



Titel: Benthiske kiselalger – oparbejdning af prøver fra søer og vandløb			
Dokumenttype: Teknisk anvisning	TA. nr.: SV1	Version: 2	Oprettet: 06.11.2020
Forfattere: Liselotte Sander Johansson, Peter Wiberg-Larsen Fagdatacenter for Ferskvand, Institut for Bioscience	Gyldig fra: 06.11.2020		
	Sider: 14 + 13 engelske		
	Sidst ændret: 30.06.2021		
TA henvisninger https://bios.au.dk/forskningraadgivning/fagdatabehandling/ferkvand/	TA S04 Planteundersøgelser TA S18 Prøvetagning af benthiske kiselalger i søer TA V21 Fytobenthos i vandløb		

Indhold

1 Indledning.....	2
2 Metode	3
2.1 Udstyr	3
2.2 Procedure	4
2.2.1 Vigtige generelle bemærkninger	4
2.2.2 Sedimentation	4
2.2.3 Foreløbig undersøgelse	4
2.2.4 Oprensning af prøve.....	4
2.2.5 Fremstilling af præparat.....	6
2.2.6 Optælling af prøver	6
2.2.7 Tælleskema	7
2.3 Vedligeholdelse af instrumenter.....	7
3 Databehandling	8
3.1 Beregninger	8
3.2 Data og koder	8
4 Kvalitetssikring	9
4.1 Kvalitetssikring af metode.....	9
4.2 Kvalitetssikring af data og dataaflevering	9
4.3 Ekstern kontrol	9
5 Referencer	10
6 Bilag.....	11
6.1 Litteratur til artsbestemmelse af benthiske kiselalger.....	11
7 Oversigt over versionsændringer	14

Engelsk oversættelse i slutningen af dette dokument!

1 Indledning

Oparbejdning af prøver af bentiske kiselalger indsamlet i søer og vandløb i henhold til denne anvisning har til formål at beskrive artssammensætningen og den relative forekomst af de enkelte arter i prøven. Resultaterne skal, jfr. vandrammedirektivet, anvendes til beregning af en indekssværdi for de bentiske kiselalger.

Metoden er baseret på DS/EN 13946:2014 "Water Quality – Guidance standard for the routine sampling and pre-treatment of benthic diatoms from rivers" samt retningslinjer fra Gina Henderson, Henderson Ecology, UK og Amelie Jarlman, Jarlman Konsult AB, Lund, Sverige.

Metode til indsamling af prøver af bentiske kiselalger i henholdsvis søer og vandløb beskrives i TA S18 og TA V21 som findes på følgende link:

<https://bios.au.dk/forskningraadgivning/fagdatacentre/ferskvand/>

2 Metode

Alle individer af bentiske kiselalger i prøven skal bestemmes til artsniveau. Hvis dette ikke er muligt, kan der undtagelsesvist bestemmes til en gruppe af arter eller til slægtsniveau (se 2.3.6). Årsagen til krav om dette detaljeniveau er, at indeks bygger på forekomsten af arter og en specifik indikatorværdi for den enkelte art.

De anvendte indsamlingsmetoder (jfr. TA S18 og TA V21) har ikke til formål, og gør det heller ikke muligt, at bestemme tætheden af de bentiske kiselalger.

OBS! Vær opmærksom på, at der anvendes potentielt sundhedsskadelige stoffer og at arbejdet skal foregå under hensyntagen til gældende regler for disse.

2.1 Udstyr

Liste over udstyr

- Vandbad
- Stinkskab
- Kogeplade
- Pincet
- Køkkensigte (maskestørrelse ca. 0,5 mm)
- Glasskål
- Flaske/beholder med låg af samme størrelse som prøvetagningsflasken
- Tragt, der passer til flasken
- Pasteurpipetter og sugbold
- Plastikvials med låg
- Engangspipetter
- Pipette (Finn pipette)
- Metalbakke til tørring af prøver
- Mikroskop (minimum 100x forstørrelse under forudsætning af 10x okkular) med olieimmersionslinse, Nomarski interferens og/eller fasekontrast
- Evt. centrifuge (kapacitet 1200 omdr/min) og centrifugerør i plast
- Evt. prøveglas med låg, 10-15 ml med tilhørende låg, hvis centrifuge ikke anvendes
- Varmefast holder til centrifugerør/prøveglas
- Hydrogenperoxid (H₂O₂) 30 %
- Evt. saltsyre (HCl) 50% - anvendes hvis der findes jernforbindelser i prøven
- Evt. NH₃ (1-2% - anvendes, hvis der er mange lerpartikler i prøven)
- Dækglas
- Objektglas
- Alkohol/opvaskemiddel
- Naphrax ("mounting agent")
- Lugol til genfiksering af prøverest
- Bestemmelseslitteratur – se bilag 6.1

NB! Hvis der vælges en anden oprensningsmetode (se nedenfor) end den her beskrevne, skal udstyrslisten evt. justeres – se DS/EN 13946.

2.2 Procedure

Ud fra de indsamlede prøver produceres mikroskopslides (præparater), som efterfølgende anvendes til identifikation af kiselalgerne og optælling af disse.

2.2.1 Vigtige generelle bemærkninger

Under alle arbejdsgange skal muligheden for kontaminering af prøverne undgås. Glas- og metaludstyr skal derfor rengøres meget grundigt mellem hver prøve. Brug engangsplastikvials med låg og engangspipetter, og kassér dem efter brug. Brug separate pipetter til hver prøve. Læg i videst muligt omfang låg på prøven. Undgå at præparere prøver fra forskellige stationer samtidig. Husk at mærke alle flasker/vials/rør/objektglas m.m. omhyggeligt. Genfiksér og gem altid prøveresten.

2.2.2 Sedimentation

De indsamlede lugol-konserverede prøver kontrolleres for grove planterester eller lignende. Disse fjernes umiddelbart fra prøverne, hvorefter prøven, hvis der fortsat er planterester eller lignende, hældes gennem en køkkensigte (maskestørrelse ca. 0,5 mm) og ned i en beholder, der kan lukkes med et låg. Beholderen lukkes, og prøven hensættes til sedimentation i mindst 48 timer. Supernatanten (dvs. væsken der ligger over det sedimenterede materiale) dekanteres fra, uden at det sedimenterede materiale ophvirvles. Kontrollér, at der ikke er kiselalger i supernatanten. Hvis det alligevel er tilfældet, skal supernatanten hældes tilbage, og processen skal gentages. I stedet for sedimentation kan prøven centrifugeres.

2.2.3 Foreløbig undersøgelse

Efter frahældning af supernatanten hældes prøven i et plastikglas og der fyldes op med ionbyttet/destilleret vand til ca. 3/4 af glassets samlede volumen. Glasset lukkes med et låg og homogeniseres ved omrystning. Et par dråber udtages til foreløbig mikroskopisk undersøgelse, med henblik på at finde den mest hensigtsmæssige fortynding (der skal optælles i alt ca. 400 kiselalgeskaller evt. mere – se afsnit 2.2.5 og 2.2.6). Algetætheden vurderes, og det noteres, hvis der f.eks. er mange tomme eller ødelagte kiselalgeskaller i prøven. NB! Prøveresten skal gemmes ifølge aftale med Miljøstyrelsen, så husk at genfiksere og mærke prøven, når delprøven til bearbejdning er udtaget.

2.2.4 Oprensning af prøve

Prøven rystes igen, og en delprøve på 5 ml overføres til et centrifugerør. Centrifugerøret fyldes med ionbyttet/destilleret vand, og prøven centrifugeres i 4 min ved 1200 omdr./min. Efter centrifugeringen skal der være en synlig mængde materiale tilbage på bunden af røret. Hvis der ikke er tilstrækkeligt materiale, suges supernatanten op fra centrifugerøret, prøven omrøres/omrystes omhyggeligt, der tilsættes yderligere 5 ml prøve til centrifugerøret, hvorefter der centrifugeres igen. Denne proces kan gentages, indtil der er tilstrækkeligt materiale tilbage i centrifugerøret.

Hvis man ikke har en centrifuge til rådighed, kan man lade prøven sedimentere i glastrør i stedet for. I så fald skal hver "centrifugegang" (også hvis det er nødvendigt med flere, som ovenfor beskrevet) erstattes med en sedimentation på 12 timer.

Nedenstående metode til oprensning er velafprøvet og anbefales. De metoder, der er anvist i den seneste udgave (i skrivende stund fra 2014) af DS/EN 13946, kan anvendes i stedet.

1. Placér hvert centrifugerør - indeholdende en delprøve - i en holder og sug så meget af det overliggende vand fra som muligt, indtil der er ca. 5 ml tilbage. For at tjekke for krydskontaminering kan man have centrifugerør uden algeprøve med mellem de faktiske prøver, som behandles og analyseres på samme måde som prøverne.
2. Tilsæt 1-2 dråber 30 % H_2O_2 til hvert prøveglas. Der vil ske en reaktion (brusen), hvorved det organiske materiale opløses og kun skallerne er tilbage. Vent, til reaktionen ophører. Tilsæt yderligere 30% H_2O_2 og gentag, indtil der er ca. 10 ml i røret. Dette kan tage lang tid, hvis reaktionen med H_2O_2 er kraftig, og man kan evt. tilsætte H_2O_2 over flere dage. Et låg kan lægges løst på glassene, alt efter hvor kraftig reaktionen er.
3. Sæt holderen med rørene med løst påsat låg i et vandbad med destilleret vand i 1-2 timer (eller natten over) ved 80°C. Undgå at prøverne (og vandbadet) tørrer ud
4. Tag prøverne op af varmebadet, og lad dem køle af.
5. Hvis der stadig er organisk materiale tilbage, centrifugeres/sedimenteres prøverne igen, og proceduren med H_2O_2 gentages. Dvs. efter centrifugering suges væsken i delprøven fra og Punkt 1-4 gentages indtil der kun er få rester af organisk materiale tilbage.
6. Hvis en prøve er brunlig (typisk pga. jernforbindelser) tilsættes et par dråber 50% HCl. Vent et par minutter. Hvis prøven stadig er gullig, tilsættes endnu et par dråber HCl.
7. Vask prøven (for at fjerne H_2O_2 og evt. HCl) ved at tilsætte ionbyttet/destilleret vand efterfulgt af centrifugering i 4 min ved 1200 omdr/min. Dekantér det overliggende vand, og gentag denne vask fire gange. Hvis HCl er tilsat, skal prøven vaskes fem gange.
8. Hvis der er meget ler i prøverne kan man tilsætte 1-2 dråber svag NH_3 -opløsning med den sidste vask for at undgå at algerne klumper sammen på præparatet.

Centrifugering kan erstattes af simpel sedimentering som beskrevet ovenfor (altså op til fem gange 12 timer).

9. Efter sidste vask fjernes det overliggende vand, bortset fra ca. 2 ml. Prøven omrystes forsigtigt, og indholdet skal nu have en farve, der er en mellemting mellem gennemsigtig og mælkehvid. Fine, flydende partikler kan normalt ses, når man holder prøven op mod lyset. Det kræver nogen øvelse at få den rigtige koncentration.
10. For at finde den mest hensigtsmæssige fortynding af prøven og for at kontrollere, at skallerne er pæne, overføres én dråbe til et objektglas, og prøven undersøges under mikroskop. Hvis prøven er for tæt, så tællingen bliver usikker, kan den fortyndes med ionbyttet/destilleret vand. Er prøven for tynd, så der skal bruges uhensigtsmæssigt meget tid på at oparbejde den, centrifugeres/sedimenteres den, og det overliggende vand dekanteres, så den bliver mere koncentreret.

2.2.5 Fremstilling af præparat

1. Rens et dækglas med H₂O₂, alkohol eller opvaskemiddel. Overfladen må ikke være fedtet. Dette kan kontrolleres ved at sikre sig, at en dråbe vand nemt spreder sig på overfladen.
2. Der fremstilles en serie af præparater for hver prøve. Placér en metalbakke på stedet, hvor tørringen (se nedenfor) skal foregå og læg en serie dækglas herpå. Prøven rystes godt, inden der med pipette overføres en delprøve på hvert dækglas. Afhængig af størrelsen af dækglasset overføres der med pipette (Finn pipette) f.eks. 0,3; 0,5 og 0,7 ml på hvert sit dækglas. Fremstilling af flere (f.eks. tre som nævnt) præparater med forskellig tæthed sikrer, at der produceres et, der er egnet til tælling (ikke for koncentreret), og et, der er mere koncentreret, som giver mulighed for at undersøge visse arter nærmere. NB! Husk at udskifte pipettespidsen efter hver prøve.
3. Lad dækglassene lufttørre et tildækket, uforstyrret sted, skærmet fra støv og luftstrømme. Pas på ikke at røre ved dem med fingrene, brug en pincet. Tørring kan tage op til to dage.
4. Kontroller dækglassene med prøverne, eventuelt ved hjælp af mikroskop, for at afgøre, om prøven er klar til at blive talt.
5. Mærk objektglas med stationsnummer, dato m.m. – se nedenfor. Overfør en dråbe Naphrax – **læs sikkerhedsanvisningerne!** - til objektglasset og placer dækglasset med prøven vendende nedad oven på denne dråbe.
6. Opvarm en kogeplade til ca. 130°C i et stinkskab og læg forsigtigt objektglasset med prøve og dækglas på kogepladen. **Vær yderst forsigtig – farlige dampe udvikles! – følg sikkerhedsanvisningerne på Naphrax-etiketten!** Stands, når opbrusningen ophører. Dette tager ca. 15 min.
7. Præparatet afkøles. Tjek, at dækglasset ikke flytter sig, når man skubber til det med en fingernegl. Hvis dette er tilfældet, skal præparatet varmes i lidt længere tid.
8. Alle præparater skal være forsynet med tydelig etiket med følgende oplysninger: stationsnr., stationsnavn, evt. lokalitet, substrattype, prøvetagningsdato og navn på laboratoriet/personen, der har oparbejdet prøven.

2.2.6 Optælling af prøver

1. Prøven tælles i et lysmikroskop med Nomarski interferens og/eller fasekontrast ved min. 1000X forstørrelse.
2. Tæl som udgangspunkt i alt 400 intakte kiselalgeskaller (dvs. halve individer). Derudover skal der tælles mindst 200 skaller, som ikke tilhører den dominerende art/underart. For eksempel: hvis der blandt de 400 talte individer findes 300 individer af samme art (dominerende art), skal der tælles flere individer, så der opnås et tælleantal på mindst 200 individer af de arter, som ikke dominerer prøven. Det endelige antal talte skaller vil dermed variere mellem prøver. Beskadigelse af skallerne i forbindelse med prøveudtagning, rengøring og præparering af objektglas er normalt minimal. Hvis der alligevel er flere ødelagte skaller, end der blev observeret ved den foreløbige undersøgelse (afsnit 2.2.3), skal skaller, som kan bestemmes, dvs. hvis både den centrale del og den ene spids (endestykket) er intakt, medtælles. For taxa, der ikke har en definérbar central del, tælles spidserne, og der divideres med to. Visse arter (f.eks. *Asterionella formosa*, *Synedra ulna*, *Synedra acus* og tyndskallede arter af *Nitzschia*

som f.eks. *N. acicularis*) går særlig let i stykker og vil blive underrepræsenteret, hvis der kun tælles intakte skaller.

3. Tæl diagonaler eller felter på glasset, så hver enkelt individ kun tælles én gang.
4. Som udgangspunkt skal alle individer identificeres til artsniveau og, hvis det er relevant og muligt, til underarter. Hvis der opstår tvivl om, hvorvidt et individ tilhører én af for eksempel 2-3 mulige arter, skal dette registreres (f.eks. som *Navicula lanceolata/pseudolanceolata/peregrina*). Hvis artsbestemmelsen på anden vis er usikker, kan "cf." anføres sammen med artsnavnet. Kun, hvis der ikke er andre muligheder, kan arten bestemmes til slægt.
5. Det noteres, hvor mange skaller, der findes af hver art.
6. Indfør værdierne i et tælleskema (se 2.2.7).

2.2.7 Tælleskema

Som tælleskema anvendes et særskilt Excel-regneark. Udformningen og indholdet af dette skal ske i samarbejde med Miljøstyrelsen.

2.3 Vedligeholdelse af instrumenter

Generel vedligeholdelse af mikroskop (Køhler-indstilling m.v.).

3 Databehandling

3.1 Beregninger

Ikke relevant.

3.2 Data og koder

Data skal indsendes elektronisk til Miljøstyrelsen i et Excel-ark. Se afsnit 2.2.7. I dette ark skal der til hver af arterne tilføjes den gældende OMNIDIA kode. Erhvervelse af licens til programmet OMNIDIA sker i samarbejde med Miljøstyrelsen.

4 Kvalitetssikring

4.1 Kvalitetssikring af metode

Sørg for, at der er optalt og identificeret mindst 400 intakte (husk dog anvisningerne i 2.2.6, pkt. 2) kiselalgeskaller. Ved tvivl om identifikation af en art, konsultér om muligt flere bestemmelsesværker. Indhent om nødvendigt en "second opinion" fra en person med de nødvendige kompetencer.

4.2 Kvalitetssikring af data og dataaflevering

Kontroller, at alle relevante oplysninger er indføjet i tælleskemaet. Kontrollér artsnavne for stavefejl. Det er vigtigt, at navnene er stavet korrekt – tjek evt. i Algaebase.org.

4.3 Ekstern kontrol

Miljøstyrelsen og/eller Fagdatacenteret forbeholder sig retten til at lade udføre en ekstern kvalitetskontrol på en del af de bearbejdede prøver. Samtlige præparater og prøverester skal derfor opbevares sikkert, således at denne kontrol er mulig.

5 Referencer

Dansk Standard DS/EN 13946 (2014) Water quality - Guidance standard for the routine sampling and pretreatment of benthic diatoms from rivers

Dansk Standard DS/EN 14407 (2004) Water quality - Guidance standard for the identification, enumeration and interpretation of benthic diatom samples from running waters.

Kelly, M.G., Adams, C., Graves, A.C., Jamieson, J., Krokowski, J., Lycett, E.B., Murray-Bligh, J., Pritchard, S. & Wilkins, C. (2001) The Trophic Diatom Index: A User's Manual. Revised edition. Environment Agency, Research and Development, Technical Report E2/TR2.

Kelly, M.G., Juggins, S., Bennion, H., Burgess, A., Yallop, M., Hingst, H., King, L., Jamieson, J., Guthrie, R. & Rippey, B. (2007) Use of Diatoms for Evaluating Ecological Status in UK Freshwaters. Environment Agency Science Report SCO301030.

Uhrenholt, J.K. (2008) Fotoautotrofe komponenters fordeling i vandløb i forhold til lys, størrelsesdimensioner og oplandsudnyttelse. Specialrapport, Biologisk Institut & DMU, Aarhus Universitet.

Johansson, L. S., Søndergaard, M. (2020) Prøvetagning af bentiske kiselalger i søer. Teknisk anvisning (version 1) DCE – Nationalt Center for Energi og Miljø, Aarhus Universitet, 8 s.

Wiberg-Larsen, P., Kallestrup, H., Johansson, L.S. (2014) Fytobenthos i vandløb. Teknisk anvisning nr. V21, version 5, DCE – Nationalt center for Miljø og Energi, Aarhus Universitet, 13 p.

6 Bilag

6.1 Litteratur til artsbestemmelse af benthiske kiselalger

(fra Amelie Jarlman)

ALLES, E., NÖRPEL-SCHEMPP, M & LANGE-BERTALOT, H. 1991. Zur Systematik und Ökologie charakteristischer Eunotia-Arten (Bacillariophyceae) in elektrolytarmen Bachoberläufen. *Nova Hedwigia* 53(1-2):171-213.

HOUK, V. 2003. Atlas of freshwater centric diatoms with a brief key and descriptions. Part 1. Melosiraceae, Orthoseraceae, Paraliaceae and Aulacoseiraceae. *Czech Phycology Supplement*. Volume 1. 2003.

HOUK, V. & KLEE, R. 2007. Atlas of freshwater centric diatoms with a brief key and descriptions. Part 2. Melosiraceae and Aulacoseiraceae (Supplement to Part I) *Fottea* 7:2. 170 pp.

HOUK, V., KLEE, R and HIROYUKI, T 2010: Atlas of freshwater centric diatoms, with a brief key and descriptions. Part 3: Stephanodiscaceae A, Cyclotella, Tertiaris, Discostell. *Fottea* 10 (Supplement): 1-498, 2010.

HÅKANSSON, H. 2002. A compilation and evaluation of species in the genera Stephanodiscus, Cyclostephanos & Cyclotella with a new genus in the family Stephanodiscaceae. *Diatom Research* 17(1):1-139

KRAMMER, K. 1997. Die cymbelloiden Diatomeen. Eine Monographie der weltweit bekannten Taxa. Teil 1. Allgemeines und Encyonema part. *Bibliotheca Diatomologica* Band 36. J Cramer Stuttgart. 382 pp.

KRAMMER, K. 1997. Die cymbelloiden Diatomeen. Eine Monographie der weltweit bekannten Taxa. Teil 2. Encyonema part., Encyonopsis und Cymbellopsis. *Bibliotheca Diatomologica* Band 37. J Cramer Stuttgart. 469 pp.

KRAMMER, K. 2000. Diatoms of Europe. Diatoms of the European Inland Waters and Comparable Habitats. Vol. 1. The genus Pinnularia. A.R.G. Gantner Verlag K. G, Ruggell. 703 pp.

KRAMMER, K. 2002. Diatoms of Europe. Diatoms of the European Inland Waters and Comparable Habitats. Vol. 3. Cymbella. A.R.G. Gantner Verlag K. G, Ruggell. 584 pp.

KRAMMER, K. 2003. Diatoms of Europe. Diatoms of the European Inland Waters and Comparable Habitats. Vol. 4. Cymbopleura, Delicata, Navicymbula, Gomphocymbellopsis, Afrocymbella.. A.R.G. Gantner Verlag K. G, Ruggell. 530 pp.

KRAMMER, K. & LANGE-BERTALOT, H. 1986. Bacillariophyceae. 1. Teil: Naviculaceae. *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Band 2/1. Durchgesehener Nachdruck der 1. Auflage 1997, 1999. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin. 876 pp.

- KRAMMER, K. & LANGE-BERTALOT, H. 1988. Bacillariophyceae. 2. Teil: Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 2/2. Ergänzter Nachdruck der 1. Aufl. 1997, 1999. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin. 611 pp.
- KRAMMER, K. & LANGE-BERTALOT, H. 1991. Bacillariophyceae. 3. Teil: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 2/3. 2nd suppl. ed. 2000. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin. 599 pp.
- KRAMMER, K. & LANGE-BERTALOT, H. 1991. Bacillariophyceae. 4. Teil: Achnanthesaceae, Kritische Ergänzungen zu Achnanthes s.l., Navicula s.str., Gomphonema, Gesamtliteraturverzeichnis Teil 1-4. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 2/4. Ergänzter Nachdruck 2004. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin. 468 pp.
- LANGE-BERTALOT, H. 1993. 85 Neue Taxa und über 100 weitere neu definierte Taxa ergänzend zur Süßwasserflora von Mitteleuropa Vol. 2/1-4. Bibliotheca Diatomologica 27. J. Cramer, Stuttgart. 393 pp.
- LANGE-BERTALOT, H. (ed). 1996. Iconographia Diatomologica. Annotated Diatom Micrographs Vol. 2. Indicators of Oligotrophy, by Lange-Bertalot, H. & Metzeltin, D. Koeltz Scientific Books. 390 pp.
- LANGE-BERTALOT, H. (ed). 1999. Iconographia Diatomologica. Annotated Diatom Micrographs Vol. 6. Diatoms from Siberia I. Islands in the Arctic Ocean, by Lange-Bertalot, H. & Genkal, S.I. Koeltz Scientific Books. 304 pp
- LANGE-BERTALOT, H. (ed). 1999. Iconographia Diatomologica. Annotated Diatom Micrographs Vol. 8. Reichardt, E. 1999. Zur Revision der Gattung Gomphonema. Die Arten um G. affine/insigne, G. angustatum/micropus, G. acuminatum sowie gomphonemoide Diatomeen aus dem Oberoligozän in Böhmen. A.R.G. Gantner Verlag K.G. 203 pp.
- LANGE-BERTALOT, H. 2001. Diatoms of Europe. Diatoms of the European Inland Waters and Comparable Habitats. Vol. 2. Navicula sensu stricto. 10 Genera Separated from Navicula sensu lato. Frustulia. A.R.G. Gantner Verlag K. G. Ruggell. 526 pp.
- LANGE-BERTALOT, H. (ed). 2004. Iconographia Diatomologica. Annotated Diatom Micrographs Vol 13. Diatoms in springs from Central Europe and elsewhere under the influence of hydrogeology and anthropogenic impacts, by Werum, M. & Lange-Bertalot, H. Eine bemerkenswerte Diatomeenassoziation in einem Quellhabitat im Grazer Bergland, Österreich, by Reichardt, E. A.R.G. Gantner Verlag, K. G. Ruggell. 479 pp.
- LANGE-BERTALOT, H. 2009. Diatoms of Europe. Diatoms of the European Inland Waters and Comparable Habitats. Vol. 5. Z. Levkov. Amphora sensu lato. A.R.G. Gantner Verlag K. G. 916 pp.
- LANGE-BERTALOT, H. 2011. Diatomeen im Süßwasser - Benthos von Mitteleuropa. Bestimmungsflora Kieselalgen für die ökologische Praxis. Über 700 der häufigsten Arten und ihre Ökologie. Gabriele Hofmann, Marcus Werum und Horst Lange - Bertalot. 2011. 3522 Fig. auf 133 Tafeln. A.R.G. Gantner Verlag. 908 pp.

LANGE-BERTALOT, H. 2011. Diatoms of Europe. Diatoms of the European Inland Waters and Comparable Habitats. Volume 6: Lange-Bertalot, H., Malgorzata Bak, Andrzej Witkowski, and Nadia Tagliaventi: Eunotia and some related genera. 2011. 5053 figs. on 237 plates. A.R.G. Gantner Verlag. 747 p.

LANGE-BERTALOT, H. & KRAMMER, K.. 1989. Achnanthes.. Monographie der Gattung mit Definition der gattung Cocconeis und Nachträgen zu den Naviculaceae. Bibliotheca Diatomologica 18(mit 2590 Figuren auf 100 Tafeln). J. Cramer, Stuttgart.

LANGE-BERTALOT, H. & MOSER, G. 1994. Brachysira. Monographie der Gattungen. Bibliotheca Diatomologica 29. J. Cramer, Stuttgart. 212 pp.

REICHARDT, E. 1997. Taxonomische Revision des Artenkomplexes um Gomphonema pumilum (Bacillariophyceae). Nova Hedwigia 65(1-4):99-129.

REICHARDT, E. & LANGE-BERTALOT, H. 1991. Taxonomische Revision des Artenkomplexes um Gomphonema angustum – G. dichotomum – G. intricatum – G. vibrio und ähnliche Taxa (Bacillariophyceae). Nova Hedwigia 53(3-4):519-544.

VAN de VIJVER, B., BEYENS, L. & LANGE-BERTALOT, H 2004. The genus Stauroneis in the Arctic and (Sub-) Antarctic Regions. 2004. Bibliotheca Diatomologica band 51, 109 plates. 7 tabs. 317 p. Stuttgart 2004

7 Oversigt over versionsændringer

Version	Dato	Emne	Ændring
1	06.11.2020		Denne tekniske anvisning bygger på flere udgaver af retningslinjer for oparbejdning af prøver fra søer og vandløb, herunder afsnit 2.7 i TA V21 – Bundlevende alger, version 4. I TA V21, version 5 er dette afsnit taget ud og erstattet med denne selvstændige TA, fælles for sø og vandløb. Samtidig er der foretaget justeringer og rettelser i anvisningerne.
2	30.06.2021	Engelsk	En komplet engelsk oversættelse er indsat i slutningen af dokumentet.
2	30.06.2021	Opsætning	Enkelte rettelser i opsætning (skrivefejl) på den danske del.



Title: Benthic diatoms – processing of samples from lakes and streams			
Document type: Technical guideline	Technical guideline no.: SV1	Version 1	From 06.11.2020
Authors: Liselotte Sander Johansson, Peter Wiberg-Larsen The Danish Topic Centre for Freshwater, Department of Bioscience	Valid from: 06.11.2020		
	Pages: 13		
	Last modified 30.06.2021		
TA references: https://bios.au.dk/forskningraadgivning/fagdacentre/ferskvand/	TA S04 Planteundersøgelser TA S18 Prøvetagning af benthiske kiselalger i søer TA V21 Fytobenthos i vandløb		

Contents

1 Introduction.....	2
2 Method	3
2.1 Equipment	3
2.2 Procedure	4
2.2.1 Important general comments	4
2.2.2 Sedimentation.....	4
2.2.3 Preliminary analysis	4
2.2.4 Sample purification	4
2.2.5 Slide preparation	6
2.2.6 Sample counting	6
2.2.7 Counting sheet.....	7
2.3 Maintenance of instruments	7
3 Data processing	8
3.1 Calculations.....	8
3.2 Data and codes	8
4 Quality assurance	9
4.1 Quality assurance of method.....	9
4.2 Quality assurance of data and data submission	9
4.3 External control	9
5 References.....	10
6 Appendices	11
6.1 List of literature for determination of benthic diatoms	11

1 Introduction

Processing of benthic diatom samples collected in lakes and streams following this guideline aims to describe the species composition and the relative presence of the individual species in the samples. According to the Water Framework Directive, the results are used to calculate an index value for the benthic diatoms.

The method is based on DS/EN 13946:2014 "Water Quality – Guidance Standard for the routine sampling and pre-treatment of benthic diatoms from rivers" as well as guidelines from Gina Henderson, Henderson Ecology, UK, and Amelie Jarlman, Jarlman Konsult AB, Lund, Sweden.

The methods for collecting samples of benthic diatoms in, respectively, lakes and streams are described in TA S18 and TA V21, which are available at the following link: <https://bios.au.dk/forskningraadgivning/fagdatacentre/ferskvand/> (in Danish).

2 Method

All individuals of benthic diatoms in the sample must be determined to species level. If this is not possible, they may – in exceptional cases – be determined to a species group or genus level (see 2.2.6). The reason why this level of detail is required is that the index is based on the presence of species and a specific indicator value for the individual species.

The methods of collection used (cf. TA S18 and TA V21) are not intended, nor do they make it possible, to calculate the density of the benthic diatoms.

NOTE! Please note that potentially harmful substances are used and that the processing must be carried out in accordance with the rules applicable for these.

2.1 Equipment

List of equipment

- Heating water bath
- Fume cupboard
- Hotplate
- Tweezers
- Kitchen sieve (mesh size approx. 0.5 mm)
- Glass bowl
- Bottle/container with a similar-sized lid as the sampling bottle
- Funnel that fits the bottle
- Pasteur pipettes and suction ball
- Plastic vials with caps
- Disposable pipettes
- Pipette (Finn pipette)
- Metal tray for drying of samples
- Microscope (minimum 100x magnification (10x ocular)) with oil immersion lens, Nomarski interference and/or phase contrast
- Possibly, centrifuge (capacity 1200 rot/min) and plastic centrifuge tubes
- Possibly, sample vials, 10-15 ml with a cap, if a centrifuge is not used
- Heat-resistant rack for centrifuge tubes/sample vials
- Hydrogen peroxide (H₂O₂) 30%
- Hydrochloric acid (HCl) 50% – used if the sample contains iron compounds
- NH₃ (1-2% – used if the sample contains many clay particles)
- Cover glasses
- Slides
- Alcohol/dishwashing liquid
- Naphrax (“mounting agent”)
- Lugol for refixation of sample remains
- Determination literature – see Appendix 6.1

Note! If a different rinsing method is chosen (see below) than the one described here, the equipment list may have to be adjusted – see DS/EN 13946.

2.2 Procedure

From the gathered samples, the microscope slides are prepared, and these are subsequently used to identify and count diatom taxa.

2.2.1 Important general comments

During all work procedures, possible contamination of samples must be avoided. Glass and metal equipment must therefore be cleaned very thoroughly between each sample processing. Use disposable plastic vials with lids and disposable pipettes and discard them after use. Use separate pipettes for each sample. Cover the sample with a lid as far as possible. Do not process samples from different stations at the same time. Remember to label all bottles /vials/tubes/slides etc. carefully. Refixate and always store the sample remains.

2.2.2 Sedimentation

The collected lugol-preserved samples are checked for coarse plant remains or similar. These are removed immediately from the samples, after which the samples, if there are still plants remains or similar, are poured through a kitchen sieve (mesh size approx. 0.5 mm) into a container that can be closed with a lid. The container is closed and the sample is left to sediment for at least 48 hours. The supernatant (i.e. the liquid above the sediment material) is poured off without stirring the sediment material. Check that there are no diatoms in the supernatant. If this is the case, the supernatant must be poured back into the container and the process must be repeated. Instead of sedimentation, the sample can be centrifuged.

2.2.3 Preliminary analysis

After pouring off the supernatant, the sample is poured into a plastic vial and filled with ion exchange/distilled water to approx. 3/4 of the total volume of the vial. The vial is closed with a lid and homogenised by shaking. Remove a few drops for a preliminary microscopic examination to identify the most appropriate dilution (a total of approx. 400 diatom shells must be counted, if necessary – see sections 2.2.5 and 2.2.6). The algae density is assessed, and it is recorded if, for example, there are many empty or damaged diatom shells in the sample. Note! The sample remains must be stored according to the agreement with the Danish Environmental Protection Agency, so remember to refixate and label the sample when the sub-sample for processing has been taken.

2.2.4 Sample purification

The sample is shaken again, and a 5 ml sub-sample is transferred to a centrifuge tube. The centrifuge tube is filled with ion exchange/distilled water, and the sample is centrifuged for 4 minutes at 1,200 rpm. After the centrifugation, a visible amount of material must be left on the bottom of the tube. If the material is insufficient, the supernatant is sucked up from the centrifuge tube, the sample is carefully stirred/shaken again, an additional 5 ml sample is added to the centrifuge tube, and centrifugation is repeated. This process should be repeated until there is sufficient material left in the centrifuge tube.

If you do not have a centrifuge available, the sample can be left to sediment in glass tubes instead. In this case, each “centrifuge run” (even if several are necessary, as described above) must be replaced with 12 h sedimentation.

The below method of rinsing is well tested and recommended. However, the methods specified in the latest version (at the time of writing from 2014) of DS/EN 13946 can be used instead.

1. Place each centrifuge tube – containing a sub-sample – in a rack and suck up as much of the overlying water as possible until approx. 5 ml are left. To check for cross-contamination, centrifuge tubes without algae, treated and analysed in the same way as the samples, can be included among the real samples.
2. Add 1-2 drops of 30% H₂O₂ to each test tube. There will be a reaction (fizzing), whereby the organic material is dissolved and only the shells are left. Wait until the reaction stops. Add another 30% H₂O₂ and repeat until there are approx. 10 ml in the tube. This may take a long time if the reaction with H₂O₂ is strong, and you may be required to add H₂O₂ over several days. Cover the tubes with a loose lid depending on the strength of the reaction.
3. Place the rack with the tubes with the loosely mounted lids in a heating water bath with distilled water for 1-2 hours (or overnight) at 80 °C. Avoid dry out of the samples (and the heater).
4. Remove the samples from the heater and let them cool off.
5. If organic material remains, the samples are centrifuged/sedimented again, and the H₂O₂ procedure is repeated. Thus, after centrifugation, the supernatant in the sub-sample is sucked up and steps 1-4 are repeated until only a few organic remains are left.
6. If a sample is brownish (typically due to iron compounds), add a few drops of 50% HCl. Wait a few minutes. If the sample is still yellowish, add another few drops of HCl.
7. Rinse the sample (to remove H₂O₂ and, if necessary, HCl) by adding ion exchange/distilled water, followed by centrifugation for 4 minutes at 1,200 rpm. Pour off the overlying water, and repeat the rinsing process four times. If HCl is added, the sample must be rinsed five times.
8. If there is a lot of clay in the samples, you may add 1-2 drops of weak NH₃ solution during the final rinsing to prevent the algae from clotting on the slide.

Centrifugation can be replaced by simple sedimentation as described above (i.e. up to five times for 12 hours).

9. After the last rinsing, pour off the overlying water, leaving approx. 2 ml. Shake the sample carefully; the content must now have a colour in-between transparent and milky white. Fine, floating particles can normally be seen when you hold up the vial to the light. It requires some practice to get the right concentration.
10. To determine the most appropriate dilution of the sample and to check that the shells are intact and clean, transfer one drop to a slide and examine the sample under a microscope. If the sample is too dense, rendering the counting uncertain, it can be diluted with ion exchange/distilled water. If the sample is too diluted and processing will require an excessively long time, it should be centrifuged/left to sediment, and the overlying water is poured off so that the sample is more concentrated.

2.2.5 Slide preparation

1. Clean a cover glass with H₂O₂, alcohol or dishwashing liquid. The surface must not be greasy. Check this by ensuring that a drop of water spreads easily on the surface.
2. Prepare a series of cover glasses with a subsample for each sample. Place a metal tray on the site of drying (see below) and place a series of cover glasses on it. Shake the sample well before transferring a sub-sample to each cover glass. Depending on the size of the cover glass, use a pipette (Finn pipette) to transfer e.g. 0.3, 0.5 and 0.7 ml onto a cover glass. Preparation of several (e.g. three as mentioned) slides with different densities ensures the availability of one not too concentrated slide suitable for counting and another more concentrated slide allowing a closer study of certain species. Note! Remember to replace the pipette tip after each sample.
3. Let the cover glass dry in a covered, undisturbed place that is shielded from dust and air currents. Take care not to touch them with your fingers, use tweezers. Drying may last up to two days.
4. Check the cover glasses with the samples, possibly using a microscope, to determine whether the sample is ready to be counted.
5. Label the slides with station number, date etc. – see below. Transfer a drop of Naphrax – **read the safety instructions!** - to the slide and place the cover glass with the sample downwards on top of this drop.
6. Heat a hotplate to approx. 130 °C in a fume cupboard and carefully place the slide with the sample and cover glass on the hotplate. **Be extremely careful – dangerous vapours are developed!** – follow the safety instructions on the Naphrax label! Stop when the fizzing ceases. This takes approx. 15 minutes.
7. Cool off the slide. Check that the cover glass does not move when you push it with your fingernail. If this is the case, the slide must be heated for a longer period of time.
8. All slides must be clearly labelled with the following information: station no., station name, location (optional), substrate type, sampling date and name of the laboratory/person who processed the sample.

2.2.6 Sample counting

1. Count the sample under a light microscope with Nomarski interference and/or phase contrast at min. 1000X magnification.
2. As a rule, count a total of 400 intact diatom shells (i.e. half individuals). In addition, at least 200 shells that do not belong to the dominant species/sub-species must be counted. For example, if 300 individuals of the same species (dominant species) occur among the 400 individuals, then more individuals must be counted to reach a counting number of at least 200 individuals of the species that do not dominate the sample. The final number of counted shells will therefore vary between samples. Damage to the shells in connection with sampling, rinsing and preparation of slides is normally minimal. If there are more damaged shells than those observed in the preliminary microscopic examination (section 2.2.3),

determinable shells must be included in the count, i.e. if both the central part and one tip (end-piece) are intact. For taxa that do not have a definable central part, count the tips and divide by two. Certain species (e.g. *Asterionella formosa*, *Synedra ulna*, *Synedra acus* and thin-shelled species of *Nitzschia*, e.g. *N. acicularis*) are particularly fragile and will be underrepresented if only intact shells are counted.

3. Count diagonals or fields on the slide so that each individual is counted only once.
4. As a general rule, all individuals must be identified to species level and, if relevant and possible, to sub-species level. If doubt arises about whether an individual belongs to one of, for example, 2-3 possible species, this must be recorded (e.g. as *Navicula lanceolata/pseudolanceolata/peregrina*). If the species determination is otherwise uncertain, "cf." can be entered together with the species name. Determination of a species to genus level is only acceptable if there are no other options.
5. Record the number of shells found for each species.
6. Enter the values into a counting sheet (see 2.2.7).

2.2.7 Counting sheet

A separate Excel spreadsheet is used as a counting sheet. Its design and content must be developed in collaboration with the Danish Environmental Protection Agency.

2.3 Maintenance of instruments

General maintenance of microscope (Køhler alignment etc.).

3 Data processing

3.1 Calculations

Not relevant.

3.2 Data and codes

Data must be submitted electronically to the Danish Environmental Protection Agency in an Excel spreadsheet. See section 2.2.7. In this sheet, the current OMNIDIA code must be added to each of the species. A license to the OMNIDIA programme is acquired in collaboration with the Danish Environmental Protection Agency.

4 Quality assurance

4.1 Quality assurance of method

Make sure that at least 400 intact diatom shells have been counted and identified (however, remember the instructions in 2.2.6, item 2). In case of doubt about the identification of a species, consult, if possible, more literature of determination. If necessary, obtain a second opinion from a person with the necessary competencies.

4.2 Quality assurance of data and data submission

Check that all relevant information is included in the counting sheet. Check the names of the species for spelling errors. It is important that the names are spelled correctly – check Algaebase.org.

4.3 External control

The Danish Environmental Protection Agency and/or the Topic Centre reserve the right to organise an external quality control of some of the processed samples. Therefore, to allow such control, all slides and sample remains must be stored safely.

5 References

Dansk Standard DS/EN 13946 (2014) Water quality - Guidance standard for the routine sampling and pretreatment of benthic diatoms from rivers

Dansk Standard DS/EN 14407 (2004) Water quality - Guidance standard for the identification, enumeration and interpretation of benthic diatom samples from running waters.

Kelly, M.G., Adams, C., Graves, A.C., Jamieson, J., Krokowski, J., Lycett, E.B., Murray-Bligh, J., Pritchard, S. & Wilkins, C. (2001) The Trophic Diatom Index: A User's Manual. Revised edition. Environment Agency, Research and Development, Technical Report E2/TR2.

Kelly, M.G., Juggins, S., Bennion, H., Burgess, A., Yallop, M., Hingst, H., King, L., Jamieson, J., Guthrie, R. & Rippey, B. (2007) Use of Diatoms for Evaluating Ecological Status in UK Freshwaters. Environment Agency Science Report SCO301030.

Uhrenholt, J.K. (2008) Fotoautotrofe komponenters fordeling i vandløb i forhold til lys, størrelsesdimensioner og oplandsudnyttelse. Specialrapport, Biologisk Institut & DMU, Aarhus Universitet.

Johansson, L. S., Søndergaard, M. (2020) Prøvetagning af bentiske kiselalger i søer. Teknisk anvisning (version 1) DCE – Nationalt Center for Energi og Miljø, Aarhus Universitet, 8 s.

Wiberg-Larsen, P., Kallestrup, H., Johansson, L.S. (2014) Fytobenthos i vandløb. Teknisk anvisning nr. V21, version 5, DCE – Nationalt center for Miljø og Energi, Aarhus Universitet, 13 p.

6 Appendices

6.1 List of literature for determination of benthic diatoms

(from Amelie Jarlman)

- ALLES, E., NÖRPEL-SCHEMPP, M & LANGE-BERTALOT, H. 1991. Zur Systematik und Ökologie charakteristischer Eunotia-Arten (Bacillariophyceae) in elektrolytarmen Bachoberläufen. *Nova Hedwigia* 53(1-2):171-213.
- HOUK, V. 2003. Atlas of freshwater centric diatoms with a brief key and descriptions. Part 1. Melosiraceae, Orthoserae, Paraliaceae and Aulacosei-raceae. *Czech Phycology Supplement*. Volume 1. 2003.
- HOUK, V. & KLEE, R. 2007. Atlas of freshwater centric diatoms with a brief key and descriptions. Part 2. Melosiraceae and Aulacoseiraceae (Supplement to Part I) *Fottea* 7:2. 170 pp.
- HOUK, V., KLEE, R and HIROYUKI, T 2010: Atlas of freshwater centric diatoms, with a brief key and descriptions. Part 3: Stephanodiscaceae A, Cyclotella, Tertiaris, Discostell. *Fottea* 10 (Supplement): 1-498, 2010.
- HÅKANSSON, H. 2002. A compilation and evaluation of species in the genera *Stephanodiscus*, *Cyclostephanos* & *Cyclotella* with a new genus in the family Stephanodiscaceae. *Diatom Research* 17(1):1-139
- KRAMMER, K. 1997. Die cymbelloiden Diatomeen. Eine Monographie der weltweit bekannten Taxa. Teil 1. Allgemeines und Encyonema part. *Bibliotheca Diatomologica* Band 36. J Cramer Stuttgart. 382 pp.
- KRAMMER, K. 1997. Die cymbelloiden Diatomeen. Eine Monographie der weltweit bekannten Taxa. Teil 2. Encyonema part., Encyonopsis und Cy bellopsis. *Bibliotheca Diatomologica* Band 37. J Cramer Stuttgart. 469 pp.
- KRAMMER, K. 2000. Diatoms of Europe. Diatoms of the European Inland Waters and Comparable Habitats. Vol. 1. The genus *Pinnularia*. A.R.G. Gantner Verlag K. G, Ruggell. 703 pp.
- KRAMMER, K. 2002. Diatoms of Europe. Diatoms of the European Inland Waters and Comparable Habitats. Vol. 3. *Cymbella*. A.R.G. Gantner Verlag K. G, Ruggell. 584 pp.
- KRAMMER, K. 2003. Diatoms of Europe. Diatoms of the European Inland Waters and Comparable Habitats. Vol. 4. *Cymbopleura*, *Delicata*, *Navicymbula*, *Gomphocymbellopsis*, *Afrocymbella*.. A.R.G. Gantner Verlag K. G, Ruggell. 530 pp.
- KRAMMER, K. & LANGE-BERTALOT, H. 1986. Bacillariophyceae. 1. Teil: Naviculaceae. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 2/1. Durchgesehener Nachdruck der 1.Auflage 1997, 1999. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin. 876 pp.

- KRAMMER, K. & LANGE-BERTALOT, H. 1988. Bacillariophyceae. 2. Teil: Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 2/2. Ergänzter Nachdruck der 1. Aufl. 1997, 1999. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin. 611 pp.
- KRAMMER, K. & LANGE-BERTALOT, H. 1991. Bacillariophyceae. 3. Teil: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 2/3. 2nd suppl. ed. 2000. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin. 599 pp.
- KRAMMER, K. & LANGE-BERTALOT, H. 1991. Bacillariophyceae. 4. Teil: Achnantheaceae, Kritische Ergänzungen zu Achnanthes s.l., Navicula s.str., Gomphonema, Gesamtliteraturverzeichnis Teil 1-4. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 2/4. Ergänzter Nachdruck 2004. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin. 468 pp.
- LANGE-BERTALOT, H. 1993. 85 Neue Taxa und über 100 weitere neu definierte Taxa ergänzend zur Süßwasserflora von Mitteleuropa Vol. 2/1-4. Bibliotheca Diatomologica 27. J. Cramer, Stuttgart. 393 pp.
- LANGE-BERTALOT, H. (ed). 1996. Iconographia Diatomologica. Annotated Diatom Micrographs Vol. 2. Indicators of Oligotrophy, by Lange-Bertalot, H. & Metzeltin, D. Koeltz Scientific Books. 390 pp.
- LANGE-BERTALOT, H. (ed). 1999. Iconographia Diatomologica. Annotated Diatom Micrographs Vol. 6. Diatoms from Siberia I. Islands in the Arctic Ocean, by Lange-Bertalot, H. & Genkal, S.I. Koeltz Scientific Books. 304 pp
- LANGE-BERTALOT, H. (ed). 1999. Iconographia Diatomologica. Annotated Diatom Micrographs Vol. 8. Reichardt, E. 1999. Zur Revision der Gattung Gomphonema. Die Arten um *G. affine/insigne*, *G. angustatum/micropus*, *G. acuminatum* sowie gomphonemoide Diatomeen aus dem Oberoligozän in Böhmen. A.R.G. Gantner Verlag K.G. 203 pp.
- LANGE-BERTALOT, H. 2001. Diatoms of Europe. Diatoms of the European Inland Waters and Comparable Habitats. Vol. 2. Navicula sensu stricto. 10 Genera Separated from Navicula sensu lato. Frustulia. A.R.G. Gantner Verlag K. G, Ruggell. 526 pp.
- LANGE-BERTALOT, H. (ed). 2004. Iconographia Diatomologica. Annotated Diatom Micrographs Vol 13. Diatoms in springs from Central Europe and elsewhere under the influence of hydrogeology and anthropogenic impacts, by Werum, M. & Lange-Bertalot, H. Eine bemerkenswerte Diatomeenassoziation in einem Quellhabitat im Grazer Bergland, Österreich, by Reichardt, E. A.R.G. Gantner Verlag, K. G. Ruggell. 479 pp.
- LANGE-BERTALOT, H. 2009. Diatoms of Europe. Diatoms of the European Inland Waters and Comparable Habitats. Vol. 5. Z. Levkov. Amphora sensu lato. A.R.G. Gantner Verlag K. G. 916 pp.
- LANGE-BERTALOT, H. 2011. Diatomeen im Süßwasser Benthos von Mitteleuropa. Bestimmungsflora Kieselalgen für die ökologische Praxis. Über 700 der häufigsten Arten und ihre Ökologie. Gabriele Hofmann, Marcus Werum und Horst Lange-Bertalot. 2011. 3522 Fig. auf 133 Tafeln. A.R.G. Gantner Verlag. 908 pp.

LANGE-BERTALOT, H. 2011. Diatoms of Europe. Diatoms of the European Inland Waters and Comparable Habitats. Volume 6: Lange-Bertalot, H., Malgorzata Bak, Andrzej Witkowski, and Nadia Tagliaventi: Eunotia and some related genera. 2011. 5053 figs. on 237 plates. A.R.G. Gantner Verlag. 747 p.

LANGE-BERTALOT, H. & KRAMMER, K.. 1989. Achnanthes.. Monographie der Gattung mit Definition der gattung Cocconeis und Nachträgen zu den Naviculaceae. Bibliotheca Diatomologica 18(mit 2590 Figuren auf 100 Tafeln). J. Cramer, Stuttgart.

LANGE-BERTALOT, H. & MOSER, G. 1994. Brachysira. Monographie der Gattungen. Bibliotheca Diatomologica 29. J. Cramer, Stuttgart. 212 pp.

REICHARDT, E. 1997. Taxonomische Revision des Artenkomplexes um Gomphonema pumilum (Bacillariophyceae). Nova Hedwigia 65(1-4):99-129.

REICHARDT, E. & LANGE-BERTALOT, H. 1991. Taxonomische Revision des Artenkomplexes um Gomphonema angustum – G. dichotomum – G. intricatum – G. vibrio und ähnliche Taxa (Bacillariophyceae). Nova Hedwigia 53(3- 4):519-544.

VAN de VIJVER, B., BEYENS, L. & LANGE-BERTALOT, H 2004. The genus Stauroneis in the Arctic and (Sub-) Antarctic Regions. 2004. Bibliotheca Diatomologica band 51, 109 plates. 7 tabs. 317 p. Stuttgart 2004