiden kanssa osoittavat pätevyyttä Itämeren näytteiden mikroskopointiin.

Lisäksi todennettu säännöllinen osallistuminen kansallisiin ja kansainvälisiin lajintunnistuksen ja mikroskopointimenetelmän harmonisointityöpajoihin ja koulutuksiin voi osoittaa pätevyyttä. Seurantanäytteitä analysoiville konsulteille Suomen kasviplanktonseuran vuosittaisiin työpajoihin osallistuminen on hyvin tärkeä osoitus pätevyyden ylläpitämisestä.

3.2 Laitteisto ja tarvikkeet

Kasviplanktonanalyysiä varten tarvitaan käänteismikroskooppi ja laskeutuskammioita (kyvettejä), tilavuudeltaan erilaisia jatkosylintereitä sekä nelikulmaisia ja pyöreitä peitinlaseja (**Kuva 2**). Mikroskoopin toisessa okulaarissa tulee olla mitta-asteikko, joka kalibroidaan objektimikrometrin avulla. Merinäytteiden analysointiin tarvitaan myös okulaariruudukko. Sisävesinäytteiden analyysiä varten voidaan tarvita myös immersioöljyä, mikäli käytetään korkean erotuskyvyn öljyimmersio-objektiiveja. Sisävesinäytteiden mahdolliseen laimentamiseen tarvitaan joko mittapipetti tai mittalasi.

3.2.1 Mikroskooppi

Käänteismikroskoopin kuvanlaatuun vaikuttavat tärkeimmät tekijät ovat objektiivit, kondensori ja valaistus. Standardin SFS-EN 15204 (2006) mukaiset mikroskoopin perusvaatimukset on esitetty **Liitteessä 1**.

Mikroskoopin suurennus muodostuu objektiivin, okulaarin ja runkokertoimen suurennusten tulosta. Kuvanlaatuun vaikuttaa paljon laitteiston erotuskyky, joka riippuu objektiivien ja mikroskoopin kondensorin numeerisista apertuureista (NA; **Liite 1**). Koska laskettavat planktonlevät ovat useimmiten 2-200 µm kokoisia, ja niiden tärkeät tuntomerkit ovat usein vielä tätä pienempiä, on kuvan korkea laatu ensiarvoisen tärkeää.

Jos mikroskooppiin on asennettu kamera/videokamerajärjestelmä, suositellaan lajiston dokumentointia tukemaan lajinmäärittystä sekä toimimaan osana laadunvarmennusta.

3.2.2 Mittaokulaari ja okulaariruudukko

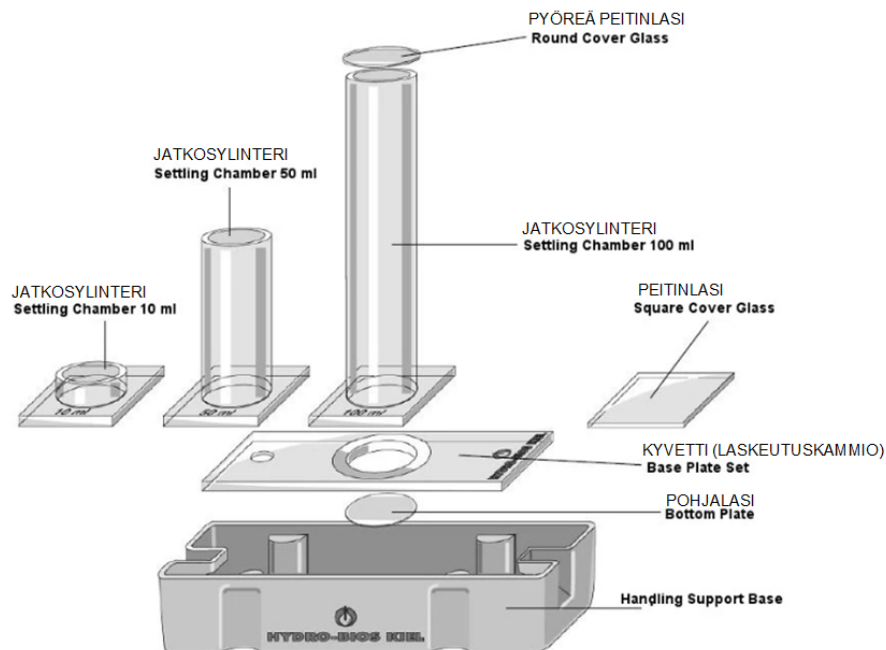
Kasviplanktonin laskentayksiköiden mittaukseen käytetään okulaariin kiinnitettävää mittaokulaaria, joka on kalibroitu objektimikrometrin avulla. Mittaokulaarin mittojen (μm) tulee olla helposti tarkistettavissa kaikille käytössä oleville laskentasuurennuksille esimerkiksi mikroskoopin runkoon kiinnitetystä listasta. Mittaukset voidaan tehdä myös mittausohjelmalla. Tällöin on varmistettava, että ohjelman kalibrointi on tehty oikein.

Mittaokulaarin mitta-asteikko tarkistetaan objektimikrometrin avulla aina, kun otetaan käyttöön uusi mikroskooppi, objektiivi, okulaarit tai runkokerroin. Objektimikrometrin mitta-asteikko (1-2 mm) on jaettu pienempiin mittaväleihin. Objektimikrometrin avulla määritetään okulaarin asteikon mittavälin todellinen pituus mikrometreinä. Okulaarin mittavälin kalibrointi tehdään erikseen kaikille suurennuksille.

Okulaariruudukko tarvitaan merinäytteiden analysointia varten. Okulaariruudukko asetetaan lisäosana toiseen okulaariin (toisessa okulaarissa on lisäosana mittaokulaari). Okulaariruudukko rajaa mikroskoopinäkymään 10x10 ruutua, joiden sisälle jäävä alue on merinäytteiden analyysissä käytössä oleva yksittäinen laskenta-alue (**Luku 3.4.3**). Okulaariruudukon mitat varmistetaan mittaokulaarin avulla.

3.2.3 Laskeutuskammiot, jatkosylinterit ja peitinlasit

Kasviplanktonnäyte laskeutetaan laskeutuskammioon (Utermöhl 1958, **Kuva 2**), jonka pinta-ala tunnetaan. Suositeltavat laskeutuskammioiden tilavuudet ovat 3 ja 5 ml ja jatkosylinterien tilavuudet 5, 10, 25 tai 50 ml. Käytetty näytetilavuus ilmoitetaan yhden desimaalin tarkkuudella kirjattaessa tieto EnvPhyto-laskentaohjelmaan. Mikäli ei ole mahdollista käyttää jo valmistajan toimesta erittäin tarkkaan tilavuudeltaan kalibroitua laskeutuskammiota ja jatkosylinteriä (esim. Hydro-Bios -yhtiön välineet, joiden tilavuudet valmistaja kertoo useiden desimaalien tarkkuudella), on laskeutuskammion ja siihen liitetyn jatkosylinterin yhteistilavuus on varmistettava ennen ensimmäistä käyttökertaa punnitsemalla lasilla peitetty laskeutuskammio sekä tyhjänä että hanavedellä täytettynä. Punnitus tehdään vaa'alla, jossa punnitus voidaan tehdä vähintään gramman kymmenesosan tarkkuudella. Punnitusten erotuksesta saadaan yhdistelmällä laskeutettava vesitilavuus ($g = \text{ml}$). Esimerkiksi 10,2 g vastaa 10,2 ml. Näytettä sisältävää yhdistelmää ei tämän jälkeen tarvitse enää erikseen punnita.



Kuva 2. Kasviplanktonnäytteen laskeuttamisvälineet. Muokattu Hydro-Bios –yhtiön internetsivulla olevasta alkuperäisestä kuvasta (<https://www.hydrobios.de/product/combined-plate-chamber/>).

3.3 Näytteen valmistaminen mikroskopointia varten

Kasviplanktonnäyte otetaan riittävän ajoissa lämpenemään huoneenlämpöön (noin vrk ennen näytteen laskeutusta). Tämä ehkäisee kaasukuplien muodostumista sekä näytteen lämpenemisestä johtuvaa lämpöliikettä ja edistää solujen tasaista jakautumista laskeutuskammion pohjalle. Huoneenlämpöinen näyte sekoitetaan hyvin ennen laskeuttamista. Laskeutettava näytetilavuus (järvinäytteet yleensä 3-50 ml, merinäytteet 10-50 ml) valitaan näytteen arvioidun solutiheyden ja roskaisuuden (detritus, epäorgaaninen aines) mukaan (**Luku 3.3.1**). Näytteet saattavat olla niin roskaisia, että solumäärän perusteella optimaalista tilavuutta on mahdotonta laskeuttaa.

Näyte sekoitetaan kääntelemällä näytepulloa varovasti ylösalaisin vähintään 20 kertaa. Tämän jälkeen näyte kaadetaan yhdellä kaadolla puhtaaseen ja kuivaan laskeutuskammioon, jonka päällä on tiiviisti halutun tilavuinen jatkosylinteri. Laskeutettavan näytteen päälle työnnetään laskeutustilavuudesta riippuen joko nelikulmainen (mikäli jatkosylinteriä ei käytetä) tai pyöreä peitinlasi (jos jatkosylinteriä käytetään) siten, että näytteeseen ei jää ilmakuplia.

Järvinäytteissä yleisenä esiintyvän *Botryococcus*-viherlevän laskeutumisen varmistamiseksi jokaisen laskeutettavan järvinäytteen päälle lisätään ennen peitinlasin asentamista pieni pisara laimennettua astianpesuainetta (käyttöliuos = pari pisaraa astianpesuainetta/50 ml vettä). Astianpesuaine pienentää veden pintajännitystä, jolloin öljyä sisältävien *Botryococcus*-yhdyskuntien laskeutuminen voidaan varmistaa. Merinäytteisiin tiskiainetta ei lisätä.

3.3.1 Sopivan laskeutustilavuuden määrittäminen koelaskeutuksen avulla

Sopivan laskeutustilavuuden selvittämiseksi voidaan tehdä koelaskeutus, jossa näytettä laskeutetaan aluksi tietty vesimäärä ja sen perusteella päätetään varsinainen laskeutustilavuus.

Näytettä voidaan laskeuttaa myös useita eri laskeutustilavuuksia, joista valitaan solutiheydeltään sopivin näyte mikroskopoitavaksi (**Luku 3.4.2** (järvet) ja **Luku 3.4.3** (meri)). Analyysi suoritetaan kuitenkin aina vain yhdestä laskeutuksesta kaikilla analyysiin kuuluvilla suurennuksilla. Mitä enemmän leviä ja/tai muita hiukkasia (mm. savihiukkaset) näytteessä on, sitä pienempi tilavuus näytettä laskeutetaan. Merinäytteiden laimentamista ei suositella, mutta sisävesinäytettä voi tarvittaessa laimentaa huoneenlämpöisellä vesijohtovedellä tai tislattulla/ionivaihdetulla vedellä (**Luku 3.4.2.2**).

3.3.2 Laskeutusaika

Jotta solut laskeutuisivat laskeutuskammion pohjalle mahdollisimman satunnaisesti, laskeutus tulee tehdä tasaisella ja vaakasuoralla alustalla valolta ja vedolta suojatussa, mahdollisimman tasalämpöisessä paikassa. Laskeutusaika määräytyy näytteen tilavuuden ja jatkosylinterin korkeuden perusteella (**Taulukko 1**) ja on enimmillään 5 vrk. Liian pitkäkestoinen laskeutusaika lisää ilmakuplien muodostumista sekä riskiä, että pohjalle vajonneet levät siirtyvät.

Taulukko 1. Suositukset näytteen minimilaskeutusajoiksi järvi- ja merinäytteille. Suositusten perustana ovat SFS-EN 15204 (2006) ja HELCOM (2021). SFS-EN 15204 (2006) standardi suosittelee laskeutusajaksi järvinäytteille 4 tuntia/cm. Jatkosylinterin sijaan 5 ml näytemäärä voidaan laskeuttaa myös kiinteässä 5 ml laskeutuskammiossa*.

Laskeutuskammion eli kyvetin ja jatkosylinterin yhteistilavuus (ml)	Jatkosylinterin korkeus (cm)	Laskeutusaika (h)	
		Järvinäyte	Merinäyte
2-3	-	3	3
5*	1	6	5
10	2	8	8
25	5	16	18
50	10	24	24

3.3.3 Laskeutustarvikkeiden huoltaminen

Ennen seuraavan näytteen laskeutusta, laskeutuskammiot ja jatkosylinterit pestään huolellisesti juoksevan veden alla esim. pehmeällä siveltimellä tai pehmeällä käsipaperitupolla. Laskeutuskammion ja jatkosylinterin pintojen naarmuuntumista ja 'tahmaantumista' (esim. tarralapun tai merkkeusteipin liimaan) on vältettävä. Tarvittaessa välineitä voidaan liottaa tiskiainetta sisältävässä vedessä ennen pesua ja huuhtelua.

3.4 Laaja kvantitatiivinen analyysi

Kvantitatiivisella mikroskooppisella laskentamenetelmällä saadaan tuloksena lajikoostumus, laskentayksiköiden tiheydet ja biomassa. Laskeutuskammioon laskeutetun näytteen mikroskooppinen analyysi tehdään käänteismikroskoopilla. Järvi- ja merinäytteiden analyysimenetelmissä on eroja, joten järvinäytteiden analyysi ohjeistetaan tarkemmin **Luvussa 3.4.2** ja merinäytteiden analyysi **Luvussa 3.4.3**.

3.4.1 Laskentayksiköt ja kokoluokat

Laskentayksikkö ("Unit" EnvPhytossa) voi olla itsenäisesti laskettava yksittäinen solu, kenobia, eri solumääriä sisältävä yhdyskunta tai esim. 100 µm:n rihman pätkä. Samassa näytteessä voi samalla taksonilla olla erilaisia laskentayksiköitä (esim. *Aphanothece paralleliformis* tai *Synura* spp., jolla on laskentayksikkönä sekä yksittäinen solu että eri solumääristä koostuvia yhdyskuntia).

Lisäksi valtaosalla taksoneita kokovaihtelu on niin suurta, että taksonilla on myös useita eri kokovaihtoehtoja. Kokovaihtoehtoja voi olla useita, vaikka laskentayksikkö olisikin sama (esim. *Dinophysis acuminata* tai *Cryptomonas* spp., jolla laskentayksikkö on aina solu, mutta kokovaihtoehtoja on useita erilaisia). Joidenkin taksonien sisällä voi olla koon vaihtelua myös muodoissa ja trofiassa, vaikka laskentayksikkö pysyy samana (esim. Dinophyceae spp.).

Hertta-tietokannassa olevan **kokoluokan** tunnistenumero on sama numero kuin EnvPhyton "Size" ja meritaksonien kohdalla myös HELCOM EG PHYTO -ryhmän listan (PEG-lista) "SizeClassNo". Kokoluokka tarkoittaa laskentayksikön ja koon, muodon sekä trofian yhdessä muodostamaa laskennan yksikköä, ja näitä yksiköitä voi olla useita samalle taksonille.

Laskennan yhteydessä käytetään ahkerasti mittaokulaaria (**Luku 3.2.2**), jotta soluille voidaan valita sopiva kokoluokka mahdollisimman tarkasti. Laskentayksikön koko ja siten valittu kokoluokka vaikuttaa siihen, millä suurennuksella se lasketaan (**Luku 3.4.2** (järvi), **Luku 3.4.3** (meri)).

Esimerkkejä laskentayksiköistä

Yksittäin laskettavat solut:

- solut, jotka esiintyvät yksittäin (esim. nielulevät).
- solut, jotka esiintyvät yhdyskunnissa, joista yksittäiset solut on helppo laskea (esim. *Dinobryon*-kultalevät, sekä soluketjuja muodostavat lajit kuten

Skeletonema-, *Aulacoseira*-, ja *Chaetoceros*-piilevät, *Binuclearia*-viherlevä, sekä *Peridiniella catenata* -panssarisiimalevä).

- solut, jotka ovat irronneet yhdyskunnista (esim. irralliset *Dinobryon*- ja *Uroglena/Uroglenopsis*- ja *Synura*-kultaleväsolut).

Yhdyskunnat:

- koloniaaliset sinilevät (esim. *Aphanocapsa*, *Cyanodictyon*, *Woronichinia*)
- samankaltaisia yhdyskuntia muodostavat viherleväsuvut (esim. *Botryococcus*).
- Huom: Merinäytteissä kaikkien yhdyskuntien solumäärä lasketaan käyttämällä laskentayksikkönä korkeintaan 20 solun laskentayksiköitä, eli esim. 100 solun yhdyskunta = viisi kertaa 20 solun yhdyskunta.

Kenobiat ja yhdyskunnat, joissa kutakuinkin pysyvät solumäärät:

- esim. *Coelastrum*, *Didymocystis*, *Eudorina*, *Pandorina*, *Desmodesmus* ja *Scenedesmus*.

Yhdyskunnat, jotka lasketaan 4-soluryhminä:

- esim. *Crucigenia*, *Crucigeniella*, *Dictyosphaerium* ja *Merismopedia*

100 µm:n pätkinä laskettavat rihmat:

- rihmamaiset sinilevät kuten *Aphanizomenon*, *Dolichospermum*, *Gloeotrichia*, *Nodularia* ja *Oscillatoriales*.

3.4.2 Järvinäytteiden analysointi

Sisävesien seurannassa kasviplanktonnäytteiden mikroskooppinen analyysi tulee suorittaa noudattaen huolellisesti alla olevia ohjeita. Ohjeet pohjautuvat CEN-standardeihin (SFS-EN 15204 (2006) ja SFS-EN 16695 (2015)) sekä Syken sisäisessä käytössä olevan laatuksikirjan ohjeisiin.

3.4.2.1 Sisävesilista

Sisävesinäytteiden tulokset tallennetaan Hertta-tietokantaan noudattaen Hertan kasviplanktonrekisterissä voimassa olevaa sisävesien laji- ja biovolyymlistaa. Voimassa oleva sisävesilista löytyy Hertta-tietokannan lisäksi EnvPhyto-laskentaohjelmasta, jonka Syke tarjoaa maksutta myös konsulttien käyttöön. Tulokset tallentuvat suoraan EnvPhyto-laskentaohjelmasta Hertta-tietokantaan.

Hertta-tietokannan kasviplanktonrekisterin ja EnvPhyto-laskentaohjelman sisävesilista seuraa Algaebase.com -sivustolla olevaa taksonomiaa ottaen huomioon HELCOM Phytoplankton Expert Group (EG Phyto, ent. PEG) -kasviplanktonasiantuntijaryhmän laji- ja biovolyymitaulukon, joka päivitetään kerran vuodessa. Käytännön syistä EnvPhyto-laskentaohjelmassa ja Hertta-tietokannassa oleva sisävesilista voi olla hieman jäljessä Algaebase.com:in ja/tai EG Phyto -kasviplanktonasiantuntijaryhmän laji- ja biovolyymitaulukon viimeisimmästä versiosta. Laji- ja biovolyymitaulukon päivitykset eivät vaikuta EnvPhyto-laskentaohjelmaa käyttäville konsulteille

tai sieltä Hertta-tietokantaan siirrettäviin tuloksiin, sillä laskentatulokset päivittyvät Hertassa uuden version mukaisiksi sitä mukaa kun lista saadaan päivitettyä Syken asiantuntijoiden toimesta.

3.4.2.2 Laskeutetun näytteen alkutarkastelu

Näyte laskeutetaan laskeutuskammioon **Luvun 3.3** ohjeiden mukaisesti. Näytteisiin lisätään laimennettua tiskiainetta varmistamaan, että myös öljyä sisältävät *Botryococcus*-yhdyskunnat laskeutuvat näytteessä. Ennen analyysin aloittamista laskeutetun näytteen solutiheyttä ja solujen jakautumista tarkastellaan käänteis- mikroskoopilla laskeutuskammioilta. Jos näyte on liian harva tai ylitieheä, tai jos solut ovat jakautuneet epätasaisesti esimerkiksi pääosin laskeutuskammion toiselle puoliskolle, keskelle tai reunoille, solut muodostavat harjannemaisia kasauksia, rihmat osoittavat kaikki samaan suuntaan, tai näytteessä on ilmakuplia, näyte hylätään ja laskeutetaan uusi näyte.

Laskennalle sopivaa solutiheyttä arvioitaessa huomioidaan, että jokaisella kolmella näytteiden analysointiin käytettävällä suurennuksella (ks. **Luku 3.4.2.3**) pyritään laskemaan vähintään 400 yksikköä, mutta laskentaa ei kuitenkaan lopeteta vaikka 400 laskentayksikön määrä ylittyisi. Analysointi suoritetaan samasta laskeutetusta näytteestä kaikilla kolmella suurennuksella. Käytännössä vähintään 400 yksikön laskenta kaikilla kolmella suurennuksella ei ole aina mahdollista, koska erikokoisten solujen lukumäärä näytteessä voi vaihdella huomattavasti.

Mikäli näyte on liian tiheä tai roskainen, sitä voidaan laimentaa huoneenlämpöisellä vesijohtovedellä tai tislattulla/ionivaihdetulla vedellä mittapipetin tai mittalasin avulla. Laimennos tehdään esim. lisäämällä uuteen puhtaaseen astiaan puolet hyvin sekoitettua näytettä ja puolet hanavettä.

3.4.2.3 Käytettävät suurennukset, laskenta-alueet ja kokoluokat

Sisävesinäytteiden analysoinnissa suositeltavat suurennukset ovat 100-125x, 200-250x ja >400x. **Taulukossa 2** on esitetty suositeltavat tavoitemuuntokertoimet suurennuksille.

Taulukko 2. Suositeltavat muuntokertoimet, jolla sisävesinäytteiden laskentatulokset muunnetaan tulokseksi laskentayksikköä/litra. Muuntokertoimeen vaikuttaa laskeutettu näytemäärä ja analysoitu ala. Laskeutettu näytemäärä on sopiva, kun kaikilla kolmella suurennuksella arvioidaan mahdolliseksi saada 400 yksikköä lasketuksi (aina se ei ole mahdollista kaikilla kolmella suurennuksella).

Laskeutettu näytemäärä ml	Kokonaisuurennus	Laskenta-ala	Muuntokerroin
3	100-125x	koko pohjapinta-ala	333
3	200-250x	näkökenttiä/ruudukoita	4522
3	>400x	näkökenttiä/ruudukoita	33329
10	100-125x	koko pohjapinta-ala	100
10	200-250x	näkökenttiä/ruudukoita	1322
10	>400x	näkökenttiä/ruudukoita	9999
25	100-125x	koko pohjapinta-ala	40
25	200-250x	näkökenttiä/ruudukoita	550
25	>400x	näkökenttiä/ruudukoita	6666
50	100-125x	koko pohjapinta-ala	20
50	200-250x	näkökenttiä/ruudukoita	275
50	>400x	näkökenttiä/ruudukoita	1980

Näytteiden vertailukelpoisuuden takaamiseksi on suositeltavaa, että tietty laskentayksikkö lasketaan aina samalla suurennuksella. Pienimmällä 100-125x suurennuksella analysoidaan mieluiten laskeutuskammion koko pohjapinta-ala, mutta kuitenkin vähintään puolet pohjapinta-alasta. Keskisuurennuksella 200-250x ja suurimmalla suurennuksella >400x tarkastellaan joko näkökenttiä tai ruudukoita. Esimerkkejä eri suurennuksilla laskettavista taksonista ja laskentayksiköistä on esitetty **Taulukossa 3**.

Solujen kokoa arvioitaessa käytetään okulaarissa olevaa mittaokulaaria, joka on kalibroitu objektimikrometrin avulla (**Luku 3.2.2**). Mittaokulaarin asteikkovälejä vastaavien µm-mittojen tulee laskennan aikana olla helposti näkyvillä ja tarkistettavissa kaikille analyysissä käytettäville kolmelle eri kokonaissuurennukselle. Taksonin kokoluokka vaikuttaa siihen, millä suurennuksella se lasketaan. Mikäli käytössä on mittausohjelma, on varmistettava, että ohjelma on kalibroitu oikein. Solujen ja yhdyskuntien koot mitataan suurimmalla käytettävissä olevalla, kyseisen taksonin mittaamiseen sopivalla suurennuksella.

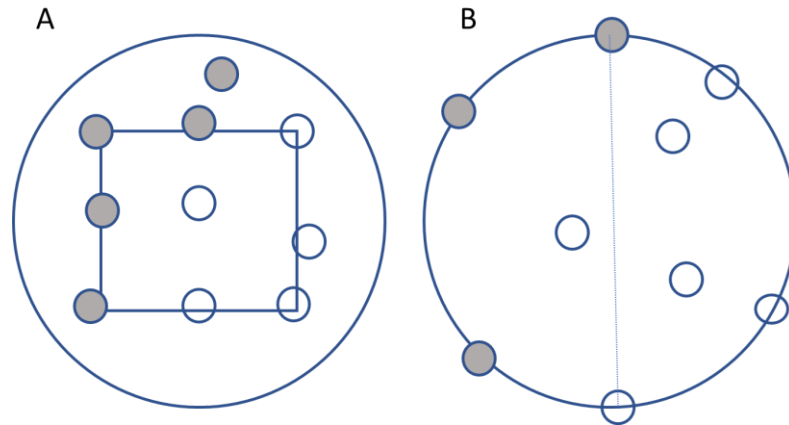
Näytteiden keskinäisen vertailukelpoisuuden takaamiseksi **sama kokoluokka pyritään laskemaan aina samalla suurennuksella**, riippumatta siitä, onko kyseinen kokoluokka poikkeuksellisen runsas tai harvalukuinen kyseisessä näytteessä. Syken kasviplanktonasiantuntijoilta saa pyytämällä excel-listan, jossa on lajilistalla oleville taksonien kokoluokille käytettävät suurennukset. Yhdyskuntien laskennassa käytetään sopivinta sisävesilistalta löytyvää kokoluokkaa. Mikäli kokoluokka ei löydy listalta, valitaan solulukumäärältään sellainen vaihtoehto, joka voidaan kertoa jollakin luvulla yhdyskunnan solulukumäärää vastaavaksi. Tarvittaessa EnvPhyto-ohjelmassa on mahdollisuus myös lisätä sopiva kokoluokka kyseiselle taksonille.

Taulukko 3. Esimerkkejä taksonista, jotka lasketaan joko 100-125x, 200-250x tai >400x suurennuksilla sisävesinäytteistä.

Kokonaissuurennus		Laskettavat yksiköt
suuri	≥400x	<ul style="list-style-type: none"> ● Pienikokoiset, < 20 µm solut ● Pienisoluiset pienikokoiset yhdyskunnat, esim. <i>Cyanodictyon</i>
keskisuuri	200x - 250x	<ul style="list-style-type: none"> ● Keskikokoiset, noin 20-30 µm solut ● Kapeammat rihmamaiset sinilevät kuten <i>Pseudanabaena</i>, kapeat Oscillatoriales spp. ● Suurisoluiset koloniaaliset sinilevät kuten <i>Woronichinia</i>, <i>Microcystis</i> ● Soluketjuja tai rihmoja muodostavat pienisoluisetkin piilevät, kuten <i>Aulacoseira</i> ● Suurikokoiset koloniaaliset kultalevät kuten <i>Dinobryon</i>
pieni	100x - 150x	<ul style="list-style-type: none"> ● Harvalukuiset ja suurikokoiset lajit esim. <i>Ceratium</i> ● Leveämmät rihmamaiset sinilevät kuten <i>Aphanizomenon</i>, <i>Dolichospermum</i>

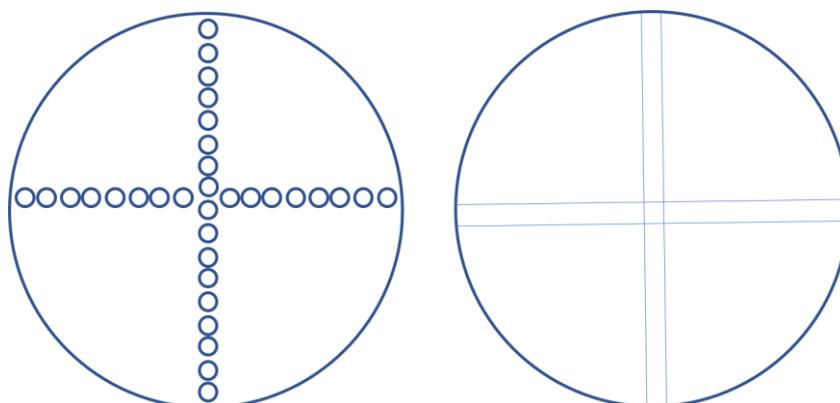
3.4.2.4 Laskenta-alueen reunoilla olevien laskentayksiköiden laskeminen

Laskenta-alue voi olla koko näkökenttä tai näkökentän osa, esim. okulaariruudukko. Laskenta-alueen reunalla olevat solut huomioidaan SFS-EN 15204 (2006) standardin mukaisesti (**Kuva 3**).

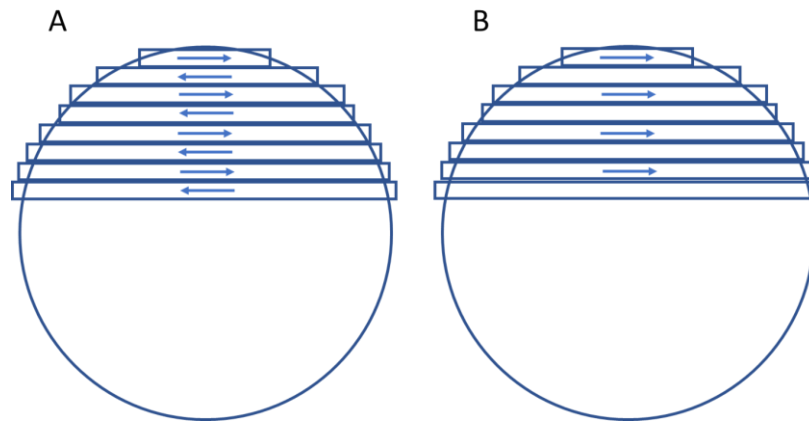


Kuva 3. Ohje okulaariruudukon (A) ja näkökentän (B) reuna-alueella olevien laskentayksiköiden laskentaan. Katso myös **Kuva 7**, jossa ohjeistetaan yhdyskuntien, soluketjujen ja kenobioiden laskentaa okulaariruudukon alueelta. Samaa laskentatapaa voi soveltaa myös ko. laskentayksiköiden laskentaan laskettaessa näkökenttiä. kuva Soluja ja kenobioita koskevat ohjeet vasemmanpuoleisessa kuvassa, rihmoja, ketjuja ja yhdyskuntia koskevat ohjeet oikeanpuoleisessa kuvassa. Valkoiset laskentayksiköt = lasketaan, harmaat vastaavat = ei lasketa. Muokattu CEN 15204:2006 standardin kuvasta 2 sivu 14.

Okulaariruudukkoa käytettäessä laskennassa noudatetaan **Kuvan 7** mukaista ohjetta. Yksittäiset laskentayksiköt lasketaan vain esim. oikeanpuoleisen ja alareunan osuudelta, silloin kun ne rajoittuvat vain osittain ruudukon alueelle. Rihmoista, ketjuista ja kolonioista huomioidaan laskennassa kaikilta reunoilta kaikki ne osat, jotka jäävät ruudukon sisäpuolelle.



Kuva 4. Järvinäytteiden osalta laskeutuskammion kaistalta tapahtuvassa laskennassa levät voidaan laskea esim. näkökenttien helminauhalla (A) tai yhtenäiseltä kaistalta (B), jolloin näkökenttää siirretään "liu'uttamalla".



Kuva 5. Pienimmällä suurennuksella laskeutuskammion pohjapinta-alan laskenta voidaan tehdä koko pinta-alalta (A) joko vaakasuoraan tai pystysuoraan vierekkäisiltä kaistoilta. Jos laskenta-alue on puolet kammion pohjapinta-alasta (B), lasketaan joka toinen kaista.

Laskennan aikana näkökenttien tai okulaariruudukoiden sijainti laskeutuskammion pinnalta valitaan satunnaisesti nostamalla katse pois okulaareista uuteen kohtaan siirryttäessä, mutta kuitenkin siten että edetään esim. pitkin ristikkäisiä halkaisijoita aina ylhäältä alas ja vasemmasta reunasta oikeaan reunaan (**Kuva 5**). Näkökenttä tai okulaariruudukon aluetta on siirrettävä niin, että peräkkäiset näkökentät tai ruudukot eivät osu päällekkäin. Laskenta koko laskeutuskammion pohjapinta-alalta tai puolelta pohjapinta-alasta tehdään **Kuvan 5** mukaisesti.

Jokaisella kolmella suurennuksella pyritään laskemaan vähintään 400 laskentayksikköä, vaikka se ei aina toteudu jokaisella suurennuksella. Erittäin runsaana esiintyvän laskentayksikön laskenta voidaan lopettaa (EnvPhytossa: Freeze), kun vähintään 50 laskentayksikköä on laskettu, mutta silloin pitää huomioida, että laskentapinta-alan pitää olla riittävän suuri ja suurennuksen kokonaislaskentayksikkömäärän pitää ylittää 400 laskentayksikköä.

3.3.3.5. Määrittystarkkuus

Näytteistä lasketaan auto- ja mikсотrofiset planktonlevät ja sinilevät (syanobakteerit). Näytteistä ei lasketa $<2 \mu\text{m}$ -kokoisia yksittäisiä esiintyviä pikoplanktonsoluja, koska käytettävä menetelmä ei sovellu autotrofisen pikoplanktonin erottamiseen heterotrofisista bakteereista. Yhdyskuntina esiintyvät, solukooltaan $<2\mu\text{m}$ -kokoiset taksonit kuitenkin lasketaan.

Havaitut solut määritetään mahdollisimman tarkasti laji-, suku-, laho- tai luokkatasolle käyttäen suurennusta ja valaistusta (esim. faasikontrasti, interferenssikontrasti tai kirkaskenttä), jossa tuntomerkit ovat parhaiten nähtävissä. Mikäli määrittämiseen tarvittavat tuntomerkit ovat näkyvissä, solu on mahdollista määrittää myös alalaji-, muunnos- (var.) tai muoto- (f.) tasolle. Mahdollisimman tarkkaa taksonomista määrittämistä noudatetaan myös siinä tapauksessa, vaikka mittojen perusteella sopivampi kokoluokka löytyisi vasta vähemmän tarkalta määrittämistasolta. Eli jos esimerkiksi sukutasolta löytyisi järvilajilistalta mittojensa puolesta sopivampi kokoluokka, käytetään silti lajitason tasoa aina, jos laskentayksikkö on mahdollista määrittää tuntomerkkiensä perusteella lajitason tasolle saakka (sillä järvilajilista ei aina kata kaikkia kirjallisuuden perusteella mahdollisia taksonikohtaisia kokovaihteluita).

Epäselvässä tapauksessa EnvPhyto-ohjelmassa tulee käyttää taksonin kohdalla cf.-merkintää (confer=vertaa). Epävarmat lajimääritykset voi myöhemmin korjata sukutason tai korkeamman tason määrittämisiksi. Sukutason tai korkeamman tason määrittämisä ei voi tarkentaa yleensä enää jälkikäteen. Mikäli vaikeasti määritettävää taksonia esiintyy paljon näytteessä, on suositeltavaa ottaa valokuva tai video taksonista tai vaihtoehtoisesti säilyttää näyte mahdollista myöhempää lajintunnistuksen tarkentamista varten.

Mikäli tarkempaan lajinmääritykseen tarvittavat tuntomerkit puuttuvat, laskentayksikön tunnistus tehdään vain solun muodon ja koon perusteella (esim. Flagellate, Unicell/Monad). Autotrofisten ja heterotrofisten flagellaattien erottaminen valomikroskoopilla voi olla vaikeaa. Epäselvässä tapauksissa tunnistamaton flagellaatti laitetaan mieluummin heterotrofiseksi kuin autotrofiseksi.

Litoraalilajit: Ranta-alueella esiintyviä litoraali-/päälylslevästön lajeja kuten esim. *Mougeotia*, *Ulothrix*, *Nostoc* ja *Surirella* ei lasketa, mutta näytteen lisätietoihin kirjataan lajeja koskevat havainnot, koska niiden määrä saattaa vaikuttaa mm. samaan aikaan otetun a-klorofylli-näytteen tulokseen. Litoraalitaksonien lähdeoksena voidaan käyttää mm. John & al. 2002 (toim.). Jos on epäselvää, onko kyseessä litoraalilaji, on parempi varmuuden vuoksi laskea taksoni.

3.3.2.6. Eri laskentayksiköiden laskeminen

Sisävesien kasviplanktonnäytteiden analyysin voi aloittaa joko pienimmällä tai suurimmalla suurennuksella. Laskenta voidaan tehdä joko näkökentän tai okulaariruudukon alueelta. Laskettujen näkökenttien ja okulaariruudukoiden lukumäärä suositellaan valittavaksi siten, että laskeutetulle tilavuudelle ja käytetylle suurennukselle laskettu muuntokerroin on lähellä **Taulukossa 2** esitettyjä muuntokertoimia.

Laskentayksiköt (esim. solut, soluryhmät tai yhdyskunnat) mitataan, määritetään ja lasketaan mahdollisimman tarkkaan käyttäen kolmea suurennusta (Oirik ym. 1998, HELCOM 2021). Näytteessä olevien solujen kokoa arvioitaessa käytetään mittaokulaaria, joka on kalibroitu objektimikrometrin avulla. Havaitut laskentayksiköt määritetään laji-, suku-, laho- tai luokkatasolle sillä suurennuksella ja valaistuksella (vaihevastakohta, differentiaali-interferenssikontrasti tai kirkaskenttä), jossa lajituntomerkit ovat parhaiten nähtävissä. Mikäli määrittämiseen tarvittavat tuntomerkit ovat näkyvissä, laskentayksikkö on mahdollista määrittää myös alalaji-, muunnos- (var.) tai muoto- (f.) tasolle. Mikäli lajintunnistukseen tarvittavat tuntomerkit puuttuvat, laskentayksikön tunnistus tehdään vain solun muodon ja koon perusteella (esim. Flagellate, Unicell).

Laskentayksikköjä ovat itsenäisesti laskettavat yksittäiset solut, yhdyskunnat tai rihmat (esim. 100 µm:n rihmanpätkä). Laskenta tehdään soluittain aina, kun se on mahdollista. Samassa näytteessä voi samalla taksonilla (esim. laji, suku, laho tai luokka) olla erilaisia laskentayksiköitä, esim. monisolainen *Synura*-yhdyskunta ja irrallisena esiintyvä *Synura*-solu ovat kumpikin yksi

laskentayksikkö (**Luku 3.3.1**). Valtaosalla taksoneita kokovaihtelu on niin suurta, että laskentayksiköllä on useita eri kokoluokkia.

Suurimmalla >400x (788-1000x) suurennuksella lasketaan alle 20 µm:n solut ja useimmat pienisoluiset yhdyskunnat (**Taulukko 3**) määritetään ja lasketaan 788-1000x suurennuksella 50-100 näkökentältä, jotka on valittu satunnaisesti laskeutuskammion pohjalevyn ristikkäisiltä halkaisijoilta (**Kuva 4**). Laskennan voi lopettaa, kun laskentayksiköt on laskettu vähintään 50 näkökentän alalta ja laskentayksiköitä (solut, yhdyskunnat ja rihmat) on vähintään 400 kpl ja laskeutetulle tilavuudelle määritetty tavoitemuuntokerroin on saavutettu (**Taulukko 2**). Mikäli laskenta tehdään okulaariruudukon alueelta, laskettavien ruudukkojen lukumäärä valitaan siten, että laskeutetulla tilavuudella käytetyn suurennuksen muuntokerroin on lähellä **Taulukossa 2** esitettyä tavoitemuuntokerrointa.

Suurennuksella 200-250x lasketaan >20 µm laskentayksiköt laskeutuskammion pohjalevyn ristikkäishalkaisijoilta sekä tarvittaessa muilta satunnaisesti valituilta 50-75 näkökentältä (mikroskoopista riippuen). Erilaisille laskeutetuille tilavuuksille suositellut muuntokertoimet on esitetty **Taulukossa 2**.

Näkökentittäin laskettaessa (suurennukset 788-1000x ja 200-250x) osittain näkökentässä näkyvät taksonit huomioidaan laskennassa vain näkökentän pystyhalkaisijan toiselta puolelta. Runsaana esiintyvän lajin laskenta voidaan lopettaa, kun kyseistä levää on laskettu 50 laskentayksikköä vähintään 20 näkökentältä. Tällöin ko. lajin laskenta voidaan jäädyttää (Freeze) EnvPhyto-ohjelmassa.

Koko laskeutuskammion pohjalta lasketaan 125x suurennuksella aikaisemmin havaitsemattomat suuret ja harvalukuiset, tällä suurennuksella helposti tunnistettavat laskentayksiköt.

3.4.3 Itämeren rannikko- ja avomerinäytteiden analysointi

Merenhoidon seurantaohjelman kasviplanktonnäytteiden mikroskooppinen analyysi tulee suorittaa noudattaen huolellisesti alla olevia ohjeita. Ohjeet pohjautuvat CEN-standardeihin (SFS-EN 15204 (2006) ja SFS-EN 16695 (2015)) ja HELCOM COMBINE -seurannan (HELCOM 2021) ohjeisiin, Lehtinen ym. (2019) -ohjeisiin ja SYKE:n sisäisessä käytössä olevan laatukäsikirjan ohjeisiin.

3.4.3.1 Merilajilista

Merinäytteiden tulokset tallennetaan ympäristöhallinnon Hertta-tietokantaan noudattaen Hertassa voimassa olevaa **Meri (HELCOM) -laji- ja biovolyymlistaa**. Voimassa oleva Meri (HELCOM) -lista löytyy Hertta-tietokannan lisäksi myös EnvPhyto-laskentaohjelmasta, jonka SYKE tarjoaa maksutta myös seurantanäytteitä mikroskopoivien konsulttien käyttöön. Tulokset voi tallentaa suoraan EnvPhyto-laskentaohjelmasta Hertta-tietokantaan.

Hertta-tietokannan ja EnvPhyto-laskentaohjelman Meri (HELCOM) -lista seuraa HELCOM Phytoplankton Expert Group (EG PHYTO, ent. PEG) -kasviplanktonasiantuntijaryhmän laji- ja biovolyymitaulukkoa, joka päivitetään kerran vuodessa. Käytännön syistä EnvPhyto-

laskentaohjelmassa ja Hertta-tietokannassa oleva Meri (HELCOM) -lista voi olla hieman jäljessä EG PHYTO -kasviplanktonasiantuntijaryhmän laji- ja biovolyymitaulukon viimeisimmästä versiosta, koska EG PHYTO -ryhmä päivittää listan ensin ja vasta sen jälkeen Syken asiantuntijat voivat päivittää Hertan (ja automaattisesti samalla EnvPhyton) Meri (HELCOM) -listan. Tästä ei kuitenkaan ole EnvPhyto-laskentaohjelmaa käyttäville konsulteille tai sieltä Hertta-tietokantaan siirrettäville tuloksille haittaa, sillä laskentatulokset päivittyvät Hertassa automaattisesti uuden version mukaisiksi sitä mukaa kun lista saadaan päivitettyä Syken asiantuntijoiden toimesta.

3.4.3.2 Laskeutetun näytteen alkutarkastelu

Näyte laskeutetaan laskeutuskammioon **Luvun 3.3** ohjeiden mukaisesti. Tiskiainetta ei lisätä merinäytteisiin. Ennen analyysin aloittamista laskeutetun näytteen solutiheyttä ja solujen jakautumista tarkastellaan käänteismikroskoopilla laskeutuskammiolta (**Luku 3.3.1**). Jos näyte on liian harva tai tiheä, tai jos solut ovat epätasaisesti jakautuneet esimerkiksi pääosin laskeutuskammion toiselle puoliskolle, keskelle tai reunoille, solut muodostavat harjannemaisia kasaumia, rihmat osoittavat kaikki samaan suuntaan, tai näytteessä on ilmakuplia, näyte hylätään ja laskeutetaan uusi näyte.

Solutiheyden sopivuutta arvioitaessa huomioidaan, että jokaisella kolmella merinäytteiden analysointiin käytettävällä suurennuksella (noin 125x, 250x ja 500x) pyritään saamaan laskettua vähintään 400 yksikköä, mutta laskentaa ei kuitenkaan lopeteta vaikka 400 laskentayksikön ylittyisi. Analysointi suoritetaan aina vain yhdestä laskeutetusta näytteestä kaikilla analyysiin kuuluvilla kolmella eri suurennuksella. Käytännössä vähintään 400 yksikön laskenta kaikilla kolmella suurennuksella ei ole aina mahdollista, koska erikokoisten solujen lukumäärä näytteessä voi vaihdella huomattavasti. Esimerkiksi Itämeren kevätnäytteissä isokokoisten solujen lukumäärä voi olla hyvin suuri. Tällöin laskeutettava näytemäärä on valittava siten, että runsaiden kevätlajien laskenta onnistuu, vaikka tällöin pienikokoisten solujen määrä saattaakin jäädä alle 400 yksikköön.

Alkutarkastelussa on syytä kiinnittää huomiota myös siihen, onko joku kokoluokka erittäin runsas, koska se voi vaikuttaa siihen, miten okulaariruudukoiden sijainti kannattaa valita laskeutuskammion pohjalta analyysin alkuvaiheessa.

3.4.3.3 Käytettävät suurennukset, laskenta-alueet ja kokoluokat

Alkutarkastelun jälkeen merinäytteen analyysi aloitetaan pienimmällä suurennuksella (IOC 2010). Merinäytteiden analyysissä käytetään **noin 125x, 205x sekä 500x suurennuksia, joilla kaikilla analysoidaan 60 okulaariruudukkoa** (10x10 ruutua, "Square" Hertassa). Mikäli käytössä on erilainen laitteisto (ml. mikroskooppi), on mikroskopoijan tarvittaessa lisättävä analysoitavien okulaariruudukoiden lukumäärää niin, että muuntokertoimet eivät juuri poikkea **Taulukossa 4** esitetyistä kertoimista ainakaan ylöspäin.

Taulukko 4. Suositeltavat muuntokertoimet, jolla merinäytteen laskentatulokset muunnetaan tulokseksi yksikköä/litra. Esimerkissä Sykessä merinäytteiden analyysikäytössä oleva mikroskooppi Leitz DM IRB, okulaarit Leica L PLAN 12,5x/16, objektiivit N PLAN 10x/0,22 PH1, PL APO 20x/0,60 PH2, PL APO 40x/0,75 PH2. Muuntokertoimeen vaikuttaa laskeutettu näytemäärä ja analysoitu ala. Laskeutettu näytemäärä on sopiva, kun kaikilla kolmella suurennuksella arvioidaan mahdolliseksi saada 400 yksikköä lasketuksi (aina se ei ole mahdollista kaikilla kolmella suurennuksella).

Laskeutettu näytemäärä (ml)	Objektiivi	Kokonaissuurennus	Laskenta-alueiden lkm	Laskettu pinta-ala (mm ²)	Muuntokerroin
50	40x	500	60	3,75	2832
50	20x	250	60	15	708
50	10x	125	60	60	177
25	40x	500	60	3,75	5663
25	20x	250	60	15	1416
25	10x	125	60	60	354
10	40x	500	60	3,75	14158
10	20x	250	60	15	3540
10	10x	125	60	60	885

Analyysi aloitetaan käänteismikroskoopin noin 125x suurennuksella, jolla lasketaan 60 okulaariruudun alueelta isokokoiset (>30 µm) solut ja mm. leveämmät rihmamaiset sinilevät (**Taulukko 5**). Seuraavaksi lasketaan noin 20-30 µm solut 60 okulaariruudun alalta noin 250x suurennuksella ja lopuksi <20 µm solut 60 ruudun alalta noin 500x suurennuksella (**Taulukko 5**).

Laskennan aikana okulaariruudukoiden sijainti laskeutuskammion pohjalta valitaan satunnaisesti nostamalla katse pois okulaareista uuteen kohtaan siirryttäessä, mutta kuitenkin siten että edetään suorilla 'raitojen' pitkin esim. aina ylhäältä alas vasemmasta reunasta oikeaan reunaan (**Kuva 6**, ks. myös **Luku 3.4.3.7**).



Kuva 6. Kyvetin pohja käydään läpi etenemällä pystysuoria "raitoja" pitkin.

Näytteessä olevien solujen kokoa arvioidessa käytetään okulaarissa olevaa mittaokulaaria, joka on kalibroitu objektimikrometrin avulla (**Luku 3.2.2**). Mittaokulaarin asteikkovälejä vastaavien µm-mittojen tulee olla mikroskooppiin kiinnitettyinä kaikille analyysissä käytettäville kolmelle eri kokonaissuurennukselle, jotta niitä voidaan katsoa helposti laskennan aikana. Taksonin kokoluokan valinta (**Luku 3.4.3.5**) vaikuttaa siihen, millä suurennuksella se lasketaan. Näytteiden keskinäisen vertailukelpoisuuden takaamiseksi **sama kokoluokka pyritään laskemaan aina**

samalla suurennuksella, riippumatta siitä, onko kyseinen kokoluokka poikkeuksellisen runsas tai harvalukuinen kyseisessä näytteessä. Syken kasviplanktonasiantuntijoilta saa pyytämällä tarkemman Excel-listan, jossa on merilajilistalla oleville taksonien kokoluokille käytettävät suurennokset. Merinäytteistä kaikki **yhdyskunnat lasketaan käyttäen vain maksimissaan 20 solun kokoluokkia**. Syy tähän on se, että suurien solumäärien, esim. 100 solun yhdyskunnan käyttäminen saattaa johtaa helpommin epätarkkuuteen tai virhearviointeihin. Pienempiä kuin 20 solun kokoluokkia voi käyttää.

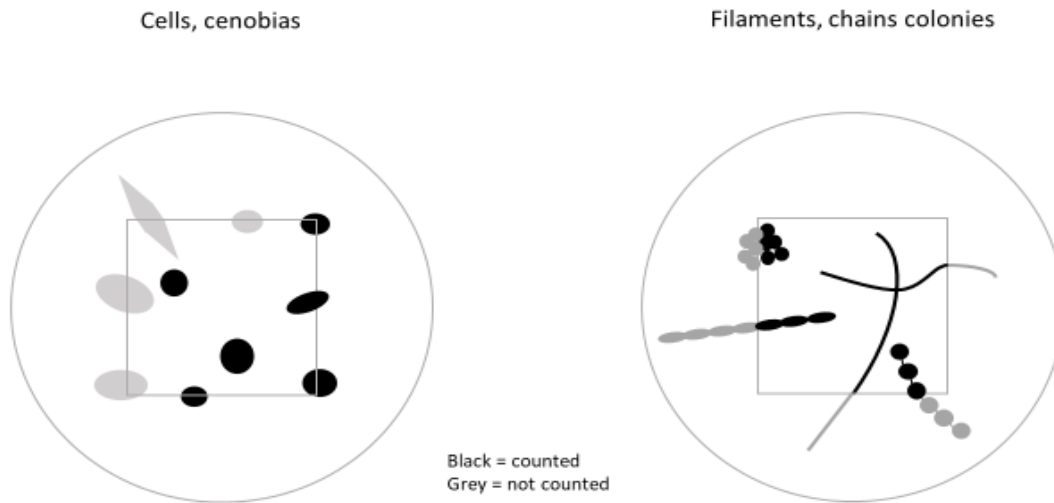
Taulukko 5. Esimerkkejä taksoneista, jotka lasketaan joko noin 125x, noin 250x tai noin 500x suurennuksilla Itämeren rannikko- ja avomerinäytteistä. Sykessä on laadittu Excel-tilukko, johon on kirjattu millä suurennuksella lasketaan mikäkin merilajilistan kokoluokka. Tämän taulukon saa pyytämällä Syken meripuolen kasviplanktonasiantuntijoilta.

Suurennus	Kyseisellä suurennuksella lasketaan yleensä esim.
noin 125x	<ul style="list-style-type: none"> ● Isokokoiset, >30 µm solut ● Leveämmät rihmamaiset sinilevät kuten <i>Aphanizomenon</i>, ● <i>Nodularia</i>, <i>Dolichospermum</i>
noin 250x	<ul style="list-style-type: none"> ● Keskikokoiset, noin 20-30 µm solut ● Kapeammat rihmamaiset sinilevät kuten <i>Pseudanabaena</i>, kapeat <i>Oscillatoriales</i> spp. ● Suurisoluiset yhdyskuntia muodostavat sinilevät kuten <i>Woronichinia</i>, <i>Microcystis</i> ● Ketjuja tai rihmoja muodostavat pienisoluisetkin piilevät kuten <i>Skeletonema</i>
noin 500x	<ul style="list-style-type: none"> ● Pienikokoiset, < 20 µm solut ● Pienisoluiset yhdyskuntia muodostavat sinilevät kuten <i>Aphanocapsa</i>, <i>Lemmermanniella</i>

3.4.3.4 Okulaariduudukon reunoilla olevien laskentayksiköiden laskeminen

Yksittäin laskettavien solujen ja kenobioiden osalta lasketaan kaikki kokonaan okulaariduudukon sisälle jäävät solut/kenobiat sekä reunoille osuvista soluista/kenobioista vain kahdelle okulaariduudukon reunalle osuvat, esimerkiksi okulaariduudukon oikeanpuolisen ja alareunan ylittävät solut (**Kuva 7**, vasemmanpuoleinen). Rihmoista, ketjuista ja yhdyskunnista huomioidaan laskennassa vain kaikki ne solut, jotka jäävät okulaariduudukon sisäpuolelle, mutta ei minkään reunan ylittäviä soluja (**Kuva 7**, oikeanpuoleinen). Yksittäinen yhdyskunnan, ketjun tai rihman

solu, joka sijaitsee okulaariruudun reunalla, lasketaan tai jätetään laskematta samojen sääntöjen mukaan kuin solut ja kenobiat (**Kuva 7**, vasemmanpuoleinen).



Kuva 7. Ohje okulaariruudun reuna-alueella olevien solujen, kenobioiden, rihmojen, ketjujen ja yhdyskuntien laskentaan. Soluja ja kenobioita koskevat ohjeet vasemmanpuoleisessa kuvassa, rihmoja, ketjuja ja yhdyskuntia koskevat ohjeet oikeanpuoleisessa kuvassa. Mustat solut, kenobiat ja rihmojen, ketjujen tai yhdyskuntien osat = lasketaan, harmaat vastaavat = ei lasketa. Muokattu teoksesta HELCOM (2021).

3.4.3.5 Määrittystarkkuus

Näytteistä lasketaan auto- ja miksotrofiset planktonlevät, sinilevät, heterotrofiset panssarisimalevät ja flagellaatit sekä endosymbionttisia nieluleviä sisältävä miksotrofinen *Mesodinium rubrum* -ripsieläin. Näytteistä ei lasketa <math><2\ \mu\text{m}</math>-kokoisia yksittäin esiintyviä pikoplanktonsoluja, koska käytettävä menetelmä ei sovellu autotrofisen pikoplanktonin erottamiseen heterotrofisista bakteereista. Yhdyskuntina esiintyvät, solukooltaan <math><2\ \mu\text{m}</math>-kokoiset taksonit kuitenkin lasketaan.

Havaitut solut määritetään mahdollisimman tarkasti laji-, suku-, laho- tai luokkatasolle sillä suurennuksella ja valaistuksella (faasikontrasti tai kirkaskenttä), jossa tuntomerkit ovat parhaiten nähtävissä. Mikäli määrittämiseen tarvittavat tuntomerkit ovat näkyvissä, solu on mahdollista määrittää myös alalaji-, muunnos- (var.) tai muoto- (f.) tasolle. **Mahdollisimman tarkkaa taksonomista määrittämistä noudatetaan myös siinä tapauksessa, vaikka mittojen perusteella sopivampi kokoluokka löytyisi vasta vähemmän tarkalta määrittämisalalta.** Eli jos esimerkiksi sukutasolta löytyisi mittojensa puolesta sopivampi kokoluokka Meri (HELCOM) -listalta, käytetään silti lajitasona aina, jos laskentayksikkö on mahdollista määrittää tuntomerkkiensä

perusteella lajitasolle saakka (sillä Meri (HELCOM) -lista ei aina kata kaikkia kirjallisuuden perusteella mahdollisia taksonikohtaisia kokovaihteluita).

Epäselvässä tapauksessa on parempi määrittää taksoni esim. suku- tai lahkotasolle kuin virheellisesti esim. lajitasolle. Mikäli määrittäminen on suhteellisen varma, mutta solun kaikki tuntomerkit eivät täysin täsmää kirjallisuudessa annettujen kanssa, EnvPhyto-ohjelmassa voidaan käyttää kaikkien eri määrittämissuoritysten kohdalla merkintää cf. Mikäli vaikeasti määritettävää taksonia esiintyy paljon näytteessä, on suositeltavaa ottaa kohteesta valokuva tai video ja keskustella lajintunnistuksesta muun muassa Syken asiantuntijoiden kanssa. Lisäksi näytteen voi säilyttää mahdollista myöhempää lajintunnistuksen tarkentamista varten.

Mikäli tarkempaan määrittämiseen tarvittavat tuntomerkit puuttuvat, laskentayksikön tunnistus tehdään vain solun muodon ja koon perusteella (esim. Flagellate, Unicell). Autotrofisten ja heterotrofisten flagellaattien erottaminen valomikroskoopilla voi olla vaikeaa. **Epäselvissä tapauksissa tarkemmin tunnistamaton flagellaatti laitetaan mieluummin heterotrofiseksi kuin autotrofiseksi.**

Litoraalilajit

Selkeät litoraalilajit kuten esim. *Mougeotia* jätetään laskematta, mutta näytteen lisätietoihin kirjoitetaan näitä lajeja koskevat havainnot, koska niiden määrä saattaa vaikuttaa mm. samaan aikaan otetun a-klorofylli-näytteen tulokseen. **Litoraalitaksonien lähdeoteoksena tulee hyödyntää teosta G. Hällfors (2004).** Teoksessa pääsääntöisesti litoraalissa esiintyvät taksonit on merkitty l-kirjaimella ilman sulkua. Jos l-kirjain on sulkujen sisällä, tulee taksoni laskea. Esim. *Diatoma tenuis* -laji on merkitty "(l)", ja se tulee laskea. **Jos jää epäselväksi, onko kyseessä litoraalilaji, on parempi varmuuden vuoksi laskea solu.**

3.4.3.6 Erittäin harvasoluisen näytteen laskeminen

Okulaariruudukoita lasketaan aina 60 kaikilla kolmella eri suurennuksella. Enimmäislaskeutusmäärä myös harvalle näytteelle on 50 ml. Okulaariruudukoiden lukumäärää ei siis tarvitse lisätä, vaikka näyte olisi harva enimmäislaskeutusmäärälläkin. Tässä voi kuitenkin poikkeustapauksissa joustaa tarpeen mukaan.

3.4.3.7 Erittäin runsaana esiintyvän kokoluokan laskeminen

Kaikki laskennassa esiin tulevat kokoluokat pyritään laskemaan 60 okulaariruudukon alueelta. Erittäin runsaan kokoluokan laskemisen voi kuitenkin lopettaa silloin, kun kyseistä **kokoluokkaa on laskettu vähintään 50 kappaletta ja vähintään 10 okulaariruudukon alueelta.** Laskenta-alueen on oltava edustava otos koko laskeutuskammion pohjan pinta-alasta, eli laskenta-alue kyseisen kokoluokan osalta ei saa keskittyä vain esim. laskeutuskammion toiseen reunaan. Hyvin runsaan kokoluokan ollessa kyseessä mikroskopoija ei siis voi edetä **Kuvan 6** mukaisesti vaan okulaariruudukot pitää tässä tapauksessa valita tasaisesti eri osista laskeutuskammiota kunnes erittäin runsaana esiintyvä kokoluokka on laskettu riittävän suurelta alalta (tämän jälkeen

laskentaa voidaan jatkaa normaalisti **Kuvan 6** mukaisesti). Eri kokoluokkien runsauteen on siis syytä kiinnittää huomiota jo näytteen alkutarkasteluvaiheessa (**Luku 3.4.3.2**).

Kokoluokat ovat erillisiä laskennan yksikköjä, vaikka ne voivat edustaa samaa taksoniakin (**Luku 3.4.1**). Mikäli taksonin jokin kokoluokka on hyvin runsas ja sen laskenta voidaan sen vuoksi lopettaa kesken analyysin, **ei saman taksonien muiden kokoluokkien laskemista voi kuitenkaan samalla lopettaa**.

Ketjuissa, yhdyskunnissa tai rihmoissa esiintyvien kokoluokkien (esim. eräät piilevät ja sinilevät) osalta pitää huomioida se, että esim. yhdyskunnassa olevien *Chaetoceros*-solujen tai 100 µm *Nodularia*-rihmojen laskennan voi lopettaa vasta sitten, kun **ketjuja/yhdyskuntia/rihmoja on tullut vastaan vähintään 50 kappaletta** (tällöin laskettujen kokoluokan yksikköjen määrä on paljon suurempi kuin 50, koska kokoluokan yksikköjä on yhdessä ketjussa/yhdyskunnassa/rihmassa useita). Koska EnvPhyto-laskentaohjelma ei pidä lukua ketjuista/kolonioista/rihmoista, tulee mikroskopioijan itse laskea ne tai arvioida kokoluokan yksiköiden maksimimäärä ketjua/koloniala/rihmaa kohden. Esim. jos *Nodularia*-rihmat olisivat näytteessä keskimäärin 600 µm pitkiä (laskentayksikkö 100 µm rihma), tulee kokoluokan yksikköjä laskea vähintään 6 kertaa 50 eli 300 kappaletta ennen kuin kyseisen *Nodularia*-kokoluokan laskemisen voi lopettaa. Esim. runsassoluisissa ketjuissa esiintyvien kevtälajien, kuten *Pauliella taeniata* –piilevien osalta kokoluokan laskettujen yksiköiden määrä voi nousta tuhansiin, ennen kuin kokoluokan laskemisen voi lopettaa.

Yksi vaihtoehto on laskea erittäin runsaana esiintyvä kokoluokka siten, että laskentaan käytetään 60 okulaariruudukon (10x10 eli 100 ruutua) sijaan 60 okulaariruudukon riviä (1x10 eli 10 ruutua). Muut samalla suurennuksella laskettavat kokoluokat lasketaan normaalisti koko okulaariruudukon (10x10 ruutua) alalta. EnvPhyto-laskentaohjelmassa on mahdollista valita samalle suurennukselle laskenta-alueeksi (Counting area) sekä koko ruudukko (Square) että 10 ruutua (Square/10).

3.5 Tulosten tarkistaminen ja tallentaminen ympäristöhallinnon Hertta-tietokantaan

Mikroskopioija tarkistaa tuloksen huolellisesti (mieluiten paperitulosteesta) heti analysoinnin jälkeen, ja tallentaa tuloksen Hertta-tietokantaan avoimesti saataville vasta tämän jälkeen. Mikäli mikroskopioija käyttää Syken tarjoamaa EnvPhyto-laskentaohjelmaa, hän pystyy tallentamaan tarkistamansa tulokset suoraan EnvPhytosta Herttaan. Tarkistamisvaihe on hyvin tärkeä suorittaa erittäin huolellisesti, sillä kasviplanktonyhteisöjen koostumuksessa luonnollisesti esiintyvän suuren vaihtelun vuoksi jälkikäteen tehtävä tarkistaminen on usein hyvin vaikeaa.

Mikäli tuloksista on mahdollisuus ottaa paperituloste, se suositellaan säilyttämään vähintään kolmen vuoden ajan.

3.6 Analysoitujen näytteiden säilyttäminen ja hävittäminen

Analysoidut näytteet on suositeltavaa säilyttää mahdollisia varmistuksia tai uudelleen analysointia varten kolme vuotta pimeässä jääkaappilämpötilassa (noin +4 - +10°C). Aina tämä ei ole mahdollista, joten asiasta voidaan sopia työn tilanteen ELY-keskuksen ja mikroskopoijan välillä tapauskohtaisesti.

Näytteet hävitetään huuhtomalla ne viemäriin runsaan veden kera laboratorion vetokaapissa tai hyvin ilmastoidussa tilassa. Käytetään suojakäsineitä, suojalaseja ja laboratoriotakkia.

4 Kirjallisuusviitteet

- European Commission 2000. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. Official Journal of the European Communities L 327: 1-72. (22.12.2000)
- European Commission 2008. Directive Euroopan Parlamentin ja Neuvoston direktiivi 2008/56/EY, annettu 17 päivänä kesäkuuta 2008, yhteisön meriympäristöpolitiikan puitteista (meristrategiadirektiivi) (ETA:n kannalta merkityksellinen teksti). *Virallinen lehti nro L 164, 25/06/2008, s. 0019 - 0040*
- HELCOM 2021. Guidelines concerning phytoplankton species composition, abundance and biomass. Updated November 2021. Manual for Marine Monitoring in the COMBINE Programme of HELCOM .Part C, Annex 6. (päivitetty 11.2021).
<https://helcom.fi/wp-content/uploads/2020/01/HELCOM-Guidelines-for-monitoring-of-phytoplankton-species-composition-abundance-and-biomass.pdf>(11.3.2022)
- Hällfors, G. 2004: Checklist of Baltic Sea phytoplankton species (including some heterotrophic protists). – Baltic Sea Environment Proceedings 95:1–208. <https://www.helcom.fi/wp-content/uploads/2019/10/BSEP95.pdf>
- IOC 2010. Intergovernmental Oceanographic Commission of © UNESCO. 2010. Karlson, B., Cusack, C., Bresnan, E. (eds.). Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis. IOC Manuals and guides, no. 55. 110 s. Paris, UNESCO. <http://unesdoc.unesco.org/images/0018/001878/187824e.pdf>
- John, D.M., Whitton, B.A., & Brook, A.J. (eds.) 2021: The freshwater algal flora of the British Isles. an identification guide to freshwater and terrestrial algae. – Cambridge University Press, 2nd ed. 878 pp.
- Järvinen, M., Forsström, L., Huttunen, M., Hällfors, S., Jokipii, R., Niemelä, M. & Palomäki, A. (toim.) 2011. Kasviplanktonin laskentamenetelmät (23.9.2011). <http://www.ymparisto.fi/download/noname/%7BAC2A0126-44F3-4419-8590-F7A5B0100ACD%7D/29255>.
- Järvinen, M., Aroviita, J., Hellsten, S., Karjalainen, S.M., Kuoppala, M., Mykrä, H., & Mitikka, S. 2022. Jokien ja järvien biologinen seuranta – Näytteenotosta tiedon tallentamiseen. (18.5.2022). https://www.ymparisto.fi/download/XN3103_Sisavesien_biologinen_seuranta_ohjeistus_tarkistettu_18052022pdf/%7BB948034F-7F9D-4EAB-A153-92FA2DDEDBBE%7D/29725
- Lehtinen, S., Hällfors, H., Oja, J., Ahlman, M., Heikkinen, M., Lax, H.-G., Puro-Tahvanainen, A., Suomela, J., Teppo, A., Törrönen, J. 2019 Meren kasviplanktonseuranta. Menetelmäohje ELY-keskusten käyttöön. 26.9.2019. Suora linkki (28.4.2020): <https://www.ymparisto.fi/download/noname/%7B23163E99-79CD-4B59-B4D0-ABB0D8FE2321%7D/141801>
- Olrik, K., Blomqvist, P., Brettum, P., Cronberg, G. & Eloranta, P. 1998. Methods for quantitative assessment of phytoplankton in freshwaters. Part 1. Naturvårdsverket, Stockholm, 86 s.
- Rantajärvi, E., Pitkänen, H., Korpinen, S., Nurmi, M., Ekeboom, J., Liljanieni, P., Cederberg, T., Suomela, J., Paavilainen, P. & Lahtinen, T. (toim.) 2020. Seurantakäsikirja Suomen merenhoitosuunnitelman seurantaohjelmaan vuosille 2020–2026. Suomen ympäristökeskuksen raportteja 47 / 2020. Suomen ympäristökeskus SYKE. Rocha, O. & Duncan, A. 1985. The relationships between cell carbon and cell volume in freshwater algal species used in zooplanktonic studies. *Journal of Plankton Research* 7: 279-294.

- Rott, E., Salmaso, N. & Hoehn, E. 2007. Quality control of Utermöhl-based phytoplankton counting and biovolume estimates - an easy task or a Gordian knot? *Hydrobiologia* 578:141–146 (DOI 10.1007/s10750-006-0440-5)
- SFS-EN 15204 2006. Water quality – Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy (Utermöhl technique). 42 s. (6 liitettä)
- SFS-EN 16695 2015: Water quality - Guidance on the estimation of phytoplankton biovolume. CEN-CENELEC Management Centre: Avenue Marnix 17, B-1000 Brussels. 100 s.
- Utermöhl, H. 1958. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitteilungen Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie* 9: 1-39.

Liite 1: Mikroskooppilaitteisto

Tärkeimmät mikroskoopin kuvanlaatuun vaikuttavat tekijät ovat objektiivit, kondensori ja valaistus. Standardin SFS-EN-15204 (2006) mukaiset mikroskoopin perusvaatimukset on esitetty taulukossa.

Taulukko. Kasviplanktonlaskennassa käytettävän mikroskoopin laitesuosituksiset (SFS-EN 15204 (2006), Annex A).

Ominaisuus	Suositus	Kommentit
Valaistus	50-100 W	
Kondensorin NA	>0,5	
Objektiivit	10x ja/tai 20x (faasi)	Suuret solut, yhdyskunnat ja rihmat
	20x NA >0,5	Suurehkot ja keskikokoiset levät
	40x faasi ja 60x tai 100x Plan Apo (öljy) NA >0,9	Pienikokoiset levät
Okulaarit	10x tai 12,5x	

Objektiivin numeerinen apertuuri (NA) vaikuttaa objektiivin erotuskykyyn. Mitä suurempi on NA, sitä pienempiä yksityiskohtia objektiivilla voidaan erottaa. Kondensorin NA vaikuttaa samalla tavalla kuvan tarkkuuteen. Mitä suurempi on NA, sitä tarkempi on kuva. Käytännössä kasviplankton-mikroskopoinnissa, jossa käytetään laskeutuskammiota, kondensorin NA ei voi olla >0,6, sillä muuten kondensorin etäisyys objektiivista on vain ~11 mm. Käytettäessä objektiivia, jonka NA on suuri (usein >0,9) tulee, objektiivista riippuen, käyttää väliainetta objektiivin ja laskeutuskammion pohjalasin välissä. Yleisin väliaine on öljy. Öljyn etuna on, että sillä on suurempi taitekerroin kuin ilmalla ja tätä kautta se vaikuttaa suurentavasti erotuskykyyn. Lisätietoa mikroskopiasta löytyy mm. internetistä (esim. <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/index.html>).

Kuvan laatuun vaikuttaa myös objektiivin linssien rakenne. Laadukkaimmissa Plan Apo linseissä vääristymät on korjattu. Optisena järjestelmänä käytetään normaalisti faasikontrastia (vaihevastakohtamikroskopia) tai kirkaskenttää. Vaihevastakohtamenetelmällä (faasikontrasti) lisätään kontrastia, mikä helpottaa hentojen solurakenteiden näkymistä, mutta pienten yksityiskohtien erotuskyky ei ole välttämättä suuri. Kirkaskenttää käytettäessä kontrastia on huomattavasti vähemmän, mutta toisaalta suuri NA objektiivissa ja kondensorissa mahdollistaa hyvän (jopa 0,3 μm) erotuskyvyn.

Suosittelava okulaarin suurennus on 10- tai 12,5-kertainen. Tätä isompi okulaarin suurennus ei paranna kuvan tarkkuutta, vaikka itse kuva suurenee. Solujen mittausta varten okulaarissa tulee olla kalibroitu mittajana. Okulaarissa voi olla lisäksi hiusristikko tai ruudukko laskenta-alueen rajausta varten.