

BTO 2005.036
november 2006

Standaardisatie, kwaliteitsborging en data- evaluatie van on-line biologische bewakingssystemen

2. bbe-algentoximeter (bbe-Moldaenke, Kiel, D.)



BTO 2005.036
november 2006

Standaardisatie, kwaliteitsborging en data- evaluatie van on-line biologische bewakingssystemen

2. bbe-algentoximeter (bbe-Moldaenke, Kiel, D.)

© 2006 Kiwa N.V.
Alle rechten voorbehouden.
Niets uit deze uitgave mag
worden verveelvoudigd,
opgeslagen in een
geautomatiseerd
gegevensbestand, of
openbaar gemaakt, in enige
vorm of op enige wijze,
hetzij elektronisch,
mechanisch, door
fotokopieën, opnamen, of
enig andere manier, zonder
voorafgaande schriftelijke
toestemming van de
uitgever.

Kiwa Water Research
Groningehaven 7
Postbus 1072
3430 BB Nieuwegein

Telefoon 030 60 69 511
Fax 030 60 61 165
www.kiwawaterresearch.eu

Colofon

Titel

Standaardisatie, Kwaliteitsborging en data-evaluatie
van on-line biologische bewakingssystemen

Projectnummer

11.1508.039

Projectmanager

Corina de Hoogh

Opdrachtegever

CvO

Auteur(s)

Eric Penders (Het Waterlaboratorium)

Arco Wagenvoort (AqWa)

Corina de Hoogh (Kiwa Water Research)

Nel Frijns (RIZA)

Ria Kamps (RIZA)

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten en is openbaar

Voorwoord

De stuurgroep Bio-alarmering heeft in 2004 een standaardisatierapport gepubliceerd over de bbe-Daphniatoximeter. Dit rapport is samengesteld naar aanleiding van de behoefte om meer inzicht te krijgen in het gebruik en de mogelijkheden voor standaardisatie van on-line biomonitoren, teneinde de betrouwbaarheid en vergelijkbaarheid van de verzamelde monitoringsgegevens te vergroten. Het tweede rapport in deze serie handelt over de implementatie, validatie, standaardisatie en kwaliteitsborging van de bbe-algentoximeter, en dient daarmee hetzelfde doel als het eerste rapport (Wagenvoort *et al.*, 2005c).

In dit document worden de mogelijkheden van standaardisatie, kwaliteitsborging en data-evaluatie voor de algentoximeter (bbe- Moldaenke, Kiel) beschreven. In het volgende hoofdstuk worden de theoretische achtergronden, opbouw en het werkingsprincipe van de algentoximeter besproken. Hierna worden achtereenvolgens het kweken van algen, de kwaliteitscontrole en de evaluatie van de meetgegevens nader beschreven. Tot slot worden nog conclusies en aanbevelingen voor verbeteringen richting de fabrikant aangegeven.

De Stuurgroep Bio-alarmering wordt in haar werkzaamheden ondersteund door bijdragen en ervaring van de leden van de werkgroep Bio-alarmering. De activiteiten van de Stuurgroep worden gedeeltelijk gefinancierd vanuit het BTO.

Samenvatting

In Nederland en Duitsland langs de Maas, Rijn en Elbe zijn momenteel elf algentoximeters van bbe-Moldaenke in gebruik. Vier daarvan staan opgesteld in Nederland, namelijk langs de Maas bij RIZA in Eijsden, het innamepunt Heel van WML en het monitoringspunt Keizersveer van Evides, en langs de Rijn bij het innamepunt Lekkanaal van Waternet.

Om de operationaliteit van *on-line* biomonitoren in het algemeen en de algentoximeter in het bijzonder te bevorderen, is een onderzoek gedaan naar de kritische factoren die het meetresultaat van deze monitor beïnvloeden. Bij de installatie van de algentoximeter op een veldlocatie zijn dan vooral de voorbehandeling van het monsterwater door middel van een filtratiestap, de keuze van het referentiewater en de temperatuurverschillen tussen het monster- en referentiewater belangrijke factoren. Een doordachte installatie van de algentoximeter op de meetlocatie kan al veel ruis in de meetresultaten wegnemen, waardoor de betrouwbaarheid van de resultaten wordt vergroot.

Bekende problemen van de algencultuur zijn het risico van afsterving of uitspoeling. Om dit zoveel mogelijk te vermijden, is het verstandig om de algen onder zoveel mogelijk geconditioneerde en gestandaardiseerde omstandigheden te kweken. Regelmatige controle van de cultuur op soortsamstelling en groeisnelheid is noodzakelijk om de algentoximeter langdurig operationeel te houden.

(Preventief) onderhoud aan de algentoximeter draagt aanzienlijk bij aan de operationaliteit van de monitor. Mits goed doordacht, kan de benodigde onderhoudstijd worden geminimaliseerd, terwijl toch alle benodigde kwaliteitscontroles worden uitgevoerd. Dit rapport geeft een voorbeeldschema van hoe dit onderhoud kan worden gepland en uitgevoerd.

Bij de evaluatie van de meetresultaten is het vooral belangrijk om alarmmeldingen op de juiste wijze te verifiëren, zodat een technisch alarm van een werkelijk kwaliteitsalarm kan worden onderscheiden, en geen onnodige maatregelen worden genomen. Dit rapport laat een overzicht zien van de prestatiekenmerken van de algentoximeter, zoals de gevoeligheid, responstijd, reproduceerbaarheid, herhaalbaarheid, detectielimiet en rapportagegrens. Daarnaast wordt beschreven hoe 0-metingen en controlemetingen uitgevoerd kunnen worden, om deze prestatiekenmerken regelmatig te kunnen controleren. Tevens dient rekening te worden gehouden met natuurlijke verschijnselen die het resultaat van de algentoximeter beïnvloeden. Een voorbeeld uit de praktijk is beschreven ter illustratie.

Inhoud

	Voorwoord	1
	Samenvatting	3
	Inhoud	5
1	Inleiding	7
2	De theoretische achtergronden van de bbe-algentoximeter	9
2.1	bbe-algentoximeter - Theoretische achtergronden en opbouw	9
2.2	Werkingsprincipe	9
3	Installatie van de bbe-algentoximeter	17
3.1	Voorbehandeling monsterwater	17
3.2	Referentiewater	17
3.3	Temperatuur van het monster- en referentiewater	17
4	Kweken van <i>Chlorella</i>, onderhoud van apparatuur en controle van de toximeter	19
4.1	Algemene kenmerken van <i>Chlorella vulgaris</i>	19
4.2	Kweken van <i>Chlorella vulgaris</i> in de bbe-algentoximeter	19
4.3	Kweken van <i>Chlorella vulgaris</i> als reservecultuur	19
4.4	Onderhoud aan de bbe-algentoximeter	22
4.4.1	Controle algen-cultuur	22
4.4.2	Meting van pompdebieten	24
5	Kwaliteitscontrole	25
5.1	Macro- en microscopische controle van de <i>Chlorella</i> -kweek	25
5.2	Gevoeligheid van <i>Chlorella vulgaris</i>	25
5.3	0-meting en vaststellen alarmgrens	25
5.4	Controlemonster	26
5.5	Validatietest	27
5.6	Controle van de chlorofylmetingen van de sensor	27
6	Evaluatie van de meetresultaten	29
6.1	Status van de bbe-algentoximeter en de randapparatuur	29
6.2	Verificatie van de verkregen meetresultaten	29
6.3	Gevoeligheid van de bbe-algentoximeter	30
6.4	Natuurlijke verschijnselen die het resultaat van de algentoximeter beïnvloeden	31

7	Conclusies en aanbevelingen	35
I	Literatuur	37
II	Adresgegevens beheerders van de bbe-algentoximeters in Duitsland en Nederland en de configuratie van deze systemen.	39
III	Samenstelling media	41
IV	Onderhoudsschema RIZA	45
V	Dagelijkse controle (voorbeeldformulier RIZA)	47
VI	Programma meting ATOX	51
VII	Checklijst wat te doen bij een alarm	53

1 Inleiding

De bbe-algentoximeter (bbe-Moldaenke, Kiel, D) meet online de toxiciteit van een watermonster met *Chlorella vulgaris* als testorganisme. De algen worden ook gebruikt in acute toxiciteitstesten (NEN 6505, 1994), waarmee onder andere met chemische stoffen de concentraties bepaald worden waarbij een effect optreedt. De sensoren bij de bbe-algentoximeter zijn algen die reageren op schadelijke stoffen door veranderingen in hun fotosynthetisch gedrag. De verandering in fotosynthetisch gedrag uit zich in een gewijzigde fluorescentiekenarakteristiek. Als markante veranderingen in de fotosynthesesnelheid optreden, wordt een alarm gegenereerd.

Dit document vormt een richtlijn voor het uitvoeren van de on-line monitoring van oppervlaktewaterkwaliteit met behulp van de bbe-algentoximeter (bbe-Moldaenke, Kiel) en zal regelmatig door de Stuurgroep Biologische Alarmering worden geactualiseerd. In hoofdstuk 2 zijn de installatie en de invloed van de voorbehandeling van het monsterwater beschreven. Het regulier onderhoud, bestaande uit het kweken van de testorganismen, het onderhoud aan de bbe-algentoximeter en de controle op het technische functioneren, zijn in hoofdstuk 3 nader toegelicht. Hoofdstuk 4 beschrijft de kwaliteitsborging. In hoofdstuk 5 wordt de evaluatie van meetgegevens behandeld. In hoofdstuk 6 worden conclusies getrokken en aanbevelingen gedaan om het functioneren van de bbe-algentoximeter te verbeteren.

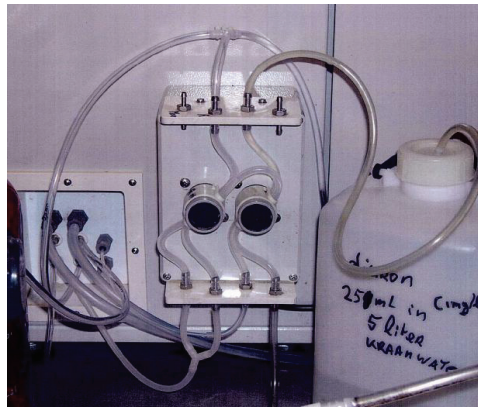
2 De theoretische achtergronden van de bbe-algentoximeter

2.1 bbe-algentoximeter - Theoretische achtergronden en opbouw

In figuur 1 is weergegeven hoe de bbe-algentoximeter eruit ziet en uit welke onderdelen deze bestaat. Een schematische weergave en verdere uitleg van het systeem is gegeven in figuur 3.



A.



B.

Figuur 1 Onderdelen van de bbe-algentoximeter

A: vooraanzicht: 1. Beeldscherm; 2. Diskdrive; 3. Toetsenbord; 4. Pomp voor toevoer medium aan algen in fermentor; 5. Schakelventiel; 6. Pomp voor aanvoer algen naar monster of referentie; 7. Pomp voor aanvoer monster en referentie; 8 Algenfermentor; 9. Sensor voor meting activiteit algen; 10. Toevoer- en afvoerleidingen voor monsterwater, referentiewater, medium en koelwater.

B: zij-aanzicht met unit voor het selecteren van verschillende waterstromen.

2.2 Werkingsprincipe

Cyanobacteriën, algen en vaatplanten zijn de enige organismen die het zonlicht gebruiken als een energiebron.

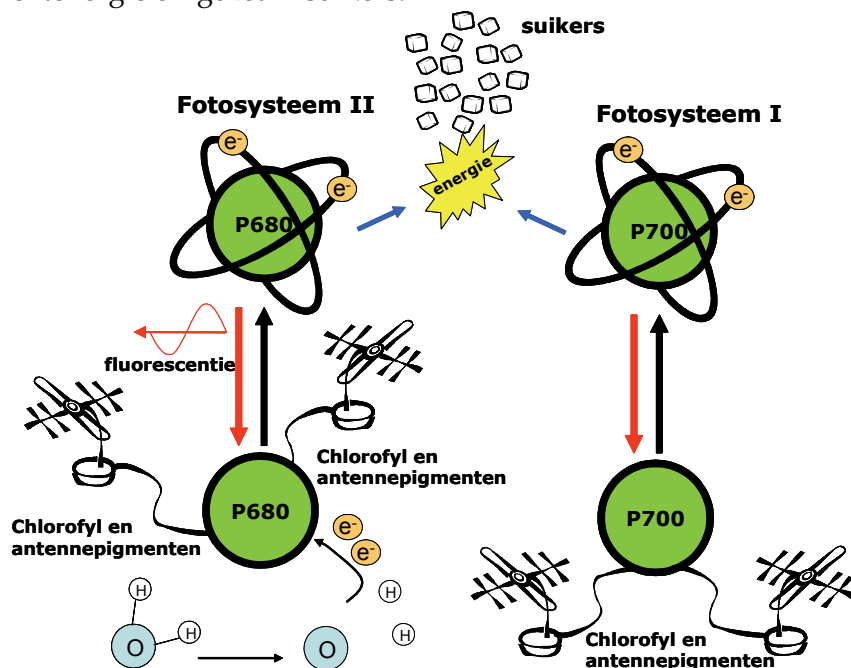
Ongeveer 98% van de totale zonne-energie die door algen (en vaatplanten) wordt opgenomen, wordt gebruikt voor fotosyntheseprocessen, zuurstofproductie en vorming van energiedragers (ATP en NADPH), of wordt afgevoerd in de vorm van warmte. De overige 2% wordt uitgestraald in de vorm van fluorescentie. Bij een verstoring van het fotosyntheseproces (zie kader) door herbiciden (bijvoorbeeld door directe remming op het fotosysteem II) of metalen/organische stoffen (indirecte remming), wordt daarbij de overtollige energie gedeeltelijk ook afgevoerd via fluorescentie. Op basis van deze eigenschap zijn er systemen ontwikkeld om tijdig verhoogde concentraties aan bijvoorbeeld herbiciden in oppervlaktewateren te detecteren. De systemen ontwikkeld door de Universiteit van Regensburg zijn in de periode 1995-2000 ingezet op verschillende locaties langs de Rijn. Als alternatief werd ook de eerste versie van bbe-algentoximeter gebruikt. In 2000 werd door bbe-Moldaenke op basis van ervaringen en wensen van gebruikers, een tweede versie ontwikkeld en ingezet door verschillende meetstations.

Fotosynthese

Fotosynthese is het chemische proces waarbij water en koolstofdioxide door middel van zonlicht wordt omgezet in suikers en zuurstof. De bruto reactie ziet er als volgt uit:



Dit proces vindt plaats in de chloroplasten van de (algen)cel, waar het chlorofyl (bladgroen) en andere pigmenten zich bevinden. Onderstaand schema geeft weer hoe het licht wordt opgevangen, hetzij rechtstreeks door het chlorofyl, ofwel via andere aanwezige antennepigmenten, zoals bijvoorbeeld caroteen of fycocyanine. Uiteindelijk wordt de ingevangen lichtenergie omgezet in suikers.



Dit gebeurt als volgt. Eerst wordt een watermolecuul gesplitst, waardoor 2 elektronen vrijkomen die opgenomen worden in het reactieve centrum van fotosysteem II, het zogenaamde cytochrom P680. Dit is een centraal chlorofylmolecuul, waarin alle opgevangen energie door andere chlorofylmoleculen en de antennepigmenten wordt verzameld. Dit centrale molecuul komt daardoor in aangeslagen toestand, en in de cascaderactie die daarop volgt, wordt de ingevangen energie omgezet in chemische energiedragers, waaruit suikers kunnen worden gevormd. In fotosysteem I vindt een vergelijkbaar proces plaats met het cytochrom P700-molecuul.

Fluorescentie

Niet in alle gevallen wordt de hierboven beschreven elektronenstroom gevolgd. Op ieder moment in het proces kan het P680- of P700-molecuul vanuit aangeslagen toestand (dus met 2 elektronen extra) weer terugvallen in de grondtoestand, waarbij fluorescentie optreedt om de vrijgekomen energie af te voeren. Deze fluorescentie is met behulp van een fotocel te zien als rood licht met een frequentie van 680 nm bij fotosysteem II en 700 nm bij fotosysteem I. Onder natuurlijke omstandigheden wordt circa 2 procent van de opgevangen energie weer uitgestraald als fluorescentie. Als het fotosyntheseproces wordt verstoord (bijvoorbeeld door de aanwezigheid van herbiciden), neemt de fluorescentie toe, omdat de elektronen dan niet via de normale route het proces kunnen volgen, en daardoor in hogere mate via fluorescentie

worden afgevoerd. Dit verschil in fluorescentie-intensiteit kan worden gemeten met een fotocel en op dit principe is de algentoximeter gebaseerd. De remming van de fotosynthese, uitgedrukt in een toename in fluorescentie-intensiteit, wordt zodoende gebruikt als maat voor de aanwezigheid van voor algen schadelijke stoffen in het water.

Het fotosyntheseproses en de vorming van suikers in de algen- of plantencel is een ingewikkeld proces, zoals ook blijkt uit de uitleg die het kinderprogramma Het Klokhuis op de website geeft:

Fotosynthese

Fotosynthese betekent letterlijk 'suikers maken met behulp van licht'. Van water en kooldioxide maakt een plant met behulp van zonlicht suikers. Hierbij komt als "afval" zuurstof vrij.

Met behulp van het zonlicht wordt van kooldioxide en water in de bladgroenkorrels suiker gemaakt. Hoe dit precies gaat is erg moeilijk uit te leggen, tenzij je scheikunde hebt gestudeerd. Dus jullie moeten maar geloven dat het zo is.

Licht

Of een plant ziek is kun je meten met een speciale camera. Van een zieke plant ligt het werk namelijk een beetje stil. Hierdoor wordt het licht dat de plant opvangt lang niet allemaal gebruikt voor de fotosynthese en voor een groot deel weer naar buiten gestuurd. Hierdoor geeft een zieke plant licht, wat je dus met een speciale camera kunt zien. Een plant geeft trouwens altijd een beetje licht, omdat er altijd wel wat licht "gemorst" wordt in de fotosynthesefabriek.

Het plantje hierna lijkt gezond, maar op de blauwe foto kun je de zieke plekken zien. Daar straalt het plantje het licht ongebruikt weer terug. Deze foto's kun je alleen met een speciale camera maken: de chlorofyl fluorescentie camera.



Bron: www.hetklokhuis.nl (d.d. 2 augustus 2006)

Een gedetailleerde beschrijving ten aanzien van de werking van de bbe-algentoximeter is als volgt:

Om de algenactiviteit te meten wordt de fluorescentie bij een niet zeer heldere lichtimpuls onder twee verschillende omstandigheden gemeten. Er vindt een meting zonder en een meting met zeer helder achtergrondlicht plaats. Voor de algen is het licht de energiebron en dus te vergelijken met voeding. Zonder extra achtergrondlicht wordt veel van de lichtimpuls als energie verbruikt. Er wordt nauwelijks licht in de vorm van fluorescentie uitgestraald. Door de aanwezigheid van genoeg achtergrondlicht stijgt de intensiteit van het fluorescentiespectrum op de lichtimpuls. Wanneer de cel beschadigd is, wordt het licht niet door de cel verbruikt en stijgt ook zonder extra achtergrondlicht de intensiteit van de fluorescentie.

Per meetsessie wordt een aantal metingen verricht in de daarvoor bestemde meetcel:

- meting van het actief chlorofylgehalte ("active chlorophyll") van de algen uit het voorraadvat ("fermentor") om te controleren of de testalgen nog leven;
- meting van de fluorescentie van de algen gedoseerd in referentievloeistof (leidingwater), als 0-meting waarbij geen toxische reactie van de algen optreedt;
- meting van de fluorescentie van de algen gedoseerd in monsterwater.

Afhankelijk van het type meting, worden de benodigde algensuspensie en eventuele vloeistoffen in de meetcel gepompt, waarna de meetcel steeds wordt gespoeld. Eén meetsessie duurt minimaal een kwartier, maar de gebruiker kan ervoor kiezen om de incubatietijd van de algen met monstervloeistof te verhogen, teneinde een gevoeliger bepaling te kunnen uitvoeren.

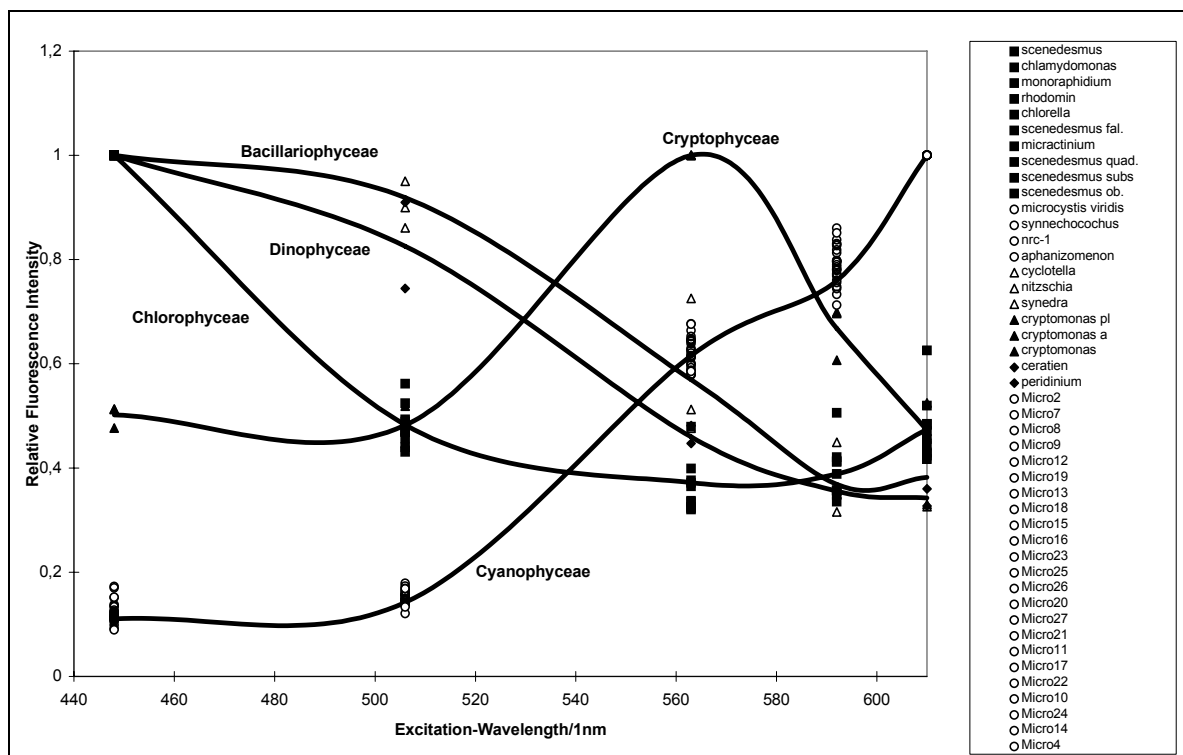
De zogenaamde Genty- parameter vat de stand van zaken samen en geeft een maat voor de activiteit van algen:

$$Genty = 100 * \frac{fm - fo}{fm} [\%]$$

In de formule is:

- Genty: activiteit van algen in procenten, waarbij afhankelijk van de algensoort en van de fysiologische toestand waardes tot 75 % kunnen worden bereikt;
- fo: fluorescentie-intensiteit aan zonder achtergrondlicht;
- fm: fluorescentie-intensiteit aan met achtergrondlicht.

De verschillende algenklassen onderscheiden zich in hun (antenne)pigmenten en daardoor in hun fluorescentiegedrag op licht in verschillende golflengten. Iedere algensoort heeft daardoor haar karakteristieke „Fingerprint“, een bijzonder patroon dus, waarmee ze in relatie tot de verschillende stimulerende golflengtes reageert (figuur 2).



Figuur 2 Fluorescentie-intensiteit van verschillende algensoorten bij 5 verschillende stimulerende golflengtes. De curves zijn op het maximum van ieder curve genormeerd.

Voor de differentiëring van de verschillende algensoorten in het monsterwater wordt een spectrum van het mengsel opgenomen en worden met behulp van een statistische rekenmethode ("best fit") de in het monster aanwezige algensoorten bepaald.

Op dezelfde manier kan ook de mate van activiteit van de verschillende algensoorten worden bepaald.

Voor de bepaling van de toxiciteit van het monster op algen, wordt eerst de achtergrondsignaal van het monster bepaald waarmee de concentraties en de activiteit van de verschillende algensoorten verkregen worden. Vervolgens worden groenalgen (bijvoorbeeld *Chlorella vulgaris*) uit de fermentor aan het monster toegevoegd en wordt weer de concentratie en de activiteit van de verschillende algensoorten bepaald. Indien het achtergrondsignaal te hoog is ten opzichte van het monster met toevoeging van algen, genereert de software een melding aan de gebruiker. Als referentiewaarde dient een meting, waarbij de algen uit de fermentor niet aan het monster, maar aan referentiewater (veelal drinkwater) toegevoegd worden.

Uit de verhouding tussen de activiteit van de algen in het monster en de activiteit van de algen in het referentiewater kan de remming (toxiciteit) van de algenactiviteit door het monster en daarmee de toxiciteit worden berekend.

$$\text{Remming}(\%) = 100 * \left(1 - \frac{\text{Genty}_{\text{monster}}}{\text{Genty}_{\text{referentiewater}}} \right)$$

In de formule is:

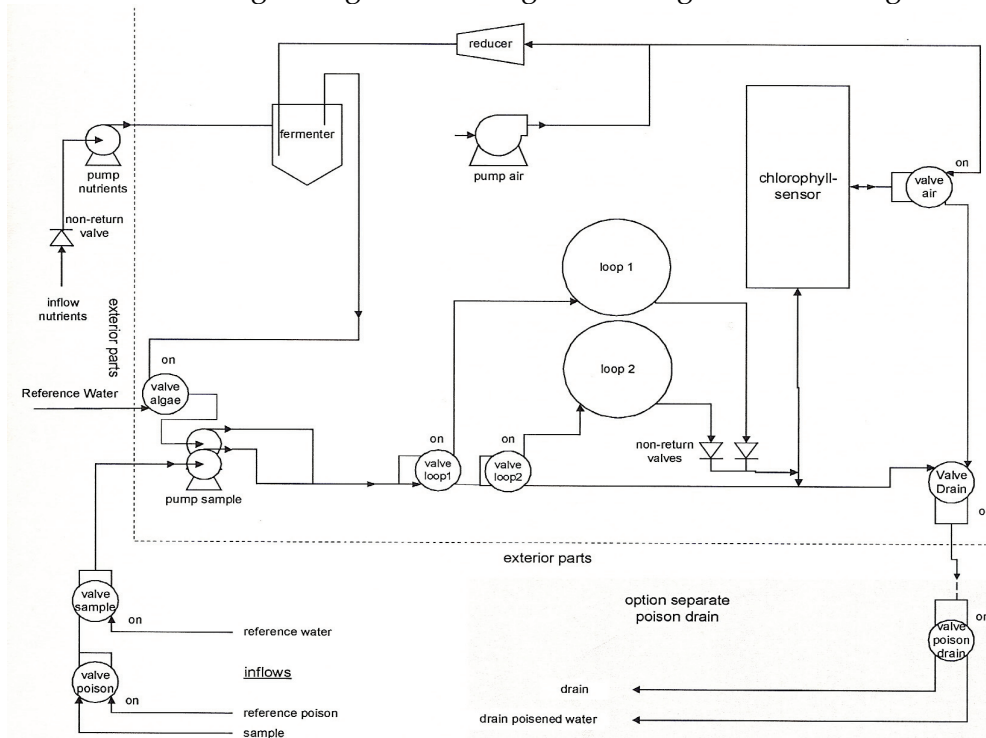
Remming: De verminderde activiteit (%) van de toegevoegde algen in het monsterwater;

Genty_{monster}: De activiteit van algen in het monsterwater (%);

Genty_{referentiewater}: De activiteit van algen in het referentiewater (%).

De meting in het referentiewater is bovendien noodzakelijk om de toevoeging van de voedseloplossing in de fermentor zo te regelen, dat er altijd algen in gelijkblijvende fysiologische staat en concentratie beschikbaar zijn.

Als optie is nog een andere meting mogelijk, waarbij in plaats van het gebruikelijke monsterwater, een referentie of controlemonster wordt ingezet. Hiermee kan het functioneren en de gevoeligheid van de gehele configuratie worden getest.



Figuur 3 Schema bbe-algentoximeter

Bovenstaand schema (figuur 3) geeft de opbouw van de bbe-algentoximeter weer. Via selectieventielen en pompen worden drie type metingen uitgevoerd:

- Meting van het monster met toegediende algen.
- Meting van het referentiemonster met toegediende algen, waarbij tevens de algenhoeveelheid in de fermentor wordt bepaald.
- Meting van het monster zelf, waarbij de transmissie en de hoeveelheid algen in het monster zelf worden bepaald.

De lussen worden na iedere gehele cyclus om en om gebruikt, waardoor alternerend in beide meetlussen zowel monster- als referentiewater wordt gepompt. Eventuele vorming van een biofilm vindt zodoende in beide lussen plaats. De processtappen die de bbe-algentoximeter uitvoert, staan beschreven in bijlage 5.

De incubatietijd bepaalt in zekere mate of de algen een reactie geven op de aanwezigheid van een herbicide. Het herbicidenmolecuul moet namelijk lipofiel genoeg zijn om de celmembranen van de alg te kunnen passeren en een goed aangrijpingspunt voor de werking kunnen vinden.

De mate waarin het herbicide over deze twee eigenschappen beschikt, bepaalt de benodigde incubatietijd om detectie met de bbe-algentoximeter mogelijk te maken. In de bbe-algentoximeter kan de benodigde incubatietijden ingesteld worden.

3 Installatie van de bbe-algentoximeter

In Duitsland en Nederland zijn momenteel elf algentoximeters van bbe-Moldaenke in gebruik. Deze zijn geplaatst langs de rivieren Elbe, Maas en Rijn (zie bijlage 1). De monitoren zijn niet allen hetzelfde uitgevoerd. Gebaseerd op praktijkervaringen met de elf beschreven monitoren en de aanwijzingen van bbe-Moldaenke, wordt in de bijlage in detail weergegeven de verschillen en de richtlijnen van relevante parameters.

Tijdens de installatie van de bbe-algentoximeter, dient met een aantal aspecten rekening te worden gehouden. De belangrijkste zijn het eventueel voorbehandelen van het monsterwater door middel van filtratie, keuze van het referentiewater en de temperatuur van het monster- en referentiewater.

3.1 Voorbehandeling monsterwater

Standaard wordt drukloos (maximaal toelaatbaar drukverschil 0,1 bar) grof gefiltreerd ($\pm 1000 \mu\text{m}$) oppervlaktewater aan de bufferbak toegevoerd. De pomp in de bbe-algentoximeter neemt zelf uit deze bufferbak de benodigde hoeveelheden monsterwater. Aan gesuspendeerde slibdeeltjes kunnen verontreinigingen gebonden zitten, die van invloed zijn op de toxiciteit van het monsterwater, mits stoffen vanuit het slib de algencellen kunnen binnenkomen. Indien de vraag met betrekking tot de toxiciteit van het monsterwater zich beperkt tot in het water opgeloste verbindingen dienen slibdeeltjes uit het monsterwater te worden verwijderd. Om dit te realiseren wordt in Nieuwegein en Eijsden ultrafiltratie van het rivierwater toegepast (Wafelin Membraanfilter, $0,2 \mu\text{m}$). Indien (min of meer) onbehandeld monsterwater wordt aangeboden kan de algensamenstelling en biomassa van het monsterwater in de tijd worden gevolgd en kan dit indien gewenst als procesmeting worden gebruikt.

3.2 Referentiewater

Bij de bbe-algentoximeter wordt de remming van de fotosynthese van de algen in monsterwater vergeleken met de remming van de algen in referentiewater. In de meeste gevallen wordt hiervoor kraanwater toegepast. Het kraanwater voedt een bufferbak waaruit de pomp in de bbe-algentoximeter zelf de benodigde hoeveelheden referentiewater en spoelwater neemt.

Het komt voor dat er negatieve toxiciteit wordt gemeten. Hierbij zijn mogelijke oorzaken, een ongunstigere matrix voor de algen van het referentiewater ten opzichte van het monsterwater of invloed van de temperatuur van het monster- en referentiewater (zie paragraaf 3.4).

3.3 Temperatuur van het monster- en referentiewater

Tijdens de metingen worden de algen aan een temperatuursverandering blootgesteld, doordat ze worden gekweekt bij $24\text{-}25 \text{ }^\circ\text{C}$ en worden blootgesteld aan niet geconditioneerd monster- en referentiewater. Afhankelijk van het jaargetijde zijn de temperatuursverschillen tussen kweekwater en referentiewater of monsterwaterverandering groter of kleiner. De verschillen tussen monster- en referentiewater onderling variëren daarnaast ook. In de herfst en winter is de temperatuur van het kraanwater veelal hoger dan het monsterwater uit de rivier. Afhankelijk van de verblijftijden in de bufferbakken en de temperatuur van de ruimte waarin de bbe-algentoximeter is opgesteld nemen het monster- en referentiewater in meer of minder mate de omgevingstemperatuur aan. In principe is de verblijftijd in de bufferbak en aanvoerslangen gering, om zodoende de actuele effecten van het water te kunnen vaststellen. Indien de veranderingen in temperatuur van het monster- en referentiewater geleidelijk

verlopen, zullen de veranderingen voor de algen ook geleidelijk verlopen en veroorzaken temperatuurseffecten op de korte termijn geen aanzienlijke verandering van de remming. Om eventuele temperatuurseffecten uit te sluiten, kan een tweetal modificaties worden doorgevoerd, te weten:

1. De temperatuur van het monster- en referentiewater gelijk maken aan de temperatuur in de fermentor. Hierdoor is in de meeste gevallen een temperatuursverhoging van het monsterwater noodzakelijk. Dit verwarmen van het water is van invloed op de hoeveelheid opgeloste vluchtige verbindingen. Naarmate het water sterker wordt verwarmd, zullen vluchtige verbindingen sneller ontwijken en worden de effecten van deze verbindingen niet gemeten.
2. Aangezien de remming een verschilmeting is tussen het monster- en het referentiewater, kan er ook voor gekozen worden om de temperatuur van deze watertypen gelijk te maken, maar niet te verhogen tot de temperatuur van de fermentor. Hierbij verdient het de voorkeur om de temperatuur van het referentiewater aan de temperatuur van het monsterwater aan te passen.

4 Kweken van *Chlorella*, onderhoud van apparatuur en controle van de toximeter

4.1 Algemene kenmerken van *Chlorella vulgaris*

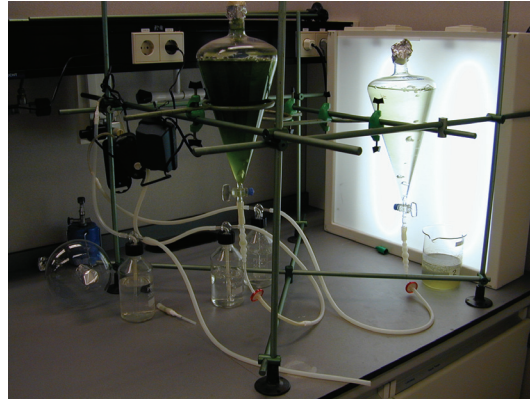
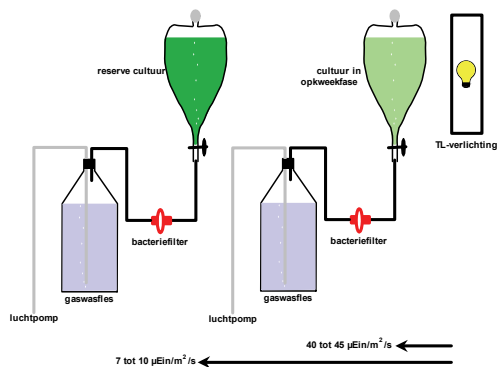
In de bbe-algentoximeter worden algen, *Chlorella vulgaris*, die behoren tot de familie Chlorophyceae (groenalgen), als testorganisme gebruikt. *Chlorella vulgaris* is een soort met losse kogelronde cellen, die een pyrenoid bezitten en in grootte variëren van 1,7 tot 10 µm. *Chlorella vulgaris* kan voorkomen in zuurdere milieus tot een zuurgraad van 4,0. *Chlorella vulgaris* heeft een grote zouttolerantie en kan zelfs in zeewater voorkomen (tot 3 à 4 % NaCl). De optimale temperatuur voor de groei van *Chlorella* soorten bedraagt ongeveer 25 °C. De zuurgraad onder optimale groeiomstandigheden is ongeveer 8 (Oswald, 1988). Meer informatie over *Chlorella vulgaris* is te vinden in Huber-Pestalozzi (1983).

4.2 Kweken van *Chlorella vulgaris* in de bbe-algentoximeter

De kweek van *Chlorella vulgaris* vindt plaats in de fermentor in de bbe-algentoximeter onder continue belichting en beluchting. Door het regelmatig toevoegen van een bekende hoeveelheid BBE V medium (voor samenstelling zie bijlage 2), worden de algen voorzien van voedingsstoffen die voor de groei noodzakelijk zijn. Het volume van de fermentor is 2 liter en per dag wordt ongeveer deze zelfde hoeveelheid aan medium verpompt. De groeisnelheid bedraagt ongeveer 1 generatie per dag. Voor een meting van de toxiciteit van het monster is 30 ml aan algensuspensie noodzakelijk. Het pompdebiet aan medium richting de fermentor dient ruim voldoende te zijn om aan de noodzakelijk hoeveelheid algen nodig voor de metingen te voldoen, zonder dat er een uitspoeling van algen gaat plaatsvinden. Ongunstige condities of introductie van andere soorten organismen (infecties) vanuit de ingepompte lucht, kan de algenc concentratie van de algen verlagen of het afsterven van de algen tot gevolg hebben (van een mooie heldergroene kleur naar een groengele kleur). Indien er sprake is van afsterving of uitspoeling, dient de fermentor en alle slangen hiervan schoongemaakt te worden. Hierna wordt een nieuwe cultuur, verkregen uit een reservekweek, ingezet zodat de bbe-algentoximeter meteen weer inzetbaar is. Een reservekweek naast de kweek in de fermentor van de bbe-algentoximeter is noodzakelijk, indien de bbe-algentoximeter continue in bedrijf moet blijven.

4.3 Kweken van *Chlorella vulgaris* als reserveculture

Voor het verkrijgen van een reserveculture, wordt gebruik gemaakt van de in figuur 4 weergegeven opstelling. Het uitgangspunt bij het kweken is dat er altijd een voorraad wordt opgekweekt en in principe altijd een voorraad beschikbaar is als vervanging van de algen in de bbe-algentoximeter. Hieronder zijn twee mogelijke werkwijzen voor het kweken puntsgewijs aangegeven. De voortgang van de kweekopstelling kan op een werkljst worden bijgehouden.



Figuur 4 Kweekopstelling voor *Chlorella vulgaris*.

A: Schematische weergave; B: Foto

Indien men niet de beschikking heeft over een klimaatkast, maar uitsluitend over een ruimte met een constante temperatuur (20 °C), kan de volgende werkwijze worden gehanteerd:

- Voor gebruik wordt de scheidrecter (glas, 2000 ml) schoongemaakt, voorzien van een wattenprop en worden de wattenprop en de kraan afgedekt met aluminiumfolie. Hierna wordt de scheidrecter geautoclaveerd.
- Als voedingsmedium voor de bbe-algentoximeter wordt 2 liter van het BBE algenmedium V gebruikt.
- Met behulp van een öse wordt het medium beënt vanaf een schuine buis. Deze schuinbuis bevat een reïncultuur van *Chlorella vulgaris*, afkomstig van de Universiteit van Göttingen (D) en kan gedurende tenminste één jaar worden bewaard bij 4 °C bij weinig licht (< 5 µEin/m²/s). Bij de CCAP (www.ccap.ac.uk) kunnen culturen van *Chlorella vulgaris* in een vloeibaar medium worden verkregen. Het voordeel van deze culturen is dat ze na het enten veel sneller aangroeien, maar deze vloeibare culturen zijn slechts één maand houdbaar.
- De scheidrecter wordt in het licht geplaatst (circa 45 µEin/m²/s) en het medium wordt belucht met bevochtigde (gaswas-fles met kraanwater, om verdamping tegen te gaan), gefiltreerde (bacteriefilter: Schleicher & Schuell, FP 030/3 0,2 µm) lucht. Na circa twee weken is de cultuur voldoende gegroeid om te worden gebruikt in de fermentor van de toximeter.
- Voorafgaand aan dit gebruik wordt microscopisch beoordeeld in hoeverre de culture nog uit 1 soort bestaat (paragraaf 5.1). Na twee weken wordt de cultuur, als reservecultuur, verplaatst naar een locatie met minder licht (5 tot 10 µEin/m²/s) en wordt een nieuwe cultuur gestart.



Figuur 5: Klimaatkast voor kweek van algen.

Indien men de beschikking heeft over een klimaatkast met licht en lucht (zie figuur 5), kan de volgende werkwijze worden gehanteerd:

- In een glazen serumfles van 3 liter, wordt 2,5 liter *Chlorella*-medium (steriel) gemaakt (bijlage 2)
- Vanuit een buis van CCAP met een reinkultuur van *Chlorella vulgaris* of vanuit een kweek met 1 week groei van de kweekkast (na microscopische controle op reinkweek), wordt 5 of 10 ml algenculture onder aseptische omstandigheden toegevoegd aan het medium in de serumfles.
- Onder aseptische omstandigheden, wordt een steriele kunststoffen pipet van 10 ml (met wattenprop) in de fles gezet en met aluminiumfolie, die eerst door de brander wordt verhit en gesteriliseerd, afgedicht.
- De geënte fles wordt in de klimaatkast geplaatst, waarbij de pipet wordt aangesloten met een extra 0,2 μm filter op de luchtvoorziening. Het niveau van het medium wordt op de fles aangegeven en voorzien van een unieke kweeknummer.
- De kweek vindt plaats bij 24 °C, onder belichting van 6 TL buizen (Philips Master TLD 36W/840). De belichting is via een tijd klok geregeld met per 24 uur een regime van 14 uur licht en 10 uur donker.
- Na 7 dagen wordt vanuit deze fles doorgeënt naar de volgende kweek, indien microscopisch bepaald werd, dat er nog steeds sprake is van een reinkultuur van *Chlorella vulgaris*.
- Na 7-9 dagen, wordt de maximale celdichtheid in de fles bereikt. De les wordt dan ontkoppeld en geplaatst in de koelkast in het donker.

Voor het kweken van de algen kan gebruik worden gemaakt van *Chlorella* medium in plaats van BBE medium V. Het Waterlaboratorium heeft vastgesteld dat *Chlorella* medium stabiel is, omdat geen gebruik wordt gemaakt van ureum. De aanpassing van de algen van de overstap van *Chlorella* medium naar BBE medium V vergt maximaal 2 dagen, waarbij de hoeveelheid algen met maximaal 30 % tijdelijk afneemt.

4.4 Onderhoud aan de bbe-algentoximeter

Het onderhoud kan worden verdeeld in een aantal activiteiten waarvoor een verschillende frequentie geldt. In tabel 1 zijn de activiteiten per frequentie gegroepeerd, waar nodig voorzien van een korte toelichting. De in tabel 1 genoemde onderhoudsintervallen bij het gebruik van ongefiltreerd rivierwater. Afhankelijk van de lokale omstandigheden kan het nodig zijn om (tijdelijk) van deze intervallen af te wijken. Bij voorfiltratie met een membraanfilter (paragraaf 3.1) is de vervuiling van het systeem minimaal, de biofilmvorming aanzienlijk minder en kan een wekelijkse schoonmaakbeurt voldoende zijn. Het is van belang om het uitgevoerde onderhoud nauwgezet vast te leggen. Bij de evaluatie van de meetgegevens vormt dit een onmisbare gegevensbron om vals positieve meldingen te traceren. In bijlage 3 is een voorbeeld van een onderhoudsschema opgenomen. Voor enkele parameters (onder meer temperatuur en gehalte van de algen in de fermentor) zijn grenzen geïmplementeerd. Bij een overschrijding van een dergelijke grens genereert het systeem een storingsmelding en worden overschrijdingen van de bbe-algentoximeter niet doorgemeld als kwaliteitsalarm. Deze automatische storingsmelding betreft echter slechts een beperkt aantal storingen, waarvoor soms relatief extreme grenzen gelden. In de praktijk kan met een snelle dagelijkse controle een aantal aanvullende controleparameters worden onderscheiden en kunnen storingen vroegtijdig gedetecteerd worden.

In de volgende subparagrafen worden de controleparameters nader toegelicht (zie ook bijlage 4 voor een overzicht).

4.4.1 Controle algen-cultuur

Bij iedere onderhoudsbeurt wordt de algencultuur visueel gecontroleerd op vlokvorming en intensiteit (Genty > 60%) van de groene kleur. Vlokvorming kan duiden op infecties (bijvoorbeeld door schimmels) en als de intensiteit van de groene kleur afneemt, betekent dit een verdunning van de algencultuur of het afsterven van de algen. Een constante Genty-waarde (en daarmee een constante algendichtheid) is wenselijk, maar na het opstarten van een nieuwe cultuur in de fermentor kan het enige tijd duren voor de cultuur geleidelijk de gewenste concentratie bereikt.

De macro- en microscopische controle van de algencultuur is onderdeel van de kwaliteitscontrole en wordt in paragraaf 5.1 nader toegelicht.

Tabel 1.

Overzicht van het onderhoud aan de bbe-algentoximeter en de bijbehorende frequentie.

Frequentie*Activiteit***Toelichting**

Dagelijkse controle (op afstand via modemverbinding met de monitor)

- Controle op functioneren en waterkwaliteit
Naast overschrijdingen van vaste grenzen kan ook variatie en geleidelijke veranderingen worden gedetecteerd
- Evaluatie referentiemetingen
De variatie van de referentiemetingen bepalen de ruis en de daarmee samenhangende alarmgrens

Aanvullend onderhoud

- Reinigen toevoerslangen
Indien nodig afhankelijk biofilm vorming
- Controle voorraad aan nutriënten en zonodig bijvullen
- Controle algencultuur en zonodig vervangen
Visuele macroscopische inspectie

Wekelijks onderhoud

- Reinigen van alle slangen (incubatieslangen spoelen met chloorbleekloog)
- Verversen nutriëntvoorraad
Visuele microscopische inspectie
- Controle algencultuur en zonodig vervangen

Maandelijks onderhoud

- Wekelijks onderhoud
- Vervangen pomp­slangen
- Reinigen afvoerslangen
- Meting van pomp­debieten
Controle 3 tot 5 dagen na het vervangen van de pomp­slangen, als deze zich naar de pomp­kop hebben gezet
Meting maandelijks of nadat een nieuwe cultuur in gebruik is genomen
- Meting controlemonster

Kwartaal­onderhoud (i.s.m. BBE)

Alle slangen vervangen

- Controle pomplagers
- Fermentor reinigen en enten
- Reinigen koelsysteem

Jaarlijks onderhoud (i.s.m. BBE)

- Onderhoud en kalibratie sensor

4.4.2 *Meting van pompdebieten*

Als gevolg van de slijtage van pompslangen varieert het pompdebiet enigszins in de tijd. Vooral direct na het vernieuwen van de pompslangen kan het debiet aanzienlijk afwijken ten opzichte van “oude” slangen. De nieuwe slangen hebben enkele dagen nodig om zich goed ‘te zetten’ naar de vorm van de pomp, waarna gedurende lange tijd een constant debiet af te geven. Circa drie tot vijf dagen na het vervangen van de slangen kan daarom het beste het pompdebiet opnieuw worden bepaald. In het stuurprogramma Atox van de bbe-algentoximeter, is voor de calibratie van pompslangen een programmaonderdeel gedefinieerd. Tabel 2 geeft de benodigde apparatuur en meettijden ten behoeve van de kalibratie weer.

Tabel 2.

Apparatuur en meettijden voor kalibratie van pompslangen van de bbe-algentoximeter.

Pompslang type	Minimale maatcilindergrootte	Minimale meettijd
Pompslang medium Ø1.6mm	25 ml	30 seconden
Pompslang algentoediening Ø1.6mm	25 ml	30 seconden
Pompslang monsterwater Ø 4.8mm	250 ml	30 seconden

5 Kwaliteitscontrole

5.1 Macro- en microscopische controle van de *Chlorella*-kweek

In de bbe-algentoximeter wordt steeds dezelfde soort, veelal *Chlorella vulgaris* gebruikt, om zoveel mogelijk een constante respons te verkrijgen. De kweken en de cultuur in de fermentor worden periodiek onderworpen aan een macro- en microscopische controle. Bij de microscopische controle wordt ondermeer naar infecties van de cultuur (bijvoorbeeld van algen, schimmels of protozoa) gekeken. Indien de cultuur of kweek niet langer uni-algaal is, wordt de geïnfecteerde cultuur vernietigd en vervangen door een geschikte cultuur.

5.2 Gevoeligheid van *Chlorella vulgaris*

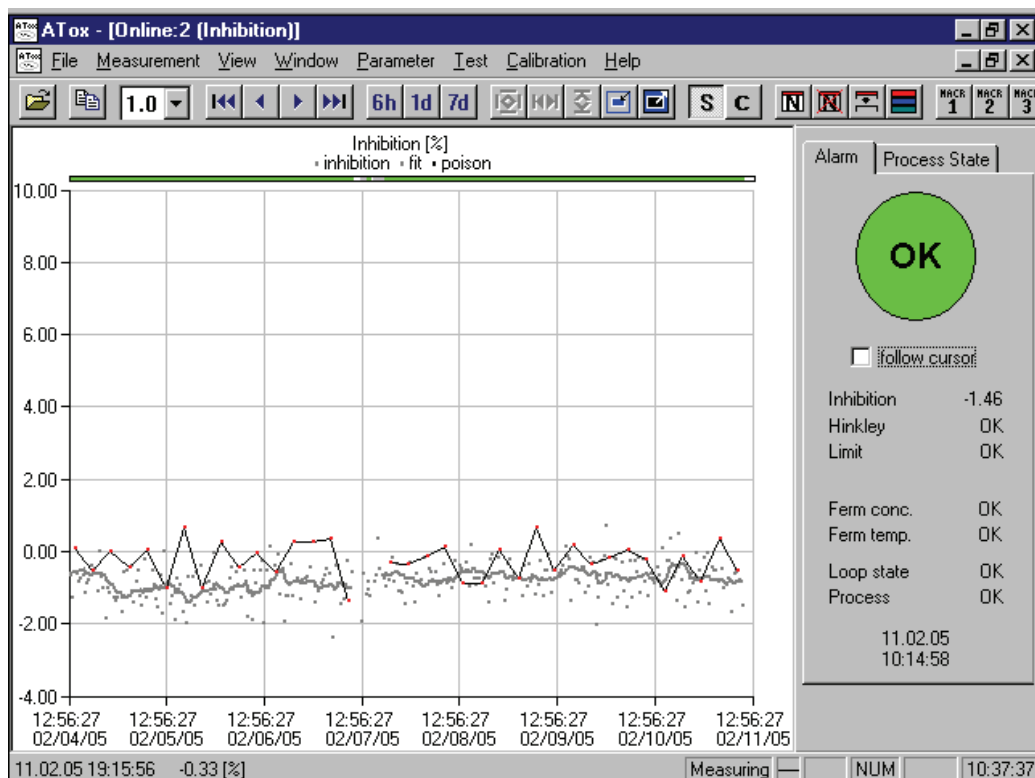
Met behulp van een statische test met kaliumdichromaat kan de gevoeligheid van de testorganismen periodiek worden vastgesteld. Voor de werkwijze kan NEN-ISO 8692 (NEN-ISO 8692, 1993) worden geraadpleegd. Echter, hierin staat wel de procedure beschreven met gebruik van de zoetwateralgen *Scenedesmus subspicatis* en *Selenastrum capricornutum*, maar deze NEN-ISO vervangt de NEN 6505 (1994) waarin ook *Chlorella* is genoemd. Voor de bepaling van de toxiciteit van een stof voor een alg, wordt de remming van groei gemeten bij verschillende concentraties van de betreffende stof. De groei wordt vast gesteld via meting van de celdichtheid in de tijd met bijvoorbeeld een Coulter Counter, een telkamer, een spectrofotometer of een fluorometer. De incubatie van algen in de te testen controleoplossing vindt plaats in kolven van 250 ml onder geconditioneerde lichtomstandigheden en temperatuur. Indien men een goede gevoeligheidsmeting wil verkrijgen, is opbouw van een goede opstelling noodzakelijk, waarbij door gebruik van de kolven, veel plaats vereist wordt. Een alternatieve methode is het gebruik van microtiterplaten, waarmee de lichthoeveelheid per verdunning gelijk blijft en de noodzakelijke ruimte beperkt blijft. Verdere informatie over microplate algentest is te vinden in Blaise *et al.* (1986) en St-Laurent & C. Blaise (1992). Ten aanzien van de gevoeligheid van *Chlorella vulgaris* werd bij gebruik van kaliumdichromaat als standaardstof, een EC₅₀ van 0.70 +/- 0,07 mg/L gevonden. Via literatuur of databases zijn er ook EC₅₀ waarden te vinden voor bepaalde herbiciden. Met deze testen wordt alleen informatie verkregen over de respons van de algen op een enkele stof. Door het meten van een controlemonster wordt ook de gevoeligheid van de algen gecontroleerd (paragraaf 5.4).

5.3 0-meting en vaststellen alarmgrens

Elk instrument heeft een bepaalde onnauwkeurigheid of ruis. Met behulp van zogenaamde 0-metingen, kan de nauwkeurigheid van de bbe-algentoximeter worden bepaald. Bij de 0-meting, zijn het monsterwater en referentiewater hetzelfde. In theorie dient het signaal dus 0% toxiciteit aan te geven. Deze 0-metingen dienen na inzet van een nieuwe culture uitgevoerd te worden, waarbij minimaal 10 waarnemingen worden verkregen. Op basis van deze gegevens, kan de spreiding van het instrument met de gebruikte kweek berekend worden. Indien de spreiding ten opzichte van de vorige kweek bij een gelijkgestelde algendichtheid te groot is, kan dit het gevolg zijn van vuile sensor of samenklontering van algencellen, waarbij onderhoud aan de sensor of start van een nieuwe kweek noodzakelijk kan zijn. Tevens kunnen de eigenschappen van de kweek in de loop van weken of maanden veranderen, waarbij aanpassingen in de grenswaarde noodzakelijk kunnen zijn.

Het gemiddelde van de 0-meting met 3 maal de standaarddeviatie, is de grenswaarde voor de detectie van herbiciden in oppervlaktewater. De alarmgrens dient in ieder geval hoger te liggen dan deze grenswaarde.

Uitvoering van 0-metingen gedurende bijvoorbeeld de nacht heeft wel als nadeel dat er op dat moment geen metingen van het monsterwater verkregen worden. Ter controle van de grenswaarde, dient regelmatig uitvoering plaats te vinden van de referentiemeting. Bij BBE Moldaenke is een aanvulling te verkrijgen waarbij na een aantal monstermetingen automatisch een 0-meting wordt uitgevoerd (zie figuur 6).



Figuur 6: Referentiemetingen van de bbe-algentoximeter (zwarte lijn met rode punten) naast de monstermetingen, ter bepaling van de spreiding en de grenswaarde.

Indien het gemiddelde (grijze lijn in figuur 6) van de monstermetingen significant verschillen ten opzichte van de 0-meting, kan er een analyse op organische en anorganische parameters worden uitgevoerd.

De gebruiker kan in de bbe-algentoximeter een alarmgrens aangeven waarboven de metingen van de monsters als toxisch worden bestempeld of een mogelijke detectie van herbiciden heeft plaatsgevonden. Aan de hand van testen met referentiewater en herbicide (zoals diuron) kan een alarmgrens worden vastgesteld. Testen te Eijsden (Wagenvoort et al., 2005a), Heel en Keizersveer hebben geleid tot een vaste statische alarmgrens van 4%. Mogelijke aanpassing van deze alarmgrens (dynamisch en statisch) wordt nog onderzocht in relatie tot de stabiliteit en reproduceerbaarheid van het systeem.

5.4 Controlemonster

Om de werking van de bbe-algentoximeter te controleren, is periodiek een meting van een controlemonster noodzakelijk. Door variatie in de kweek (gevoeligheid van algen), slijtage van onderdelen, vervuiling van sensoren en slangen, kan een meting van controle monster aangeven dat onderhoud aan de bbe-algentoximeter of vervanging van slangen noodzakelijk

is. Hiertoe kan maandelijks of bij vervanging van een culture in de fermentor een controlemeting uitgevoerd. De gegevens worden bijgehouden in een controle- of shewartkaart.

Als aanvulling is het mogelijk een optie in te bouwen om naast de referentiemeting automatisch een controlemonster aan de bbe-algentoximeter aan te bieden. Hiermee zijn meteen de controle gegevens automatisch beschikbaar indien de bbe-algentoximeter een alarm genereert. Van de controlemonsters dient de houdbaarheidstermijn bepaald te worden, dat afhankelijk is van de keuze van de controlestof. In het algemeen wordt de stof diuron gebruikt als controlestof met een houdbaarheidstermijn van 6 maanden.

5.5 Validatietest

Bij de uitvoering van validatietesten en het vaststellen van de detectieniveaus van afzonderlijke stoffen, is het van belang dat aan een aantal randvoorwaarden wordt voldaan. Voorkomen dient te worden dat neveneffecten een rol spelen zoals adsorptie van de toxische stof aan slangen. Dit kan nagegaan worden door het water met toxische stof op te vangen na de meting en door chemische analyse bepalen of de stof in de gewenste concentratie nog aanwezig is. Maak gebruik van schone incubatieloops en let op incubatieloops met de aanwezigheid van een biofilm. Om cross-over van het toxische stoffen bij de referentiemetingen te ondervangen, dienen de spoeltijden mogelijk aangepast te worden. Verder dient de matrix niet van invloed te zijn op de metingen en dient deze met uitzondering van de geaddeerde verbinding onveranderd te blijven. Dit betekent dat een goed systeem voor de uitvoering van deze metingen dient te worden opgezet. Bij voorkeur wordt een validatietest uitgevoerd in dezelfde matrix als het monsterwater.

Bij het gebruik van containers (voorraadvaten) met monsterwater, dient dit water continu goed gemengd en belucht te worden. Voor het uitvoeren van de test dient de concentratie van de verbinding zodanig te worden gekozen, dat deze in het bereik van de fotosyntheseremming ligt.

5.6 Controle van de chlorofylmetingen van de sensor

De metingen van de fluorescentiesensor kunnen worden gecontroleerd door de chlorofylmeting van de bbe-algentoximeter te vergelijken met een laboratoriummeting van chlorofyl door middel van een spectrofotometrische analyse volgens de Nederlandse norm (NEN 6520, 1981). Om de meetwaarden van het chlorofyl in het monsterwater te vergelijken met laboratorium analyses, is echter wel een conversiefactor nodig. Bij de vergelijking wordt uitgegaan van het onderstaand model dat door Mrówczyński (2004) is beschreven, waarbij de grenzen op een afwijking van 30% zijn gesteld.

$$[\text{chlorofyl}]_{\text{Algentoximeter}} = 0.7722 \cdot [\text{chlorofyl}]_{\text{Lab.analyse}}^{0.927117}$$

Bij hoge chlorofyl-gehaltenes in het monsterwater, wordt de inhibition beïnvloed. Dit probleem doet zich voor bij een gehalte van meer dan 25 µg/L chlorofyl in het monsterwater. Filtratie of verdunning van het monsterwater kan dan uitkomst bieden.

6 Evaluatie van de meetresultaten

In de algenmonitor worden bij iedere meting nieuwe algen uit de fermentor genomen en aan het monsterwater en het referentiewater toegevoegd. Hierdoor zijn de verkregen metingen en de berekende toxiciteit in de tijd te volgen, objectief en reproduceerbaar. Bij een instrument als de daphniamonitor, mosselmonitor of vismonitor, waarbij eenmalig het instrument wordt voorzien van nieuwe organismen tijdens het regulier onderhoud, is dit niet het geval. Vooral het objectief volgen van de toxiciteit van het monster is moeilijk als gevolg van de adaptatie van deze organismen aan de omstandigheden en verontreinigingen in het monsterwater.

Toch dient bij een alarmmelding van de algenmonitor eerst nagegaan te worden, of geen andere factoren de oorzaak zijn van het verkregen alarm.

6.1 Status van de bbe-algentoximeter en de randapparatuur

Een oorzaak van een alarm kan een technische storing zijn aan de bbe-algentoximeter of aan de randapparatuur die van belang zijn voor een goede meting aan de bbe-algentoximeter. De werking van mogelijke opvoerpompen, die de bbe-algentoximeter van monsterwater voorzien, alsook de werking van filtratie-eenheden, dienen gecontroleerd te worden. Tevens dient de voorziening van referentiewater gecontroleerd te worden. Verder moet geverifieerd worden of er geen sprake is van lekkage of breuken aan de (pomp)slangen in het systeem, verstoppingen, of dat er slangen losgeschoten zijn van slangaansluitingen (zie bijlage 6). Indien onderhoud wordt uitgevoerd, waarbij tijdig (pomp)slangen worden vervangen (zie bijlage 3), is de kans op een alarm als gevolg van een lekkage te verwaarlozen. Ten aanzien van het goed functioneren van de algenmonitor, is een controle van de fermentor met zijn koelwaterbad noodzakelijk waarbij het waterniveau van het bad en in de fermentor, de ingestelde temperatuur/temperatuur koelunit en temperaturen van de fermentor, en de flow van het koelwater (geen verstopping nabij het peltierelement) en lucht nagegaan dient te worden.

6.2 Verificatie van de verkregen meetresultaten

Afwijkende meetresultaten of een grote spreiding in de meetresultaten die leiden tot een alarmmelding, kunnen het gevolg zijn van een technisch probleem (zie paragraaf 6.1) of het gebruik van een slechte cultuur van algen in de fermentor. Indien naast een grote spreiding in de toxiciteit tevens een grote spreiding van de algenconcentratie van de fermentor geconstateerd wordt, is de toevoer van algen aan het monsterwater of referentiewater niet constant. Mogelijke oorzaken hiervoor zijn de verstopping van het algenselectieventiel, te klein volume in de fermentor (onvoldoende mediumtoevoer), verstoppingen in de slangen of slijtage van de gebruikte pompslangen.

Indien de algencultuur in de fermentor niet langer homogeen is en niet meer uit losse cellen bestaat, kan door aanwezigheid van vlokken een meer dan normale variatie in de hoeveelheid gedoseerde algen optreden. Dit leidt ook tot een toename aan fluctuatie aan gehalte metingen aan algen in de fermentor. Een visuele inspectie van de algencultuur, indien mogelijk gebruikmakend van een microscoop, kan snel uitsluitsel bieden.

Naast de toxiciteitsmetingen op basis van de conditie van de toegediende algen aan een monster in relatie tot referentiewater, wordt ook bij iedere meting een vorm van troebelheid

gemeten van het monster zelf (transmissie) en de achtergrondsignaal van de al aanwezige algen in het monster. Indien er een duidelijke verandering geconstateerd wordt in de transmissie van het monster, kan het verkregen alarm het gevolg zijn van het uitdoven van fluorescentie door het aanwezige slib. De maximale hoeveelheid algen in het monsterwater zelf (het achtergrondsignaal), mag maar een factor 3 lager zijn dan de hoeveelheid algen dat aan het monster wordt toegediend vanuit de fermentor. Indien het achtergrondsignaal deze waarde nadert, zal de verkregen metingen en alarm onnauwkeuriger worden. Een verhoging van de algenconcentratie in de fermentor, is de enige oplossing hiervoor.

6.3 Gevoeligheid van de bbe-algentoximeter

Een alarm kan ook verkregen worden indien de gevoeligheid van de bbe-algentoximeter in de tijd toeneemt. Condities die langzaam kunnen veranderen in de fermentor, kunnen leiden tot een veranderingen in de algencultuur, waarbij de gevoeligheid van de algen op stoffen kan veranderen. De gevoeligheid kan alleen aan de hand van de metingen aan een controlemonster met bijvoorbeeld een herbicide (diuron) gecontroleerd worden. De bbe-algentoximeter is uitgerust met een mogelijkheid om periodiek een controlemonster te meten. Het signaal verkregen uit de controlemeting dient nabij de ingestelde alarmgrens te liggen. De metingen van de controlemeting zijn van belang bij de dataevaluatie, om direct vast te kunnen stellen dat het systeem correct functioneert en bij een melding sprake is van een reëel alarm.

Ten aanzien van de stabiliteit en reproduceerbaarheid van de bbe-algentoximeter, werden al door enkele gebruikers enkele prestatiekenmerken van het systeem vastgesteld (Wagenvoort et al., 2005a en b, Wagenvoort & Frijns, 2006).

Een voorbeeld hiervan is weergegeven in tabel 3.

Gezien ook de ontwikkelingen van normen voor online instrumentatie, zullen meerdere gebruikers als ook de fabrikant ervoor meten gaan zorgen dat de prestatiekenmerken van de bbe-algentoximeter in de nabije toekomst bekend worden. Ook uitvoering van ringonderzoeken kan meer informatie geven over de stabiliteit en reproduceerbaarheid van de instrumenten onderling.

Tabel 3.

Voorbeeldresultaat van een test om de prestatiekenmerken van de algentoximeter bij Eijsden vast te leggen.

prestatiekenmerk	eenheid	resultaat	opmerking
REFERENTIE WATER - LABORATORIUM TEST			
responstijd	uur	n.b.	
vertraging	uur	n.b.	
duur toename en afname	uur	n.b.	
normaliteit		ja	Shapiro Wilk normaliteitstest: $F = 0,939$, $df = 29$; $p > 0,125$
lineariteit		Verzadiging scurve	$\text{inhibition} = -0,3247 \cdot ([\text{diuron}]^2) + 5,8483 \cdot ([\text{diuron}]) - 0,2582$
variatie coëfficiënt, herhaalbaarheid	%	2,1 tot 6,1 < 3	Op het niveau van de alarmgrens.
detectielimiet (LOD)	%	0,7	Test met diuron in kraanwater.

rapportagegrens (LOQ)	%	2,8	Test met diuron in kraanwater. Alarmgrens van de algentoximeter is op 4% ingesteld. Gehaltes vanaf 2µg/l diuron in de matrix kwantificeerbaar.
kleinste detecteerbare verandering (LDC)	%	0,55	Kleinste aangetoond verschil (2 x s.d.).
juistheid		n.v.t.	Niet uitgevoerd.
reproduceerbaarheid	%	10,2	Bepaald aan de hand van de metingen van het controle monster (7µg/l diuron in kraanwater) tijdens experiment.
drift, korte duur	%/dag	0,74	Helling bedroeg tijdens het validatie experiment -0,185%.
memory effect		Geen	
interferentie veroorzaakt door:		matrix algen mogelijk tijd	Meetwaarde ("inhibition") in matrix lager dan in kraanwater. Gevoeligheid van "oude" algencultuur aanmerkelijk lager. In de tijd neemt de gevoeligheid van de algentoximeter (sensor) af, nog niet te Eijsden vastgesteld.
milieuomstandigheden		Temperatuur	gecontroleerde ruimte
MATRIX - VELD TEST			
responstijd	uur	n.b.	
vertraging	uur	n.b.	
duur toename en afname	uur	n.b.	
juistheid			Verskil in additie van 2,3 µg/l diuron aan referentiewater en gefiltreerd Maaswater (model).
absolute verschil	%	-1,0	
relatieve verschil	%	-10,6	
drift, lange duur	%/dag	4,5	Helling bedroeg gedurende 10 dagen (1 meetserie aan eenzelfde algencultuur) - 1,067%. Vaststellen aan de hand van meerdere algenculturen.
beschikbaarheid, up-time	%	94,1	Van 3 december tot en met 15 december 2005. Onderhoud ± 5%

6.4 Natuurlijke verschijnselen die het resultaat van de algentoximeter beïnvloeden

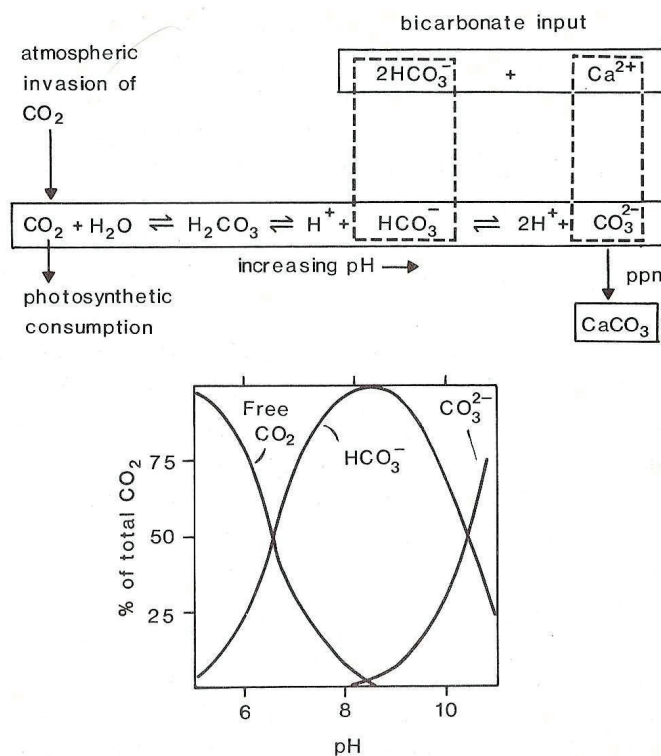
Er zijn diverse natuurlijke verschijnselen die het resultaat en de gevoeligheid van de algentoximeter kunnen beïnvloeden. Hieronder is daarvan een voorbeeld uitgewerkt, waarbij de extreem hoge watertemperatuur als gevolg van de twee hittegolven in juli 2006 ook invloed op het meetresultaat van de algentoximeter bleek te hebben.

De invloed van natuurlijke processen in het monsterwater op het meetresultaat kan niet altijd vermeden worden. Daarom blijft het van belang om met voldoende expertise de meetwaarden te beoordelen, en indien sprake is van een natuurlijk verschijnsel, dit niet automatisch aan te merken als een waterkwaliteitsalarm.

Verhoogde algenactiviteit in Maaswater leidt tot een verhoogde inhibition

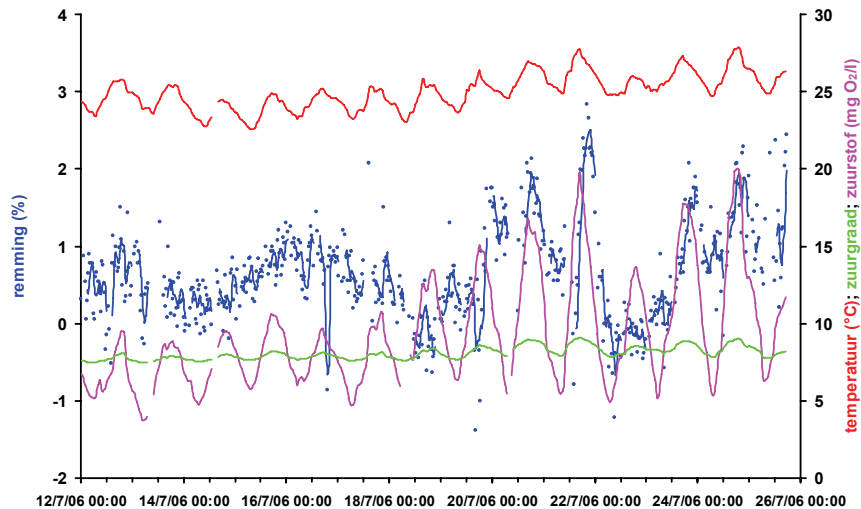
Op het meestation Eijsden werd in de tweede helft van juli een verhoogde inhibition van het Maaswater geconstateerd. Dit verschijnsel trad in mindere mate ook bij het WML-innamewerk te Heel op. Omdat er een mogelijk verband kon zijn met de eveneens geconstateerde tijdelijk verhoogde waarden van de zuurgraad, werd nader onderzoek verricht.

Anorganisch koolstof komt in het water in een drietal vormen voor, CO_2 , HCO_3^- en CO_3^{2-} . Het voorkomen van de verschillende vormen hangt sterk af van de ligging van het carbonaatevenwicht, dat door de zuurgraad wordt bepaald (figuur 7). Voor algen (met uitzondering van goudalgen) zijn koolstofdioxide en waterstofcarbonaat opneembaar. Een sterke opname van CO_2 door algen leidt tot een verhoging van de zuurgraad en daardoor relatief meer carbonaat. Carbonaat daarentegen kan niet door algen worden opgenomen en slaat met veel positieve ionen (onder andere Ca^{2+} en Mg^{2+}) neer.



Figuur 7 De ligging van het carbonaatevenwicht is afhankelijk van de zuurgraad (bewerkt naar: Reynolds, 1984).

Nadere gegevens van de inhibition van de algentoximeter en andere factoren in het Maaswater (temperatuur, zuurstofgehalte en zuurgraad) werden verzameld en zijn weergegeven in figuur 8.



Figuur 8 Het dag-nacht ritme van de fotosynthese (productie van zuurstof en verhoogde zuurgraad), de toenemende watertemperatuur (verminderde oplosbaarheid van CO₂) en de invloed op de remming van de fotosynthese van de algen in de algentoximeter (gegevens www.Aqualarm.nl).

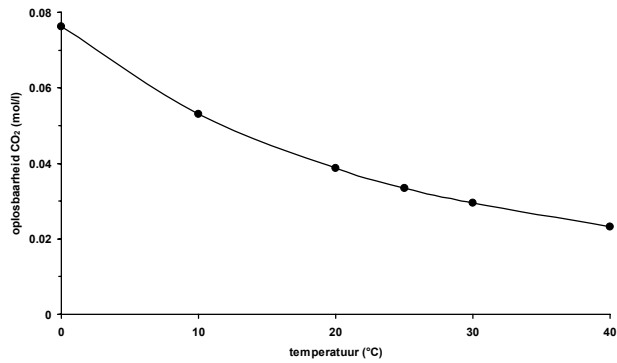
De zuurgraad varieerde tussen 7,5 en 9,1. Bij deze waarden overheerst de bicarbonaatfractie (figuur 7); deze koolstofvorm is goed voor algen opneembaar. Overdag waren algen (en planten) in de Maas (buitenwater) tijdens zonnig weer zeer actief, waardoor er veel koolstof door fotosynthese werd vastgelegd. In combinatie hiermee werd veel zuurstof geproduceerd, waardoor het zuurstofgehalte sterk toenam en het water zelfs oververzadigd met zuurstof werd (figuur 8, vooral tijdens de laatste week).

De relatieve en absolute beschikbaarheid van koolstof nam in de loop van deze twee weken af door een tweetal processen. Ten eerste was er voor de fotosynthese veel bicarbonaat nodig, waardoor het carbonaatevenwicht verschoof naar de basische kant. Ten tweede liep door instraling van het zonlicht de watertemperatuur sterk op, waardoor overdag de oplosbaarheid van koolstofdioxide in het water sterk afnam (figuur 9). Doordat deze twee processen tegelijkertijd optraden, versterkten ze elkaar en zal de hoeveelheid voor algen beschikbaar koolstof in het water sterk zijn gedaald. Zo sterk zelfs dat de fotosynthese werd beperkt door de hoeveelheid opneembaar koolstof en er dus sprake was van koolstoflimitatie (nutriëntlimitatie). De algen die in de algentoximeter aan het gefiltreerde Maaswater werden toegevoegd, moesten voor het fotosyntheseproces met elkaar concurreren om koolstof en niet in alle algen kon het fotosyntheseproces ongestoord verlopen, waardoor de fotosynthesesnelheid niet maximaal kon worden. Dit vertaalde zich in een toegenomen waarde voor de remming (inhibition) van de fotosynthese.

Aan het einde van de dag nam de hoeveelheid koolstofdioxide in het water weer toe, doordat in de nacht en het begin van de volgende dag de watertemperatuur daalde, waardoor de oplosbaarheid van koolstofdioxide in het water weer toenam. Tevens kwam bij afwezigheid van licht de fotosynthese in het buitenwater tot stilstand en afbraakprocessen (ademhaling en mineralisatie) overheersten. Deze processen verklaren het dag-nacht-ritme van de waargenomen effecten die onder invloed van instralend zonlicht plaatsvonden (figuur 8).

In het referentiewater waren de hoeveelheden koolstofdioxide en bicarbonaat niet of nauwelijks veranderd en in voldoende mate voorhanden. De fotosynthese van algen, die aan

het referentiewater waren geaddeerd, werd dan ook niet geremd. Door het verschil in fotosynthese van de algen in het (koolstofrijke) referentiewater en het koolstofgelimiteerde gefiltreerde Maaswater leidde tot een toename van de inhibition (figuur 8).



Figuur 9 De oplosbaarheid van kooldioxide (CO₂) in water afhankelijk van de watertemperatuur.

Deze casus toont tevens aan dat bij de alarm- en data-evaluatie ook de gegevens van de sensoren van het EWS moeten worden beoordeeld.

7 Conclusies en aanbevelingen

- Ter bepaling van de toxiciteit van het monsterwater voor algen met behulp van de bbe- algentoximeter, wordt het systeem of op het ruwe oppervlaktewater aangesloten of op een filtraat hiervan. Indien het systeem op het ruwe oppervlaktewater wordt aangesloten, is het tevens mogelijk het chlorofylgehalte hiervan te meten met de aanduiding welke algenklasse dit betreft. Deze informatie vervalt in het filtraat vanuit een membraanfilter als monsterwater wordt ingezet.
- De kweek van een reserveculture kan op verschillende manieren plaatsvinden. Deze reserveculture kan meteen ingezet worden in de bbe-algentoximeter, indien een kweek in de bbe-algentoximeter niet goed van kwaliteit is (besmetting met andere organismen, sterfte). De meest gebruikte algensoort is *Chlorella vulgaris*, maar ook andere soorten kunnen worden ingezet.
- De kweek van een algencultuur in de fermentor van bbe-algentoximeter is grotendeels gestandaardiseerd. Enkel de opbouw van de fermentor (in de vorm van gebruik van halogeenvlampen of TL lampen) met of zonder filter en het materiaal van de fermentor (glas of kunststof) kan variatie in de kweek ten aanzien van de algendichtheid en kwaliteit veroorzaken.
- Een periodieke controle van de kwaliteit van de gekweekte algen in de vorm van 0-metingen en controlemetingen met een toxische stof is van belang om de variatie in het meetsignaal tijdig vast te kunnen stellen.
- Naast het gebruik van de 0-metingen en controlemetingen, zijn ook metingen noodzakelijk om de gehele bbe-algentoximeter te controleren op een juiste werking. Afwijkingen hierin resulteren in voortijdig onderhoud of hercalibratie van pompen en sensor.
- Verder onderzoek naar de prestatiekenmerken van de bbe-algentoximeter is van belang om de bbe-algentoximeter de status van volwaardig online bewakingsinstrument (in relatie tot chemische sensoren) te geven. Hierbij is invoering van een kwaliteitsborging bij de fabrikant zeer gewenst (wijze van kalibratiesensoren, calibratierapporten). Verder levert een invoering van kwaliteitssysteem een positieve bijdrage aan de acceptatie van dit systeem bij de beheerders en managers. Periodiek (ten minste één maal per jaar) dienen de prestatiekenmerken te worden vastgelegd.
- Onder bepaalde omstandigheden is het mogelijk om een verdergaande standaardisatie van de algentoximeter uit te voeren. Hierdoor wordt implementatie makkelijker en met een goede kwaliteitsborging en data-evaluatie zijn gegevens met verschillende monitoren goed te vergelijken.

I Literatuur

Blaise C, Legault R, Bermingham N, Van Coillie R and Vasseur P. 1986. A simple Microplate Algal Assay Technique for Aquatic Toxicity Assessment, Toxicity Assessment: An International Quarterly Vol 1., 261-281, John Wiley & Sons Inc.

Huber-Pestalozzi 1983. Das Phytoplankton des Süßwassers. Teil 7, 1. Hälfte. Chlorophyceae (Grünalgen) Ordnung: Chlorococcales. Die Binnengewässer Band XVI.E. Schweizerbart'sche Verlagbuchhandlung, Stuttgart.

NEN-ISO 8692, 1993. Water Quality- Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*, ISO.

NEN 6505, 1994. Water. Bepaling van de toxiciteit met behulp van algen, Nederlands Normalisatie Instituut 1e druk, Delft.

NEN 6520, 1981. Water. Spectrofotometrische bepaling van het gehalte aan chlorofyl-a, Nederlands Normalisatie Instituut 1e druk, Delft.

Oswald W.J. 1988. Micro-algae and waste-water treatment. In Micro-algal Biotechnology, ed. M.A. & L.J. Borowitzka, Cambridge University Press, Cambridge.

St-Laurent D and Blaise, C. 1992. Comparative Assessment of Herbicide Phytotoxicity to *Selenastrum capricornutum* using Microplate and Flas Bioassay Procedures, Environmental Toxicology and Water Quality, Vol 7, 35-48, John Wiley & Sons Inc.

Wagenvoort, A, Frijns, N & Scaf, W. 2005a. Validatie experiment van de bbe-algentoximeter bij RIZA Eijsden. Aqwa, Goes.

Wagenvoort, A, Frijns, N & Scaf, W. 2005b. Testrapport bbe-algentoximeter. RIZA Eijsden - 13 december tot 15 december 2004. Aqwa, Goes.

Wagenvoort, A, De Hoogh, C, Penders, E, Frijns, N & Kamps, R. 2005c. Standaardisatie, kwaliteitsborging en data-evaluatie van online biologische bewakingssystemen. 1. Daphnia-toximeter (bbe-Moldaenke, Kiel, D). BTO rapport 2004.013, Kiwa, Nieuwegein.

Wagenvoort, A & Frijns, N. 2006. Testrapport maart 2006 - bbe-algentoximeter RIZA Eijsden. Relatie tussen de gevoeligheid van de algentoximeter en de respons op het controlemonster. Aqwa, Goes.

II Adresgegevens beheerders van de bbe-algentoximeters in Duitsland en Nederland en de configuratie van deze systemen.

Onderwerp	Magdeburg	Hamburg	Eijsden	Lateraalkanaal	Keizersveer	Essen	Karlsruhe	Nieuwegein	Leipzig
Eigenaar	Landesbetrieb für Hochwasserschutz und Wasserwirtschaft Sachsen-Anhalt (LHW)	Institut für Hygiene und Umwelt -Bereich Um-weltuntersuchun gen	RIZA	WML	Evides waterbedrijf NV	Landesumwelt amt NRW	Landesanstalt f. Umweltschutz Baden-Württemberg	Het Waterlaboratoriu m en WaterLeidingBed rijn Amsterdam	UFZ - Umweltfor- schungszentrum Leipzig/Halle GmbH
E-mail	Thieme@staum.d. mu.lsa-net.de	Michael.Lechelt@ bug.hamburg.de	n.frijns@riza.rws. minvenw.nl	p.engels@wml.nl	f.jonker@evides.nl	harald.teicher@ lua.nrw.de	Michael.Marten@ lfuka.lfu.bwl.de	Eric.Penders@Het waterlaboratoriu m.nl	fd@uoe.ufz.de
Riviersysteem	Elbe	Elbe (2x) en Bille (1x)	Maas	Maas	Maas	Rijn	Rijn (en laboratoriumteste n)	Rijn	laboratoriumteste n?
Filtratie (µm)			0,2	1000	800		0,2		
Configuratie									
Ingebruikname			1-11-2005	2000	2001				
Aantal	2	2	2	2	2	2	2	2	1
meetlussen									
Type monster- waterpomp	Verder	Verder en Watson-Marlow halogeen en TL-verlichting	Watson & Marlow	Watson & Marlow (sinds 2005)	Watson & Marlow	Verder	Watson & Marlow	Watson & Marlow	Verder
Licht	TL-verlichting	TL-verlichting	TL-verlichting	TL-verlichting	TL-verlichting met daglicht filter	halogeen- verlichting	TL-verlichting	halogeen- verlichting	halogeen- verlichting
Sensor	new optics	new optics en new optics	New optics	new optics	new optics	old optics	new optics, sen- sor with bottom cooling	new optics	new optics
Nutriënt-opl.	V en V	V	V	V	V	V	special	I	
Algen	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Scenedesmus</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>
- concentratie fermentor (r.u.)			2000	2000	3000			2000	
- controle				periodiek kraanwater	wekelijks kraanwater				
Referentiewater			4	4	10 x s.d.				
Alarmwaarde (%)					referentiewatertest, optimaal 4				

Onderwerp	Magdeburg	Hamburg	Eijsden	Lateraalkanaal	Keizersveer	Essen	Karlsruhe	Nieuwegein	Leipzig
Referentiewater- test			Ja (periodiek)	ja	ja			ja	
Controle monster					ja				
- frequentie			2x per dag	Periodiek	3x per dag				
- verbinding			diuron	Diuron	diuron				
- concentratie			7	5	5				
(µg/L)									
- gevoeligheid (%)			2,6		2,5				
inhib./µg)									

III Samenstelling media

1: Chlorella medium

STOCKOPLOSSINGEN

Stockoplossing A.1

Los 125 gram kaliumnitraat (KNO_3) op in 1 liter MQ water

Stockoplossing A.2

Los 5 gram calciumchloride ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) op in 500 ml. MQ water

Stockoplossing A3

Los 150 gram magnesiumsulfaat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) op in 500 ml. MQ water

Stockoplossing A4

Los 72,5 gram dikaliumwaterstoffosfaat (K_2HPO_4) op in 500 ml. MQ water

Stockoplossing A5

Los 47,5 gram kaliumdiwaterstoffosfaat (KH_2PO_4) op in 500 ml. MQ water

Stockoplossing A6

Los op in 500ml. MQ water:

1,43 gram boorzuur (H_3BO_3)

905 mg mangaanchloride ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)

110 mg zinksulfaat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

9 mg ammoniummolybdaat

39,5 mg kopersulfaat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

245 mg kobaltnitraat ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

Stockoplossing A7

Los op in ca. 0,5 liter MQ water 0,8 gram natrium-EDTA
($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

Voeg hieraan toe 25,5 ml ijzer(II)ammoniumsulfaat ($(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$) en vul aan tot 1 liter.

Steriliseer deze oplossing voor gebruik, door filtratie over een 0,20 μm filter.

De stockoplossingen worden in de koelkast bewaard en zijn 1 jaar houdbaar.

CHLORELLA MEDIUM BEREIDING

Vul een glazen kolf met 10 liter MQ water en voeg toe:

100 ml Stockoplossing A1
10 ml Stockoplossing A2
10 ml Stockoplossing A3
20 ml Stockoplossing A4
20 ml Stockoplossing A5
5 ml Stockoplossing A6

Meng het medium en verdeel de 10 liter over 4 infuusflessen van 3 liter.

(goede menging van de kolf vereist; vanuit de kolf 1 fles vullen, kolf goed schudden en inhoud van fles meteen weer terug in de kolf)

Steriliseer de flessen met het medium in de autoclaaf gedurende 20 minuten bij 121°C.

De oplossing dient na sterilisatie en afkoeling helder te zijn. Indien niet geval is er sprake geweest van slechte menging en zijn de oplossingen niet geschikt voor gebruik.

Na afkoelen van de flessen 12,5 ml steriele stockoplossing A7 (6.2.7) steriel toevoegen per fles.

2. BBE I Medium

STOCKOPLOSSINGEN

Stockoplossing BBE1.1

Los op in 5 liter MQ water

NaNO₃ 74,5 gram

KH₂PO₄ 62,5 gram

MgSO₄.7H₂O 50,0 gram

CaCl₂.2H₂O 1,106 gram

H₃BO₃ 1,142 gram

Stockoplossing BBE1.2

Los op in 1 liter MQ water

EDTA 45 gram

KOH 50 gram

Stockoplossing BBE1.3

Los op in 1 liter MQ water

ZnSO₄.7H₂O 8,81 gram

MnCl₂.4H₂O 1,42 gram

(NH₄)Mo₇O₂₄.H₂O 0,65 gram

CuSO₄.5H₂O 1,57 gram

Co(NO₃)₂.6H₂O 0,49 gram

Stockoplossing BBE1.4

EDTA 5 gram

FeSO₄.7H₂O 4,98 gram

Hierbij eerst EDTA in 400 ml MQ water oplossen, FeSO₄ toevoegen en tot 1 liter aanvullen

BBE 1 Medium bereiding

8,7 liter MQ water in een 10 liter jerrycan (donker)

1000 ml stockoplossing BBE1.1

100 ml stockoplossing BBE1.2

100 ml stockoplossing BBE1.3

100 ml stockoplossing BBE1.4

3. BBE V Medium

Toevoegen aan 10 liter MQ of demiwater:

116.0 mg CaCl₂.2H₂O

5000 mg UreaCO(NH₂)₂

2400 mg K₂HPO₄

1533 mg KH₂PO₄

2000 mg MgSO₄.7H₂O

Woods Hole oplossing 10 ml

Voor bereiding van Woods hole, toevoegen aan 1 liter MQ of demiwater:

10.0 mg CoCl₂.6H₂O

10.0 mg CuSO₄.5H₂O

1000 mg FeCl₃.6H₂O

1000 mg H₃BO₃

180 mg MnCl₂.4H₂O

25000 mg Na₂EDTA

6.0 mg NaMoO₄.2H₂O

22.0 mg ZnSO₄.7H₂O

0.5 mg Biotin

100 mg Thiamine HCl

0.5 mg vitamine B12

IV Onderhoudsschema RIZA

n/jaar	1	2	3	4	5
Weeknummer					
Datum					
Uitvoerende					
Aanvullend onderhoud					
Functioneert de toximeter storingsvrij	J / N	J / N	J / N	J / N	J / N
Nutriënten vervangen	J / N	J / N	J / N	J / N	J / N
Fermentor zonder vlokken en grasgroen, macroscopische beoordeling	J / N	J / N	J / N	J / N	J / N
Wekelijksonderhoud					
Reinigen (met perslucht doorblazen) incubatieslangen (loops) ¹	52	J / N	J / N	J / N	J / N
Reinigen (met perslucht doorblazen) van dunne slangen	52	J / N	J / N	J / N	J / N
Reinigen van de luchtslang van de fermentor	52	J / N	J / N	J / N	J / N
Reinigen aanvoer slangen monsterwater en referentiewater	52	J / N	J / N	J / N	J / N
Fermentor vrij van infecties, microscopische beoordeling	52	J / N	J / N	J / N	J / N
Controlemonster aangemaakt	52	J / N	J / N	J / N	J / N
Concentratie controlemeting (µg/L diuron)					
Controle T-sensor fermentor, afwijking (°C)	26				
Code referentiemeter:					
Maandelijksonderhoud					
Reinigen (met perslucht) afvoerslangen	12	J / N	J / N	J / N	J / N
Pompslangen vervangen	12	J / N	J / N	J / N	J / N
Kalibratie van het debiet van de pompen (3 dagen na het vervangen)	12	J / N	J / N	J / N	J / N
Nutrientenpomp (volume in 60 s. in ml) (debiet in ml/uur)					
Monsterpomp – algen (volume in 60 s. in ml) (debiet in ml/uur)					
Monsterpomp – monster (volume in 60 s. in ml) (debiet in ml/uur)					
Reinigen kranen en verbindingen (connectoren)	12	J / N	J / N	J / N	J / N
Kwartaalonderhoud					
Alle slangen vervangen	4	J / N	J / N	J / N	J / N
Schoonmaken toevoer van referentie- en monsterwater	4	J / N	J / N	J / N	J / N
Reinigen van de cuvet in de meetsensor	4	J / N	J / N	J / N	J / N
Pomplager van nutriëntdoseringscontrollen	4	J / N	J / N	J / N	J / N
Fluorometer reinigen	4	J / N	J / N	J / N	J / N
Fermentor reinigen	4	J / N	J / N	J / N	J / N
Lamp van de fermentor vervangen	< 4	J / N	J / N	J / N	J / N
Overig					

Opmerkingen op bladzijd 2 genoteerd	J / N	J / N	J / N	J / N	J / N
Fermentor reinigen	J / N	J / N	J / N	J / N	J / N
Nieuwe algen in fermentor ingezet	J / N	J / N	J / N	J / N	J / N
Status (Operationeel / Niet operationeel)	O / NO	O / NO	O / NO	O / NO	O / NO
Monsterwater (Referentiewater / Maaswater)	R / M	R / M	R / M	R / M	R / M
Systeem vrijgegeven (noteer tijdstip)					
Controlemeting of spiketest uitgevoerd	J / N	J / N	J / N	J / N	J / N

1: Chloorspoeling: gebruik 2 ml chlooroplossing en voeg dit toe; goed naspoeien met kraanwater en lucht

OPMERKINGEN

Datum:

Datum:

V Dagelijkse controle (voorbeeldformulier RIZA)

Jaar en week									
Datum en tijd controle									
Uitvoerende									

Technisch functioneren

parameter	referentiewaarde	zondag	maandag	dinsdag	woensdag	donderdag	vrijdag	zaterdag
Datum								
Technisch alarm op scherm		JA / NEE*	JA / NEE*	JA / NEE*	JA / NEE*	JA / NEE*	JA / NEE*	JA / NEE*
Totaal chlorofyl fermentor	constant (2000) [r.u.]	JA / NEE*	JA / NEE*	JA / NEE*	JA / NEE*	JA / NEE*	JA / NEE*	JA / NEE*
Actief chlorofyl fermentor	[r.u.]							
Transmissies	> 80 [%]							
Temperatuur fermentor	23,5 tot 24,5 [°C]							
Peltier element aangestuurd		JA / NEE*	JA / NEE*	JA / NEE*	JA / NEE*	JA / NEE*	JA / NEE*	JA / NEE*
Temperatuur incubatieruimte	≥ 23 EN ≤ 27 [°C]							
Doseersnelheid nutriënten	6 tot 15 [%]							
Groeisnelheid fermentor	> 0,5 [1/d]							

Genty parameter, totaal	55 tot 70	[%]							
Totaal chlorofyl in monster	< 0,5	[µg/ L]	Door defecte LED wordt er enig chlorofyl in het monsterwater geregistreerd. Wordt in december door BBE opgelost.						
Groenalgen	< 0,5	[µg/ L]							
Conclusie: storing?			JA / NEE *	JA / NEE *	JA / NEE *	JA / NEE *	JA / NEE *	JA / NEE *	JA / NEE *
omschrijving storing									

Beoordeling waterkwaliteit

parameter	referentiewaarde	zondag	maandag	dinsdag	woensdag	donderdag	vrijdag	zaterdag
Type monsterwater	e	Maas/referentie *	Maas/referentie *	Maas/referentie e *	Maas/referentie e *	Maas/referentie e *	Maas/referentie e *	Maas/referentie e *
Alarm Inhibition	< 4	JA / NEE *	JA / NEE *	JA / NEE *	JA / NEE *	JA / NEE *	JA / NEE *	JA / NEE *
Limit	< 4	[%]	OK / NOK **	OK / NOK **	OK / NOK **	OK / NOK **	OK / NOK **	OK / NOK **
Controle monster Inhibition, gemiddelde		JA / NEE *	JA / NEE *	JA / NEE *	JA / NEE *	JA / NEE *	JA / NEE *	JA / NEE *
minimum	≥ 15	OK / NOK *	OK / NOK *	OK / NOK *	OK / NOK *	OK / NOK *	OK / NOK *	OK / NOK *
maximum	≤ 28	OK / NOK *	OK / NOK *	OK / NOK *	OK / NOK *	OK / NOK *	OK / NOK *	OK / NOK *

Conclusie: alarm? melding Omschrijving alarm	JA / NEE *	JA / NEE *	JA / NEE *	JA / NEE *	JA / NEE *	JA / NEE *	JA / NEE *

Opmerking(en):

VI Programma meting ATOX

Meetprocedure online bbe-algentoximeter
 Grijs vlak: Het schoonmaken van de sensor
 Geel vlak: Meting van algen in monster
 Wit vlak procedure: Monstertransport

Testing	Procedure	Cycle 1 Cycle 2	
		Active Loop	
Sample and Algae	Incubation	1	2
	Fill Sensor (Loop)	1	2
	Fill Loop (Water)	1	2
	Tune LEDES	1	2
	F0 Measurement	1	2
	FM Measurement	1	2
	Get FM data	1	2
	F Measurement	1	2
	Transmission	1	2
	Empty Sensor	1	2
	Fill Sensor (Water)	1	2
	Clean Hoses (Water)	1	2
	Empty Sensor	1	2
	Fill Sensor (Water)	1	2
	Empty Sensor	1	2
Water and Algae	Incubation	2	1
	Fill Sensor (Loop)	2	1
	Fill Loop (Water)	2	1
	Clean Hoses (Sample)	2	1
	Fill Loop (Sample and Algae)	2	1
	Tune LEDES	2	1
	F0 Measurement	2	1
	FM Measurement	2	1
	Get FM data	2	1
	F Measurement	2	1
	Transmission	2	1
	Empty Sensor	2	1
	Fill Sensor (Water)	2	1
	Clean Hoses (Water)	2	1
	Empty Sensor	2	1
Fill Sensor (Water)	2	1	
Empty Sensor	2	1	
Sample	Incubation		
	Fill Sensor (Loop)		
	Fill Loop (Water)		
	Fill Loop (Water and Algae)	1	2
	Tune LEDES		
	F0 Measurement		
	FM Measurement		

	Get FM data
	F Measurement Transmission
	Cleaning sensor (moving sample)
	Empty Sensor
	Fill Sensor (Water)
	Clean Hoses (Water)
	Empty Sensor
	Fill Sensor (Water)
	Empty Sensor
Calculations and presentation results, start new cycle	

