Reviderade bedömningsgrunder för klorofyll

Revidering och anpassning till den ”nordiska” interkalibreringen av klorofyll i sjöar (NGIG)

Lars Sonesten

Institutionen för miljöanalys, SLU

Naturvårdsverkets programområde Levande sjöar och vattendrag

Avtal nr. 501 0522

Institutionen för miljöanalys, SLU
Box 7050, 750 07 Uppsala

Rapport 2007:5

Innehåll

Sammanfattning 2
Inledning 3
Det ”nordiska” kalibreringsarbetet inom CIS - NGIG 3
Applicering av NGIG på de svenska bedömningsgrunderna 4
Slutgiltiga bedömningsgrunder för klorofyll *a* 5
Litteratur 5

Bilaga 1. Det tidigare förslaget till reviderade bedömningsgrunder för klorofyll
(Sonesten & Wilander 2006, ”Underlag och förslag till reviderade bedömningsgrunder för klorofyll”. Institutionen för miljöanalys, SLU, Rapport 2006:6).

Sammanfattning

Halten av klorofyll *a* i ytvattenprov ger en uppskattning av den totala växtplanktonbiomassan. Bedömningar av ekologisk status med avseende på klorofyllhalten skall ses som ett komplement till de både dyrare och mer tidskrävande växtplanktonanalyserna. Klorofyllbedömningar bör inte ensamt förorsaka att en sjös status klassas som måttlig eller sämre och därigenom orsaka att åtgärder sätts in, utan skall snarare ge en indikation på statusförhållanden och vägledning för eventuellt kompletterande analyser. Föreliggande slutgiltiga förslag till reviderade bedömningsgrunder för klorofyll har i möjligaste mån anpassats till de internationellt överenskomna klassgränserna inom interkalibreringen i Northern Geografical Intercalibration Group (NGIG). Detta innebär vissa justeringar av klassgränser och referensvärden gentemot det första förslaget, samt att bedömningar nu inte görs för sjöar där den ekologiska statusen klassas som sämre än god. Den ekologiska statusen i dessa sjöar bör istället fastställas med hjälp av en fullständig växtplanktonanalys.

Inledning

Detta slutgiltiga förslag till reviderade bedömningsgrunder med avseende på klorofyll *a* baseras på förslaget ett tidigare förslag för klorofyll (se BILAGA 1), samt ett förslag till reviderade bedömningsgrunder för växtplankton (Willén 2006). Utgångspunkten har varit att klorofyllbedömningarna skall vara en kompletterande förlängning av växtplanktonbedömningarna framförallt när växtplanktondata saknas. I det första förslaget till reviderade bedömningsgrunder jämkades referens- och klassgränsvärden för klorofyll *a* i möjligaste mån ihop med förslaget till växtplanktonbedömningar med hjälp av linjära regressionssamband mellan totalbiomassorna och klorofyll. Gränsvärdena testades sedan med hjälp av material från nationella och regionala referenssjöar, samt andra regionala dataset. Jämförelser gjordes även mellan klassningar med avseende på klorofyll och totalfosforhalten i vattnet. Den största skillnaden mellan denna slutgiltiga version och det första förslaget från 2006, är att klassgränserna i föreliggande dokument har anpassats i möjligaste mån till internationellt överenskomna gränsvärden inom en interkalibrering mellan Sverige, Norge, Finland, Storbritannien och Irland (Solheim m.fl. 2006). Eftersom sjöarna inom interkalibreringen har klassificerats på ett i vissa fall annorlunda sätt, har vissa anpassningar till typologin inom de svenska bedömningsgrunderna för växtplankton varit nödvändiga. En annan viktig skillnad är att bedömningar för klasserna måttlig, otillfredsställande och dålig status har tagits bort, då dessa inte gick att jämka ihop med interkalibreringens gränsvärden. Föreliggande bedömningsgränser anger istället att för sjöar där den ekologiska statusen klassas som sämre än god skall en kompletterande fullständig växtplanktonanalys genomföras för att säkerställa den ekologiska statusen.

I det första förslaget till bedömningsgrunder för klorofyll gav statusklassningarna en något sämre klass än motsvarande klassningar med växtplanktonbiomassor eller totalfosforhalter. Detta gällde speciellt om man ser till situationen under sensommar/höst (juli – september). Om man istället använde sig av säsongsmedelhalter ökade variationen, även om klorofyllbedömningarna tenderar till att också i dessa fall ge en överlag något sämre status. Vid anpassningarna av klassgränserna till den ovan nämnda interkalibreringen har gränsvärdena justerats något uppåt. Detta torde dock inte innebära någon större skillnad gentemot den tidigare något strängare klassningen för klorofyll, även om klassningarna nu torde bli mer lika de för totalbiomassan av växtplankton. Ingen ny jämförelse har dock varit möjlig att utföra inom ramen för detta arbete.

Det ”nordiska” kalibreringsarbetet inom CIS - NGIG

Inom det europeiska interkalibreringsprojektet COMMON IMPLEMENTATION STRATEGY (CIS) har man arbetat med att ta fram data för referensförhållanden och klassgränser för påverkan. Tyngdpunkten har varit att ta fram typspecifika referensvärden och klassgränser för relevanta biologiska och fysikalisk-kemiska faktorer enligt Ramdirektivet för vatten. En del av detta arbete har skett inom ett ”nordiskt” delprojekt Northern Geografical Intercalibration Group (NGIG) där Sverige, Norge, Finland, Storbritannien och Irland har ingått. De svenska och nordiska arbetena har pågått och utvecklats parallellt, men när det första förslaget till bedömningsgrunder för klorofyll lades fram fanns inte mycket underlag att tillgå från interkalibreringen (se t.ex. Solheim 2005). Eftersom det nu finns överenskomna klassgränser inom NGIG har de svenska bedömningsgrunderna tvingats att i möjligaste mån anpassa sig till dessa.

Applicering av NGIG på de svenska bedömningsgrunderna

Den sjöklassificering i olika typer som man har gjort inom NGIG har dock varit svår att direkt kunna applicera på såväl de svenska bedömningsgrunderna för klorofyll som för växtplankton (Willén 2006). Dessa baserades på en geografisk uppdelning av de svenska sjöarna i tre områden, fjällen ovan trädgränsen, Norrland (exkl fjällen) och södra Sverige. Sjöarna i Norrland och i den södra delen av landet delades dessutom upp i humösa respektive klara sjöar. Gränsen mellan humösa och klara vatten sattes till en vattenfärg på 30 mg Pt/l, vilket motsvarar en absorbans på 0,06 ($Abs_{filt, 420/5}$). Inom NGIG har man delat in sjöarna med avseende på vattenfärg, alkalinitet, medeldjup och höjd över havet. Samtliga dessa har i sin tur delats in i tre grupper. Till exempel har man för vattenfärgen förutom den i Sverige använda gränsen på 30 mg Pt/l, även särskiljt polyhumösa sjöar med en vattenfärg >90 mg Pt/l. Man har däremot av naturliga skäl inte kunnat hitta ett gemensamt underlag till samtliga dessa potentiellt 12 sjötyper, utan man har totalt arbetat med sju grupper (tabell 1).

Tabell 1. Sjötyper enligt NGIG.

Sjötyp	Altitud (m över havet)	Medeldjup (m)	Vattenfärg (mg Pt/l)	Alkalinitet (mekv/l)
LN1	<200	3-15	<30	0,2-1
LN2a	<200	3-15	<30	<0,2
LN2b	<200	>15	<30	<0,2
LN3a	<200	3-15	30-90	<0,2
LN5a	200-800	3-15	<30	<0,2
LN6a	200-800	3-15	30-90	<0,2
LN8a	<200	3-15	30-90	0,2-1

Av dessa sjötyper anses tre stycken mer eller mindre direkt motsvaras av de svenska typer som hittills har använts inom bedömningsgrundsarbetet för klorofyll och växtplankton (tabell 2). De norrländska klara sjöarna anses motsvara NGIG:s typ LN5, medan de humösa sjöarna i samma område anses tillhöra LN6. De humösa i den södra delen av landet motsvaras bäst av LN3, medan de södra klara sjöarna motsvarar LN2a, men med ett visst inslag av LN1. De svenska fjällsjöarna saknar däremot motsvarighet i interkalibreringsarbetet.

Tabell 2. Svenska sjötyper för bedömning av växtplankton och klorofyll a.

Sjötyper för bedömningar av växtplankton	Ekoregion[1]	Humusklass[1]
Fjällen ovan trädgränsen	1	h, H
Norrland klara sjöar[2]	2, 3	h[4]
Norrland sjöar[3]	2, 3	H[4]
Södra Sverige klara sjöar[2]	4, 5, 6	h
Södra Sverige humösa sjöar[3]	4, 5, 6	H

[1] enligt NFS 2006:1

[2] färgtal ≤30mg Pt/l eller $Abs_{420/5}$ ≤0,06 (filtrerat prov)

[3] färgtal >30mg Pt/l eller $Abs_{420/5}$ >0,06 (filtrerat prov)

[4] Vid bedömningar enl. trofiskt planktonindex görs ingen åtskillnad mellan klara och humösa sjöar i Norrland

Slutgiltiga bedömningsgrunder för klorofyll *a*

Ett problem med att direkt kunna använda indelningen inom NGIG för de svenska sjöarna är framförallt bristen på svenska underlagsdata. I denna slutgiltiga version av underlag för de svenska bedömningsgrunderna har vi dock varit tvingade att i möjligaste mån använda oss av dessa internationellt överenskomna klassgränser, varför föreliggande klassgränser avviker något från det tidigare förslaget till reviderade bedömningsgrunder för klorofyll (Sonesten & Wilander 2006, se BILAGA 1).

Tabell 3. Reviderade referensvärden och klassgränser för bedömningar av ekologisk status med avseende på klorofyll a. *Värdena anges som halter (µg/l) och ekologiska kvoter (EK).*

Sjötyp[1]	Referens-värde	Osäkerhet[2]	Hög	God	Måttlig eller sämre
			Klorofyllhalt (µg/l)		
Fjällsjöar	1,0	0,081	≤1,5	>1,5 – 3,0	Genomför fullständig växtplanktonanalys för att verifiera ekologisk status!
Norrland, klara	2,0	0,245	≤4,0	>4,0 – 6,0	
Norrland, humösa	2,5	0,355	≤5,0	>5,0 – 7,5	
Södra Sverige, klara	2,5	0,270	≤5,0	>5,0 – 8,5[3]	
Södra Sverige, humösa	3,0	0,933	≤6,0	>6,0 – 10	
			Ekologisk kvalitetskvot (EK = referensvärde/uppmätt värde)		
Fjällsjöar	1,0	0,074	≥0,75	0,75>EK≥0,33	Genomför fullständig växtplanktonanalys för att verifiera ekologisk status!
Norrland, klara	2,0	0,111	≥0,50	0,50>EK≥0,33	
Norrland, humösa	2,5	0,127	≥0,50	0,50>EK≥0,33	
Södra Sverige, klara	2,5	0,082	≥0,50	0,50>EK≥0,30[3]	
Södra Sverige, humösa	3,0	0,283	≥0,50	0,50>EK≥0,30	

1 Med klara vatten avses sjöar med en vattenfärg motsvarande ≤30 mg Pt/l alt. $Abs_{filt,\ 420\ nm}$ ≤0,06, däröver anses vattnet vara humöst.

2 Avser medianvärdet av standardavvikelserna för referenssjöar inom sjötypen (se vidare kap. 4.1.2 Osäkerhetsbedömning).

3 För sjöar med måttligt hög alkalinitet (0,2-1 mekv/l) är övre klassgränsen 10,0 µg/l som motsvarar EK=0,25.

Förutom att referensvärden och klassgränserna har justerats något, så är en avgörande skillnad i dessa bedömningsgrunder gentemot tidigare förslag att bedömningar endast görs för klasserna hög och god status. I samtliga fall då man erhåller en klassning som tyder på måttlig status eller sämre bör en fullständig växtplanktonanalys genomföras för att verifiera klorofyllresultaten, samt för att ligga till grund för eventuella åtgärder.

Litteratur

SOLHEIM A.L. (ed) 2005. Reference conditions of European Lakes – Indicators and methods for the Water Framework Directive Assessment of Reference conditions. Manuskript 2005-12-30.

SOLHEIM A.L. (ed) 2006. Milestone 6 Report – Lake GIGs. Final version: 8th September 2006. European Commission, Directorate General, Joint Research Centre, Institute of Environment and Sustainability.

SONESTEN L. & WILANDER A. 2006. Underlag och förslag till reviderade bedömningsgrunder för klorofyll. Institutionen för miljöanalys, SLU, Rapport 2006:6. (se BILAGA 1).

WILLÉN E. 2006. Planktiska alger i sjöar – Bedömningsgrunder. Inst. för miljöanalys, SLU, Rapport 2006:4.

Bilaga 1. Det tidigare förslaget till reviderade bedömningsgrunder för klorofyll

(Sonesten & Wilander 2006, ”Underlag och förslag till reviderade bedömningsgrunder för klorofyll”. Institutionen för miljöanalys, SLU, Rapport 2006:6).

Bilaga 1

Underlag och förslag till reviderade bedömningsgrunder för klorofyll

Lars Sonesten och Anders Wilander

Institutionen för miljöanalys, SLU

Naturvårdsverkets programområde Levande sjöar och vattendrag

Avtal nr. 501 0522

Institutionen för miljöanalys, SLU
Box 7050, 750 07 Uppsala

Rapport 2006:6

Bilaga 1

Innehåll

Sammanfattning ... 3
Bakgrund ... 3
Ekologisk relevans ... 3
Nuvarande bedömningsgrunder ... 4
Andra viktiga arbeten ... 5
Dataunderlag ... 5
  Referensförhållanden ... 5
  Validering av referensförhållanden och klassgränser ... 7
  Metodik ... 7
    Typspecifika områden ... 8
    Val av mätperiod ... 8
Områdesspecifika referensvärden och klassgränser för bedömning av ekologisk status ... 9
  Test av referensvärden ... 9
  Test av klassgränser för bedömning av ekologisk status ... 12
    Klassningar efter klorofyll och växtplanktonbiomassa ... 12
    Klassningar efter klorofyll och totalfosfor ... 15
    Effekter på sjöar i gränsområden ... 18
Metoder för provtagning och analys av klorofyll ... 19
  Analysmetoder ... 19
    Spektrofotometriska metoder ... 19
    Fluorometriska metoder ... 20
    Provberedning och förvaring vid spektrofotometrisk bestämning ... 20
Kommentarer ... 21
Litteratur ... 22
Bilaga 1. Förslag till reviderade bedömningsgrunder ... 23

Bilaga 1

Sammanfattning

Halten av klorofyll *a* i ytvattenprov ger ett grovt mått på den totala växtplanktonbiomassan. Bedömningar av ekologisk status med avseende på klorofyllhalten skall ses som ett komplement till de både dyrare och mer tidskrävande växtplanktonanalyserna. Klorofyllbedömningar bör inte ensamt förorsaka att en sjös status klassas som måttlig eller sämre och förorsaka att åtgärder sätts in, utan skall snarare ge en indikation på statusförhållanden och vägledning över kompletterande analyser.

Föreliggande förslag till reviderade bedömningsgrunder med avseende på klorofyll *a* baseras på förslaget till reviderade bedömningsgrunder för växtplankton (Willén 2006) och utgångspunkten har varit att klorofyllbedömningarna skall vara en kompletterande förlängning av växtplanktonbedömningarna framförallt när växtplanktondata saknas. Referens- och klassgränsvärden för klorofyll *a* har i möjligaste mån jämkats ihop med förslaget till växtplanktonbedömningar med hjälp av linjära regressionssamband mellan totalbiomassorna och klorofyll. Gränsvärdena har sedan testats med hjälp av material från nationella och regionala referenssjöar, samt andra regionala dataset. Jämförelser har även gjorts mellan klassningar m.a.p. klorofyll och totalfosforhalten i vattnet.

Överlag ger statusklassningarna med klorofyll en något sämre klass än motsvarande klassningar med växtplanktonbiomassor eller totalfosforhalter om man håller sig till situationen under sensommar/höst (juli – september). Om man istället använder sig av säsongsmedelhalter ökar variationen, även om klorofyllbedömningarna tenderar till att också i dessa fall ge en överlag något sämre status.

Vid de fall klorofyllbedömningar ensamt anger att den ekologiska statusen endast är måttlig eller sämre (klass 3 eller högre), rekommenderas att kompletterande analyser utförs av t.ex. växtplanktonsamhället. Detta gäller speciellt om man misstänker att samhället domineras av nålflagellaten *Gonyostomum semen* (gubbslem), vilken kan orsaka höga växtplanktonbiomassor och därigenom höga klorofyllhalter i framförallt humösa vatten.

Bakgrund

De nuvarande bedömningsgrunderna för bl.a. klorofyll *a* i inlandsvatten (NV 1999/2000) är ej direkt kompatibla med de krav som ställs enligt EU:s Ramdirektiv för vatten. Den största skillnaden är att Ramdirektivet är fokuserad på ekologisk status och att klassindelningen baseras på avvikelser från referensförhållanden.

Syftet med detta arbete är att få fram ett underlag till reviderade bedömningsgrunder för klorofyll *a* som bättre uppfyller Ramdirektivets krav, med rekommendationer över hur de skall användas, hur prover skall tas och analyseras, samt för vilka vatten de är användbara.

Ekologisk relevans

Genom att kemiskt bestämma halten av fotosyntespigment i ett vatten kan man på ett förhållandevis snabbt och enkelt sätt få ett grovt mått på växtplanktonbiomassan i vattnet. Vanligen analyseras endast klorofyll *a*, vilket är det pigment som finns i alla fotosyntetiserande växter. Därutöver kan dels andra varianter av klorofyll (b, c1, c2), dels karotenoider bestämmas. Dessa pigment förekommer däremot inte i alla växtplanktongrupper, utan återfinns i och är kännetecknande endast för vissa grupper. Därutöver har på senare tid klorofyll *d*

påvisats i en grupp marina epifytiska cyanobakterier, samt i en hypersalin limnisk miljö (Miller m.fl. 2005).

Vid en totalbestämning av klorofyll *a* ingår även s.k. feofytiner, vilka anses vara inaktiva pigment i exempelvis döda växtplankton. Ibland sker en korrigering för dessa feofytiner och resultatet skall då anges som korrigerat klorofyll *a*. Tyvärr så är det vanligt att det slarvas med dessa benämningar och man måste vanligen anta att när något endast benämns som klorofyll *a* eller i värsta fall endast som klorofyll, så är det den totala mängden klorofyll *a* som avses.

Klorofyll-bestämningar är, som tidigare nämnts, ett jämförelsevis snabbt och enkelt sätt att få en överblick över växtplanktonbiomassan i ett vatten, men eftersom mängden klorofyll *a* varierar avsevärt mellan olika planktongrupper, så kan man endast använda metoden som en indikation på den aktuella situationen. Metoden är användbar som screeningmetod, samt för att ge indikationer på eventuella förändringar i växtplanktonbiomassan i ett vatten. Vid tveksamheter bör alltid en fullständig växtplanktonanalys utföras för att verifiera resultaten. Vid vissa situationer ger dessutom en klorofyllanalys inte hela sanningen av den aktuella situationen i vattnet. I exempelvis fjällsjöar med klart vatten utförs en stor del av primärproduktionen av bentiska påväxtalger eller högre vegetation på bottnarna. Detta gör att om man endast förlitar sig på klorofyll- eller växtplanktondata, kan man förledas att tro att biomassan av primärproducenter är mindre än vad som egentligen är fallet. Även i humösa vatten kan men förledas att tro att växtplanktonbiomassan är mindre än vad som är fallet om man förlitar sig på enbart klorofyllanalyser. Detta beror på att i dessa system kan växtplanktonbiomassan i varierande grad bestå av olika heterotrofa och/eller mixotrofa planktonorganismer, vilka kan vara mer eller mindre dåligt pigmenterade då dessa i varierande grad lever av dött organiskt material.

Nuvarande bedömningsgrunder

De nuvarande bedömningsgrunderna för planktiska alger i sjöar (NV 1999/2000) inkluderar klorofyll som en av indikatorerna på växtplanktonbiomassan i ett vatten. I dessa bedömningsgrunder anges att klorofyllhalten i ett vatten kan användas som ett treårs-medelvärde för antingen hela växtproduktionssäsongen (månatliga mätningar maj – oktober) eller endast i augusti. Proverna skall antingen representera hela epilimion (vattenmassan ovan det termiska språngskiktet) eller endast ytvattnet (vanligen 0,5 m). Gränsvärden anges i dokumentet för tillståndsklassningar baserade på antingen säsongsmedelvärden eller endast på augustiprov (tabell 1). Klassgränserna utgår från och är matchade mot de gränser som anges för växtplankton och totalfosfor i samma dokument.

Tabell 1. Gränsvärden för bedömning av miljökvalitet med avseende på klorofyll a *enligt nuvarande bedömningsgrunder (NV 1999/2000).*

Klass	Benämning	Halt maj – oktober (µg/l)	Halt augusti (µg/l)
1	Låga halter	≤ 2,0	≤ 2,5
2	Måttliga halter	2,0 – 5,0	2,5 – 10,0
3	Höga halter	5,0 – 12,0	10,0 – 20,0
4	Mycket höga halter	12,0 – 25,0	20,0 – 40,0
5	Extremt höga halter	> 25,0	> 40,0

Andra viktiga arbeten

Ett liknande arbete med att ta fram referensförhållanden och klassgränser för påverkan pågår inom det europeiska interkalibreringsprojektet REBECCA (se t.ex. Solheim 2005). Tyngdpunkten inom detta arbete är att ta fram typspecifika referensvärden för relevanta biologiska och fysikalisk-kemiska faktorer enligt Ramdirektivet för vatten. Arbetet inom detta projekt pågår för närvarande och beräknas vara färdigt i juni 2006, vilket gör att inga resultat kan presenteras här. Den sjötypning man har gjort inom REBECCA är dock varit svår att applicera på växtplanktonarbetet för revisionen av de svenska bedömningsgrunderna (Willén 2006). Detta gör att det blir svårt att direkt kunna jämföra slutresultaten från interkalibreringsarbetet med resultaten från föreliggande arbete med bedömningsgrunder för klorofyll, då detta arbete baseras på den sjötypning som gjorts för växtplankton.

Dataunderlag

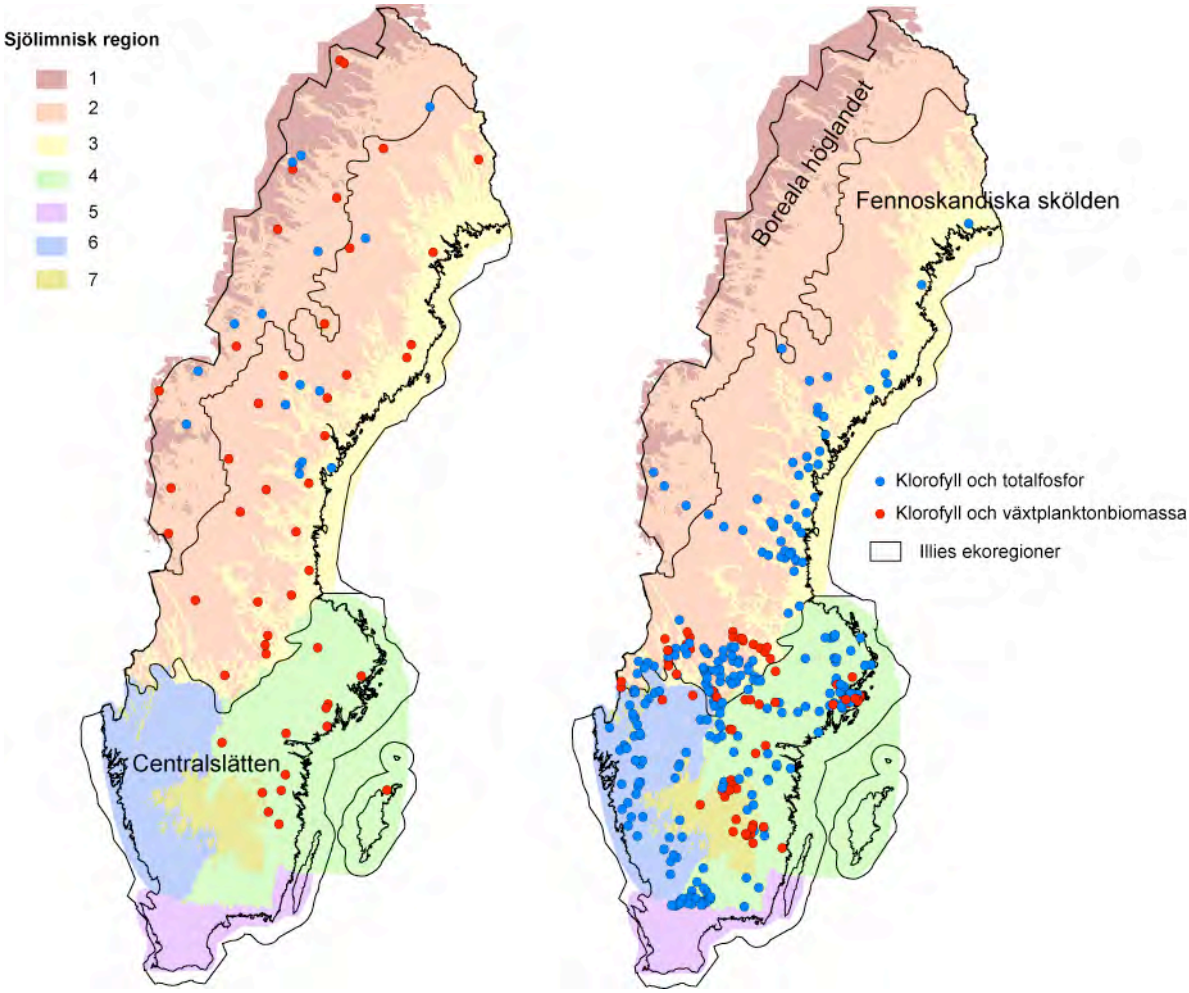
Referensförhållanden

Underlaget till att ta fram områdesspecifika referensvärden härrör från nationella och i viss mån regionala tidsseriesjöar som ingår i det nationella datavärdskap som Institutionen för miljöanalys vid SLU har åt Naturvårdsverket. Det nationella materialet består av dels de s.k. intensivsjöarna, vilka undersöks månatligen, dels de s.k. nationella tidsseriesjöarna som för närvarande provtas fyra gånger per år. Endast de sjöar som har passerat det s.k. referensfiltret har använts för att ta fram referensförhållandena. Filtret baseras på totalfosforhalter i vattnet korrigerat för höga humushalter, vattnets pH, samt påverkan från omgivningen baserat på kartdata (se Johnson m.fl. 2003, Johnson & Goedkoop, 2004). För att förstärka detta material har även sjöar från det regionala material som ingår i datavärdskapet tagit med. Även i detta fall är det endast sjöar som har klarat ”filtret” som har ingått (figur 1). Samtliga sjöar som har passerat ”filtret” benämns i fortsättningen referenssjöar, medan övriga sjöar kallas tidsseriesjöar (nationella eller regionala). Samtliga ingående data härrör från perioden 1996 – 2005, vilket är den period då både klorofyllanalyser och växtplanktonbestämningar ingår i det nationella programmet.

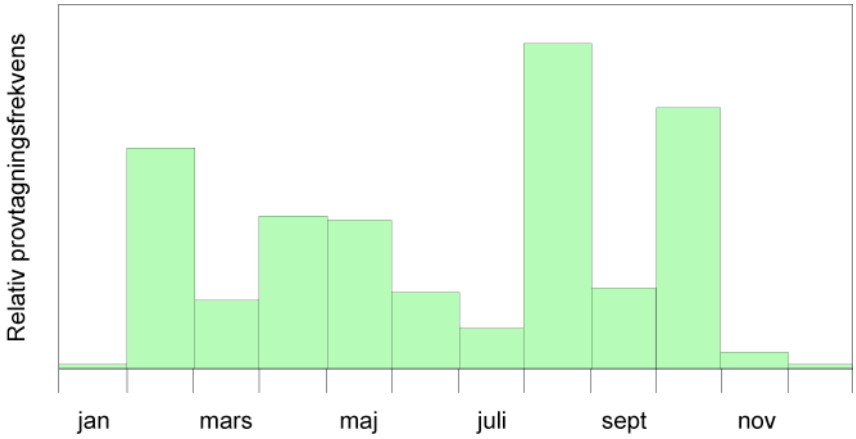
Total har datamaterialet från de nationella och regionala tidsseriesjöarna inkluderat 5038 observationer med klorofyll *a*, varav 2774 observationer härrör från sjöar som har passerat ”referensfiltret” och därigenom kan betraktas som ”riktiga” referenssjöar. Merparten av dessa observationer från referensvatten är tagna i augusti och oktober, samt i viss mån även under februari, april och maj (figur 2). Det totala antalet referenssjöar med klorofyllobservationer uppgår till 90 st (tabell 2). Flertalet av sjöarna har vanligen provtagits 1 – 4 gånger per år, men provtagningsfrekvensen i de s.k. intensivsjöarna är betydligt tätare och provtas upp till 8 gånger per år.

Merparten av klorofyllanalyser har gjorts på ytvatten, vanligen på 0,5 m djup (85 %), men i vissa fall sträcker sig mätningarna ned till 2 – 3 m. Hela 94 % av mätningarna har dock utförts på maximalt 1 m djup, vilket också är det maxdjup som har använts i detta arbete.

Bilaga 1



Figur 1. Referenssjöar (t.v.) som har använts för att undersöka referensvärden för klorofyll a*, samt valideringssjöar (t.h.) som har använts för att validera referens- och klassgränsvärden. Sjöarna är uppdelade med avseende på om endast klorofyll- och totalfosfordata finns tillgängligt eller om även data på växtplanktonbiomassan finns tillgängligt. Illies ekoregioner använts för att dela upp sjöarna geografiskt. I figuren visas även den senare antagna sjöliminiska regionindelningen enligt NFS 2006:1.*



Figur 2. Månadsvis fördelning av provtagningar i de 63 referenssjöarna.

Bilaga 1

Tabell 2. Antalet referenssjöar med klorofyll- och växtplanktondata fördelade på typområden och klara eller humösa vatten ($abs_{filt,\ 420\ nm} \leq 0{,}06$, resp. $> 0{,}06$). Sjöarna är även fördelade på olika programområden. Vid avvikande antal objekt med växtplanktondata anges dessa inom parentes.

Program	Fjällen ovan trädgränsen	Norra Sverige *		Södra Sverige*	
		klara	humösa	klara	humösa
Intensivsjöar	1	1	3	3	2
Nationella	2	5(4)	23	6(5)	15(14)
Regionala	2	5(0)	8(0)	3(2)	11(3)

* Områdena motsvarar Illies ekoregioner Fennoskandiska skölden (norra Sverige) och Centralslätten (södra Sverige). Gränsen mellan de norra och södra delarna av landet utgörs av *Limes norrlandicus*. Fjällen ovan trädgränsen motsvarar ekoregionen Boreala höglandet, men med undantag av de delar som ligger nedanför trädgränsen som har överförts till de norrländska sjöarna.

Av de 2774 observationerna från referenssjöar fanns uppgifter på totalbiomassan av växtplankton för 912 observationer fördelade på 63 sjöar. Materialet från dessa sjöar utgör således det dataset som har använts för att jämföra referensvärden och klassgränser mellan klorofyll *a* och totalbiomassorna, vilka de senare har inhämtats från förslaget till nya bedömningsgrunder för växtplankton (Willén 2006). Till skillnad från klorofyllanalyserna, så tas växtplanktonprov i regel som ett samlingsprov motsvarande epilimnion, dvs. vattenmassan ovan temperatursprångskiktet. Detta innebär att de olika typerna inte är direkt jämförbara, då analyserna inte har skett på exakt samma vattenprov.

Validering av referensförhållanden och klassgränser

För att undersöka om de framtagna referensvärdena klarar att särskilja på objekt med hög/god status och mer påverkade objekt användes dels de tidsseriesjöar som inte passerade ”referensfiltret” (se ovan), dels ett datamaterial från den samordnade recipientkontrollen (SRK). För en stor del av SRK-materialet saknas uppgifter på växtplanktonbiomassor, medan uppgifter finns för merparten av de sjöar som inte passerade referensfiltret (tabell 3) SRK-materialet består till stor del av växtplanktondata som erhölls från Medins Biologi AB inför arbetet med underlag till Ramdirektivsrapporteringen i mars 2005 (Sonesten m.fl. 2004). Materialet baseras framförallt på data från 2003, samt i något enstaka fall på prover från 2004. Därutöver har även växtplanktondata i en mindre utsträckning tagits från Institutionen för miljöanalys som även har stått för samtliga vattenkemiska SRK-data som har använts i arbetet. Därutöver genomfördes även ett test med ett regionalt tidsseriematerial där omgivningsdata var otillräckliga för att kunna testa dessa sjöar med ”referensfiltret” (tabell 3). För merparten av detta material saknas dock uppgifter på växtplanktonbiomassor. För endast ett mindre antal sjöar (8 st) där både växtplankton- och klorofylldata fanns tillgängliga sammanföll däremot inte provtagningarna tidsmässigt. I dessa sjöar samlades växtplanktonmaterialet in under 1995 – 1996, medan klorofyllmaterialet härrör från perioden 1997 – 2003.

Metodik

Det finns flera olika tänkbara tillvägagångssätt för att ta fram referensvärden och klassgränser för klorofyll *a*. Först och främst kan man med enbart klorofylldata ta fram dessa värden utifrån materialets statistiska fördelning, medan alternativa sätt inkluderar jämförelser med framförallt vattenkemiska eutrofieringsindikatorer och totalbiomassan av växtplankton.

Bilaga 1

Tabell 3. Valideringssjöar med data på klorofyll a*, totalfosfor och växtplankton. Materialet består av tidsseriesjöar som inte passerat referensfiltret, icke referensklassade regionala tidsseriesjöar, samt SRK-sjöar. Sjöarna är fördelade på typområden, samt klara eller humösa vatten (*$abs_{filt,\ 420\ nm} \leq 0{,}06$*, respektive > 0,06). Sjöarna är även fördelade på olika programområden. Vid avvikande antal objekt med växtplanktondata anges dessa inom parentes.*

Program	Fjällen ovan trädgränsen	Norra Sverige*		Södra Sverige*	
		klara	humösa	klara	humösa
Intensivsjöar	0	0	1	1	3
Nationella	0	1	2	9	22(21)
Regionala	0	0	9(4)	3(0)	10(1)
Icke klassade regionala	0	3(0)	9(0)	29(4)	77(4)
SRK	0	25(1)	54(19)	91(18)	41(31)

* Områdena motsvarar Illies ekoregioner Fennoskandiska skölden (norra Sverige) och Centralslätten (södra Sverige). Gränsen mellan de norra och södra delarna av landet utgörs av *Limes norrlandicus*. Fjällen ovan trädgränsen motsvarar ekoregionen Boreala höglandet, men med undantag av de delar som ligger nedanför trädgränsen som har överförts till de norrländska sjöarna.

Totalfosfor är i detta sammanhang den mest lämpliga eutrofieringsindikatorn eftersom det i allmänhet finns ett direkt samband mellan totalfosforhalten och växtplanktonbiomassan, samt därigenom även med klorofyllhalten i inlandsvatten. Eftersom klorofyllhalten skall vara ett enkelt och snabbt sätt att kunna erhålla ett indikativt mått på växtplanktonbiomassan, anser vi att utgångspunkten för arbetet med att ta fram referens- och klassgränsvärden för klorofyll måste stämma väl överens på förslaget till nya bedömningsgrunder för växtplankton (se Willén 2006). Vi har dock med de ovan nämnda sambanden som grund även undersökt några alternativa sätt att ta fram de eftersökta referensvärdena.

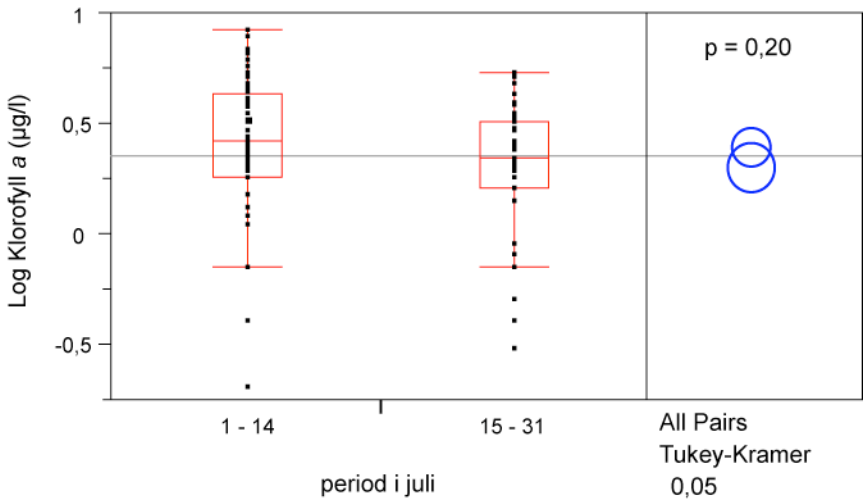
Typspecifika områden

För att ta fram typspecifika referens- och klassgränsvärden har vi använt samma områdesindelning som har använts för framtagandet av de nya bedömningsgrunderna för växtplankton (Willén 2006). Dessa områden, som har befunnits vara tillämpbara på växtplankton och bör därigenom även gälla för klorofyll, är fjällsjöar ovanför högsta trädgränsen, norrländska klara och humösa vatten ($abs_{filt,\ 420\ nm} \leq 0{,}06$, respektive > 0,06), samt motsvarande klara och humösa sjöar i södra Sverige. För att skilja på sjöar i norrland och de södra delarna av landet har Illies ekoregioner Fennoskandiska skölden respektive Centralslätten använts (figur 1). Avgränsningen mellan dessa båda områden stämmer i stort sett överens med *Limes norrlandicus*. Inom det europeiska interkalibreringsarbetet har däremot ett annat sjötypningssystem använts (se t.ex. Solheim 2005), vilket komplicerar jämförandet mellan värden framtagna med de olika systemen. Användandet av Illies ekoregioner har dock befunnits fungera bättre för växtplanktonarbetet i svenska vatten än de som används inom interkalibreringen (Willén 2006).

Val av mätperiod

Det tillgängliga dataunderlaget har insamlats under merparten av växtsäsongen, men med en viss dominans för provtagningar under augusti och oktober, samt i viss mån februari, april och maj. Underlaget till det nya förslaget till bedömningsgrunder för växtplankton (Willén 2006) baseras däremot enbart på prov tagna under perioden 15 juli – sista augusti. Detta beror dels på att merparten av planktonmaterialet är koncentrerat till denna period, dels på att det är

den period då strukturen i växtplanktonsamhället är stabilast och omsättningen av biomassan vanligen är långsam. Dessutom saknades dataunderlag för att kunna genomföra regionala jämförelser för någon annan tidsperiod (Willén 2006). Eftersom klorofyllanalyser utförs på prover tagna under en större del av året, är det viktigt att det även finns bedömningsgrunder för dessa för hela växtsäsongen. Därför har detta underlag inriktats på dels höstprover tagna under juli – september, dels på hela växtsäsongen. Höstperioden är viktig för jämförelserna med växtplankton och säsongsperioden för att möjliggöra bedömningar för andra tider på året än enbart höstprov. För att erhålla ett så omfattande material som möjligt har i detta fall höst-perioden utökats jämfört med bedömningsgrunderna för växtplankton till att även omfatta första halvan av juli, samt hela september. Början av juli har tagits med eftersom ingen skill-nad i klorofyllhalter har kunnat påvisas mellan månadens första och andra hälft (figur 3). Septemberprover har tagits med då augustiprovtagningar i vissa fall inte tas förrän en bit in i september. Man bör dock ha i åtanke att vi har stora regionala klimatskillnader inom landet och att en alltför ensidig och strikt begränsning sig till en eller annan enskild månad inte är helt relevant då hösten, och därigenom höstomblandning i djupare sjöar, inträffar vid olika tidpunkter i olika landsdelar. Dessutom kan mellanårsvariationer i klimatet medföra att hösten infaller inte infaller vid samma tidpunkt alla år.



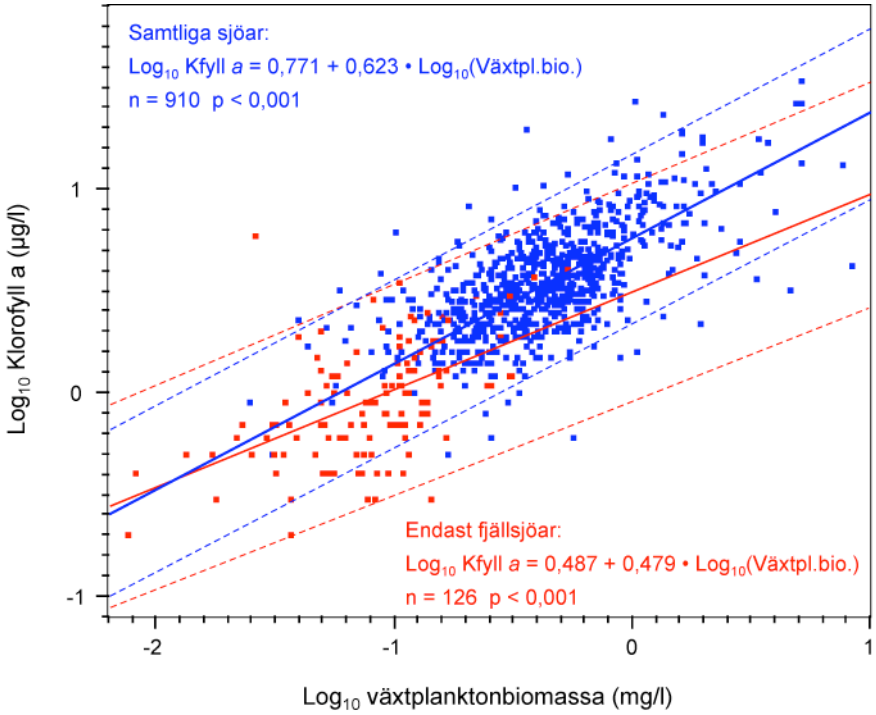
Figur 3. Jämförelse av klorofyllhalter i referenssjöarna under första respektive andra hälften av juli. Ingen statistisk skillnad kunde påvisas med hjälp av T-test (signifikansnivå = 0,05). De statistiska mått som illustreras är 10-, 25-, 75- och 90-percentilerna, samt medianvärdet (50-percentilen).

Områdesspecifika referensvärden och klassgränser för bedömning av ekologisk status

Test av referensvärden

Utgångspunkten för detta arbete har varit att såväl referensvärden som klassgränser bör överensstämma i möjligaste mån med de värden som föreslås i de reviderade bedömnings-grunderna för växtplankton (Willén 2006). En överföring av de där föreslagna referens-värdena till motsvarande klorofyllhalter har gjorts med hjälp av linjär regression (figur 4).

Bilaga 1



Figur 4. Linjär regression av klorofyll a *och totala växtplanktonbiomassan i samtliga 63 st referens-sjöar (blått), samt enbart fjällsjöar (rött). Regressionen baseras på logaritmerade värden för att optimera det linjära sambandet. Streckade linjer anger 95%-igt prediktionsintervall.*

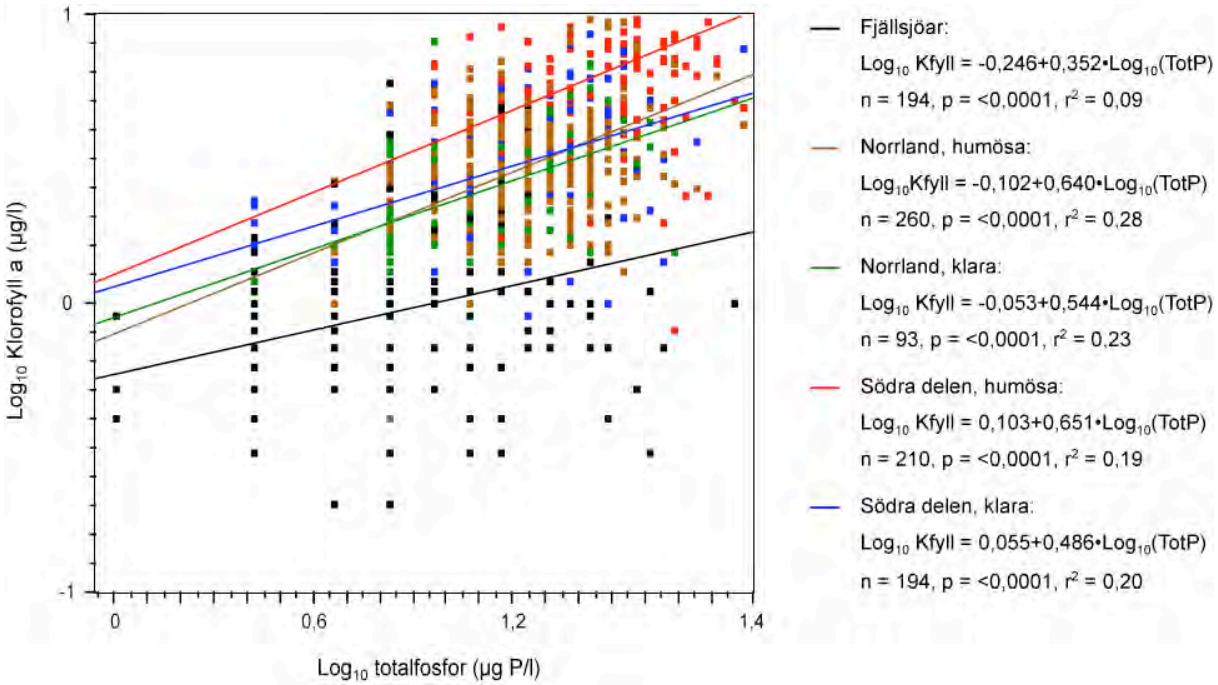
Dessa omvandlade referensvärden ligger även som grund till vårt förslag för typspecifika referensvärden för klorofyll. En jämförelse har gjorts mellan dessa referensvärden och olika statistiska mått på klorofyllhalterna i referenssjöarna (tabell 4 resp. 5). För fjällsjöarna ligger det föreslagna referensvärde väl över samtliga ingående sjöars medelhalt av klorofyll *a* (max 1,0), men i detta fall består referensmaterialet endast av totalt fem sjöar med klorofylldata, vilket gör det svårt att dra några slutsatser över materialet. Fjällsjöarna förefaller dessutom ha ett något avvikande förhållande mellan klorofyll *a* och växtplanktonbiomassan, vilket vid en typspecifik regression ger att betydligt lägre referensvärde (figur 4, resp. tabell 5). Baserat på dels denna typspecifika regression, dels det statistiska underlaget förordar vi att den lägre halten används som referensvärde för fjällsjöar.

Tabell 4. Förslag till referensvärden (µg/l) för totalbiomassan av växtplankton (Willén 2006), samt för klorofyll a *baserat på referensvärdena för totalbiomassan och totalfosfor.*

	Fjällen ovan trädgränsen	Norra Sverige		Södra Sverige	
		klara	humösa	klara	humösa
Totalbiomassa (µ/l)	200	300	500	650	500
Klorofyll *a* (totalbiomassa)*	2,2 (1,4***)	2,8	3,8	4,5	3,8
Klorofyll *a* (totalfosfor)**	1,2	3,1	3,5	3,5	5,7

* Halt av klorofyll *a* motsvarande referensvärdet för totalbiomassan av växtplankton (se figur 4).
** Halt av klorofyll *a* motsvarande referensvärdet för växtplanktonbiomassan om en separat regression görs för fjällsjöarna (se figur 4).
*** Halt av klorofyll *a* motsvarande totalfosforvärdet i ”referensfiltret” (8 µg P/l för fjällsjöar, 10 µg/l för övriga sjöar) baserat på områdesspecifika regressioner av sensommarhalter av klorofyll *a* och totalfosfor (figur 5).

Bilaga 1



Figur 5. Typspecifika linjära regressioner av klorofyll a *och totalfosforhalter i 63 st referenssjöar. Regressionerna baseras på logaritmerade värden för att optimera det linjära sambandet.*

För de klara sjöarna i såväl norrland som i de södra delarna av landet ligger det föreslagna referensvärdet mellan referensmaterialets 75- och 90-percentiler, vilket innebär att mellan 10 och 25 % av de sjöar som passerat ”referensfiltret” skulle med avseende på klorofyll *a* klassas som klass 2 eller sämre (tabell 5). För de mer humösa sjöarna ligger däremot de föreslagna referensvärdena under medianvärdet för respektive sjötyp, vilket innebär att mer än hälften av referenssjöarna skulle klassas ha en god status eller sämre (klass 2 eller sämre). En viktig orsak till denna stora spridning i klorofyllhalter som orsakar denna dåliga överensstämmelse är att vissa av dessa humusrika sjöar kan stundtals uppvisa mycket stora växtplanktonbiomassor som domineras av nålflagellaten *Gonyostomum semen* (gubbslem). Denna mixotrofa växtplanktonart är förhållandevis stor och orsakar ofta mycket höga biomassor när förutsättningarna är gynnsamma. Trots att den vanligen innehåller jämförelsevis mindre klorofyll än växtplankton i genomsnitt, så bidrar de stora biomassorna till förhöjda klorofyllhalter. I förslaget till reviderade bedömningsgrunder för växtplankton har speciell hänsyn tagits till denna art för humösa sjöar ($abs_{filt,\ 420\ nm} > 0{,}06$) i den södra delen av landet, genom att olika referens- och gränsvärden anges för sjöar med eller utan dominans av denna art (Willén 2006). Denna hänsyn är dock omöjlig att ta när man endast har klorofylldata som mått på växtplanktonbiomassan, varför förslagen till referens- och klassgränser för klorofyll måste bortse från detta och vi rekommenderar istället att kompletterande växtplanktonanalyser görs vid behov. Arten förekommer även i vissa humösa sjöar i den norra delen av landet (bl.a. i Sidensjön i Västerbottens län, vilken dock har bedömts vara närsaltsbelastad och därigenom inte passerade ”referensfiltret”). Denna i vissa fall nordliga spridning komplicerar förhållandet mellan de båda bedömningsgrunderna ytterligare, men även i detta fall kan vi endast rekommendera en kompletterande växtplanktonanalys för att utröna orsaken till eventuellt höga klorofyllhalter.

Bilaga 1

Tabell 5. Förslag till referensvärden för klorofyll a *(µg/l) baserat på den statistiska fördelningen av klorofylldata för referenssjöarna. Metoden att använda fördelningens medianvärde, 75-percentil eller annat lämpligt statistiskt mått som referensvärde beskrivs bl.a. i REFCOND Guidance document no. 10 (EC 2003).*

	Fjällen ovan trädgränsen	Norra Sverige*		Södra Sverige*	
		klara	humösa	klara	humösa
Juli-sept					
Referensvärde (median)	0,7	1,6	3,1	2,2	5,6
75-percentil	0,9	2,0	4,2	4,0	9,3
90-percentil	1,0	3,7	5,8	5,4	16,6
Antal sjöar	5	11	34	12	27
Hela säsongen					
Referensvärde (median)	0,7	1,3	2,2	3,0	4,2
75-percentil	0,9	1,7	3,1	3,9	6,2
90-percentil	1,0	3,3	4,4	5,1	9,1
Antal sjöar	5	11	34	12	28

* Områdena motsvarar Illies ekoregioner Fennoskandiska skölden (norra Sverige) och Centralslätten (södra Sverige). Gränsen mellan de norra och södra delarna av landet utgörs av *Limes norrlandicus*. Fjällen ovan trädgränsen motsvarar ekoregionen Boreala höglandet, men med undantag av de delar som ligger nedanför trädgränsen som har överförts till de norrländska sjöarna.

Sammanfattningsvis kan sägas att de föreslagna referensvärdena för klorofyll *a* som erhållits genom omräkning från de totala växtplanktonbiomassorna förefaller kunna fungera väl som referensvärden för klassningen av ekologisk status. Gränsvärdena är konservativa i den meningen att de tenderar till att statusklassningarna snarare fäller än friar och att risken för att man därigenom friklassar objekt som borde fällas minskas. I statistiska termer så är risken för att begå typ II fel mindre på bekostnad av att risken för att begå typ I fel är större.

Test av klassgränser för bedömning av ekologisk status

Klassningar efter klorofyll och växtplanktonbiomassa

I förslaget till reviderade bedömningsgrunder för växtplankton har de föreslagna referensvärdena även använts som gränsvärden mellan hög och god status (klass 1 och 2). Dessa och övriga föreslagna klassgränser har omvandlats till motsvarande klorofyllhalter genom linjär regression (tabell 6). Utfallet från klassningar enligt dessa gränsvärden har jämförts med klassningar enligt förslaget till reviderade bedömningsgrunder för växtplankton (Willén 2006), samt nuvarande bedömningsgrunder för totalfosfor (NV 1999/2000). De referenssjöar som passerat ”referensfiltret”, samt de olika nationella och regionala dataset som har funnits tillhands (se ovan ”Dataunderlag”) har använts som underlag för jämförelserna. Trots att förslaget till reviderade bedömningsgrunder för växtplankton endast anger klassgränser för höstprov har klassningarna för klorofyll *a* genomförts både för höstprov (juli – september) och för säsongsmedelvärden. Anledningen till att även säsongsmedelvärden anses vara viktiga att testa är att man i bland måste genomföra en bedömning med hjälp av det i många fall mycket begränsade material som finns tillgängligt.

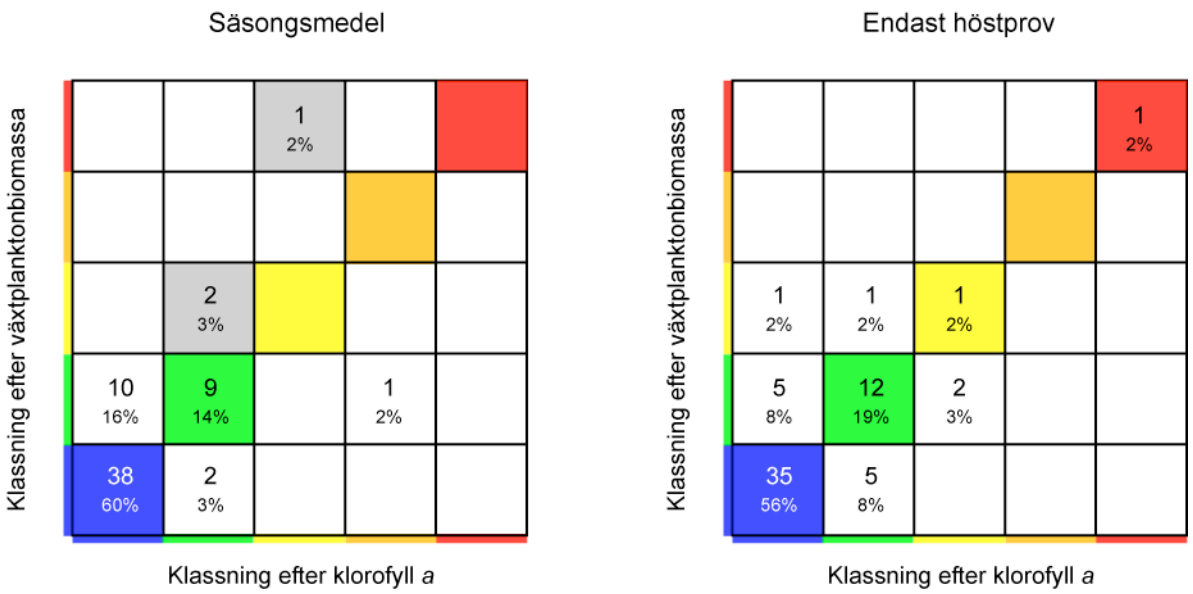
Bilaga 1

Tabell 6. Förslag till referensvärden och klassgränser för bedömningar av ekologisk status med avseende på klorofyll a *(µg/l). Ekologiska kvalitetskvoter (EQR) anges inom parentes.*

Sjötyp	Hög/god*	God/måttlig	Måttlig/otillfredställande	Otillfredställande/dålig
Fjällsjöar	1,5	3,0 (0,50)	3,8 (0,39)	4,5 (0,33)
Norra Sverige, klara	2,8	4,5 (0,62)	6,0 (0,47)	7,0 (0,40)
Norra Sverige, humösa	3,8	6,0 (0,63)	7,5 (0,51)	9,0 (0,42)
Södra Sverige, klara	4,5	10 (0,45)	16 (0,28)	25 (0,18)
Södra Sverige, humösa	4,5	10 (0,45)	16 (0,28)	25 (0,18)

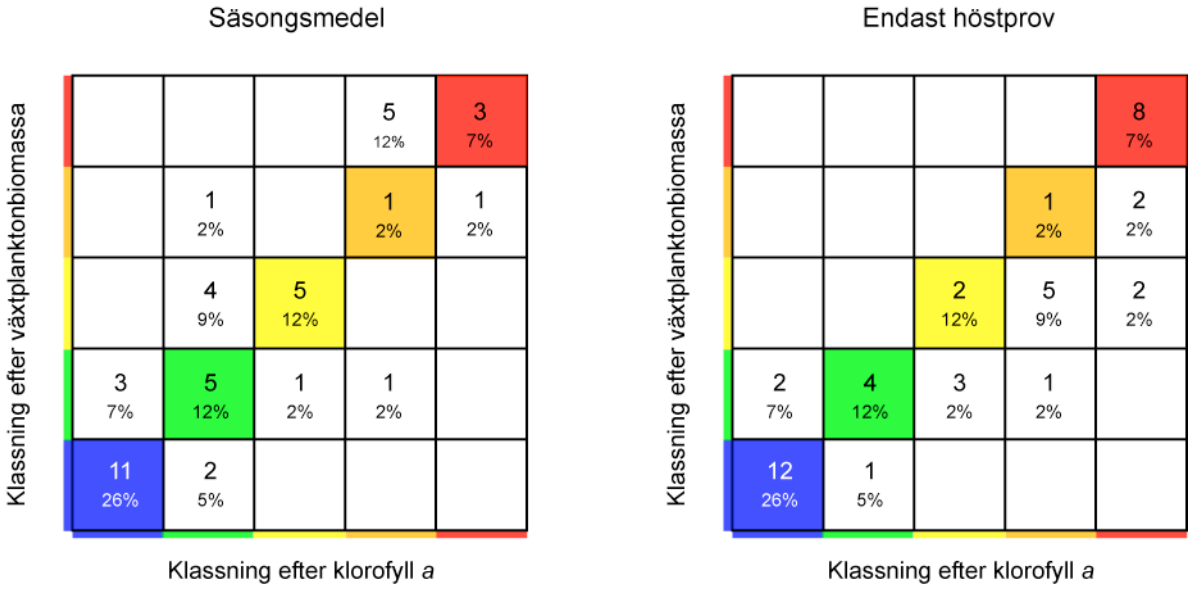
* Gränsvärdet mellan hög och god status föreslås även fungera som referensvärde.

Om mängden höstprov i dessa fall är begränsad måste man ändå kunna göra det bästa av situationen och kunna utnyttja det material som ändå finns tillgängligt. Testerna av såväl referenssjöarna som de tidsseriesjöar som inte passerade ”referensfiltret” tyder dock på att andelen av typ II fel ökar, dvs. att klorofyllklassningen ger en lägre klassning än motsvarande växtplanktonklassning (figur 6 och 7). Anledningen till att felbedömningarna tenderar till att öka är att såväl inomårs- som mellanårsvariationen av klorofyll kan vara avsevärd (figur 8), vilket ökar osäkerheten i bedömningarna. Bedömningar med hjälp av säsongsmedelvärden bör således undvikas om det är möjligt. Likaså bör bedömningar baseras på flerårsmedel-värden för att minska inflytandet av enskilda år. Ett rimligt antal år som medelvärdet bör baseras på är minst tre år, vilket innebär att vi föreslår att bedömningarna skall baseras på treårs-medelvärden av klorofyllhalten under sensommar/höst (juli – september) för att vara så stabila och representativa för sjön som möjligt.

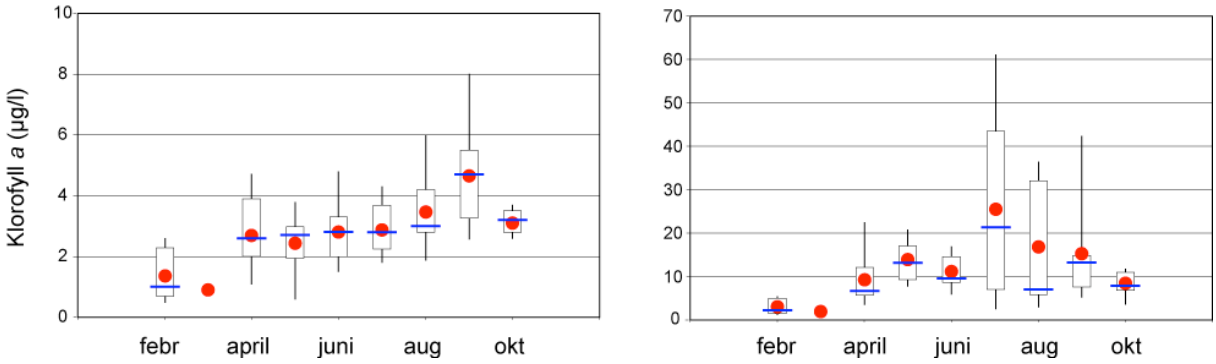


Figur 6. Resultat av statusklassning med avseende på klorofyllhalt och totalbiomassa av växtplankton från de 63 st referenssjöarna. Säsongsmedelhalter respektive höstmedelvärden av klorofyll a *1996 – februari 2005, samt höstmedel av växtplanktonbiomassor 1996 – 2004.*

Bilaga 1



Figur 7. Resultat av statusklassning med avseende på klorofyllhalt och totalbiomassa av växtplankton från 43 st tidsseriesjöar som inte passerade det s.k. referensfiltret. Säsongsmedelhalter respektive höstmedelvärden av klorofyll a *1996 – februari 2005, samt höstmedelvärden av växtplanktonbiomassor 1996 – 2004.*



Figur 8. Variationsskillnader i klorofyllhalt mellan olika månader i de två intensivstuderade referenssjöarna Stora Envättern och Älgsjön. Spridningen under perioden 1996-2004 illustreras med max, min, 25- och 75-percentilerna, samt median (grönt streck) och medelvärden (röd punkt). Älgsjön är en s.k. Gonyostomum-*sjö och uppvisar därför högre klorofyllhalter under sensommaren och en större spridning.*

Jämförelser av klassningar med hjälp av klorofyll och växtplanktonbiomassor för de 63 tidsseriesjöar som passerat ”filtret” och därigenom skall betraktas som ”riktiga” referenssjöar, visar att merparten av dessa klassas ha en hög eller god ekologisk status (klass 1 eller 2), medan i ett fåtal av sjöarna bedöms statusen endast vara måttlig (figur 6). I ett fall klassas sjöns status som dålig (klass 5) med avseende på såväl klorofyll som växtplanktonbiomassan under höstperioden. Denna sjö, Gosjön i Gävleborgs län, uppvisar regelbundet höga biomassor av *Gonyostomum semen*, vilket gör att såväl växtplanktonbiomassan som klorofyll-

halterna ofta är mycket höga. Sjön passerade ändå referensfiltret på grund av dess förhållandevis låga totalfosforhalter när hänsyn tagits till vattnets humusinnehåll. Om man vid klassningen med avseende på växtplanktonbiomassan tar hänsyn till förekomsten av *Gonyostomum* i enlighet med förslaget till reviderade bedömningsgrunder, blir klassningen istället måttlig status (klass 3), dvs. en sänkning med två statusklasser. Förekomst av höga biomassor av denna växtplanktonart är ett problem som är svårlöst när man endast har klorofylldata till hands och kräver kompletterande växtplanktonanalyser för att man skall kunna ta hänsyn till dess förekomst (se ”Referensvärden” ovan).

Jämförelserna av klassningar av klorofyllhalter och växtplanktonbiomassor i de tidsseriesjöar som inte passerade ”filtret” uppvisar naturligt nog en större spridning i ekologisk status än de ”riktiga” referenssjöarna (figur 7). Klorofyllklassningarna tenderar till att bedöma statusen hårdare än växtplanktonklassningarna om man enbart ser till höstproverna, medan spridningen i klassningar blir större och även typ I felen blir vanligare (fler sjöar bedöms ha en bättre status m.a.p. klorofyllhalt jämfört med växtplanktonbiomassan), om man ser till hela vegetationssäsongen.

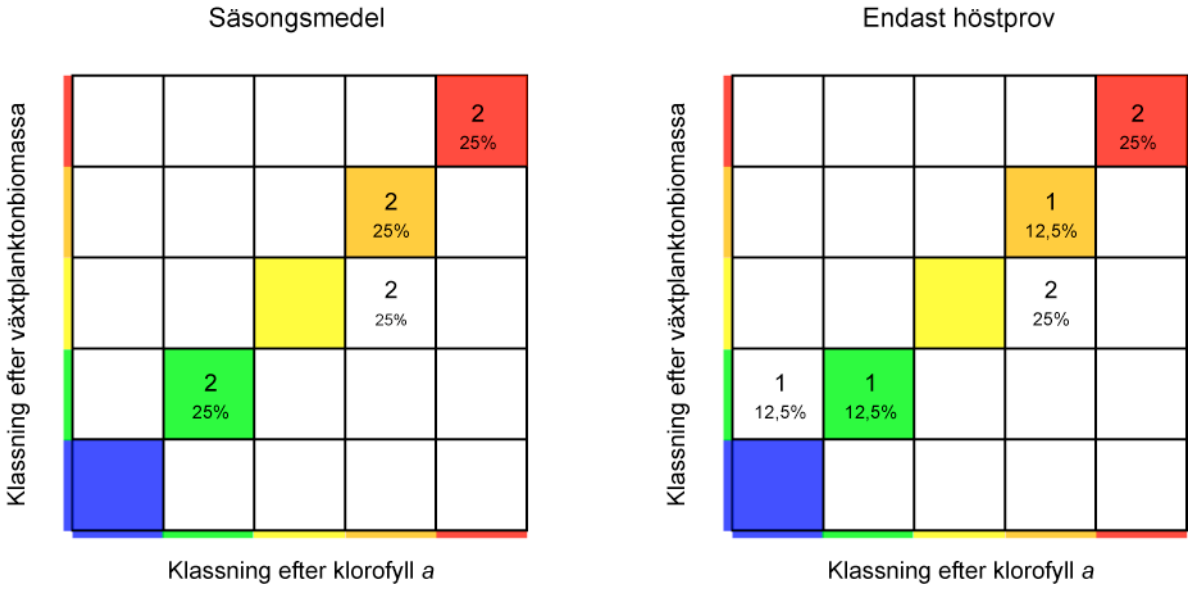
I vissa fall måste man i det praktiska arbetet ge avkall på kraven på att underlaget skall uppfylla vissa krav för att egentligen kunna klassificeras. Som ett exempel har vi tagit med åtta stycken sjöar som tillhör det regionala material där underlagsmaterialet inte har räckt till för att kunna tillämpa ”referensfiltret”. För dessa sjöar matchar inte de vattenkemiska undersökningarna växtplanktonprovtagningarna, utan sjöarna har först undersökt med avseende på växtplankton och något eller några år senare med avseende på den vattenkemiska sammansättningen. Även om det statistiska underlaget är litet så förefaller bedömningarna ha fallit väl ut och inga anmärkningsvärda ”felklassningar” kan urskiljas (figur 9).

För det fortsatta arbetet med bl.a. karakteriseringar av vattenförekomster enligt direktiven i Ramdirektivet kommer olika regionala datamaterial att vara mycket betydelsefulla. Exempel på sådana dataset är olika recipientkontrollprogram som t.ex. SRK (samordnad recipientkontroll). Det test av jämförande klassningar med avseende på klorofyll *a* och växtplanktonbiomassor som här har utförts med SRK-data uppvisar samma tendens som övriga valideringsmaterial, nämligen att klorofyll-klassningarna tenderar till att ge objekten en sämre statusklassning i jämförelse med klassningarna m.a.p. växtplankton (figur 10).

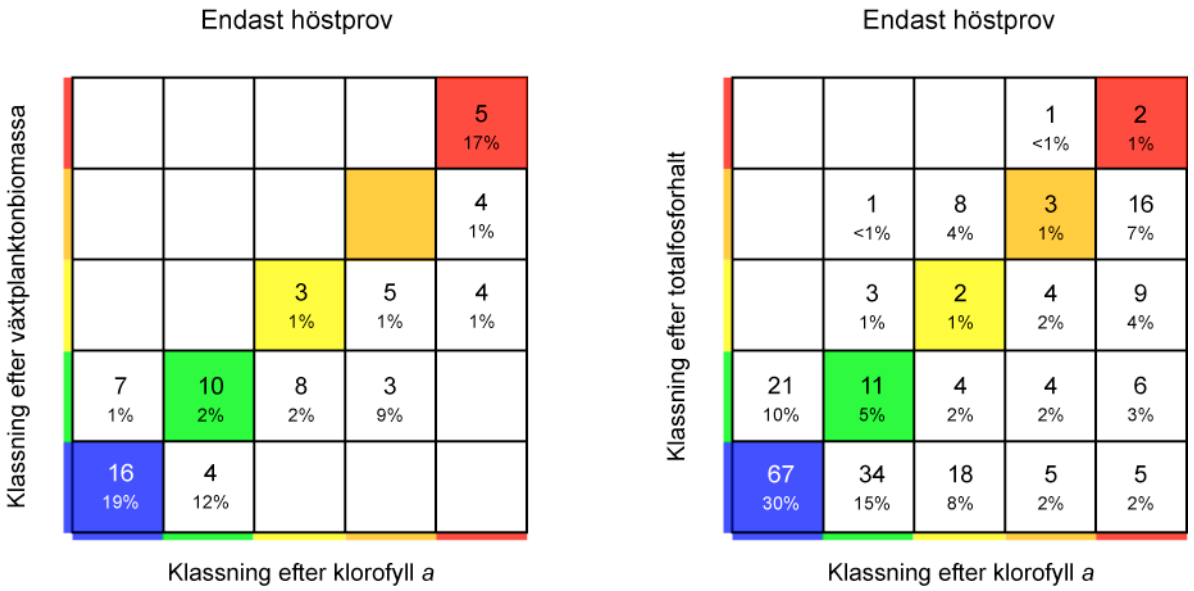
Klassningar efter klorofyll och totalfosfor

I många fall saknas uppgifter på växtplanktonbiomassor i de regionala undersökningsmaterial som har funnits till vårt förfogande. Därför har även en jämförelse gjorts mellan statusklassningar utförda med avseende på klorofyll *a* och totalfosfor. Referensvärden har till dessa jämförelser erhållits genom beräkningar enligt de nuvarande bedömningsgrunderna (NV 1999/2000). Orsaken till detta är att en stor del av det underlag som krävs enligt förslaget till reviderade bedömningsgrunder för eutrofierande ämnen (Wilander 2004) saknas i det aktuella datamaterialet. Jämförelserna mellan klassningar m.a.p. klorofyll *a* och totalfosfor uppvisar samma tendens som i jämförelsen mellan klorofyll- och växtplanktonklassningar (se ovan), nämligen att klassningarna m.a.p. klorofyll tenderar till att ge en sämre status än motsvarande totalfosforklassning (figur 10 och 11).

Bilaga 1

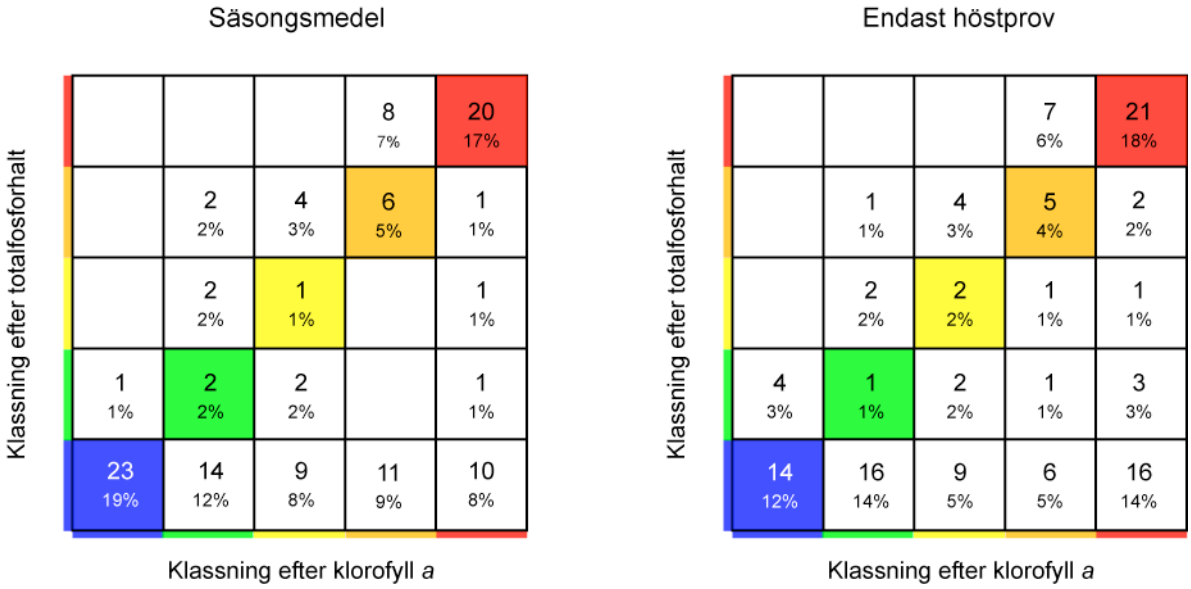


Figur 9. Resultat av statusklassning av 8 st sjöar söder om Limes norrlandicus *med avseende på klorofyllhalt och totalbiomassa av växtplankton. Säsongsmedelhalter respektive höst-medelvärden av klorofyll* a *1997 – 2003, samt växtplanktonbiomassor i augusti – september 1995 – 1996.*



Figur 10. Resultat av statusklassning med avseende på klorofyllhalt och växtplanktonbio-massa (69 sjöar) resp. totalfosforhalt (211 sjöar) inom den samordnade recipientkontrollen (SRK). Klassningar baserade på höstmedelvärden. Klassning av totalfosfor, inkl beräkning av referensvärde, enligt de nuvarande bedömningsgrunderna (NV 1999/2000). Dessa referens-värden användes då en stor del av det underlag som krävs enligt de reviderade bedömnings-grunderna (Wilander 2004) saknas i det aktuella datamaterialet.

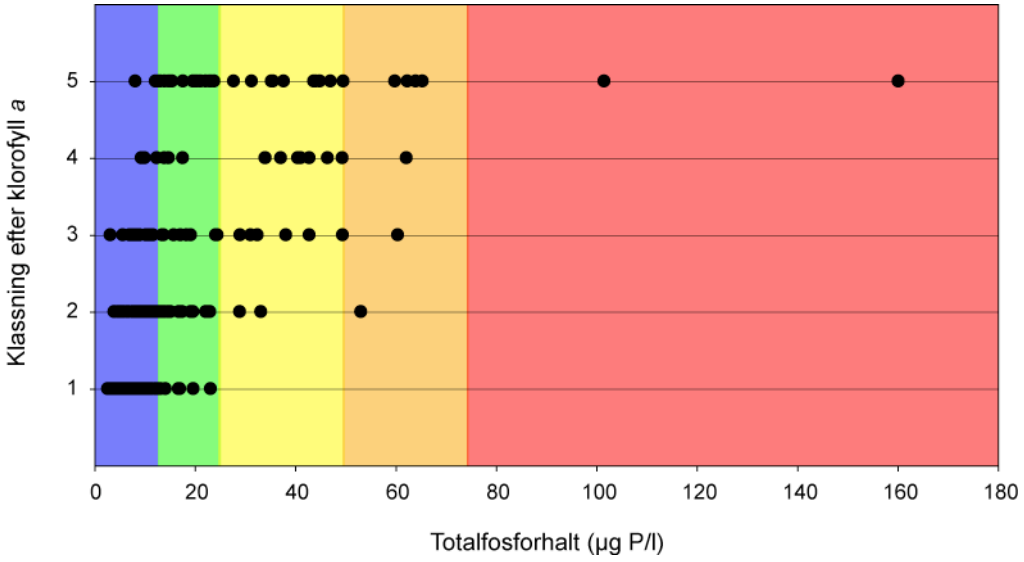
Bilaga 1



Figur 11. Resultat av statusklassning med avseende på klorofyllhalt och totalfosforhalt i 118 st tidsseriesjöar med otillräcklig information för att kunna testas med referensfiltret. Baserat på säsongsmedelvärden, respektive höstmedelvärden (juli – september) av klorofyll a *och totalfosfor. Klassning av totalfosfor, inkl beräkning av referensvärden, enligt de nuvarande bedömningsgrunderna (NV 1999/2000). Dessa referensvärden användes då en stor del av det underlag som krävs enligt de reviderade bedömningsgrunderna (Wilander 2004) saknas i det aktuella datamaterialet.*

”Felklassningarna” i detta fall förefaller dock vara fler och större än för jämförelserna mot växtplanktonbiomassor (figur 6, 7 och 9). Till viss del beror denna större spridning på att totalfosformaterialet är betydligt större än växtplanktonmaterialet, men detta kan inte förklara hela skillnaden. En starkt bidragande orsak till denna noterbart större spridning är att förhållandet mellan totalfosfor- och klorofyllhalten är mindre tydligt jämfört mellan klorofyll *a* och växtplanktonbiomassan. Ett komplicerande faktum är att totalfosfor inte är en substans utan består av fosfor kopplat till flera olika typer av substanser som dött och levande organiskt material (inkl växtplankton), samt oorganiskt material. All denna fosfor är inte direkt biologisk tillgänglig och därigenom saknas den direkta kopplingen mellan totalfosforhalten och växtplanktonbiomassan eller klorofyllhalten. En viktig del av den mindre biotillgängliga organiska fosforfraktionen är humusämnena i vattnet, vilken bland annat tas hänsyn till vid användandet av ”referensfiltret” för att fastställa lokala referenshalter för totalfosfor (se t.ex. Johnson m.fl. 2003, Johnson & Goedkoop 2004). Dessa fosforhaltiga humusämnen kan däremot utnyttjas som energikälla av bl.a. den mixotrofa nålflagellaten *Gonyostomum semen* (gubbslem). Detta komplicerar ytterligare förhållandet mellan de olika klassningsvariablerna totalfosfor, klorofyll *a* och växtplanktonbiomassan, eftersom i ett mixotroft stadium behöver inte dessa organismer så mycket klorofyll.

Sammantaget innebär detta inte helt entydiga förhållande mellan totalfosfor- och klorofyllhalten att spridningen i totalfosforhalt inom en och samma klorofyllstatusklass är betydande och att överlappen mellan olika statusklasser är avsevärd (figur 12).

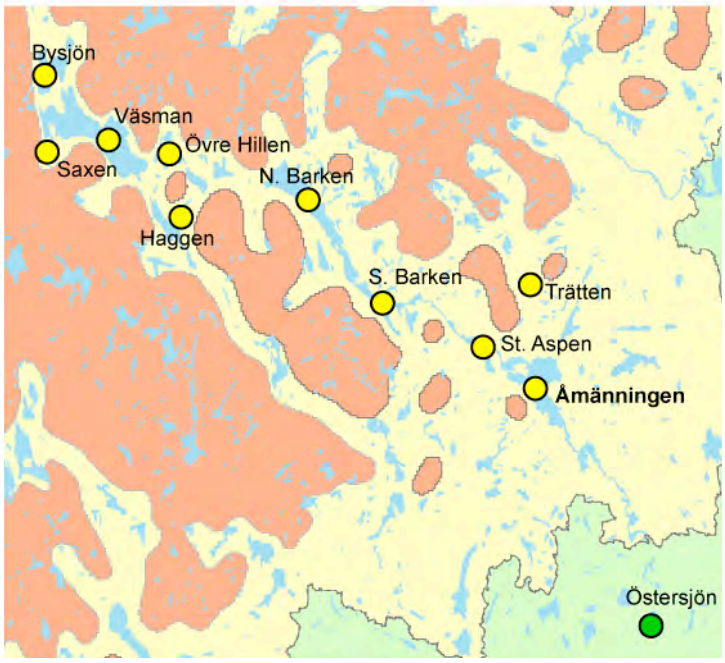


Figur 12. Jämförelse av statusklassning med avseende på klorofyllhalt och totalfosforhalt i 143 st sjöar inom samordnad recipientkontroll (SRK). Baserat på höstmedelvärden (juli – september) för klorofyll a *och totalfosfor. De färgade fälten visar tillståndsklassning med avseende på totalfosfor enligt förslag till nya bedömningsgrunder för eutrofierande ämnen (Wilander 2004), vilket i detta fall överensstämmer med de "gamla" bedömningsgrunderna (NV 1999/2000).*

Effekter på sjöar i gränsområden

För att möjliggöra statusklassning genom typspecifika referensförhållanden måste de enskilda vattenförekomsterna kopplas till en viss vattentyp. Att göra denna indelning är dock inte helt okomplicerat då detta innebär att man i princip typindelar ett kontinuum, vilket medför att framförallt objekt som ligger nära typgränserna riskerar att bli "felklassade". Detta gäller inte minst när man geografiskt delar in sjöar i olika områden baserade på t.ex. klimat, geologi, osv. Här spelar lokalkännedom en viktig roll när man skall utvärdera t.ex. statusklassningar baserade på typspecifika referensvärden och klassgränser. Som ett exempel kan nämnas sjön Åmänningen strax söder om Fagersta i Västmanlands län. Denna sjö klassas med hjälp av kartmaterial tillhöra Illies region Fennoskandiska skölden (figur 13). En statusklassning av klorofyllhalterna i sjön med hjälp av de typspecifika gränsvärden som här föreslås (tabell 4) ger en ekologisk status med avseende på klorofyll *a* som motsvarar dålig status (klass 5). Om sjön istället hade legat 20-30 km längre söder ut hade den ekologiska statusen klassats som knappt måttlig (strax över gränsen till klass 3). Som jämförelse kan nämnas att statusen för samma sjö klassas som måttlig respektive god med avseende på växtplanktonbiomassan (klass 3 resp. 2), samt god m.a.p. totalfosforhalten (klass 2 enligt nuvarande bedömnings-grunder för totalfosfor). Denna typ av olika bedömningar kan få stora konsekvenser rörande hur objektet skall övervakas och eventuellt åtgärdas i framtiden, speciellt om principen "one-out-all-out" skall gälla för samtliga kvalitetselement.

Bilaga 1



Figur 13. Fördelningen av sjöar inom Kolbäcksåns avrinningsområde på de sjölimniska regionerna 2 (rött) och 3 (gult), vilka ungefär motsvarar Illies ekoregion Fennoskandiska skölden, samt region 4 (grönt) som motsvarar Centralslätten (jfr. figur 1).

Metoder för provtagning och analys av klorofyll

Vattenprov för analys av klorofyll *a* skall vara så representativt för epilimnion (dvs. vattnet ovanför språngskiktet) som möjligt. Vanligen är dock att man endast har ett ytprov (0,5 m), vilket även används för bestämning av den övriga vattenkemiska sammansättningen. Samtliga steg i provberednings- och analysförfarandet bör överensstämma med gällande standardmetoder (SS 02 81 46 och 02 81 70) eller likvärdigt om andra analysmetoder används. Nedan ges en del kortfattade instruktioner rörande provberedning och provförvaring vid spektrofotometrisk bestämning. För fullständig beskrivning se respektive standardmetodbeskrivning.

Analysmetoder

Växtpigment kan mätas på ett flertal olika sätt. Den vanligaste metoden i sötvatten är spektrofotometrisk bestämning efter extraktion i antingen aceton eller metanol. Andra analysmetoder är fluorometrisk bestämning, HPLC (High Pressure Liquide Chromatography), samt pigmentkänsliga elektroder. HPLC och fluorometriska analyser sker framförallt i forskningssyfte då de är relativt kostsamma. Fluorometriska bestämningar görs även vid synoptiska studier i stora sjöar eller i havsmiljön.

Spektrofotometriska metoder

Det finns två metoder för bestämning av klorofyll som svensk standard. Båda är spektrofotometriska metoder som ger ett mått på klorofyll *a*. Den huvudsakliga skillnaden mellan metoderna är vilket extraktionsmedel som används. Vid den traditionellt sett vanligast förekom-

mande metoden används aceton (SS 02 81 46) för att extrahera ut pigmenten ur växtplankton-cellerna, medan den andra standardmetoden använder sig av metanol (SS 02 81 70). Därutöver kan även etanol användas som extraktionsmedel, men detta är mer sällsynt och svensk standardmetod saknas. Metanol och etanol är effektivare än aceton som extraktionsmedel, vilket gör att man i allmänhet inte behöver homogenisera provfiltret före analysen, medan acetonmetoden kräver att filtret homogeniseras för att extraktionen skall vara tillräckligt effektiv (t.ex. Wetzel & Likens 1991). Den uppenbara nackdelen att använda sig av metanol istället för aceton är att metanol är mer giftigt och därigenom ställer högre säkerhetskrav för hanteringen. Metanol- och etanolextraktionerna är dessutom mycket känsliga för mängden syra som tillsätts vid feofytinbestämningar och minsta mängd för mycket kan orsaka kraftiga felbestämningar av feofytinhalten (Wetzel & Likens 1991).

Skillnaden i halt av klorofyll *a* mellan olika analysmetoder som spektrofotometriska metoder, fluorometri och HPLC är ofta mindre än 10 % (Wetzel & Likens 1991). En viktig felkälla vid spektrofotometriska metoder är att våglängderna är korrekt kalibrerade och inställda då felaktiga våglängder kan resultera i betydande felbestämningar (SWCSMH 2006).

Metoden som extraherar klorofyllet med aceton gör mätningar av absorbans vid fyra våglängder, varav en (vid 750 nm) används för kompensation av grumlighet hos extraktet, den kallas ibland trikromatisk metod. Beräkningen inbegriper en kompensation för förekomsten av andra pigment än klorofyll *a*. En variant av standardmetoden medger kompensation för feofytiner, dvs. nedbrytningsprodukter av klorofyller. Feofytinerna bestäms efter syratillsats som medför att klorofyllmolekylens centrala magnesiumatom avlägsnas. Skillnaden mellan totalbestämningen och feofytinhalten benämns korrigerat klorofyll *a* och anses motsvara representera andelen aktiva växtplankton (t.ex. Wetzel & Likens 1991).

Fluorometriska metoder

Förutom de ovan nämnda standardiserade spektrofotometriska metoderna används ibland även fluorometri, särskilt vid synoptiska studier i stora sjöar eller vid marina studier. Metoden är även lämplig då man av någon anledning inte vill förstöra sitt prov, eftersom metoden kan användas på ett färskt prov utan någon förbehandling och dessutom inte förstör provet. För att kunna användas kräver metoden dock en kalibrering mot kända pigmenthalter. En komplikation vid analyser av naturvatten är att hänsyn måste tas till att fluorescensen från cyanobakterier skiljer sig åt från andra växtplankton (Tolstoy 1977).

Provberedning och förvaring vid spektrofotometrisk bestämning

Vattenproverna skall filtreras snarast möjligt, helst inte i direkt solljus för att undvika nedbrytning av klorofyllet. Om filtrering inte kan ske ute i fält skall proverna förvaras svalt och mörkt, dock högst ett dygn. Standardmetoderna anger dock i detta avseende olika maximala tider för provförvaring. Aceton-standarden (SS 02 81 46) anger att proverna maximalt får förvaras åtta timmar före filtrering, men förutsatt att proverna förvaras svalt och mörkt direkt efter provtagningen torde förvaring upp till ett dygn kunna accepteras såsom metanol-standarden föreskriver (SS 02 81 70).

Så stor vattenmängd som möjligt bör filtreras för att erhålla en så god precision i analysen som möjligt. Vanligen filtreras 1-2 liter under vegetationsperioden, men större vattenvolymer kan behövas om det är lite växtplankton i vattnet. Likaså kan även mindre vattenmängder behöva filtreras om det är mycket växtplankton i vattnet, framförallt för att inte filtret skall

sätta igen och i värsta fall gå sönder. Det är ytterst viktigt att den filtrerade vattenmängden är kvantifierad med god noggrannhet, eftersom precisionen på analysen avgörs av hur mycket vatten som har filtrerats. Filtret kan sedan antingen lufttorkas (SS 02 81 46) eller i exsickator (SS 02 81 70). Filtret bör därefter analyseras så snart som möjligt, men kan förvaras djupfryst (-20°C) i upp till tre månader före analys.

Kommentarer

Vid utvärderingar av klorofylldata är det viktigt att tänka på att klorofyllhalten endast ger ett grovt mått på växtplanktonbiomassan och kan inte helt ersätta växtplanktonanalyser. Att dessa analysmetoder inte är helt jämförbara beror dels på osäkerheter i klorofyllbestämningarna, dels på att olika växtplanktonarter innehåller varierande mängder av klorofyll *a*, samt i många fall kompletterat med andra klorofyller eller andra pigment. Eftersom klorofyllanalyser är jämförelsevis snabba och billiga, kan de vara ett gott komplement vid t.ex. screeningstudier eller långtidsövervakning. Eventuella förändringar eller avvikande halter bör dock alltid följas upp med en kompletterande och verifierande växtplanktonanalys för att utreda orsaken till förändringen eller avvikelsen. Ett problem med klorofyllanalyser är att man inte kan särskilja på förhöjda halter orsakade av den storväxta nålflagellaten *Gonyostomum semen* (gubbslem), vilken särskiljs i förslaget till reviderade bedömningsgrunder för växtplankton (Willén 2006). I dessa bedömningsgrunder anges olika gränsvärden för humösa sjöar i södra Sverige med eller utan *Gonyostomum*, där ”*Gonyostomum*-sjöarna” har högre gränsvärden än andra humösa sjöar. Denna växtplanktonart är mixotrof och förekommer framförallt i bruna humusrika vatten, men kan även förekomma i mindre humusrika vatten förutsatt att något annat organiskt material kan utnyttjas som energikälla. Eftersom man med ett klorofyllprov inte kan säga om växtplanktonbiomassan domineras av *Gonyostomum* eller ej och att arten även finns i de nordliga delarna av landet, anser vi att samtliga fall med förhöjda klorofyllhalter (klass 3 eller högre) i humösa vatten bör kompletteras med en växtplanktonanalys för att verifiera om arten har orsakat den förhöjda klorofyllhalten eller ej.

Vid jämförelser mellan klassningar med avseende på klorofyll *a* och totala växtplanktonbiomassor är det uppenbart att variationen är stor. Detta beror som tidigare nämnts bl.a. på osäkerheter i klorofyllanalyser och att växtplanktonarter innehåller olika mycket klorofyll. En annan viktig orsak till att det finns en viss skillnad mellan klorofyllhalterna och växtplanktonbiomassorna är att analyserna vanligen inte har skett på samma vattenprov. Klorofyllanalyserna har i allmänhet utförts på ytvattenprov (0,5 m), medan växtplanktonanalyserna gjorts på integrerade prov som skall motsvara vattenmassan ovan temperatursprångskiktet. Eftersom växtplankton i allmänhet inte är homogent fördelade i vattenmassan kan detta orsaka stora skillnader om man jämför integrerade prov med ytvattenprov. Skillnaden kanske är mest uppenbar vid lugn väderlek under sommaren då cyanobakterier ofta tenderar att ansamlas i ytvattnet och då riskerar att bli överrepresenterade i ett ytprov. Likaså kan eventuell ansamling av t.ex. *Gonyostomum* vid temperatursprångskiktet ge betydligt högre biomassor jämfört med ytnära prover. Denna skillnad mellan ytvattenprov och integrerade prov är dock ofrånkomlig och speglar egentligen verkligheten väl, där bedömningar av ekologisk status med avseende på klorofyllhalt framförallt kommer att ske på ytprov.

I de ovan utförda testerna av hur vårt förslag till reviderade bedömningsgrunder för klorofyll matchar motsvarande förslag till bedömningsgrunder för växtplankton tenderade klorofyllklassningarna till att överlag ge en strängare klassning än motsvarande för växtplankton (dvs. klassningarna blev överlag högre). Att klorofyllklassningarna gav en lägre statusklassning än

växtplanktonklassningarna var ovanligt, i alla fall om man endast bedömde sensommar- och höstproverna (juli-september). Detta bådar gott eftersom klorofyll endast skall ses som ett grovt mått på växtplanktonbiomassan och därigenom hellre bör ”fälla” än ”fria”, dvs. bör bedöma statusen strängare än växtplanktonklassningarna. En sjö bör däremot inte fällas enkom pga. höga klorofyllhalter, utan kompletterande analyser av t.ex. växtplankton bör göras för att utreda orsaken och att säkerställa sjöns ekologiska status inför eventuella åtgärder som kan behöva vidtas för att vidmakthålla god ekologisk status.

Litteratur

EC 2003. Common Implementation Strategy or the Water Framework Directive (2000/60/EC). Guidance document no. 10. River and lakes – typology, reference conditions and classification systems. European Commission, Luxemburg.

JOHNSON R.K., GOEDKOOP W., WILLÉN E. & LARSSON D. 2003. Typanpassning av referens-sjöar och vattendrag: Kritisk granskning av biologiska kvalitetsfaktorer med bedömnings-grunder. Institutionen för miljöanalys, SLU, Rapport 2003:17.

JOHNSON R.K. & GOEDKOOP W. 2004. Typanpassning av referenssjöar och vattendrag: En granskning av den föreslagna svenska sötvattenstypologin avseende bottenfauna. Institutionen för miljöanalys, SLU, Rapport 2004:4.

MILLER S.R., AUGUSTINE S., OLSON T.L., BLANKENSHIP R.E. SELKER J. & WOOD M. 2005. Discovery of a free-living chlorophyll d-producing cyanobacterium with a hybrid proteo-bacterial/cyanobacterial small-subunit rRNA gene. PNAS 102:3, s 850-855.

NV 1999/2000. Bedömningsgrunder för miljökvalitet – Sjöar och vattendrag. Naturvårds-verket, Rapport 4913.

SOLHEIM A.L. (ed) 2005. Reference conditions of European Lakes – Indicators and methods for the Water Framework Directive Assessment of Reference conditions. Manuskript 2005-12-30.

SONESTEN L., WALLIN M., KARLSSON B. & NISELL J. 2004. Preliminär tillståndsbedömning av vattenkemiska och biologiska kvalitetsfaktorer i svenska sjöar och vattendrag baserat på rapporteringsområden – Underlag inför Ramdirektivsrapporteringen 2005. Institutionen för miljöanalys.

SS 02 81 46. Vattenundersökningar – Bestämning av klorofyll i vatten – Extraktion med aceton – Spektrofotometrisk metod. Fastställd 1980-05-20

SS 02 81 70. Vattenundersökningar – Bestämning av klorofyll *a* i vatten – Extraktion med metanol – Spektrofotometrisk metod. Fastställd 1983-05-20

SWCSMH 2006. Soil & Water Conservation Society of Metro Halifax (SWCSMH) hemsida för klorofyllanalyser: http://lakes.chebucto.org/DATA/PARAMETERS/CHA/cha.html (publicerad 2006-02-26).

TOLSTOY A. 1977. Methods for determining chlorophyll *a* in phytoplankton. SNV PM 831.

WETZEL R.G. & LIKENS G.E. 1991. Limnological analyses. 2nd ed. Springer-Verlag, N.Y.

WILANDER A. 2004. Förslag till bedömningsgrunder för eutrofierande ämnen. Institutionen för miljöanalys, SLU, Rapport 2004:19.

WILLÉN E. 2006. Planktiska alger i sjöar – Bedömningsgrunder. Inst. för miljöanalys, SLU.