

Inhoudsopgave

1	Doel en toepassingsgebied	2
2	Termen en definities	2
3	Beginsel	2
4	Chemicaliën en reagentia	2
4.1	Chemicaliën	2
4.2	Reagentia	3
5	Toestellen en hulpmiddelen	3
6	Analyse monsters	4
6.1	Conservering	4
6.2	Monsterontvangst	4
7	Werkwijze	4
7.1	Voorbereiding	4
7.2	Opdrachtcontrole	4
7.3	Inzetten van de cuvet	4
7.4	Analyse	5
7.5	Aanvullende analyses	6
8	Berekening van dichtheid en biovolume	7
9	Kwaliteit	7
9.1	Eerstelijnscontrole	7
9.2	Tweedelijnscontrole en afstemming:	8
9.3	Derdelijnscontrole	8
9.4	Overige borgingspunten	8
10	Opleiding	8
11	Gegevensverwerking en rapportage	8
12	ARBO, Veiligheid en Milieu	8
13	Documenten	8
14	Formulieren	8
15	Literatuur	8
16	Wijzigingen t.o.v. vorige versie	9
17	Bijlagen	9

1 Doel en toepassingsgebied

Dit analysevoorschrift behandelt de kwalitatieve en kwantitatieve methoden voor een fytoplankton analyse conform NEN-EN 15204: fytoplankton telling met gebruikmaking van een omkeermicroscop de zogenaamde Utermöhl techniek (PDC test: Fytoplankton telling; Fytoplankton screening; Fytoplankton biovolume). Dit voorschrift is van toepassing op monsters uit het oppervlaktewater.

2 Termen en definities

Abundantie	In dit voorschrift uitgedrukt als aantal cellen per oppervlakte- en volume-eenheid in het beeldveld van de cuvet.
Aerotopen	Gasvacuoles/gasblaasjes
Beeldveld	Microscopiebeeld waar het fytoplankton in wordt geteld
Biovolume	Ingenomen fotosynthetisch actief volume aandeel inclusief een celwand
Blauwalgen (cyanobacteriën)	Een groep foto-autotrofe bacteriën die in veel opzichten aan algen doen denken
Chlorofyl-a	Licht invangend pigment betrokken bij fotosynthese
Coenobium	Een kolonie die bestaat uit een bepaald vast aantal cellen zonder signaal overdracht met weinig of geen specialisatie
Conserveren	Het langdurig bewaren of behouden van biologisch materiaal meestal door toevoeging van een conserveringsmiddel of door invriezen
Cuvet	Bezinkingskamer voor fytoplankton tellingen
Determineren	Het op naam brengen van fytoplankton aan de hand van determinatieliteratuur
Detritus	Niet levend organisch materiaal
Dichtheid	Microscopisch bepaalde hoeveelheid cellen per volume-eenheid
Filament (trichoom)	Een draad van achter elkaar geplaatste cellen meestal in één rij
Fixeren	Protectie tegen cel afbraak en beëindiging van biologisch leven met behoud van karakteristieke kenmerken door toevoeging van een fixatiemiddel en/of het vastmaken van bijvoorbeeld kiezelwieren of bacteriën op een objectglasje zodat ze kunnen worden geteld en in het geval van bacteriën kunnen worden gekleurd zonder weg te spoelen
Fytoplankton	Verzamelnaam voor kleine, vrijlevende, gesuspendeerde, foto-autotrofe (eukaryotische) organismen en cyanobacteriën die vrij zweven in het oppervlaktewater
Homogene verdeling	Gelijkmatige verdeling van het fytoplankton op de bodem van de sedimentatiekamer
Screening	Snelle inschatting van de dichtheid aan fytoplankton om het inzetvolume te bepalen
Soortenlijst	De lijst van soorten in een monster of een gebied; meestal alleen de soorten van een bepaalde taxonomische of functionele groep
Waarneming	Een getelde eenheid van fytoplankton. Bij algen kan een waarneming bestaan uit één of meer algencellen (bijvoorbeeld coenobium, filament) die als een zelfstandig deeltje in het water aanwezig is.

3 Beginsel

Met een omkeermicroscop wordt het fytoplankton uit een oppervlaktewater monster geteld en omgerekend naar individuen of het aantal cellen per ml. Op aanvraag wordt biovolume gemeten en uitgedrukt in mm³/l gerapporteerd.

4 Chemicaliën en reagentia

4.1 Chemicaliën

4.1.1	Lugoloplossing	Boom, ERP nr. 320100
4.1.2	Ethanol	C ₂ H ₅ OH 96 %
4.1.3	Gefiltreerd kraanwater	Filtreren over 0,2 µm filter
4.1.4	Waterstofperoxide	30%
4.1.5	Naphrax	
4.1.6	Tolueen	

4.2 Reagentia

4.2.1 Verdunningswater

Geacclimatiseerd gefiltreerd kraanwater verdund met Lugol (4.1.1; zie toepassing in 7.2). Om geen vormverandering van fytoplankton te krijgen als gevolg van osmose. Aan het water is lugol (4.1.1) toegevoegd om dezelfde kleur te krijgen als het monster.

4.2.2 Verdunde Naphrax

Naphrax wordt gebruikt om kiezelwieren in te sluiten. Om de viscositeit van de Naphrax -oplossing (4.1.5) te verbeteren worden 10 druppels tolueen (4.1.6) toegevoegd aan het flesje.

5 Toestellen en hulpmiddelen

	Apparatuur/hulpmiddel	Info
5.1	Gekalibreerde omkeer microscoop	20x, 60x PlanApochromaat olie immersie objectieven
5.2	Gekalibreerde rechtop staande microscoop	
5.3	Digitale camera	12 megapixels
5.4	Oculair uitgerust met kruis meetoculair	Gevalideerd met een micrometer
5.5	Beeldanalyse -en verwerking programma CellSens Dimension	
5.6	Waterbad zonder schud functie	Ingesteld op 90°C ± 2°C
5.7	Telapparaat	Mechanisch
5.8	Pasteurpipetten	Glas
5.9	Horlogeglas	
5.10	Petriskaal met deksel	
5.11	Spuutfles met gefiltreerd kraanwater	
5.12	Volume instelbare pipetpistool 0.5 - 5 ml	kalibratie volgens P022
5.13	Volume instelbare pipet 100 - 1000 µl	kalibratie volgens P022
5.14	Rietpipet 1000 µl met een grotere opening (>3 mm)	kalibratie volgens P022
5.15	Hydrobios Cuvet 5 ml	(o.a. voor hogere verdunning) met oppervlakte percentage beeldveld voor 200x en 600x
5.16	Cuvetkast	Geïsoleerde kast (verschil met ruimtetemperatuur max 2°C)
5.17	Geacclimatiseerde ruimte	Ruimte met temperatuurverloop van max 3°C.
5.18	Objectglazen 27x26 mm	
5.19	Dekglasjes 24x50 mm	
5.20	Dekglasjes 18x18 mm en 0.18mm dik	
5.21	Bodem dekglass voor de Hydrobios cuvet 0.2mm x 27mm	
5.22	Grote warmte isolerende perspex werkplaat	
5.23	Kleine perspex cuvet onderzetplaat	
5.24	Kookplaat	
5.25	Plastic scintillatie flesje 25ml	
5.26	Invoer programma Countmanager	Versie 6.3, in de loop van 2023 wordt Aquadesk geïmplementeerd
5.27	Gekalibreerd objectmicrometerglasje	
5.28	Erlenmeyer 150 ml	
5.29	Centrifuge	
5.30	Centrifuge buisjes	100 ml glas met conische uitloop
5.31	Reageerbuis met dop	

6 Analyse monsters

6.1 Conservering

Monsters worden bij monsternamen geconserveerd met lugol (4.1.1).

6.2 Monsterontvangst

De aangeleverde pot met gefixeerd monstermateriaal wordt door een analist op het laboratorium visueel op kleur beoordeeld. Als de kleur van het monstermateriaal met toegevoegd Lugol (4.1.1) in de monsterpot niet Cognac-kleurig maar een tint lichter is, wordt extra Lugol (4.1.1) toegevoegd (meestal enkele druppels om het geheel tot de juiste kleur te brengen). Na het op kleur brengen van het monster wordt dit in de koeling geplaatst. Indien de kleur niet afwijkt, wordt het direct in de koeling geplaatst. Binnen 12 maanden dienen de monsters te worden geanalyseerd.

7 Werkwijze

7.1 Voorbereiding

- Er wordt gebruik gemaakt van een actuele TWN lijst. Deze wordt minimaal 1x per jaar vernieuwd (voor het determinatie seizoen).
- Er wordt gedetermineerd in een geacclimatiseerde ruimte (5.17) met een temperatuuruitloop van max 3°C om de monsters tijdens de analyse op constante temperatuur te houden
- Voor het verkrijgen van een goede homogeniteit in het beeldveld van de cuvet (5.15) onder de omkeer microscoop (5.1) en om convectiestromingen in het beeldveld te vermijden moeten alle temperatuurgevoelige materialen van glas, de hydrobios cuvetten (5.15) en de monsters acclimatiseren tot omgevingstemperatuur.
- Een te analyseren monsterpotje wordt ingezet en tot het moment van analyse in de cuvetkast (5.16) geplaatst.

7.2 Opdrachtcontrole

Op verzoek van de klant kunnen voor onderstaande onderdelen nadere afspraken zijn gemaakt:

- Biovolume
- Determinatie tot een gewenst taxonomisch niveau;
- Het gewenst aantal waarnemingen (b.v. 100 of 200 of anders)
- Aanvullend droogpreparaat voor kiezelwieren
- Score van zogenaamde nulsoorten

7.3 Inzetten van de cuvet

Bij het inzetten van de verdunning wordt gebruik gemaakt van een pipet (5.14). Zie voor de verdunningsstappen en de te kiezen transfer pipet onderstaande tabel.

Tabel 1: Hydrobioscuvet van 5 ml

Verdunning	Monster (ml)	Verdunningswater (ml) 4.2.1.
Onverdund	5	0
5 x	1	4
10 x	0.5	4.5
20 x	0.25	4.75

Het inzetten van een monster in een Hydrobioscuvet (5.15) doorloopt de volgende stappen:

- Plaats een monsterpot naast een petrischaal met deksel (5.10) en daarin een dun laagje water en een cuvet (5.15).
- Homogeniseer het monster in de monsterpot met schudbewegingen langs 3 assen zoals omschreven in het kwaliteitshandboek (Handboek Hydrobiologie IV bijlage 13).
- Maak je gebruik van een instelbare 0.5-5ml pipetpistool (5.12). Neem direct een monster uit de monsterfles en houdt de pipetpunt boven het midden van de cuvet (5.15). Of eenvoudiger: Vul de gehele cuvet (5.15) af met monster (indien gepipetteerd wordt gebruik een rietpipet (5.14).

- Bij een verdunning worden de verdunningsstappen uitgevoerd met verdunningswater (4.2.1) en monstermateriaal volgens de Tabel 1.
- Dek de cuvet (5.15) af met een afdekglas. Dit doe je met een vloeiende en glijdende beweging zodat er geen luchtbellen onder het afdekglas ontstaan
- Sluit de petrischaal (5.10) opnieuw af.
- Zet de petrischaal (5.10) in de hiervoor geacclimatiseerde cuvetkast (5.16) en plaats het corresponderende monsterpotje op de petrischaal (5.10).
- Per hoogte van 1 cm moet minimaal vier uur bezinkingstijd worden aangehouden

7.4 Analyse

Bij aanvang van een analyse wordt het programma Countmanager (5.26) geopend. De gegevens van het monster (locatie, datum, LIMSnummer) worden ingevoerd. Het programma Countmanager (5.26) werkt met Subsamples. Wanneer een analyse is uitgevoerd wordt het eindresultaat automatisch berekend aan de hand van het aantal Subsamples (deeltellingen), de ingezette hoeveelheid monster (al dan niet verdund), de gehanteerde vergrotingen en aantal getelde beeldvelden.

Een analyse doorloopt de volgende stappen:

- Verkenning (7.4.1)
- Telling (7.4.2)
- Invoer van de gegevens in Countmanager (7.4.3)

7.4.1 Verkenning

In de verkenningfase wordt bij een lage vergroting (100 tot 200 x) gekeken of de cellen en deeltjes homogeen verdeeld liggen in het beeldveld en het cuvet (5.15) en deze ook niet zweven. Geschat moet worden hoeveel deeltellingen er uit gevoerd dienen te worden, of het een soortenrijkmonster betreft en tenslotte welke vergrotingen worden gehanteerd.

Homogene verdeling

- Verken het monster om er mee vertrouwd te raken
- Kijk o.a. naar detritus, soortenrijkdom, of de algen bij gebruik van het olie immersie objectief van het bezinkingsoppervlak loskomen en niet gaan “zweven”
- Oefen een visuele controle uit of de cellen in de cuvet (5.15) homogeen verdeeld liggen door te kijken of de deeltjes qua grootte aan de randen en in het centrum van de cuvet (5.15) gelijkmatig verspreid in verschillende beeldvelden verdeeld liggen.
- Indien geen homogene verdeling wordt het monster opnieuw ingezet

7.4.2 Telling

- Per subsample worden minimaal vijf random beeldvelden geteld.
- Een telling bestaat uit een analyse bij een vergroting van 200 en 600 maal. Er worden zoveel beeldvelden geteld tot het aantal van 200 waarneming is bereikt. Per beeldveld worden alle soorten gedetermineerd en het aantal volledig geteld. Noteer het aantal beeldvelden per subsample in Count (5.26).
- Bij een monster met een zeer lage dichtheid (zie 7.4) worden maximaal 200 random beeldvelden geteld
- Waarnemingen worden benoemd tot een zo hoog mogelijk taxonomisch niveau en het aantal cellen van een waarneming wordt geteld (bij grote aantallen cellen in een waarneming geschat).
- Alleen plankton dat tot fotosynthese is staat is en bijdraagt aan primaire productie wordt in een telling meegenomen. Dan zijn de cellen gekleurd (blauwalgen) of in de cel zijn chloroplasten te zien.
- Een cuvet (5.15) wordt na analyse schoongemaakt en voorzien van een nieuw basisglasplaatje (5.21).
- De lenzen van de objectieven en oculairs worden aan het eind van iedere werkdag schoongemaakt met lensdoekjes.

7.4.3 Invoer van gegevens in Countmanager (5.26).

Na afloop van de telling wordt de analyse opgeslagen in Countmanager (5.26). Hiervoor worden de volgende stappen nog toegevoegd:

- In Countmanager (5.26) worden het aantal subsamples met het ingezette volume van het monster en het oppervlaktepercentage behorend bij de vergroting definitief ingevoerd
- Het aantal beeldvelden wordt vermenigvuldigd met het oppervlaktepercentage van één beeldveld waarbij rekening wordt gehouden met de vergroting en beeldveldoppervlaktepercentage ten opzichte van de gehele cuvet (5.15).
- Het inzetvolume van het monster wordt ingevoerd
- Voer in de Infotab van de Countmanager per aangemaakte subsample(s) in ieder geval in: verdunning, het aantal getelde beeldvelden, vergroting en het moment van inzetten.

7.5 Aanvullende analyses

7.5.1 Pelagische diatomeeën

Van de diatomeeën die gedurende de determinatie in een cuvet (5.15) niet aan de hand van de chloroplast op naam kunnen worden gebracht, wordt op aanvraag van de opdrachtgever een aanvullend droogpreparaat gemaakt. Het betreft staafvormige Bacillariophyceae en de ronde Cosinodiscophyceae.

De werkwijze voor het maken van preparaten is als volgt:

- Homogeniseer een monster met drie schudbewegingen.
- Breng 50 ml monsterwater in een centrifugebuis (5.30) en doe de dop erop.
- Centrifugeer 10 minuten bij 2500 toeren.
- Draai de dop eraf en decanteer bovenstaande vloeistof totdat je ca. 5 ml vloeistof boven de pellet overhoudt.
- Vul de centrifugebuis (5.30) met de resterende 5ml tot 50 ml aan met water en centrifugeer wederom 10 min bij 2500 toeren.
- Draai de dop eraf en decanteer de bovenstaande vloeistof totdat je circa 5 ml vloeistof boven de pellet overhoudt.
- Voeg 10 ml waterstofperoxide 30%(4.1.4) toe aan het resterend monstermateriaal markeer de centrifugebuis (5.30) en plaats de buis in een rek.
- Plaats het rek met de afgesloten centrifugebuis (5.30) in een waterbad (5.6). Draai de dop niet geheel vast op de centrifugebuis.
- Zet de buizen in het waterbad (5.6) gedurende 4 uur in bij 90°C.
- Centrifugeer 10 minuten bij 2500 toeren.
- Verwijder voorzichtig zonder de pellet te beroeren bovenstaande vloeistof.
- Ontvet zowel het grote dekglas (24x50mm) (5.19) en objectglasje met ethanol en plaats na ontvetting het grote dekglas (5.19) op de kookplaat (5.24) bij een temperatuur van 35°C.
- Schud de centrifugebuis(5.30) op de vortex om de pellet te resuspenderen en de diatomeeën schaaltes weer homogeen verdeeld in de overgebleven vloeistof te krijgen. Zuig een halve pasterspiket (5.8) vol en breng de inhoud over op het grote dekglas (5.19) wat op de kookplaat (5.24) ligt. Laat dit volledig indampen in de zuurkast bij 35°C.
- Breng met behulp van de pasterspiket (5.8) twee druppels met tolueen(4.1.6) verdund Naphrax (4.2.2) aan op het dekglas (5.19) met het ingedampte preparaat. Plaats een objectglas (5.18) aan de rand op de kookplaat (5.24) ingesteld op stand 4 en plaats met behulp van een pincet het dekglas(5.19) met de zijde met het ingedampte monstermateriaal en opgebrachte Naphrax druppels op het objectglas (5.18).
- Plaats het objectglas (5.18) met het dekglas (5.19) en daarop aangebracht de Naphrax druppels in het midden van de kookplaat (5.24) en breng de Naphrax aan de kook.
- Schuif het objectglas (5.18) naar de kant totdat er geen luchtbellen meer borrelen onder het dekglas (5.19).
- Haal daarna het preparaat van de kookplaat (5.24) en laat het afkoelen tot kamertemperatuur.

- Schrijf met potlood op de matte zijde van het objectglas (5.18) de samplemanager code, locatiecode de datum en het buisnummer.
- Determineer en tel de aanwezige diatomeeën in het preparaat met een rechtopstaande microscoop (5.2).
- De eerder bepaalde aantallen van Cosinodiscophyceae en Bacillariophyceae uit de fytoplanktontelling (7.5.1) worden in Count (5.26) vervangen naar ratio door aantallen van de op naam gebrachte diatomeeën.

7.5.2 Biovolume

Het biovolume wordt berekend door de dichtheid van cellen te vermenigvuldigen met de default waarden uit het overzicht 'FP_conversie_cel_vol.xlsx' (zie hoofdstuk 8).

7.5.3 Globale fytoplanktonanalyse

In het monster worden het voorkomende fytoplankton tot op genus niveau of hoger gedetermineerd. 100 waarnemingen worden geteld met een 600x-vergroting. Iedere waarneming wordt als aantal cellen per waarneming gerapporteerd.

8 Berekening van dichtheid en biovolume

De dichtheid van cellen en waarnemingen uit een telling wordt als volgt berekend:

$$Dichtheid = \frac{n * 100}{O_{onderzocht} * V}$$

waarbij:

V	= volume het deelmonster in ml.
O	= onderzocht deel cuvetbodem in %.
n	= aantal getelde cellen of waarnemingen van een bepaald taxon.
Dichtheid	= dichtheid in het monster cellen/ml of waarnemingen/ml van een bepaald taxon.

$$Biovolume_{taxon} = \frac{biovolume\ per\ cel_{taxon} * dichtheid_{taxon}}{10^6}$$

Biovolume _{taxon}	biovolume van een taxon in mm ³ /l.
Biovolume per cel _{taxon}	default waarde voor biovolume per cel van een taxon in μm ³
Dichtheid _{taxon}	dichtheid in het monster cellen/ml of waarnemingen/ml van een bepaald taxon.

9 Kwaliteit

De kwaliteitsborging is als volgt georganiseerd:

- Apparatuur: na onderhoud worden de objectieven van de microscoop gecontroleerd met behulp van een gekalibreerd objectmicrometerglaasje (5.27).
- Uitbested werk wordt gecontroleerd d.m.v. duplo analyses. Indien niet wordt voldaan aan de eis uit P023 wordt dit besproken met de betreffende aannemer

9.1 Eerstelijnscontrole

De eerstelijnscontrole vindt plaats door bevoegde analisten in naleving van de beschreven procedure te laten werken met aandacht voor:

- Hantering en interpretatie van de in dit voorschrift beschreven methodieken door dagelijkse collegiale toetsing en onderlinge afstemming en visuele beoordeling van de homogeniteit
- Gebruik van standaardnaamlijst (TWN) en actuele determinatieliteratuur.
- Archivering van het monster gedurende een periode van 1 jaar zodat een heranalyse kan plaatsvinden

9.2 Tweedelijscontrole en afstemming:

- Dagelijks kan afstemming plaatsvinden doordat meerdere analisten op dezelfde locatie werken. Dit wordt niet gedocumenteerd.
- Afstemming van de benoeming van soorten door 1 keer per jaar gemaakte foto's te bespreken zodat gelijke determinaties zijn gewaarborgd.
- Landelijk worden er afspraken gemaakt tijdens het PON overleg.
- Zie P023 voor de frequentie en de eisen aan de duplo analyse
- Jaarlijks worden de duplo analyses geëvalueerd en in een overzicht in de tijd gevolgd.

9.3 Derdelijscontrole

AQUON neemt deel aan beschikbare ringonderzoeken.

9.4 Overige borgingspunten

Voor de sedimentatiekamers wordt een ingangscontrole uitgevoerd op intern volume en oppervlakte. Dit wordt jaarlijks herhaald op basis van een steekproef, het minimum aantal te controleren sedimentatiekamers is 10%.

10 Opleiding

De opleiding voor fytoplankton staat beschreven in P017.

11 Gegevensverwerking en rapportage

De opslag van de gegevens uit de determinatie vindt plaats in AquaDesk. De volgende stappen worden doorlopen:

- De resultaten en de gegevens worden direct in Aquadesk ingevoerd.
- De berekeningen worden direct in Aquadesk uitgevoerd, deze worden door een tweede analist gecontroleerd.
- De gegevens worden ten alle tijden door een tweede analist gevalideerd.
- De opdrachtgevers kunnen rechtstreeks de gegevens uit AquaDesk halen of krijgen het geëxporteerde bestand opgestuurd.

12 ARBO, Veiligheid en Milieu

- Van toepassing zijn de algemene veiligheidsmaatregelen die zijn beschreven in P025
- De hydrobiologisch analist neemt de voor de analyse benodigde veiligheidsmaatregelen in acht en maakt hierbij gebruik van de door de werkgever verstrekte middelen.
- De milieuzorg wordt nageleefd volgens wettelijke regels en P026

13 Documenten

- V MLO 010 Bemonstering van fytoplankton en zoöplankton
- P022 Controle uitrusting
- P023 Lijncontroles en controlekaarten
- P025 ARBO en veiligheid
- P026 Milieu

14 Formulieren

Niet van toepassing

15 Literatuur

- Gebruiksaanwijzing Countmanager 6.3

- Handboek Hydrobiologie 2010 (drukwerk) en 2014 (online)
- NEN-EN 15204 Waterkwaliteit - Richtlijn voor het tellen van fytoplankton met behulp van omgekeerde microscopie (Utermöhl-techniek)
- Overzicht 'FP_conversie_cel_vol.xlsx'

16 Wijzigingen t.o.v. vorige versie

H5 Toegestane afwijking in temperatuur waterbad toegevoegd

H10 Tekst opleiding vervangen door verwijzing naar P017

H11 Rapportage via Count verwijderd

17 Bijlagen

Niet van toepassing.