

Ministerieel besluit tot goedkeuring van het compendium voor de monsterneming, meting en analyse van water (WAC)

Rechtsgronden

Dit besluit is gebaseerd op:

- het decreet van 5 april 1995 houdende algemene bepalingen inzake milieubeleid, artikel 5.6.2, zesde lid, ingevoegd bij het decreet van 25 april 2014 en artikel 5.6.5, tweede lid, ingevoegd bij het decreet van 25 april 2014 en gewijzigd bij het decreet van 8 december 2017;
- het VLAREL van 19 november 2010, artikel 45, §1, tweede lid, ingevoegd bij het besluit van de Vlaamse Regering van 3 mei 2019.

Vormvereisten

De volgende vormvereisten zijn vervuld:

- De afdeling Gebiedsontwikkeling, Omgevingsplanning en -projecten van het Departement Omgeving heeft een voorstel tot wijziging van het compendium voor de monsterneming, meting en analyse van water (WAC) gedaan op [datum].
- Het ontwerp werd met mededeling nr. [xxx] op [datum] meegedeeld aan de Europese Commissie, met toepassing van artikel 5 van richtlijn (EU) 2015/1535 van het Europees Parlement en de Raad van 9 september 2015 betreffende een informatieprocedure op het gebied van technische voorschriften en regels betreffende de diensten van de informatiemaatschappij.
- Het ontwerp van ministerieel besluit werd van [datum] tot en met [datum] gepubliceerd op de websites van het Departement Omgeving en het inspraakportaal van het beleidsdomein Omgeving. Tijdens die termijn kon iedereen zijn opmerkingen meedelen.

Motivering

Dit besluit is gebaseerd op de volgende motieven:

- Ten gevolge van internationale en Vlaamse ontwikkelingen en recent onderzoek zijn aanpassingen aan een aantal bestaande methoden en de opname van nieuwe methoden in het compendium voor de monsterneming, meting en analyse van water (WAC) noodzakelijk.
- Volgens artikel 45 van het VLAREL passen erkende laboratoria voor de monsternemingen, beproevingen, metingen en analyses waarvoor ze erkend zijn, de methoden toe van de compendia voor water (WAC), lucht (LUC), bodembescherming (BOC), het Mestdecreet (BAM) en het Materialen- en Bodemdecreet (CMA). Tussen de compendia bestaan er kruisverwijzingen.

- Om praktische, organisatorische en juridische redenen voor zowel de laboratoria, de overheid als de opdrachtgevers is het aangewezen dat alle compendia voor de laboratoria die erkend zijn en erkend worden op dezelfde datum in werking treden. Als die gezamenlijke datum van inwerkingtreding wordt 15 januari 2026 vooropgesteld.
- Voor exploitanten, bijvoorbeeld in het kader van zelfcontrole, treedt het geactualiseerde WAC tien dagen na de bekendmaking van dit ministerieel besluit in het Belgisch Staatsblad in werking.
- De laboratoria en andere belanghebbenden zijn geïnformeerd en geconsulteerd over de wijzigingen aan het WAC. Het geactualiseerde compendium voor de monsterneming, meting en analyse van water (WAC) kan online geraadpleegd worden.

Juridisch kader

Dit besluit sluit aan bij de volgende regelgeving:

- het ministerieel besluit van 29 april 2025 tot goedkeuring van het compendium voor de monsterneming, meting en analyse van water (WAC) en tot wijziging van bijlage 4.2.5.2 bij het besluit van de Vlaamse Regering van 1 juni 1995 houdende algemene en sectorale bepalingen inzake milieuhygiëne en het VLAREL van 19 november 2010.

DE VLAAMSE MINISTER VAN OMGEVING EN LANDBOUW BESLUIT:

Enig artikel. Het compendium voor de monsterneming, meting en analyse van water, afgekort WAC, en de bijhorende inhoudstafel, die opgenomen zijn in de bijlage die bij dit besluit is gevoegd, worden goedgekeurd.

Voor wat de laboratoria betreft voor de naleving van de erkenningsvoorwaarden, vermeld in hoofdstuk 4 van het VLAREL van 19 november 2010, en de naleving van de gebruikseisen, vermeld in hoofdstuk 8 van het VLAREL van 19 november 2010 heeft de in het eerste lid bedoelde goedkeuring uitwerking met ingang van 15 januari 2026. Voor het overige heeft die goedkeuring uitwerking met ingang van de tiende dag na de bekendmaking van dit besluit in het Belgisch Staatsblad.

Brussel, (datum).

De Vlaamse minister van Omgeving en Landbouw,

Jo BROUNS

Bijlage. Compendium voor de monsterneming, meting en analyse van water (WAC) als vermeld in het enig artikel

Inhoudstafel van het compendium voor de monsterneming, meting en analyse van water (WAC)

DEEL I. ALGEMEEN

A. Monsterneming en voorbehandeling

Ogenblikkelijke monstername (aan kraan) van water voor menselijke consumptie	WAC/I/A/001	mei 2025
Ogenblikkelijke monstername (aan kraan) van water	WAC/I/A/002	mei 2025
Ogenblikkelijke monstername (schepmonster) van water	WAC/I/A/003	mei 2025
Procedure voor het nemen van een verzamelmonster	WAC/I/A/004	juni 2025
Monstername van water via een peilput, inclusief conservering en transport	WAC/I/A/005	mei 2025
Monsterneming van macro-invertebraten en verwerking van de monsters	WAC/I/A/006	november 2017
Monstername van bemalingswater	WAC/I/A/007	mei 2025
Conservering en behandeling van watermonsters	WAC/I/A/010	mei 2025
Meting ter plaatse van temperatuur, pH, elektrische geleidbaarheid, opgeloste zuurstof, vrije chloor en gebonden chloor	WAC/I/A/011	januari 2020
Bepaling van het debiet in controle-inrichtingen voor afvalwater	WAC/I/A/012	mei 2025
Monstervoorbehandeling van asbest in afvalwater	WAC/I/A/013	november 2023

DEEL II. ORGANOLEPTISCHE ANALYSEMETHODEN

A. Organoleptische parameters

Methoden voor de bepaling van organoleptische parameters	WAC/II/A	maart 2013
CIE 1976 totaal kleurverschil - ΔE^*_{ab}	WAC/II/A/001	januari 2005
Onderzoek en bepaling van kleur	WAC/II/A/002	maart 2013
Kwalitatieve vaststelling en kwantitatieve bepaling van geur en smaak	WAC/II/A/003	juni 2017

DEEL III. ANORGANISCHE ANALYSEMETHODEN

A. Algemene testen

Methoden voor de bepaling van algemene anorganische parameters	WAC/III/A	oktober 2021

Bepaling van de droogrest	WAC/III/A/001	juni 2020
Bepaling van de temperatuur	WAC/III/A/003	november 2016
Bepaling van de elektrische geleidbaarheid	WAC/III/A/004	november 2020
Bepaling van de pH	WAC/III/A/005	november 2016
Bepaling van de alkaliniteit en de buffercapaciteit	WAC/III/A/006	november 2016
Bepaling van opgeloste zuurstof	WAC/III/A/008	mei 2025
Bepaling van totale hardheid	WAC/III/A/009	oktober 2015
Bepaling van de troebelingsgraad	WAC/III/A/010	oktober 2018
Berekening van de saturatie-index	WAC/III/A/011	februari 2025

B. Bepaling van elementen

Methoden voor de bepaling van elementen	WAC/III/B	maart 2025
Ontsluiting voor de bepaling van geselecteerde elementen in water – salpeterzuurontsluiting	WAC/III/B/001	oktober 2018
Ontsluiting voor de bepaling van geselecteerde elementen in water – aqua regia ontsluiting	WAC/III/B/002	april 2021
Bepaling van de geselecteerde elementen met inductief gekoppeld plasma - atomaire emissiespectrometrie	WAC/III/B/010	maart 2025
Bepaling van elementen met inductief gekoppeld plasma - massaspectrometrie (ICP-MS)	WAC/III/B/011	februari 2024
Bepaling van antimoon, arseen en seleen met hydride - atomaire absorptiespectrometrie	WAC/III/B/012	juni 2019
Bepaling van kwik	WAC/III/B/014	juni 2023

C. Bepaling van anionen

Methoden voor de bepaling van anionen	WAC/III/C	maart 2025
Bepaling van opgeloste anionen door vloeistof-chromatografie. Bepaling van bromide, chloride, fluoride, nitraat, nitriet, orthofosfaat en sulfaat	WAC/III/C/001	mei 2022
Bepaling van ionen met een discreet analysesysteem en spectrofotometrische detectie - ammonium, chloride, nitraat, nitriet, orthofosfaat en sulfaat	WAC/III/C/002	juni 2025
Bepaling van het gehalte aan orthofosfaat en totaal fosfor met behulp van doorstroomanalyse	WAC/III/C/010	oktober 2019
Bepaling van fluoride met ion selectieve elektrode	WAC/III/C/020	februari 2023
Bepaling van fluoride met doorstroomanalyse	WAC/III/C/022	mei 2022
Bepaling van het gehalte aan vrij cyanide met behulp van continue doorstroomanalyse	WAC/III/C/030	december 2023
Potentiometrische bepaling van sulfiden	WAC/III/C/040	maart 2025
Spectrofotometrische bepaling van sulfiden	WAC/III/C/041	maart 2025
Bepaling van opgelost chroom VI in water door ionenchromatografie	WAC/III/C/050	februari 2023

D. Bepaling van groepsparameters

Methoden voor de bepaling van groepsparameters	WAC/III/D	februari 2025
Bepaling van de bezinkbare stoffen	WAC/III/D/001	december 2012
Bepaling van vaste stoffen in suspensie. Methode door filtratie op glasvezelfilter	WAC/III/D/002	mei 2022
Bepaling afmeting zwevende stoffen	WAC/III/D/003	januari 2013
Bepaling van het biochemisch zuurstofverbruik (BZV) na 5 dagen	WAC/III/D/010	juni 2025
Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik (CZV)	WAC/III/D/020	mei 2024
Bepaling van de oxideerbaarheid bij warmte	WAC/III/D/022	juni 2019
Bepaling van Kjeldahl-stikstof. Methode na mineralisatie met selenium	WAC/III/D/030	oktober 2013
Bepaling van het gehalte aan nitrietstikstof en nitraatstikstof en de som van beide met behulp van doorstroomanalyse	WAC/III/D/031	oktober 2016
Bepaling van het totaal stikstofgehalte na oxidatieve digestie met peroxodisulfaat	WAC/III/D/032	november 2016
Bepaling van de totale gebonden stikstof (TNb) en opgeloste gebonden stikstof (DNb) na katalytische oxidatieve verbranding bij hoge temperatuur	WAC/III/D/033	juli 2025
Bepaling van het gehalte aan totaal cyanide met behulp van continue doorstroomanalyse	WAC/III/D/036	december 2023
Bepaling van de methyleenblauw actieve substanties (MBAS) index met behulp van doorstroomanalyse	WAC/III/D/040	mei 2017
Bepaling van de totale organische koolstof (TOC) en/of de opgeloste organische koolstof (DOC)	WAC/III/D/050	mei 2025

E. Bepaling van kationen

Methoden voor de bepaling van kationen	WAC/III/E	juni 2023
Bepaling van ammoniumstikstof door manuele spectrofotometrie	WAC/III/E/020	oktober 2016
Bepaling van het gehalte aan ammoniumstikstof met behulp van doorstroomanalyse	WAC/III/E/021	oktober 2012
Bepaling van het gehalte aan ammoniumstikstof met behulp van ionenchromatografie	WAC/III/E/023	oktober 2012

DEEL IV. ORGANISCHE ANALYSEMETHODEN

A. Bepaling van specifieke parameters

Bepaling van fenolische verbindingen in water	WAC/IV/A/001	oktober 2021

Bepaling van polycyclische aromatische koolwaterstoffen in water	WAC/IV/A/002	januari 2024
Bepaling van ureum	WAC/IV/A/003	oktober 2017
Bepaling van di-2-ethylhexylftalaat en andere ftalaten in oppervlaktewater	WAC/IV/A/004	oktober 2021
Bepaling van octylfenol, nonylfenol en bisfenol A in afvalwater met behulp van LC-MS/MS	WAC/IV/A/005	augustus 2015
Toestelinstellingen van GC-MS/MS bij de bepaling van organische parameters	WAC/IV/A/006	november 2018
Bepaling van formaldehyde in water	WAC/IV/A/007	oktober 2019
Bepaling van ftalaten in water met GC-MS/MS	WAC/IV/A/008	oktober 2020
Bepaling van organofosforpesticiden in water	WAC/IV/A/010	oktober 2021
Bepaling van matig vluchtige chloorkoolwaterstoffen in water	WAC/IV/A/015	juni 2024
Bepaling van vluchtige organische verbindingen in water	WAC/IV/A/016	mei 2022
Specifieke bepaling van niet-ionogene surfactanten in water met LC-am-MS	WAC/IV/A/021	maart 2025
Specifieke bepaling van kationische surfactanten in water met LC-MS	WAC/IV/A/022	juni 2024
Bepaling van dioxines en dioxineachtige verbindingen in water	WAC/IV/A/023	juni 2024
Bepaling van aromatische amines in water	WAC/IV/A/024	oktober 2021
Bepaling van per- en polyfluoralkylverbindingen (PFAS) in water met LC-MS/MS	WAC/IV/A/025	mei 2025
Bepaling van ultrakorte keten per- en polyfluoralkylverbindingen (PFAS) in water met LC-MS/MS	WAC/IV/A/026	mei 2025
Bepaling van pesticiden in water met LC-MS	WAC/IV/A/027	oktober 2021
Bepaling van pesticiden in water met GC-MS	WAC/IV/A/028	oktober 2021
Bepaling van glyfosaat en AMPA in water met LC-MS	WAC/IV/A/029	november 2020
Bepaling van gebromeerde brandvertragers in water	WAC/IV/A/030	november 2018
Bepaling van organotinverbindingen in water	WAC/IV/A/031	november 2018
Bepaling van gehalogeneerde azijnzuren (HAA's) in water	WAC/IV/A/033	juni 2024
Bepaling van microcystine-LR in drinkwater	WAC/IV/A/034	juni 2024
Bepaling van 17-bèta-estradiol in drinkwater	WAC/IV/A/036	maart 2025

B. Bepaling van groepsparameters

Bepaling van de fenolindex met behulp van continue doorstroomanalyse	WAC/IV/B/001	april 2021
Bepaling van petroleumetherextraheerbare stoffen in water	WAC/IV/B/005	januari 2012

Extraheerbare organische halogeenverbindingen (EOX) in water	WAC/IV/B/010	juni 2024
Adsorbeerbare organische halogeenverbindingen (AOX) in water	WAC/IV/B/011	juni 2024
Purgeerbare organische halogeenverbindingen (POX) in water	WAC/IV/B/012	juni 2024
Bepaling van het adsorbeerbaar organisch fluor (AOF) gehalte met combustion-ionchromatografie	WAC/IV/B/013	juni 2023
Organische screening	WAC/IV/B/020	januari 2013
Organische screening: Leidraad voor de identificatie van organische verbindingen in water met behulp UHPLC-HRMS	WAC/IV/B/021	februari 2018
Kwalitatieve GC-screening	WAC/IV/B/022	november 2018
Bepaling van minerale olie in water met gaschromatografie	WAC/IV/B/025	juni 2024
Bepaling van tetrachlooretheenextraheerbare stoffen in water met IR-spectrofotometrie	WAC/IV/B/026	november 2016
Gelpermeatiechromatografie (GPC) voor de zuivering van monsterextracten bij de bepaling van organische parameters	WAC/IV/B/040	september 2010

DEEL V. BIOLOGISCHE ANALYSEMETHODEN

A. Bepaling van bacteriologische parameters

Bepaling van totaal kiemgetal	WAC/V/A/001	mei 2025
Bepaling van totale coliformen en <i>E.coli</i>	WAC/V/A/002	oktober 2024
Bepaling van enterokokken	WAC/V/A/003	augustus 2024
Bepaling van <i>Salmonella</i> spp.	WAC/V/A/004	augustus 2021
Bepaling van <i>Legionella</i> in drinkwater en in koeltorenwater	WAC/V/A/005	mei 2025
Bepaling van <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	WAC/V/A/006	maart 2025
Bepaling van <i>Clostridium perfringens</i>	WAC/V/A/007	augustus 2021
Bepaling van coagulase positieve stafylokokken	WAC/V/A/008	augustus 2021
Bepaling van de meetonzekerheid bij microbiologische analyses	WAC/V/A/009	november 2020
Opsporing en telling van somatische colifagen	WAC/V/A/010	augustus 2024

B. Bepaling van ecotoxiciteit

Ecotoxiciteitstest met invertebraten: acute toxiciteit voor de watervlo (<i>Daphnia magna</i>) of het pekelkreeftje (<i>Artemia franciscana</i>)	WAC/V/B/001	juni 2025
Ecotoxiciteitstest met vissen: acute toxiciteit voor zebravisembryo (<i>Danio rerio</i>)	WAC/V/B/002	juni 2023

Ecotoxiciteitstest met algen: groei-inhibitietest met de zoetwateralg (<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>) of de mariene alg (<i>Phaeodactylum tricornutum</i>)	WAC/V/B/003	juni 2025
Ecotoxiciteitstest met bacterie: acute toxiciteit voor de luminescente bacterie (<i>Aliivibrio fischeri</i>)	WAC/V/B/004	juni 2025
Zahn-Wellenstest op afvalwaters: bio-elimineerbaarheid van DOC en toxiciteit na 7 tot 28 dagen behandeling	WAC/V/B/005	november 2020
Ecotoxiciteitstest met vissen: acute toxiciteit voor forel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	WAC/V/B/007	juni 2023

C. Bepaling van biodiversiteit

BBI-berekening op basis van op het veld verzamelde macro-invertebraten	WAC/V/C/001	september 2015
MMIF-berekening op basis van op het veld verzamelde macro-invertebraten	WAC/V/C/002	september 2015

DEEL VI. VALIDATIE

A. Algemeen

Prestatiekenmerken	WAC/VI/A/001	juli 2025
Meetonzekerheid	WAC/VI/A/002	april 2020
Kwaliteitseisen voor de analysemethoden	WAC/VI/A/003	juli 2025
Voorwaarden voor rapportering van monsternamegegevens en analyseresultaten door een erkend laboratorium	WAC/VI/A/004	april 2025

Het compendium voor de monsterneming, meting en analyse van water (WAC)

Het compendium vermeld in het enig artikel is in extenso beschikbaar via de website <https://emis.vito.be/nl/erkende-laboratoria/water-gop/compendium-wac> met als kenmerk MB 2026.

Gezien om gevoegd te worden bij het ministerieel besluit tot goedkeuring van het compendium voor de monsterneming, meting en analyse van water (WAC).

Brussel, (datum).

De Vlaamse minister van Omgeving en Landbouw,

Jo BROUNS

Ogenblikkelijke monstername (aan kraan) van water voor menselijke consumptie

INHOUD

1	TOEPASSINGSGEBIED	4
2	APPARATUUR, MATERIAAL EN OPLOSSINGEN	4
3	BEPALING VAN DE MONSTERNAMEMETHODE	6
4	UITVOERING MONSTERNEMING	8
4.1	<i>Standaardmethode A: monstername voor de bepaling van de waterkwaliteit van het geproduceerde/aangeleverde water</i>	8
4.1.1	Vorbereiding monstername	8
4.1.2	Monstername (fysico)chemische parameters	9
4.1.3	Monstername bacteriologische parameters	9
4.1.4	Beëindigen monstername	9
4.2	<i>Standaardmethode B: monstername voor de bepaling van de waterkwaliteit aan een afnamepunt ter consumptie</i>	9
4.2.1	Vorbereiding monstername	9
4.2.2	Monstername (fysico)chemische parameters	10
4.2.3	Monstername bacteriologische parameters	10
4.2.4	Beëindigen monstername	11
4.3	<i>Standaardmethode C: monstername voor bepaling risico-evaluatie bij consumptie (worst-case benadering)</i>	11
4.3.1	Vorbereiding monstername	11
4.3.2	Monstername (fysico)chemische OF bacteriologische parameters	12
4.4	<i>Procedures te respecteren i.k.v. monstername in uitvoering van het controleprogramma conform het Besluit van Vlaamse Regering houdende reglementering inzake de kwaliteit en de levering van water bestemd voor menselijke consumptie (cfr. Bijlage A)</i>	12
4.5	<i>Speciale staalnamepunten</i>	13
4.6	<i>Vullen van recipienten</i>	13
4.6.1	Algemeen	13
4.6.2	Conservering	14
4.6.3	Vulvolgorde	14
4.6.4	Aandachtspunten bij het vullen van recipienten	15
4.7	<i>Richtlijnen m.b.t. specifieke analyseparameters</i>	16
4.7.1	PFAS	16
5	METINGEN TER PLAATSE	16
6	VELDREGISTRATIES	17
7	RAPPORTERING	17
8	TRANSPORT	18
9	REFERENTIES	18
10	BIJLAGEN	19
BIJLAGE A		19
A.1	<i>Tapkraan bij particulieren of publieke gebouwen (eventueel bij bedrijven)</i>	19
A.2	<i>Leegloopkraan (dicht bij de watermeter)</i>	20

BIJLAGE B : voorbeeld van een monsternemingsformulier	22

1 TOEPASSINGSGEBIED

Deze procedure beschrijft de ogenblikkelijke monsternamen aan een kraan van water bestemd voor menselijke consumptie, inclusief de specificaties betreffende conservering, transport en metingen ter plaatse.

Volgens Richtlijn (EU) 2020/2184 wordt water voor menselijke consumptie gedefinieerd als a) het water dat onbehandeld of na behandeling bestemd is voor drinken, koken, voedselbereiding of andere huishoudelijke doeleinden, zowel in openbare als in particuliere gebouwen en terreinen, ongeacht de herkomst en of het water wordt geleverd via een distributienet, geleverd uit een tankschip of in flessen of in verpakkingen wordt gedaan, met inbegrip van bronwater, en b) het water dat in levensmiddelenbedrijven wordt gebruikt voor de vervaardiging, de behandeling, de conservering of het in de handel brengen van voor menselijke consumptie bestemde producten of stoffen, met uitzondering van natuurlijke minerale waters (behalve bronwater) en als geneesmiddel gebruikt water.

Wat de microbiologische vereisten betreft is bronwater uitgesloten van de bepalingen in bijlage I, deel A, van Richtlijn (EU) 2020/2184; hiervoor is Richtlijn 2009/54/EG van toepassing.

Deze monsternamen kan kaderen binnen verschillende wetgevende kaders (bijv. levering van water voor menselijke consumptie, toezicht volksgezondheid, milieuhygiëne, ...), waardoor verschillende methoden worden beschreven, afhankelijk van het beoogde doel. In Bijlage A wordt een specifieke monsternamemethode beschreven in kader van het controleprogramma conform het Besluit van Vlaamse Regering houdende reglementering inzake de kwaliteit en de levering van water bestemd voor menselijke consumptie.

Deze procedure beschrijft steeds de monsternamen voor (fysico-)chemische en bacteriologische analyses in het laboratorium. Ook voor metingen ter plaatse van pH, geleidbaarheid, temperatuur, vrije en gebonden chloor en/of opgeloste zuurstof zijn de randvoorwaarden vastgelegd. Voor deze metingen ter plaatse wordt verwezen naar WAC/I/A/011.

Voor de monsternamen aan de kraan van water dat niet voor menselijke consumptie wordt gebruikt (tweedecircuitwater bijv. afvalwater, spoelwater, koelwater, ...) wordt verwezen naar WAC/I/A/002.

2 APPARATUUR, MATERIAAL EN OPLOSSINGEN

- 2.1. Voldoende monsterrecipiënten voor de te analyseren parameters (voorgeconserveerd en/of aantoonbaar steriel, indien van toepassing), voor (fysico-)chemische en/of bacteriologische parameters. De richtlijnen m.b.t. het minimale volume water, de nodige conserveermiddelen en te gebruiken recipiënten (bijv. plastic, glas,...) per parameter(groep) conform WAC/I/A/010 moeten gerespecteerd worden.

Elke monsterrecipiënt in- dient voorzien te zijn van een (voorgedrukte) label met vermelding van monstercodering, datum monsterneming, analyseparameter(s) of andere eenduidige identificatie of link naar de analyseparameter(s), conserveermiddel en/of steriliteit, en houdbaarheid ervan (indien noodzakelijk); facultatief aanduiding plaats/locatie van de monsterneming.

- 2.2. Tang en/of sleutel om opzet- of koppelstukken te verwijderen
- 2.3. Beker/recipient 1 liter voor het opvangen van de eerste liter water bij methode C (steriel, indien gebruikt voor bacteriologische monstername)

Voor bacteriologische parameters kunnen ook steriele zakken gebruikt worden (zie 2.5), met een volume vergelijkbaar met 1 liter.

- 2.4. Beker/recipient 250 à 1000 ml voor het meten van de temperatuur tijdens of bij de monstername aan kranen

Het volume van 250 ml is een afwijking ten opzichte van WAC/III/A/003, maar is bedoeld om het stabiliteitscriterium in methode A binnen een redelijke tijdspanne te kunnen opvolgen.

- 2.5. Trechters of plastic zakken (steriel, indien gebruikt voor bacteriologische monstername)
- 2.6. Absorberend papier
- 2.7. Katoenen watten (kwaliteit voor medisch gebruik)
- 2.8. Draagbare bunzenbrander met gasvulling
- 2.9. Aansteker
- 2.10. Vochtige alcoholdoekjes, bijv. isopropanoldoekjes
- 2.11. Desinfectans: ethanol, isopropanol, hypochloriet, of ander gelijkwaardig
- 2.12. Desinfecterende handgel
- 2.13. Persoonlijke beschermingsmiddelen, afhankelijk van de omstandigheden van de monsterneming.

Wegwerphandschoenen en veiligheidsbril (bij het vullen van recipienten met conserveermiddelen) worden aanbevolen. Bij monstername i.k.v. *Legionella* wordt ademhalingsbescherming FFP3 tegen aerosolen aanbevolen.

- 2.14. Draagbare digitale thermometer of thermokoppel afleesbaar tot op 0,1°C conform WAC/III/A/003. Voor veldmetingen is een meetbereik tot +65°C aanbevolen.
- 2.15. Monsternemingsformulier
- 2.16. Timer / klok / stopwatch
- 2.17. Kleefband, tape
- 2.18. Schaar (steriel, indien gebruikt voor bacteriologische monstername)
- 2.19. Koelboxen met voldoende diepgevroren koelelementen of koelinstallatie om gekoeld transport van monsters te garanderen
- 2.20. Temperatuurlogger voor koelbox (aanbevolen)
- 2.21. Fototoestel (facultatief)

3 BEPALING VAN DE MONSTERNAMEMETHODE

De uitvoering van een ogenblikkelijke monstername van water (leidingwater, putwater, ...) voor menselijke consumptie aan kranen is afhankelijk van het beoogde doel van de monstername, zoals het bepalen van de kwaliteit van het geproduceerde of aangeleverde water, van het geconsumeerde water, voor risico-evaluatie. Maar de monstername is ook afhankelijk van het (wettelijk) kader (drinkwater, gezondheidsinspectie, sectorale milieuhygiënische bepalingen, ...) en van de te analyseren parameter(s) of parametergroepen.

Daarom is het primordiaal dat de monstername-instantie vóór de monstername over alle informatie i.v.m. doel, kader en analyseparameters voor de monstername beschikt, zodat deze de correcte bemonsteringsmethode(n) kan vastleggen.

Het kan ook voorkomen dat het beoogde doel en opgegeven parameters niet verenigbaar zijn binnen één monstername, en dat de monstername opgesplitst moet worden over verschillende afname- of leverpunten, of zelfs over verschillende tijdstippen. Na deze analyse kan de monsternemer na overleg met de technisch verantwoordelijke een meest gepaste monsternamestrategie vastleggen.

Bij de monstername kan gebruik gemaakt worden van verschillende methodes uit Tabel 1:

Tabel 1

Methode	Type water	Verwijderen koppelstukken	Spoelen	Desinfecteren ¹
A	het geproduceerde/ aangeleverde water (§4.1)	ja	tot constante temp.	ja
B	aan een afnamepunt ter consumptie (§4.2)	ja	kort (ca. 1 l)	ja
C	risico-evaluatie (worst-case) (§4.3)	nee	nee	nee

- **de standaard monsternamemethoden A, B of C**
- **specifieke monsternamemethode** waar binnen één monstername een combinatie van meerdere doeleinden/kaders gemaakt wordt, al dan niet afhankelijk van de te bepalen parameter.

Een voorbeeld hiervan wordt gegeven in Bijlage A. **Voor een monstername in uitvoering van het controleprogramma conform het Besluit van Vlaamse Regering houdende reglementering inzake de kwaliteit en de levering van water bestemd voor menselijke consumptie bestaat een specifieke monsternameprocedure.** Deze specifieke procedure is van toepassing voor waterleveranciers, hetzij drinkwatermaatschappijen, hetzij eigenaars van een private waterwinning die het gewonnen water leveren als water bestemd voor menselijke consumptie zonder een openbaar netwerk te gebruiken. Ook laboratoria die door een waterleverancier worden aangesteld om een controle uit te voeren in uitvoering van de wetgeving inzake drinkwater moeten deze specifieke monsternameprocedure respecteren.

Voor de controle van water in de levensmiddelensector geldt ook een specifieke monsternamemethode (zie <http://www.afsca.be/autocontrole-nl/informatie/waterkwaliteit/>).

¹ Enkel bij monstername van monsters bestemd voor bacteriologische analyses;

De verschillen tussen de methoden zitten hoofdzakelijk in het al dan niet verwijderen van koppelstukken, spoelen en desinfecteren (enkel voor bacteriologische parameters) en de volgorde in monsternamen van de te analyseren parameter(s)(groepen).

Naar interpretatie van de analyseresultaten toe kunnen, op basis van de gekozen monsternamemethode, conclusies getrokken worden of de gemeten waarden representatief zijn voor het water zelf, voor het binnenhuisnetwerk, of voor het specifieke afnamepunt.

De toegepaste monsternamemethode moet altijd vermeld worden op het analyse- of monsternemingsverslag. Indien een combinatie van meerdere methoden toegepast werd, moet in het analyse- of monsternemingsverslag duidelijk zijn welke methode voor welke parameters gebruikt werd.

4 UITVOERING MONSTERNEMING

4.1 STANDAARDMETHODE A: MONSTERNAME VOOR DE BEPALING VAN DE WATERKWALITEIT VAN HET GEPRODUCEERDE/AANGELEVERDE WATER

Dit is de methode om de kwaliteit van het water te bepalen zoals het geproduceerd/ aangeleverd wordt, **zonder** de eventuele invloed van een binnenleidingsnetwerk. Daarom wordt in deze methode steeds gespoeld tot constante temperatuur. Het gaat hier dus om de intrinsieke kwaliteit van het water.

4.1.1 VOORBEREIDING MONSTERNAME

- 1) Voer de monstername uit op een afnamepunt dat zich het dichtst bij de (hoofd)leidingen van het waterdistributienet of pomp bevinden. In praktijk kan dit een afnamepunt in het distributienet zelf zijn, of het leveringspunt bij particulieren, bedrijven of publieke gebouwen. Voor deze laatste wordt bij voorkeur gebruik gemaakt van het afnamepunt dat zich het dichtst bij de watermeter bevindt, maar een normaal afnamepunt waar het water ter beschikking komt van de consument (bijv. keuken, badkamer,...), is eveneens geschikt, zolang voldoende lang gespoeld wordt tot constante temperatuur.

Opmerking: het spoelen bij een normaal afnamepunt zal meer tijd in beslag nemen dan bij het leverpunt, aangezien het volume van de binnenleiding tot aan het afnamepunt mee gespoeld moeten worden.

Lokaliseer het gekozen monsternamepunt en kies de koudwaterkraan of plaats de kraan in de koudwaterstand (indien mengkraan). Elke afwijking hiervan dient gerapporteerd te worden. Het type kraan en/of stand die bemonsterd werd, moet steeds gerapporteerd worden.

Controleer de kraan op eventuele oxidatieverschijnselen (roest). Indien teveel roest aanwezig is, selecteer dan, indien mogelijk, een ander monsternamepunt, bij voorkeur zo dicht mogelijk bij de watermeter. Gebruik de koudwaterkraan of plaats een mengkraan in koudwaterstand.

Documenteer het monsternamepunt eenduidig op het monsternemingsformulier (adres, lokaal, schets, GPS-coördinaten, mengkraan, ...).

Afwijkingen ten aanzien van het monsternamepunt worden gedocumenteerd en gemotiveerd.

- 2) Verwijder alle opzet- en/of koppelstukken (ook zeefje en/of straalbreker, indien aanwezig) die manueel of met behulp van een tang/sleutel losgemaakt kunnen worden. (eventueel laten uitvoeren door de eigenaar om eventuele aantijgingen van schade te vermijden). Verwijder zichtbaar aanklevend vuil met (water) bevochtigd absorberend papier (eenmalig te gebruiken). Maak ook de binnenkant van de kraan schoon met bevochtigd papier.
- 3) Draag minimaal wegwerphandschoenen (éénmalig te gebruiken) bij het vullen van monsterrecipiënten met conserveermiddel.
- 4) Open de kraan ² (mag bij volledig kraandebiet) en spoel tot een constante temperatuur van het water wordt bereikt. Sluit de kraan pas als alle monsterrecipiënten voor (fysico)chemische parameters gevuld zijn.

Volg de temperatuur tijdens het spoelen continu op met behulp van een digitale thermometer die in een overlopende beker (250 ml) onder de waterstraal geplaatst wordt. Constante temperatuur wordt bereikt als de gemeten temperatuur gedurende 1 minuut stabiel blijft (max. 0.1 °C schommeling).

Noteer de gestabiliseerde temperatuur; deze geldt als temperatuursmeting bij de monsterneming.

² Niet van toepassing voor continu stromende kranen.

- 5) Indien (fysico-)chemische parameters bepaald moeten worden, ga verder naar 6); indien enkel bacteriologische parameters bepaald moeten worden, sluit de kraan en ga verder naar 8).

4.1.2 MONSTERNAME (FYSICO)CHEMISCHE PARAMETERS

- 6) Regel de kraan op half debiet en vul de monsterrecipiënten voor fysico-chemische parameters conform §4.6.
- 7) Indien geen bacteriologische parameters bepaald moeten worden, ga verder naar 12).

4.1.3 MONSTERNAME BACTERIOLOGISCHE PARAMETERS

- 8) Desinfecteer de kraan. Dit kan thermisch door de binnenkant en het uiteinde van de kraan gedurende 30 seconden te verhitten (zonder wegwerphandschoenen!) met een draagbare bunzenbrander of door een in ethanol of isopropanol gedrengde prop watten in de uitstroomopening van de kraan te plaatsen en deze met een aansteker in brand te steken. Indien de kraan geverfd is of uit kunststof(onderdelen) bestaat, wordt gedesinfecteerd door de buiten -en binnenkant te bevochtigen met ethanol, isopropanol of ander desinfectans.
- 9) Draag minimaal wegwerphandschoenen (éénmalig te gebruiken) bij het vullen van monsterrecipiënten met conserveermiddel.
- 10) Open de kraan en spoel (mag bij volledig debiet) kort na het desinfecteren om de invloed van het thermisch effect ongedaan te maken of om resten van het desinfectans te verwijderen.
- 11) Regel de kraan op half debiet geopend en vul de voorgeconserveerde natriumthiosulfaat steriele monsterrecipiënt(en) voor bacteriologische parameters conform §4.6.

4.1.4 BEËINDIGEN MONSTERNAME

- 12) Sluit de kraan ³.
- Monteer eventueel verwijderde opzet- en/of koppelstukken.

4.2 STANDAARDMETHODE B: MONSTERNAME VOOR DE BEPALING VAN DE WATERKWALITEIT AAN EEN AFNAMEPUNT TER CONSUMPTIE

Deze monsternamemethode geeft de kwaliteit van het water aan een afnamepunt ter consumptie, **inclusief** de eventuele invloed van een binnenleidingsnetwerk. Deze invloed is afhankelijk van de keuze van het staalnamepunt en de locatie ervan binnen het binneleidingsnetwerk. In deze methode wordt enkel kort (ca. 1 l) gespoeld. De invloed van verontreinigingen van het afnamepunt zelf wordt uitgesloten.

4.2.1 VOORBEREIDING MONSTERNAME

- 1) Voer de monstername uit aan een representatief afnamepunt waar het water ter beschikking komt bij particulieren of publieke gebouwen (of evt. bij bedrijven). In praktijk wordt meestal het afnamepunt ter hoogte van de keukenkraan gekozen.
- Indien deze niet ter beschikking of onbruikbaar (bijv. veel roest,...) is, selecteer dan een ander afnamepunt, bijv. in de badkamer.
- Voor methode B zal in principe steeds de koudwaterkraan of kraan in koudwaterstand gekozen worden, maar kan – in overleg met de opdrachtgever - anders vastgelegd worden in functie van het hoogste risico voor een beoogde analyseparameter (bijv. i.k.v. een specifiek

³ Niet van toepassing voor continu stromende kranen.

beheersplan). Elke afwijking van de koudwaterstand dient gemotiveerd en gerapporteerd te worden. Het type kraan en/of stand die bemonsterd werd, moet steeds gerapporteerd worden.

Lokaliseer het staalnamepunt en controleer de kraan op eventuele oxidatieverschijnselen (roest). Gebruik de koudwaterkraan of plaats een mengkraan in koudwaterstand.

Documenteer het gekozen staalnamepunt eenduidig op het monsternemingsformulier (adres, lokaal, schets, GPS-coördinaten, mengkraan, ...).

Afwijkingen ten aanzien van het staalnamepunt worden gedocumenteerd en gemotiveerd.

- 2) Verwijder alle opzet- en/of koppelstukken (ook zeefje en/of straalbreker, indien aanwezig) die manueel of m.b.v. een tang/sleutel losgemaakt kunnen worden (eventueel laten uitvoeren door de eigenaar om eventuele aantijgingen van schade te vermijden).
Verwijder zichtbaar aanklevend vuil met (water) bevochtigd absorberend papier (eenmalig te gebruiken). Maak ook de binnenkant van de kraan schoon met bevochtigd papier.
- 3) Draag minimaal wegwerphandschoenen (eenmalig te gebruiken) bij het vullen van monsterrecipiënten met conserveermiddel.
- 4) Indien (fysico-)chemische parameters bepaald moeten worden, ga verder naar 5); indien enkel bacteriologische parameters bepaald moeten worden, ga verder naar 8).

4.2.2 MONSTERNAME (FYSICO)CHEMISCHE PARAMETERS

- 5) Open de kraan (mag bij volledig kraandebiet) en spoel kort (ca.1 liter).
- 6) Regel de kraan op half debiet en vul de monsterrecipiënten voor fysico-chemische parameters conform §4.6.

Een veel voorkomende monsternemingsopdracht is om de invloed van de binnenleiding voor een bepaalde parameter (bijv. lood) na te gaan. Hiervoor kan het nodig zijn om de eerste spoeling onder 4) op te vangen en te gebruiken voor de analyse van de desbetreffende parameter (methode C). De overige analyseparameters worden in de volgorde gevuld, zoals beschreven onder §4.6.3.

- 7) Indien bacteriologische parameters bepaald moeten worden, sluit de kraan en ga verder naar 8). Indien geen bacteriologische parameters bepaald moeten worden, ga verder naar 12).

4.2.3 MONSTERNAME BACTERIOLOGISCHE PARAMETERS

- 8) Desinfecteer de kraan. Dit kan thermisch door de binnenkant en het uiteinde van de kraan gedurende 30 seconden te verhitten (zonder wegwerphandschoenen!) met een draagbare bunzenbrander of door een in ethanol of isopropanol gedrengde prop watten in de uitstroomopening van de kraan te plaatsen en deze met een aansteker in brand te steken.
Indien de kraan geveerd is of uit kunststof(onderdelen) bestaat, wordt gedesinfecteerd door de buiten- en binnenkant te bevochtigen met ethanol, isopropanol of ander desinfectans.
- 9) Draag minimaal wegwerphandschoenen (éénmalig te gebruiken) bij het vullen van monsterrecipiënten met conserveermiddel.
- 10) Open de kraan (mag bij volledig debiet) en spoel kort (maximaal 1 liter) na het desinfecteren om de invloed van het thermisch effect ongedaan te maken of om resten van het desinfectans ongedaan te verwijderen.
- 11) Zet de kraan op half debiet geopend en vul de voorgeconserveerde (natriumthiosulfaat steriele monsterrecipiënt(en) voor bacteriologische parameters conform §4.6.

4.2.4 BEËINDIGEN MONSTERNAME

- 12) Vul aansluitend een bijkomende beker of recipiënt voor het meten van de temperatuur bij de monsterneming met behulp van een digitale thermometer. Noteer de temperatuur zodra deze stabiel⁴ is.
- 13) Sluit de kraan.
Monteer eventueel verwijderde opzet- en/of koppelstukken.

4.3 STANDAARDMETHODE C: MONSTERNAME VOOR BEPALING RISICO-EVALUATIE BIJ CONSUMPTIE (WORST-CASE BENADERING)

Deze monsternemingsmethode heeft als opzet om de minst gunstigste omstandigheden van de kwaliteit van het water na te gaan ter hoogte van het staalnamepunt. Deze methode wordt toegepast bij risico-evaluaties en in bijzondere situaties, bijv. bij een uitbraak van *Legionella*.

Bij deze methode wordt de ogenblikkelijke kwaliteit bepaald van het geconsumeerde water aan een bepaald afnamepunt via een eerste afname ('first draw', gelijk aan een volume van 1 liter) van de kraan. Aangezien in veel gevallen enkel de eerste afname bij de monstername overeenkomt met een worst-case benadering in kader van een risico-evaluatie, is deze monstername gericht op de parameter(s) of parametergroep(en) tot een totaal volume van te vullen monsterrecipiënten tot 1 liter.

Wel kan de monstername voor bijkomende parameter(s) of -groep(en) (totaal volume van te vullen monsterrecipiënten is meer dan 1 liter) gecombineerd worden met andere monsternemingsmethoden, zoals beschreven in §4.1 (methode A) of 4.2 (methode B). Voor deze bijkomende parameters geeft het resultaat dan geen worst-case situatie, maar een gemiddelde kwaliteit van het water zoals het geleverd resp. geconsumeerd wordt.

Het gebruik van gecombineerde methoden moet steeds gedocumenteerd worden op het monsternemingsformulier, en moet tevens gerapporteerd worden met aanduiding van de relevante parameter(s)(groepen) per monsternemingsmethode op het analyse- of monsternemingsverslag.

Desgevallend kan een worst-case benadering voor bijkomende parameters via (een) nieuwe monstername(n) op een ander afnamepunt binnen dezelfde locatie of op een ander tijdstip uitgevoerd worden.

4.3.1 VOORBEREIDING MONSTERNAME

- 1) Voer de monstername uit aan een afnamepunt waar het water ter beschikking komt bij particulieren, publieke gebouwen of bedrijven, en waar de minst gunstige omstandigheden heersen of waar het hoogste risico is op contaminatie van de beoogde parameter(groep). In praktijk kan dit ook een afnamepunt zijn waar een besmetting of contaminatie wordt vermoed of al werd vastgesteld.
- 2) In principe kunnen hier zowel koud als warm water of water bij een bepaalde verbruikstemperatuur bemonsterd worden. Deze keuze is steeds in functie van het hoogste risico voor de beoogde analyseparameter, en moet vooraf vastgelegd worden in overleg met de opdrachtgever (bijv. zoals vermeld in het beheersplan, of bij een brononderzoek).
Voor bacteriologische parameters zal bij deze monsternamemethode steeds de stand of kra(a)nen bij verbruikstemperatuur gekozen worden. Elke afwijking hiervan dient gerapporteerd te worden. Het type kraan en/of stand die bemonsterd werd, moet steeds gerapporteerd worden.

⁴ Zie §3 WAC/1/A/011

- 3) Documenteer het staalnamepunt eenduidig op het monsternemingsformulier (adres, lokaal, schets, GPS-coördinaten, mengkraan, ...). Afwijkingen ten aanzien van het staalnamepunt worden gedocumenteerd en gemotiveerd.
- 4) Opzet- en/of koppelstukken (ook zeefje en/of straalbreker, indien aanwezig) worden niet verwijderd (tenzij het type onderzoek dit oplegt).
- 5) De kraan mag niet schoongemaakt of gedesinfecteerd worden.
- 6) De kraan mag niet gespoeld worden.
- 7) Draag minimaal wegwerphandschoenen (eenmalig te gebruiken) bij het vullen van monsterrecipiënten met conserveermiddel.

Indien de bemonstering uitgevoerd wordt in het kader van een *Legionella* uitbraak, is het aangewezen om een ademhalingsbescherming FFP3 masker tegen aërosolen te dragen.

4.3.2 MONSTERNAME (FYSICO)CHEMISCHE OF BACTERIOLOGISCHE PARAMETERS

Belangrijk!!

Meerdere parameter(s)(groepen) binnen methode C kunnen enkel gecombineerd worden, tot een totaal volume aan te vullen recipiënten van 1 liter. De overige parameter(s) of -groepen worden bemonsterd via methode A of B (of een combinatie ervan), ofwel via een nieuwe monstername volgens methode C aan een ander afnamepunt op dezelfde staalnamelocatie (bijv. badkamer) of op een ander tijdstip.

- 8) Open de kraan (op volledig debiet) en vang de **eerste liter water** die uit de kraan stroomt ('first draw' 1 l) op in een maatbeker (steriel indien voor bacteriologische parameters).
Vanuit deze opgevangen liter water kunnen de monsterrecipiënt(en) voor de beoogde parameter(groep) conform §4.6 gevuld worden. Een monsterrecipiënt van 1 liter kan ook rechtstreeks aan de kraan gevuld worden.
- 9) Vul aansluitend een bijkomende beker of recipiënt voor het meten van de temperatuur bij de monsterneming met behulp van een digitale thermometer. Noteer de temperatuur.
- 10) Sluit de kraan, indien geen monsterrecipiënten voor andere parameters gevuld moeten worden.

4.4 PROCEDURES TE RESPECTEREN I.K.V. MONSTERNAME IN UITVOERING VAN HET CONTROLEPROGRAMMA CONFORM HET BESLUIT VAN VLAAMSE REGERING HOUDENDE REGLEMENTERING INZAKE DE KWALITEIT EN DE LEVERING VAN WATER BESTEMD VOOR MENSELIJKE CONSUMPTIE (CFR. BIJLAGE A)

De wettelijke controle op de kwaliteit van in Vlaanderen geleverd water bestemd voor menselijke consumptie wordt toevertrouwd aan de waterleverancier. De waterleverancier is hetzij een drinkwatermaatschappij, hetzij een eigenaar van een private waterwinning die het gewonnen water levert als water bestemd voor menselijke consumptie zonder een openbaar netwerk te gebruiken.

De controle verloopt via 'bewakingcontroles' en 'auditcontroles' met een minimale frequentie die gekoppeld is aan het volume geleverde water (debiet). In beide controles worden zowel bacteriologische als fysico-chemische parameters gemeten.

De staalnameprocedures die werden ontwikkeld zijn voorbeelden van een gecombineerde methode waarbinnen één monstername een combinatie van meerdere doeleinden/kaders gemaakt worden, al dan niet afhankelijk van de te bepalen parameter.

Een onderscheid wordt gemaakt tussen een staalname aan een tapkraan en een staalname aan de leegloopkraan. De staalname aan de leegloopkraan vindt plaats in het kader van het onderzoek dat

een waterleverancier moet uitvoeren bij eerder vastgestelde kwaliteitsproblemen ter hoogte van een tapkraan in het gebouw in kwestie.

Ten einde de éénduidigheid en gelijkvormigheid van de resultaten maximaal te garanderen **MOET** onderstaande procedure worden gevolgd: **zie bijlage A**.

4.5 SPECIALE STAALNAMEPUNTEN

De monstername van kranen kan ook van toepassing zijn op douchekranen. De monstername van douchekranen zal in de meeste gevallen kaderen in een risico-evaluatie (methode C, §4.3), maar kan ook toegepast worden voor de bepaling van de kwaliteit van het geproduceerde/aangeleverde water (methode A, §4.1) of van het geconsumeerde water (methode B, §4.2).

De uitvoering verloopt volledig conform de beschreven richtlijnen inzake volgorde, spoelen, opzetstukken verwijderen, desinfecteren van de beoogde monsternamemethoden, maar met volgende richtlijnen naar uitvoering toe:

- Bij het rechtstreeks vullen van monsterrecipiënten aan een douchekraan kan het voorkomen dat het water gedeeltelijk naast de fles loopt. Om dit te vermijden moet het volledige oppervlak van de douchekop opgevangen worden (methode C: first draw 1 liter van het volledige oppervlak van de douchekop, bijv. met behulp van een trechter of in een zak die aan de buitenkant met een klem aan de douche vastgemaakt wordt (beide steriel, indien monstername voor bacteriologische parameters). Om de monsterrecipiënten te vullen wordt een tipje van de zak weggesneden met een schaar (steriel, indien monstername voor bacteriologische parameters) zodat het water zonder morsen in de monsterrecipiënt kan lopen.
- Voor het betreden van douches dienen schoenvertrekken aangetrokken te worden.

Bij kranen die bediend worden met drukknoppen of sensoren (bijv. douches in zwembaden, handenwassers, drinkwaterdonsen,...), wordt de waterstroom herhaaldelijk herstart totdat het vereiste spoel- en monsternamevolume bereikt werd. Het onderbreken van de waterstroom tijdens spoelen en/of vullen van recipiënten moet als afwijking bij de monstername gerapporteerd worden.

4.6 VULLEN VAN RECIPIENTEN

4.6.1 ALGEMEEN

- De waterstraal steeds bij half debiet aanhouden om inslag van luchtbellen te vermijden.
- Meestal moet het water opgevangen worden in meer dan één monsterrecipiënt, afhankelijk van de te analyseren parameters of parametergroepen, en al dan niet met een conserveermiddel. Vermijd daarom contaminaties van het conserveermiddel door de verschillende monsterrecipiënten in een welbepaalde volgorde te vullen. Voor nadere instructies wordt verwezen naar §4.6.3.

De verschillende monsterrecipiënten worden in vlotte opeenvolgende bewegingen gevuld, waarbij de kraan blijft lopen. Ook de eventuele opeenvolging van monstername voor (fysico-)chemische en bacteriologisch parameters moet opeenvolgend en binnen een redelijke tijdspanne (bijv. 10 min.) uitgevoerd worden, om wijzigingen in de kwaliteit van het kraanwater zo beperkt mogelijk te houden.

- Open de verschillende monsterrecipiënten één voor één, telkens net voor het vullen van de recipiënt in kwestie. Indien twee identieke monsters dienen gevuld te worden (bijv. monster -

tegenmonster), open dan de twee recipiënten tegelijk en vul afwisselend kleine hoeveelheden tot beide recipiënten gevuld zijn.

- Vermijd rechtstreeks contact van de monsterrecipiënt met de kraan om directe contaminatie van de buitenkant van kraan naar het water (bijv. voor bacteriologie) of indirecte contaminatie van de monsterrecipiënt (conserveermiddel) naar de buitenkant van de kraan en vervolgens naar de volgende monsterrecipiënt, uit te sluiten.
- Vermijd overvullen of overlopen van voorgeconserveerde monsterrecipiënten om verlies van het conserveermiddel te vermijden.
Bij overvulling moet steeds een nieuwe monsterrecipiënt voor de parameter(s) in kwestie gevuld worden. Zorg dus steeds voor voldoende extra monsterrecipiënten van de te analyseren parameters.

4.6.2 CONSERVERING

- Voeg de nodige bewaar- of conserveermiddelen toe per analyseparameter voor de (fyscio-) chemische parameters toe conform WAC/I/A/010.
- Voor de bacteriologische parameters worden steeds aantoonbaar steriele monsterrecipiënten gebruikt.
De werking van chloor in drinkwater wordt geneutraliseerd met een natriumthiosulfaat pentahydraat oplossing cfr. WAC/1/A/010. Dit kan door op aseptische wijze individuele porties natriumthiosulfaat te doseren aan het watermonster in de gevulde steriele monsterrecipiënt, maar bij voorkeur wordt het bemonsterde water rechtstreeks opgevangen (methode A en B; methode C enkel indien monsterrecipiënt van 1 liter wordt toegepast) of overgebracht vanuit de eerste opgevangen liter (methode C indien monsterrecipiënt < 1 liter wordt toegepast) in een voorgedoseerde steriele monsterrecipiënt met natriumthiosulfaat.
- De conservering gebeurt steeds ter plaatse.
Maak bij voorkeur gebruik van voorgeconserveerde monsterrecipiënten.
Toevoeging van conserveermiddelen op het veld is omslachtig, moet vaak in moeilijke (weers-) omstandigheden uitgevoerd worden en is bijgevolg vaak minder nauwkeurig.
- De aard en de houdbaarheid van de conserveermiddelen en/of steriliteit moet vermeld worden op de monsterrecipiënt en moet gerespecteerd worden.

4.6.3 VULVOLGORDE

Bij het vullen van de monsterrecipiënten dienen onderstaande instructies gerespecteerd te worden:

1. Recipiënt(en) bestemd voor vluchtige organische solventen ⁵
2. Recipiënten waarbij zuurstofinbreng de bepaling kan storen (bijv. BZV)
3. Recipiënt(en) zonder conserveringsreagentia

Voor pH en geleidbaarheid kan uit voorzorg een monsterrecipiënt gevuld voor meting in het labo, ingeval de kalibratie en/of controle van de veldmeter(s) na de monsterneming niet voldoet aan de geldende kwaliteitseisen en een meting door het laboratorium nodig is. Het vullen van deze recipiënt is overbodig indien bij elke monsterneming een controlemeting wordt gedaan.

⁵ Bij directe monsterneming aan de kraan is het niet noodzakelijk om de recipiënt bestemd voor vluchtige organische solventen als eerste te bemonsteren.

4. Receptiënt(en) met conserveringsreagentia: ook hier dient rekening gehouden te worden met een volgorde van vullen om contaminatie van een volgend monster via de conserveringsreagentia te vermijden.

Voorbeeld: een receptiënt bestemd voor nitraatbepaling mag niet volgen op het vullen van een receptiënt met salpeterzuur. Binnen éénzelfde methode(A, B of C) mag een receptiënt metaalanalyse niet gevuld worden na het vullen van een receptiënt met kaliumdichromaat wegens risico op Cr-contaminatie.

5. Receptiënten voor metingen ter plaatse:
 - a) geleidbaarheid: min. 50 ml water in een meetreceptiënt (indien ter plaatse gemeten)
 - b) opgeloste zuurstof: min. 50 ml water in een meetreceptiënt (indien ter plaatse gemeten)
 - c) vrije en gebonden chloor
 - d) pH en pH-temperatuur min. 50 ml water in een meetreceptiënt (indien ter plaatse gemeten)

Er worden bij voorkeur afzonderlijke meetreceptiënten voor geleidbaarheid en pH gevuld om contaminatie via de elektrode te vermijden (externe contaminatie of via lek van de pH-elektrode). Maar indien gewenst kan het receptiënt waarin geleidbaarheid gemeten is, daarna gebruikt worden voor pH meting.

6. Receptiënt(en) voor bacteriologische analyses: enkel geldig in het geval van een monsterneming conform 4.1 en 4.2.

Alle handelingen bij het vullen moeten zo snel mogelijk na elkaar volgen. Het is dan ook zeker zinvol en tijdsbesparend om de vulvolgorde van monsterreceptiënten kenbaar te maken op de receptiënten (via nummering of codering). Hierbij worden enkel door het laboratorium aangeleverde monsterreceptiënten gebruikt, die proper gestockeerd en lekdicht afgesloten zijn.

Eventuele richtlijnen qua vulling of vulgraad (bijv. geen vrije ruimte laten) in WAC/I/A010 moeten gerespecteerd worden.

Afwijkingen m.b.t. vulvolgorde zijn enkel toegelaten mits duidelijke motivatie ervan in het monsternemingsverslag.

4.6.4 AANDACHTSPUNTEN BIJ HET VULLEN VAN RECIPIËNTEN

Volgende voorzorgen worden in achtgenomen:

- Voor chemische en bacteriologische parameters: hou de flessendop van een geopende monsterreceptiënt bij voorkeur in de hand en indien het echt nodig om hem neer te leggen: dan enkel met de opening naar boven op een propere ondergrond (bijv. op adsorberend papier), zodat contaminatie vanuit de ondergrond wordt vermeden.
- Sluit alle monsterreceptiënt goed af (handgespannen en lekdicht) en controleer dit desgewenst.
- Maak ook de buitenkant van de monsterreceptiënten proper.
- Zorg dat de gevulde receptiënten op de monsternamelocatie afgeschermd worden van direct zonlicht (zie verder §7).
- Breng bij metingen ter plaatse nooit een thermometer of elektrode aan in een receptiënt die bestemd is voor andere analyses.

4.7 RICHTLIJNEN M.B.T. SPECIFIEKE ANALYSEPARAMETERS

4.7.1 PFAS

Wanneer monsternames gebeuren in het kader van PFAS-analyses, moet rekening worden gehouden met volgende richtlijnen:

- ~~Bij monstername mag enkel gebruik worden gemaakt van materialen die geen PFAS afgeven/uitlogen. In de mate van het mogelijke moet nagegaan worden (bij de leverancier / aan de hand van analyses) of het materiaal gebruikt bij de monstername voor analyse op PFAS, PFAS kan bevatten. Een overzicht van mogelijke PFAS-houdende elementen wordt in de checklist, opgenomen in de OVAM-document 'richtlijn PFAS-onderzoek' (www.ovam.be), weergegeven.~~
~~Er mag enkel monstername-apparatuur gebruikt worden waarvan aangetoond is dat ze geen PFAS boven de LOQ uitlogen in het waterstaal.~~
- Elk rechtstreeks contact met het monster moet worden vermeden, dit houdt ook rechtstreeks contact van het monster met de handschoenen in. Het is bijgevolg noodzakelijk om een gereinigd hulpmiddel te gebruiken om het staal te nemen.
- Reinigen van materiaal:
 - o enkel met water van drinkwaterkwaliteit;
 - o bij de toepassing van reinigingsmiddel mag enkel gebruik gemaakt worden van PFAS-vrije detergents en moet grondig worden nagespoeld. ~~Het gebruik van Deconex is niet toegestaan;~~
- Waterstalen voor de analyse van PFAS worden niet gefiltreerd.
- Het gebruik van koelelementen wordt toegestaan onder de volgende voorwaarden:
 - o de koelelementen vertonen geen lekken;
 - o alleen harde koelelementen worden toegestaan, de flexibele koelelementen niet omdat ze een grotere kans op scheuren hebben.
- Er wordt geen beperking opgelegd in te dragen regen-, veiligheids- en andere kledij indien aan volgende voorwaarden wordt voldaan:
 - o rechtstreeks contact met het staal moet worden vermeden;
 - o afloop van hemelwater via de kledij in het staal moet worden vermeden;
 - o ~~—kledij aangewend bij staalname mag niet worden gewassen met wasverzachter.~~
- Richtlijnen met betrekking tot conservering en recipiënten zijn opgenomen in de procedure WAC/1/A/010.

5 METINGEN TER PLAATSE

Voor de metingen ter plaatse wordt verwezen naar WAC/I/A/011.

6 VELDREGISTRATIES

Bij elke monsterneming van drinkwater worden ter plaatse veldregistraties gemaakt. Dit kan bijvoorbeeld door gebruik te maken van een 'monsternemingsformulier'.

Een voorbeeld van monsternemingsformulier is toegevoegd in Bijlage B.

Ongeacht het opzet of doel van de uitgevoerde monsterneming dienen steeds alle uitgevoerde handelingen m.b.t. verwijderen van koppelstukken, spoelen en desinfecteren geregistreerd te worden op het formulier voor veldregistraties. Afwijkingen van de beoogde methode dienen ook steeds geregistreerd en gemotiveerd (reden van afwijkingen) te worden.

Volgende gegevens dienen minimaal geregistreerd te worden bij de monsterneming:

- identificatie van de monsternemer
- datum en uur van de monsterneming
- plaats en locatie van de monsterneming
- aanduiding/omschrijving/schets van het staalnamepunt (eventueel een foto), met vermelding van het type kraan (koud, warm water, mengkraan bij warm/koud/verbruiksstand,...) met motivatie indien afgeweken werd van de in de methode opgelegde kraan/stand
- opzet en methode van de bemonstering van het drinkwater, inclusief de uitgevoerde handelingen m.b.t. verwijderen van koppelstukken, spoelen en/of reinigen/desinfecteren
- temperatuur van het water bij de monsterneming
- aantal recipiënten gevuld en de gegevens die noodzakelijk zijn voor het identificeren van de monsters zoals vermeld op het etiket
- resultaten van metingen ter plaatse
- afwijkingen t.o.v. de gevolgde methode en de reden van de afwijking
- eventuele opmerkingen en/of (omgevings-)omstandigheden die de monsterneming kunnen beïnvloeden.

7 RAPPORTERING

Van elke monsterneming dient een monsternemingsverslag conform WAC/VI/A/004 opgemaakt te worden.

Naast de nodige gegevens cfr. §5 van WAC/VI/A/004, moet het monsternemingsverslag minimum volgende gegevens bevatten:

- gebruikte methode voor monsterneming, per parameter (ook indien combinatie van verschillende methoden gebruikt werden);
- type kraan dat bemonsterd werd en/of stand waarin deze bemonsterd werd (koud, warm water, mengkraan bij warm/koud/verbruiksstand,...), met motivatie indien afgeweken werd van de in de methode opgelegde kraan/stand

8 TRANSPORT

De maximale bewaartermijnen van watermonsters conform WAC/I/A/010 zijn van toepassing vanaf het tijdstip (datum/uur) van de monsterneming. De monsters dienen dan ook tijdig aan het analyselaboratorium geleverd te worden zodat de houdbaarheid gerespecteerd kan worden. Eventueel moet de monsternemer afspraken maken m.b.t. de levering aan het analyselaboratorium, zodat het laboratorium zich kan houden aan de gestelde houdbaarheidstermijn (bijv. spoedanalyses op voorhand plannen).

Elke blootstelling aan licht en hitte moet ten allen tijde vermeden worden. Gekoeld transport van monsters dient gegarandeerd te zijn door gebruik te maken van koelboxen met voldoende koelelementen of een koelinstallatie. Tijdens het transport mag de temperatuur van een monster⁶ zeker niet stijgen. Monsters met een hoge temperatuur worden hierbij fysisch gescheiden van koele monsters.

Het is zeker zinvol om via een logger het temperatuursverloop tijdens het transport te registreren.

9 REFERENTIES

- WAC/I/A/002, Ogenblikkelijke monsternamen (aan kraan) van water
- WAC/I/A/010, Conservering en behandeling van watermonsters
- WAC/I/A/011, Meting ter plaatse van temperatuur, pH, elektrische geleidbaarheid, opgeloste zuurstof, vrije chloor en gebonden chloor
- NBN EN ISO 5667-1:2022, Water quality - sampling Part 1: Guidance on the design of sampling programmes and sampling techniques.
- NBN EN ISO 5667-3 :2018 Water quality- sampling Part 3: Guidance on preservation and handling of samples.
- NBN EN ISO 5667-5:2019, Water quality - sampling - Part 5: Guidance on sampling of drinking water and from treatment works and piped distribution systems.
- ISO 19458:2006, Water quality - sampling - General guide for sampling, transport, preservation and handling of samples for bacteriological analysis
- <http://www.afsca.be/autocontrole-nl/informatie/waterkwaliteit/>

⁶ Monsters met een temperatuur lager dan 8°C mogen tijdens transport tot maximaal 8°C opwarmen.

10 BIJLAGEN

BIJLAGE A

A.1 Tapkraan bij particulieren of publieke gebouwen (eventueel bij bedrijven)

1. Controleer de kraan op eventuele oxidatieverschijnselen (roest). Indien teveel roest aanwezig is, selecteer dan indien mogelijk een andere tapkraan (bv. in de badkamer).
2. Verwijder alle onderdelen van de kraan die handmatig (zonder hulpmiddelen) kunnen worden verwijderd (bijv. een plastic slangetje). Verwijder zichtbaar aanklevend vuil met een éénmalig te gebruiken papieren doekje.
3. Er wordt aangeraden handschoenen te dragen bij monsternamen voor chemische parameters met conserveringsstoffen
4. Draai de kraan open en vul onmiddellijk de 1 liter monsterfles uit kunststof (dus zonder spoeling, = Random Day Time) voor de bepaling van de metalen. Vermijd hierbij contact tussen kraan en monsterfles.

LET OP: Indien er echter alleen een bacto-fles moet gevuld worden dan dient er pas overgegaan tot monsternamen ná desinfectie van de kraan en ná 5 liter spoeling!!!

5. Giet de inhoud van de 1 liter monsterfles vervolgens over in die recipiënten nodig voor de bepaling van de metalen
6. Vulling van de recipiënten voor andere fysisch-chemische parameters:
 - vulling van de recipiënten voor vluchtige componenten ⁷;
 - vulling van de andere recipiënten: eerst die ZONDER conserveringsstoffen, daarna die MET conserveringsstoffen.
7. Vulling van de recipiënten voor in-situ metingen:
 - het recipiënt voor de meting van pH en geleidbaarheid (en zuurstof indien gevraagd); hiervoor kan hetzelfde 1 liter recipiënt gebruikt worden als bij de staalname van de metalen;
 - vulling van de recipiënten voor metingen van troebelingsgraad, kleur, reuk, smaak en chloorresten (drinkglas of emmer, meetcuvetten,...);
8. Draai de kraan terug dicht (enkel nodig voor bacteriologische parameters, zo niet ga naar punt 12).
9. Desinfecteer de buiten- en de binnenkant van de kraan met alcohol (isopropanol of ethanol) of flambeer de kraan.
10. Spoel daarna 5 liter.

⁷ Bij directe monsternamen aan de kraan is het niet noodzakelijk om de recipiënt bestemd voor vluchtige organische solventen als eerste te bemonsteren.

11. Vul de fles(sen) voor de analyse van bacteriologische parameters.
12. Spoel vervolgens tot constante temperatuur en noteer deze temperatuur van het water
13. Draai de kraan terug dicht (belangrijk: manipulatie van de kraan na eerste opening is enkel toegelaten indien desinfectie nodig is voor de staalname van bacteriologische parameters, zie punt 8 en 9).
14. Na het vullen van alle recipiënten kan men overgaan tot het uitvoeren van de metingen ter plaatse indien gewenst

A.2 Leegloopkraan (dicht bij de watermeter)

1. Controleer of de kraan juist gemonteerd is (tappunt naar beneden). Indien dit niet het geval is, plaats de kraan dan juist.

Opmerking: er wordt geen staal aan de leegloopkraan genomen als de uitstroomopening beschadigd werd tijdens het manipuleren van de kraan.

2. Verwijder zichtbaar aanklevend vuil met een éénmalig te gebruiken papieren doekje.
3. Er wordt aangeraden handschoenen te dragen bij monstername voor chemische parameters met conserveringsstoffen
4. Monstername voor de metalen:
 - Spoel precies 1 liter en draai hiervoor de kraan open zodat er een zachte waterstraal uitstroomt (debiet waarmee een glas gevuld wordt) en vul onmiddellijk daarna de 1 liter monsterfles uit kunststof voor de bepaling van de metalen.
 - LET OP: Indien er echter alleen een bacto-fles moet gevuld worden dan dient er pas overgegaan tot monstername ná desinfectie van de kraan en ná spoeling tot constante temperatuur van het water!!!
5. Giet de inhoud van de 1 liter monsterfles vervolgens over in die recipiënten nodig voor de bepaling van de metalen
6. Spoel tot de temperatuur van het water constant is en noteer deze temperatuur van het water
7. Vulling van de recipiënten voor fysisch-chemische parameters:
 - vulling van de recipiënten voor vluchtige componenten ⁸;
 - vulling van de andere recipiënten: eerst die ZONDER conserveringsstoffen, daarna die MET conserveringsstoffen.
8. Vulling van de recipiënten voor in-situ metingen:
 - het recipiënt voor de meting van pH en geleidbaarheid (en zuurstof indien gevraagd); hiervoor kan hetzelfde 1 liter recipiënt gebruikt worden als bij de staalname van de metalen;
 - vulling van de recipiënten voor metingen van troebelingsgraad, kleur, reuk, smaak en chloorresten (drinkglas of emmer, meetcuvetten,...);

⁸ Bij directe monstername aan de kraan is het niet noodzakelijk om de recipiënt bestemd voor vluchtige organische solventen als eerste te bemonsteren.

9. Draai de kraan terug dicht (enkel nodig voor bacteriologische parameters, zo niet ga naar punt 13).
10. Flambeer de kraanmond met een gasbrander (van het uiteinde van de kraan naar de hals van de kraan) indien er een monster dient genomen te worden voor bacteriologische parameters. Desinfecteer de kraan met alcohol als flamberen niet mogelijk is.
11. Spoel opnieuw tot de temperatuur van het water constant is
12. Vul de fles(sen) voor de analyse van bacteriologische parameters
13. Draai de kraan terug dicht (belangrijk: manipulatie van de kraan na eerste opening is enkel toegelaten indien desinfectie nodig is voor de staalname van bacteriologische parameters, zie punt 9 en 10).
14. Na het vullen van alle recipiënten kan men overgaan tot het uitvoeren van de metingen ter plaatse indien gewenst

LET OP: een leegloopkraan wordt steeds vóór een keukenkraan bemonsterd.

BIJLAGE B: VOORBEELD VAN EEN MONSTERNEMINGSFORMULIER

MONSTERNEMINGSFORMULIER (KRANEN VOOR MENSELIJKE CONSUMPTIE)

Monsternemer: _____

Tijdstip monsternamen: datum _____ uur: _____

Monstercode: _____

Algemeen – omschrijving opdracht

Monsternamelocatie: _____

Gebouw - lokaal: _____

Kader monsterneming:

☐ drinkwater voor menselijke consumptie	☐ gezondheidsinspectie	☐ milieuhygiëne	☐ andere: _____
☐ waterleverancier/ drinkwatermij	☐ waterleverancier/ private waterwinning	☐	☐

Doel monsterneming:

☐ geleverde water	☐ geconsumeerde water	☐ risico-evaluatie	☐ andere: _____

Parameter(s)(groepen):

☐ bacteriologische	☐ (fysico-)chemische	☐ beide	☐ andere: _____

Staalnamepunt:

☐ afnamepunt (keuken,...)	☐ leverpunt (watermeter)	☐ douche	☐ andere: _____

Type kraan:

☐ mengkraan	☐ koudwaterkraan	☐ warmwaterkraan	☐ Andere: _____

Type water:

☐ leidingwater	☐ putwater	☐ grondwater	☐ Andere: _____

Monsterneming

Monsternamemethode:

☐ A (geprod. water)	☐ B (ter consumptie)	☐ C (risico-evaluatie cons.)	☐ andere: _____
☐ Tapkraan part/publ	☐ leegloopkraan		

Handelingen:

☐ verwijderen opzet-koppelstukken	☐ reinigen (buitenkant)	☐ reinigen (binnenkant)	☐ andere: _____

Spoelen:

☐ tot constante T: _____ °C ☐ kort ☐ geen ☐ andere: _____ min. spoelen
begin _____ einde _____

Desinfecteren:

☐ n.v.t. ☐ thermisch (flamberen) ☐ Chemisch: _____
(specifieer desinfectans) ☐ andere: _____

Temperatuur bij de monstername: _____ °C

Afwijkingen: _____

opmerkingen _____

Monsterrecipiënten

Aantal gevulde recipiënten: _____

Recipiënten

☐ steriel ☐ niet steriel ☐ _____ ☐

Conservering (neutralisatie) bacteriologische parameters

☐ 1 ml/l 1.8% natriumthiosulf. ☐ 2 ml/l 1.8% natriumthiosulf. ☐ _____ ☐

Opmerkingen:**Metingen ter plaatse**

Parameter: pH : _____ Parameter _____: _____

Parameter: _____: _____ Parameter _____: _____

Parameter: _____: _____ Parameter _____: _____

Parameter: _____: _____ Parameter _____: _____

Transport en overdracht**Transport**

☐ monsternemer ☐ opdrachtgever ☐ extern: _____ ☐ andere: _____
☐ gekoeld ☐ niet-gekoeld ☐ ijswater ☐ andere: _____

Overdracht monsters aan: _____

Datum/uur: _____ Handtekening: _____

Opmerkingen: _____

.

Ogenblikkelijke monstername (aan kraan) van water

INHOUD

1	Toepassingsgebied	4
2	Apparatuur, materiaal, oplossingen	4
3	Keuze monsternamepunt en monsternamestrategie	5
4	Uitvoering ogenblikkelijke (enkelvoudige) monstername aan een kraan	11
4.1	Vorbereiding monstername	11
4.2	Monstername (fysico)chemische parameters	11
4.3	Monstername bacteriologische parameters	11
4.4	Vullen van recipiënten	12
4.4.1	Direct: rechtstreeks aan de kraan	13
4.4.2	Indirect: vanuit verzamelemmer (enkel fysico-chemische parameters)	13
4.4.3	Vulvolgorde	14
4.4.4	Conservering	15
4.4.5	Filtraties ter plaatse	15
4.5	Aandachtspunten	15
4.6	Richtlijnen m.b.t. specifieke analyseparameters	16
4.6.1	PFAS	16
5	Monstername van koel(toren)water aan een kraan m.b.t. de analyse van Legionella spp	16
5.1	Vorbereiding monstername	16
5.2	Spoelen en desinfectie	17
5.3	Monstername m.b.t. de analyse van Legionella spp.	17
6	Metingen ter plaatse	17
7	Veldregistraties	18
8	Rapportering	18
9	Transport	19
10	Referenties	19
11	BIJLAGEN	20
	BIJLAGE A : Controle heterogeniteit en monstername van niet-homogeen water in (opslag)tank(wagen)(s)	20
A.1	Controle heterogeniteit van (opslag)tank(wagen) en/of opslagrecipiënten	20
A.2	(Meervoudige) monsterneming van niet-homogeen water tijdens vullen of ledigen/leegpompen van een (opslag)tank(wagen)	20
	BIJLAGE B : voorbeeld van een monsternemingsformulier	21

1 TOEPASSINGSGEBIED

Deze procedure beschrijft de ogenblikkelijke monsternamen aan een kraan van water dat niet bestemd is voor menselijke consumptie, inclusief de specificaties betreffende conservering, transport en metingen ter plaatse.

Het betreft zowel de monsternamen van afvalwater en tweedecircuitwater (koelwater, proceswater, spoelwater,...) en eventueel ook grond-, oppervlaktewater zolang deze niet binnen het kader van (drink)water voor menselijke consumptie worden bemonsterd.

Deze procedure is niet toepasbaar voor het bemonsteren van stoom.

Deze procedure beschrijft steeds de monsternamen voor (fysico-)chemische en bacteriologische analyses in het laboratorium en m.b.t. metingen ter plaatse van pH, geleidbaarheid, temperatuur, vrije en gebonden chloor en/of opgeloste zuurstof.

Voor deze metingen ter plaatse wordt verwezen naar WAC/I/A/011.

Voor de ogenblikkelijke monsternamen aan kranen van water dat bestemd is voor menselijke consumptie wordt verwezen naar WAC/I/A/001.

2 APPARATUUR, MATERIAAL, OPLOSSINGEN

- 2.1. Voldoende plastic en/of glazen monsterrecipiënten voor de te analyseren parameters (voorgeconserveerd, indien van toepassing), voor (fysico-)chemische en bacteriologische parameters. De richtlijnen m.b.t. het minimale volume water, de nodige conserveermiddelen en te gebruiken recipiënten (bijv. plastic, glas,...) per parameter(groep) conform WAC/I/A/010 moeten gerespecteerd worden.

Elke monsterrecipiënt in 2.1 dient voorzien te zijn van een (voorgedrukte) label met vermelding van monstercodering, datum monsterneming, analyseparameter(s) of andere eenduidige identificatie of link naar de analyseparameter(s), dosering en houdbaarheid conserveermiddel (indien noodzakelijk), facultatief aanduiding plaats/locatie van de monsterneming..

- 2.2. Tang en/of sleutel om opzet- of koppelstukken te verwijderen
- 2.3. Beker/recipiënt voor het meten van de temperatuur bij de monsternamen
- 2.4. Emmer(s) voor het opvangen van spoelwater
- 2.5. Absorberend papier
- 2.6. Katoenen watten (kwaliteit voor medisch gebruik)
- 2.7. Draagbare bunzenbrander met gasvulling
- 2.8. Aansteker
- 2.9. Vochtige alcoholdoekjes, bijv. isopropanoldoekjes
- 2.10. Desinfectans: ethanol, isopropanol, hypochloriet, of ander gelijkwaardig
- 2.11. Desinfecterende handgel
- 2.12. Persoonlijke beschermingsmiddelen, afhankelijk van de omstandigheden van de monsterneming.

Wegwerphandschoenen en veiligheidsbril (bij het vullen van recipiënten met conserveermiddelen) worden aanbevolen. Bij monsternamen i.k.v. Legionella wordt ademhalingsbescherming FFP3 tegen aerosolen aanbevolen.

- 2.13. Draagbare digitale thermometer of thermokoppel afleesbaar tot op 0,1°C conform WAC/III/A/003. Voor afval en tweedecircuitwater is een meetbereik tot +100°C aanbevolen.
- 2.14. Draagbare pH-meter met elektrode, temperatuursonde en benodigdheden (kalibratie- en controle-oplossingen,...) conform WAC/I/A/011 en WAC/III/A/005 (aanbevolen voor monstername van koel(toren)water m.b.t. analyse van *Legionella* spp.)
- 2.15. Monsternemingsformulier
- 2.16. Timer /klok / stopwatch
- 2.17. Koelboxen met voldoende diepgevroren koelementen of koelinstallatie om gekoeld transport van monsters te garanderen
- 2.18. Temperatuurlogger voor koelbox (aanbevolen)
- 2.19. Fototoestel (facultatief)

3 KEUZE MONSTERNAMEPUNT EN MONSTERNAMESTRATEGIE

Een ogenblikkelijke monstername van water dat niet bestemd is voor menselijke consumptie aan een kraan kan zich voordoen in zeer diverse bemonsteringssituaties: rechtstreeks of aan een zijvertakking van een leidingencircuit, aan kranen van (opslag)recipiënten, tijdens verpompen ... Ook het doeleinde van de monstername kan zeer divers zijn, bijvoorbeeld om het effect nagaan van een behandelingsinstallatie, om de concentratie te bepalen bij toevoeging van chemicaliën, om de kwaliteit van het gebruikte water (inkomende stroom), van influenten, van het circulerende water, van effluënten of van het geloosde water (uitgaande stroom) te bepalen,... Verder is de monstername is ook afhankelijk van het (wettelijk) kader (drinkwater, gezondheidsinspectie, sectorale milieuhygiënische bepalingen, ...) en van de te analyseren parameter(s) of parametergroepen. Al deze elementen vormen een belangrijke schakel in de keuze van het monsternamepunt en monsternamestrategie met het oog op een zo goed mogelijke representativiteit van de monstername.

Volgende overwegingen moeten in achtgenomen worden bij aanvang van de monstername en keuze van het monsternamepunt. Deze keuze(s) moet(en) steeds gebeuren in overleg met de productieverantwoordelijke of opdrachtgever.

- a) (Koel- of proces)water in **koeltorens** wordt als volgt bemonsterd (Figuur 1, Figuur 2):
- i. De monstername wordt uitgevoerd volgens de methode beschreven in §5 aan een kraan of aftappunt na de warmtewisselaar (condensor) of zo dicht mogelijk bij de uitgang van deze warmtewisselaar. Dit is de voorkeursmethode voor het bemonsteren van koel(toren)water.

Een aftappunt/kraan na de warmtewisselaar is niet in alle koelinstallaties beschikbaar, maar mogelijk is er wel een staalnamepunt bij of in (de controlekamer van) de waterbehandelingsinstallatie van het koelwater (installatie bestemd voor anti-corrosie, anti-fouling, anti-scaling dispersanten).

- ii. Indien twijfel/onzekerheid over de relevantie van het aftappunt in de te bemonsteren koelinstallatie, of er géén relevante kraan of aftappunt aanwezig is, wordt een schepmonster cfr. WAC/1/A/003 genomen uit het vergaarbassin zelf. Dit is een afwijking op de voorkeursmethode, en de reden van afwijking moet steeds gedocumenteerd worden in het monsternemingsformulier en -rapport.

Bij een uitbraak of calamiteit is er vaak weinig tijd om de relevantie en correctheid van de aftappunten in de vaak complexe leidingensystemen te verifiëren (dit vergt bijstand van iemand van het bedrijf met kennis ter zake), en zal vaak – voor een snelle en uniforme uitvoering van de monstername van mogelijke andere nabijgelegen koelinstallaties – een schepmonster uit (of boven) het vergaarbassin cfr. WAC/1/A/003 genomen worden.

- iii. Indien de methode in i) en ii) niet toepasbaar zijn (bijv. gesloten koelsysteem, vergaarbassin niet bereikbaar voor monstername), wordt het continu vallende water opvangen aan de vernevelaar of sprinkler volgens de methode beschreven in §5 van deze WAC.
- iv. De opvolging van de goede werking van een koel(toren)installatie kan uitgebreid worden met de monstername van het inkomende oppervlaktewater en van de lozing op het oppervlaktewater. Deze worden uitgevoerd als schepmonster (oppervlaktewater) cfr. WAC/I/A/003.

De aanwezigheid van biociden, anticorrosie- anti-scaling of anti-fouling producten op het moment van de monstername moet worden nagevraagd en worden gedocumenteerd op het monsternemingsformulier en -verslag. Indien gekend, wordt tevens het tijdstip van de laatste dosering genoteerd. Een monstername van koel(toren)water m.b.t. de analyse van *Legionella* spp. is pas zinvol als deze minimaal 48h na de laatste shockdosering van biocide uitgevoerd wordt¹.

Ongeacht het type monstername dat werd uitgevoerd (kraan, schep, vallend water) wordt het aanbevolen om de pH van het koel(toren)water bijkomend (in situ) te meten². Met deze informatie kan de beheerder van de koelinstallatie ingrijpen als de gemeten pH buiten het werkingsgebied van het biocide ligt.

(Koel- of proces)water in **luchtvochtigheidsbehandelingen met waterinjectie** wordt bemonsterd in de vergaarbak:

- v. Indien de waterhoogte in de vergaarbak meer dan 20 cm bedraagt, wordt een schepmonster genomen cfr. WAC/1/A/003 §5 en §5.2.
 - vi. Indien de waterhoogte in de vergaarbak minder dan 20 cm bedraagt, wordt het koelwater voorzichtig opgepompt d.m.v. een steriele hand- of peristaltische pomp cfr. WAC/1/A/003 §5 en §5.3.
- b) Voor **andere monsternamesituaties m.b.t. water dat niet voor menselijke consumptie** is bestemd (Figuur 1): kies het monsternamepunt op een plaats waar het representatief is voor het te bemonsteren water en het doel van de monstername, met andere woorden dat de monstername toelaat om de samenstelling, of wijzigingen in de samenstelling, te bepalen, bijvoorbeeld:
- bij toevoeging van chemicaliën of bij mengstromen wordt het monsternamepunt gekozen op de plaats waar volledige menging kan verondersteld worden. Vaak kan dit bewerkstelligd worden door stroomafwaarts te bemonsteren of na een deel van het leidingcircuit dat turbulentie opwekt (bv. klep, pomp, bocht in leiding).
 - als het effect van een bepaalde behandelingeninstallatie (bijv. zuivering, ontsmetting) moet worden nagegaan wordt vlak voor en vlak na de installatie een monsternamepunt gezocht.
 - indien de toevoeging van chemicaliën discontinu in het proces wordt uitgevoerd, is, naast het monsternamepunt, ook het tijdstip van monstername belangrijk: het effect wordt dan nagegaan bij het einde van een toevoegcyclus (d.w.z. vlak voor een nieuwe dosering).
- c) De monstername gebeurt bij voorkeur vanuit monstername- of aftappunt met stromend water. De stroming en turbulenties in de waterstroom zullen ervoor zorgen dat deeltjes en/of

¹ Indien enkel een continue dosering van biocide wordt uitgevoerd, is deze termijn niet van toepassing.

² Indien de pH niet in situ gemeten wordt bij de monstername, kan de aflezing van de pH van het waterbehandelingsproces ook nuttige informatie geven over het werkingsgebied van het biocide.

verontreinigingen homogeen verdeeld geraken. Bij stilstaand water is dit niet het geval en zal er voornamelijk in verticale richting heterogeniteiten optreden.

- d) Gebruik bij voorkeur bestaande monsternamapunten om vergelijking van resultaten toe te laten, tenzij het bestaande monsternamapunt niet compatibel/geschikt is voor het beoogde doel van de monsternamename en/of geschikt voor de te analyseren parameter(groepen).
- e) Vermijd monsternamapunten op horizontale leidingen, of waar terugloop van vloeistoffen is.
- f) Vermijd vuile, bestoft of gecorrodeerde kranen en kranen die te dicht bij de grond liggen (contaminatierisico), of lekkende aansluitingen boven het monsternamapunt/kraan.

De monsternamestrategie moet aansluiten met de best mogelijke keuze van het monsternamapunt. Hierbij worden onderstaande richtlijnen gegeven (schematisch weergegeven in Figuur 1):

- a) De ogenblikkelijke monsternamename aan een kraan van stromend water in een leidingcircuit wordt uitgevoerd via een **enkelvoudige monsternamename** (d.w.z. de monsternamename wordt op een bepaald tijdstip en in één handeling uitgevoerd). Deze monsternamename kan ook toegepast worden op stilstaand water in een leidingcircuit, maar enkel na spoelen (3x) van het stagnerende watervolume.

Het monster van een enkelvoudige monsternamename aan een kraan van een leidingcircuit is dan representatief voor de waterkwaliteit op het moment en plaats van de uitgevoerde monsternamename.

- b) Een ogenblikkelijke (enkelvoudige) monsterneming aan een kraan is ook toepasbaar bij het bemonsteren van aftapkranen of -leidingen bij opslagtanks, tankwagens- of opslageenheden voor vloeistoffen in het algemeen, op voorwaarde dat de inhoud van de (opslag)tank(wagen) homogeen verondersteld kan worden, d.w.z. dat er geen bezinkbare of drijvende delen en/of stratificatie van vloeistofflagen aanwezig is, of dat er gemengd kan worden voor aanvang van de monsterneming. Het mengen kan gebeuren door mengers of door een rondpompcircuit dat zorgt voor de nodige circulatie en menging (min. 15 min voor aanvang van de monsternamename). De enkelvoudige monsternamename is in deze gevallen representatief voor het totale inhoud van de opslageenheid.

Noteer in dat geval de vulgraad of vulhoogte van de opslageenheid.

Registreer de vaststelling van homogeniteit (zie Bijlage A.1) of aanwezigheid en werking van menger(s) en rondpompcircuit op het monsternemingsformulier.

De uitvoering van de enkelvoudige monsterneming aan de kraan is beschreven in §4. Deze algemene methode komt overeen met scenario B van de monsternamename van drinkwater conform (WAC/1/A/001) waarbij het water bemonsterd zoals het gebruikt wordt in het proces.

Indien van de monsternamename eerder gericht is op risico-evaluatie van het proces- of afvalwater wordt de monsternamename uitgevoerd conform scenario C van WAC/1/A/001.

Indien het doel van de monsternamename is om de kwaliteit van het geleverde water te bepalen, wordt de monsternamename uitgevoerd conform scenario A van WAC/1/A/001.

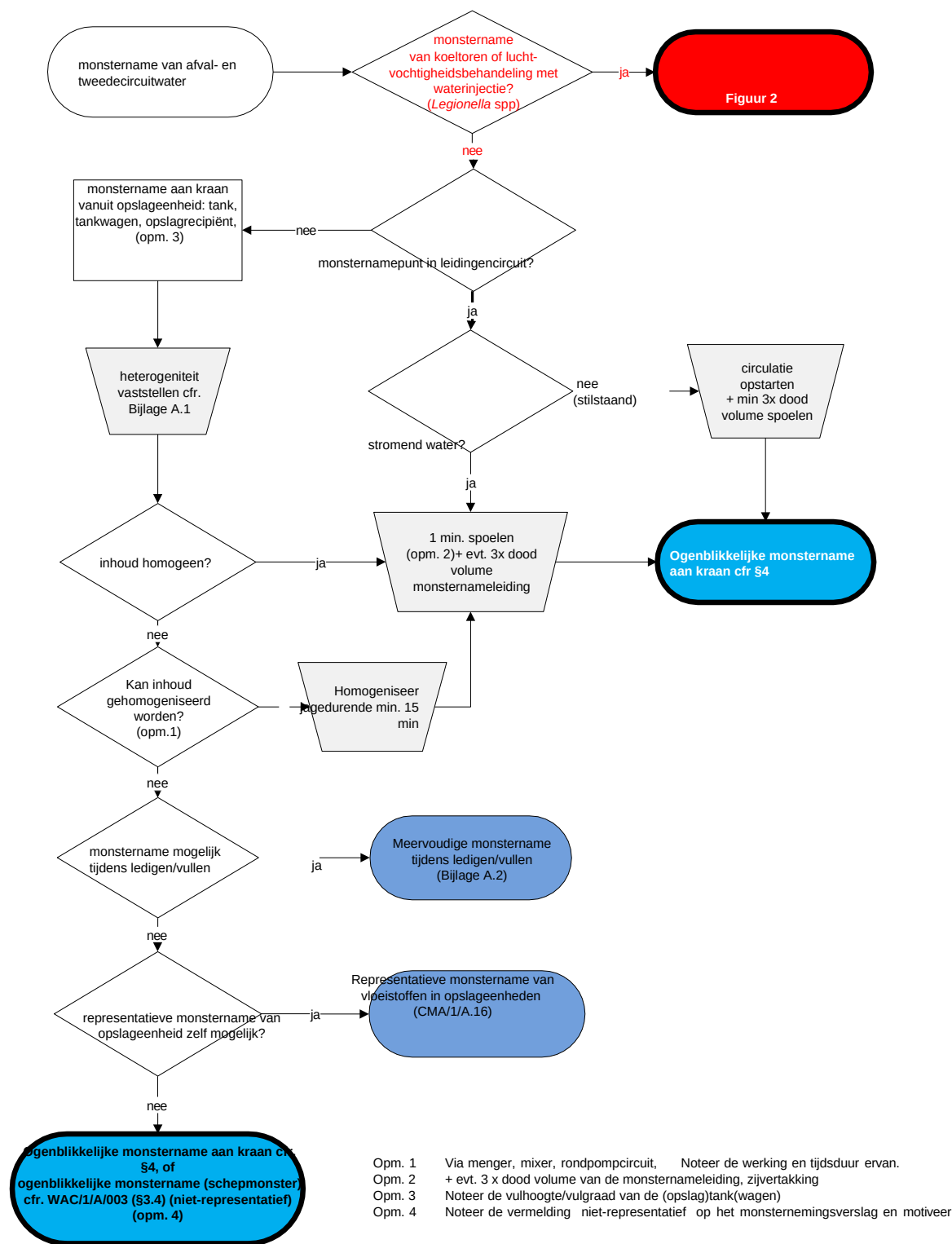
De methode-referenties zijn dan respectievelijk scenario A of B of C van WAC/1/A/002.

De scenario's zijn verschillend van elkaar m.b.t. het al dan niet toepassen van de randvoorwaarden (verwijderen opzetstukken - spoelen - desinfecteren) en in de volgorde van de te bemonsteren parametergroepen.

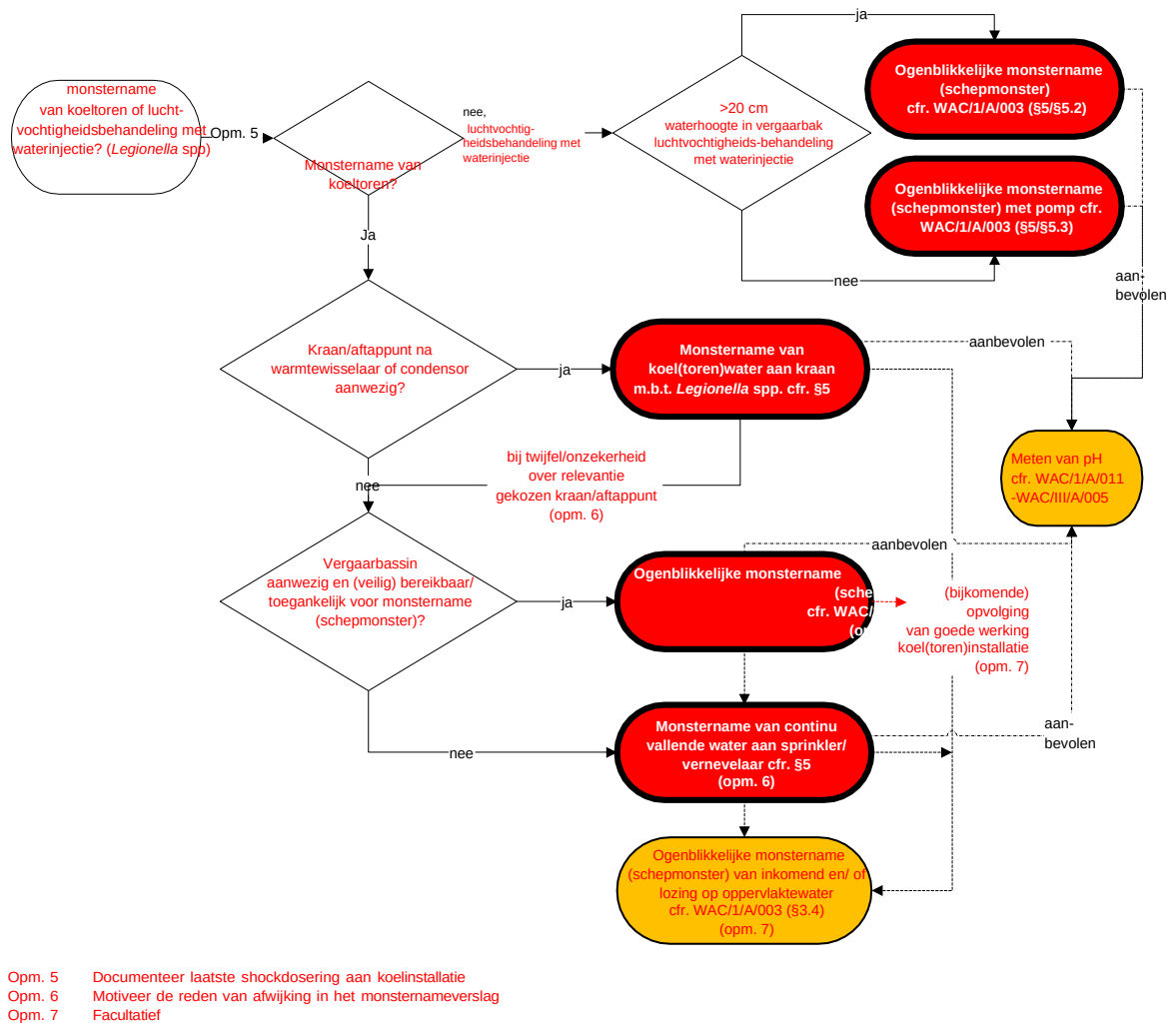
Voor alle andere situaties of bij combinatie parametergroepen die in een bepaald scenario niet tezamen bepaald kunnen worden (bijv. scenario C van WAC/1/A/001) kan, mits doordachte keuze van het monsternamapunt, een combinatie van meerdere scenario's aangewend kan worden, of een aanpassing van een specifieke handeling/randvoorwaarde uitgevoerd worden in functie van het beoogde doel van de monsternamename mits registratie en rapportering van de uitgevoerde monsternamemethode en handeling/randvoorwaarden.

- c) Indien de inhoud van de opslageenheid niet homogeen is of gemaakt kan worden, volstaat een ogenblikkelijke (enkelvoudige) monstername niet om de representativiteit te garanderen, en wordt een **meervoudige monstername aan de kraan uitgevoerd**. Dit is een monstername in 3 handelingen (grepen) tijdens het vullen of ledigen van de tank bij 20%, 50 en 80% van de tankinhoud, en is per definitie geen ogenblikkelijke monstername meer. Een beschrijving van de uitvoering wordt gegeven in Bijlage A.2. Deze monstername is steeds representatief voor het totale volume van het water dat verplaatst werd.
- d) Indien de meervoudige monstername van een opslageenheid met inhoud die niet homogeen is, niet toegepast kan worden tijdens het vullen of ledigen van de opslageenheid, kan een representatief monster rechtstreeks in de opslageenheid genomen worden conform CMA/1/A.16.
- e) Indien de uitvoering van een meervoudige (c) representatieve monstername cfr. CMA/1/A.16 rechtstreeks uit de opslageenheid met inhoud die niet homogeen is, niet mogelijk is, bijvoorbeeld omwille van toegankelijkheid/veiligheid, en er toch een monster moet worden genomen, kan overgegaan worden tot een ogenblikkelijke (enkelvoudige) monstername aan de kraan van de opslageenheid conform §4, of een ogenblikkelijk schepmonster cfr. WAC/1/A/003.
- In deze situatie biedt een ogenblikkelijke monstername geen garanties meer over de representativiteit van het monster ten opzichte van de volledige (opslag)tank(wagen). Op het monsternemingsformulier en monsternemingsverslag wordt de vermelding "ogenblikkelijke monstername aan kraan – niet-representatief" toegevoegd.

De toegepaste monsternamemethode moet altijd vermeld worden op het analyse- of monsternemingsverslag. Indien een combinatie van meerdere methoden toegepast werden, moet in het analyse- of monsternemingsverslag duidelijk zijn welke methode voor welke parameters gebruikt werd.



Figuur 1: stroomschema monstername (water dat niet geschikt is voor menselijke consumptie)



Figuur 2: stroomschema monstername van koeltoren of luchtvochtigheidsbehandeling met waterinjectie (*Legionella* spp.)

4 UITVOERING OGENBLIKKELIJKE (ENKELVOUDIGE) MONSTERNAME AAN EEN KRAAN

4.1 VOORBEREIDING MONSTERNAME

- 1) Documenteer en beschrijf het bemonsterde water, de bemonsteringssituatie (leidingcircuit, stilstaand, stromend, (opslag)tank(wagen), menger/mixer, rondpompcircuit/circulatiemogelijkheid en het gekozen staalnamepunt (adres/lokaal of situering in productie, stromen, schets, GPS-coördinaten, ...) eenduidig op het monsternemingsformulier.
- 2) Verwijder alle opzet- en/of koppelstukken (indien aanwezig) die manueel of m.b.v. een tang/sleutel eenvoudig losgemaakt kunnen worden (enkel uitvoeren in overleg met de productieverantwoordelijke!).
Verwijder zichtbaar aanklevend vuil met (water) bevochtigd absorberend papier (eenmalig te gebruiken). Maak ook de binnenkant van de kraan schoon met bevochtigd papier.
- 3) Draag minimaal wegwerphandschoenen (eenmalig te gebruiken).

Indien de bemonstering uitgevoerd wordt in het kader van een *Legionella* uitbraak, is het aangewezen om een ademhalingsbescherming FFP3 masker tegen aërosolen te dragen.
- 4) Open de kraan ³ (bij voorkeur bij eenzelfde debiet als het stromende water in de leiding) en spoel minimaal 1 minuut (indien de kraan rechtstreeks op het leidingcircuit met stromend water geïnstalleerd is), of minimaal 3 keer het dood volume⁴ van de staalnameleiding in alle andere gevallen, met een maximum van 50 liter.
Vang het spoelwater op in een emmer. Sluit de kraan pas na de monstername.
Noteer de hoeveelheid spoelwater (bij benadering) op het monsternemingsformulier.
- 5) Indien uitsluitend (fysico-)chemische parameters bepaald moeten worden, ga verder naar 4.2.
Indien uitsluitend bacteriologische parameters bepaald moeten worden ga verder naar 4.3

4.2 MONSTERNAME (FYSICO)CHEMISCHE PARAMETERS

- 6) Regel de kraan op half debiet (indien mogelijk) en vul de monsterrecipiënten voor fysico-chemische parameters conform §4.4. Voor homogeen water (grond- oppervlakte en tweedecircuitwater zonder deeltjes), worden de monsterrecipiënten rechtstreeks aan de kraan gevuld conform §4.4.1. Voor afvalwater of heterogeen water, worden de monsterrecipiënten indirect vanuit een verzamelemmer gevuld conform §4.4.2.
- 7) Indien geen bacteriologische parameters bepaald moeten worden, ga verder naar 11)

4.3 MONSTERNAME BACTERIOLOGISCHE PARAMETERS

- 8) Overleg met de (productie)verantwoordelijke welke desinfectiemethode kan en/of mag toegepast worden in de gegeven bemonsteringssituatie. Sluit en desinfecteer de kraan.
Het desinfecteren kan thermisch uitgevoerd worden door bijvoorbeeld de binnenkant en het uiteinde van de kraan gedurende 30 seconden te verhitten (zonder wegwerphandschoenen!) met een draagbare bunzenbrander of door een in ethanol of isopropanol gedrenkte prop

³ Niet van toepassing voor continu stromende kranen.

⁴ Dood volume is het volume van het leidingcircuit vanaf de wateropslag of leidingnet met stromend water tot aan kraan waaraan bemonsterd wordt (inclusief het volume van deze kraan).

watten in de uitstroomopening van de kraan te plaatsen en deze met een aansteker in brand te steken.

Indien de kraan geveerd is of uit kunststof(onderdelen) bestaat, wordt gedesinfecteerd door de buiten -en binnenkant te bevochtigen met ethanol, isopropanol of ander desinfectans, en vervolgens binnen- en buitenkant droog te vegen met adsorberend papier.

Documenteer de toegepaste desinfectiemethode (ook indien geen desinfectie toegepast wordt, mogelijk in kader van het doel van het onderzoek of omwille van veiligheidsoverwegingen).

- 9) Open de kraan en spoel (mag bij volledig debiet) kort na het desinfecteren om de invloed van het thermisch effect ongedaan te maken of om resten van het desinfectans ongedaan te verwijderen.
- 10) Zet de kraan op half debiet geopend en vul de steriele monsterrecipiënt(en) (met of zonder conservering) voor bacteriologische parameters rechtstreeks aan de kraan conform §4.4 en §4.4.1.
- 11) Vul aansluitend een bijkomende beker of recipiënt voor het meten van de temperatuur bij de monsterneming met behulp van een digitale thermometer. Noteer de temperatuur.
- 12) Sluit de kraan ⁵.
Monteer eventueel verwijderde opzet- en/of koppelstukken.

4.4 VULLEN VAN RECIPIËNTEN

- De kraan wordt niet meer gesloten tussen het spoelen van de leiding en/of het voorspoelen en de (directe of indirecte) monsterneming zelf.
- Hou de waterstraal voor het vullen van monsterrecipiënten of verzamelemmer steeds bij half debiet aan om inslag van luchtballen te vermijden.
- Draag propere (nieuwe) wegwerphandschoenen bij het homogeniseren en vullen van monsterrecipiënten. Een veiligheidsbril wordt aanbevolen.
- Meestal moet het water opgevangen worden in meer dan één monsterrecipiënt, afhankelijk van de te analyseren parameters of parametergroepen, en al dan niet met een conserveermiddel.
 - o Indien het homogeen water betreft, zoals grond- oppervlakte en tweedecircuitwater zonder deeltjes, wordt het vullen van de recipiënten direct aan de kraan uitgevoerd volgens §4.4.1.
 - o Indien het afvalwater of heterogeen water betreft, wordt het vullen van de recipiënten voor (fysico-)chemische parameters indirect vanuit een verzamelemmer uitgevoerd volgens §4.4.2.

De recipiënt(en) voor bacteriologische analyses bij afval- of heterogeen water worden steeds direct, rechtstreeks aan de kraan gevuld volgens §4.3 en §4.4.1.

Vul de verschillende monsterrecipiënten in een welbepaalde vulvolgorde om contaminaties en/of verliezen van het conserveermiddel te vermijden. Volg hierbij de instructies m.b.t. de vulvolgorde (§4.4.3), conservering (§4.4.4) en eventuele filtraties ter plaatse (§4.4.5) bij de analyse van opgeloste bestanddelen.

- Vermijd overvullen of overlopen van voorgeconserveerde monsterrecipiënten om verlies van het conserveermiddel te vermijden.

⁵ Niet van toepassing voor continu stromende kranen (hieronder worden ook continue sproeisystemen, vernevelaars, sprinklers, etc gerekend).

Bij overvulling moet steeds een nieuwe monsterrecipiënt voor de parameter(s) in kwestie gevuld worden. Zorg dus steeds voor voldoende extra monsterrecipiënten van de te analyseren parameters.

4.4.1 DIRECT: RECHTSTREEKS AAN DE KRAAN

- De verschillende monsterrecipiënten worden in vlotte opeenvolgende bewegingen rechtstreeks aan de lopende kraan gevuld. De kraan blijft tussen de monsterrecipiënten in, lopen. Ook de eventuele opeenvolging van monsternamen voor (fysico-)chemische en bacteriologische parameters moet opeenvolgend en binnen een redelijke tijdsperiode (bijv. 10 min.) uitgevoerd worden, om wijzigingen in de kwaliteit van het kraanwater zo beperkt mogelijk te houden.
- Open de verschillende monsterrecipiënten één voor één, telkens net voor het vullen van de recipiënt in kwestie. Indien twee identieke monsters dienen gevuld te worden (bijv. monster - tegenmonster), open dan de twee recipiënten tegelijk en vul afwisselend kleine hoeveelheden tot beide recipiënten gevuld zijn.
- Vermijd rechtstreeks contact van de monsterrecipiënt met de kraan om directe contaminatie van de buitenkant van kraan naar het water (bijv. voor bacteriologie) of indirecte contaminatie van de monsterrecipiënt (conserveermiddel) naar de buitenkant van de kraan en vervolgens naar de volgende monsterrecipiënt, uit te sluiten.

4.4.2 INDIRECT: VANUIT VERZAMELEMMER (ENKEL FYSICO-CHEMISCHE PARAMETERS)

- Laat het water van de kraan in een verzamelemmer lopen tot ongeveer 1.5 x het volume van alle te vullen monsterrecipiënten voor deze monsternamen. De verzamelemmer wordt zo gevuld dat er voldoende ruimte is (± 10 cm) om te kunnen homogeniseren met een maatbeker.
- Het homogeniseren en vullen wordt uitgevoerd met behulp van een propere (maat)beker met uitgietsluit en handvat. De diameter van de maatbeker moet in verhouding zijn met het mengvat. Homogeniseer het verzamelmonster door zachte horizontale en verticale zwenkende bewegingen met een maatbeker in de emmer uit te voeren.
Het is niet toegelaten om ten behoeve van het homogeniseren de maatbeker te vullen en terug in de emmer uit te gieten omdat op deze manier te veel zuurstof in het verzamelmonster wordt gebracht.
- Met behulp van de maatbeker worden de nodige recipiënten één voor één gevuld (zie vulvolgorde §4.4.3), waarbij elke keer dat wordt geschept, de gehele inhoud van het opvangvat weer wordt opgemengd.
Voor elk nieuw, volgend, recipiënt moet opnieuw een maatbeker vanuit het verzamelmonster gevuld worden. Bij het afvullen van identieke of gelijkaardige monsterrecipiënten (bv. zelfde conservering, monster-tegenmonster,...) worden deze direct na elkaar gevuld: voor elk recipiënt wordt een volgende maatbeker gevuld (het overblijvende gedeelte uit de maatbeker mag niet gebruikt worden om de volgende identieke of gelijkaardige recipiënt af te vullen). Het afwisselend vullen van identieke of gelijkaardige recipiënten is niet toegelaten.
- ~~— Vul één voor één de monsterrecipiënten vanuit de verzamelemmer met behulp van deze maatbeker, en waarbij de vulvolgorde gerespecteerd wordt (). Vanuit elke gevulde (maat)beker wordt slechts één monsterrecipiënt gevuld.
Gooi het restant in maatbeker telkens weg na het vullen van een recipiënt.
Indien identieke monsterrecipiënten (zelfde conservering) dienen gevuld te worden, open dan deze recipiënten tegelijk en vul afwisselend kleine hoeveelheden tot de recipiënten gevuld zijn.
Elke keer dat opnieuw geschept wordt met de maatbeker, moet de hele inhoud van de verzamelemmer weer gehomogeniseerd worden.~~

- De maatbeker mag bij het vullen de hals van de monsterrecipiënt niet raken (risico op contaminatie van verzamelmonster met maatbeker vanuit het conserveermiddel dat mogelijk aan de hals kleeft).
- Hou de te vullen monsterrecipiënt nooit boven de verzamelemmer zodat bij eventueel overlopen van monsterrecipiënten met conserveermiddel, kan vermeden worden dat het verzamelmonster gecontamineerd raakt door conserveermiddel
- Tussen het vullen wordt de (maat)beker in de verzamelemmer gelegd; in geen geval mag deze (maat)beker tussendoor op de grond geplaatst worden.

4.4.3 VULVOLGORDE

Bij het vullen van de monsterrecipiënten dienen onderstaande instructies gerespecteerd te worden:

1. Recipiënt(en) bestemd voor vluchtige organische solventen ⁶
2. Recipiënten waarbij zuurstofinbreng de bepaling kan storen (bijv. BZV)
3. Recipiënt(en) zonder conserveringsreagentia

Voor pH en geleidbaarheid wordt uit voorzorg een monsterrecipiënt gevuld voor meting in het labo, ingeval de kalibratie en/of controle van de veldmeter(s) na de monsterneming niet voldoet aan de geldende kwaliteitseisen en een meting door het laboratorium nodig is.

4. Recipiënt(en) met conserveringsreagentia: ook hier dient rekening gehouden te worden met een volgorde van vullen om contaminatie van een volgend monster via de conserveringsreagentia te vermijden.

Voorbeeld: en recipiënt bestemd voor nitraatbepaling mag niet volgen op het vullen van een recipiënt met salpeterzuur. Een recipiënt metaalanalyse mag niet gevuld worden na het vullen van een recipiënt met kaliumdichromaat wegens risico op Cr-contaminatie.

5. Recipiënten voor metingen ter plaatse:
 - a) geleidbaarheid: min. 50 ml water in een meetrecipiënt (indien ter plaatse gemeten)
 - b) opgeloste zuurstof: min. 50 ml water in een meetrecipiënt (indien ter plaatse gemeten)
 - c) vrije en gebonden chloor
 - d) pH en pH-temperatuur min. 50 ml water in een meetrecipiënt (indien ter plaatse gemeten)

Er worden bij voorkeur afzonderlijke meetrecipiënten voor geleidbaarheid en pH gevuld om contaminatie via de elektrode te vermijden (externe contaminatie of via lek van de pH-elektrode). Maar indien gewenst kan het recipiënt waarin geleidbaarheid gemeten is, daarna gebruikt worden voor pH meting.

6. Recipiënt(en) voor bacteriologische analyses (bij directe monsternamen aan kraan⁷).

Indien de monsternamen volgens een andere scenario of methode bemonsterd werd dan beschreven in §4, kan het zijn dat van deze volgorde moet worden afgeweken.

Alle handelingen bij het vullen moeten zo snel mogelijk na elkaar volgen. Het is dan ook zeker zinvol en tijdsbesparend om de vulvolgorde van monsterrecipiënten kenbaar te maken op de recipiënten (via nummering of codering). Hierbij worden enkel door het laboratorium aangeleverde monsterrecipiënten gebruikt, die proper gestockeerd en lekdicht afgesloten zijn.

⁶ Bij directe enkelvoudige monsternamen aan de kraan is het niet noodzakelijk om de recipiënt bestemd voor vluchtige organische solventen als eerste te bemonsteren.

⁷ vulvolgorde niet toepasbaar bij de indirecte deelmonsternamen vanuit de verzamelemmer

Eventuele richtlijnen qua vulling (bijv. geen vrije ruimte) in WAC/I/A/010 moeten gerespecteerd worden.

Afwijkingen m.b.t. vulvolgorde zijn enkel toegelaten mits duidelijke motivatie ervan in het monsternemingsverslag.

4.4.4 CONSERVERING

- Voeg de nodige bewaar- of conserveermiddelen toe per analyseparameter voor de (fysico-) chemische parameters toe conform WAC/I/A/010.
- Voor bacteriologische parameters worden steeds steriele monsterrecipiënten gebruikt. Indien het te bemonsteren water oxidanten bevat (chloor, broom, ozon,...), moeten de werking ervan bovendien geneutraliseerd worden met natriumthiosulfaatpentahydraat-oplossing cfr. WAC/1/A/010. Dit kan door op aseptische wijze individuele porties natriumthiosulfaat te doseren aan het watermonster in de gevulde steriele monsterrecipiënt, maar bij voorkeur wordt het water rechtstreeks opgevangen in een voorgedoseerde steriele monsterrecipiënt met natriumthiosulfaat.
- De conservering gebeurt steeds ter plaatse.
Maak bij voorkeur gebruik van voorgeconserveerde monsterrecipiënten. Toevoeging van conserveermiddelen op het veld is omslachtig, moet vaak in moeilijke (weers)omstandigheden uitgevoerd worden en is bijgevolg vaak minder nauwkeurig.
- De aard en de houdbaarheid van de conserveermiddelen en/of steriliteit moet vermeld worden op de monsterrecipiënt en moet gerespecteerd worden.

4.4.5 FILTRATIES TER PLAATSE

WAC/1/010 vermeldt voor bepaalde opgeloste parameters in oppervlaktewater en afvalwater dat de watermonsters ter plaatse gefiltreerd moeten worden met een 0,45 µm spuitfilter. De filtratie wordt vlak voor het vullen van de monsterrecipiënt voor de opgeloste parameter in kwestie, uitgevoerd rekening houdend met de vulvolgorde vermeld in §4.4.3. Het filtraat wordt rechtstreeks in de desbetreffende monsterrecipiënt opgevangen.

4.5 AANDACHTSPUNTEN

Volgende voorzorgen worden in achtgenomen:

- Voor chemische en bacteriologische parameters: hou de flessendop van een geopende monsterrecipiënt bij voorkeur in de hand en indien het echt nodig om hem neer te leggen: dan enkel met de opening naar boven op een propere ondergrond (bijv. op adsorberend papier), zodat contaminatie vanuit de ondergrond wordt vermeden. .
- Sluit alle monsterrecipiënt goed af (handgespannen en lekdicht) en controleer dit desgewenst.
- Maak ook de buitenkant van de monsterrecipiënten proper.
- Zorg dat de gevulde recipiënten op de monsternamelocatie afgeschermd worden van direct zonlicht (zie verder §9).
- Breng bij metingen ter plaatse nooit een thermometer of elektrode aan in een recipiënt die bestemd is voor andere analyses.
-

4.6 RICHTLIJNEN M.B.T. SPECIFIEKE ANALYSEPARAMETERS

4.6.1 PFAS

Wanneer monsternames gebeuren in het kader van PFAS-analyses, moet rekening worden gehouden met volgende richtlijnen:

- ~~Bij monstername mag enkel gebruik worden gemaakt van materialen die geen PFAS afgeven/uitlogen. In de mate van het mogelijke moet nagegaan worden (bij de leverancier / aan de hand van analyses) of het materiaal gebruikt bij de monstername voor analyse op PFAS; PFAS kan bevatten. Een overzicht van mogelijke PFAS-houdende elementen wordt in de checklist, opgenomen in de OVAM document 'richtlijn PFAS-onderzoek' (www.ovam.be), weergegeven.~~
~~Er mag enkel monstername-apparatuur worden gebruikt waarvan aangetoond is dat ze geen PFAS boven de LOQ uitlogen in het waterstaal.~~
- Elk rechtstreeks contact met het monster moet worden vermeden, dit houdt ook rechtstreeks contact van het monster met de handschoenen in. Het is bijgevolg noodzakelijk om een gereinigd hulpmiddel te gebruiken om het staal te nemen.
- Reinigen van materiaal:
 - o enkel met water van drinkwaterkwaliteit;
 - o bij de toepassing van reinigingsmiddel mag enkel gebruik gemaakt worden van PFAS-vrije detergents en moet grondig worden nagespoeld. ~~Het gebruik van Deconex is niet toegestaan;~~
- Waterstalen voor de analyse van PFAS worden niet gefiltreerd.
- Het gebruik van koelelementen wordt toegestaan onder de volgende voorwaarden:
 - o de koelelementen vertonen geen lekken;
 - o alleen harde koelelementen worden toegestaan, de flexibele koelelementen niet omdat ze een grotere kans op scheuren hebben.
- Er wordt geen beperking opgelegd in te dragen regen-, veiligheids- en andere kledij indien aan volgende voorwaarden wordt voldaan:
 - o rechtstreeks contact met het staal moet worden vermeden;
 - o afloop van hemelwater via de kledij in het staal moet worden vermeden;
 - o ~~kledij aangewend bij staalname mag niet worden gewassen met wasverzachter.~~
- Richtlijnen met betrekking tot conservering en recipiënten zijn opgenomen in de procedure WAC/1/A/010.

5 MONSTERNAME VAN KOEL(TOREN)WATER AAN EEN KRAAN M.B.T. DE ANALYSE VAN LEGIONELLA SPP.

5.1 VOORBEREIDING MONSTERNAME

- 1) Documenteer en beschrijf het bemonsterde water, de bemonsteringssituatie (kraan na warmtewisselaar, aftappunt waterbehandelingssysteem, vernevelaar, sprinkler,...) en het gekozen staalnamepunt (adres/lokaal of situering in productie bijv. identificatie kraan, waterstromen, schets, GPS-coördinaten, ...) eenduidig op het monsternemingsformulier. Informeer bij de productieverantwoordelijke wanneer laatst biocide gedoseerd werd en rapporteer deze informatie. **De monstername is pas zinvol als deze min. 48h na de laatste shockdosing van biocide uitgevoerd wordt¹.**
- 2) Voorzie een steriele monsterrecipiënt voor de analyse van *Legionella* spp. cfr. WAC/1/A/010.

Voor de analyse van *Legionella* spp. worden steeds steriele monsterrecipiënten gebruikt met 0,2 ml 1,8% natriumthiosulfaat pentahydraat oplossing voor elke 100 ml volume van de monsterrecipiënt.

- 3) Draag minimaal wegwerphandschoenen (eenmalig te gebruiken). Indien de bemonstering uitgevoerd wordt in het kader van een *Legionella* uitbraak of in besloten ruimtes met aerosolen, is het aangewezen om een ademhalingsbescherming FFP3 masker tegen aerosolen te dragen. Vermijd om in besloten ruimtes met aerosolen te treden om de monstername uit te voeren (bijv. monstername van het vallende water), maar maak – indien mogelijk – gebruik van een verlengstok of -arm waarin de monsterrecipiënt geplaatst kan worden.

5.2 SPOELEN EN DESINFECTIE

- 4) Verwijder (indien aanwezig) losse opzetstukken die geen deel uit maken van het koelwaterproces. Verwijder zichtbaar aanklevend vuil met (water) bevochtigd absorberend papier (eenmalig te gebruiken).
- 5) Open de kraan op een beheersbaar debiet en spoel minimaal 3 keer het dood volume van de kraan of (staalname)leiding tot aan de koelwaterleiding, met een minimum van 10 liter en maximum 50 liter.
Vang het spoelwater op in (een) emmer(s).
Documenteer het spoelproces en het spoelvolumen.
- 6) Bij voorkeur wordt gedesinfecteerd door de buiten -en binnenkant te bevochtigen met ethanol, isopropanol of ander desinfectans, en vervolgens binnen- en buitenkant droog te vegen met adsorberend papier.
Sluit en desinfecteer de kraan. Documenteer de toegepaste desinfectiemethode (ook indien geen desinfectie toegepast wordt, mogelijk in kader van het doel van het onderzoek of omwille van veiligheidsoverwegingen).

5.3 MONSTERNAME M.B.T. DE ANALYSE VAN *LEGIONELLA* SPP.

- 7) Spoel kort na het desinfecteren om de invloed van het thermisch effect ongedaan te maken of om resten van het desinfectans ongedaan te verwijderen.
- 8) Zet de kraan op een beheersbaar debiet open en vul de steriele monsterrecipiënt(en) rechtstreeks aan de kraan.
- 9) Vul aansluitend een bijkomende beker of recipiënt voor het meten van de temperatuur bij de monsterneming met behulp van een digitale thermometer.
Noteer de temperatuur bij de monstername onmiddellijk op het monsternemingsformulier; het is voornamelijk belangrijk dat de temperatuur zo snel mogelijk na de monstername gemeten en afgelezen wordt voordat deze beïnvloedt kan worden door de omgevingstemperatuur.
- 10) Het meten van de pH van het koel(toren)water wordt aanbevolen (zie §3 a). Vul hiervoor aansluitend een meetrecipiënt voor pH. Noteer de pH.
- 11) Sluit de kraan⁵. Monteer eventueel verwijderde opzet- en/of koppelstukken. Vervolledig de nodige veldregistraties cfr. §7.

6 METINGEN TER PLAATSE

Voor de metingen ter plaatse wordt verwezen naar WAC/I/A/011.

7 VELDREGISTRATIES

Bij elke monsterneming van water worden ter plaatse veldregistraties gemaakt. Dit kan bijvoorbeeld door gebruik te maken van een 'monsternemingsformulier'. Een voorbeeld van monsternemingsformulier is toegevoegd in Bijlage B.

Ongeacht het opzet of doel van de uitgevoerde monsterneming dienen steeds alle uitgevoerde handelingen m.b.t. verwijderen van koppelstukken, spoelen en desinfecteren geregistreerd te worden op het formulier voor veldregistraties. Afwijkingen van de beoogde methode dienen ook steeds geregistreerd en gemotiveerd (reden van afwijkingen) te worden.

Volgende gegevens dienen minimaal geregistreerd te worden bij de monsterneming:

- identificatie van de monsterner
- datum en uur van de monsterneming
- plaats en locatie van de bemonstering
- aanduiding /omschrijving/schets van de kraan die bemonsterd is (eventueel een foto), met vermelding van het type kraan (koud, warm water, mengkraan), tijdstip laatste shockdosering biocide⁸ (indien van toepassing)
- opzet en methode van de bemonstering van het water, inclusief de uitgevoerde handelingen m.b.t. verwijderen van koppelstukken, spoelen (incl. spoelvolumen) en/of reinigen/desinfecteren
- temperatuur van het water bij de monsterneming
- aantal recipiënten gevuld en de gegevens die noodzakelijk zijn voor het identificeren van de monsters zoals vermeld op het etiket
- resultaten van metingen ter plaatse
- afwijkingen t.o.v. de gevolgde methode en de reden van de afwijking
- eventuele opmerkingen en/of (omgevings-)omstandigheden die de monsterneming kunnen beïnvloeden.

8 RAPPORTERING

Van elke monsterneming dient een monsternemingsverslag conform WAC/VI/A/004 opgemaakt te worden. Dit verslag kan ook geïntegreerd worden met het analyseverslag.

Naast de nodige gegevens cfr. §5 van WAC/VI/A/004, moet het monsternemingsverslag het minimum volgende gegevens bevatten:

- beschrijving plaats en locatie van de monsterneming, inclusief aanduiding lokaal en kraan
- documentatie (tijdstip) laatste shockdosering biocide⁸ (indien van toepassing)
- gebruikte methode voor monsterneming per parameter (ook indien combinatie van verschillende methoden gebruikt werden), incl. motivatie bij afwijkingen

⁸ Enkel indien koel(toren)water of luchtvochtigheidsbehandelingen met waterinjectie bemonsterd worden m.b.t. analyse van *Legionella* spp.

9 TRANSPORT

De maximale bewaartermijnen van watermonsters conform WAC/I/010 zijn van toepassing vanaf het tijdstip (datum/uur) van de monsterneming. De monsters dienen dan ook tijdig aan het analyselaboratorium geleverd te worden zodat de houdbaarheid gerespecteerd kan worden. Eventueel moet de monsternemer afspraken maken m.b.t. de levering aan het analyselaboratorium, zodat het laboratorium zich kan houden aan deze houdbaarheidstermijn (bijv. spoedanalyse op voorhand plannen).

Elke blootstelling aan licht en hitte moet te allen tijde vermeden worden. Gekoeld transport van monsters dient gegarandeerd te zijn door gebruik te maken van koelboxen met voldoende koelelementen of een koelinstallatie. Tijdens het transport mag de temperatuur van een monster⁹ zeker niet stijgen. Monsters met een hoge temperatuur worden hierbij fysisch gescheiden van koele monsters.

Het is zeker zinvol om via een logger het temperatuursverloop tijdens het transport te registreren.

10 REFERENTIES

- WAC/I/A/001, Ogenblikkelijke monsternamen (aan kraan) van water voor menselijke consumptie
- WAC/I/A/003, Ogenblikkelijk monsternamen (schepmonster) van water
- WAC/I/A/010, Conservering en behandeling van watermonsters
- WAC/I/A/011, Meting ter plaatse van temperatuur, pH, elektrische geleidbaarheid, opgeloste zuurstof, vrije chloor en gebonden chloor
- CMA/1/A.16, Monsterneming – Afvalstoffen en secundaire grondstoffen – Monsternemingstechnieken vloeistoffen
- NBN EN ISO 5667-1:2007, Water quality - Sampling Part 1: Guidance on the design of sampling programmes and sampling techniques.
- NBN EN ISO 5667-3:2018, Water quality- Sampling Part 3: Guidance on preservation and handling of samples.
- ISO 5667-7:1993, Water quality - Sampling - Part 7: Guidance on sampling of water and steam in boiler plants.
- NBN EN ISO 5667-10:2021, Water quality - sampling - Part 10: Guidance on sampling of waste water
- NBN EN ISO 5667-13:2011, Water quality - Sampling - Part 7: Guidance on sampling of sludges from sewage and water treatment plants.
- NBN EN ISO 19458:2006, Water quality – Sampling – General guide for sampling, transport, preservation and handling of samples for bacteriological analysis

⁹ Monsters met een temperatuur lager dan 8°C mogen tijdens transport tot maximaal 8°C opwarmen.

11 BIJLAGEN

BIJLAGE A: CONTROLE HETEROGENITEIT EN MONSTERNAME VAN NIET-HOMOGEEN WATER IN (OPSLAG)TANK(WAGEN)(S)

A.1 Controle heterogeniteit van (opslag)tank(wagen) en/of opslagrecipiënten

Voor een nadere visuele beoordeling van vloeistoffen wordt met een transparante monsterbuis (steekhevel, kogelklep- of vloeistoflagenmonsternemer) een vloeistofkolom genomen over de volledige vloeistofhoogte. Aan de hand van kleurverschillen en/of viscositeitverschillen en/of verschillen in aggregatietoestand (vast, vloeibaar) kan mogelijke **heterogeniteit of stratificatie (laagvorming)** van de vloeistof vastgesteld worden.

Een andere methode voor het vaststellen van heterogeniteit of laagvorming in de vloeistof, bestaat in het nemen van een oppervlakte- en bodemstaal, en beide monsters grondig te mengen. Nadat de recipiënt enkele minuten tot rust gekomen is, wordt de vloeistof geïnspecteerd. Kleurverschillen of verschillen in viscositeit wijzen meestal op heterogeniteit of laagvorming. Deze methode is toepasbaar bij de monsterneming van diepere tanks of opslageenheden, waar het nemen van monsters over de volledige vloeistofhoogte niet meer mogelijk is.

A.2 (Meervoudige) monsterneming van niet-homogeen water tijdens vullen of ledigen/leegpompen van een (opslag)tank(wagen)

1. De aftapleiding/klep/kraan wordt vooraf grondig gespoeld. Hiervoor laat men een hoeveelheid vloeistof gelijk aan drie keer de inhoud van de monsterrecipiënt in een zachte stroom uit de opslageenheid vloeien. De vloeistof wordt opgevangen in een afvalfles, en de kraan wordt gesloten. De spoelvloeistof wordt nadien op gepaste wijze afgevoerd.
2. Voor de eigenlijke monsterneming wordt de kraan opnieuw geopend, en wordt de vloeistofstroom zo geregeld dat de vloeistof gematigd en constant uit de tank loopt.
3. Een representatieve monsterneming kan bekomen worden door te bemonsteren tijdens het verpompen of ledigen van de volledige opslageenheid. Neem na 20% van de te verpompen hoeveelheid vloeistof een greep, en vang de vloeistof van elke greep afzonderlijk op in een monsterrecipiënt.
4. Herhaal punten 2 en 3 na 50% en 80 % van de vloeistof verpompt wordt.
5. De grepen/monsters na 20%, 50% en 80% verpompen, mogen ter plaatse samengevoegd worden tot een mengmonster op voorwaarde dat deze grepen/monsters allen eenzelfde volume vloeistof bevatten en steeds volledige grepen/monsters samengevoegd worden.
6. Indien meerdere laboratoriummonsters bereid moeten worden (reservemonster, contra-expertise), wordt dit uitgevoerd door meerdere monsterrecipiënten te vullen bij resp. 20%, 50% en 80% verpompen.

BIJLAGE B: VOORBEELD VAN EEN MONSTERNEMINGSFORMULIER

MONSTERNEMINGSFORMULIER

Monsternemer: _____

Tijdstip monsternamen: datum _____ uur: _____

Monsternummer: _____

Algemeen – omschrijving opdracht

Monsternameloctie: _____

Gebouw - lokaal: _____

Type water:

☐ afvalwater	☐ koel(toren)water	☐ spoelwater	☐ andere: _____
☐ proceswater	☐ grondwater (niet ikv drinkwater)	☐ oppervlaktewater (niet ikv drinkwater)	

Doel / reden monsterneming:

Staalnamepunt:

☐ kraan aan leidingen(circuit), stromend	☐ kraan aan leidingen(circuit), stilstaand	☐ kraan aan tank, tankwagen, opslagreservoir, ... vulhoogte _____	☐ andere: _____

Parameter(s)(groepen):

☐ bacteriologische	☐ (fysico-)chemische	☐ beide	☐ andere: _____

Monsterneming

Monsternamemethode:

☐ ogenblikkelijke monsternamen (representatief)	☐ meervoudige monsternamen tijdens ledigen/vullen	☐ monsternamen vloeistoffen in tank cfr. CMA/1/A.16	☐ andere: _____
☐ ogenblikkelijke monsternamen (niet-representatief)	☐ monsternamen koel(toren)water aan kraan m.b.t. Legionella spp.		

Handelingen:

☐ verwijderen opzetkoppelstukken	☐ reinigen (buitenkant)	☐ reinigen (binnenkant)	☐ andere: _____
☐ homogeniseren	☐ circuleren begin _____ einde _____		

Spoelen:

☐ dood volume: _____ l + min. 1 minuut begin _____ einde _____	☐ kort	☐ niet gespoeld	☐ andere: _____ min./liter spoelen

Desinfecteren:

☐ n.v.t. ☐ thermisch (flamberen) ☐ Chemisch:

(specificeer desinfectans)

☐

andere: _____

Temperatuur bij de monstername: _____ °C

Afwijkingen: _____

Opmerkingen: _____

Monsterrecipiënten

Aantal gevulde recipiënten: _____

Recipiënten

☐ steriel ☐ niet steriel ☐ _____ ☐

Conservering (neutralisatie) bacteriologische parameters (enkel indien chloor aan water werd toegevoegd)

☐ 1 ml/l 1.8% natriumthiosulf. ☐ 2 ml/l 1.8% natriumthiosulf. ☐ _____ ☐

Opmerkingen: _____

Metingen ter plaatse

Parameter: pH : _____ Parameter: _____: _____

Parameter: _____: _____ Parameter: _____: _____

Parameter: _____: _____ Parameter: _____: _____

Parameter: _____: _____ Parameter: _____: _____

Transport en overdracht

Transport

☐ monstememer ☐ opdrachtgever ☐ extern: _____ ☐ andere: _____

☐ gekoeld ☐ niet-gekoeld ☐ ijswater ☐ andere: _____

Overdracht monsters aan: _____

Datum/uur: _____ Handtekening: _____

Opmerkingen: _____

Schets

Ogenblikkelijke monstername (schepmonster) van water

INHOUD

1	Toepassingsgebied	4
2	Apparatuur, materiaal en oplossingen	4
2.1	Monsternamename-apparatuur	4
2.2	Benodigdheden	5
3	Keuze monsternamelocatie/-punt	5
3.1	Locatie	5
3.2	Samenstelling	6
3.3	Specifieke instructies bij de keuze van de monsternamelocatie en -punt	7
4	Uitvoering schepmonster	11
4.1	Toegankelijkheid van de monsternamelocatie	11
4.1.1	Algemeen - veiligheid	11
4.1.2	Oppervlaktewater	11
4.2	Monsternamemethode	13
4.2.1	Directe monsternamename	13
4.2.2	Indirecte monsternamename	13
4.2.3	Monsternamename van oppervlaktelagen of -films	14
4.3	Uitvoering schepmonster	14
4.3.1	Vorbereiding	14
4.3.2	Monsternamename voor bacteriologische analyses	15
4.3.3	Monsternamename voor ecotoxicologische analyses	16
4.3.4	Monsternamename voor (fysico)chemische parameters	16
4.3.5	Monsternametemperatuur	17
4.4	Vullen van recipiënten	17
4.4.1	Direct: rechtstreeks schepmonster in monsterrecipiënt	17
4.4.2	Indirect: van verzamelemmer (enkel fysico-chemische parameters)	18
4.5	Vulvolgorde	18
4.6	Conservering	19
4.7	Filtraties ter plaatse	19
4.8	Aandachtspunten	20
4.9	Richtlijnen m.b.t. specifieke analyseparameters	20
4.9.1	PFAS	20
5	Schepmonster van koel(toren)water m.b.t. de analyse van Legionella spp	21
5.1	Vorbereiding monsternamename	21
5.2	Monsternamename van een koeltoren m.b.t. de analyse van Legionella spp.	22
5.3	Monsternamename van een luchtvochtigheidsbehandeling met water-injectie m.b.t. de analyse van Legionella spp.	22
5.4	Monsternametemperatuur en (facultatieve) pH-meting	23
6	Metingen ter plaatse	23

7	Veldregistraties	23
8	Rapportering	24
9	Transport	24
10	Referenties	24
11	Bijlagen	25
	BIJLAGE A : Voorbeelden van een monsternemingsformulier (informatief)	26
	BIJLAGE B : voorbeelden van gespecialiseerde apparatuur voor monsterneming: cilindrisch monsternametoestel (CMT, informatief)	30
B.1	<i>Verticale CMT - vloeistoflagenmonsternemer</i>	30
B.1.1	Stangbediende vloeistoflagenmonsternemer	30
B.1.2	Kabelbediende vloeistoflagenmonsternemer	31
B.2	<i>Horizontale CMT - vloeistoflagenmonsternemer</i>	32

1 TOEPASSINGSGEBIED

Deze procedure beschrijft de ogenblikkelijke monsterneming via een schepmonster van zwembaden, oppervlaktewater, afval- en tweedecircuitwater en de monsternamen van koelwater uit het vergaarbassin van koeltorens¹ en van luchtvochtigheidsbehandelingen met waterinjectie, met bijhorende specificaties betreffende conservering en transport.

Het betreft de monsterneming m.b.t. (fysico-)chemische, ecotoxicologische en microbiologische analyses in het laboratorium en m.b.t. metingen ter plaatse van pH, geleidbaarheid, temperatuur, vrije en gebonden chloor en/of opgeloste zuurstof. Voor de metingen ter plaatse wordt verwezen naar WAC/I/A/011.

Deze procedure is niet toepasbaar voor monsternamen m.b.t. (hydro)biologische parameters (pakketten W9).

Voor de tijds- en/of debietsgebonden monsternamen van afvalwater wordt verwezen naar WAC/I/A/004.

Voor de ogenblikkelijke monsternamen van afval- en tweedecircuitwater (koel-, proces, spoelwater,...) aan kranen wordt verwezen naar WAC/I/A/002.

2 APPARATUUR, MATERIAAL EN OPLOSSINGEN

De apparatuur en benodigdheden dienen zoveel mogelijk te bestaan uit materialen die inert zijn ten aanzien van de te analyseren component(en). Ze moeten goed onderhouden en schoon zijn zodat de representativiteit van de monsterneming niet nadelig wordt beïnvloed. De apparatuur en benodigdheden behoren regelmatig mechanisch en/of chemisch te worden gereinigd. Het ontstaan van bijvoorbeeld doffe of verkleurde vlekken kan een signaal zijn dat het hulpmiddel niet meer geschikt is voor monsterneming.

2.1 MONSTERNAME-APPARATUUR²

- 2.1.1. Scheppot of maatbeker met handvat³
- 2.1.2. (Telescopische) schepstok met houder en passende (maat)beker/recipient
- 2.1.3. Monsterkooi met passende recipient³ en touw (facultatief, in sommige monsternamensituaties alternatief voor 2.1.2 ; evenwaardige toestellen ook toegelaten), met mogelijkheid tot openen en afsluiten onder het wateroppervlak indien toegepast voor de monsternamen m.b.t. analyse van PFAS
- 2.1.4. Emmer met touw
- 2.1.5. (Hand- of peristaltische) pomp voor monsternamen van zeer ondiep water of op specifieke diepte, steriel of desinfecteerbaar indien toegepast voor bacteriologische parameters

² Andere, gelijkwaardige monsternamen-apparatuur dan hierna vermeld (bijv. pompapparatuur,...), kan toegepast worden op voorwaarde dat het werkingsprincipe en/of gebruik ervan overeenstemt met de doelstelling van de monsternamen. Het gebruik ervan wordt toegelaten na overleg met de opdrachtgever en/of toezichthoudende overheid, en mits documenteren en motiveren ervan op het monsternamenslag.

³ Voor elke monsternamen een nieuw/proper exemplaar voorzien.

2.2 BENODIGDHEDEN

- 2.2.1. Voldoende en aantoonbaar monsterrecipiënten (voorgeconserveerd, indien van toepassing) voor de te analyseren bacteriologische, (fysico-)chemische en/of ecotoxicologische parameters (indien van toepassing). De richtlijnen m.b.t. het minimale volume, de nodige conserveer- en of neutralisatiemiddelen en de te gebruiken recipiënten (bijv. plastic, glas,...) per parameter(groep) conform WAC/1/A/010 moet gerespecteerd worden

Elk recipiënt dient voorzien te zijn van een (voorgedrukte) label met vermelding van monstercoding, datum monsterneming, analyseparameter(s) of andere eenduidige identificatie of link naar de analyseparameter(s), conserveermiddel (indien noodzakelijk) en/of steriliteit met houdbaarheid ervan, facultatief aanduiding plaats/locatie van de monsterneming.

- 2.2.2. Verzamelemmer(s)³, met inhoud min. 1,5x het nodige volume voor het vullen van de monsterrecipiënten
- 2.2.3. Maatbeker(s) met gietskuit en handvat voor homogenisatie³
- 2.2.4. Breedhalsrecipiënt voor de monsterneming van oppervlaktelagen
- 2.2.5. (Lies)laarzen en/of waadpak (facultatief, indien van toepassing)
- 2.2.6. Handschoenen tot polslengte (directe monsterneming) en/of elleboog- of schouderlengte (facultatief, indien van toepassing)
- 2.2.7. Peilstok (1.5 m) voor bepaling monsternamediepte (of gelijkwaardige apparatuur)
- 2.2.8. Toestel waarmee ruimtelijke coördinaten kunnen vastgelegd en teruggevonden worden, bijv. GPS (verplicht bij monsterneming van oppervlaktewater; facultatief voor de andere situaties)
- 2.2.9. Monsternemingsformulier
- 2.2.10. Wegwerpspuiten³ en 0,45 µm spuitfilters³ (indien van toepassing, zie WAC/1/A/010)
- 2.2.11. Vochtige alcoholdoekjes, bijv. isopropanoldoekjes (van toepassing voor bacteriologische parameters)
- 2.2.12. Desinfectans: ethanol, hypochloriet, of ander gelijkwaardig (van toepassing voor bacteriologische parameters)
- 2.2.13. Desinfecterende handgel (van toepassing voor bacteriologische parameters)
- 2.2.14. Absorberend papier
- 2.2.15. Persoonlijke beschermingsmiddelen, afhankelijk van de omstandigheden van de monsterneming. Wegwerphandschoenen (eenmalig te gebruiken) en veiligheidsbril (bij het vullen van recipiënten met conserveermiddel) worden aanbevolen.

Bij monsterneming i.k.v. *Legionella* wordt ademhalingsbescherming FFP3 tegen aerosolen aanbevolen

- 2.2.16. Koelboxen met voldoende diepgevroren koelementen of koelinstallatie om gekoeld transport van monsters te garanderen
- 2.2.17. Fototoestel (facultatief)

3 KEUZE MONSTERNAMELOCATIE/-PUNT

3.1 LOCATIE

De monsternamelocatie en het exacte monsternamepunt is een bepalende factor in het analyseresultaat bij het nemen van een scheppmonster, maar de keuze ervan wordt ook ingegeven door de monsternamesituatie, zoals deze zich op het moment van de monsterneming voordoet, en het doel en/of (regelgevend) kader van de monsterneming. In deze procedure worden volgende monsternamesituaties behandeld:

a) **Oppervlaktewater** wordt gedefinieerd⁴ als:

- het stilstaand of stromend zoet of brak water dat permanent of op geregelde tijdstippen op natuurlijke of op kunstmatige wijze een deel van het aardoppervlak inneemt en dat deel uitmaakt van het waterhuishoudkundig systeem (bijv. bronnen, beken, vaarten, kanalen, rivieren)
- het stilstaand water dat permanent of op geregelde tijdstippen op natuurlijke wijze een deel van het aardoppervlak inneemt, dat niet in verbinding staat met een waterhuishoudkundig systeem, maar dat gevoed wordt door hemelwater

Qua monsternamen (schemonsters) worden volgende situaties in deze procedure behandeld:

- i. Stromend oppervlaktewater
- ii. Stilstaand oppervlaktewater
- iii. Recreatiewaters en open zwemgelegenheden voor baden/zwemmen: vijvers, meren en waterlopen bedoeld waar volgende activiteiten plaatsvinden: zwemmen, duiken, windsurfen, waterskiën, met uitzondering van zeebadzones

b) **Zwembaden**: alle vaste zwembaden, overdekte en niet-overdekte circulatiebaden, plons-, therapie-, dompelbaden en whirlpools

c) **Afvalwater**

- i. Stromend afvalwater (in open kanalen en in gesloten opstelling): bij de lozing van bedrijfsafvalwater of bij monsternamen van influent en effluent bij afvalwaterzuiveringsinstallatie worden (debiets-of tijdsproportionele) 24-uurmonsters conform WAC/I/A/004 genomen op vaste plaatsen in de inlaat en in de afvoer van de behandelingsinstallatie. Een ogenblikkelijke monsternamen via schemonsters is in deze gevallen in principe enkel toegelaten door de toezichthoudende overheid.
- ii. Alle andere situaties: afvalwater wordt meestal gekenmerkt door een heterogene verdeling van verontreinigingen. In eerste instantie wordt de monsternamenstrategie voor het nemen van een ogenblikkelijke monster conform WAC/1/A/002 (§3.1/Figuur 1) gevolgd. Als de bemonsterings situatie geen meervoudige of representatieve monsternamen via andere methoden (CMA/1/A.16) toelaat, wordt een ogenblikkelijk schemonster volgens §Fout! Verwijzingsbron niet gevonden. genomen.

d) **Speciale bemonsterings situaties**:

- i. koeltorens, luchtvochtigheidsbehandeling met waterinjectie (bevochtigingsbakken)

3.2 SAMENSTELLING

Als algemene richtlijn wordt gesteld dat het schemonster genomen wordt op een plaats waar een homogene samenstelling van het water kan verwacht worden. In specifieke gevallen (zwemwater) wordt een schemonster algemeen genomen op een plaats met de minst gunstige kwaliteit. Specifieke instructies en informatie met betrekking tot de keuze van monsternamenlocatie en- punt in functie van de monsternamensituatie worden gegeven in **Tabel 1**⁵.

⁴ Titel II van het VLAREM, art.1, 1°

⁵ Tenzij anders opgelegd in de omgevingsvergunning

Hierbij wordt aanbevolen om rekening te houden met volgende aspecten:

- Houdt rekening met de toegankelijkheid en/of veiligheid bij uitvoering van de monstername: overweeg op welke plaatsen (brug, oever, doorwaden..) het monsternamepunt het best toegankelijk is, rekening houdende met de beperkingen van de locatie inzake monstername (zie §4).
Indien een opgegeven locatie niet geschikt is, wordt de reden gedocumenteerd op het veldformulier, en wordt een monsternamelocatie en -punt gekozen volgens de instructie in Tabel 1.
- Gebruik bij voorkeur bestaande monsternamelocaties om vergelijking van resultaten toe te laten, tenzij het bestaande monsternamepunt niet compatibel/geschikt is voor het beoogde doel van de monstername, veiligheid, etc. Lokaliseer de opgegeven locatie, en verifieer steeds of deze toepasbaar is in de huidige situatie.

3.3 SPECIEKE INSTRUCTIES BIJ DE KEUZE VAN DE MONSTERNAMELOCATIE EN -PUNT

Tabel 1 ²: instructies m.b.t. de keuze van de monsternamelocatie en- punt bij een ogenblikkelijke monstername (schipmonster)

Matrix	Monstername-situatie	Monsternamelocatie	Monsternamepunt	Opmerkingen
Oppervlakte- ^{Fout!} water Bladwijzer niet gedefinieerd., 6	Recreatiewater en open zwemgelegenheden	Op een plaats met <u>de minst gunstige waterkwaliteit</u> : - de plaats waar het gemiddeld aantal baders het grootst is - de plaats waar de meeste zwemmers verwacht kunnen worden - de plaats waar volgens het zwemwaterprofiel het grootste risico van verontreiniging wordt verwacht	Volgende instructies gerespecteerd worden: - op een plaats waar het water minstens 1 m diep is (bij voorkeur 1 tot 1,5 m diepte) en 30 cm onder het wateroppervlak	
	Stromend	Op een plaats waar een homogene samenstelling kan worden verwacht, bijv.: goede menging of turbulentie (overloop of toevloed meerdere stromen)		Vermijd plaatsen met instroom van contaminanten (lozingspunten), tenzij deze het doel zijn van de monstername
	Stilstaand	Op een plaats waar een homogene samenstelling kan worden verwacht, bijv.: - instroom van een (vers)waterbron - uitstroom van water (onttrekken)		- Risico op heterogene verdeling in horizontale en verticale richting door fotosynthese - veranderingen in watertemperatuur - invloed waterbodem - sedimentatie van gesuspendeerd materiaal

⁶Wanneer zwevende stoffen of parameters die zich hechten aan zwevende stoffen het onderwerp vormen in het betreffende onderzoek, wordt een cilindrisch monsternametoestel (BIJLAGE B) gebruikt. Bij het gebruik ervan dient de toegepaste methode gedocumenteerd en gemotiveerd te worden in het monsternameverslag.

Matrix	Monstername-situatie	Monsternamelocatie	Monsternamepunt	Opmerkingen
				Tijdsgebonden (seizoens-, dag-) variaties kunnen optreden. Vermijd dit door de monstername op welbepaald tijdstip te plannen ⁷ .
Drinkwater	Zwem- en therapiebaden	Op een plaats met de minst gunstige waterkwaliteit: • tegenover én het verst verwijderd van de verswatertoevoer • aan de waterafvoer van het bad (bij oudere installaties) • Indien beschikbaar, wordt de plaats genomen die via de kleurtest als minst gunstig werd bepaald.	Volgende instructies moeten gerespecteerd worden: • 30 à 50 cm van de badrand en • net onder het oppervlak (tussen -10 en -30 cm) Baders moeten tijdens de monstername minstens 1 m verwijderd zijn van het monsternamepunt.	• In ondiepe baden aangepaste (compacte) apparatuur gebruiken om water onder het wateroppervlak te onttrekken (oppervlaktemonsters vermijden!) • Duid in- en uit- of overlaat bij aanduiding monsternamepunt op schets • Noteer (een schatting van) het aantal aanwezige baders in het betreffende bad tijdens de monstername • Gebruik geen glazen monstername- of meetapparatuur in de badzone.
Afvalwater	Stromend, bij lozing of afvalwater-zuivering	Op een plaats met de meeste turbulentie, of waar de samenstelling het meest representatief is: • waar een meetinrichting (meetgoot, meetschot,...) geïnstalleerd is • t.h.v. de uitstroom van afvalwater uit een afvoerbuï naar een oppervlaktewater of naar een lager gelegen put of riool. • op vaste plaatsen in de inlaat en in de afvoer van de	Volgende instructies moeten gerespecteerd worden: • ~~alle situaties~~ onder het wateroppervlak⁸ • voor meetinrichtingen: stroomafwaarts van de meetinrichting, op een afstand gelijk aan 3 x de breedte van de meetinrichting. Indien stroomafwaarts niet mogelijk is (in deze volgorde), en mits registratie van het afwijkende monsternamepunt: - stroomopwaarts	• monstername via (debiets-of tijdsproportionele) 24-uurs-verzamelmonsters conform WAC/I/A/004; een ogenblikkelijk (schepp)monster is in principe enkel toegelaten door de toezichthoudende overheid • Eventuele afzetting, bezinsel, sliblaag, etc. op de bodem van het afvoerkanaal of -buis wordt niet bemonsterd. • In ondiepe afvoerkanalen aangepaste (compacte) apparatuur gebruiken om water onder het wateroppervlak te onttrekken

⁷ Tenzij de tijdsgebonden variaties het doel vormen van de monstername

⁸ bij voorkeur op 1/3 van het waterniveau

Matrix	Monsternamesituatie	Monsternamelocatie	Monsternamepunt	Opmerkingen
		behandelingsinstallatie bij afvalwaterzuivering	- in de meetinrichting - aan een meetpunt	
Afvalwater	Andere dan lozing of afvalwaterzuivering	Op een plaats met de meeste turbulentie, of waar de samenstelling het meest representatief is. Volg bij de keuze van de monsternamelocatie de <u>monsternamestrategie voor het nemen van een ogenblikkelijke monster conform WAC/1/A/002</u> (<u>\$3.1/Figuur 1</u>) ² . Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.	• bezonken deeltjes worden niet mee bemonsterd	• Monstername aan kraan conform WAC/1/A/002 heeft voorkeur. • Geen representatieve monstername indien het stilstaand afvalwater niet gehomogeniseerd kan worden². Noteer de vermelding 'niet-representatief' op het monsternemingsverslag.
Koelwater	Koeltorens luchtvochtigheidsbehandeling met waterinjectie	Keuze via Figuur 2 van WAC/1/A/002 •	Afhankelijk van de monsternamelocatie cfr. Figuur 2 WAC/1/A/002: zie \$5 van WAC/1/A/002 (kraan) of \$5 van deze methode (schipmonster)	
	luchtvochtigheidsbehandeling met waterinjectie	vergaarbak	Afhankelijk van de waterhoogte in de vergaarbak (zie ook Figuur 2 WAC/1/A/002): - waterhoogte ≥ 20 cm: schepmonster net onder het oppervlak, tussen -10 en -30 cm - waterhoogte < 20 cm: water oppompen op halve diepte	• Vermijd de mogelijk vervuilde bodem en wanden van de vergaarbak.

4 UITVOERING SCHEPMONSTER

4.1 TOEGANKELIJKHEID VAN DE MONSTERNAMELOCATIE

De keuze van de monsternamelocatie is, voornamelijk bij oppervlaktewater, ook zeer afhankelijk van de toegankelijkheid van de locatie, veiligheidsfactoren en de toepasbaarheid van bepaalde monsternametechnieken op de locatie.

4.1.1 ALGEMEEN - VEILIGHEID

Bij de keuze van de monsternamepunten wordt gelet op de toegankelijkheid onder alle weersomstandigheden. De eigen veiligheid is steeds prioritair, en voor het betreden van een locatie dienen de gevaren ingeschat te worden. Mogelijk kan toegankelijkheid, of gebrek aan veilige toegang tot een site, het bereik van een beoogde monsternamepunt hinderen. Bij potentieel onveilige of gevaarlijke situaties wordt - in overleg met het bedrijf - gebruik gemaakt van gepaste collectieve en/of persoonlijke beschermingsmiddelen (bijv. leuning, valharnas,...). Indien deze ontoereikend zijn, wordt een alternatieve locatie gekozen.

Probeer vooraf ook op te vragen of ter plaatse in te schatten of er andere specifieke risico's verbonden zijn aan een bepaalde monstername, met name op gebied van bijvoorbeeld aanwezigheid van toxische gassen (H_2S , CO , NH_3 , ...), explosieve mengsels, radioactieve straling, pathogene organismen. In dergelijke situatie is de aanwezigheid van een tweede persoon, uitgerust met GSM, noodzakelijk zodat deze desgevallend alarm kan geven en hulp kan bieden. In overleg met het bedrijf dient gebruik gemaakt te worden van gepaste collectieve en persoonlijke beschermingsmiddelen zoals specifieke beschermende kledij, ademhalingsbescherming, gebruik van bepaalde detectoren...

Elke afwijking m.b.t. de monsternamelocatie en -punt omwille van veiligheids- en/of toegankelijkheidsredenen dient gemotiveerd te worden in het monsternameverslag.

4.1.2 OPPERVLAKTEWATER

Hieronder worden enkele van de meest voorkomende monsternamelocaties opgelijst. Er is geen expliciete voorkeursvolgorde voor de beschreven monsternamelocaties; deze zijn situatie-afhankelijk en worden in de eerste plaats bepaald door de instructies van het programma waarbinnen de monstername plaatsvindt (vaste monsternamelocatie, specifieke instructie qua diepte,...). De monsternemer overweegt ter plaatse de mogelijkheden met inachtnaam van de specifieke instructies inzake monsternamelocatie- en punt (Tabel 1). Bij deze overweging wordt steeds gestreefd naar een kwalitatief schepmonster (vermijden van externe invloeden, contaminatie, respecteren monsternameplaats en -diepte).

4.1.2.1 MONSTERNAME VAN OP EEN BRUG

Kies een plaats op een brug zodat:

- er voldoende diepgang is in het water om de monstername-apparatuur onder te dompelen zonder de waterbodem op te woelen (bv. bij voorkeur in het midden van een brug). Kies een

kleinere monsternamereciënt of -apparaat of een andere monsternametechniek indien niet aan deze voorwaarde kan voldaan worden.

- er niet meer verontreinigingen of artefacten in de stroom aanwezig zijn ter hoogte van de brug t.o.v. van enkele meters verder (bijv. zwerfvuil, stenen, keien,...)
- er geen verontreinigend materiaal die aan of onder de brug hangen, kan loskomen en in de monstername-apparatuur terechtkomen.

Monstername via emmer en touw biedt weinig controle over de diepgang van het bemonsterde water. Bij gebruik van een emmer vanaf een brug wordt de reden gemotiveerd waarom andere locaties niet geschikt zijn voor monstername.

4.1.2.2 MONSTERNAME VAN OP DE OEVER/KANT

- Vermijd contaminatie van het monster door verstoring van de waterbodem of de oeverkant van het(de) water(loop). Een (telescopische) schepstok met beker is in dit opzicht beter geschikt dan een (schep)emmer met touw. Deze laatste mag enkel in overweging genomen worden indien geen andere locaties toegankelijk zijn voor monstername.
- Vermijd contaminatie van de wanden bij monstername van afvalwater in een meetgoot, kanaal of riool. Zorg ervoor dat de wanden proper zijn voor de monstername en dat slib, aanklevende deeltjes, etc. van de wanden verwijderd worden of niet in het schepmonster terecht kunnen komen.

4.1.2.3 MONSTERNAME BIJ HET DOORWADEN VAN WATER(LOOP) ('IN-STREAM')

- Betreed het oppervlaktewater alleen als dit op een veilige manier kan gebeuren en de nodige veiligheidsmaatregelen getroffen zijn. Zorg dat er altijd een tweede persoon in de buurt is in onveilige situaties. Indien deze wijze van monstername uitgesloten wordt omwille van veiligheid, wordt de reden gedocumenteerd op het monsternemingsformulier.
- Gebruik van een schepstok met telescopische verlengarm kan de diepte tot waar het oppervlaktewater moet betreden worden voor de monstername, beperken en is bijgevolg minder risicovol.
- Beperk de verstoring van de waterbodem of de oeverkant van het(de) water(loop) bij het doorwaden en bemonsteren. Betreedt de waterloop stroomafwaarts en waadt vervolgens stroomopwaarts door de waterloop; zo zal het monsternamepunt minder verstoord worden. Wacht even als het monsternamepunt bereikt is alvorens de monstername aan te vangen, zodat mogelijk opgedwarrelde waterbodemdeeltjes opnieuw kunnen bezinken. Een (telescopische) schepstok met beker/reciënt is in dit opzicht beter geschikt dan een (schep)emmer met touw.
- Verlaat het water voor het vullen van de verschillende monsterreciënten bij een indirecte monstername, en voer dit bij voorkeur uit op een veilige plaats aan de oever. Neem enkel een verzamelemmer en de monstername-apparatuur mee bij het doorwaden. Gebruik eventueel een vlot of boot als houvast en/of draaghulp.

4.1.2.4 MONSTERNAME VAN OP EEN BOOT (FACULTATIEF, IN FUNCTIE VAN EEN SPECIFIEKE OPDRACHT)

- Deze monstername mag enkel uitgevoerd worden als de monsternemer opgeleid is voor deze monstername en het gebruik van het vaartuig. Het vaartuig moet goed onderhouden zijn en geschikt zijn voor monstername.

- Vermijd contaminatie door uitlaatgassen van de motor; leg de motor stil bij de monstername, gebruik verankering (indien nodig) en wacht enkele minuten (ook bij gebruik van een roeiboot) alvorens de monstername aan te vangen.
- Contaminatie van een monster wordt vermeden door verstoring van neerslag op de waterbodem of doordat enig materiaal afkomstig van de boot zelf in het monster terechtkomt. Voor de bemonstering kan een schepstok (voorkeur) of een emmer worden gebruikt.

4.2 MONSTERNAMEMETHODE

Afhankelijk van het doel/kader van de monstername en de te analyseren parameter(s)groep(en) wordt een geschikte monsternamemethode gekozen. Deze methoden kunnen ook gecombineerd worden binnen één monstername.

4.2.1 DIRECTE MONSTERNAME

Monstername waarbij de monsterrecipiënt die aan het labo bezorgd wordt (d.i. het laboratoriummonster) rechtstreeks vanuit het te bemonsteren watervolume gevuld wordt, al dan niet gebruik makend van een (telescopische) schepstok of monsterkooi waarin de monsterrecipiënt rechtstreeks in bevestigd kan worden.	
<i>Wel toepassen:</i>	<i>Niet toepassen:</i>
- bij het nemen van monsters zowel <u>aan het oppervlak</u> als <u>net onder het oppervlak</u> (-30 cm). - bij voorkeur in gevallen waarbij verlies, of contaminatierisico van de te analyseren parameter(s), tijdens de monstername zeer hoog is. Vanuit deze optiek is directe monstername de aanbevolen methode voor het nemen van scheppmonsters voor microbiologische analyse (zie §4.3.2) en voor het nemen van oppervlaktelagen (zie §4.2.3). - enkel wanneer de monstername op een veilige manier kan uitgevoerd worden (cfr. toegankelijkheid van het monsternamepunt, stromingsgevaar bij doorwaden, etc.).	- als de monsterrecipiënt waarmee bemonsterd wordt, conserveermiddelen bevat omdat verlies van het conserveermiddel en/of contaminatie van het bemonsterde water met conserveermiddel niet uitgesloten kan worden. - als er meerdere monsterrecipiënten moeten gevuld worden voor chemische parameters. Om de representativiteit van de inhoud van de verschillende monsterrecipiënten ten opzichte van het bemonsterde watervolume te garanderen, wordt de monstername in dit geval uitgevoerd door opeenvolgende scheppmonsters (zie §4.2.2).

4.2.2 INDIRECTE MONSTERNAME

Monstername waarbij het scheppmonster genomen wordt met (afzonderlijke) monstername-apparatuur (bijv. schepstok met beker, emmer, maat- of schepbeker,...) vanuit dewelke vervolgens de monsterrecipiënt(en) gevuld worden.

Vaak worden bij een indirecte monsterneming herhaaldelijk scheppmonsters na elkaar genomen (weliswaar op dezelfde plaats en diepte) en worden deze verzameld in een verzamelrecipiënt (bijv. emmer).-Er worden dan zoveel scheppmonsters genomen als 1.5 keer de benodigde hoeveelheid monster (het volume van alle monsterrecipiënten tesamen). De verzamelrecipiënt mag hierbij maximaal $\frac{3}{4}$ gevuld worden, zodat homogenisatie nog mogelijk is. Het verzamelmonster wordt

gehomogeniseerd (zie §4.4.2), waarna de monsterrecipiënten gevuld worden met behulp van deze maatbeker.	
<i>Wel toepassen:</i>	<i>Niet toepassen:</i>
- als het volume van de (maat)beker onvoldoende is om de monsterrecipiënt in één keer volledig te vullen - als er meerdere monsterrecipiënten gevuld moeten worden	- monstername van oppervlaktelagen (zie §4.2.3)

4.2.3 MONSTERNAME VAN OPPERVLAKTELAGE OF -FILMS

Speciale vorm van een directe monstername, waarbij enkel de oppervlakte- of drijfslag bemonsterd wordt met behulp van een monsternamerecipiënt met brede instroomopening, zonder (monstername bij doorwaden) of met telescopische schepstok (monstername vanaf oever, boot, brug). De monsternamerecipiënt wordt stroomopwaarts (of tegen de windrichting in bij stilstaand water) gericht en horizontaal in het water gebracht zodat de hals van de monsternamerecipiënt half ondergedompeld is. Laat de recipiënt vollopen en haal op zodra deze gevuld is. Zorg ervoor dat de monsternamerecipiënt niet overvuld wordt, omdat de oppervlaktelaag dan (gedeeltelijk) kan overlopen. Het overgieten van de monsternamerecipiënt naar een andere monsterrecipiënt voor analyse (indirecte monstername) is niet toegelaten bij het bemonsteren van oppervlaktelagen, wegens risico op verlies van de oppervlaktelaag.	
<i>Wel toepassen:</i>	<i>Niet toepassen:</i>
- monstername voor kwalitatieve analyse van drijf- en oppervlaktelagen - in zeer specifieke gevallen, bijvoorbeeld voor de kwalitatieve analyse van minerale olie in oppervlaktewater met bestemming zwembadwater, oliën/vetten in afvalwater	- gebruik van emmer met touw voor deze monstername (biedt geen controle over diepgang van de monstername) - kwantitatieve analyses van verontreinigingsparameters

4.3 UITVOERING SCHEPPMONSTER

4.3.1 VOORBEREIDING

- 1) Leg alle benodigdheden, apparatuur en monsterrecipiënten op voorhand en binnen handbereik klaar.
- 2) Documenteer en beschrijf de gekozen monsternamelocatie en -punt conform de richtlijnen in §3, in functie van de monsternamesituatie en het doel van de monstername, eenduidig op het monsternemingsformulier. Gebruik hulpmiddelen om de locatie en/of diepte van het monsternamepunt te kunnen vaststellen, bijv. (peil)stok (andere, evenwaardige, hulpmiddelen zijn toegelaten)
Het vastleggen van het monsternamepunt wordt uitgevoerd in lengte- en breedterichting: noteer de GPS-coördinaten van de locatie (noodzakelijk voor oppervlaktewater) en/of duid tesamen met (een) referentiepunt(en) aan op een schets (alsook in- en uitlaat voor zwembaden) op het veldformulier en/of neem een foto van de monsternamelocatie en duidt hierop de locatie aan.
Noteer ook eventuele (omgevings-, weers-)omstandigheden die de monstername zou kunnen beïnvloeden (bijv. regen, sneeuw, opwaaiend stof, ijslaag,...).

Ijslagen worden uit veiligheidsoverwegingen niet betreden voor de monstername, maar worden vanaf de oever/kant/brug voorzichtig verwijderd. Indien hierdoor afgeweken moet worden van de normale instructies voor het monsternamepunt wordt dit als afwijking genoteerd op het monsternemingsformulier.

- 3) Draag voor de monsterneming van fysicochemische parameters minimaal handschoenen (bij voorkeur eenmalig te gebruiken).
Voor de monsternaming voor bacteriologische parameters worden de handen eerst gewassen en/of ontsmet met een desinfecterende handgel of worden steriele handschoenen gebruikt.

Indien de bemonstering uitgevoerd wordt in het kader van een *Legionella* uitbraak, is het aangewezen om een ademhalingsbescherming FFP3 masker tegen aërosolen te dragen

- 4) Neem eerst, indien van toepassing (bijv. voor de kwalitatieve bepaling van minerale olie) of gevraagd (bijv. bij vaststelling van drijfslagen), een monster van de oppervlaktelaag conform §4.2.3.
Doe na deze monsternaming nieuwe handschoenen aan (bij voorkeur eenmalig te gebruiken) (zie punt 3).
- 5) Verwijder, indien van toepassing, eventuele resterende drijfslagen of andere verontreinigingen van het wateroppervlak ter hoogte van het monsternamingspunt door de schepstok of onderzijde van de monsternamingsrecipiënt enkele malen over het oppervlak van het water te bewegen.
- 6) Voer de monsternaming voor bacteriologische, ecotoxologische en (fysico-)chemische parameters steeds afzonderlijk uit (d.w.z. afzonderlijk verzamelmonster), maar wel op dezelfde monsternamingslocatie en hetzelfde monsternamingspunt. Zorg evenwel voor dat beide monsternamingsnamen binnen een redelijke tijdspanne (bijv. 10 min.) uitgevoerd worden.

Meestal wordt de monsternaming voor bacteriologische parameters eerst uitgevoerd, daar de gebruikte apparatuur of benodigdheden reeds voorgesteriliseerd zijn. Dezelfde apparatuur (niet meer steriel na gebruik) kan dan achtereenvolgens gebruikt worden voor de (fysico-)chemische parameters.

Indien bacteriologische parameters bepaald moeten worden, ga verder naar §4.3.2.

Indien ecotoxologische parameters bepaald moeten worden ga verder naar §4.3.3.

Indien uitsluitend (fysico-)chemische parameters bepaald moeten worden ga verder naar §4.3.4. Spoel voor fysicochemische en ecotoxologische monsternaming vooraf (evt. aan de oever) de apparatuur (indien indirect bemonsterd wordt) en touw of verlengkabel met het te bemonsteren water.

4.3.2 MONSTERNAMING VOOR BACTERIOLOGISCHE ANALYSES

- 7) Gebruik uitsluitend steriele (monster)recipiënten of apparatuur voor deze monsternaming (binnen- en buitenkant steriel). Open de verpakking van een individueel verpakte steriele recipiënt net de vóór monsternaming of desinfecteer elk steriele recipiënt - dat niet langs de buitenkant steriel is - heel nauwkeurig langs de buitenkant; tot aan de onderdompeling wordt de steriele recipiënt in de binnenkant van de verpakking gelaten. Niet-steriele apparatuur kan ook ter plaatse steriel gemaakt worden door te reinigen met vochtige alcoholdoekjes of desinfectans.

Omwille van gezondheidsredenen wordt het aanbevolen om voorgeconserveerde steriele recipiënten met natriumthiosulfaat niet rechtstreeks in het te bemonsteren water te brengen.

- 8) Indien een schepstok (verlengarm) met houder of monsterkooi gebruikt wordt, wordt de onderzijde (houder en verlengarm of kooi) eveneens steriel gemaakt met alcoholdoekjes of met een desinfectans tot een hoogte van ongeveer 60 cm. Breng de recipiënt of beker aan in de houder van de schepstok/kooi. Gebruik eventueel de verpakking als een soort "handschoen" zodat de binnenkant van de verpakking en de recipiënt niet worden aangeraakt.

- 9) Verwijder de verpakking (indien van toepassing) ((open de recipiënt) en dompel de (houder of kooi met) recipiënt ondersteboven of gesloten onder tot op het gekozen monsternamepunt tot op de gestelde diepte (Tabel 1).
- 10) Open de fles/recipiënt of draai de recipiënt/scheppot. Vermijd hierbij verstoring van bodem of invloeden van (vervulde) bodem en wanden.
- 11) Hou de recipiënt schuin onder water zodat deze gevuld wordt tot aan de flessenhals (dus niet volledig vol). Sluit de monsterrecipiënt of draai om en haal op.
- 12) Giet het monster onmiddellijk over in een steriele monsterrecipiënt, indien geen directe monstername in een steriele monsterrecipiënt (binnenkant steriel) kon worden uitgevoerd(bijv. schepstok met beker).
- 13) Indien het bemonsterde water oxidanten bevat (chloor,...) dienen deze onmiddellijk na de monstername geneutraliseerd te worden met natriumthiosulfaat; voor de dosering van natriumthiosulfaat, raadpleeg §4.6.
- 14) Indien geen (fysico-)chemische en/of ecotoxicologische parameters bepaald moeten worden, ga verder naar 25).

4.3.3 MONSTERNAME VOOR ECOTOXICOLOGISCHE ANALYSES

- 15) Gebruik, indien mogelijk, dezelfde apparatuur, (maat)beker en schepstok, emmer of kooi als deze voor de monstername van de overige parameters.
Gebruik in ieder geval propere, gespoelde recipiënten en apparatuur voor deze monstername.
- 16) Breng de (maat)beker of houder met beker/recipiënt op het monsternamepunt in het water tot op de gestelde diepte (Tabel 1) en vul. Vermijd verstoring van bodem of invloeden van (vervulde) bodem en wanden.
- 17) Giet de inhoud over in het (met ~~afval~~ te bemonsteren water gespoelde, proper) monsterrecipiënt. Herhaal deze laatste stap (op hetzelfde monsternamepunt en diepte) totdat voldoende water bemonsterd werd (afhankelijk van het aantal en de aard van de uit te voeren ecotoxiciteitstesten). Let erop dat het monsterrecipiënt volledig gevuld is, zodat er geen bovenliggende luchtlaag in het recipiënt aanwezig is.
- 18) Bewaar de monsterrecipiënten koel.
- 19) Indien geen (fysico-)chemische parameters bepaald moeten worden, ga verder naar 25).

4.3.4 MONSTERNAME VOOR (FYSICO)CHEMISCHE PARAMETERS

- 20) Gebruik, indien mogelijk, dezelfde apparatuur, (maat)beker en schepstok, emmer of kooi voor de monstername als voor bacteriologische parameters.
- 21) Breng de (maat)beker of houder met beker/recipiënt op het monsternamepunt in het water tot op de gestelde diepte (Tabel 1): ondersteboven indien schepstok met beker wordt gebruikt; gesloten als een fles of monsterrecipiënt wordt gebruikt.
- 22) Open de fles/recipiënt of draai de maatbeker (schepstok) zodat deze gevuld wordt. Vermijd hierbij verstoring van bodem of invloeden van (vervulde) bodem en wanden.
- 23) Giet de inhoud over in een verzamelemmer¹⁰. Herhaal de laatste stap (op hetzelfde monsternamepunt en diepte) totdat voldoende water bemonsterd werd (ongeveer 1.5 x het volume van alle te vullen monsterrecipiënten voor deze monstername). Let erop dat de verzamelemmer niet volledig gevuld is, zodat homogenisatie met een maatbeker nog mogelijk is.

¹⁰ Tenzij de inhoud van de (maat)beker of emmer reeds voldoende is om alle monsterrecipiënten te vullen of voor enkel veldmetingen.

- 24) Voor homogeniseren van het bemonsterde water en het vullen van de verschillende monsterrecipiënten wordt verwezen naar §4.4.

4.3.5 MONSTERNAMETEMPERATUUR

- 25) Vul aansluitend een bijkomende beker of recipiënt voor het meten van de temperatuur bij de monsterneming met behulp van een digitale thermometer. Noteer de temperatuur bij de monsternaming onmiddellijk op het monsternamingsformulier; het is voornamelijk belangrijk de temperatuur zo snel mogelijk na de monsternaming gemeten en afgelezen wordt voordat deze beïnvloedt kan worden door de omgevingstemperatuur.

4.4 VULLEN VAN RECIPIËNTEN

Meestal dienen meer dan één monsterrecipiënt aan het labo bezorgd te worden, afhankelijk van het aantal te analyseren parameters of parametergroepen, waaraan al dan niet een conserveermiddel is toegevoegd. Monsterrecipiënten die een conserveermiddel bevatten mogen NIET rechtstreeks in het water gevuld worden bij het nemen van een schepmonster omwille van het basisprincipe dat er geen chemicaliën mogen toegevoegd worden aan het te bemonsteren water. Dit basisprincipe is geldig voor fysico-chemische parameters, en wordt tevens aanbevolen voor ecotoxicologische en bacteriologische parameters. Het vullen van de verschillende recipiënten wordt als volgt uitgevoerd:

- voor bacteriologische parameters wordt bij voorkeur rechtstreeks in een steriele monsterrecipiënt bemonsterd. Indien het water oxidanten bevat, worden deze onmiddellijk na monsternaming geneutraliseerd met natriumthiosulfaat (zie §4.6)
- voor fysico-chemische parameters wordt een indirecte monsternaming (m.u.v. drijfslagen) uitgevoerd door verschillende delen water (grepen) te verzamelen in een verzamelemmer (zie §4.2.2). Van hieruit worden vervolgens de verschillende monsterrecipiënten voor fysico-chemische parameter gevuld conform de richtlijnen in §4.4.2; volg hierbij de instructies m.b.t. de vulvolgorde (§4.5), conservering (§4.6) en eventuele filtraties ter plaatse bij de analyse van opgeloste bestanddelen (§4.7).
Het is niet toegelaten om monsterrecipiënten voor bacteriologische op deze wijze te vullen wegens risico op contaminatie vanuit de verzamelemmer, maatbeker of door de langere blootstelling aan de omgeving (slucht).
- Voor ecotoxicologische parameters wordt een directe of indirecte monsternaming uitgevoerd door (verschillende delen) water rechtstreeks in het monsterrecipiënt te verzamelen (§4.3.3).

Eventuele richtlijnen qua vulling (bijv. geen vrije ruimte) in WAC/I/A/010 moeten gerespecteerd worden.

Vermijd overvullen of overlopen van voorgeconserveerde monsterrecipiënten om verlies van het conserveermiddel te voorkomen. In dit geval moet steeds een nieuwe monsterrecipiënt voor de parameter(s) in kwestie gevuld worden. Zorg dus steeds voor voldoende extra monsterrecipiënten van de te analyseren parameters.

4.4.1 DIRECT: RECHTSTREEKS SCHEPMONSTER IN MONSTERRECIPIËNT

- Deze werkwijze wordt toegepast indien een directe monsternaming (voor bijv. drijfslagen, ecotoxicologische of bacteriologische parameters) wordt uitgevoerd.

- De monsterrecipiënt wordt na de monstername onmiddellijk afgesloten. De buitenzijde wordt droog geveegd alvorens transport of monsteroverdracht aan het laboratorium.

4.4.2 INDIRECT: VAN VERZAMELEMMER (ENKEL FYSICO-CHEMISCHE PARAMETERS)

- Doe propere (nieuwe) wegwerphandschoenen aan bij het homogeniseren en vullen van monsterrecipiënten.
- Het homogeniseren en vullen wordt uitgevoerd met behulp van een propere (maat)beker met uitgietsluit en handvat vanuit de verzamelemmer. Homogeniseer het verzamelmonster door zachte horizontale en verticale zwenkende bewegingen met een maatbeker in de emmer uit te voeren, zonder hierbij lucht in het water te brengen.
Het is niet toegelaten om de maatbeker te vullen en opnieuw uit te gieten in de verzamelemmer omdat op deze manier te veel lucht in het verzamelmonster wordt gebracht.
- Met behulp van de maatbeker worden de nodige recipiënten één voor één gevuld (zie vulvolgorde §4.5), waarbij elke keer dat wordt geschept, de gehele inhoud van het opvangvat weer wordt opgemengd.
Voor elk nieuw, volgend, recipiënt moet opnieuw een maatbeker vanuit het verzamelmonster gevuld worden. Bij het afvullen van identieke of gelijkaardige monsterrecipiënten (bv. zelfde conservering, monster-tegenmonster,...) worden deze direct na elkaar gevuld: voor elk recipiënt wordt een volgende maatbeker gevuld (het overblijvende gedeelte uit de maatbeker mag niet gebruikt worden om de volgende identieke of gelijkaardige recipiënt af te vullen). Het afwisselend vullen van identieke of gelijkaardige recipiënten is niet toegelaten.
- De maatbeker mag bij het vullen de hals van de monsterrecipiënt niet raken (risico op contaminatie van verzamelmonster met maatbeker vanuit het conserveermiddel dat mogelijk aan de hals kleeft).
- Hou de te vullen monsterrecipiënt nooit boven de verzamelemmer zodat bij eventueel overlopen van monsterrecipiënten met conserveermiddel, kan vermeden worden dat het verzamelmonster gecontamineerd raakt door conserveermiddel

4.5 VULVOLGORDE

Bij het vullen van de monsterrecipiënten dienen onderstaande instructies gerespecteerd te worden, **met uitzondering van ecotoxicologische, bacteriologische parameters en/of voor parameters met een monstername aan het oppervlak** (cfr. drijfslagen) genomen werden. **Hiervoor is een afzonderlijke monstername (zie §4.3.1 4.3.2, 4.3.3 en §4.4.1) voorzien voorafgaand aan de monstername voor de overige (fysico)chemische parameters.**

1. Recipiënt(en) bestemd voor vluchtige organische solventen
2. Recipiënten waarbij zuurstofinbreng de bepaling kan storen (vb BZV)
3. Recipiënt(en) zonder conserveringsreagentia

Voor pH en geleidbaarheid wordt een monsterrecipiënt gevuld voor meting in het labo, ingeval de kalibratie en/of controle van de veldmeter(s) na de monsterneming niet voldoet aan de geldende kwaliteitseisen en een meting door het laboratorium nodig is. Het vullen van deze recipiënt is overbodig indien bij elke monsterneming een controlemeting wordt gedaan.

4. Recipiënt(en) met conserveringsreagentia: ook hier dient rekening gehouden te worden met een volgorde van vullen om contaminatie van een volgend monster via de conserveringsreagentia te vermijden.

Voorbeeld: een recipiënt bestemd voor nitraatbepaling mag niet volgen op het vullen van een recipiënt met salpeterzuur. Een recipiënt metaalanalyse mag niet gevuld worden na het vullen van een recipiënt met kaliumdichromaat wegens risico op Cr-contaminatie.

5. Recipiënten voor metingen ter plaatse:

- a) geleidbaarheid: min. 50 ml water in een meetrecipiënt (indien ter plaatse gemeten)
- b) opgeloste zuurstof: min. 50 ml water in een meetrecipiënt (indien ter plaatse gemeten)
- c) vrije en gebonden chloor
- d) pH en pH-temperatuur min. 50 ml water in een meetrecipiënt (indien ter plaatse gemeten)

Er worden bij voorkeur afzonderlijke meetrecipiënten voor geleidbaarheid en pH gevuld om contaminatie via de elektrode te vermijden (externe contaminatie of via lek van de pH-elektrode). Maar indien gewenst kan het recipiënt waarin geleidbaarheid gemeten is, daarna gebruikt worden voor pH meting.

Alle handelingen bij het vullen moeten zo snel mogelijk na elkaar volgen. Het is dan ook zeker zinvol en tijdsbesparend om de volgorde van monsterrecipiënten kenbaar te maken op de recipiënten (via nummering of codering). Hierbij worden enkel door het laboratorium aangeleverde monsterrecipiënten gebruikt, die proper gestockeerd en lekdicht afgesloten zijn.

Afwijkingen m.b.t. volgorde zijn enkel toegelaten mits duidelijke motivatie ervan in het monsternemingsverslag.

4.6 CONSERVERING

- De monsters moeten, per analyseparameter of -groep, de nodige bewaar- of conserveermiddelen voor de (fysico-) chemische parameters bevatten conform WAC/I/A/010.
- Voor bacteriologische parameters worden steeds steriele monsterrecipiënten gebruikt. Indien het te bemonsteren water oxidanten bevat (chloor, broom, ozon,...), moeten de werking ervan bovendien geneutraliseerd worden met een natriumthiosulfaatpentahydraat-oplossing cfr. WAC/1/A/010. Dit kan door een nadosering onmiddellijk na de monstername: ofwel door op aseptische wijze individuele porties natriumthiosulfaat te doseren aan het watermonster van de gevulde steriele monsterrecipiënt, ofwel door overgieten van het watermonster in een voorgedoseerde steriele monsterrecipiënt met natriumthiosulfaat.
Het ter plaatse nadoseren van natriumthiosulfaat wordt aanbevolen ten opzichte van de directe monstername met recipiënten waarbij natriumthiosulfaat voorgedoseerd is. Omwille van gezondheidsredenen wordt het aanbevolen om natriumthiosulfaat niet rechtstreeks in het te bemonsteren water te brengen.
- De conservering gebeurt steeds ter plaatse. Maak voor fysico-chemische parameters bij voorkeur gebruik van voorgeconserveerde monsterrecipiënten. Het doseren van conserveermiddelen op het veld is omslachtig, moet vaak in moeilijke (weers)omstandigheden uitgevoerd worden en is bijgevolg vaak minder nauwkeurig.
- De aard en de houdbaarheid van de conserveermiddelen en/of steriliteit moet vermeld worden op de monsterrecipiënt en moet gerespecteerd worden.

4.7 FILTRATIES TER PLAATSE

Voor bepaalde (opgeloste) parameters in oppervlaktewater en afvalwater dienen watermonsters ter plaatse gefiltreerd te worden met een 0,45 µm spuitfilter. De filtratie wordt vlak voor het vullen van de monsterrecipiënt voor de opgeloste parameter in kwestie, uitgevoerd rekening houdend met de volgorde vermeld in §4.5. Het filtraat wordt onmiddellijk overgebracht in de monsterrecipiënt in kwestie.

4.8 AANDACHTSPUNTEN

Volgende voorzorgen worden in achtgenomen tijdens het nemen van een scheppmonster:

- Alle gebruikte monstername-apparatuur en monsterrecipiënten moeten steriel zijn voor microbiologische monstername, aan de binnenkant en aan de buitenkant indien deze in contact komen met het te bemonsteren water, en moeten steriel worden toegepast. De apparatuur en recipiënten worden gesteriliseerd of steriel aangekocht; vóór sterilisatie worden deze individueel verpakt. Eventueel wordt de buitenkant van moeilijk te steriliseren apparatuur langs de buitenzijde steriel gemaakt met een desinfectiemiddel net vóór de monstername.
- Vooraleer het monster genomen wordt, is het aangewezen om de monstername-apparatuur (met uitzondering van gesteriliseerde apparatuur) voor te spoelen met het te bemonsteren water. Vergeet hierbij niet het deel van het touw of verlengstuk/-stok van de apparatuur.
- De temperatuur van het water kan ook rechtstreeks in het water of bad of emmer gevuld met monster gemeten worden; het is voornamelijk belangrijk dat de temperatuur zo snel mogelijk wordt gemeten.

Volgende voorzorgen worden in achtgenomen bij het vullen van de recipiënten:

- Voor chemische, ecotoxicologische en bacteriologische parameters: leg de flessendop van een geopende monsterrecipiënt met de opening naar boven op een propere ondergrond (bijv. op adsorberend papier), zodat contaminatie vanuit de ondergrond wordt vermeden.
- Sluit elk monsterrecipiënt goed af (handgespannen en lekdicht) en controleer dit desgewenst.
- Maak de buitenkant van de monsterrecipiënten proper na het vullen.
- Zorg dat de gevulde recipiënten op de monsternamelocatie afgeschermd worden van direct zonlicht (zie verder §9).
- Breng bij metingen ter plaatse nooit een meetsonde aan in een recipiënt die bestemd is voor andere analyses.

4.9 RICHTLIJNEN M.B.T. SPECIFIEKE ANALYSEPARAMETERS

4.9.1 PFAS

Wanneer er monsternames gebeuren in het kader van PFAS-analyses, moet rekening worden gehouden met volgende richtlijnen:

- ~~Bij monstername mag enkel gebruik worden gemaakt van materialen die geen PFAS afgeven/uitlogen. In de mate van het mogelijke moet nagegaan worden (bij de leverancier / aan de hand van analyses) of het materiaal gebruikt bij monsternames voor analyse op PFAS; PFAS kan bevatten. Een overzicht van mogelijke PFAS-houdende elementen wordt in de checklist, opgenomen in de OVAM document 'richtlijn PFAS-onderzoek'(www.ovam.be); weergegeven.~~
- ~~Bij ogenblikkelijke monsternames mag enkel monstername-apparatuur worden gebruikt waarvan aangetoond is dat ze geen PFAS boven de LOQ uitlogen in het waterstaal.~~
- Elk rechtstreeks contact met het monster moet worden vermeden, dit houdt ook rechtstreeks contact van het monster met de handschoenen in. Het is bijgevolg noodzakelijk om een gereinigd hulpmiddel te gebruiken om het staal te nemen.
- Reinigen van materiaal:
 - o enkel met water van drinkwaterkwaliteit;

- bij de toepassing van reinigingsmiddel mag enkel gebruik gemaakt worden van PFAS-vrije detergents en moet grondig worden nagespoeld. ~~Het gebruik van Deconex is niet toegestaan;~~
- Waterstalen voor de analyse van PFAS worden niet gefiltreerd.
- Het gebruik van koelelementen wordt toegestaan onder de volgende voorwaarden:
 - de koelelementen vertonen geen lekken;
 - alleen harde koelelementen worden toegestaan, de flexibele koelelementen niet omdat ze een grotere kans op scheuren hebben.
- Er wordt geen beperking opgelegd in te dragen regen-, veiligheids- en andere kledij indien aan volgende voorwaarden wordt voldaan:
 - rechtstreeks contact met het staal moet worden vermeden;
 - afloop van hemelwater via de kledij in het staal moet worden vermeden;
 - ~~kledij aangewend bij staalname mag niet worden gewassen met wasverzachter.~~
- Richtlijnen met betrekking tot conservering en recipiënten zijn opgenomen in de procedure WAC/1/A/010.

5 SCHEPMONSTER VAN KOEL(TOREN)WATER M.B.T. DE ANALYSE VAN LEGIONELLA SPP.

5.1 VOORBEREIDING MONSTERNAME

- 1) Raadpleeg het stroomschema (Figuur 2) van WAC/1/A/002 om de meest aangewezen bemonsteringssituatie en -locatie m.b.t. de opvolging van *Legionella* spp. te bepalen. De voorkeur wordt gegeven aan de monstername aan een kraan na de warmtewisselaar en wordt uitgevoerd cfr. WAC/1/A/002.

Indien het nemen van een schepmonster in de gegeven situatie de meest aangewezen methode is, ga verder met 2) van deze paragraaf.
- 2) Documenteer en beschrijf het bemonsterde water, de bemonsteringssituatie (bassin, vergaarbak,...) en het gekozen monsternamepunt in het bassin van de koeltoren of in de vergaarbak van de luchtvochtigheidsbehandeling met waterinjectie (adres/lokaal of situering in productie bijv. foto, schets, GPS-coördinaten, ...) eenduidig op het monsternemingsformulier (zie §7).
- 3) Informeer bij de productieverantwoordelijke wanneer laatst gedesinfecteerd werd en rapporteer deze informatie. **De monstername is pas zinvol als deze min. 48h na de shockdosering van biocide uitgevoerd wordt¹¹.**
- 4) Voorzie een steriele monsterrecipiënt voor de analyse van *Legionella* sp. cfr. WAC/1/A/010.

Voor de analyse van *Legionella* spp. worden steeds steriele monsterrecipiënten gebruikt met 0,2 ml 1,8% natriumthiosulfaat pentahydraat oplossing voor elke 100 ml volume van de monsterrecipiënt.
- 5) Draag minimaal wegwerphandschoenen (eenmalig te gebruiken). Indien de bemonstering uitgevoerd wordt in het kader van een *Legionella* uitbraak of in besloten ruimtes met aerosolen, is het aangewezen om een ademhalingsbescherming FFP3 masker tegen aerosolen te dragen. Vermijd om in besloten ruimtes met aerosolen te treden om de monstername uit te voeren (bijv. monstername van het vallende water), maar maak – indien mogelijk – gebruik van een verlengstok of -arm waarin de monsterrecipiënt geplaatst kan worden.

¹¹ Indien enkel een continue dosering van biocide wordt uitgevoerd, is deze termijn niet van toepassing.

- 6) Gebruik uitsluitend steriele (monster)recipiënten of apparatuur voor deze monsternamen. Niet-steriele apparatuur kan ter plaatse steriel gemaakt worden door te reinigen met vochtige alcoholdoekjes of desinfectans.
- 7) Indien het de monsternamen van een koeltoren betreft: ga verder naar §5.2.
Indien het de monsternamen van een luchtvochtigheidsbehandeling met waterinjectie betreft: ga verder naar §5.3.

5.2 MONSTERNAME VAN EEN KOELTOREN M.B.T. DE ANALYSE VAN *LEGIONELLA* SPP.

- 8) Indien een schepstok (verlengarm) met houder of monsterkooi gebruikt wordt, wordt de onderzijde (houder en verlengarm of kooi) eveneens steriel gemaakt met alcoholdoekjes of met een desinfectans tot een hoogte van ongeveer 60 cm. Breng de recipiënt of beker aan in de houder van de schepstok/kooi.
- 9) Dompel de (houder of kooi met) recipiënt ondersteboven, of gesloten, onder op het gekozen monsternamenpunt. Het monsternamenpunt moet minstens 1 m van de kant/zijwand liggen, en bij de monsternamen wordt een diepte tussen -10 en -30 cm onder het wateroppervlak aangehouden.
- 10) Open de fles/recipiënt of draai de recipiënt/scheppot. Vermijd hierbij verstoring van bodem of invloeden van (vervuilde) bodem en wanden.
- 11) Hou de recipiënt schuin onder water zodat deze gevuld wordt tot aan de flessenhals (dus niet volledig vol). Sluit de monsterrecipiënt of draai om en haal op.
- 12) Giet het monster onmiddellijk over in een steriele monsterrecipiënt, indien geen directe monsternamen in een steriele monsterrecipiënt (binnenkant steriel) kon worden uitgevoerd (bijv. schepstok met beker).

Indien het bemonsterde water oxidanten bevat (chloor,...) dienen deze onmiddellijk na de monsternamen geneutraliseerd te worden met natriumthiosulfaat cfr. WAC/1/A/010; voor de dosering van natriumthiosulfaat, raadpleeg §4.6.
- 13) Ga verder naar 15).

5.3 MONSTERNAME VAN EEN LUCHTVOCHTIGHEIDSBEBANDELING MET WATER-INJECTIE M.B.T. DE ANALYSE VAN *LEGIONELLA* SPP.

- 14) Bemonster de vergaarbak van de luchtvochtigheidsinstallatie:
 - Indien de waterhoogte in de vergaarbak meer dan 20 cm bedraagt, wordt een scheppmonster genomen zoals beschreven in §5.2 (punt 8) t.e.m. 12)). Voor waterhoogtes net boven 20 cm, moet hier mogelijk een aangepaste kleinere scheppot of -beker gebruikt worden zodat de bodem niet geraakt of verstoord kan worden door de monsternamen.
 - Indien de waterhoogte in de vergaarbak minder dan 20 cm bedraagt, moet de monsternamen uitgevoerd worden met een hand- of peristaltische pomp (2.1.5), waarbij de aanzuigdarm in het midden van de totale waterhoogte wordt gepositioneerd:
 - i. Zorg ervoor dat het onderste deel van de buitenzijde van de aanzuigdarm, alsook de binnenzijde van de aanzuigdarm en/of alle delen van de pomp waarmee het bemonsterde water in contact komt, steriel zijn of gedesinfecteerd worden voor de monsternamen.

- ii. Positioneer de aanzuigdarm van de pomp in het midden van de totale waterhoogte in de vergaarbak. Vermijd hierbij de (vervuilde) bodem en wanden van de vergaarbak.
- iii. Start de aanzuiging van de pomp en laat het water in een steriele monsterrecipiënt lopen. Indien het bemonsterde water oxidanten bevat (chloor,...) dient deze monsterrecipiënt voor- of nageconserveerd te worden met natriumthiosulfaat cfr. WAC/1/A/010.

Ga verder naar 15).

5.4 MONSTERNAMETEMPERATUUR EN (FACULTATIEVE) PH-METING

15) Vul aansluitend een bijkomende beker of recipiënt voor het meten van de temperatuur bij de monsterneming met behulp van een digitale thermometer.

Noteer de temperatuur bij de monsternam onmiddellijk op het monsternemingsformulier; het is voornamelijk belangrijk dat de temperatuur zo snel mogelijk na de monsternam gemeten en afgelezen wordt voordat deze beïnvloedt kan worden door de omgevingstemperatuur.

16) Het meten van de pH van het koel(toren)water wordt aanbevolen (zie WAC/1/A002 §3 **Fout! Verwijzingsbron niet gevonden.** .

Neem hiervoor aansluitend een nieuw scheppmonster en vul een meetrecipiënt voor pH (of meet rechtstreeks in het te bemonsteren water of scheppmonster). Noteer de pH

17) Vervolledig de nodige veldregistraties cfr. §7.

6 METINGEN TER PLAATSE

Voor de metingen ter plaatse wordt verwezen naar WAC/I/A/011.

7 VELDREGISTRATIES

Bij elke monsternam van water worden ter plaatse veldregistraties gemaakt. Dit kan bijvoorbeeld door gebruik te maken van een 'monsternemingsformulier'.

Een voorbeeld van monsternemingsformulier is toegevoegd in Bijlage 1.

Volgende gegevens dienen minimaal geregistreerd te worden bij de monsterneming:

- identificatie van de monsternemer
- datum en uur van de monsternam
- identificatie/omschrijving/schets van de monsternamelocatie (naam zwembad/vijver/stroom, plaatsnaam,...) en monsternamepunt (eventueel foto). GPS-coördinaten zijn verplicht bij de monsternam van oppervlaktewater.
- (weers-)omstandigheden waarbij bemonsterd werd en/of vlak voor de monsternam (bijv. regen, bewolkt, zon,...), tijdstip laatste shockdosing van biocide¹² (indien van toepassing)

¹² Enkel indien koel(toren)water of luchtvochtigheidsbehandeling met waterinjectie bemonsterd worden m.b.t. analyse van *Legionella* sp.

- methode van de bemonstering, inclusief beschrijving van gebruikte apparatuur en uitgevoerde handelingen
- temperatuur van het water bij de monsterneming
- resultaten van metingen ter plaatse (indien van toepassing)
- aantal recipiënten en de gegevens die noodzakelijk zijn voor het identificeren van de monsters zoals vermeld op het etiket
- afwijkingen t.o.v. deze procedure en de reden van de afwijkingen
- eventuele opmerkingen en/of (omgevings-)omstandigheden die de monsterneming kunnen beïnvloeden (bijv. aanwezigheid van zwemmers/baders bij de monsterneming van zwembaden of recreatiewaters).

8 RAPPORTERING

Van elke monsterneming dient een monsternamerverslag conform WAC/VI/A/004 opgemaakt te worden.

Naast de nodige gegevens cfr. §5 van WAC/VI/A/004, moet het monsternemingsverslag minimum volgende gegevens bevatten:

- identificatie/omschrijving/schets monsternamepunt (eventueel foto)
- (weers-)omstandigheden waarbij bemonsterd werd en/of vlak voor de monsterneming (bijv. regen, bewolkt, zon,...) [niet voor indoor monsternames], documentatie (tijdstip) laatste shockdosering¹² (indien van toepassing)
- temperatuur van het water bij de monsterneming
- eventuele opmerkingen en/of (omgevings-)omstandigheden die de monsterneming kunnen beïnvloeden (bijv. aanwezigheid van zwemmers/baders bij de monsterneming van zwembaden of recreatiewaters, aanwezigheid en tijdstip van toevoegen van biociden bij koeltorenwater), incl. motivatie bij afwijken.

9 TRANSPORT

De maximale bewaartermijnen van watermonsters conform WAC/I/010 zijn van toepassing vanaf het tijdstip (datum/uur) van de monsterneming. De monsters dienen dan ook tijdig aan het analyselaboratorium geleverd te worden zodat de houdbaarheid gerespecteerd kan worden.

Elke blootstelling aan licht en hitte moet te allen tijde vermeden worden. Gekoeld transport van monsters dient gegarandeerd te zijn door gebruik te maken van koelboxen met voldoende koelelementen of een koelinstallatie. Tijdens het transport mag de temperatuur van een monster¹³ zeker niet stijgen. Monsters met een hoge temperatuur worden hierbij fysisch gescheiden van koele monsters.

Het is zeker zinvol om via een logger het temperatuursverloop tijdens het transport te registreren.

¹³ Monsters met een temperatuur lager dan 8°C mogen tijdens transport tot maximaal 8°C opwarmen.

10 REFERENTIES

- WAC/I/A/002, Ogenblikkelijke monstername (aan kraan) van water
- WAC/I/A/004, Tijds- en/of debietsgebonden monstername van afvalwater
- WAC/I/A/010, Conservering en behandeling van watermonsters
- WAC/I/A/011, Meting ter plaatse van temperatuur, pH, elektrische geleidbaarheid, opgeloste zuurstof, vrije chloor en gebonden chloor
- CMA/1/A.16, Monsterneming - Afvalstoffen en secundaire grondstoffen - Monsternemingstechnieken vloeistoffen
- NBN EN ISO 5667-1:2007, Water quality - sampling Part 1: Guidance on the design of sampling programmes and sampling techniques.
- NBN EN ISO 5667-3:2018, Water quality — Sampling — Part 3: Preservation and handling of water samples
- NBN EN ISO 5667-4:2019, Water quality- sampling Part 4: Guidance on sampling of lakes, natural and man-made
- NBN EN ISO 5667-6:2016 + /A11:2020, Water quality - Sampling -Part 6: Guidance on sampling of rivers and streams
- NBN EN ISO 5667-10:2021, Water quality - sampling - Part 10: Guidance on sampling of waste water
- NPR 8066:2010, Water - Monsterneming stilstaand afvalwater
- NEN 6600-3:2010, Water - Monsterneming - Deel 3: Zwembadwater

11 BIJLAGEN

BIJLAGE A: VOORBEELDEN VAN EEN MONSTERNEMINGSFORMULIER (INFORMATIEF)

MONSTERNEMINGSFORMULIER SCHEPPMONSTER

(OPPERVLAKTWER, AFVALWATER, GRONDWATER, KOELWATER, PROCESWATER, EXCL. ZWEMBAD)

Algemeen – omschrijving opdracht			
Monsternemer: _____			
Tijdstip monsternamen: datum _____ uur: _____			
Monstercode: _____			
Monsternameloctie: _____			
Aanwezige personen: _____			
Type water/monsternamen:			
☐ oppervlaktewater(OW) Indien oppervlaktewater:	☐ afvalwater (AW)	☐ koelwater	☐ andere: _____
☐ recreatiewater Toegankelijkheid OW:	☐ stilstaand	☐ stromend	☐ andere: _____
☐ oeverkant	☐ doorwaden	☐ brug	☐ boot
☐ andere: _____			
Monsternamelpunt: (zie ook schetsfoto in bijlage) _____			
GPS-coördinaten:			
Schets + aanduiding staalname punt *:			
Oppervlaktewater:			
☐ diepte 1 tot 1.5m	☐ lozingspunt	☐ mengpunt / turbulentie	☐ in-/uitstroom (vers) water
☐ andere: _____			
Afvalwater:			
☐ meetinrichting	☐ afvoerbuis	☐ in en/of uitlaat WZS	☐ andere: _____
Koelwater:			
☐ vergaarbassin koeltoren	☐ vergaarbak luchtvochtigheidsbehandeling	☐ andere: _____	☐
Beschrijving oppervlak:			
☐ drijfslaag (cfr. olie) Oppervlaktelaag verwijderd?	☐ zichtbare verontreinigingen ☐ ja ☐ nee	☐ plantaardig (bladeren...)	☐ andere: _____
Weers-/omgevingsomstandigheden (schrapen wat niet past):			
wel/geen neerslag, wel/niet bewolkt, buitentemperatuur _____ °C, wind? _____,			
turbiditeit? _____, stroomsnelheid? _____, waterplanten? _____, andere? _____			
bezetting: ☐ baders ☐ vaartuigen ☐ andere: _____			

Monsterneming			
Monsternamemethode WAC/1/A/003 <i>(beide of combinatie is mogelijk)</i> :			
☐ oppervlaktelaag	☐ direct (bact.)	☐ indirect (chem.)	☐ andere: _____
Monsternamemethode <i>(meerdere keuzes zijn mogelijk)</i> :			
☐ monsterrecipiënt	☐ schepstok + monsterrec.	☐ schepstok + beker	☐ maatbeker met handvat
☐ emmer (+ touw)	☐ hand- of peristaltische pomp	andere: _____	
Desinfecteren monsternamemethoden:			
☐ niet van toepassing	☐ sterilisatie labo	☐ thermisch (flamberen)	☐ chemisch: _____ (specificeer desinfectans)
☐ andere: _____			
Diepte monsterneming			
☐ oppervlak	☐ tussen -10 en -30 cm	☐ ander: _____	
Afwijkingen: _____			
Opmerkingen: _____			
Monsterrecipiënten			
Aantal gevulde recipiënten: _____			
Recipiënten			
☐ steriel	☐ niet steriel		
Conservering (neutralisatie) bacteriologische parameters			
☐ nvt (OW)	☐ 1 ml/l 1.8% natriumthiosulf.	☐ 2 ml/l 1.8% natriumthiosulf.	☐ ander: _____
Opmerkingen: _____			
Metingen ter plaatse			
Parameter: pH :	_____	Parameter: _____:	_____
Parameter: _____:	_____	Parameter: _____:	_____
Parameter: _____:	_____	Parameter: _____:	_____
Parameter: _____:	_____	Parameter: _____:	_____
Transport en overdracht			
☐ monsternemer	☐ opdrachtgever	☐ extern: _____	☐ andere: _____
☐ gekoeld	☐ niet-gekoeld	☐ ijswater	☐ andere: _____
Overdracht monsters aan: _____			
Datum/uur: _____		Handtekening: _____	
Opmerkingen: _____			

MONSTERNEMINGSFORMULIER SCHEPMONSTER (ZWEMBADEN)

Monsternemer: _____

Tijdstip monstername: datum _____ uur: _____

Monstercode: _____

Algemeen – omschrijving opdracht

Monsternamelocatie: _____

Monsternamepunt:
(zie ook schets/foto in bijlage) _____

GPS-coördinaten (fac.): _____

Bezetting zwembad: ☐ geen baders ☐ _____ (aantal) baders tijdens monstername

Schets + aanduiding
staalname punt *:

Type water:
☐ zwembadwater ☐ andere: _____

Type zwembad:

☐ overdekt, circul. ☐ niet-overdekt circulatie ☐ plonsbad ☐ therapiebad
☐ dompelbad ☐ hot whirlpool ☐ therapiebad ☐ andere: _____

Indien niet-overdekt: weersomstandigheden *(schrappen wat niet past)*:
wel/geen neerslag, wel/niet bewolkt, buitentemperatuur _____ °C, wind? _____, andere? _____

Monsterneming

Monsternamemethode WAC/1/A/003 *(beide of combinatie is mogelijk)*:

☐ direct ☐ indirect ☐ andere: _____

Monstername-apparatuur *(meerdere keuzes zijn mogelijk)*:

☐ monsterreceptiënt ☐ schepstok + monsterrec. ☐ schepstok + beker ☐ maatbeker met handvat
☐ andere: _____

Desinfecteren monsternamebenodigheden:

☐ niet van toepassing ☐ sterilisatie labo ☐ thermisch (flamberen) ☐ chemisch: _____
(specificeer desinfectans)
☐ andere: _____

Diepte monstername: ☐ tussen -10 en -30cm ☐ ander: _____

Afwijkingen: _____

Opmerkingen: _____

Monsterrecipiënten

Aantal gevulde recipiënten per monstername: _____

Recipiënten

☐ steriel ☐ niet steriel ☐ _____

Conservering (neutralisatie) bacteriologische parameters

☐ 1 ml/l 1.8% natriumthiosulfaat ☐ 2 ml/l 1.8% natriumthiosulf. ☐ _____

Opmerkingen: _____

Waarnemingen

Helderheid : _____ Schuim: _____

Zichtbare verontreinigingen: _____ Kleur : _____

Geur: _____ Andere: _____

Metingen ter plaatse

Parameter: Temp. : _____ °C Parameter totaal Cl : _____ mg/l

Parameter: pH : _____ Parameter gebonden Cl : _____ mg/l

Parameter: pH temp : _____ °C Parameter : _____

Parameter: vrij beschikb. Cl : _____ mg/l Parameter : _____

Transport en overdracht

Transport:

☐ monsternemer ☐ opdrachtgever ☐ extern: _____ ☐ andere: _____

☐ gekoeld ☐ niet-gekoeld ☐ ijswater ☐ andere: _____

Overdracht monsters aan: _____

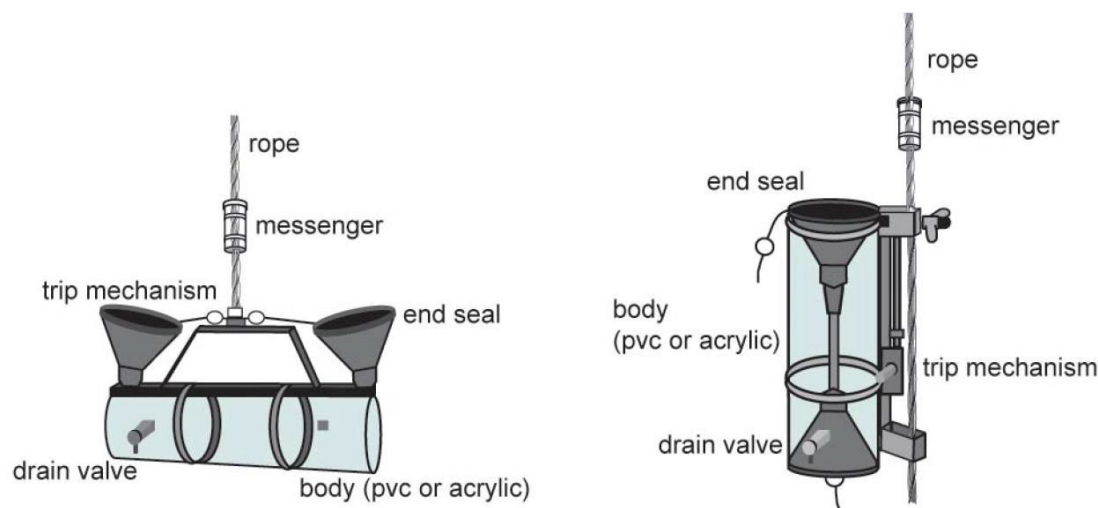
Datum/uur: _____ Handtekening: _____

Opmerkingen: _____

BIJLAGE B: VOORBEELDEN VAN GESPECIALISEERDE APPARATUUR VOOR MONSTERNEMING: CILINDRISCH MONSTERNAMETOESTEL (CMT, INFORMATIEF)

Een cilindrisch monsternametoestel bestaat uit een centraal cilindrisch recipiënt dat met kleppen onder water kan worden afgesloten. In de handel wordt een onderscheid gemaakt tussen CMT's voor respectievelijk horizontale (e.g. Van Dorn toestel met horizontale opstelling) en verticale (e.g. vloeistoflagenmonsternemer, multisampler, Van Dorn toestel met verticale opstelling Kemmerer staalnametoestel, bailer).

CMT's zijn geschikt voor monsternameting op welbepaalde diepten en bij de aanwezigheid van drijfslagen.



Voorbeelden van cilindrische monsternametoestellen: Van Dorn monsternametoestel met horizontale (links) en verticale opstelling (rechts)

B.1 Verticale CMT - vloeistoflagenmonsternemer

Verticale CMT's worden toegepast voor bemonstering van stilstaand water waarbij op een welbepaalde diepte een deel van de waterkolom moet worden bemonsterd. Deze methode is echter niet geschikt in ondiepe oppervlakte wateren (diepte <80 cm) omwille van het mogelijk opwervelen van sediment.

Een vloeistoflagenmonsternemer bestaat uit een open teflon buis die aan de onderzijde kan afgesloten worden met een stop. Dit afsluitsysteem kan bediend worden door een stang of een kabel.

B.1.1 Stangbediende vloeistoflagenmonsternemer

De stangbediende vloeistoflagenmonsternemer is geschikt voor het bemonsteren van vaten en ondiepe vloeistofrecipiënten (diepte tot 90% van de lengte van de vloeistoflagenmonster). Het apparaat is opgebouwd uit een roestvaststalen stang met onderaan een stop. Over de stang en dop past een teflon monsternametoestelbuis.

Voor monsternemingen op grotere diepten is de kabelbediende uitvoering aangewezen.

Monsterneming over gehele diepte

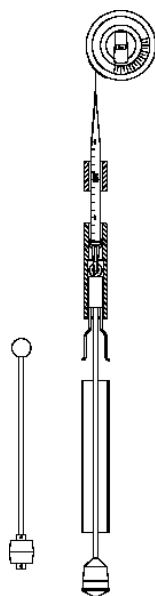
- De stang (zonder monsternamebuis) wordt met de dop naar onder naar beneden gelaten.
- De buis wordt over de stang langzaam in de vloeistof naar beneden geduwd. Op deze manier wordt een monster genomen over de gehele diepte.
- Vervolgens drukt men de buis vast op de onderstop.
- De gevulde vloeistoflagenmonsternemer kan nu voorzichtig opgehaald worden. (Eventueel wordt de buitenkant van de buis schoongemaakt met absorberend papier.)
- Om het staal te verzamelen wordt de onderkant van de buis in een monsterrecipiënt geplaatst. De buis wordt van de onderstop getrokken, zodat de vloeistof in de monsterfles kan lopen.

Monsterneming op specifieke diepte

- De buis wordt vooraf vastgedrukt op de stang met onderstop.
- De afgesloten buis laat men in de vloeistof zakken tot op de gewenste diepte (bijvoorbeeld midden van een laag). Op deze diepte wordt de buis omhoog getrokken, zodat de buis loskomt van de stop. De buis vult zich met vloeistof van die specifieke diepte.
- Na afsluiten van de buis, kan de gevulde vloeistoflagenmonsternemer opgehaald worden. (Eventueel wordt de buitenkant van de buis schoongemaakt met absorberend papier.)
- Om het staal te verzamelen wordt de onderkant van de buis in een monsterrecipiënt geplaatst. De buis wordt van de onderstop getrokken, zodat de vloeistof in de monsterfles kan lopen.

B.1.2 Kabelbediende vloeistoflagenmonsternemer

Het grote verschil met de stangbediende uitvoering is dat de (teflon) monsternamebuis van de kabelbediende vloeistoflagenmonsternemer bovenaan vastgehouden wordt door een clip. Aan de centrale stang is een teflon gecoate staaldraad bevestigd waarmee het toestel op de gewenste diepte kan gebracht worden. Eens op de gewenste diepte wordt een “boodschapper” naar beneden gelaten. Deze valt op een “ontvanger” waardoor de clip samenknijpt. De monsternamebuis wordt hierdoor van de clip verwijderd en valt op de onderste stop. Op dit moment is het monster ingesloten en kan het gevulde apparaat naar omhoog getrokken worden. Dit type wordt gebruikt om diepere opslageenheden of stilstaande waters te bemonsteren (maar ook peilbuizen bijvoorbeeld) op elke willekeurige diepte.



- Laat de vloeistoflagenmonsternemer met behulp van de kabel zakken tot op de gewenste hoogte. De vloeistof stroomt onderaan in de monsternamebuis.

- Op de gewenste hoogte wordt de boodschapper naar beneden gelaten. Hierdoor komt de clip los van de buis, en valt de buis op de onderste stop. Op dat moment is het monster ingesloten.
- Haal de vloeistoflagenmonsternemer rustig op.
- Eventueel wordt de buitenkant van de buis schoongemaakt met absorberend papier.
- Om het staal te verzamelen wordt de onderkant van de buis in een monsterrecipiënt geplaatst. De buis wordt van de onderstop getrokken, zodat de vloeistof in de monsterfles kan lopen.

B.2 Horizontale CMT - vloeistoflagenmonsternemer

Horizontale CMT's worden aangewend voor staalname van oppervlaktwater waar stroming aanwezig is. Dit toestel is zeer geschikt voor staalname van zwevende stof met een partikelgrootte > 200 µm.

Procedure voor het nemen van een verzamelmonster

INHOUD

1	Doel en toepassingsgebied	4
2	Definities	4
3	Principe	6
3.1	<i>Debietsgebonden monsternamen</i>	6
3.2	<i>Tijdsgebonden monsternamen</i>	7
3.3	<i>Gebeurtenisgebonden monsternamen (facultatief)</i>	7
4	Apparatuur, materiaal en benodigdheden	7
4.1	<i>Automatisch monsternametoestel</i>	7
4.2	<i>Materiaal en benodigdheden</i>	9
4.3	<i>Oplossingen en reagentia</i>	10
5	Monsternamen van afvalwater	10
5.1	<i>Algemene afspraken m.b.t. tijds- of debietsgebonden monsternamen</i>	10
5.2	<i>Monsternamenlocatie en -punt</i>	11
5.2.1	<i>Open systeem voor afvalwater</i>	11
5.2.2	<i>Gesloten systeem voor afvalwater</i>	11
5.3	<i>Installatie apparatuur</i>	12
5.4	<i>Afronden monsternamen cyclus</i>	13
5.5	<i>Specifieke eisen voor het uitvoeren van een tijd- of debietsgebonden monsternamen in het kader van heffingscampagnes voor lozen van afvalwater</i>	14
5.6	<i>Richtlijnen m.b.t. specifieke analyseparameters</i>	15
5.6.1	<i>PFAS</i>	15
6	Kwaliteitscontrole	15
6.1	<i>Controle van het ingestelde deelmonstervolume</i>	16
6.2	<i>Controle van het werkelijk t.o.v. het theoretisch volume van het verzamelmonster</i>	16
6.3	<i>Controle van de omgevingstemperatuur van het monsterverzamelvat</i>	16
7	Deelmonsternamen en vullen van recipiënten	17
7.1	<i>Verzamelmonster, homogeniseren en deelmonsternamen</i>	17
7.2	<i>Vulvolgorde</i>	17
7.3	<i>Conservering</i>	17
8	Metingen ter plaatse	18
9	Veldregistraties	18
10	Rapportering	18

11	Transport monsters	19
12	Onderhoud	19
13	Referenties	20

1 DOEL EN TOEPASSINGSGEBIED

Deze procedure beschrijft het nemen van een tijds-, debiets- of gebeurtenisgebonden verzamemonster van afvalwater (afkomstig van bedrijven en rioolwaterzuiveringsinstallaties) en oppervlaktewater, inclusief het verdelen, de conservering, het transport en de metingen ter plaatse.

De methode is toepasbaar bij monsternamen in open en gesloten systemen voor afvalwater.

Deze methode kan worden toegepast in het kader van heffingscampagnes voor het lozen van afvalwater. In dat geval moet er rekening gehouden worden met de specifieke eisen en voorwaarden bij de uitvoering, zoals opgelijst in 5.5.

De principes in deze methode kunnen als basis dienen voor het nemen van een verzamemonster van oppervlaktewater.

Een debietsgebonden monsternamen is in feite een volumeproportionele monsternamen, waarbij de debietmeting onderdeel uitmaakt van de opgezette monsternamencampagne. Om een voldoende betrouwbare debietmeting te garanderen wordt hiervoor verwezen naar de instructies in WAC/I/A/012.

2 DEFINITIES

- **Verzamemonster:** monster bestaande uit een aantal deelmonsters, gelijk in volume, die gedurende een monsternamencyclus door een monsternametoestel worden genomen, en dit telkens na een bepaalde monsternamepauze. Afhankelijk van de aard van de aansturing van het monsternametoestel worden volgende verzamemonsters onderscheiden:
 - volumeproportionele (of debietsgebonden) monsternamen: het nemen van monsters na een vaste doorstroomde of geloosde volume-eenheid water. Het monsternamensysteem is hierbij gekoppeld aan een voorziening voor het meten van de volumestroom (debietmeter). Deze geeft een stuurpuls aan het monsternametoestel per vast volume gepasseerd water (monsternemingspauze), waardoor telkens een deelmonster genomen wordt.
 - tijdsproportionele (of tijdsgebonden) monsternamen: het nemen van monsters na een vast tijdsinterval. Het monsternamensysteem wordt hierbij aangestuurd door een (puls)signaal van een tijdsklok. De frequentie van het signaal is afhankelijk van het vooraf ingestelde tijdsinterval (monsternemingspauze).
 - Gebeurtenis- (of event)gebonden monsternamen: de start van de monsternamen is getriggerd door een extern signaal, bijv. na een pompaanslag, na een signaal van een pluviometer, een pH-meter,... , waarna een monster of een reeks van monsters genomen wordt. Dit kan een variatie op een tijds- of debietsgebonden monsternamen zijn.
- **Gesloten systeem:** meetsysteem dat het debiet meet in een gesloten leiding of in een gesloten drukleiding, waarbij het water niet in contact staat met de buitenlucht (bijv. gesloten controle-inrichting voor afvalwater waarin een elektromagnetische debietmeter is geïnstalleerd).

- **Open systeem** (synoniem 'open kanaal'): systeem waarbij het oppervlak van het stromend water in direct contact staat met de omgevingslucht (bijv. een open controle-inrichting voor het lozen van afvalwater waarin een meetgoot of een meetschot geïnstalleerd is).
- **Meetgoot** (synoniem venturi): een betonnen, metalen of kunststoffen constructie waarbij de goot een kunstmatige vernauwing van de zijwanden vertoont, al dan niet met een ingebouwde verhoging of verdieping van de bodem ter plaatse van de vernauwing waardoor kritische stroming wordt teweeg gebracht om debieten te kunnen meten. Meetgoten worden onderverdeeld volgens de vorm van de bodem in de meetgoot (bijv. vlak, parabolisch,...), alsook van het profiel.
- **Meetschot**: vlakke plaat met een uitsparing, die dwars in het afvoerkanaal (meetput) wordt geplaatst. Het water wordt hierdoor opgestuwd en stroomt door een uitsparing van het schot weg. Het waterniveau voor het schot is evenredig met het doorstromende debiet.
- **Verzamelmonster**: samengesteld monster dat wordt verkregen door (deel)monsters, die op meer plaatsen of op meerdere tijdstippen (zelfde plaats) zijn genomen, te mengen.
- **Deelmonster**: enkelvoudig monster met een vast volume dat door een automatisch monsternametoestel wordt genomen.
- **Monsternametoestel**: (automatisch) apparaat waarmee het monster wordt genomen, inclusief leidings- en besturingssysteem.
- **Monsternamecyclus**: vaste periode waarbinnen een verzamelmonster wordt samengesteld (voor afvalwater meestal in een cyclus van 24 h).
- **Monsternamecampagne**: er kan afhankelijk van het geloosde water een meerdaagse (bijv. drie- of vijf- daagse) campagne uitgevoerd worden met meerdere opeenvolgende monsternamecycli (bijv. drie of vijf monsternamecyclussen).
- **Monsterverzamelvat**: opvangrecipiënt(en) voor alle deelmonsters binnen één monsternamecyclus. Een monsternametoestel is meestal voorzien van een automatische wisselaar die ervoor zorgt dat deelmonsters van een nieuwe (aansluitende) monsternamecyclus in een volgende monsterverzamelvat terechtkomen.
- **Debietmeter**: meter waarmee (bijvoorbeeld door middel van druk of ultrasoon) het debiet gemeten wordt.

3 PRINCIPE

Een **verzamelmonster** van het te onderzoeken water wordt samengesteld uit een aantal eenvoudige **deelmonsters** die gedurende een vastgelegde **monsternamecycle** (doorgaans 24 h) door een automatisch monsternametoestel worden genomen. Er bestaan verschillende manieren om via dit principe tot een verzamelmonster te komen:

- volumeproportioneel (**debietsgebonden**),
- tijdsproportionele (**tijdsgebonden**) monsternamename, of
- **gebeurtenisgebonden** monsternamename (facultatief)

Vaak worden er **meerdaagse monsternamecampagnes** opgezet, die bestaan uit meerdere monsternamecycli (bijv. 3- of 5 daagse campagne).

Een (eenvoudig) *deelmonster voor afvalwater* bedraagt **minimaal 50 ml** (de representativiteit van het deelmonster is beter indien het deelmonster groter is, bijv. 100 à 300 ml). In principe wordt de representativiteit van het uiteindelijke verzamelmonster beter als het aantal deelmonsters groter is. Voor een *verzamelmonster van afvalwater* wordt gestreefd naar (minstens) 100 deelmonsters, met een minimum van **50 deelmonsters**, voor zover dit technisch mogelijk is. Indien noodzakelijk kan hiervan gemotiveerd afgeweken worden.

De deelmonsters worden opgevangen in één of meerdere monsterverzamelvaten. Per monsternamecycle (doorgaans 24 h voor afvalwater) wordt het verzamelmonster na homogenisatie afgevuurd in de nodige recipiënten voor analyse (zie WAC/I/A/010). Het monsternametoestel heeft een automatische monstervisselaar, die zo ingesteld is dat na afloop van de ingestelde monsternamecycle, gewisseld wordt naar een volgend verzamelvat, en aansluitend een volgende monsternamecycle kan gestart worden.

Dit principe kan ook toegepast worden voor het nemen van een verzamelmonster van oppervlaktewater. Afhankelijk van het doel en/of het regelgevende kader waarbinnen de monsternamename uitgevoerd wordt, kan de duur van een monsternamecampagne, -cyclus, en/of -pauze, alsook het volume van een deelmonster¹ en van het verzamelmonster, verschillen.

3.1 DEBIETSGEBONDEN MONSTERNAME

Het monsternametoestel wordt in dit geval gekoppeld aan een debietmeter met integrator. Dit kan een 'eigen' debietmeter zijn (geïnstalleerd door het laboratorium), of een reeds geïnstalleerd debietmeter van de opdrachtgever (bedrijf waar de monsternamename wordt uitgevoerd).

De integrator zorgt ervoor dat het meetsignaal van de debietmeter omgezet wordt in een telsignaal (bijv. 1 puls per m³).

De debietmeter geeft een stuurpuls aan het monsternametoestel telkens een vast volume de debietmeter passeert, waarna het monsternametoestel een deelmonster neemt met een vast (ingesteld) volume. Het monsternametoestel, of de debietmeter, is voorzien van een zogenaamde "pulsdeler", waarmee na een vooraf ingestelde serie pulsen, een deelmonster worden genomen.

¹ Voor oppervlaktewater is er geen eis m.b.t. het minimale deelmonstervolume

3.2 TIJDSGEBONDEN MONSTERNAME

Bij tijdsgebonden monstername wordt het automatische monsternametoestel gestart door een signaal van een tijd klok die met vaste tijdsintervallen het startsignaal afgeeft. Het volume van het deelmonster en van het tijdsinterval tussen 2 deelmonsters worden ingesteld. In deze situatie geldt eveneens dat de representativiteit beter is als het aantal deelmonsters groter is. Het tijdsinterval tussen 2 deelmonsters moet groot genoeg zijn, om de benodigde tijd tussen het opzuigen en overbrengen in het monsterverzamelvat, te kunnen overbruggen.

3.3 GEBEURTENISGEBONDEN MONSTERNAME (FACULTATIEF)

Bij deze monstername wordt de start ervan geïnitieerd door een extern signaal, waarna één monster of een reeks van monsters genomen wordt. Dit kan een variatie op een tijd- of debietgebonden monstername zijn, bijv. na een pompaanslag, na een signaal van een pluviometer, een pH-meter,...

Dit type monstername wordt toegepast wanneer monstername gewenst is na optreden van een bepaalde gebeurtenis. Een voorbeeld hiervan is de monstername bij een discontinuë aanvoer van water: door de monstername te koppelen aan de werking van de pomp (pompaanslag in dit geval), kan de monstername uit stilstaand water vermeden worden.

4 APPARATUUR, MATERIAAL EN BENODIGDHEDEN

4.1 AUTOMATISCH MONSTERNAMETOESTEL

Het laboratorium moet kunnen beschikken over (een) automatisch(e) monsternametoestel(len), die geschikt zijn om volume- en/of tijdsproportionele monsternames met een uitgestelde starttijd te kunnen programmeren.

Voor een volumeproportionele (debietsgebonden) monstername moet het monsternametoestel gekoppeld kunnen worden aan een aantoonbaar betrouwbare debietmeting. Hierbij moeten de eisen en kwaliteitscontroles m.b.t de debietmeter en de debietmeting zelf, zoals opgenomen in WAC/I/A/012, opgevolgd worden.

Voor het uitvoeren van een gebeurtenisgebonden monstername (facultatief) moet het toestel gekoppeld kunnen worden aan het extern signaal waardoor de monstername getriggerd moet worden.

Het laboratorium moet kunnen beschikken over een automatisch monsternametoestel dat geschikt is voor monsternames van drukleidingen in gesloten systemen (indien relevant in klantenportefeuille). Het monsternametoestel moet in dat geval rechtstreeks of via een klep/ventiel, aan het leidingsysteem gekoppeld kunnen worden.

Het monsternametoestel en hulpmiddelen (zoals aanzuigleidingen, vaten, maatbekers) dienen zoveel mogelijk te bestaan uit materialen die inert zijn ten aanzien van de te analyseren component(en). Het toestel zelf moet bestaan uit een robuuste en eenvoudige constructie, die eenvoudig verplaatst en onderhouden kan worden, en voldoende bestand is tegen de heersende weersomstandigheden.

Indien gebruik gemaakt wordt van een monsternametoestel van derden, moet het laboratorium kunnen aantonen dat de gebruikte apparatuur technisch geschikt is, en voldoende onderhouden is.

Het monsternametoestel dient verder:

- te beschikken over een instelbaar deelmonstervolume (over een minimaal bereik van 50 tot 150 ml);
- te beschikken over een instelbaar tijdsinterval tussen 2 deelmonsters (minstens 5 tot 30 minuten);
- deelmonsters te kunnen nemen met een herhaalbaarheid van maximaal 5%;
- te beschikken over een inwendige diameter van min. 9 mm voor alle doorstromende delen het monsternamesysteem (van aanzuigpunt tot opvangrecipiënt);
- te beschikken over één of meerdere monsterverzamelvat(en) of opvangrecipiënten om verzamemonster van 2 opeenvolgende monsternamecycli te bewaren ;
- te beschikken over een afgrendelbare gekoelde ruimte met een temperatuur van ($4 \pm 3^\circ\text{C}$), waarin het (de) verzamemonster(s) gedurende de monsternamecyclus en tot aan de monsterophaling koel bewaard kunnen worden;
- te beschikken over een overvulbeveiliging;
- te beschikken over de mogelijkheid om automatisch uitgeschakeld te worden na het beëindigen van de ingestelde monsternamecampagne (behalve het koelsysteem);
- roestvrij uitgevoerd te zijn, en elektrische onderdelen moet afgeschermd worden van ijs en vocht, en corrosieve omgevingen;
- zo gebouwd te zijn dat een minimum aan onderdelen contact hebben met het te bemonsteren water;
- over de mogelijkheid te beschikken om technische storingen, zoals stroomonderbrekingen, te visualiseren of op te slaan;
- bestand te zijn tegen langdurige nullozingen.

Elk apparaat wordt bij de indienstneming gevalideerd. De herhaalbaarheid moet een onderdeel zijn van het validatierapport.

MONSTERNAMETOESTEL MET VACUÛMPOMP

Bij dit systeem worden deelmonsters met behulp van een vacuümpompje via een aanzuigleiding, als gevolg van het creëren van onderdruk, opgevoerd tot boven in het monsterverzamelvat. De aansturing gebeurt door de debietsmeter in het geval het om een debietsgebonden monstername gaat.

Het vacuümmonsternametoestel werkt in 4 stappen:

- Wanneer het een startsignaal ontvangt, wordt de monsternameleiding m.b.v. perslucht gereinigd (dit om eventueel achtergebleven residu van het vorige deelmonster weg te nemen).
- Daarna wordt er een vacuüm in het systeem gecreëerd totdat de doseerbokaal volledig gevuld is.
- Vervolgens wordt het glas wederom onder perslucht gebracht om het teveel aan monsternamevloeistof terug te persen waarbij de gevraagde hoeveelheid monsternamevloeistof in de doseerbokaal achterblijft.
- Wanneer deze gevraagde hoeveelheid is bereikt, opent de klep zich en het deelmonster wordt dan opgevangen in het verzamelvat.

MONSTERNAMETOESTEL MET PERISTALTISCHE POMP

Bij de slangenpompbemonstering vindt het transport plaats door onderdruk. Het vacuüm wordt bij dit systeem opgewekt door een slangenpomp.

Gedurende de omwenteling van de slangenpomp wordt het deelmonster rechtstreeks naar het verzamelvat geleid.

ANDERE MONSTERNAMESYSTEMEN

Omwille van het drukverschil in gesloten systemen kunnen bepaalde monsternametoestellen (bijv. toestel met vacuümpomp) niet rechtstreeks aan een gesloten (druk)leiding gekoppeld worden. Bij kleine (gravitaire) drukverschillen (tot ca. 0.5 bar overdruk) kan een magneetventiel tussen de leiding en het monsternametoestel met vacuümpomp gemonteerd worden.

Bij grotere drukverschillen (bijv. pompleidingen) is een aangepast toesteltype noodzakelijk, bijv. een **monsternametoestel o.b.v. doorstroomprincipe**. Het water stroomt bij dit type toestel vrij door een monsternameleiding doorheen de doseerbokaal voor het deelmonstervolume (mogelijk moet het debiet hiervoor aangepast/gesmoord worden).

- Wanneer het toestel een startsignaal ontvangt, wordt de monsternameleiding onderaan afgesloten met een klep, en loopt het water in de (afgesloten) doseerbokaal.
- De klep onderaan de monsternameleiding wordt vervolgens weer geopend om het teveel aan monsternamenvloeistof te laten wegstromen tot aan de elektrode waarmee het deelmonstervolume wordt ingesteld.
- Daarna wordt de klep onderaan de doseerbokaal geopend om de ingestelde hoeveelheid deelmonster te laten wegvloeien in het verzamelvat.

4.2 MATERIAAL EN BENODIGDHEDEN

- 4.2.1 Voldoende plastic en/of glazen monsterrecipiënten voor de te analyseren parameters.
- 4.2.2 Monster(verzamel)vat: per monsternameplaats één of meerdere propere² vaten voorzien, beschermd tegen invloeden van buitenaf, en met een zodanige inhoud dat het vat gedurende de monsternameperiode niet overloopt of dat de overvulbeveiliging niet wordt geactiveerd.
- 4.2.3 Doorzichtige aanzuigleidingen met een minimum diameter van 9 mm
- 4.2.4 Magneetventiel om gravitair drukverschil tussen vacuümmonsternametoestel en gesloten leiding te neutraliseren (in functie van klantenportefeuille met gesloten systemen)
- 4.2.5 Doorzichtige maatcilinder, aangepast aan het te controleren deelmonstervolume, afleesbaar op 1 ml voor volumes tot 95 ml, afleesbaar op 2 ml voor volumes >95 ml)
- 4.2.6 Maatbeker: per monsternameplaats een reine maatbeker voorzien
- 4.2.7 Klein materiaal om onderdelen te bevestigen en een sergeantklem
- 4.2.8 Verzegelmateriaal, ingeval een heffingscampagne op de lozing van afvalwater wordt uitgevoerd;
- 4.2.9 Koelboxen met voldoende diepgevroren koelelementen of koelinstallatie om gekoeld transport van monsters te garanderen
- 4.2.10 Persoonlijke beschermingsmiddelen, afhankelijk van de omstandigheden van de monstername en de eisen gesteld door de instantie waar de monstername wordt uitgevoerd. Wegwerphandschoenen en veiligheidsschoenen zijn sterk aanbevolen.
- 4.2.11 Veldformulier/monsternameformulier/instel- en/of controleblad
- 4.2.12 Fototoestel (facultatief)
- 4.2.13 Absorberend papier

² Proper is gereinigd met detergent en nagespoeld met drinkbaar of gedemineraliseerd water, en visueel rein

4.2.14 Weeginstrument afleesbaar tot 50 g

4.3 OPLOSSINGEN EN REAGENTIA

4.3.1 Leidingwater voor het spoelen van monstername-apparatuur

4.3.2 Fosfaatvrije detergent/reinigingsmiddel voor het reinigen van monstername-apparatuur

5 MONSTERNAME VAN AFVALWATER

5.1 ALGEMENE AFSPRAKEN M.B.T. TIJDS- OF DEBIETSGEBONDEN MONSTERNAME

- Het verzamelmonster moet representatief zijn voor het te bemonsteren water, d.w.z. de samenstelling van het verzamelmonster moet overeenkomen met deze van het te onderzoeken water.
- De wijze van de automatische verzamelmonstername kan debietsgebonden of tijdsgebonden worden uitgevoerd.
 - Bij een debietsgebonden monstername moet een aantoonbaar betrouwbare debietmeting uitgevoerd worden, waarvoor verwezen wordt naar de eisen in WAC/I/A/012. Mogelijke afwijkingen van de controle-inrichting of debietmeting worden gemotiveerd in het monsternameverslag.

Het uitgangssignaal van de debietmeter wordt gekoppeld aan het monsternametoestel conform de voorschriften van de leverancier van het toestel. In de debietmeter wordt een factor ingesteld die aangeeft om de hoeveel m^3 water een puls of mA-sigitaal gegeven wordt aan het monsternametoestel, die dan een deelmonster neemt. Deze factor moet zodanig uitgevoerd zijn dat bij een gemiddeld dagdebiet voldoende monster genomen wordt om alle analyses uit te voeren.
 - Bij een tijdsgebonden monstername wordt een tijdsinterval tussen 2 opeenvolgende deelmonsternames ingesteld. Dit tijdsinterval mag maximaal 30 minuten bedragen, en bedraagt minimaal 5 minuten zodat er voldoende tijd is om het bemonsterde water op te voeren naar het monsternametoestel en over te brengen in het monsterverzamelvat. Onder bepaalde omstandigheden kan, facultatief, een gebeurtenisgebonden monstername, die tijds- of volumeproportioneel gestuurd kan worden (zie 3.3).
- Er wordt geadviseerd om vooraf mogelijke problemen (bijv. batchlozingen, sterk wisselende lozingspatronen,...) op te vragen bij de opdrachtgever of het bedrijf, zodat er bij installatie en instellen van de monsternameparameters rekening mee gehouden kan worden.
- Bij het instellen van het aantal deelmonsters en van het individuele deelmonstervolume moet steeds rekening gehouden worden met het totaal benodigde volume (voor zowel analyse als voor eventuele tegenanalyse).

BELANGRIJK!!! In het kader van heffingscampagnes bij het lozen van afvalwater worden specifieke richtlijnen/instructies gegeven i.v.m. de installatie en uitvoering van een monsternamecampagne. Raadpleeg hiervoor 5.5.

5.2 MONSTERNAMELOCATIE EN -PUNT

Als algemene vuistregel wordt het aanzuigpunt van het monsternametoestel als volgt geïnstalleerd:

- op een plaats met **turbulentie** of waar de samenstelling het **meest representatief is**;
- **onder het wateroppervlak**; het aanzuigpunt is zodanig bevestigd, zodat zelfs bij zeer laag debiet nog voldoende water kan overgebracht worden naar het monsternametoestel.

Meer specifieke eisen voor het nemen van een verzamelmonster van afvalwater volgen in punt 5.2.1 en 5.2.2. Voor beide situaties geldt dat alle afwijkingen m.b.t. het aanzuigpunt moeten worden gemotiveerd in het monsternameverslag.

5.2.1 OPEN SYSTEEM VOOR AFVALWATER

De monstername vindt plaats:

- **stroomafwaarts aan de controle-inrichting** (meetgoot, meetschot) zonder de vrije uitloop en/of een eventuele debietsmeting te hinderen. Bijvoorbeeld ter hoogte van de vrije uitstroom van het (afval)water uit een afvoerbuï naar een bijv. oppervlaktewater, of ter hoogte van een vrije uitstroom naar een lager gelegen put of riool). Indien mogelijk, wordt het aanzuigpunt geïnstalleerd op een afstand gelijk aan 3 keer de breedte ("B") van de controle-inrichting.
- voor debietsgebonden monsternames is het bovendien belangrijk dat het **debietsgebonden karakter van de monstername gegarandeerd blijft**, d.w.z. dat aanzuiging vanuit een (groter) volume water in een (vergaar)bak of -put geen debietsgebonden relatie meer heeft met de waterstroom door de controle-inrichting.
- Indien het stroomafwaarts niet mogelijk is om een monster te nemen, kunnen bijvoorbeeld volgende alternatieven overwogen worden:
 - stroomopwaarts van de controle-inrichting (op zeer ruime afstand indien het een debietsgebonden monstername betreft, zodat de debietmeting niet beïnvloed wordt door de opvoerslang)
 - in de controle-inrichting (niet toegelaten voor debietsgebonden monstername!)

5.2.2 GESLOTEN SYSTEEM VOOR AFVALWATER

De monstername vindt in dit geval plaats vanuit een "gesloten systeem", bijv. een gesloten afvoerleiding voor afvalwater waarin een elektromagnetische debietmeter is geïnstalleerd.

Stroomafwaarts van de debietmeter moet het bedrijf een aftappunt of aftakking op de afvoerleiding voorzien voor het aansluiten een monsternametoestel, met mogelijkheid voor afvoer. Dit monsternamepunt mag zich niet in een bocht of vernauwing in de leiding bevinden. Indien het te bemonsteren water wordt afgevoerd met behulp van een pomp, moet het aftappunt zich aan de perszijde van de pomp bevinden. Het monsternametoestel moet rechtstreeks, al dan niet met behulp van een drukreducerendventiel of klep (door bedrijf of door labo), op de afvoerleiding geïnstalleerd worden. Het water in een gesloten systeem mag t.b.v. de monstername niet van het aftakpunt op de gesloten leiding naar een 'open systeem' (bijv. overlopende emmer of bak) geleid worden (onrechtstreekse monstername van gesloten systeem).

In afwezigheid van een aftappunt of aftakking op de gesloten leiding, kan er in sommige gevallen bemonsterd worden aan een open uitstroom afwaarts aan de debietmeter, waarin het gesloten systeem uitmondt in een open (afvoer)kanaal (bijv. een venturi die is blijven liggen bij het plaatsen van nieuwe EM-debietmeter). Om het debietsgebonden karakter van de monstername te garanderen moet het aanzuigpunt in dit geval in de vrije uitstroom na de gesloten leiding geïnstalleerd worden, en niet in een (verzamel of buffer)bak of -put.

Het labo overlegt vooraf met de exploitant wat de mogelijkheden zijn om het toestel rechtstreeks aan de leiding te koppelen of er mogelijk afwaarts aan de debietmeter een open en vrije uitstroom van gesloten systeem voorhanden is.

5.3 INSTALLATIE APPARATUUR

Het monsternametoestel wordt zodanig ingesteld dat er voldoende verzamelmonster opgevangen wordt na één monsternamecyclus. Het gewenste volume verzamelmonster is afhankelijk van de te bepalen parameters en moet in overeenstemming zijn met WAC/I/A/010. De opgevangen hoeveelheid water is afhankelijk van:

- de instellingen van het deelmonstervolume van het toestel, en
- voor debietsgebonden monstername: de monsternamefrequentie (puls) ingesteld in de debietmeter, die bepaalt bij welk volume water er monster wordt genomen. De meeste toestellen laten zowel toe het debiet per puls te programmeren op de debietmeter (bijv. 1 puls of mA-sigitaal per 0,1 m³ water), als het aantal pulsen/signalen nodig om een monstername te initiëren op het monsternametoestel, bijv. 1 monstername per 10 pulsen of mA-sigitaal (er zal dan 1 monster genomen worden per m³ water), of
- voor tijdsgebonden monstername: het ingestelde tijdsinterval tussen 2 opeenvolgende deelmonsters (monsternamepauze).

Een monsternamecyclus wordt meestal ingesteld op één etmaal (24 h), maar kan ook langer ingesteld worden (week, maand,...).

Het monsternametoestel wordt geïnstalleerd en ingesteld, rekening houdend met volgende richtlijnen:

- Het monsternametoestel moet op een vlakke ondergrond worden geplaatst, zo dicht mogelijk bij het monsternamelocatie. Op die manier kan de aanzuigleiding zo kort mogelijk gehouden worden (zonder knikken of overbodige bochten waarin restwater kan blijven staan)
- Bij elke monsternamelocatie of waterstroom wordt het systeem voorzien van een nieuwe aanzuigleiding;
- Bij het aanzuigpunt is het gebruik van hulpmiddelen (bijv. korf of filters) die de stroomsnelheid beïnvloeden, niet toegelaten. Het gebruik van een korf bij het aanzuigpunt van de aanzuigslang is niet toegelaten omdat in het gebruik de korf zal verstopen. Tevens zal de korf met aangehecht materiaal zich dan als filter gaan gedragen, waardoor er geen sprake meer kan zijn van een representatief monster;
- Eventuele afzetting, bezinksel, sliblaag, etc. op de bodem van het afvoerkanaal of -buis wordt niet mee bemonsterd;
- De aanzuigleiding moet steeds leeglopen. Indien dit niet het geval is, kan de monstername(campagne) niet gestart worden;
- Het minimale volume van een **deelmonster is 50 ml**;
- Simuleer minstens 3x achter elkaar een enkelvoudige monstername en controleer hierbij het ingestelde deelmonstervolume met een daarvoor geschikte maatcilinder. Noteer de volumes en bereken de gemiddelde waarde. Dit is het ingestelde deelmonstervolume voor deze monsternamecyclus.
- **Er wordt gestreefd naar 100 deelmonsters, met een minimum van 50.** Indien dit technisch niet mogelijk is, mag hier gemotiveerd van afgeweken worden, bijvoorbeeld in geval van batchlozing, lozingen beperkt in de tijd of beperkt in volume;
- Bij een tijdsgebonden monstername bedraagt het tijdsinterval tussen 2 deelmonsters (monsternamepauze) maximaal 30 minuten en minimaal 5 minuten;

- Zorg ervoor dat het (de) monsterverzamelvat(en) groot genoeg is (zijn) om de verwachte hoeveelheid verzamelmonster kunnen bevatten, zodat het de monsternamecycle niet vroegtijdig beëindigd wordt;
- Schakel de koeling van de afgesloten ruimte met monsterverzamelvaten in: de temperatuur moet ingesteld worden op $4 \pm 3^{\circ}\text{C}$. Plaats tevens een temperatuurlogger of min-max thermometer in deze ruimte om mogelijke overschrijdingen tijdens de monsternamecampagne te kunnen opvolgen. Deze temperatuursopvolging mag niet beïnvloed worden door de buitenomgeving bij het aflezen ervan;
- Het volledige monsternamesysteem, inclusief aanzuigleiding, dient te worden beschermd tegen bevroering.
- Technische storingen zoals stroomonderbrekingen, moeten gelogd worden.

5.4 AFRONDEN MONSTERNAMECYCLUS

Het verzamelmonster van de betreffende monsternamecycle wordt ten laatste de volgende werkdag na deze monsternamecycle (doorgaans 24h) uit het monsternametoestel genomen voor verdere voorbehandeling, deelmonsternam(e) en/of metingen ter plaatse (§8), en dit ongeacht of er al dan niet nog verdere monsternamecycli zullen plaatsvinden.

~~De werkdag na elke monsternamecycle van een monsternamecampagne~~ Er wordt er tevens gecontroleerd of het monsternametoestel, en mogelijke randapparatuur (bijv. debietmeter), correct heeft gewerkt, en of de juiste hoeveelheid verzamelmonster geïncolteerd werd voordat het verzamelmonster uit toestel wordt genomen.

Bij deze dagelijkse controle worden volgende punten opgevolgd:

- Er wordt telkens gecontroleerd en geregistreerd of de monsternam(e) niet vroegtijdig gestopt is, of onderbroken werd. Bij stroomonderbreking(en) wordt het monster van de betreffende monsternamecycle afgekeurd. Ingeval de monsternamecycle afgekeurd werd, moet deze opnieuw opgestart worden (monsternamecampagne verlengen met één monsternamecycle);
- Er wordt tevens een visuele controle van de omgeving van de controle-inrichting uitgevoerd om mogelijke overloop van de controle-inrichting vast te stellen. Visuele vaststellingen/afwijkingen worden genoteerd op het monsternameverslag.
- Gedurende de hele monsternamecampagne wordt dagelijks, bij de monsterophaling, een nieuwe controle op het ingestelde deelmonstervolume (zie 5.3) uitgevoerd en genoteerd. De afwijking mag niet meer bedragen dan 5 % van het ingestelde volume (zie 6.1);
- Bepaal het opgevangen volume in het verzamelvat (V_w) d.m.v. weging met een weeghaak of daarvoor geschikt weegtoestel.
- Bereken het theoretisch volume van het verzamelmonster (V_T):

$$V_T = f \times V_d$$

met: V_T = theoretisch verzamelmonster (l)

f = aantal puls(signalen)

= totale hoeveelheid water tijdens monsternamecycle (dagdebiet in m^3)
delen door monsternam(e) frequentie (m^3 per puls) of monsternam(e)pauze
(tijdseenheid per puls)

V_d = ingestelde (enkelvoudig) deelmonstervolume (l)

- Bereken en noteer de procentuele afwijking tussen het theoretisch en werkelijk gemeten volume δ_{T-W} (%) in het verzamelvat cfr. 6.2. Deze afwijking mag niet meer bedragen dan 10 % (zie ook 6.2).
- Controleer de temperatuur in de monsternamekast gedurende de afgelopen monsternamecycle m.b.v. de in de kast geplaatste thermometer of logger. De temperatuur moet in elke monsternamecycle voldoen aan $4 \pm 3^{\circ}\text{C}$.

- Tijdens een monsternamecyclus mogen de instellingen niet gewijzigd worden (bijv. factor debietmeter, deelmonstervolume,...) omdat de samenstelling van het verzamelmonster van die cyclus (24u) hierdoor beïnvloed wordt.
Voor een volgende cyclus tijdens eenzelfde monsternamecampagne is dit wel toegelaten, zolang er geen invloed is op het debiets- of tijdsproportioneel karakter van het verzamelmonster, en op voorwaarde dat deze gemotiveerd gemeld worden aan de VMM (bijv. bedrijfsafvalwater dat veel verontreinigd regenwater bevat);
- Iedere werkdag volgend op een afgeronde monsternamecyclus wordt het verzamelmonster afgehaald, verdeeld (zie 0) over de nodige monsterreceptiënten voor analyse en/of metingen ter plaatse.

5.5 SPECIFIEKE EISEN VOOR HET UITVOEREN VAN EEN TIJD- OF DEBIETS- GEBONDEN MONSTERNAME IN HET KADER VAN HEFFINGSCAMPAGNES VOOR LOZEN VAN AFVALWATER

De heffing op waterverontreiniging staat in Titel IV van het decreet van 18 juli 2003 betreffende het integraal waterbeleid.

Voor het bepalen van de vuilvracht bij de berekening van de heffing gelden volgende afspraken m.b.t. de monstername van afvalwater vanaf 1/1/2024:

- Een monsternamecampagne bedraagt 1, 2, 3 of 5 dagen (afhankelijk van de vuilvracht van de laatst vastgestelde heffing, zie Art. 3. §4³), en wordt doorgaans uitgevoerd in de 'periode ~~(maand)~~ van de grootste vervuiling'. Deze interpretatie wordt gemaakt door de opdrachtgever (heffingsplichtige), en is niet de verantwoordelijkheid van het laboratorium.
- Een monsternamecampagne mag niet maandoverschrijdend zijn.
- In het kader van de heffingscontrole is een tijdsgebonden monstername enkel toegestaan wanneer debietsgebonden monstername niet mogelijk is, bijvoorbeeld wanneer er geen, of geen geschikte controle-inrichting voor debietmeting cfr. WAC/I/A/012 aanwezig is.
- ~~Een~~ Alle monsternamecycli van een monsternamecampagne dienen 24 h te bedragen (één volledig etmaal), en moeten starten om 0:00 h. Afwijkingen van het startuur voor een volledige campagne, moeten voor de start gemeld worden aan de bevoegde overheid (VMM).
- De monsternamepauze bij een tijdsgebonden monstername i.k.v. heffingen mag maximaal 10 minuten bedragen.
- Alle toestellen, apparatuur en alle belangrijke onderdelen (aanzuigslang, borrelbuis, debietmeter, printer, gekoelde ruimte met monsterverzamelvat(en)) worden verzegeld gedurende de volledige monsternamecampagne. De verzegeling wordt aangebracht op een duidelijk zichtbare plaats, en zodanig dat er geen manipulaties mogelijk zijn zonder dat het zegel verbroken wordt. Na elke monsterophaling wordt de verbroken verzegeling van het monsternametoestel, en mogelijke andere apparatuur (bijv. debietmeter en printer) opnieuw verzegeld. De stroomtoevoer hoeft niet verzegeld te worden.
- De te analyseren monsterreceptiënten worden verzegeld conform het betreffende uitvoeringsbesluit³.
- Indien een monsternamecyclus afgekeurd werd, kan de monsternamecampagne overeenkomstig verlengd worden. De monsternamecyclus van de verlenging start op hetzelfde uur als de overige monsternamecycli, dus om 0:00h. Een verlenging van een heffingscampagne zou een uitzondering moeten zijn, bijv. bij terugslag rioolwater, overlopen van verzamelvaten, algemene elektriciteitspanne, ...

³ Besluit van de Vlaamse regering van 28 juni 2002 tot uitvoering van Titel IV, hoofdstuk II en Titel V, hoofdstuk IV van het Decreet van 18 juli 2003 betreffende het integraal waterbeleid, gecoördineerd op 15 juni 2018

De vraag voor verlenging wordt binnen 24 h na het vaststellen van het probleem door het labo of na het doorgeven van het probleem door VMM, via mail gemeld aan de bevoegde overheid (VMM). De oorzaak en motivatie voor verlenging dient tijdens de lopende monsternamecampagne bezorgd te worden aan de bevoegde overheid (VMM).

~~Het verzamelmonster van de afgekeurde monsternamecyclus wordt geanalyseerd, indien dit technisch mogelijk is. Bij onvoldoende of laattijdige informatie betreffende afkeuring of verlenging, kan de monsternamecampagne in zijn geheel afgekeurd worden.~~ Het erkend laboratorium vraagt bij de melding van het probleem aan VMM, richtlijnen met betrekking tot de te ondernemen stappen met het verzamelmonster van de afgekeurde monsternamecyclus (bv. analyseren of niet).

5.6 RICHTLIJNEN M.B.T. SPECIFIEKE ANALYSEPARAMETERS

5.6.1 PFAS

Wanneer monsternames gebeuren in het kader van PFAS-analyses, moet rekening worden gehouden met volgende richtlijnen:

- ~~— Bij monstername mag enkel gebruik worden gemaakt van materialen die geen PFAS afgeven/uitlogen. In de mate van het mogelijke moet nagegaan worden (bij de leverancier/ aan de hand van analyses) of het materiaal gebruikt bij de monstername voor analyse op PFAS, PFAS kan bevatten.~~
- ~~— Alle monsternameslangen moeten worden vervangen vóór de monstername. Andere monstername-apparatuur mogen enkel gebruikt indien aangetoond is dat ze geen PFAS boven de LOQ uitlogen in het waterstaal.~~
- Elk rechtstreeks contact met het monster moet worden vermeden, dit houdt ook rechtstreeks contact van het monster met de handschoenen in. Het is bijgevolg noodzakelijk om een gereinigd hulpmiddel te gebruiken om het staal te nemen.
- Reinigen van materiaal:
 - o enkel met water van drinkwaterkwaliteit;
 - o bij de toepassing van reinigingsmiddel mag enkel gebruik gemaakt worden van PFAS-vrije detergents en moet grondig worden nagespoeld. ~~Het gebruik van Deconex is niet toegestaan;~~
- Waterstalen voor de analyse van PFAS worden niet gefiltreerd.
- Het gebruik van koelelementen wordt toegestaan onder de volgende voorwaarden:
 - o de koelelementen vertonen geen lekken;
 - o alleen harde koelelementen worden toegestaan, de flexibele koelelementen niet omdat ze een grotere kans op scheuren hebben.
- Er wordt geen beperking opgelegd in te dragen regen-, veiligheids- en andere kledij indien aan volgende voorwaarden wordt voldaan:
 - o rechtstreeks contact met het staal moet worden vermeden;
 - o afloop van hemelwater via de kledij in het staal moet worden vermeden;
 - o ~~— kledij aangewend bij staalname mag niet worden gewassen met wasverzachter.~~
- Richtlijnen met betrekking tot conservering en recipiënten zijn opgenomen in de procedure WAC/1/A/010.

6 KWALITEITSCONTROLE

Bij elk bezoek aan de monsternameplaats worden onderstaande kwaliteitscontroles uitgevoerd en geregistreerd op formulier voor veldregistraties.

6.1 CONTROLE VAN HET INGESTELDE DEELMONSTERVOLUME

Bij het opstellen ter plaatse van het monsternametoestel wordt het ingestelde deelmonstervolume 3x achter elkaar gecontroleerd met een daarvoor geschikte maatcilinder. Deze waarden worden genoteerd en de gemiddelde waarde wordt berekend.

Dagelijks, bij elke monsterophaling, wordt opnieuw een controle van het ingestelde deelmonstervolume uitgevoerd en genoteerd op het monsternametoestelverslag.

De afwijking ten opzichte van het ingestelde deelmonstervolume mag niet meer bedragen dan 5 %.

6.2 CONTROLE VAN HET WERKELIJK T.O.V. HET THEORETISCH VOLUME VAN HET VERZAMELMONSTER

Bereken en noteer de procentuele afwijking δ_{T-W} (%) tussen het theoretisch (V_T) en werkelijk gemeten volume (V_W) in het verzamelvat:

$$\delta_{T-W} = \frac{|V_W - V_T|}{V_T} \times 100$$

Deze afwijking mag niet meer bedragen dan 10 %. Bij afwijking > 10 % is traceren van de oorzaak noodzakelijk, bijvoorbeeld:

- verminderd deelmonstervolume door vervuiling, verstopping,...
- stroomuitval
- niet bij elke signaal wordt een monster genomen
- aanzuigslang bevindt zich niet (meer) onder het wateroppervlak
- 2 signalen dicht bij elkaar waardoor monsternametoestelcycli overlappen en niet volledig afgerond worden
- ...

De afwijking is enkel acceptabel mits een duidelijke motivatie en mits het verzamelmonster nog representatief is, zoniet wordt de bemonstering afgekeurd.

6.3 CONTROLE VAN DE OMGEVINGSTEMPERATUUR VAN HET MONSTERVERZAMELVAT

Controleer of de omgevingstemperatuur van de gekoelde ruimte in het monsternametoestel, tijdens de monsternametoestelcyclus binnen de toegelaten eis van $4 \pm 3^\circ\text{C}$ is gebleven. Voer de controle zo uit dat de invloed van de buitenomgeving verwaarloosbaar is. Voer de meting met een thermometer, temperatuurlogger of temperatuursonde die in een met vloeistof gevulde beker/recipiënt is geplaatst, of gebruik een (digitale) temperatuursonde die buiten de kast kan afgelezen worden (zorg ervoor dat de monsternametoestelkast minimaal 15 min gesloten is voor de aflezing).

De temperatuur moet gedurende een monsternametoestelcyclus voldoen aan $4 \pm 3^\circ\text{C}$.

7 DEELMONSTERNAME EN VULLEN VAN RECIPIËNTEN

Het verzamelmonster van een monsternamecycle (doorgaans 24h) wordt ten laatste de volgende werkdag na deze monsternamecycle uit het monsternametoestel genomen voor verdere voorbehandeling, deelmonstername (§0) en/of metingen ter plaatse (§8), en dit ongeacht of er al dan niet nog verdere monsternamecycle's zullen plaatsvinden.

7.1 VERZAMELMONSTER, HOMOGENISEREN EN DEELMONSTERNAME

Indien per monsternamecycle meerdere monsterverzamelvaten worden gebruikt, moeten die vaten die gedurende de periode van één cyclus zijn gevuld uit het apparaat worden genomen, en samengevoegd worden in, bijvoorbeeld, een emmer. Hierbij worden alle monsterverzamelvaten gebruikt (emmer moet groot genoeg zijn) en het overgieten moet in twee bewegingen gebeuren. Na verwijderen van de helft van het verzamelmonster moet omgeroerd worden om alle bezinkbare en zwevende delen mee te nemen.

Wanneer per cyclus één vat wordt gebruikt, kan het vat in zijn geheel uit het apparaat genomen worden. Het homogeniseren en daarna verdelen in de verschillende recipiënten kan ook rechtstreeks hieruit gebeuren.

Aan de hand van een maatbeker wordt het water in de emmer of het verzamelvat gehomogeniseerd door horizontale en verticale bewegingen met de beker in het vat uit te voeren. Hierbij wordt gezorgd dat al het bezonken materiaal in suspensie komt. Bezinsel maakt ondubbelzinnig deel uit van het af te vullen monster. Dit wordt bewerkstelligd door een beker in achtvorm door de oplossing te halen. Indien materiaal vast aan de bodem van het vat plakt, wordt met een handschoen het materiaal losgemaakt van de bodem.

Met behulp van de maatbeker worden de nodige recipiënten één voor één gevuld, waarbij elke keer dat wordt geschep, de gehele inhoud van het opvangvat weer wordt opgemengd.

Voor elk nieuw, volgend, recipiënt moet opnieuw een maatbeker vanuit het verzamelmonster gevuld worden. Bij het afvullen van identieke of gelijkaardige monsterrecipiënten (bv. zelfde conservering, monster-tegenmonster,...) worden deze direct na elkaar gevuld: voor elk recipiënt wordt een volgende maatbeker gevuld (het overblijvende gedeelte uit de maatbeker mag niet te gebruiken worden om de volgende identieke of gelijkaardige recipiënt af te vullen). Het afwisselend vullen van identieke of gelijkaardige recipiënten is niet toegelaten.

Vooraleer de monsterverzamelvaten worden teruggeplaatst voor een volgende monsternamecycle in eenzelfde meetcampagne, moeten deze worden gespoeld.

7.2 VULVOLGORDE

Voor verdere richtlijnen in verband met het vullen van de monsterrecipiënten wordt verwezen naar WAC/I/A/003 (§4).

7.3 CONSERVERING

De monsters moeten, per analyseparameter of -groep, de nodige bewaar- of conserveermiddelen voor de (fysico-) chemische parameters bevatten conform WAC/I/A/010.

De conservering gebeurt steeds ter plaatse. Maak voor fysico-chemische parameters bij voorkeur gebruik van voorgeconserveerde monsterrecipiënten. Het doseren van conserveermiddelen op het veld is omslachtig, moet vaak in moeilijke (weers)omstandigheden uitgevoerd worden en is bijgevolg vaak minder nauwkeurig.

De aard en de houdbaarheid van de conserveermiddelen en/of steriliteit moet vermeld worden op de monsterrecipiënt en moet gerespecteerd worden.

8 METINGEN TER PLAATSE

De bepaling van veldparameters (indien gevraagd door opdrachtgever) wordt uitgevoerd conform WAC/I/A/011).

9 VELDREGISTRATIES

Bij elke monstername worden ter plaatse veldregistraties gemaakt. Dit kan bijvoorbeeld door gebruik te maken van een 'monsternameformulier' (ook wel 'veldformulier', 'instel- of controleblad'.

Volgende gegevens dienen minimaal geregistreerd te worden indien van toepassing:

- identificatie van de monsternemer
- plaats en locatie van de monstername, incl. aanduiding/omschrijving/schets van de monsternameplaats (eventueel een foto)
- methode van de monstername (tijds-/debiets-/eventgebonden, open/gesloten systeem)
- ingeval debietsgebonden: dagdebiet per monsternamecyclus, bevestiging van uitvoering conform WAC/1/A/012 of vermelding van de aard en impact van de afwijkingen
- ingeval eventgebonden: 'trigger'
- type monsternametoestel, ingesteld deelmonstervolume, monsternamefrequentie van een deelmonster binnen één cyclus, aantal deelmonsters per cyclus, volume verzamelmonster
- data en duur van de monsternamecampagnes en -cycli
- alle gegevens betreffende kwaliteitscontrole(s) cfr. 6
- resultaten van metingen ter plaatse
- de gegevens die noodzakelijk zijn voor het identificeren van de monsters zoals vermeld op het etiket
- afwijkingen en eventuele opmerkingen en/of (omgevings-)omstandigheden die de monstername kunnen beïnvloeden.

10 RAPPORTERING

Van elke monstername dient een monsternameverslag conform WAC/VI/A/004 opgemaakt te worden. Dit verslag kan ook geïntegreerd worden met het analyseverslag.

Naast de nodige gegevens cfr. §5 van WAC/VI/A/004, moet het monsternameverslag ook volgende informatie bevatten:

- datum en uur van de monsternamecampagne en- cycli
- gebruikte techniek voor monstername (tijd-/debiets-/eventgebonden in open/gesloten systeem)
- werkelijk volume verzamelmonster per monsternamecyclus

- ingeval debietsgebonden: (meet)verslag van de debietmeting cfr. WAC/1/A/012
- ingeval eventgebonden: 'trigger'
- aantal monsters of recipiënten die ter analyse gevuld werden.

11 TRANSPORT MONSTERS

De maximale bewaartermijnen van watermonsters conform WAC/I/A/010 zijn van toepassing. De monsters dienen dan ook tijdig aan het analyselaboratorium geleverd te worden zodat de houdbaarheid gerespecteerd kan worden. Eventueel moet de monsternemer afspraken maken m.b.t. de levering aan het analyselaboratorium, zodat het laboratorium zich kan houden aan de gestelde houdbaarheidstermijn (bijv. spoedanalyses op voorhand plannen).

Blootstelling aan licht en hitte moet te allen tijde vermeden worden. Gekoeld transport van monsters dient gegarandeerd te zijn door gebruik te maken van koelboxen met voldoende koelementen of een koelinstallatie. Tijdens het transport mag de temperatuur van een monster niet stijgen. Monsters met een hoge temperatuur worden fysisch gescheiden van koude monsters. Het is aan te raden om via een logger het temperatuursverloop tijdens het transport te registreren.

12 ONDERHOUD

- Nazicht van de goede staat van monsternamekast, mengvaten en leidingen
- De monsterverzamelvaten moeten voor elke monsternamecyclus (meestal per 24 h) met voldoende worden gespoeld voor ze terug worden ingezet in eenzelfde monsternamecampagne. Zichtbaar verontreinigde vaten worden gereinigd met detergent;
- De aanzuigleiding moet bij elke monsternamecampagne vervangen worden, d.w.z. bij elke bedrijf of waterstroom;
- Spoelen van het monsternametoestel met detergent na elke monsternamecampagne: alle delen die in contact komen met het bemonsterde water (doseerbokaal, vacuümtoestel, slang, peristaltische pomp, distributiearm,...) moeten gereinigd worden;
- Regelmatig vervangen van de leiding van de peristaltische pomp minimaal volgens de instructies van de fabrikant, en verder indien de controle op het volume van de deelmonsters afwijkend is, of indien er visuele verontreiniging is van deze leiding.

13 REFERENTIES

- WAC/I/A/003 – Algemeen – Monsterneming en voorbehandeling – Ogenblikkelijke monstername (schemonster) van water
- WAC/I/A/010 – Algemeen – Monsterneming en voorbehandeling – Conservering en behandeling van watermonsters
- WAC/I/A/011 – Algemeen – Monsterneming en voorbehandeling – Meting ter plaatse van temperatuur, pH, elektrische geleidbaarheid, opgeloste zuurstof, vrije chloor en gebonden chloor
- WAC/I/A/012 – Algemeen – Monsterneming en voorbehandeling – Bepaling van het debiet in controle-inrichtingen voor afvalwater
- WAC/VI/A/004 – Validatie – Voorwaarden voor rapportering van monsternamegegevens en analyseresultaten door een erkend laboratorium
- NBN EN ISO 5667-1:2023, Water quality — Sampling — Part 1: Guidance on the design of sampling programmes and sampling techniques (ISO 5667-1:2023)
- NBN ISO 5667-10:2021, Water quality - Sampling - Part 10: Guidance on sampling of waste waters (ISO 5667-10:2020)
- NBN EN ISO 5667-4:2019, Water quality - Sampling - Part 4: Guidance on sampling from lakes, natural and man-made (ISO 5667-4:2016)
- NEN 6600-1:2001, Water - Monsterneming - Deel 1: Afvalwater

Monsternamen van water via een peilput, inclusief conservering en transport

INHOUD

1	TOEPASSINGSGEBIED	4
2	DEFINITIE	4
3	MATERIAAL, APPARATUUR EN OPLOSSINGEN	4
3.1	Algemeen	4
3.2	Apparatuur (pakket W1.4.1 en W1.4.2)	5
3.3	Extra apparatuur voor monsternamen van peilputten >30 m- mv (uitsluitend pakket 1 4.2)	6
3.4	Oplossingen en reagentia (pakket W1.4.1 en W1.4.2)	6
3.5	Materiaal en benodigdheden (pakket W1.4.1 en W1.4.2)	6
4	VOORBEREIDING MONSTERNAME	7
4.1	Informatie m.b.t. de plaatsing van de peilbuis	7
4.2	Controle op aanwezigheid drijf- en/of zinklagen	9
4.3	Opmeting waterstand en peilbuiskarakteristieken	10
4.4	Keuze monsternamemethode	10
4.5	Keuze en gebruik pompapparatuur	11
5	MONSTERNAME VAN (GROND)WATER	14
5.1	Verversen van de peilbuis of voorpompen	14
5.2	Metingen ter plaatse bij de monsternamen van (grond)water	17
5.3	Peilbuizen met 'slechte' toestroming	18
5.4	Eigenlijke monsternamen	18
5.5	Richtlijnen m.b.t. specifieke analyseparameters	21
6	VELDREGISTRATIES	22
7	RAPPORTERING	23
8	TRANSPORT	23
9	REFERENTIES	23
10	BIJLAGEN	24
	BIJLAGE A : SCHEMATISCHE VOORSTELLING PEILBUIZEN	25
A.1	Snijdende peilbuis	25
A.2	Peilbuis met volledig verzadigde filter	26
A.3	Multilevel peilput	28
	BIJLAGE B : MONSTERNAMEMETHODE: LOW FLOW VS. KLASSIEKE METHODE	29
B.1	Low flow purging of micro purging	29
B.2	Klassieke monsternamen (pompen bij hoog debiet)	30
	BIJLAGE C : KEUZE EN GEBRUIK VAN MONSTERNAMEAPPARATUUR	31
C.1	Monsteringstechnieken door opzuigen van water (zuigpompen)	31

C.2	Monsternametechnieken door opdrukken van water (perspompen)	31
C.3	Andere monsternamemethoden	33
	BIJLAGE D : SPECIFICATIES VOOR VERWIJDERING VAN OPGEpomPT GRONDWATER	34
	BIJLAGE E : AFWIJKENDE VOORWAARDEN VOOR HET BEMONSTEREN VAN PERCOLAATWATER VIA EEN PEILPUT	35

1 TOEPASSINGSGEBIED

Deze procedure beschrijft de monsternamen van water met behulp van een peilput of peilbuis conform Vlare, inclusief de conservering en transport van de watermonsters. Deze monsternamen kunnen plaatsvinden op verschillende plaatsen in functie van de beoogde rubriek, bijvoorbeeld grondwaterwinningen, stortplaatsen, ontginningen, lekdetectie bij mestopslagplaatsen of opslagtanks,...

Deze methode is niet toepasbaar voor de monsternamen van grondwater in het kader van Vlarebo; hiervoor wordt verwezen naar CMA/1/A.2.

Het plaatsen van de peilbuizen of -putten behoort niet tot de procedures beschreven in het WAC. Hiervoor wordt verwezen naar CMA/1/A.2 en de code van goede praktijk in bijlage 5.53.1 van Vlare II. Voor de constructie van peilputten rond mestopslagplaatsen wordt eveneens verwezen naar bijlage 5.9 van Vlare II.

Voor de monsternamen van percolaatwater via peilputten op stortplaatsen worden in Bijlage E afwijkende voorwaarden bij de monsternamen gegeven.

Voor de monsternamen van bemalingswater via peilputten worden bijkomende voorwaarden bij de monsternamen gegeven; raadpleeg hiervoor WAC/I/A/007.

2 DEFINITIE

Peilbuis: is een buis of een soortgelijke constructie (zie Figuur 1 tot Figuur 3 van BIJLAGE A) voorzien van een filterelement. In sommige gevallen kunnen in één buis meerdere filterelementen, gescheiden door blinde elementen, onder elkaar geplaatst worden. Een peilbuis wordt gebruikt om de grondwaterstand of stijghoogte te meten en voor het nemen van grondwatermonsters.

Peilput: boring waarin een of meerdere peilbuizen zijn aangebracht t.b.v. het opmeten van de grondwaterstand en/of het nemen van watermonsters. Indien een peilput meerdere peilbuizen of meetfilters op verschillende dieptes bevat, spreekt men over multilevel peilputten.

In de procedure wordt een *ondiepe grondwaterstand* (GWS) bedoeld indien het waterpeil < 8 m-mv, en een *diepe grondwaterstand* indien het waterpeil > 8 m-mv bedraagt.

3 MATERIAAL, APPARATUUR EN OPLOSSINGEN

3.1 ALGEMEEN

Al de apparatuur, oplossingen, reagentia, materiaal en benodigdheden, opgelijst in 3.2, 3.4 en 3.5, dient voorzien te worden door de erkende monsternameninstantie voor de monsternamen van peilbuizen (cfr. pakketten W1.4.1 en/of W1.4.2). Voor de monsternamen van peilbuizen >30 m-mv (pakket W1.4.2) moet de monsternameninstantie extra apparatuur cfr. 3.3 voorzien.

De toestellen en hulpmiddelen die worden gebruikt bij de bemonstering dienen zoveel mogelijk te bestaan uit materialen die inert zijn ten aanzien van de te analyseren component(en).

Alle te gebruiken toestellen en hulpmiddelen moeten goed onderhouden en schoon zijn zodat de representativiteit van de monsternamen niet nadelig wordt beïnvloed. De onderhoudsvoorschriften van de leveranciers dienen hierbij gevolgd te worden. Onderhoudsbeurten dienen in een logboek geregistreerd te worden.

Hulpmiddelen behoren regelmatig mechanisch en chemisch te worden gereinigd, bij voorkeur in het laboratorium. Het ontstaan van bijvoorbeeld doffe of verkleurde vlekken op de hulpmiddelen kan een signaal zijn dat het hulpmiddel niet meer geschikt is voor monsternamen.

3.2 APPARATUUR (PAKKET W1.4.1 EN W1.4.2)

- 3.2.1. Regelbare pomp(en) met instelbaar (minimaal) debiet van 100 ml/min¹ geschikt² voor het voorpompen en/of monsternamen van (grond)water
- 3.2.2. (Externe) (stroom)voorziening voor het aandrijven van pompen, en voldoende brandstof om het voorpompen en monsternamen(s) af te ronden (indien van toepassing en indien niet aanwezig/voorhanden op het terrein)
- 3.2.3. Filtreerapparatuur, geschikt voor veldfiltratie
- 3.2.4. Peillint (lengte min. 30 m met onderverdeling per cm) met visueel en/of akoestisch signaal, geschikt voor het opmeten van de grondwaterstand en de diepte van de peilbuis tot max. 30 m-mv (facultatief mits voor dit doeleinde 3.2.5 kan worden gebruikt)
- 3.2.5. Elektronische drijf-/zinklagendetector (lengte min. 30 m) met visueel en/of akoestisch signaal
- 3.2.6. Doorstroomcel (met gekend volume en luchtdicht af te sluiten) voor in-line meten van de veldparameters pH, geleidbaarheid, redoxpotentiaal en/of opgeloste zuurstof en temperatuur
- 3.2.7. Draagbare digitale thermometer of thermokoppel afleesbaar tot op 0,1°C conform WAC/I/A/011 en WAC/III/A/003 (facultatief mits voor dit doeleinde 3.2.8 of 3.2.9 wordt gebruikt)
- 3.2.8. Draagbare pH-meter met elektrode, temperatuurssonde en benodigdheden (kalibratie- en controle-oplossingen,...) conform WAC/I/A/011 en WAC/III/A/005 (ISO 10523)
Een pH-meter met driepuntskalibratie (of meer dan 3 kalibratiepunten) is aanbevolen; zoniet worden twee pH-meters gebruikt, één voor het zuur bereik en een tweede voor het basisch bereik, of wordt ter plaatse geherkalibreerd i.f.v. het pH-gebied van de te meten monsters.
- 3.2.9. Draagbare geleidbaarheidsmeter voorzien van een geleidbaarheidscel en temperatuursensor, en benodigdheden (kalibratie- en controle-oplossingen,...) conform WAC/I/A/011 en WAC/III/A/004
De geleidbaarheidsmeter dient voorzien te zijn van een geleidbaarheidscel en een temperatuursensor tot op 0,1°C nauwkeurig voor temperatuurscorrectie.
Het toestel dient instelbaar te zijn bij een referentietemperatuur van 20°C³ (voor grond- en drinkwater).
- 3.2.10. Draagbare turbiditeitsmeter met infrarood lichtbron en benodigdheden (kalibratie- en controle-oplossingen,...) conform WAC/III/A/010.
- 3.2.11. Draagbare digitale zuurstofmeter met elektrochemische cel of luminescentiesensor, en benodigdheden kalibratie- en controle-oplossingen,... conform WAC/I/A/011 en WAC/III/A/008 (facultatief, indien van toepassing)
- 3.2.12. Draagbare redoxmeter met elektrode en benodigdheden controle-oplossingen, ... (facultatief, indien van toepassing)

¹ Waar technisch mogelijk

² De toepassingsmogelijkheden zijn gespecificeerd in Tabel 1 en verder gedocumenteerd in Bijlage B

³ Voor andere watertypes (afvalwater en oppervlaktewater) is de referentietemperatuur 25°C.

3.3 EXTRA APPARATUUR VOOR MONSTERNAME VAN PEILPUTTEN >30 M- MV (UITSLUITEND PAKKET 1.4.2)

Voor **toepassingen <200 m-mv** dient volgende apparatuur voorzien te worden:

- 3.3.1. Regelbare pomp(en) met instelbaar debiet geschikt² voor het voorpompen en/of monstername van peilbuizen met een (grond)waterstand tot 200 m-mv. De toepassingsmogelijkheden zijn gespecificeerd in Tabel 1 en Bijlage B.
- 3.3.2. Peillint (lengte tot 200 m) met visueel en/of akoestisch signaal
- 3.3.3. Dieptelood met lengte 200 m. Dit kan eventueel vervangen worden door het hierboven beschreven peillint uitgerust met een geschikt verzwaringsgewicht⁴ geleverd door de fabrikant.
- 3.3.4. Elektronische drijf-/zinklagendetector met een lengte van min. 50 m met visueel en/of akoestisch signaal

Voor **toepassingen >200 m-mv** dient de apparatuur ad hoc voorzien te worden in functie van de klantenportefeuille.

3.4 OPLOSSINGEN EN REAGENTIA (PAKKET W1.4.1 EN W1.4.2)

- 3.4.1. Drinkbaar⁵ of gedemineraliseerd water voor het spoelen van monstername-apparatuur
- 3.4.2. 0,1 N HNO₃ voor reiniging filtreerapparaat (indien geen wegwerp-filtreereenheden worden gebruikt)
- 3.4.3. Detergent voor het reinigen van monsternameapparatuur (bijv. Deconex)

3.5 MATERIAAL EN BENODIGDHEDEN (PAKKET W1.4.1 EN W1.4.2)

- 3.5.1. Draagbare GPS (optioneel)
- 3.5.2. Voldoende teflon en/of PE slangen voor bemonstering van totaal aantal monsters (met reserve)
- 3.5.3. Schuifpasser of meetlat met minimale onderverdeling 1 mm
- 3.5.4. Membraanfilters van 0,45 µm
- 3.5.5. Emmer met maataanduiding of weegschaal
- 3.5.6. Voldoende plastic en/of glazen monsterrecipiënten voor de te analyseren (fysico-) chemische parameters (voorgeconserveerd, indien conserveermiddel vereist). De richtlijnen m.b.t. het minimale volume water, de nodige conserveermiddelen en de te gebruiken recipiënten (bijv. plastic, glas,...) per parameter(groep) conform WAC/1/A/010 moeten gerespecteerd worden.
 - Indien de te analyseren parameter een bepaald conserveermiddel vereist conform WAC/1/A/010, wordt gebruik gemaakt van voorgeconserveerde monsterrecipiënten.
 - Elk recipiënt dient voorzien te zijn van een (voorgedrukte) label met vermelding van monstercodering, facultatief aanduiding plaats/locatie en datum monstername, analyseparameter(s) of andere eenduidige identificatie of link naar de analyseparameter(s), conserveermiddel (indien noodzakelijk).
- 3.5.7. Koelboxen met voldoende diepgevroren koelelementen of koelinstallatie om gekoeld transport van monsters te garanderen
- 3.5.8. Invulformulier voor veldregistraties (analoog of digitaal)
- 3.5.9. Absorberend papier

⁴ Volgens instructie fabrikant, reinigbaar en vlot in een peilbuis kan neergelaten en opgehaald worden

⁵ Drinkwater of leidingwater mag gebruikt worden, zolang het gebruik ervan geen aanrijking kan leveren aan de kwaliteit van het bemonsterde grondwater (bijv. nitraat,...)

3.5.10. Persoonlijke beschermingsmiddelen, afhankelijk van de omstandigheden van de monstername.

Wegwerphandschoenen en veiligheidsbril worden aanbevolen bij het vullen van recipiënten met conserveermiddelen.

3.5.11. Timer /klok / stopwatch

3.5.12. Fototoestel

4 VOORBEREIDING MONSTERNAME

Peilbuizen bestaan uit een kunststof of inox buis waarvan het onderste gedeelte (centimeters tot meters) geperforeerd is. Dit gedeelte, de filter, laat toe dat grondwater in de buis kan instromen. Het niet geperforeerde gedeelte van de peilbuis wordt omschreven als blinde buis of stijgbuis (zie ook BIJLAGE A).

Onder de filter wordt veelal ook een zandvang voorzien om eventuele vervuiling (slib, zand) onderaan op te vangen zonder de filter zelf te verstoppert. Deze kan een lengte hebben van enkele tientallen centimeters (bij ondiepe peilbuizen), tot verschillende meters (diepe peilbuizen). De onderkant van de peilbuis is bijgevolg niet steeds de onderkant van de filter.

Vóór de monstername van (grond)water kan aanvangen, is een goede identificatie van de peilbuis noodzakelijk. Deze identificatie houdt minimaal de kennis en/of opmeting van volgende aspecten in:

- datum plaatsing, evt. wachttijd na het plaatsen van peilbuizen
- plaatsing – filterstelling peilbuis (snijdend, niet-snijdend)
- controle aanwezigheid van drijf- en/of zinklagen
- opmeting grondwaterstand en peilbuiskarakteristieken t.o.v. referentiepunt
- controle ligging en peilbuiskarakteristieken met de aangeleverde gegevens t.b.v. de monstername (boorverslag, liggingsplan,...)

Voor de monstername van percolaatwater via peilputten op stortplaatsen worden in Bijlage E specifieke instructies gegeven.

4.1 INFORMATIE M.B.T. DE PLAATSING VAN DE PEILBUIS

4.1.1 NAGAAN FILTERSTELLING

De plaatsing van een peilbuis staat in functie van de beoogde toepassing: voor de opvolging van de waterkwaliteit bij grondwaterwinningen is de detectie van drijf- en zinklagen veelal niet van toepassing, terwijl bij peilbuizen geplaatst voor de opvolging van stortplaatsen, of lekdetectie bij mestopslagplaatsen of opslagtanks drijf- en zinklagen zeker een aandachtspunt zijn.

Voor het bemonsteren van (grond)water in peilbuizen is het belangrijk om te weten hoe de peilbuis geplaatst werd. Hierbij wordt een onderscheid gemaakt tussen:

- **snijdende peilbuis**, d.i. een peilbuis waarbij de filter de grondwatertafel snijdt (Figuur 1, bijlage A).

Voor de detectie van een mogelijke drijfslag of aanwezigheid van puur product ter hoogte van de grondwatertafel, wordt de filter altijd snijdend met de grondwatertafel geplaatst. Bij de filterplaatsing werd specifiek rekening gehouden met de lokale geologische opbouw, met

de natuurlijke schommeling van de grondwatertafel en met de locatie van eventuele verontreiniging (zie ook niet-snijdende peilbuis).

Voor monsternames met betrekking tot zware metalen en vluchtige componenten is een snijdende peilbuis in principe niet geschikt omwille van de vervluchtiging van opgeloste delen en beluchting van het (grond)water⁶. **Indien een snijdende peilbuis toch bemonsterd wordt m.b.t. metalen of vluchtige componenten, moet dit als opmerking op het verslag vermeld worden.**

Opmerking: bij monstername kan beluchting van het (grond)water plaatsvinden waarbij hydroxidevorming en complexvorming in het filterelement veroorzaakt wordt zodat de peilbuis geleidelijk aan minder en minder water zal geven.

Opmerking: de monstername van chemische parameters die niet vluchtig en niet oxideerbaar zijn via een snijdende peilbuis, is wel toegelaten, behalve indien de mogelijkheid van co-precipitatie reëel is.

- **niet-snijdende peilbuis**, d.i. een peilbuis waarbij de filter volledig in het verzadigde gedeelte van de watervoerende laag gelegen is (Figuur 2, bijlage A).

De diepte en de lengte van de filter kan worden bepaald door de geologische karakteristieken van het terrein en de verwachte locatie van de verontreinigingen. De lengte van de filter varieert meestal tussen 0,5 m en meerdere meters, in functie van de toepassing. In het geval van peilbuizen in volledig afgesloten watervoerende lagen (Figuur 3, bijlage A) is een minimale afstand van 1 m tussen de bovenkant van de filter en het "dak" van de watervoerende laag noodzakelijk.

De plaatsing (snijdend/niet-snijdend) dient gekend te zijn op basis van het 'boorverslag', en de diepte kan worden gecontroleerd ten opzichte van die op de boorstaat, en wordt genoteerd op het formulier voor veldregistraties en wordt overgenomen op het monsternameverslag. Deze informatie behoort in principe tot de werkopdracht voor monstername, en wordt bekomen via de boorbeschrijving, identificatie op de peilbuis zelf, via gegevens van de opdrachtgever en/of boorfirma die de peilbuizen geplaatst heeft.

Indien er geen informatie beschikbaar is over de plaatsing van de peilbuis, of deze gegevens verschillen met de vaststellingen op het terrein, moet dit als opmerking op het monsternameverslag vermeld worden en wordt de peilbuis verder voorgepompt en bemonsterd.

4.1.2 RESPECTEREN PERIODE TUSSEN DE PLAATSING VAN DE PEILBUIS EN MONSTERNAME

Het plaatsen van een peilbuis veroorzaakt verstoring van de geochemische gesteldheid van de ondergrond. Vlak na het plaatsen van een peilbuis kan de samenstelling door oplossing, complexvorming en dergelijke, veranderen. De aangebrachte kleistoppen hebben ook minimum 24 uur nodig om uit te zwellen. De periode tussen de plaatsing van een peilbuis en het starten met vervensen of voerpompen voor de monstername moet onderzoeksspecifiek vastgelegd worden; hierbij dient minimaal een periode van 1 week gerespecteerd worden.

Opmerking: De periode tussen de plaatsing van de peilbuis is afhankelijk van het type en de diepte van de boring. In sommige gevallen wordt het evenwicht pas na weken en zelfs maanden bereikt (bv. min. 6 weken wachttijd bij installatie freatisch meetnet), en wordt tevens bepaald door de hydrodynamische en hydrochemische randvoorwaarden (bv. snelheid grondwaterstroming).

⁶ Behalve wanneer het een snijdende peilbuis betreft die geplaatst werd voor 18/01/2012 (bron: CMA/1/A.2)

Indien de periode tussen plaatsing en monsternamen minder dan 1 week bedraagt, moet dit genoteerd en gemotiveerd worden op het formulier voor veldregistraties. Deze afwijking en motivatie dient tevens op het monsternamensverslag gerapporteerd te worden.

4.2 CONTROLE OP AANWEZIGHEID DRIJF- EN/OF ZINKLAGEN

Drijf- en zinklagen treden alleen op wanneer de retentiecapaciteit van de bodem wordt overschreden en mogelijks ook als er puur product ter hoogte van de grondwatertafel voorkomt (ook zonder drijf- en/of zinklaag kan er puur product voorkomen). Een drijf- en/of zinklaag heeft een dichtheid kleiner dan water. Zinklagen hebben een dichtheid groter dan water, en kunnen zich onderaan de peilbuis bevinden. De controle op de aanwezigheid van drijf- en zinklagen is noodzakelijk om te bepalen of de peilbuis nog geschikt is voor bepaling van de kwaliteit van het (grond)water, en is zeker relevant voor grondwateropvolging in peilbuizen rond stortplaatsen. Voor de opvolging van peilbuizen i.k.v. grondwaterwinningen, is deze bepaling overbodig, tenzij anders bepaald in de milieuvergunning.

De controle op drijf- en zinklagen gebeurt in één handeling met behulp van een elektronische drijf- en zinklagendetector. Dit is een peilapparaat dat specifieke licht- en/of geluidssignalen geeft wanneer het in contact komt met geleidende en niet-geleidende vloeistoffen. Een sensor aan het uiteinde van het peillint meet de geleidbaarheid en geeft bij de verschillende geleidbaarheden, geluid- en/of lichtsignalen (bv. continu en pulserend). Wanneer de sensor de drijf- en/of zinklaag bereikt, geeft deze een signaal. Als de sensor vervolgens verder in de peilbuis wordt neergelaten en het (grond)water bereikt, wordt een ander signaal gegeven. Als de sensor vervolgens nog dieper in de peilbuis wordt neergelaten en een zinklaag bereikt, wordt een ander signaal gegeven tot aan de onderkant van de peilbuis. Het hoogteverschil tussen het geven van de verschillende signalen is de dikte van de drijf- en/of zinklagen in de peilbuis. Op deze manier kan op een snelle en eenvoudige, doch vrij nauwkeurige wijze de dikte van een drijf- of zinklaag bepaald worden. Bij het meten van een drijf- en/of zinklaag moet er rekening mee gehouden worden dat olieproduct aan de sensor kan blijven hangen, waardoor een foutieve meting wordt uitgevoerd. Om dit tegen te gaan moet het overgangsvlak water/drijf- en/of zinklaag gemeten worden wanneer de sensor weer omhoog getrokken wordt vanuit het (grond)water.

Opmerking: de drijf- en/of zinklagdikte in peilbuis is een "schijnbare" dikte. De werkelijke dikte is moeilijk te bepalen. Enkel o.b.v. boringen met ongeroerde staalname kan de dikte van de puur productzone vrij goed worden ingeschat.

Opmerking: Indien met de drijf- en/of zinklagendetector een effectieve drijf- en/of zinklaag kon worden vastgesteld, is de sensor en het lint verontreinigd, en is een doorgedreven reiniging noodzakelijk alvorens deze opnieuw gebruikt wordt.

De elektronische drijf- en/of zinklagendetector kan eventueel als 'gewoon' peillint gebruikt worden voor het bepalen van de diepte van de peilbuis en het (grond)waterpeil (zie 3.2.4 en 3.3.2).

De hoogtemetingen en hoogteverschillen bij het geluidssignaal (dikte drijf- of zinklaag) worden genoteerd op het formulier voor veldregistraties. Deze metingen worden tevens vermeld op het monsternamensverslag.

Opmerking: de dikte van een drijf- en/of zinklaag in een peilbuis geeft veelal een overschatting van de werkelijke drijf- en/of zinklagdikte in de bodem. Puur product hoopt zich namelijk op in de peilbuis. De schijnbare dikte in de peilbuis kan enorm variëren en is o.a. afhankelijk van de (grond)waterstand.

In het geval voldoende puur product in de drijf- of zinklaag aangetroffen wordt in een peilbuis (dikte > ca. 1 cm), kan de laag bemonsterd worden met behulp van een vloeistoflaggenmonsternemer. Een monster van een drijf- of zinklaag kan ook genomen worden door de aanzuigslang van de slangenpomp op de juiste hoogte te positioneren.

In alle gevallen geldt dat, bij aanwezigheid van drijf- en/of zinklaag, het grondwater niet bemonsterd mag worden. Het verdere verloop van het grondwateronderzoek, of de mogelijkheid om de drijf laag te bemonsteren, moet besproken worden met de opdrachtgever.

4.3 OPMETING WATERSTAND EN PEILBUISKARAKTERISTIEKEN

Voor het inbrengen van de monsternameslang en het voerpompen wordt de waterstand en de diepte van de put(ten) bepaald met een peilapparaat ten opzichte van een vast punt. Het "vaste punt" voor de peilmetingen is meestal de rand van de peilbuis of het maaiveld. Het gebruikte vaste punt moet duidelijk vermeld in de veldregistraties en monsternameverslag.

Eerst wordt het waterpeil gemeten. Dit wordt uitgevoerd met een peillint met akoestisch en/of lichtsignaal. Daarna wordt de diepte van de peilbuis opgemeten met datzelfde peillint als de diepte <30 m of met een specifiek daarvoor voorzien dieptelood als de diepte van de put >30 m (zie 3.3.3). Deze opmetingen worden uitgedrukt in meter met twee cijfers na de komma, en genoteerd op het formulier voor veldregistraties.

De interne diameter van de peilbuis wordt opgemeten met een meetlat of schuifpasser (uitgedrukt in mm met minimaal 2 beduidende cijfers).

De opeenvolgende metingen zijn:

1. waterpeil G (in m) in de peilbuis t.o.v. vast punt
2. diepte D (in m) van de peilbuis (bodem) t.o.v. vast punt
3. interne diameter d (in cm of mm)
- vaststellen van afwijkingen (bijv. andere ligging of diepte van de put dan vermeld op het boorverslag of putschema), veranderingen, beschadigingen aan de putafwerking (bijv. water in putkelder of beschadigde koker met risico tot verontreiniging), peilbuis of filter (bijv. defecte peilbuiskop, veel slib aan het peillint). Afwijkingen vastleggen aan de hand van foto('s) en vermelding in het formulier voor veldregistraties.

Opmerking: sommige filters zijn artesisch en uitgerust met een manometer. Hier kan dan ook geen peil- en dieptemeting worden uitgevoerd. Wel dient de druk te worden afgelezen (in bar) en dient deze omgerekend te worden naar stijghoogte in m (1 bar wordt gerapporteerd als -10 m)

Speciale aandacht moet worden besteed aan het opmeten van multilevelputten (*Figuur 4* en *Figuur 5*, Bijlage A). Het komt immers vaak voor dat er meerdere peilbuizen voorkomen in éénzelfde boorgat. Het is bij deze putten zeker van belang dat men elke peilbuis in die put ook nauwkeurig opmeet.

Opmerking: de meldingen op de putdoppen of peilbuizen komen immers niet steeds overeen met de realiteit aangezien die wel eens 'verwisseld' worden.

De waterstanden en dieptes van alle peilbuizen moeten in **multilevelputten** eerst opgemeten worden vooraleer er in één van de peilbuizen wordt voorgepompt. De bemonstering is steeds de combinatie van voerpompen en monstername, altijd te beginnen met de meest ondiepe filters te bemonsteren, vervolgens de tweede minst diepe enz.... en het laatst de meest diepe.

Opmerking: een afpomping in één filter kan in bepaalde gevallen een andere filter 'beïnvloeden'. Afwijkingen van het initiële waterpeil in een peilbuis na het bemonsteren van een ondiepere peilbuis in dezelfde put worden genoteerd in het formulier voor veldregistraties.

4.4 KEUZE MONSTERNAMEMETHODE

Qua monsternamemethode wordt er een onderscheid gemaakt tussen 2 technieken:

- **“klassieke” methode:** het water wordt bij hogere pompdebieten (>500 ml/min, maar vaak >5 l/min) boven het filtergedeelte weggepompt. Dit voorpompen wordt beëindigd wanneer minimaal 5 keer het volume van *de waterkolom in de peilbuis* wordt opgepompt. Deze methode van voorpompen wordt in regel gevolgd door een monstername bij laag debiet (<500 ml/min).
- **“low flow purging/sampling” of “micro-purging”** : Bij deze techniek wordt het voorpompen uitgevoerd bij laag debiet (100-500 ml/min) ter hoogte van de filter. Dit voorpompen wordt beëindigd wanneer minimaal 5 keer de het volume van *de waterkolom in het filtergedeelte* wordt opgepompt. De low flow methode wordt vaak uitgevoerd in combinatie met een peristaltische pomp (slangenpomp).

Opmerking: Bij low flow purging/sampling wordt voorkomen dat gronddeeltjes uit de te bemonsteren laag vrijkomen, dat de natuurlijke toestroming van de watervoerende laag wordt overschreden, of dat het filtergedeelte aan de lucht blootgesteld wordt (waterpeil mag nooit onder de bovenkant van de filter komen te staan), tenzij het om snijdende peilbuizen gaat. Op deze manier wordt enkel het water in het filterdeel van de peilbuis ververs, en niet in het ‘dood volume’ boven de filter. Het voordeel van deze methode is dat de hoeveelheid opgepompt water hierdoor ook aanzienlijk beperkt wordt.

De opdrachtgever of monsternemer moet een **oordeelkundige keuze in de toe te passen monsternamemethode** opleggen resp. maken in functie van het specifieke doel van de monstername en de constructie, filterstelling (zie §4.1) en ouderdom van de peilbuis. De lage debieten bij “low flow purging” kunnen bovendien niet met alle pompsystemen behaald worden (ook afhankelijk van de situatie), of lage-debietpompsystemen (vaak vacuümtrekkende pompen) hebben een beperking qua opvoerhoogte. Maar ook andere beweegredenen kunnen de keuze van de monsternamemethode bepalen; in BIJLAGE B worden een aantal kenmerken van beide technieken besproken.

Voor de monstername van percolaatwater via peilputten op stortplaatsen worden in Bijlage E afwijkende voorwaarden bij de monsternamemethode gegeven.

De gebruikte monsternamemethode moet in elk geval gerapporteerd worden in het monsternameverslag.

4.5 KEUZE EN GEBRUIK POMPAPPARATUUR

De pompapparatuur wordt geselecteerd in functie van de gekozen monsternamemethode en moet tevens voldoen aan fysische vereisten bij de monstername zoals putdiepte, interne diameter van de peilbuis en waterpeil (opvoerhoogte), en mag tevens de fysico-chemische samenstelling van het bemonsterde water niet beïnvloeden.

Maar verder vormt het risico op contaminatie door de pompapparatuur een belangrijk criterium in de keuze van monstername-apparatuur. Het pomphuis dient uit inox of zo mogelijk uit teflon of ander inert materiaal vervaardigd te zijn om chemische reacties met het (grond)water zoveel mogelijk te vermijden. Alle delen van de monsternameapparatuur die in contact komen met (grond)water, moeten reinigbaar of vervangbaar zijn, zoniet is de betreffende pompapparatuur niet toelaatbaar voor gebruik binnen deze WAC.

In Tabel 1 worden de toepassingsmogelijkheden voor voorpompen en bemonstering van de toegelaten pomptechnieken voor grondwater⁷, weergegeven. Meer informatie over deze pomptechnieken wordt gegeven in BIJLAGE C.

⁷ Voor percolaatwater: zie BIJLAGE E

Tabel 1: Toepassingsmogelijkheden van pompapparatuur voor monsternamen van grondwater in peilputten

	Max. waterpeil (m-mv)	Min. benodigde binnendiameter (mm)	evaluatie toepasbaarheid voor monsternamen van grondwater				"standaard"-apparatuur voor monsternamen van peilbuizen <30 m-mv (pakket W.1.4.1)
			Geschiktheid voor voerpompen en monsternamen	Geschiktheid voor in-line filtratie	Risico op kruiscontaminatie	Geschiktheid voor analyse op VOC	
Slangenpomp of peristaltische pomp	7	25	+	+	+ ^g	+	ja
Balgpomp	40	25	+	+	+/- ^b	-	
Dubbele kleppomp	150	25 of 50 (type-afhankelijk)	+	+	+		
Pulsslang (kogelkleppomp)	60	25	+	+/-	- ^g	+	
Dompelpomp (onderwatercentrifugaal-pomp)	80 ^e	50 ^e	+	+	+/- ^b	+	ja
	200 ^f	85 à 90 ^f					
12 V pompjes (DC-pompjes) ⁸	9 (18,27,35) ^a	37	+ ^c	+	+/- ^{b, c}	+	
+ geschikt +/- weinig geschikt - niet toegelaten binnen deze WAC-procedure a indien resp. 1, 2 of 3 boosterpompsjes gekoppeld worden b mits spoelen van pomp+slang met zuiver water van drinkwaterkwaliteit ⁵ na elk gebruik en geen visuele verontreiniging (binnen- en buitenkant) van de opvoerslang of vervanging van volledige slang c enkel eenmalig gebruik pomp/booster toegelaten binnen deze WAC-procedure e specificaties geldend voor type Grundfos MP1-pomp f specificaties geldend voor type Grundfos SQE-pomp g mits volledige vervanging van slangen							

Bij de keuze van de pomptechniek moet de haalbaarheid van de lage debieten voor het voerpompen en/of de eigenlijke monsternamen (verplicht bij laag debiet) overwogen worden.

Bij de klassieke methode kan in principe een combinatie van 2 pomptechnieken voor voerpompen (zie §5.1) en monsternamen (zie §5.4) gemaakt worden. Het voerpompen en monsternamen gebeurt echter bij voorkeur met éénzelfde pomp(systeem). Het veranderen van pomp(systeem) is enkel toegelaten indien de monsternamen technisch (omwille van opvoerhoogte) niet kan uitgevoerd worden met het pomp(systeem) dat bij het voerpompen gebruikt werd, én op voorwaarde dat een minimale hoeveelheid water met de 2^e pomp onttrokken wordt.

Het wisselen van pompsysteem tijdens of na het voerpompen is niet toegelaten indien het principe van low flow purging toegepast werd. Door het wisselen van pompen wordt het ververste water ter hoogte van de filter dan gemengd met de niet-ververste waterkolom boven het filtergedeelte.

Voor de monsternamen van percolaatwater via peilputten op stortplaatsen worden in Bijlage E afwijkende voorwaarden bij de keuze van de pompapparatuur gegeven.

⁸ Deze zijn slechts eenmalig te gebruiken

Indien de monsternamen via de aangehaalde pomptechnieken niet mogelijk is, en er toch een monster van het aanwezige water in de peilbuis dient genomen te worden, kunnen alternatieve monsternametechnieken toegepast worden (zie Bijlage C.3).

Aandachtspunten

- In regel wordt voor *elke peilbuis een nieuwe aanzuig- of opvoerslang* gebruikt, die ook na elke monsternamen wordt verwijderd.
- Bij gebruik van onderwaterpompen (m.u.v. 12 V pompjes⁸) wordt op deze regel een uitzondering gemaakt (indien slang >10 meter):
 - *de slang moet minimaal jaarlijks* vervangen worden of zodra deze een visuele verontreiniging van binnen –en/of buitenkant aanwezig blijft na spoelen met zuiver water en/of detergent.
 - Indien onderdelen (vb. stroomkabel) aan een aanzuig- of opvoerslang dienen te worden vastgemaakt mag dit enkel met behulp van kabelbinders gebeuren en zeker niet door gebruik te maken van kleeftape of lijm.
 - na elke peilbuis wordt de opvoerslang en pomp volledig gespoeld met zuiver water van drinkwaterkwaliteit⁵.
 - *Op het einde van de monsternamedag* wordt grondig gespoeld met *warm water en detergent* en overvloedig nagespoeld met zuiver water van drinkwaterkwaliteit⁵.
- *Elke spoeling, vervanging en/of onderhoudsbeurt wordt genoteerd in een logboek.*
- Turbulentie en belvorming in de slangen moet worden vermeden, zowel bij voerpompen (meting veldparameters) als bij het nemen van de monsters zelf.

5 MONSTERNAME VAN (GROND)WATER

De monstername van water via peilbuizen of -putten bestaat steeds uit een combinatie van het verversen van het aanwezige water in de peilbuis (zie §5.1) en de eigenlijke monstername (zie §5.4). De eigenlijke monstername kan pas aanvangen wanneer de peilbuis voldoende verversst werd.

5.1 VERVERSEN VAN DE PEILBUIS OF VOORPOMPEN

Voor de eigenlijke monstername moet een peilbuis worden 'ververst' of voorgepompt zodat (grond)water van de watervoerende laag naar de peilbuis stroomt en in situ-water kan worden bemonsterd.

5.1.1 VOLUME VOORPOMPEN

5.1.1.1 LOW FLOW PURGING

Een peilbuis wordt **minimaal** verversst totdat aan volgende criteria voldaan werd:

- een gepompt volume via het principe van 'low flow sampling' dat overeenkomt met **5 x de waterkolom in het filtergedeelte** (F-D) van de peilbuis
- **en** totdat de in situ gemeten veldparameter **geleidbaarheid gestabiliseerd** is (zie §5.1.4).

Het (enkelvoudig) volume van het water in het filtergedeelte (V_F , in l) wordt als volgt berekend:

$$V = \frac{\pi \times (d / 2)^2 \times (D - F)}{10}$$

Met:	d	interne diameter peilbuis (cm)
	F	diepte bovenkant filterdeel t.o.v. vast punt (m)
	D	diepte peilbuis t.o.v. vast punt (m)
	D-F	lengte waterkolom in het filtergedeelte (m)

Opmerking: Bij sommige putten heeft de filter een kleinere diameter (om boorkosten te drukken). Deze vernauwing kan, zeker voor diepe peilputten, een aanzienlijk verschil uitmaken in de berekening van de inhoud van de peilbuis en het af te pompen volume.

Wanneer niet aan deze criteria kan voldaan worden, moet meer volume water voorgepompt worden: minimaal 5 x waterkolom in de peilbuis (G-D d.i. waterkolom in filter én in stijgbuis) cfr. 5.1.1.2.

Voor de monstername van percolaatwater via peilputten op stortplaatsen worden in Bijlage E afwijkende voorwaarden bij het voorpompen gegeven.

5.1.1.2 KLASSIEKE MONSTERNAME METHODE

- Een peilbuis wordt **minimaal** verversst met een volume dat overeenkomt met:
 - 5 x de lengte van de waterkolom in de peilbuis ('natte' inhoud peilbuis)
 - **en** wanneer de in situ gemeten veldparameters **pH en geleidbaarheid** (en/of opgeloste zuurstof) **gestabiliseerd** zijn.

Het (enkelvoudig) volume van het water in de peilbuis (V_p , in l) wordt als volgt berekend:

$$V = \frac{\pi \times (d / 2)^2 \times (D - G)}{10}$$

Met:	d	interne diameter peilbuis (cm), zie opmerking 5.1.1.1
	G	(grond)waterpeil t.o.v. vast punt (m) of evenwichtspeil ($G_{\text{evenwicht}}$) tijdens het pompen van peilbuizen met slechte toestroming (zie § 5.3)
	D	diepte peilbuis t.o.v. vast punt (m)
	D-G	lengte waterkolom in de peilbuis (m)

Voor de monsternamen van percolaatwater via peilputten op stortplaatsen worden in Bijlage E afwijkende voorwaarden bij het voorpompen gegeven.

5.1.2 UITVOERING VOORPOMPEN

5.1.2.1 ALGEMEEN

- Bereken de hoeveelheid voor te pompen (grond)water (§5.1.1) in functie van de gekozen monsternamemethode, en noteer op het formulier voor veldregistraties.
- Kies een pomp in functie de gekozen monsternamemethode, diepte peilbuis, GWS en diameter van de peilbuis volgens Tabel 1, BIJLAGE B en BIJLAGE C .
Indien het principe van low flow purging/sampling wordt toegepast, ga verder met §5.1.2.2; indien de klassieke methode toegepast wordt, ga verder met §5.1.2.3
- Zuig eventueel het bezinksel op de bodem voorzichtig weg. Sluit de doorstroomcel pas aan nadat het bezinksel weggezogen is om verontreiniging van de doorstroomcel te vermijden.
- Bepaal steeds het effectieve volume van het afgepompte water tijdens het voorpompen: in een emmer met schaalverdeling, via massabepaling met een weegschaal, of via het pompdebiet en -tijd na stabilisatie van het waterpeil en extrapolatie naar opgepompt volume water. Noteer het effectieve afgepompte volume water op het formulier voor veldregistraties.
- De pomp mag na het voorpompen in geen geval stilgelegd worden; het pompdebiet wordt overgeschakeld naar het debiet bij monsternamen (§5.4).

5.1.2.2 LOW FLOW PURGING

- Hang de aanzuigopening (slang of onderzijde pomp) ter hoogte van de filter. Op deze manier wordt het voorpompen uitgevoerd enkel in het filterdeel van de peilbuis, en niet in het 'dood volume' boven de filter. De bovenliggende waterkolom wordt op deze wijze niet "ververst".

Opmerking: Het gebruik van packers⁹ is zeker nuttig bij 'low flow sampling'.

Opmerking: De aanzuigopening hoger positioneren dan net boven het filterdeel, is toegelaten op voorwaarde dat minimaal 5 x de waterkolom in de peilbuis voorgepompt wordt (klassieke monsternamen, zie 5.1.2.3).

- Start het voorpompen bij een debiet van max. 500 ml/min. Voerpompen bij snijdende peilbuizen moet uitgevoerd worden bij een debiet van 100 ml/min.
- Koppel een (luchtdichte) doorstroomcel aan de uitstroomopening en laat het opgepompte water door de doorstroomcel stromen.
- Peil het waterpeil in de peilbuis continu tijdens het voorpompen:

⁹ Dit is een soort ballon die via de slang in de put wordt gebracht en boven de filter wordt opgeblazen. Op deze manier is de bovenliggende waterkolom in de stijgbuis afgesloten en is men zeker dat enkel de onderliggende waterkolom ververst wordt.

- o het waterpeil mag niet meer dan 50 cm dalen ten opzichte van het waterpeil G voorafgaand aan het voerpompen en mag niet onder de bovenzijde van de filter zakken (tenzij het om een bestaande snijdende peilbuis gaat). Als het waterpeil te veel daalt, moet de pompsnelheid verlaagd worden (in stappen van 100 ml/min) totdat het waterpeil zich stabiliseert. Een minimale pompsnelheid van 100 ml/min mag evenwel worden aangehouden.
- o **Peilbuizen >30 m-mv** mogen voorgepompt worden met een debiet hoger dan 500 ml/min, op voorwaarde dat de 'natuurlijke' toestroming van het (grond)water niet overschreden wordt (stabilisatie - evenwichtspeil). Een daling van het (grond)waterpeil in de peilbuis ~~tot~~ > 50 cm is hierbij toegelaten, op voorwaarde dat de peildaling aantoonbaar gedocumenteerd word en niet onder de bovenzijde van de filter komt. Indien er geen stabilisatie (evenwichtspeil) bereikt worden moet hiervan melding gemaakt worden op het monsternameverslag
- Het evenwichtspeil wordt genoteerd op de veldregistraties.
- Het voerpompen kan worden beëindigd indien aan de criteria in §5.1.1.1 wordt voldaan.

5.1.2.3 KLASIEKE MONSTERNAME

- Positioneer de aanzuigopening boven het filterdeel .
- Start het voerpompen bij een debiet > 500 ml/min, op voorwaarde dat het water continu gepeild wordt en het pompdebiet zo ingesteld wordt dat er stabilisatie van het waterpeil optreedt. Het filtergedeelte mag hierbij niet aan de lucht blootgesteld worden (waterpeil mag nooit onder de bovenkant van de filter komen te staan), tenzij het om snijdende peilbuizen gaat.
- Koppel een (luchtdichte) doorstroomcel aan de uitstroomopening en laat het opgepompte water door de doorstroomcel stromen. De doorstroming van hoge debieten door de doorstroomcel kan problemen veroorzaken (lek dichtheid). Een driewegventiel of bypass-mogelijkheid voor de doorstroomcel is hier aangewezen.
- Het evenwichtspeil wordt genoteerd op de veldregistraties.
- Het voerpompen wordt beëindigd indien aan de criteria in §5.1.1.2 wordt voldaan.

Let op: als er met (te) hoge debieten in of ter hoogte van het filtergedeelte wordt gepompt, bestaat het risico van beschadiging van de filter in geval van drukverhoging door enorme peilverlaging (vooral bij diepe filters). Ook kan er zand/ slib mee opgezogen worden waardoor de pomp beschadigd kan worden.

5.1.3 OPVOLGEN VELDPARAMETERS TIJDENS VOERPOMPEN¹⁰

- Bij het voerpompen worden in een luchtdicht afgesloten doorstroomcel minimaal de parameters geleidbaarheid en pH opgemeten, en, voor een complete monitoring, ook redoxpotentiaal en het zuurstofgehalte (zie §5.2). Op deze manier komen grondwater noch elektrode in contact met de (versturende) atmosfeer tijdens de meting. Eventueel resterende openingen (voor bijkomende sondes) in het deksel van de doorstroomcel worden met dopjes luchtdicht afgesloten.
- Tijdens de metingen van de parameters in de doorstroomcel mag het pompen niet stilgelegd worden.

Tijdens de meting van de redoxpotentiaal en het zuurstofgehalte dient gelet te worden op het ontstaan van luchtbelletjes nabij de elektrode in de doorstroomcel. Indien luchtbelletjes aanwezig zijn dient het debiet van de pomp te worden aangepast (verlaagd) en/of dient de luchtdichte sluiting van het pompsysteem en de doorstroomcel gecontroleerd te worden. Bij een

¹⁰ voor grondwater

slechte toestroming van (grond)water zijn luchtbelletjes niet te vermijden. De metingen worden zo sterk verstoord dat de gemeten waarden voor zuurstof en redoxpotentiaal volkomen onbetrouwbaar en dus weinig bruikbaar zijn (hooguit indicatief).

5.1.4 STABILISATIE VELDPARAMETERS¹⁰

Om stabilisatie van veldparameters vast te stellen worden er minimaal 3 metingen van de opgevolgde veldparameters uitgevoerd en geregistreerd:

- de startwaarde(n) bij aanvang voerpompen
- een tussenwaarde(n) tijdens het voerpompen
- de gestabiliseerde eindwaarde(n) aan het einde van het voerpompen

Een meting van veldparameters wordt afgelezen bij doorstroming door de doorstroomcel over een tijdsperiode van 1 minuut.

Stabiliteit van de veldparameters wordt bereikt wanneer de voorgaande meting:

- maximaal 1% afwijkt van de gemeten waarde voor geleidbaarheid (EC) voor meetwaarden > 500 $\mu\text{S}/\text{cm}$ of maximaal 5 $\mu\text{S}/\text{cm}$ afwijkt voor meetwaarden $\leq 500 \mu\text{S}/\text{cm}$;
- maximaal 0,1 pH-eenheden afwijkt voor pH;
- maximaal 0.2 mg/l (voor waarden <2 mg/l) of 0.4 mg/l (voor waarden >2 mg/l) voor opgeloste zuurstof (O_2);
- maximaal 0,2°C afwijkt voor temperatuur (T).

Tussen 2 metingen moet minimaal het volume van de doorstroomcel mét de aanzuigslangen doorgepompt zijn.

Wanneer geen stabiliteit van (bepaalde) veldparameter(s) wordt bereikt wordt dit genoteerd in de veldregistraties.

5.2 METINGEN TER PLAATSE BIJ DE MONSTERNAME VAN (GROND)WATER

De gestabiliseerde eindwaarden na het voerpompen worden gerapporteerd op het analyseverslag. Veldmetingen van pH, T, Ec, O_2 (en ORP) via meting in afzonderlijke, beluchte meetrecipiënten kunnen niet worden aanvaard. Voor de meting zelf, kalibraties en controles van voornoemde parameters wordt verwezen naar WAC/I/A/011.

In specifieke gevallen kan ook het opmeten van bijkomende parameters door middel van ion-selectieve electrodes (e.g. H_2CO_3 , HCO_3^- , CO_3^{2-} , Fe^{++} , S^{2-}) voorafgaand aan de monstername, gewenst zijn.

Na het voerpompen en stabilisatie van de veldparameters en vóór bemonstering wordt de troebelheid aan de hand van een turbiditeitsmeter bepaald en de waarde wordt genoteerd op de veldregistraties.

Opmerking: de meting van de troebelheid dient ter plaatse gemeten te worden voordat de recipiënten gevuld worden (§5.4.2). Analyse van de troebelheid in het labo is niet toegelaten.

Opmerking: bij gestabiliseerde waarden van de veldparameter(s) zou de meting van de troebelheid 10 FNU (Formazine Turbidity Units) of lager moeten aangeven.

5.3 PEILBUIZEN MET 'SLECHTE' TOESTROMING

Men spreekt van een slechte toestroming indien:

- i. Low flow: het waterpeil zelfs bij voorpompen bij een zeer laag debiet (100 ml/min) meer dan 50 cm daalt én er ook geen stabilisatie van het (grond)waterpeil wordt bereikt.
- ii. Klassieke monstername: er (zelfs na verlagen van het pompdebiet) geen stabilisatie van het waterpeil wordt bereikt

Volgende situaties kunnen worden onderscheiden:

- Er is zodanig voorgepompt dat de veldparameter(s) zijn gestabiliseerd, maar onvoldoende voor 5 x het te verversen volume; de filter staat nog volledig onder water en is tijdens het voorpompen niet belucht. De monstername kan gewoon doorgaan, indien minimaal 3 x het te verversen volume werd opgepompt. Op het formulier voor veldregistraties en monsternameverslag wordt "slechte toestroming" en het aantal verversingscycli bij het voorpompen als afwijking genoteerd.
- De filter werd gedeeltelijk belucht tijdens het voorpompen. De in-line bepaling van veldparameters zoals O₂ en redoxpotentiaal (en temperatuur) is zinloos.

Indien toch een monster wordt genomen, zorg ervoor dat er voldoende water in peilbuis is om alle nodige monsterrecipiënten te vullen. De monstername dient evenwel binnen 24 h na voorpompen uitgevoerd te worden. Op het formulier voor veldregistraties en monsternameverslag wordt minimaal 'slechte toestroming / beluchting tijdens monstername' als afwijking vermeld met bijhorende motivatie.

Desgevallend wordt, in overleg met de opdrachtgever, overwogen of het herplaatsen van een peilbuis met een betere voeding nodig/mogelijk is.

Indien het opgepompte water troebel blijft dient dit op het formulier voor veldregistraties en monsternameverslag (+ eventuele foto's van de doorstroomcel) genoteerd te worden.

5.4 EIGENLIJKE MONSTERNAME

Als het water ter hoogte van het filtergedeelte voldoende verversst werd (zie §5.1), kan de eigenlijke monstername aanvangen. De monstername wordt uitgevoerd bij laag debiet.

5.4.1 UITVOERING

- De monstername volgt onmiddellijk op het voorpompen. De pomp moet voldoen aan de voorwaarden vermeld in Tabel 1 in Bijlage B.
- Koppel doorstroomcel af of sluit de toevoer van de driewegventiel of bypass naar de doorstroomcel
- De monstername gebeurt altijd ter hoogte van het filterelement. Positioneer de aanzuigopening (slang of onderzijde pomp) halverwege de filter (low flow) of ter hoogte van de bovenzijde van het filterdeel (klassieke methode). Let er op dat de aanzuigopening minimaal 0,5 m boven de onderzijde van de filter geplaatst is. Tijdens de monstername mag het waterpeil niet zakken tot in het filterdeel (filter belucht), tenzij de monstername wordt uitgevoerd op een bestaande snijdende peilbuis.

Voer de monstername uit bij hetzelfde of een lager pompdebiet dan bij het voorpompen. Eventueel wordt het debiet in de monsternameslang bijkomend 'gesmoord' (bijv. via by-pass of met dunnere slang in opvoerslang). Het debiet waarmee de recipiënten gevuld wordt, komt overeen met:

- o algemeen: 100-200 ml/min (richtinggevend), afhankelijk van de te analyseren parameters

- o snijdende peilbuizen: 100 ml/min (richtinggevend)
 - o monstername vluchtige parameters: monsternamedebiet 100-200 ml/min (dwingend)
- Vul de benodigde recipiënten voor de analyses conform §5.4.2. Zorg dat de slang waarmee de recipiënten gevuld worden, proper is langs de binnen- en buitenzijde.
- Monstername met betrekking tot vluchtige parameters (VOC) of zware metalen mag enkel gebeuren uit peilbuizen met een niet-snijdende filterstelling, behalve wanneer het bestaande snijdende peilbuizen betreft die geplaatst werden voor 18/01/2012.
- Het is niet toegelaten om mengmonsters uit verschillende peilbuizen te maken (tenzij uitdrukkelijk opgelegd door de opdrachtgever en mits melding op het monsternameverslag).

5.4.2 VULLEN VAN RECIPIËNTEN

Daar de verschillende analytische methodes verschillende conserveringen vereisen, wordt het water opgevangen in verschillende monsterrecipiënten en ter plaatse geconserveerd. Voor de specifieke richtlijnen voor conservering en behandeling van watermonsters wordt verwezen naar WAC/I/A/010. **Bij voorkeur wordt gebruikt gemaakt van voorgeconserveerde recipiënten** (indien conserveermiddel nodig is). De maximale bewaartermijn van de conserveermiddelen dient steeds gerespecteerd te worden.

De verschillende monsterrecipiënten worden net voor het vullen geopend. Indien de dop zonodig dient neergelegd te worden, leg deze dan omgekeerd op een proper oppervlak.

Om contaminaties en/of verliezen van de beoogde analyseparameter te vermijden moeten de verschillende monsterrecipiënten in een welbepaalde volgorde gevuld worden. Voor nadere instructies i.v.m. de volgorde wordt verwezen naar §0.

Luchtinslag bij het vullen van de recipiënten moet worden vermeden door:

- het recipiënt recht houden
- de PE-slang tot onderaan in het recipiënt brengen
- het contact tussen de PE-slang en de stijgende vloeistof in het recipiënt minimaal houden (max. 0,5 cm)
- de PE-slang mee opvoeren langs de wand met de stijgende vloeistofspiegel
- na afvulling van een recipiënt met conserveermiddel, het gedeelte van de slang dat in het recipiënt werd gebracht verwijderen (i.e. afknippen) alvorens een volgend recipiënt te vullen.

De recipiënten moeten belvrij worden afgevuld. Een minimale overvulling, waarbij gelet wordt op een beperkt verlies van conserveermiddel (meestal in overmaat aanwezig), is toegelaten (i.e. voorzichtig vullen tot een bolvormig scheidingsvlak tussen vloeistof en lucht ontstaat, welke vervolgens onmiddellijk wordt 'doorbroken' door de schroefdop aan te brengen). Indien na bemonstering blijkt dat luchtbellens in een recipiënt aanwezig zijn, kunnen deze recipiënten voorzichtig worden bijgevuld, met uitzondering van de recipiënten voor VOC (opnieuw afvullen in nieuwe recipiënt).

Vermijd overlopen van voorgeconserveerde monsterrecipiënten om verlies van het conserveermiddel te vermijden. Bij overlopen moet steeds een nieuwe monsterrecipiënt voor de parameter(s) in kwestie gevuld worden. Zorg dus steeds voor voldoende extra monsterrecipiënten van de te analyseren parameters.

5.4.3 VULVOLGORDE

Bij het vullen van de monsterrecipiënten dienen onderstaande instructies gerespecteerd te worden:

1. Recipiënt(en) zonder conserveringsreagentia
2. Recipiënten met vaste conserveringsreagentia
3. Recipiënt(en) met vloeibare conserveringsreagentia

Bij het vullen van recipiënten met conserveringsmiddelen dient rekening gehouden te worden met een volgorde van vullen om contaminatie van een volgend monster via de conserveringsreagentia te vermijden. Voorbeeld: een recipiënt bestemd voor nitraatbepaling mag niet volgen op het vullen van een recipiënt met salpeterzuur. Een recipiënt metaalanalyse mag niet gevuld worden na het vullen van een recipiënt met kaliumdichromaat wegens risico op Cr-contaminatie.

Alle handelingen bij het vullen moeten zo snel mogelijk na elkaar volgen. Het is dan ook zeker zinvol en tijdsbesparend om de vulvolgorde van monsterrecipiënten kenbaar te maken op de recipiënten (via nummering of codering). Hierbij worden enkel door het laboratorium aangeleverde monsterrecipiënten gebruikt, die proper gestockeerd en lekdicht afgesloten zijn.

Eventuele richtlijnen qua vulling (bijv. geen vrije ruimte) in WAC/I/A/010 moeten gerespecteerd worden.

Afwijkingen m.b.t. vulvolgorde zijn enkel toegelaten mits duidelijke motivatie ervan in het monsternameverslag.

5.4.4 FILTRATIE GRONDWATERMONSTERS¹¹

5.4.4.1 METALEN

De grondwatermonsters voor metalen worden ter plaatse gefiltreerd om bodemdeeltjes en daaraan geadsorbeerde parameters, te verwijderen. Het grondwater wordt gefiltreerd over een filter met poriegrootte 0,45 µm. Eventueel kan deze worden gecombineerd met een grovere (voor)filter om dichtslibben te vermijden.

Opmerking: Door kwikadsorptie aan de filtermembranen kunnen kwikconcentraties onderschat worden.

De filters, alsook het filtreerapparaat zelf, mogen de te analyseren parameters niet beïnvloeden. Voor het filtreerapparaat wordt bij voorkeur gebruik gemaakt van een in-line filter die in serie is geplaatst tussen de peilbuis en de te vullen recipiënt. Het toetreden van buitenlucht wordt hierbij vermeden. Het filtreerapparaat bestaat uit een bovenplaat met inlaatopening, zeven ter ondersteuning van de 0,45 µm filter, afdichting en een onderplaat met uitlaatopening. Na elk gebruik moet het volledige apparaat grondig gereinigd worden m.b.v. 0,1 N HNO₃ en vervolgens 2 maal nagespoeld met gedemineraliseerd water. Minstens 1 maal per week, maar bij voorkeur aan het einde van elke monsternamedag, moet het toestel gereinigd worden met warm water en detergent. Het risico op contaminatie is reëel bij onvoldoende reiniging. Er bestaan ook plastic wegwerpfiltreereenheden met in- en uitlaatzijde, welke slechts éénmalig gebruikt kunnen worden.

¹¹ Voor de monstername van percolaatwater via peilputten op stortplaatsen worden in Bijlage E afwijkende voorwaarden bij de monsterbehandeling gegeven.

5.4.4.2 ANDERE ANORGANISCHE PARAMETERS

Voor anorganische parameters wordt vooraf WAC/I/A/010 geconsulteerd. Indien filtratie ter plaatse voor de parameter in kwestie relevant is, is de instructie in WAC/I/A/010 als opmerking opgenomen.

5.4.4.3 ORGANISCHE PARAMETERS

Organische parameters (VOC, PAK, minerale olie, ...) worden in regel niet gefiltreerd ter plaatse.

Voor verdere monsterbehandeling bij aankomst in het labo wordt verwezen naar de desbetreffende WAC-procedure

5.4.5 AANDACHTSPUNTEN

Volgende voorzorgen worden genomen om contaminatie van de monsters te beletten:

- Enkel door het laboratorium aangeleverde (voorgeconserveerde) recipiënten gebruiken, die proper gestockeerd en lekdicht afgesloten zijn.
- Het handgespannen en lekdicht afsluiten van alle recipiënten na het vullen controleren
- De monsters zo snel mogelijk koel en van het licht afgeschermd stockeren vóórdat ze naar het laboratorium getransporteerd worden.

5.5 RICHTLIJNEN M.B.T. SPECIFIEKE ANALYSEPARAMETERS

5.5.1 PFAS

Wanneer monsternames gebeuren in het kader van PFAS-analyses, moet rekening worden gehouden met volgende richtlijnen:

- ~~Bij monstername mag enkel gebruik worden gemaakt van materialen die geen PFAS afgeven/uitlogen. In de mate van het mogelijke moet nagegaan worden (bij de leverancier / aan de hand van analyses) of het materiaal gebruikt bij de monstername voor analyse op PFAS, PFAS kan bevatten.~~
- Alle monsternameslangen van de pompen moeten worden vervangen vóór de monstername.
- ~~Andere monstername-apparatuur en benodigdheden mogen enkel gebruikt worden indien aangetoond is dat ze geen PFAS boven de LOQ uitlogen in het waterstaal.~~
- Elk rechtstreeks contact met het monster moet worden vermeden, dit houdt ook rechtstreeks contact van het monster met de handschoenen in. Het is bijgevolg noodzakelijk om een gereinigd hulpmiddel te gebruiken om het staal te nemen.
- Reinigen van materiaal:
 - o enkel met water van drinkwaterkwaliteit;
 - o bij de toepassing van reinigingsmiddel mag enkel gebruik gemaakt worden van PFAS-vrije detergenten en moet grondig worden nagespoeld.
- Het gebruik van koelelementen wordt toegestaan onder de volgende voorwaarden:
 - o de koelelementen vertonen geen lekken;
 - o alleen harde koelelementen worden toegestaan, de flexibele koelelementen niet omdat ze een grotere kans op scheuren hebben.
- Er wordt geen beperking opgelegd in te dragen regen-, veiligheids- en andere kledij indien aan volgende voorwaarden wordt voldaan:
 - o rechtstreeks contact met het staal moet worden vermeden;
 - o afloop van hemelwater via de kledij in het staal moet worden vermeden;
 - o ~~kledij aangewend bij staalname mag niet worden gewassen met wasverzachter.~~
- Waterstalen voor de analyse van PFAS worden niet gefiltreerd.

- Richtlijnen met betrekking tot conservering en recipiënten zijn opgenomen in de procedure WAC/1/A/010.

6 VELDREGISTRATIES

Bij elke monstername via peilputten worden ter plaatse veldregistraties gemaakt. Dit kan bijvoorbeeld door gebruik te maken van een 'monsternameformulier'.

Alle uitgevoerde handelingen dienen geregistreerd te worden op het monsternameformulier. Afwijkingen van de beoogde methode dienen ook steeds geregistreerd en gemotiveerd (reden van afwijkingen) te worden.

De veldregistraties moeten door het uitvoerend laboratorium bewaard worden voor eventuele latere terugkoppeling.

Minimale informatie die op het monsternameformulier dient vermeld te worden, zijn:

- monsternameinstantie en identificatie monsternemer
- datum en uur van de monstername
- plaats en locatie van de monstername + situering van de peilbuis (eventueel een foto of schets)
- eventueel opgemeten GPS-coördinaten van de peilbuis
- filterstelling/plaatsing van de peilbuis (snijdend / niet-snijdend)
- aanwezigheid drijfslag / aanwezigheid zinkslag
- vermelding van het gebruikte vast punt, opmetingen van (grond)waterpeil t.o.v. vast punt en peilbuis karakteristieken
- toegepaste methode voorpompen (low flow of klassiek)
- theoretisch (berekend) en werkelijk volume van het voorgepompte water
- type pomp gebruikt voor voorpompen en monstername en ophangdiepte
- tijdsinterval voorpompen (aanvang en einde voorpompen)
- registratie van de opgevolgde veldparameters tijdens de spoeling
- afwijkingen indien slechte toestroming
- meetwaarden van begin-, tussen- en gestabiliseerde eindwaarde(n) van veldparameters
- diepte van de monstername t.o.v. vast punt
- tijdsinterval waarover monstername uitgevoerd werd (tijdstip aanvang en einde)
- pompdebiet en waterpeil bij monstername
- aantal recipiënten die ter analyse gevuld werden en de gegevens die noodzakelijk zijn voor het identificeren van de monsters zoals vermeld op het etiket
- omstandigheden die de monstername mogelijk beïnvloed hebben (weer, omgeving, contaminaties,...)
- afwijkingen t.o.v. de procedure en de reden afwijking
- vermelding van eventuele schade aan de peilput (koker, peilbuis, filter, slechte identificatie, slechte toestroming, metingen niet in overeenstemming met het aangeleverde putschema, risico op verontreiniging,...). (Eventueel met foto)

7 RAPPORTERING

Van elke monstername dient een verslag conform WAC/VI/A/004 opgemaakt te worden. Dit monsternameverslag kan ook geïntegreerd worden met analyseverslag. Naast de nodige gegevens cfr. §5 van WAC/VI/A/004, moet het monsternameverslag minimum volgende gegevens bevatten:

- reden monstername (peilbuis rond stortplaats, grondwaterwinning, ...)
- veldgegevens:
 - o beschrijving plaats en locatie van de monstername + situering van de peilbuis
 - o vast punt, opmetingen van (grond)waterpeil t.o.v. vast punt en peilbuis karakteristieken (diameter, diepte, filterlengte en -stelling)
 - o aanwezigheid drijfslag / aanwezigheid zinkslag (enkel voor peilputten rond stortplaatsen)
 - o toegepaste methode voerpompen (low flow of klassiek), peilbuisinhoud (klassiek)/filterinhoud (low flow) en effectief volume voorgepompt water
 - o toestroming in de peilbuis (goed/slecht, eventuele afwijkingen en/of evenwichtspeil)
 - o meetwaarden van veldparameter(s) (na stabilisatie) en van troebelheid

8 TRANSPORT

De maximale bewaartermijnen van watermonsters conform WAC/I/010 zijn van toepassing vanaf het tijdstip (datum/uur) van de monstername. De monsters dienen dan ook tijdig aan het analyselaboratorium geleverd te worden zodat de houdbaarheid gerespecteerd kan worden. Eventueel moet de monsternemer afspraken maken m.b.t. de levering aan het analyselaboratorium, zodat het laboratorium zich kan houden aan deze houdbaarheidstermijn (bijv. spoedanalyse op voorhand plannen).

Elke blootstelling aan licht en hitte moet te allen tijde vermeden worden. Gekoeld transport van monsters dient gegarandeerd te zijn door gebruik te maken van koelboxen met voldoende koelelementen of een koelinstallatie. Tijdens het transport mag de temperatuur van een monster¹² zeker niet stijgen. Monsters met een hoge temperatuur worden hierbij fysisch gescheiden van koude monsters.

Het is zeker zinvol om via een logger het temperatuursverloop tijdens het transport te registreren.

9 REFERENTIES

- ISO 5667-11, Water quality – Sampling - Part 11 - Guidance on sampling of groundwaters
- CMA/1/A.2, Compendium voor Monsterneming en Analyse (CMA) – Deel 1 Monsterneming – Bodem - Grondwater
- Vlarem II Bijlage 5.53.1, Code van goede praktijk voor boringen en voor exploiteren en afsluiten van boorputten voor grondwaterwinning
- **WAC/I/A/007, Monstername van bemalingswater**
- WAC/I/A/010, Conservering en behandeling van watermonsters

¹² Monsters met een temperatuur lager dan 8°C mogen tijdens transport tot maximaal 8°C opwarmen.

- WAC/I/A/011, Meting ter plaatse van temperatuur, pH, elektrische geleidbaarheid, opgeloste zuurstof, vrije chloor en gebonden chloor
- WAC/III/A/004, Bepaling van de elektrische geleidbaarheid
- WAC/III/A/005, Bepaling van de pH
- WAC/III/A/008, Bepaling van opgeloste zuurstof
- WAC/III/A/010, Bepaling van de troebelingsgraad

10 BIJLAGEN

BIJLAGE A: SCHEMATISCHE VOORSTELLING PEILBUIZEN EN POMPPUTTEN

BIJLAGE B: MONSTERNAMEMETHODE: LOW FLOW PURGING VS. KLASSIEKE METHODE

BIJLAGE C: KEUZE EN GEBRUIK VAN MONSTERNAME-APPARATUUR

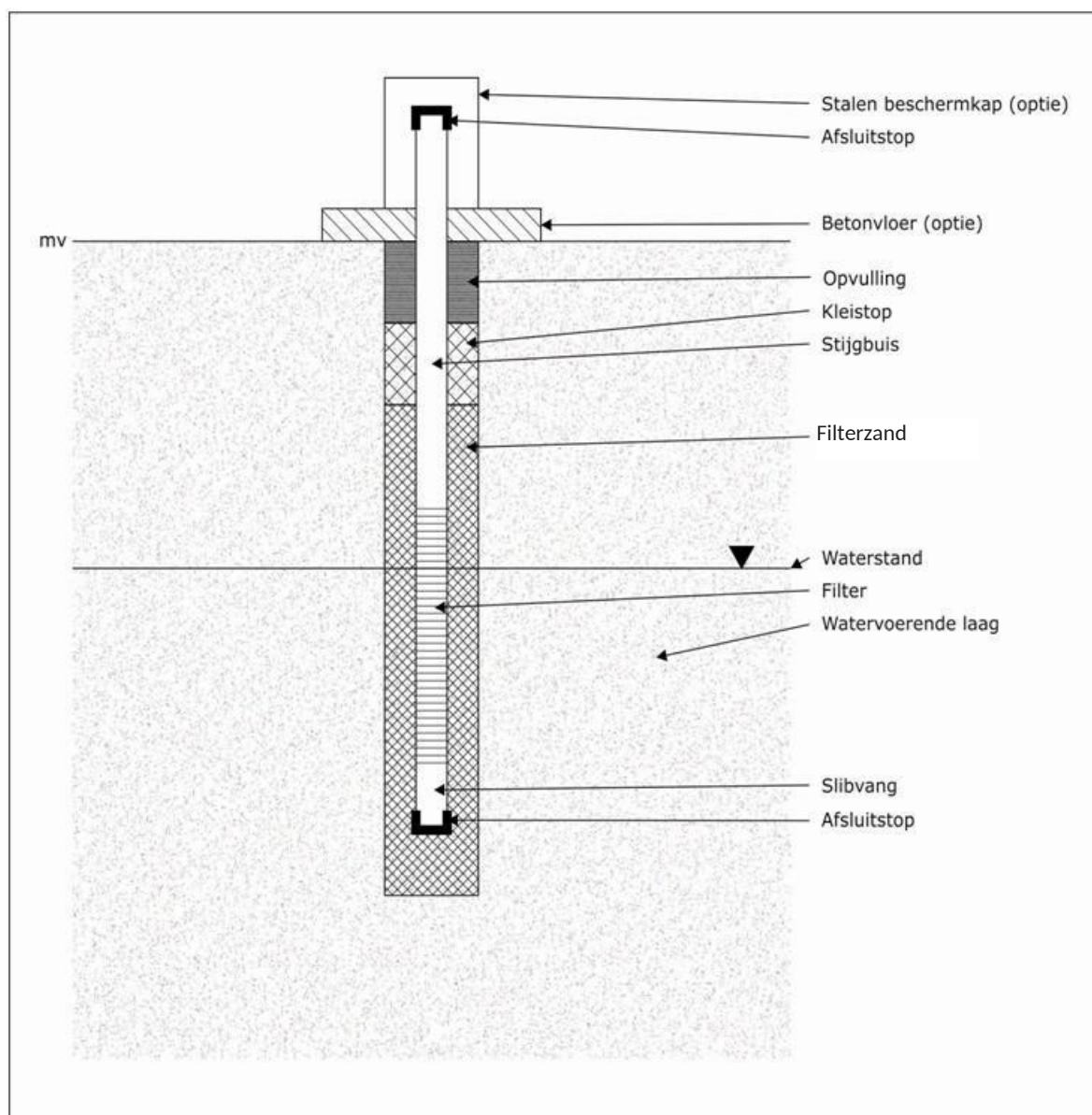
BIJLAGE D: SPECIFICATIES VOOR VERWIJDERING VAN GRONDWATER

BIJLAGE E: AFWIJKENDE VOORWAARDEN VOOR HET BEMONSTEREN VAN PERCOLAATWATER VIA EEN PEILPUT

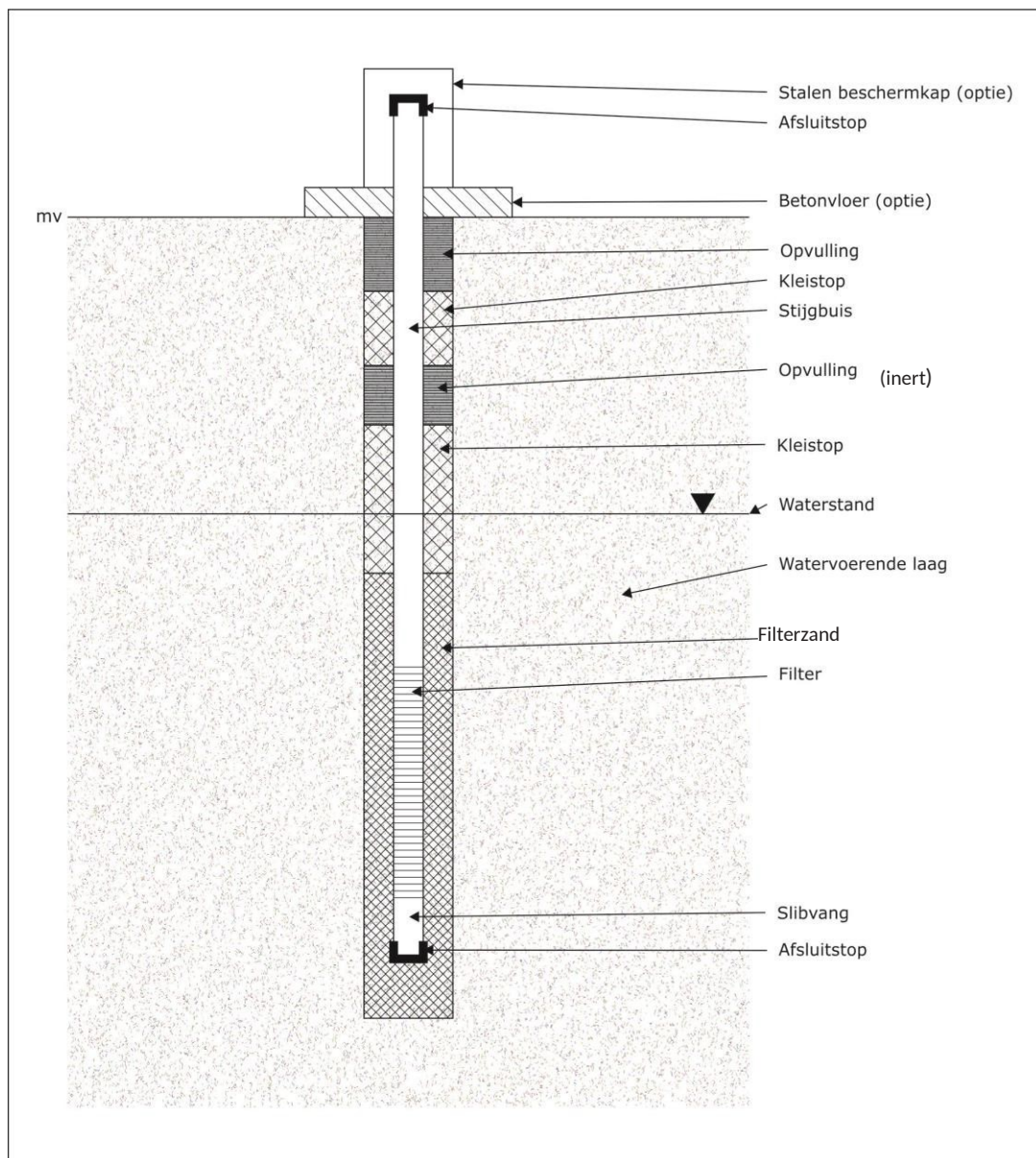
BIJLAGE A: SCHEMATISCHE VOORSTELLING PEILBUIZEN

Een tijdelijke peilbuis is een peilbuis die slechts voor een beperkte tijd op het terrein aanwezig is, meestal slechts enkele uren.

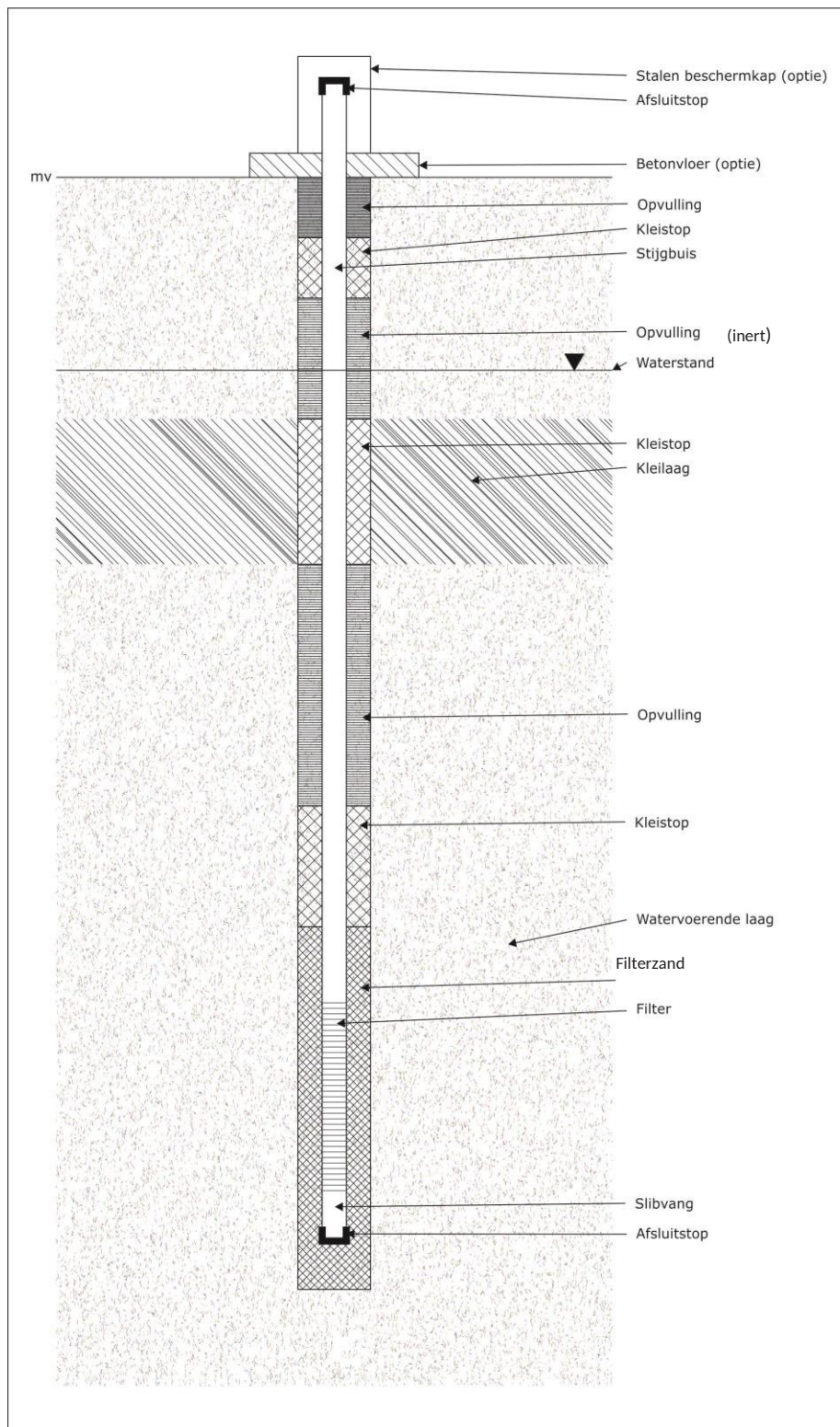
Een permanente peilbuis is een peilbuis die geplaatst wordt met als doel langdurige monitoring mogelijk te maken en dit over langere periodes (tot meerdere jaren).

A.1 Snijdende peilbuis

Figuur 1: schematische doorsnede van een boorgat met snijdende peilbuis (bron: CMA/1/A.2)

A.2 Peilbuis met volledig verzadigde filter

Figuur 2: schematische doorsnede van een boorgat met niet-snijdende peilbuis (bron: CMA/1/A.2)

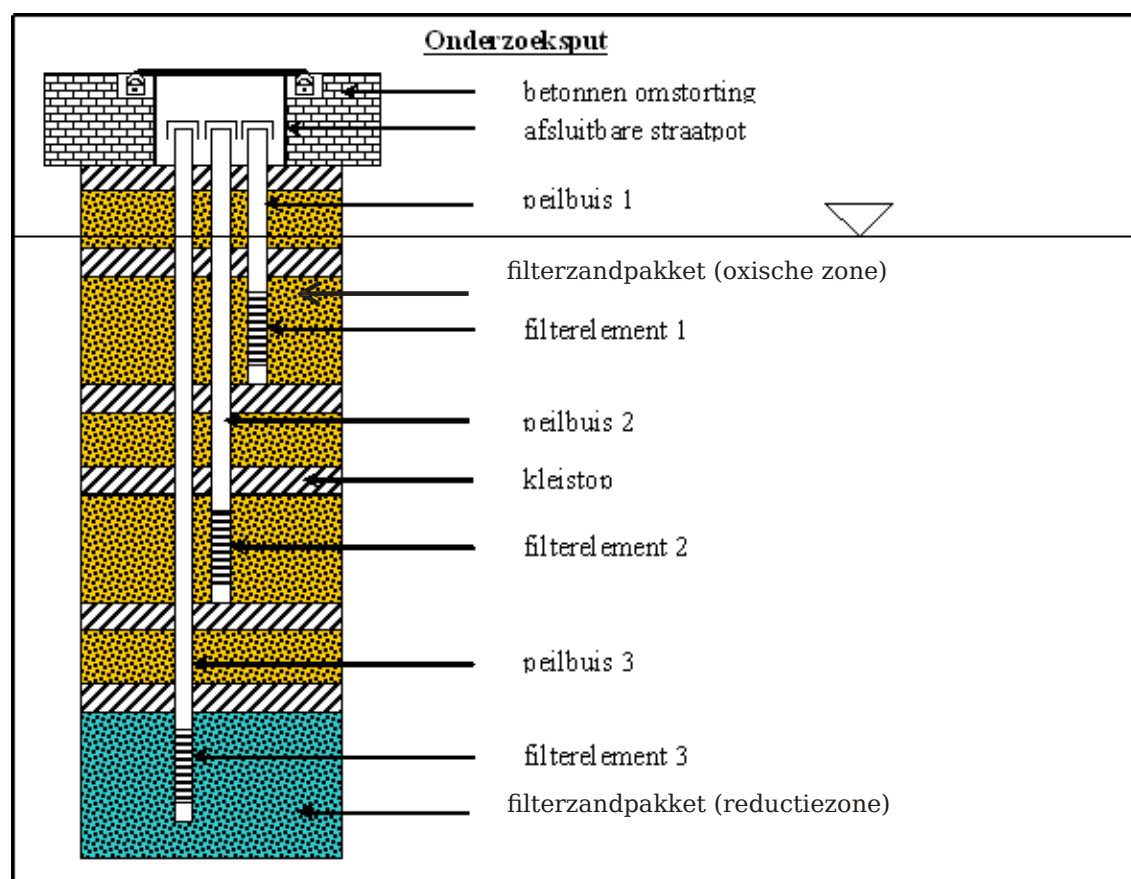


Figuur 3: schematische doorsnede van een boorgat met een peilbuis waarvan de filter is gelegen onder een slecht doorlatende laag (bron: CMA/1/A.2)

A.3 Multilevel peilput

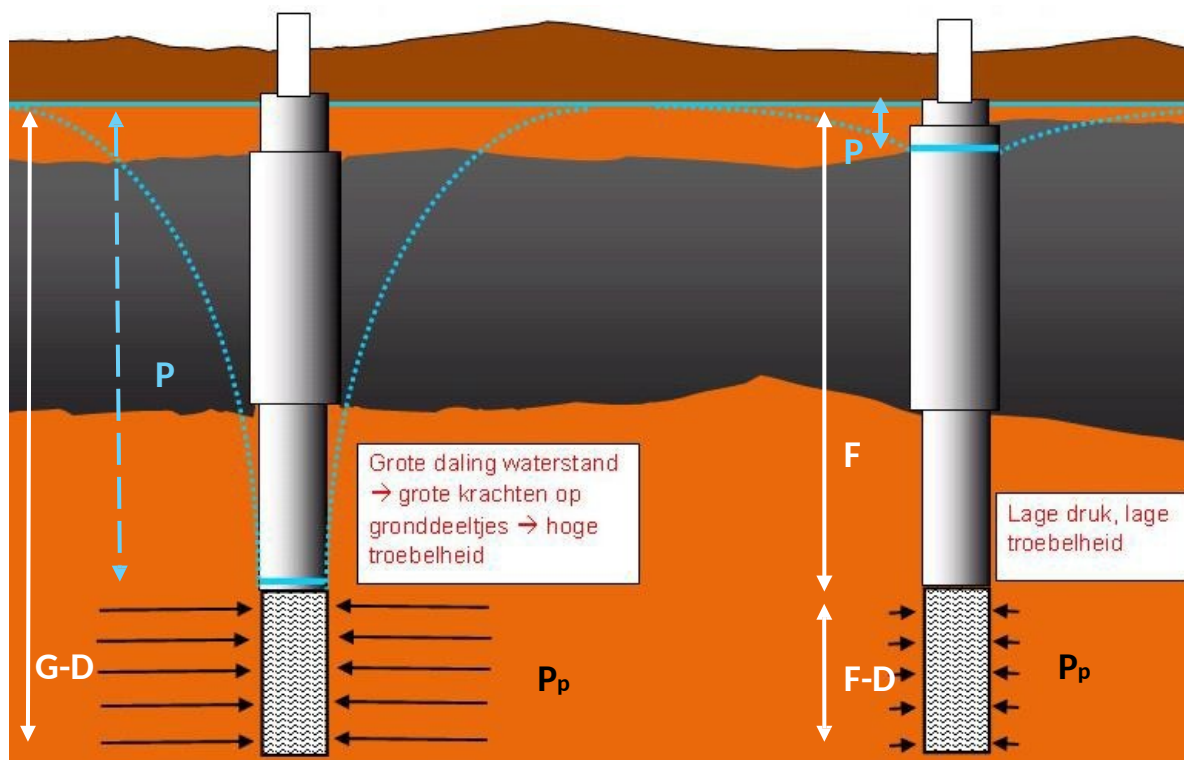


Figuur 4: afgewerkte peilput van het freatisch grondwatermeetnet met drie peilbuizen (bron: DOV).



Figuur 5: multilevel peilput van het freatisch grondwatermeetnet (bron: DOV)

BIJLAGE B: MONSTERNAMEMETHODE: LOW FLOW VS. KLASSIEKE METHODE



Figuur 6: klassieke methode (links) versus low flow purging (rechts)

Met:	G	grondwaterpeil t.o.v. vast
	punt D	diepte peilbuis t.o.v. vast punt
	G-D	lengte waterkolom in de peilbuis
	F-D	lengte waterkolom in het filtergedeelte
	P	daling waterstand bij voerpompen

B.1 Low flow purging of micro purging

- Heeft het voordeel dat er minder volume grondwater moet voorgepompt worden (5 keer filtervolume F-D); Het verminderd volume water dat opgepompt wordt, kan leiden tot een aanzienlijke tijdswinst bij lange waterkolommen (20 m en meer) en brede peilbuisdiameters;
- Er treedt slechts een beperkte daling van de grondwaterstand (P) bij lage pompdebieten (< 500 ml/min);
- Daardoor treedt een kleine kracht op het grondwater op en de gronddeeltjes naar het filtergedeelte toe optreedt (P_p) waardoor een lage troebelheid van het opgepompte water bekomen wordt (natuurlijke troebelheid is 0 à 10 NTU: zie Figuur 7). Hierdoor bevat het bemonsterde grondwater minder zwevende of opgeloste delen welke afwijkingen in de geanalyseerde samenstelling/concentratie van het grondwater kunnen veroorzaken bij sorptiegevoelige parameters (bijv. organische stoffen, zware metalen) ;
- Bij een correcte uitvoering van low flow sampling is er geen invloed van het stilstaande water bij de monsternamemethode (hangt van voeding af).



Figuur 7: voorstelling turbiteit

- Door het lage debiet ter hoogte van het filtergedeelte bestaat het gevaar van een selectieve monsternam, bijv. gerichte stroming uit een deel van de filter, pseudostabiele geleidbaarheid, ...);
- De filtersituatie en ophangdiepte van pomp moet gekend zijn voor een correcte en herhaalbare uitvoering van de monsternam met low flow principe (vergelijkbaarheid moet worden gegarandeerd);
- Er wordt meestal gewerkt met vacuümtrekkende pompsystemen, welke als nadeel hebben dat ze kunnen leiden tot ontgassing/oxidatie van de watermonsters (mindere nauwkeurigere bepaling van veldparameters O_2 , redoxpotentiaal, maar ook andere redoxgevoelige parameters is mogelijk zoals HCO_3^- , CO_3^{2-} , CO_2 – verstoring van oplosningsevenwicht).

B.2 Klassieke monsternam (pompen bij hoog debiet)

- Biedt een betere garantie van de verversing van de boorgatzone (d.w.z. het oppompen van in situ grondwater dat rechtstreeks afkomstig is vanuit het onverstoorde sedimentpakket) wanneer deze aangelegd is met een milieuvreemde matrix (bijv. filterzand). Bij lage debieten bestaat anders het risico dat gemodificeerd grondwater opgepompt wordt. Dit is zeker relevant wanneer de karakteristieken van de peilput (nog) niet gekend zijn;
- Er wordt mengwater uit de volledige filterzone onttrokken, zodat het grondwater representatief is voor het beoogde aquifergedeelte (vooral van voordeel voor lange filterelementen van 1m of meer;
- Het pompsysteem wordt ruim voorgespoeld met het te bemonsteren grondwater waardoor contaminaties geminimaliseerd worden;
- De gebruikte pompsystemen (dompelpompen en gesloten pompsystemen) leiden minder tot ontgassing/oxidatie van de watermonsters, en geven dan ook een beter bepaling van veldparameters O_2 , redoxpotentiaal en/of andere redoxgevoelige parameters zoals HCO_3^- , CO_3^{2-} , CO_2 (ook van belang voor oplosningsevenwicht o.a. voor zware metalen) .
- Heeft een hoger voor te pompen volume (5 x waterkolom in peilbuis G-D. Bij een (zware) verontreiniging kunnen de grote hoeveelheden verontreinigd water een probleem vormen op het vlak van afvalverwijdering;
- Er is somseen grote waterdaling (P) door het hoge debiet, waardoor er grote krachten op het grondwater en de gronddeeltjes naar het filtergedeelte toe kunnen ontstaan (Pp);
- Het voorpompen met hogere pompsnelheden / hoger debiet kan enkel worden toegelaten op voorwaarde dat bij het pompen een evenwichtspeil wordt bereikt. Eens het evenwichtspeil bereikt is, kan met dit hoger debiet eveneens een tijdsbesparing bereikt worden in het verversingsproces;
- De kwaliteit van het stilstaande grondwater kan door (langdurige) insluiting gewijzigd zijn of kan zelfs stratificatie vertonen; voorpompen bij hoge debieten biedt zekerheid dat 'oud' (stilstaand) grondwater boven en onder het filtergedeelte wordt verwijderd;

BIJLAGE C: KEUZE EN GEBRUIK VAN MONSTERNAMEAPPARATUUR

C.1 Monstertechnieken door opzuigen van water (zuigpompen)

C.1.1 Slangpompen of peristaltische pomp

De slangpomp kan manueel of elektrisch aangedreven worden. De slang in het pomphuis is in "silicone" uitgevoerd. De zuigzijde van deze slang wordt verbonden met een teflon of PE-slang die in de peilbuis steekt. Door een kortdurende onderdruk is er geen contact met de lucht zodat een goed monster wordt bekomen. Daar de slangen eenvoudig te vervangen zijn is bij correct gebruik de kans voor kruisbesmetting klein. Eén van de meest gebruikte pompen is de elektronische slangpomp met ingebouwde accu en aansluitmogelijkheid voor andere pompjes, een peilsensor en een schakelklok.

Door zijn vrij laag debiet (orde van liters per minuut) is deze pomp echter niet bruikbaar voor het schoonspoelen (na plaatsing) van diepere peilbuizen. Dit is ook het geval indien de opvoerhoogte te groot wordt. De maximale opvoerhoogte voor toepassing van de slangpomp bedraagt theoretisch 10 m, in de praktijk is dit, omwille van de wrijvingsweerstand, meestal beperkt tot 6-8 m.

C.1.2 Bovengrondse centrifugaalpomp (niet toegelaten binnen WAC)

Voor het "schoonpompen" van peilbuizen met grotere diameter kan gebruik worden gemaakt van bovengrondse centrifugaalpompen, aangedreven door een verbrandingsmotor. Deze zijn te verkrijgen voor afpomp uit buizen met diameters vanaf 45 mm. Het debiet is regelbaar.

Het gebruik van centrifugaalpompen is binnen deze WAC niet toegestaan. Door de hoge snelheid van de schoepen treedt er immers een sterke turbulentie op, waardoor monsternamen met betrekkingen tot vluchtige parameters niet aangewezen is. Na verwijdering van de pomp wordt door middel van een ander type pomp de eigenlijke grondwater-bemonstering uitgevoerd.

De maximale opvoerhoogte voor toepassing van de centrifugaalpomp bedraagt theoretisch 10 m, in de praktijk is dit, omwille van de wrijvingsweerstand, meestal beperkt tot 6-8 m.

C.1.3 Vacuümpomp (niet toegelaten binnen WAC)

Het grondwater wordt opgezogen door het creëren van een onderdruk waardoor ontgassing bevorderd wordt. Bovendien is er contact met lucht mogelijk zodat oxidatie kan optreden. Aangezien de methode niet geschikt is voor het opmeten van veldparameters - bijgevolg ook niet om voor te pompen - kan het gebruik van deze methode binnen deze WAC niet worden toegestaan.

Het vacuümeffect treedt eveneens op bij alle systemen van bovengrondse pompen, zolang de aanzuigleiding niet volledig gevuld is. Aanzuigleidingen moeten daarom steeds volledig gevuld zijn vooraleer het voorpompen (en meten van veldparameters) en monsternamen aan te vangen.

C.2 Monsternametechnieken door opdrukken van water (perspompen)

C.2.1 Balgpomp (gasdruksysteem)

Afhankelijk van de diepte varieert het maximum debiet tussen 2,5 en 4 l/min. De maximum bemonsteringsdiepte bedraagt ca. 60 m. Tevens kan er inline worden gefiltreerd en kunnen de vereiste metingen worden uitgevoerd. De pomp werkt op luchtdruk, zonder dat de lucht in contact komt met het watermonster. Hiervoor zorgt een teflon balg die in het pomphuis is gemonteerd. Het is een pulserende pomp. In een eerste fase wordt het water aangezogen door samentrekken van de balg. Tijdens de tweede fase wordt het water naar boven geperst door uitzetten van de

balg. De

balgpomp is voorzien van de nodige terugslagkleppen zodanig dat er geen terugstroming kan ontstaan.

Er dient echter opgelet te worden voor kruisbesmetting daar men steeds met dezelfde slangen werkt. Aangezien bepaalde delen van het (moeilijk reinigbare) pomphuis in aanraking komen met het grondwater uit verschillende peilbuizen kan kruiscontaminatie optreden. Het gebruik van dit type pomp is niet toegestaan voor de monstername zelf. Deze pomp wordt doorgaans wel gebruikt voor het schoonpompen na peilbuisplaatsing.

C.2.2 Dubbele kleppomp

De dubbele kleppomp is een pneumatisch aangedreven pomp die gebruikt kan worden bij lage tot middelmatige debieten, en afhankelijk van het type, op aanzienlijke diepte kan gebruikt worden (150 m). Ten opzichte van de balgpomp biedt dit type pomp het voordeel dat hogere debieten bereikt kunnen worden en dat er geen vervanging van balg nodig is.

C.2.3 Kogelkleppompen (pulsknikkerpomp)

Deze pomp is een combinatie van een stijve slang die onderaan voorzien is van terugslagklep. Aan de slang wordt een snelle verticale op- en neerbeweging gegeven (manueel of mechanisch). De kogelkleppomp is verkrijgbaar in verschillende diameters en is vervaardigd uit roestvrij staal. Zij worden aan een darm in de peilbuis neergelaten en door een pulsende beweging wordt het grondwater langs de buis naar boven gedrukt.

Deze pompjes zijn geschikt voor zowel schoonpompen na peilbuisplaatsing als voor voerpompen en monstername. Toepassing van machinaal aangedreven kogelkleppompjes is geschikt bij diepe grondwaterbemonstering. Een veldtest heeft echter aangetoond dat de trillingen troebelheid van het opgepompte grondwater kunnen veroorzaken (bron VMM).

C.2.4 Dompelpomp (onderwater centrifugaalpomp)

De dompelpomp of impellerpomp is een centrifugaalpomp die onder water gebruikt wordt; Deze pomp is meestal vervaardigd uit roestvrij staal en teflon. Dit type pomp is omwille van de volgende karakteristieken zeer goed geschikt voor zowel schoonpompen als grondwatermonstername uit diepe peilbuizen:

- het debiet is fijn regelbaar;
- het onttrekkingsdebiet wordt gekenmerkt door een groot bereik: zowel lage als hoge onttrekkingsdebieten kunnen worden ingesteld;
- omwille van specifieke interne opbouw veroorzaakt de dompelpomp weinig turbulentie, in tegenstelling tot de bovengrondse centrifugaalpomp;
- zuigt geen lucht aan;
- grondwater wordt onderaan de pomp aangezogen.

De diameter van de peilbuis die kan bemonsterd worden is afhankelijk van het type dompelpomp. MP1 pompen zijn bijvoorbeeld enkel toepasbaar voor peilbuizen of pompputten met een interne diameter van minimaal 50 mm.

Daar de pomp in het grondwater wordt gehangen dient voldoende aandacht te worden besteed aan het optreden van kruiscontaminatie. Deze pomp en opvoerslang moet daarom na elk gebruik gespoeld worden met zuiver water van drinkwaterkwaliteit⁵. Aan het einde van elke monsternamedag dient bovendien een reiniging met warm water en detergent te worden uitgevoerd (gevolgd door uitvoerig spoelen). Het regelmatig spoelen kan de levensduur van de pomp ook aanzienlijk verlengen. De opvoerslangen worden vervangen indien deze visueel

verontreiniging (aanslag) vertonen, maar minimaal éénmaal per jaar. Indien de pomp in aanraking is geweest met puur product moet deze grondig gereinigd worden, alvorens verder toe te passen bij schoonspoelen en/of voerpompen en monsternamen.

C.2.5 12V dompelpompjes (DC-pompjes)

De 12V dompelpompjes zijn een goedkopere uitvoering met laag vermogen (5 tot 10 m drukhoogte) van de onderwater centrifugaalpomp. Ze zijn vervaardigd uit een niet-inerte kunststof, en daarom bedoeld voor éénmalig gebruik voor de monsternamen. Ze zijn aan elkaar te koppelen tot een totale opvoerhoogte tot ca. 36 m wordt bereikt. Door het redelijk debiet dat zij halen zijn ze echter goed geschikt om peilbuizen schoon te pompen na plaatsing. Indien éénmalig gebruikt, kunnen zij toegepast worden voor het voerpompen en monsternamen van grondwater, zoals beschreven in deze WAC.

Meestal worden DC-pompjes gebruikt in combinatie met de elektronische peristaltische pomp. Uitzonderlijk kan meermalig gebruik worden toestaan bij achtergrondbepaling en indien het niveau van de verontreiniging gekend is (voorwaarde geen organische verontreiniging).

C.3 Andere monsternamemethoden

C.3.1 Kogelklepmonsternemer of bailer

Dit is geen echte pomp maar een soort bailer uit teflon of roestvrij staal die onderaan afgesloten is met een balklep. Bovenaan is een koord bevestigd, waarmee de bailer omlaag wordt gebracht in de peilbuis. Wanneer men het apparaat laat zakken, stroomt het grondwater vertraagd via de balklep en de bovenopening door de buis van de bailer. Wanneer men het apparaat stilsthoudt of optrekt, sluit de balklep en wordt het grondwater ingesloten.

Deze methode laat toe om beperkte volumes monster te nemen.

De kogelklepmonsternemer mag niet gebruikt worden wanneer vluchtige bestanddelen moeten geanalyseerd worden.

C.3.2 Vloeistoflagemonsternemer

Dit is geen pomp, maar een open teflon buis die aan de onderzijde kan afgesloten worden. Dit afsluiten gebeurt door een afsluitsysteem aan de onderkant van de buis dat bediend wordt door een stang of een kabel. Via dit systeem is het mogelijk om op gewenste dieptes een monster te nemen. Deze methode is binnen deze WAC enkel geschikt voor de monsternamen van drijf- en zinklagen.

BIJLAGE D: SPECIFICATIES VOOR VERWIJDERING VAN OPGEPOMPT GRONDWATER

Het oordeelkundig afvoeren van opgepompt grondwater behoort tot de verantwoordelijkheden van het erkend laboratorium dat de monsternamen uitvoert. Het lozen van opgepompt grondwater in peilbuizen/pompputten is, ongeacht de verontreinigingstoestand, niet toegestaan.

Lozing in riool of op onverhard terrein

Lozing in de riool of op onverhard terrein is enkel toegestaan indien aan onderstaande voorwaarden is voldaan:

- afwezigheid van organoleptische waarnemingen die op de mogelijke aanwezigheid van GWV kunnen wijzen (zoals kleur, geur, sterk verhoogde EC, afwijkende pH-waarden, verhoogde PID-metingen);
- afwezigheid puur product / film op waterspiegel;
- analytische gegevens uit voorgaande onderzoeken hebben geen sterk verhoogde concentraties aangetoond;
- het rioleringsstelsel, waarop de lozing plaatsvindt, heeft voldoende berging en afvoercapaciteit om het geloosde grondwater te kunnen verwerken zonder overlast te veroorzaken;
- bij gescheiden rioolstelsel is lozing in de afvoer van hemelwater enkel toegestaan indien voldaan is aan de vereisten voor lozing in oppervlaktewater.

Lozing in oppervlaktewater

Voor lozing in oppervlaktewater dient voldaan te zijn aan de voorwaarden opgesomd in bovenstaande paragraaf. Tevens dient de algemene waterkwaliteit te voldoen aan de lokale lozingsnormen voor oppervlaktewater.

Lozing in waterzuiveringsinstallatie (WZI)

Indien op de site, waar grondwater bemonsterd wordt, een waterzuiveringsinstallatie aanwezig is, kan opgepompt grondwater in deze WZI worden geloosd op voorwaarde dat:

- de eigenaar, gebruiker, exploitant van het terrein hiermee instemt;
- de samenstelling en de grootte-orde van de concentraties van het grondwater gekend zijn;
- de technische specificaties van de WZI gekend zijn;
- er geen VOCl's worden geloosd in een koolwaterstofscheider (KWS);
- het rioleringsstelsel, waarop de lozing plaatsvindt, voldoende berging en afvoercapaciteit heeft om het geloosde grondwater te kunnen verwerken zonder overlast te veroorzaken;
- de WZI, waarop de lozing plaatsvindt, voldoende berging en afvoercapaciteit heeft om het geloosde grondwater te kunnen verwerken.

Afvoer in vaten voor verwerking volgens de gangbare regelgeving

Puur product en zeer sterk verontreinigd grondwater (i.e. op basis van gekende concentraties uit voorgaande onderzoeken of op basis van zintuiglijke/organoleptische waarnemingen) dienen steeds te worden opgevangen in vaten en vervolgens afgevoerd te worden naar een erkend verwerker.

BIJLAGE E: AFWIJKENDE VOORWAARDEN VOOR HET BEMONSTEREN VAN PERCOLAATWATER VIA EEN PEILPUT

Omwillen van de soms extreme omstandigheden (pH, geleidbaarheid, temperatuur, vervuiling) is het nodig om een aantal voorwaarden van de algemene procedure (WAC/1/A/005) te vereenvoudigen om monsternamen van percolaatwater via een peilbuis /-put mogelijk te maken.

Peilbuizen op stortplaatsen hebben dikwijls een grotere diameter zodat het totaal volume in de buis groter is, het water is meestal vervuild zodat het oppompen en verwijderen van het water niet eenvoudig is. Meer nog dan bij andere peilputten wordt aangeraden om "low-flow" te bemonsteren.

Voor het gebruikte materiaal is het belangrijk te beseffen dat het contaminatierisico voor volgende monsternamen veel groter zijn dan in een klassieke situatie en alle pompen die ondergedompeld worden in het percolaatwater kunnen best vermeden worden. Meer nog dan in andere situaties is het materiaal dat in contact gekomen is met het percolaatwater niet herbruikbaar of moet grondig gereinigd worden.

Welke pompen zijn wel toepasbaar:

- Slangenpomp of peristaltische pomp
- Kogelkleppomp
- 12V dompelpompjes (eenmalig gebruik!)

Omdat een stabiele waarde voor pH, geleidbaarheid of temperatuur in realiteit niet of zelden haalbaar is wordt bij deze monsternamen geen stabiliteit gemeten (steeds vermelden op monsternamenslag met motivatie).

Er moet wel een minimumvolume voorgespoeld worden en dit is afhankelijk van de diameter van peilbuis (zie tabel 1).

Tabel 2: Minimum aantal liter voorgepompt bij percolaatwater

Diameter peilbuis in mm	Aantal liter voorgepompt
< 30 mm	2.5 l
>30 - <50 mm	5 l
>50 mm	10l

Dit minimumvolume moet steeds gerapporteerd worden samen met organoleptische waarnemingen. Indien dit volume niet kan gehaald worden (bijv. door verstopte filter) moet dit ook vermeld worden als afwijking van de methode.

De rest van de voorwaarden van WAC /1/A/005 zijn wel van toepassing.

Het bemonsterde percolaatwater wordt verder behandeld als afvalwater, ~~en wordt in principe niet gefiltreerd~~. Dit impliceert dat er voor metalen niet gefiltreerd wordt. Indien er bepaalde (opgeloste) parameters in afval- of percolaatwater bepaald moeten worden, moeten de watermonsters wel ter plaatse gefiltreerd (0.45 µm) te worden voor deze parameter; raadpleeg hiervoor WAC/1/A/010

Monstername van bemaalingswater

Inhoud

1	Toepassingsgebied	3
2	Definities	3
3	Apparatuur en benodigdheden	3
3.1	<i>Algemeen</i>	3
3.2	<i>Monstername kraan/uitloop (pakket W1.1.1)</i>	4
3.3	<i>Monstername via schepmonster (pakket W1.2)</i>	4
3.4	<i>Monstername via peilbuis (pakket W1.4.1)</i>	4
4	Richtlijnen bij de monstername van bemalingswater	4
4.1	<i>Algemeen monstername en analyse</i>	4
4.2	<i>Monsternamestrategie – keuze monsternametechniek</i>	4
5	Monstername	7
5.1	<i>Monstername na opstart van de bemalingsinstallatie</i>	7
5.1.1	<i>Monsternamepunt: eisen voor een ogenblikkelijk monster</i>	7
5.1.2	<i>Uitvoering ogenblikkelijke monstername via kraan/uitloop</i>	7
5.1.3	<i>Uitvoering ogenblikkelijke monstername via schepmonster</i>	9
5.2	<i>Monstername voor opstart van de bemalingsinstallatie</i>	10
5.2.1	<i>Monsternamepunt: eisen peilput</i>	10
5.2.2	<i>Uitvoering monstername van een bestaande of nieuwe peilput</i>	11
5.3	<i>Vulvolgorde recipiënten</i>	12
5.4	<i>Conservering</i>	13
5.5	<i>Filtraties ter plaatse</i>	13
5.6	<i>Richtlijnen m.b.t. specifieke analyseparameters</i>	13
5.6.1	<i>Metalen: totaal en opgelost</i>	13
5.6.2	<i>PFAS</i>	13
5.7	<i>Metingen ter plaatse</i>	14
5.8	<i>Transport</i>	14
5.9	<i>Analyse van bemalingswater</i>	14
6	Veldregistraties	15
7	Rapportering	15
8	Referenties	15

1 TOEPASSINGSGEBIED

Deze procedure beschrijft de monsternamen van bemalingswater van werkende bemalingsinstallaties tijdens het bemalen, alsook van bemalingsinstallaties die nog opgestart moeten worden, ten behoeve van (fysico-)chemische analyses in het laboratorium.

Deze methode is niet toepasbaar voor de monsternamen van grondwater ander dan bemalingswater en van percolaatwater (stortplaatsen) via peilputten; hiervoor wordt verwezen naar WAC/1/A/005. Deze methode is niet toepasbaar voor de monsternamen van grondwater in het kader van het Bodemdecreet (CMA/1/A.2).

2 DEFINITIES

De definities, zoals vermeld in Vlarem II¹, zijn van toepassing.

3 APPARATUUR EN BENODIGDHEDEN

3.1 ALGEMEEN

- 3.1.1. Maatbeker(s) met gietskuit en handvat voor homogenisatie²
- 3.1.2. Emmer² voor het opvangen van het verzamelmonster
- 3.1.3. Beker/recipient voor het meten van de temperatuur bij de monsternamen
- 3.1.4. Voldoende plastic en/of glazen monsterrecipienten voor de te analyseren parameters (voorgeconserveerd, indien van toepassing), voor (fysico-)chemische parameters. De richtlijnen m.b.t. het minimale volume water, de nodige conserveermiddelen en te gebruiken recipienten (bijv. plastic, glas, ...) per parameter(groep) conform WAC/I/A/010 moeten gerespecteerd worden.
- 3.1.5. Buis-/flessenborstel/pijpenrager met aangepaste borsteldiameter (groter dan de binnendiameter van de schoon te maken kraan/buis)
- 3.1.6. Absorberend papier
- 3.1.7. Draagbare digitale thermometer of thermokoppel afleesbaar tot op 0,1°C conform WAC/III/A/003.
- 3.1.8. Draagbare (veld)meters voor metingen ter plaatse van pH en geleidbaarheid conform WAC/1/A011.

Indien andere veldparameters dan pH/EC/T worden gevraagd in de analyse van het bemalingswater, worden de overeenkomstige veldmeters conform WAC/1/A/011 voorzien.
- 3.1.9. Wegwerpspuiten en 0,45 µm spuitfilters (enkel voor opgeloste parameters)
- 3.1.10. Timer /klok / stopwatch
- 3.1.11. Monsternemings- of veldformulier (kan ook digitaal)
- 3.1.12. Fototoestel (facultatief)
- 3.1.13. Koelboxen met voldoende diepgevroren koelelementen of koelinstallatie om gekoeld transport van monsters te garanderen (5.8)

¹ <https://navigator.emis.vito.be/detail?wold=7916&woLang=nl>

² voor elke monsternamen een proper exemplaar voorzien.

3.2 MONSTERNAME KRAAN/UITLOOP (PAKKET W1.1.1)

3.2.1. Emmer(s) voor het opvangen van spoelwater (indien van toepassing, verschillend van 3.1.1)

3.3 MONSTERNAME VIA SCHEPMONSTER (PAKKET W1.2)

3.3.1. Scheppot of maatbeker met handvat voor monstername (verschillend van 3.1.1)

3.3.2. (Telescopische) schepstok met houder en passende (maat)beker/recipient

3.3.3. Monsterkooi met passende recipient² en touw (facultatief, in sommige monsternamesituaties alternatief voor 3.3.1/3.3.2; evenwaardige toestellen ook toegelaten)

3.4 MONSTERNAME VIA PEILBUIJS (PAKKET W1.4.1)

Zie WAC/1/A/005 en §5.2.2

4 RICHTLIJNEN BIJ DE MONSTERNAME VAN BEMALINGSWATER

4.1 ALGEMEEN MONSTERNAME EN ANALYSE

Om de kwaliteit van het opgepompte bemalingswater na te gaan, moet het bemonsterd, voorbehandeld en geanalyseerd worden met de technieken van afvalwater en conform het Compendium voor de monsterneming, meting en analyse van water (WAC).

De verschilpunten met de monstername en/of analyse als grondwater, of met de uitvoering ervan conform het Compendium voor monsterneming en analyses van afvalstoffen en bodem (CMA), kunnen significante verschillen in de analyseresultaten veroorzaken ten opzichte van deze bemonsterd en geanalyseerd als afvalwater. Deze verschilpunten zijn oa. terug te vinden in (niet-limitatief): het al dan niet toepassen van een filtratie ter plaatse, het toepassen van een directe of indirecte monstername aan de kraan, keuze tussen klassieke monstername van peilputten of low flow monstername, de destructie van de watermonsters, decanteren, het gebruik van bepalingsgrenzen op het analyseverslag, het gebruik of uitsluiten van bepaalde pompsystemen bij de monstername,... Analyseresultaten van bemalingswater die *niet* conform het WAC werden bemonsterd en geanalyseerd, zijn bijgevolg niet bruikbaar om de kwaliteit van het bemalingswater te bepalen.

4.2 MONSTERNAMESTRATEGIE – KEUZE MONSTERNAMETECHNIEK

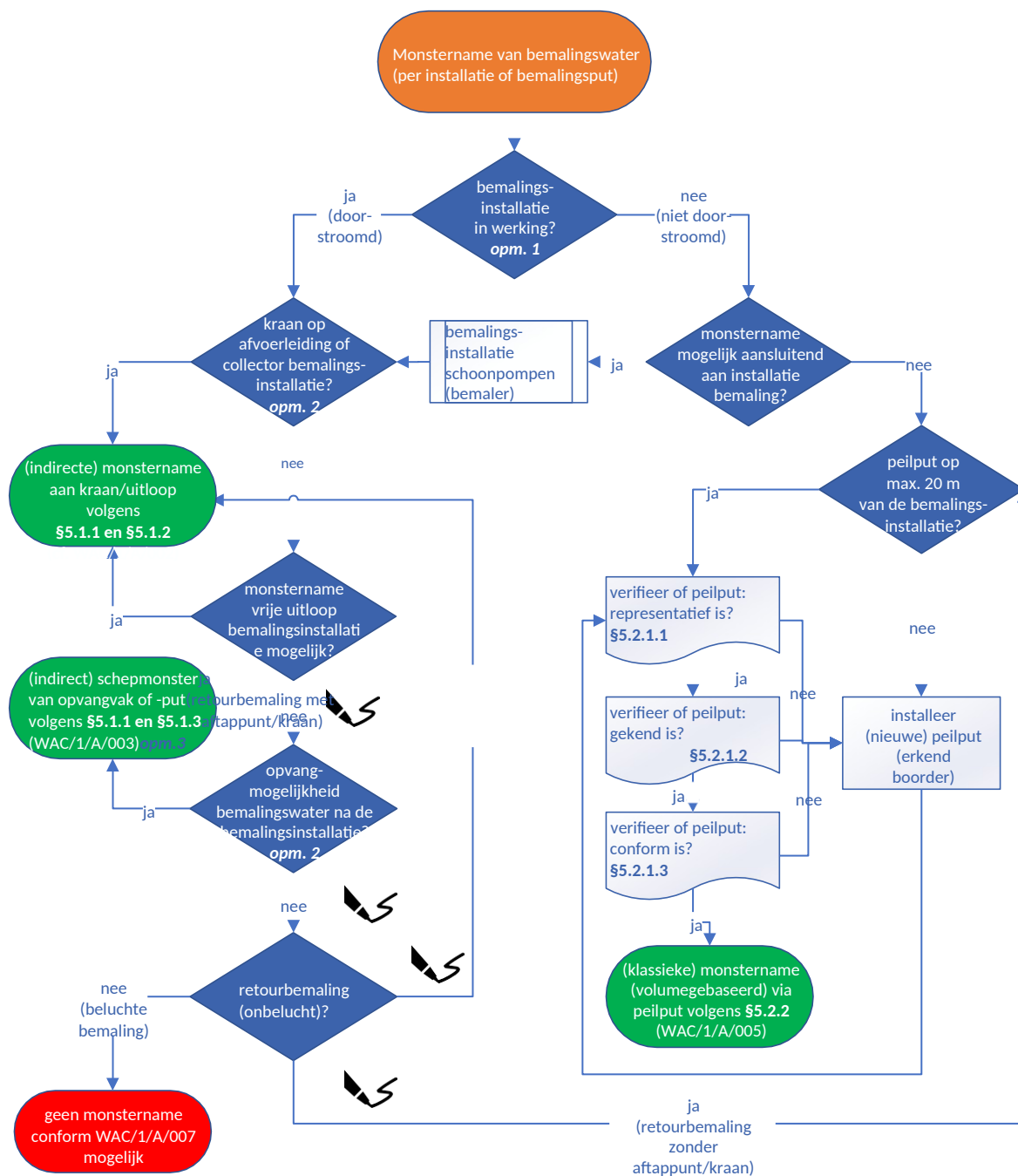
De keuze van de monsternamestrategie bij een bemaling kan bepalend zijn voor de analyseresultaten van het bemalingswater. Met het oog op een zo goed mogelijke representativiteit van het bemonsterde water ten opzichte van het opgepompte water, moeten een aantal aspecten, de status en/of type van de bemalingsinstallatie vooraf in overweging genomen worden om tot de correcte strategie voor monstername te komen.

De te overwegen stappen zijn schematisch voorgesteld in Figuur 1.

Er wordt een onderscheid gemaakt tussen bemalingsinstallaties die reeds in werking zijn (§5.1) en bemalingsinstallaties die nog opgestart (§5.2) moeten worden.

Elke afwijking van de voorkeursmethode voor monsternamen moet gemotiveerd én gerapporteerd worden in het monsternamEVERSLAG.

- i. De monsternamen van een werkende bemalingsinstallatie wordt bij voorkeur via een **ogenblikkelijke monsternamen aan kraan of uitloop** (§5.1.1, §5.1.2) uitgevoerd, tenzij:
- er geen mogelijkheid is tot monsternamen aan een (geïnstalleerde monsternamen)kraan of vrije uitloop.
- In dat geval wordt er gekeken of het bemalingswater mogelijk opgevangen wordt in een opvangbak of (ondergrondse) put na het geheel van de bemalingsinstallatie (inclusief beluchtings- en/of bezinkingsbak) en wordt er een **ogenblikkelijke monsternamen via schepmonster** (§5.1.1, §5.1.3) uitgevoerd.
- een retourbemaling die hoofdzakelijk onbelucht uitgevoerd wordt, en waarbij er géén speciale (onbeluchte) monsternamenvoorziening (kraan) voorzien is; een (belucht) schepmonster is in dat geval niet wenselijk.
- De monsternamen (§5.2.2) kan enkel in dit laatste geval via een **representatieve** (§5.2.1.1), **gekende** (§5.2.1.2) en conforme (§5.2.1.3) **peilput** uitgevoerd te worden.
- ii. Omdat de bemalingsinstallatie in principe pas in gebruik genomen mag worden als de analyseresultaten van het te bemalen water beschikbaar zijn, wordt een bemaling of een bemalingsinstallatie die opgestart moet worden (en nog niet in werking is) bemonsterd hetzij (geen voorkeursvolgorde):
- via een **ogenblikkelijke monsternamen aan een kraan/uitloop van de bemalingsinstallatie** (§5.1.1, §5.1.2), na schoonpompen van de installatie.
- Dit schoonpompen wordt door de bemaler uitgevoerd bij de installatie van de bemaling. De ogenblikkelijke monsternamen kan dan aansluitend aan het schoonpompen uitgevoerd worden; de bemalingsinstallatie wordt nadien stilgelegd in afwachting van de analyseresultaten.
- via **monsternamen van een representatieve peilput** (§5.2.2) binnen de contour van de ingedeelde inrichting activiteit.
- Dit kan een nieuw geboorde of een bestaande peilput zijn.
Een belangrijke voorwaarde bij deze monsternamen is dat de bemonsterde peilput representatief (§5.2.1.1), gekend (§5.2.1.2) en conform (§5.2.1.3) moet zijn om de monsternamen kwalitatief te kunnen uitvoeren.
- iii. Een (werkende) bemalingsinstallatie die niet-continu of intermitterend werkt (bijv. met sondesturingen) kan eventueel geforceerd opgestart worden ten behoeve van de monsternamen en wordt dan bemonsterd cf. i. Het (geforceerd) herstarten valt onder de verantwoordelijkheid van de opdrachtgever. Het moet weloverwogen toegepast worden om ongewenste gevolgen zoals zettingsvoorkomingen, verzilting, aantrekken of verschuiving van pollutanten,...) te vermijden



Opm. 1: een (werkende) bemalingsinstallatie die niet-continu of intermitterend werkt (bv. met sondesturingen) kan eventueel geforceerd herstart worden. Het (geforceerd) herstarten valt onder de verantwoordelijkheid van de opdrachtgever, en moet weloverwogen toegepast worden om ongewenste gevolgen zoals zettingsvoorkomingen, verzilting, aantrekken of verschuiving van polluenten, te vermijden.

Opm. 2: bemalingsinstallatie met inbegrip van een eventuele zuiveringsinstallatie, zandfilter, beluchtings- of bezinkingsbak; de monstername mag niet in één van deze onderdelen plaatsvinden. Een ontluchtingssysteem, onder de vorm van een bak of snelontluchter, is géén aftappunt dat geschikt is voor monstername.

Opm. 3: indien het (onbeluchte) aftappunt deel uitmaakt van de bemalingsinstallatie moet dit als afwijking gerapporteerd en gemotiveerd worden onbelucht aftappunt bij retourbemaling



keuze motiveren en rapporteren

Figuur 1: stroomschema monstername bemalingswater

5 MONSTERNAME

Elke afwijking met betrekking tot het monsternamepunt of met de uitvoering van de monstername moet gemotiveerd én gerapporteerd worden in het monsternameverslag.

5.1 MONSTERNAME NA OPSTART VAN DE BEMALINGSINSTALLATIE

5.1.1 MONSTERNAMEPUNT: EISEN VOOR EEN OGENBLIKKELIJK MONSTER

- Het ogenblikkelijke monster van bemalingswater is bij voorkeur een mengstaal van de verschillende strengen die tegelijkertijd op een werkende bemalingspomp zijn aangesloten (bv. kraan op collectorleiding).
- De vrije uitloop van een bemalingsinstallatie kan aanzien worden als een (semi) continu lopende kraan.
- De ogenblikkelijke monstername moet steeds uitgevoerd worden **op een punt waar het bemalingswater de bemalingsinstallatie verlaat**.
De bemalingsinstallatie wordt hierbij aanzien als het geheel van pompen, filters en leidingencircuit bij het oppompen van grondwater, met inbegrip van een eventuele zuiveringsinstallatie, zandfilter, beluchtings- of bezinkingsbak en debietmeter.
Er mag in géén geval een (schep- of kraan-)monster genomen uit één van de individuele onderdelen van een bemalingsinstallatie. Een ontluchtingssysteem, onder de vorm van een bak of snelontluchter, is géén aftappunt dat geschikt is voor monstername.
- De bemalingsinstallatie is schoongepompt. Dit schoonpompen wordt door de bemaler uitgevoerd bij de installatie van de bemaling.

5.1.2 UITVOERING OGENBLIKKELIJKE MONSTERNAME VIA KRAAN/UITLOOP³

- 1) Documenteer en beschrijf de bemonsteringssituatie (werkende, pas geïnstalleerde, discontinu werkende bemalingsinstallatie, ...) en monsternamepunt (kraan, uitloop, ...) eenduidig op het monsternemingsformulier.
- 2) Verwijder eventuele opzet- en/of koppelstukken die manueel of eenvoudig losgemaakt kunnen worden (in overleg met de bemaler/verantwoordelijke).
- 3) Verwijder zichtbaar aanklevend vuil aan de kraan met bevochtigd (water) absorberend papier (eenmalig te gebruiken). Maak ook de binnenkant van de kraan schoon met een buis-/flessenborstel/-rager (3.1.5), indien mogelijk, en met bevochtigd (water) absorberend papier (eenmalig te gebruiken). Bij aanwezigheid en loskomen van vaste of aangekoekte delen (bv. ijzeroxidelagen, algen,...) in de kraan - zichtbaar via visuele inspectie van de gebruikte borstel -, moet bijkomend gespoeld worden (zie punt 6)) totdat het spoelwater geen van deze delen meer bevat..

³ cf. [WAC/I/A/002](#) "Ogenblikkelijke monstername (aan kraan) van water"

- 4) Bij een bemalingsinstallatie die niet in werking is, of niet-continue/intermitterend doorstroomd wordt op het moment van de monsternamname, kan – in overleg met, en onder verantwoordelijkheid van, de opdrachtgever – de bemaling geforceerd (her)(ge)start worden. Het (geforceerd) (her)starten moet weloverwogen toegepast worden om ongewenste gevolgen zoals zettingen, verzilting, aantrekken of verschuiving van polluenten, ...) te voorkomen. Na de (her)start van de pompen wordt de bemalingsinstallatie eerst minstens 5 min. doorstroomd vooraleer verdergegaan wordt naar de volgende stap (voor op te starten bemalingsinstallaties is dit 5 min. doorstroming na het volledig schoonpompen van de installatie).
Noteer de het tijdstip en -duur van herstart/doorstroming.

- 5) Open de kraan en spoel de kraan waaraan het monster wordt genomen: laat de kraan **min. 5 min doorstromen** OF **spoel minstens 3x het dood volume van de monsternamenamekraan inclusief de koppelingen en mogelijke monsternamenameleiding** tot aan de leiding met het opgepompte bemalingswater.
Noteer de tijdsduur of volume (bij benadering) van het spoelwater.
Overleg met de opdrachtgever wat de mogelijkheden zijn om het spoelwater af te voeren.

Het spoelen van de monsternamenamekraan is niet van toepassing indien de vrije uitloop wordt bemonsterd.

- 6) Vul een (propere) verzamelemmer met bemalingswater aan kraan of uitloop tot ongeveer 1.5 x het volume van alle te vullen flessen/monsterrecipiënten voor deze monsternamename.
Indien er in het verzamelmonster visueel nog vaste deeltjes – andere dan bodemdeeltjes – vastgesteld worden, afkomstig van loskomende aangekoekte lagen in de kraan (ijzeroxide, algen,...), dient er bijkomend gespoeld te worden totdat het gespoelde water visueel vrij is van deze deeltjes. Herhaal in dat geval punt 5) en 6), eventueel voorafgaand door punt 3) (zonder daarbij punt 0 te herhalen).
- 7) Vul aansluitend een bijkomende beker of recipiënt voor het meten van de temperatuur bij de monsterneming met behulp van een digitale thermometer.
Noteer deze (monsternamename)temperatuur.
- 8) Sluit de kraan (niet van toepassing bij een vrije uitloop).
Monteer eventueel verwijderde opzet- en/of koppelstukken.
- 9) Vul de flessen/recipiënten voor de verschillende analyses af vanuit de verzamelemmer ('indirecte monsternamename') en rekening houdend met de volgorde (§5.3), filtraties ter plaatse (§5.5) en/of specifieke richtlijnen (§5.6):
- Homogeniseer het bemalingswater met een maatbeker met handvat door zachte horizontale en verticale zwenkende bewegingen in de verzamelemmer te maken. Vermijd hierbij luchtinslag.
 - Met behulp van de maatbeker worden de nodige recipiënten één voor één, waarbij elke keer dat wordt geschep, de gehele inhoud van het opvangvat weer wordt opgemengd. Voor elk nieuw, volgend, recipiënt moet opnieuw een maatbeker vanuit het verzamelmonster gevuld worden. Bij het afvullen van identieke of gelijkaardige monsterrecipiënten (bv. zelfde conservering, monster-tegenmonster,...) worden deze direct na elkaar gevuld: voor elk recipiënt wordt een volgende maatbeker gevuld (het overblijvende gedeelte uit de maatbeker mag niet gebruikt worden om de volgende identieke of gelijkaardige recipiënt af te vullen). Het afwisselend vullen van identieke of gelijkaardige recipiënten is niet toegelaten.

- ~~• Vul de eerste fles/recipient met de maatbeker, en doe dit naast de verzamelemmer. De maatbeker mag bij het vullen de hals van de monsterrecipient niet raken (risico op contaminatie vanuit het conserveermiddel dat mogelijk aan de hals kleeft). Vanuit elke gevulde (maat)beker wordt slechts één monsterrecipient gevuld.~~
- ~~• Gooi het restant in maatbeker weg na het vullen van de recipient.~~
- Elke keer dat opnieuw geschept wordt met de maatbeker, moet de hele inhoud van de verzamelemmer weer gehomogeniseerd worden.
- Herhaal voor volgende fles(sen)/recipient(en). Tussen het vullen wordt de (maat)beker in de verzamelemmer gelegd; in geen geval mag deze (maat)beker tussendoor op de grond of omgeving geplaatst worden.

5.1.3 UITVOERING OGENBLIKKELIJKE MONSTERNAME VIA SCHEPMONSTER⁴

- 1) Documenteer en beschrijf de bemonsteringssituatie (werkende, pas geïnstalleerde, discontinu werkende bemalingsinstallatie, ...) en monsternamepunt (type, grootte opvangeenheid, ...) eenduidig op het monsternemingsformulier.
- 2) Maak het wateroppervlak ter hoogte van het monsternamepunt vrij van drijvende delen, verontreinigingen, etc. met behulp van andere apparatuur dan voor de monstername wordt gebruikt.
- 3) Breng de (maat)beker of schepstok met beker/recipient op het monsternamepunt ondersteboven (of gesloten) tot onder het wateroppervlak. Vermijd verstoring van bodem of invloeden van (vervulde) bodem en wanden.
Draai (of open onder water) om onder water en laat vullen. Giet de inhoud over in een (propere) verzamelemmer.
- 4) Herhaal punt 3) op hetzelfde monsternamepunt en diepte totdat de verzamelemmer gevuld is met ongeveer 1.5 x het volume van alle te vullen monsterrecipiënten voor deze monstername.
- 5) Vul aansluitend een bijkomende beker of recipient voor het meten van de temperatuur bij de monsterneming met behulp van een digitale thermometer.
Noteer deze (monstername)temperatuur.
- 6) Vul de flessen/recipiënten voor de verschillende analyses af vanuit de verzamelemmer ('indirecte monstername') en rekening houdend met de vulvolgorde (§5.3), filtraties ter plaatse (§5.5) en/of specifieke richtlijnen (§5.6):
 - Homogeniseer het bemalingswater met een maatbeker met handvat door zachte horizontale en verticale zwenkende bewegingen in de verzamelemmer te maken. Vermijd hierbij luchtinslag.
 - Vul de eerste fles/recipient met de maatbeker, en doe dit naast de verzamelemmer. De maatbeker mag bij het vullen de hals van de monsterrecipient niet raken (risico op contaminatie vanuit het conserveermiddel dat mogelijk aan de hals kleeft). Vanuit elke gevulde (maat)beker wordt slechts één monsterrecipient gevuld.
 - Gooi het restant in maatbeker weg na het vullen van de recipient.
 - Elke keer dat opnieuw geschept wordt met de maatbeker, moet de hele inhoud van de verzamelemmer weer gehomogeniseerd worden.

⁴ cf. [WAC/1/A/003](#) "Ogenblikkelijke monstername (schepmonster) van water"

- Herhaal voor volgende fles(sen)/recipient(en). Tussen het vullen wordt de (maat)beker in de verzamelemmer gelegd; in geen geval mag deze (maat)beker tussendoor op de grond of omgeving geplaatst worden.

5.2 MONSTERNAME VOOR OPSTART VAN DE BEMALINGSINSTALLATIE

5.2.1 MONSTERNAMEPUNT: EISEN PEILPUT

5.2.1.1 REPRESENTATIEF

De locatie en de aansluiting van de peilput met de te analyseren watervoerende laag moet gegarandeerd worden en moet - op volgende punten - overeenstemmen met het bemalingsconcept⁵ ervan:

- filterstelling op vergelijkbare diepte als waar bemalingswater onttrokken wordt (informatie m.b.t. bemalingsdiepte wordt opgevraagd bij de opdrachtgever);
- gelegen op maximum 20 m van de bemalingsinstallatie.

De ligging en de filterstelling van de peilput moeten in het betreffende het monstername - en/of analyserapport gerapporteerd zijn (zie §5.2.1.2).

Indien niet aan deze voorwaarde is voldaan, dient de peilput als “niet-representatief” aangeduid te worden, en is het analyseresultaat bekomen via monstername aan deze peilput niet bruikbaar om de kwaliteit van het bemalingswater te bepalen.

5.2.1.2 GEKEND

Volgende boorgegevens moeten van een nieuw geplaatste peilput bij een te plaatsen/op te starten bemalingsinstallatie moeten minimaal beschikbaar zijn:

- erkende boorfirma;
- (unieke) identificatie peilput;
- putdiameter;
- exacte locatie (GPS-coördinaten, laser, of door inmeting ten opzichte van een of meerdere vaste referentiepunten door middel van een meetwiel of lintmeter);
- diepte en lengte van het filterinterval.

Bij het gebruik van analyseresultaten van een monstername van een bestaande peilput binnen de contour van de ingedeelde inrichting of activiteit moeten de monsternamegegevens conform §5 van WAC/VI/A/004 (rapportering monstername- en analysegegevens) en conform §7 van WAC/1/A/005 (monstername peilbuizen) beschikbaar zijn.

Bij ontbreken van één of meerdere van deze gegevens wordt de peilput aangeduid als “niet-gekend” en is het analyseresultaat bekomen via monstername aan deze peilput niet bruikbaar om de kwaliteit van het bemalingswater te bepalen.

5.2.1.3 CONFORM

Bij de monstername van een bestaande peilput moet deze intact én in goede staat zijn. Een goede visuele inspectie voor aanvang van de monstername is hierbij belangrijk.

⁵ [Richtlijnen bemalingen ter bescherming van het milieu](#), Vlaamse Milieumaatschappij, 2021

Er kan bijvoorbeeld gelet worden op volgende aspecten die de kwaliteit van het bemonsterde grondwater mogelijk kunnen beïnvloeden:

- is de afwerking nog intact en nog water- en vloeistofdicht? Is er instroom van verontreinigd water of andere vloeistoffen, verontreinigingen of materie mogelijk? Indien er sprake is van instroom, dan is de peilbuis niet geschikt voor monsternamen.
- is er sprake van verzanding? Klopt de diepte met het putschema? Bij afwijkingen moet de peilput geregeneerd worden of moet met de opdrachtgever afgesproken worden of de plaatsing van nieuwe peilbuis opportuun is.
- is de toestroming nog voldoende: als er geen 5x (putvolume) binnen het uur ververs kan worden, is peilbuis niet bruikbaar en moet met de opdrachtgever afgesproken worden of de plaatsing van nieuwe peilbuis opportuun is.

De binnendiameter van de peilput moet het mogelijk maken om een pompsysteem van ~~min:~~ 506 mm (~~binnen~~) diameter voor de monsternamen te kunnen toepassen.

Bij twijfel over de staat en de bruikbaarheid van de peilput, wordt de peilput aangeduid als “niet-conform”, en is het analyseresultaat bekomen via monsternamen aan deze peilput niet bruikbaar om de kwaliteit van het bemalingswater te bepalen.

5.2.2 UITVOERING MONSTERNAMEN VAN EEN BESTAANDE OF NIEUWE PEILPUT

De monsternamen zoals beschreven in [WAC/I/A/005](#) ('monsternamen van water via een peilput') is van toepassing mits volgende aanpassingen:

1) Apparatuur en benodigdheden:

- punt 3.2.3, 3.2.10: niet van toepassing voor bemalingswater
- punt 3.2.1; §4.5, Tabel 1: **het voorpompen en monsternamen van bemalingswater wordt uitgevoerd met een onderwatercentrifugaalpomp of kogelkleppomp met buitendiameter 18 of 22 mm met hefboombediening of elektrisch aangedreven.**

Mogelijke afwijkingen m.b.t. de pompkeuze die te maken hebben met de staat en de bruikbaarheid van de peilput worden beoordeeld volgens §5.2.1.3.

Mogelijke afwijkingen van deze pompsystemen die te maken hebben met specifieke eisen van te onderzoeken parameters (bv. PFAS) kunnen wel als afwijking gemotiveerd worden in het monsternamenslag, rekening houdend met volgende eisen:

- een slangenpomp/peristaltische pomp is niet toegelaten voor het voorpompen van een peilput voor bemalingswater, maar is wel toelaatbaar voor de eigenlijke monsternamen van bemalingswater;
- de 12 V dompelpompjes/boosters⁶ zijn niet toegelaten voor de monsternamen van bemalingswater, maar zijn wel toelaatbaar voor het voorpompen.

2) Monsternamemethode

- §4.4, §5.1.1.1, §5.1.2.2, bijlage B: **“low flow purging/sampling” of “micro-purging” niet van toepassing voor bemalingswater; bemalingswater wordt steeds via de “klassieke” methode bemonsterd**

3) Verversen peilput/voorpompen/spoelen

- §5.1.1.1, §5.1.2.2, §5.3: “low flow” niet van toepassing voor bemalingswater

⁶ enkel eenmalig gebruik pomp/booster toegelaten binnen deze WAC-procedure

- §5.1.1.2, §5.1.2.3: **spoeling enkel volumegebaseerd; stabilisatie van veldparameters hoeft niet bereikt te worden**
- 4) Opvolgen veldparameters, metingen ter plaatse
- §5.1.3: **opvolging van grondwatervluchtweg en veldparameters pH en geleidbaarheid wel van toepassing voor bemalingswater**
 - §5.1.4, §5.1.1.2: **stabilisatie veldparameters niet van toepassing voor bemalingswater**
 - §5.2: **meten troebelheid niet van toepassing voor bemalingswater**
- 5) Monsternamen peilput
- §5.4.2: **vermijden van luchtinslag is belangrijk bij onbeluchte bemalingen**
 - §5.4.4: **bemalingswater wordt niet gefiltreerd**, behalve indien er opgeloste parameters (bv. opgeloste metalen) moeten geanalyseerd worden
 - Bijlage E: percolaatwater niet van toepassing
- 6) Veldregistratie, rapportering
- resultaat van eisen aan de bemonsterde peilput: gekend (§5.2.1.2), conform (§5.2.1.3)
 - §6, §7: eindwaarden veldparameters worden gerapporteerd i.p.v. gestabiliseerde eindwaarden

5.3 VULVOLGORDE RECIPIËNTEN

Bij het vullen van de monsterrecipiënten dienen onderstaande instructies gerespecteerd te worden:

1. Recipiënt(en) bestemd voor vluchtige organische solventen⁷
2. Recipiënten waarbij zuurstofinbreng de bepaling kan storen (bijv. BZV)
3. Recipiënt(en) zonder conserveringsreagentia
4. Recipiënt(en) met conserveringsreagentia: ook hier dient rekening gehouden te worden met een volgorde van vullen om contaminatie van een volgend monster via de conserveringsreagentia te vermijden.

Voorbeeld: en recipiënt bestemd voor nitraatbepaling mag niet volgen op het vullen van een recipiënt met salpeterzuur. Een recipiënt metaalanalyse mag niet gevuld worden na het vullen van een recipiënt met kaliumdichromaat wegens risico op Cr-contaminatie.

5. Recipiënten voor metingen ter plaatse

Er worden bij voorkeur afzonderlijke meetrecipiënten voor geleidbaarheid en pH gevuld om contaminatie via de elektrode te vermijden (externe contaminatie of via lek van de pH-elektrode). Maar indien gewenst kan het recipiënt waarin geleidbaarheid gemeten is, daarna gebruikt worden voor pH meting.

Alle handelingen bij het vullen moeten zo snel mogelijk na elkaar volgen. Het is zinvol om de vulvolgorde van monsterrecipiënten kenbaar te maken op de recipiënten (via nummering of codering). Eventuele richtlijnen qua vulling (bijv. geen vrije ruimte) in WAC/I/A/010 moeten gerespecteerd worden.

Afwijkingen m.b.t. vulvolgorde zijn enkel toegelaten mits duidelijke motivatie ervan in het monsternemingsverslag.

⁷ Bij de monsternamen via een peilput is het niet noodzakelijk om de recipiënt bestemd voor vluchtige organische solventen als eerste te bemonsteren.

5.4 CONSERVERING

Voeg de nodige bewaar- of conserveermiddelen toe per (fysico-) chemische analyseparameter conform WAC/I/A/010.

De conservering gebeurt steeds ter plaatse.

Maak bij voorkeur gebruik van voorgeconserveerde monsterrecipiënten; toevoeging van conserveermiddelen op het veld is omslachtig, moet vaak in moeilijke (weers)omstandigheden uitgevoerd worden en is bijgevolg vaak minder nauwkeurig.

De aard en de houdbaarheid van de conserveermiddelen moet vermeld worden op de monsterrecipiënt en moet gerespecteerd worden.

5.5 FILTRATIES TER PLAATSE

Het bemalingswater wordt niet gefiltreerd, behalve indien er opgeloste parameter(s) (bv. opgeloste metalen) geanalyseerd moeten worden.

Enkel voor opgeloste parameters wordt een filtratie ter plaatse uitgevoerd over een 0.45µm spuitfilter. De filtratie wordt vlak voor het vullen van de monsterrecipiënt voor de opgeloste parameter in kwestie, uitgevoerd rekening houdend met de vulvolgorde vermeld in §5.3. Het filtraat wordt onmiddellijk overgebracht in de monsterrecipiënt in kwestie.

5.6 RICHTLIJNEN M.B.T. SPECIEKE ANALYSEPARAMETERS

5.6.1 METALEN: TOTAAL EN OPGELOST

Indien de bestemming van het bemalingswater (resp. het weer in de ondergrond brengen of lozing) ongekend is bij de aanvang van het onderzoek, moeten zowel de opgeloste metalen als de totale concentratie metalen op bemalingswater bepaald worden. Voor de analyse van metalen wordt zowel een recipiënt voor (totaal) metalen afgevuld (i.e. niet-gefiltreerd bemalingswater) als een recipiënt voor opgeloste metalen (i.e. gefiltreerd bemalingswater, zie §5.5).

Indien het onderzoek van het bemalingswater enkel gericht is op één van de mogelijkheden, respectievelijk m.b.t. het weer terug in de ondergrond brengen (herinfiltratie) of m.b.t. het lozen, wordt enkel een recipiënt voor respectievelijk opgeloste metalen (i.e. gefiltreerd bemalingswater) of voor totaal metalen (i.e. niet-gefiltreerd bemalingswater) afgevuld.

5.6.2 PFAS

Wanneer monsternames gebeuren in het kader van PFAS-analyses, moet rekening worden gehouden met volgende richtlijnen:

- Bij monstername mag enkel gebruik worden gemaakt van materialen die geen PFAS afgeven/uitlogen. In de mate van het mogelijke moet nagegaan worden (bij de leverancier/aan de hand van analyses) of het materiaal gebruikt bij de monstername voor analyse op PFAS, PFAS kan bevatten. Er mag enkel monstername apparatuur worden gebruikt waarvan aangetoond is dat ze geen PFAS boven de LOQ uitlogen in het waterstaal.
- Elk rechtstreeks contact met het monster moet worden vermeden, dit houdt ook rechtstreeks contact van het monster met de handschoenen in. Het is bijgevolg noodzakelijk om een gereinigd hulpmiddel te gebruiken om het staal te nemen.
- Reinigen van materiaal:

- o enkel met water van drinkwaterkwaliteit;
 - o bij de toepassing van reinigingsmiddel mag enkel gebruik gemaakt worden van PFAS-vrije detergenten en moet grondig worden nagespoeld.
- Het gebruik van koelelementen wordt toegestaan onder de volgende voorwaarden:
 - o de koelelementen vertonen geen lekken;
 - o alleen harde koelelementen worden toegestaan, de flexibele koelelementen niet omdat ze een grotere kans op scheuren hebben.
- Er wordt geen beperking opgelegd in te dragen regen-, veiligheids- en andere kledij indien aan volgende voorwaarden wordt voldaan:
 - o rechtstreeks contact met het staal moet worden vermeden;
 - o afloop van hemelwater via de kledij in het staal moet worden vermeden;
 - o ~~kledij aangewend bij staalname mag niet worden gewassen met wasverzachter.~~

5.7 METINGEN TER PLAATSE

Voor eventuele metingen ter plaatse wordt verwezen naar WAC/I/A/011.

5.8 TRANSPORT

De maximale bewaartermijnen van watermonsters conform WAC/I/010 zijn van toepassing vanaf het tijdstip (datum/uur) van de monsterneming. De monsters dienen dan ook tijdig aan het analyselaboratorium geleverd te worden zodat de houdbaarheid gerespecteerd kan worden.

Elke blootstelling aan licht en hitte moet te allen tijde vermeden worden.

Gekoeld transport van monsters dient gegarandeerd te zijn door gebruik te maken van koelboxen met voldoende koelelementen of een koelinstallatie. Tijdens het transport mag de temperatuur van een monster⁸ zeker niet stijgen.

Monsters met een hoge temperatuur worden hierbij fysisch gescheiden van koele monsters.

Het is zeker zinvol om via een logger het temperatuursverloop tijdens het transport te registreren.

5.9 ANALYSE VAN BEMALINGSWATER

De verschillende recipiënten met het bemonsterde water moeten **als afvalwater geanalyseerd** worden door het erkend analyselaboratorium.

Voor de metalen worden zowel de totaal als de opgeloste metalen (§5.6.1) geanalyseerd.

Indien het onderzoek van het bemalingswater enkel gericht is op één van de mogelijkheden, respectievelijk het **weer terug** in de ondergrond brengen of het lozen, wordt enkel een analyse voor respectievelijk opgeloste metalen of totaal metalen uitgevoerd.

⁸ Monsters met een temperatuur lager dan 8°C mogen tijdens transport tot maximaal 8°C opwarmen.

6 VELDREGISTRATIES

Bij elke monsterneming van water worden ter plaatse veldregistraties gemaakt. Dit kan bijvoorbeeld door gebruik te maken van een 'monsternemingsformulier'.

Volgende gegevens dienen minimaal geregistreerd te worden bij de monsterneming:

- identificatie van de monsternemer
- datum en uur van de monsterneming
- plaats en locatie van de monsterneming
- eenduidige omschrijving of aanduiding (evt. via schets, plan, foto...) van het monsternamepunt
- monsternametechniek, inclusief de uitgevoerde handelingen en toegepast materieel
- temperatuur van het bemalingswater bij de monsterneming
- aantal recipiënten gevuld en de gegevens die noodzakelijk zijn voor het identificeren van de monsters
- eventuele afwijkingen t.o.v. te volgen monsternamestrategie (§4.2), -punt (§5.1.15.2.1) of -techniek (§5.1.2, §5.1.3, §5.2.2) en motivatie van de afwijking
- eventuele opmerkingen en/of (omgevings-)omstandigheden die de monsterneming kunnen beïnvloeden
- eventuele resultaten van metingen ter plaatse

7 RAPPORTERING

Van elke monsterneming dient een monsternemingsverslag conform WAC/VI/A/004 opgemaakt te worden. Dit verslag kan ook geïntegreerd worden met het analyseverslag.

Naast de nodige gegevens cfr. §5 van WAC/VI/A/004, moet het monsternemingsverslag moet minimum volgende gegevens bevatten:

- beschrijving plaats en locatie van de monsterneming, monsternamepunt (§5.1.15.2.1), toegepaste monsternametechniek (§5.1.2, §5.1.3, §5.2.2), incl. motivatie bij afwijkingen
- veldgegevens (voor monstername via peilput §5.2.2):
 - o vast punt, opmetingen van (grond)waterpeil t.o.v. vast punt, peilbuis karakteristieken
 - o resultaat van eisen aan de bemonsterde peilput: gekend (§5.2.1.2), conform (§5.2.1.3)
 - o aan-/afwezigheid drijfslag / aan-/afwezigheid zinklaag
 - o toegepaste methode voerpompen (klassiek) en volume voorgepompt water
 - o toestroming in de peilbuis (goed/slecht, eventuele afwijkingen en/of evenwichtspeil)
 - o meetwaarden van veldparameter(s)

8 REFERENTIES

- WAC/I/A/002, Ogenblikkelijke monstername (aan kraan) van water
- WAC/I/A/003, Ogenblikkelijke monstername (schepmonster) van water
- WAC/I/A/005, Monstername van water via een peilput
- WAC/I/A/010, Conservering en behandeling van watermonsters

- WAC/I/A/011, Meting ter plaatse van temperatuur, pH, elektrische geleidbaarheid, opgeloste zuurstof, vrije chloor en gebonden chloor
- [Richtlijnen bemalingen ter bescherming van het milieu](#), Vlaamse Milieumaatschappij, 2021

Conservering en behandeling van watermonsters

INHOUD

1	DOEL EN TOEPASSINGSGEBIED	3
2	TERMEN EN DEFINITIES	3
3	PRINCIPE	3
4	VOORBEHANDELING	14
4.1	<i>Homogenisatie</i>	14
4.2	<i>Deelbemonstering</i>	14
5	REFERENTIES	14

1 DOEL EN TOEPASSINGSGEBIED

Deze procedure beschrijft de voorbehandeling van de monsters voor de bepaling van het gehalte aan anorganische, organische, bacteriologische en ecotoxicologische parameters in water.

Het doel van de in deze methode beschreven voorbehandeling is de bereiding van een analysemonster dat een gehalte aan verontreinigingen bevat dat gelijk is aan het gemiddelde verontreinigingsgehalte van het gehele oorspronkelijke monster.

Bovendien worden in deze procedure voorwaarden gegeven in verband met het nodige monstervolume, het materiaal van het recipiënt waarin het monster wordt genomen en bewaard en eventuele voorzorgen die moeten genomen worden om watermonsters te bewaren met het oog op het uitvoeren van analyses.

2 TERMEN EN DEFINITIES

Monster: hoeveelheid water dat als geheel aan het laboratorium wordt aangeleverd. Elk monster is apart verpakt.

Opmerking: het is mogelijk dat een aantal recipiënten tot één monster behoren.

Deelmonster: een gedeelte van het monster aangeboden aan het laboratorium waarvan wordt verondersteld dat het representatief is voor het gehele monster.

Monstervoorbehandeling: het geheel van handelingen, zoals mengen enz., die de eigenlijke analyseprocedure voorafgaat.

Analysemonster: de hoeveelheid van een deelmonster dat voor een welbepaalde analyse wordt opgewerkt.

3 PRINCIPE

De bewaartermijn van monsters is specifiek voor de te analyseren parameter. Monsters mogen niet langer bewaard worden dan de maximale bewaartermijn vermeld in deze procedure. In het laboratorium worden de monsters koel bewaard bij 3 ± 2 °C. Monsters voor elementanalyse die met zuur zijn geconserveerd, kunnen op kamertemperatuur worden bewaard. Ingevroren monsters worden bewaard bij een temperatuur $< -18^{\circ}\text{C}$, tenzij anders aangegeven.

Voor de conservering van de monsters bestemd voor **chemische analyses** wordt ISO 5667-3 gevolgd tenzij anders vermeld. Het toevoegen van conserveringsmiddelen gebeurt onmiddellijk (binnen 10 minuten) bij monsternamen, tenzij technisch niet haalbaar. De toevoeging gebeurt dan zo snel mogelijk en ter plaatse. Toevoeging van additionele conserveringsmiddelen is toegestaan. Conserveringsmethoden vermeld in de binnen WAC toegestane normmethoden (bv. Europese, Internationale) voor de bepaling van specifieke parameter(s) zijn eveneens toepasbaar.

In Tabel 1: *Water - organische parameters* en Tabel 2: *Water - anorganische parameters* zijn per parameter voor het matrixtype water de minimale hoeveelheden monster nodig voor de uitvoering van een analyse; het meest geschikte recipiënt; de in acht te nemen voorwaarden bij de

deelbemonstering; de maximum bewaartermijnen en eventuele voorzorgen te nemen tijdens de bewaring, weergegeven. Wanneer meerdere parameters op eenzelfde monster (met dezelfde conservering) worden bepaald, is minstens de hoeveelheid van de parameter met de hoogste minimale hoeveelheid van toepassing en moet de som van de nodige analyseporties kleiner zijn dan deze hoeveelheid.

Opmerking: De aangeleverde hoeveelheid monster dient vastgelegd te worden in overleg met het laboratorium, maar mag nooit lager zijn dan de minimale hoeveelheid vermeld in onderstaande tabel.

Voor de conservering van de monsters bestemd voor **microbiologische analyses** zijn de maximale bewaartermijnen in Tabel 3 van toepassing vanaf het tijdstip (datum/uur) van de monsterneming. De monsters dienen dan ook tijdig aan het analyselaboratorium geleverd te worden zodat de houdbaarheid gerespecteerd kan worden. Voor gegevens betreffende de bewaartemperatuur en de te bemonsteren volumes en recipiënten wordt verwezen naar Tabel 3: *Water microbiologische parameters*.

Monsters bestemd voor **ecotoxicologische analyses** worden koel bewaard. De testen worden bij voorkeur binnen 24 u gestart. Voor de houdbaarheidscondities en maximale termijn na staalname wordt verwezen naar Tabel 4: Water – ecotoxicologische parameters en bioeliminatie. {} In het testrapport worden in ieder geval duidelijk de data van staalname en start van testuitvoering aangegeven, en elke afwijking qua houdbaarheidstermijn en bewaarconditie zoals benoemd in tabel 4.

Tabel 1: Water - organische parameters

Bepaling van	Minimale hoeveelheid	Materiaal van het recipiënt	Opmerkingen	Bewaringsvoorzorgen en -termijn
Minerale olie ⁽¹⁾	100 ml	donker gekleurd glas met geslepen glazen stop of plastic stop met teflon inlage	afzonderlijke fles	-aanzuren tot pH ≤ 2 met HCl, H ₂ SO ₄ of HNO ₃ -koel bewaren -1 maand
TCE-extraheerbare stoffen	500 ml	donker gekleurd glas met geslepen glazen stop of plastic stop met teflon inlage	afzonderlijke fles	-aanzuren tot pH ≤ 2 met HCl, H ₂ SO ₄ of HNO ₃ -koel bewaren -1 maand
Petroleumether extraheerbare stoffen	500 ml	donker gekleurd glas met geslepen glazen stop of plastic stop met teflon inlage	afzonderlijke fles	-aanzuren tot pH ≤ 2 met HCl, H ₂ SO ₄ of HNO ₃ -koel bewaren -1 maand
Polycyclische aromatische koolwaterstoffen	25 ml	donker gekleurd glas met geslepen glazen stop of plastic stop met teflon inlage	afzonderlijke fles	-koel en donker bewaren -1 week
Vluchtige organische verbindingen ⁽²⁾⁽⁶⁾	100 ml	donker gekleurd glas met geslepen / conische glazen stop (optioneel afdichten met PTFE film) of plastic stop met teflon inlage	-monsterfles volledig vullen (geen dampruimte); -deelmonsternamen dient door analist te gebeuren (rechtstreeks in purgeervial van P&T of in meetvial van headspace); -indien monsterfles voor	koel bewaren en ofwel - 50 mg/l Na ₂ S ₂ O ₃ : 1 week - 50 g/l ascorbinezuur: 2 weken - aanzuren tot pH 1-2

Bepaling van	Minimale hoeveelheid	Materiaal van het recipiënt	Opmerkingen	Bewaringsvoorzorgen en -termijn
			verschillende parameters, dan is de eerste deelmonsterneming voor oplosmiddelen	met HCl of H ₂ SO ₄ : 1 week
Matig vluchtige chloorkoolwaterstoffen ⁽³⁾⁽⁹⁾	25 ml	donker gekleurd glas met geslepen glazen stop of plastic stop met teflon inlage	-monsterfles volledig vullen (geen damp ruimte) ⁽⁸⁾ -afzonderlijke fles	-koel en donker bewaren -1 maand
Polaire pesticiden (fenoxyazijnzuurderivaten, uronen, organofosforpestic. en triazines) ⁽⁴⁾⁽⁷⁾	100 ml	donker gekleurd glas met geslepen glazen stop of plastic stop met teflon inlage	afzonderlijke fles	- drinkwater en afvalwater: bij monsterneming 10 ml 0.01M Na ₂ S ₂ O ₃ of Na ₂ SO ₃ toevoegen per liter water -koel en donker bewaren -OPPs 1 week, -andere 2 weken
Organische screening	100 ml	donker gekleurd glas met geslepen glazen stop of plastic stop met teflon inlage	afzonderlijke fles	-koel en donker bewaren -1 week
PCDD/F	100 ml	donker gekleurd glas met geslepen glazen stop of plastic stop met teflon inlage	afzonderlijke fles	1 maand
Fenolische verbindingen	~~100 ml~~ 250 ml	donker gekleurd glas met geslepen glazen stop of plastic stop met teflon inlage	afzonderlijke fles	-aanzuren met HCl, H ₃ PO ₄ of H ₂ SO ₄ tot pH ≤ 4 -koel en donker bewaren -21 dagen
AOF	500 ml	Glas, polypropyleen of hoge densiteit polyethyleen; dop met PP of HDPE inlage.		geen
EOX, AOX, POX ⁽⁵⁾	500 ml	donker gekleurd glas met geslepen glazen stop of plastic stop met teflon inlage	afzonderlijke fles	-bij monsterneming: 10 ml 1.5 M Na ₂ SO ₃ toevoegen per liter water ; monsterfles volledig vullen -bij ontvangst in labo: aanzuren met 10 ml geconc. HNO ₃ per liter water -koel en donker bewaren -2 weken -1 maand (-18°C)
Gebromeerde brandvertragers	100 ml	donker gekleurd glas met geslepen glazen	afzonderlijke fles	-koel en donker (!) bewaren

Bepaling van	Minimale hoeveelheid	Materiaal van het recipiënt	Opmerkingen	Bewaringsvoorzorgen en -termijn
		stop of plastic stop met teflon inlage		-1 maand
Per- en polyfluor-verbindingen ⁽¹⁰⁾	25 ml	Glas, polypropyleen of hoge densiteit polyethyleen; dop met PP of HDPE inlage.		-koel bewaren -1 maand
Ultra korte keten per- en polyfluor-verbindingen ⁽¹⁰⁾	25 ml	Glas, polypropyleen of hoge densiteit polyethyleen; dop met PP of HDPE inlage.		-koel bewaren -1 maand
Ftalaten	100 ml	donker gekleurd glas met geslepen glazen stop of plastic stop met teflon inlage	afzonderlijke fles	-koel en donker bewaren -4 dagen
Kationische surfactanten	25 ml	polypropyleen, polyethyleen of glas	afzonderlijke fles	-koel bewaren -14 dagen mits toevoeging van gelijke hoeveelheid acetonitrile ofwel 10% isopropanol en 1 mM LAS; solvent dient ofwel ten velde ofwel binnen 3 dagen na aankomst in labo toegevoegd te worden aan het volledige staal
Niet-ionogene surfactanten	25 ml	polypropyleen, polyethyleen of glas	afzonderlijke fles	- koel en donker bewaren, - 7 dagen mits toevoegen van gelijke hoeveelheid acetonitrile ofwel 1% van 37% formaldehyde-oplossing ofwel 1% F-solv ofwel 0.1% 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol aan het volledige staal ten velde ofwel binnen 3 dagen na aankomst in labo
Formaldehyde	100 ml	donker gekleurd glas met geslepen glazen stop of plastic stop met teflon inlage	- afzonderlijke fles - monsterfles volledig vullen (geen dampruimte)	- koel en donker bewaren - 4 dagen
Gehalogeneerde azijnzuren (HAA's)	100 ml	Donker gekleurd PET, polypropyleen of polyethyleen; donker gekleurd glas met	Afzonderlijke fles	- koel en donker bewaren, - 14 dagen mits additie van 100 mg/l

Bepaling van	Minimale hoeveelheid	Materiaal van het recipiënt	Opmerkingen	Bewaringsvoorzorgen en -termijn
		geslepen glazen stop of plastic stop met teflon inlage		ammoniumchloride bij de staalname
Microcystine-LR	100 ml	donker gekleurd glas met geslepen glazen stop of plastic stop met teflon inlage	Afzonderlijke fles	- koel en donker bewaren, - 21 dagen mits additie van 150 mg/l natriumthiosulfaat
Beta-estradiol	100 ml	donker gekleurd glas met geslepen glazen stop of plastic stop met teflon inlage	Afzonderlijke fles	- koel en donker bewaren, - 28 dagen mits additie van 150 mg/l ascorbinezuur
Andere organische parameters	100 ml	donker gekleurd glas met geslepen glazen stop of plastic stop met teflon inlage	afzonderlijke fles	- koel en donker bewaren - 1 week

- (1) - indien niet aangezuurd wordt, zijn de stalen 4 dagen houdbaar.
- voor grondwateranalyses in het kader van bodemonderzoek (Vlarebo) dient aangezuurd te worden met HCl of H₂SO₄.
- (2) Styreen en MTBE breken af in aanwezigheid van HCl of H₂SO₄ in combinatie met NaCl als uitzoutingsreagens; indien deze componenten bepaald moeten worden dient het staal geconserveerd te worden met ascorbinezuur (50 gram per liter; de pH die aldus bekomen wordt kan hoger liggen dan 1-2). Bij conservering met Na₂S₂O₃ kan afbraak optreden van 2,2-dichloorpropaan en 1,3-dichloorpropeen
- (3) 'Matig vluchtige chloorkoolwaterstoffen' : voor grondwateranalyses in het kader van bodemonderzoek (Vlarebo) is een maximale bewaartermijn van 1 week van toepassing
- (4) 'Organofosforpesticiden' : voor grondwateranalyses in het kader van bodemonderzoek (Vlarebo) dient de pH niet aangepast te worden
- (5) 'EOX/AOX/POX' : tijdens de additie van zuur aan het staal (bij aankomst in het labo) kan gasontwikkeling optreden; om drukopbouw te vermijden wordt aangeraden om de recipiënten pas af te sluiten nadat de gasontwikkeling ophoudt.
Voor AOX bepaling dient een tweede staal aangeleverd te worden met een volume van 100 ml dat niet geconserveerd wordt, ter bepaling van DOC en totaal halogeniden.
Voor POX is aanzuren facultatief; indien niet aangezuurd bedraagt de bewaar termijn 24u.
- (6) 'VOC' : tijdens de additie van zuur aan het staal (bij aankomst in het labo) kan gasontwikkeling optreden; om drukopbouw te vermijden wordt aangeraden om de recipiënten pas af te sluiten nadat de gasontwikkeling ophoudt. Daarbij kunnen vluchtige verbindingen verloren gaan, dit dient vermeld te worden op het analyseverslag
- (7) Carbendazim kan verloren gaan door complexering met koperionen. Dit kan vermeden worden door additie van EDTA aan het staal. Aan 500 ml staal wordt 2 ml toegevoegd van een oplossing die 4,6 mg/ml Na₂EDTA bevat.
- (8) Indien de trichloorbenzenen niet geanalyseerd moeten worden, dient de fles niet volledig gevuld te zijn

- (9) Indien dicofol bepaald moet worden dient het staal op pH 2 gebracht te worden met HCl en de maximale bewaartermijn bedraagt dan 7 dagen
- (10) Voor de analyse van de ultrakorte keten PFAS moet niet noodzakelijk een apart recipiënt voorzien worden; voor de analyse van ultra korte keten PFAS mag ook een deelstaal van 1 ml uit het recipiënt van de PFAS genomen worden. **De bewaartermijn van 1 maand geldt ook voor verdunningen van stalen in acetonitrile of methanol (1:1).**

Tabel 2: Water - anorganische parameters

Bepaling van	Minimale volume	Materiaal van het recipiënt	Opmerking	Bewaringsvoorzorgen en -termijn
Alkaliniteit	200 ml (Volledig gevuld om lucht te elimineren)	P of G	Bij voorkeur analyse ter plaatse. Reductie- en oxidatieprocessen tijdens bewaring kunnen het monster veranderen.	- gekoeld ($3 \pm 2^\circ\text{C}$), 1 dag
Ammonium stikstof	100 ml	P of G		- onmiddellijk na staalname, 1 dag - in diepvries ($<-18^\circ\text{C}$), 1 maand ⁽¹⁰⁾ - aanzuren tot pH 1-2 met H_2SO_4 , gekoeld ($3 \pm 2^\circ\text{C}$), 21 dagen
Bezinkbare stoffen	1000 ml	P of G		- onmiddellijk na staalname, 2 dagen
BZV	1000 ml (Volledig gevuld om luchtballen zo veel mogelijk te elimineren)	P of G		- gekoeld ($3 \pm 2^\circ\text{C}$) in het donker, 1 dag - in diepvries ($<-18^\circ\text{C}$) ⁽⁵⁾ , 1 maand ⁽¹⁰⁾
Bromaat	20 ml	P of G	Indien ozon aanwezig, voeg 50 mg ethyleendiamine toe aan 1 l monster onmiddellijk na staalname. ⁽¹²⁾	- gekoeld ($3 \pm 2^\circ\text{C}$), 1 maand
Bromide	25 ml	P of G		- gekoeld ($3 \pm 2^\circ\text{C}$), 1 maand
Chloor-totaal		P of G	Analyse ter plaatse, binnen 5 min na monstername	- 5 min
Chloor-vrije		P of G	Analyse ter plaatse, binnen 5 min na monstername	- 5 min
Chloride	25 ml	P of G		- gekoeld ($3 \pm 2^\circ\text{C}$), 1 maand - in diepvries ($<-18^\circ\text{C}$), 1 maand ⁽¹⁰⁾
Chloraat	25 ml	P of G		- indien een analyse binnen 2 dagen na staalname niet mogelijk is , voeg NaOH toe tot pH 10 ± 0.5 , 7 dagen

Bepaling van	Minimale volume	Materiaal van het recipiënt	Opmerking	Bewaringsvoorzorgen en -termijn
Chloriet	25 ml	P of G		- indien een analyse binnen 2 dagen na staalname niet mogelijk is, voeg NaOH toe tot pH 10 ± 0.5, 7 dagen (indien geen gebruik van chloordioxide bij de behandeling van water) - bij aanwezigheid van resten chloordioxide: purgeer binnen 1 dag het monster met een inert gas gedurende minstens 5 minuten, analyse binnen 2 dagen of voeg NaOH toe tot pH 10 ± 0.5, 7 dagen
Chroom(VI)	100 ml	P of G	Reductie- en oxidatieprocessen tijdens bewaring kunnen het monster veranderen	- gekoeld ($3 \pm 2^\circ\text{C}$), 1 dag
CZV	50 ml	P of G		- aanzuren tot pH 1-2 met H_2SO_4, 1 maand - in diepvries ($< -18^\circ\text{C}$), 1 maand⁽¹⁰⁾
Cyanide-totaal	25 ml	P of G		- NaOH toevoegen tot pH > 12, gekoeld ($3 \pm 2^\circ\text{C}$) in het donker, 7 dagen
Cyanide-vrij	25 ml	P of G		- NaOH toevoegen tot pH > 12, gekoeld ($3 \pm 2^\circ\text{C}$) in het donker, 7 dagen
Droogrest	1000 ml	P of G		- gekoeld ($3 \pm 2^\circ\text{C}$), 1 dag
Fenolindex	50 ml	G		- aanzuren tot pH < 4 met H_3PO_4 of H_2SO_4, 21 dagen
Fluoride	100 ml	P (niet PTFE)		- gekoeld ($3 \pm 2^\circ\text{C}$), 1 maand - in diepvries ($< -18^\circ\text{C}$), 1 maand⁽¹⁰⁾
Geleidbaarheid	50 ml (Volledig gevuld om lucht te elimineren)	P of G	Bij voorkeur analyse ter plaatse.	- gekoeld ($3 \pm 2^\circ\text{C}$), 1 dag
Kjeldahl stikstof	60 ml	P of G		- aanzuren tot pH 1-2 met H_2SO_4, gekoeld ($3 \pm 2^\circ\text{C}$) in het donker, 1 maand - in diepvries ($< -18^\circ\text{C}$), 1 maand⁽¹⁰⁾
Kleur	20 ml	P of G	Bij grondwater, rijk aan Fe(II), analyse ter plaatse binnen 5 min na monstername	- gekoeld ($3 \pm 2^\circ\text{C}$) in het donker, 5 dagen
Kwik	50 ml	P of G		- aanzuren tot pH 1-2 met HNO_3 of HCl; bij aankomst in labo en binnen 3 dagen na monstername stabilisator (1%)

Bepaling van	Minimale volume	Materiaal van het recipiënt	Opmerking	Bewaringsvoorzorgen en -termijn
				HCl + 0,009 mM KBrO ₃ of 1% HCl + 2 mg/l Au) toevoegen, 1 maand ⁽⁶⁾ . Bij toepassing van CV-AAS/AFS wordt aan een deelmonster extra BrCl oplossing ⁽¹⁾ toegevoegd. ^(7, 11)
MBAS	100 ml	PP, PE of glas	afzonderlijke fles	- gekoeld ($3 \pm 2^\circ\text{C}$), en donker bewaren, 1 dag - 4 dagen mits toevoegen van 1% van 37% formaldehyde-oplossing - in diepvries ($<-18^\circ\text{C}$), 1 maand⁽¹⁰⁾ na toevoegen van 1% van 37% formaldehyde-oplossing
Metalen	100 ml,	P of G	- B en Si: geen conservering noodzakelijk - As, Sb en Sn: aanzuren tot pH 1-2 met HNO₃ of HCl, 1 maand - Ti: aanzuren tot pH 1-2 met HNO₃ of HCl, 1 maand - Na, Mg, K, Ca: bij toepassing IC mag conservering tot pH 3 ± 0.5 met HNO₃⁽⁴⁾ - Totaal P: aanzuren tot pH 1-2 met HNO₃ of H₂SO₄, 1 maand	- aanzuren tot pH 1-2 met HNO₃, 1 maand (zie ook Hg) - Ag: in het labo stabilisatie met HCl - Sb: in het labo optioneel stabilisatie met HCl/HF
Nitraat	25 ml	P of G		- gekoeld ($3 \pm 2^\circ\text{C}$), 1 dag - in diepvries ($<-18^\circ\text{C}$), 1 maand⁽¹⁰⁾ - aanzuren tot pH 1-2 met HCl, 7 dagen
Nitriet stikstof Totaal geoxideerde stikstof	25 ml	P of G		- gekoeld ($3 \pm 2^\circ\text{C}$), 1 dag - in diepvries ($<-18^\circ\text{C}$), 1 maand⁽¹⁰⁾
Orthofosfaat	25 ml	P of G		- gekoeld ($3 \pm 2^\circ\text{C}$), 1 dag - aanzuren tot pH 1-2 met H₂SO₄, 1 maand - in diepvries ($<-18^\circ\text{C}$), 1 maand⁽¹⁰⁾
Opgeloste zuurstof	300 ml (Volledig gevuld om lucht te elimineren)	P of G		- Zuurstof ter plaatse fixeren (cfr ISO 5813), monsters in het donker bewaren, 4 dagen - De electrochemische methode moet ter plaatse worden uitgevoerd.
Oxideerbaarheid	100 ml	P of G	Analyse zo snel mogelijk na	- te velde aanzuren tot pH 1-2 met H ₂ SO ₄ , gekoeld ($3 \pm 2^\circ\text{C}$)

Bepaling van	Minimale volume	Materiaal van het recipiënt	Opmerking	Bewaringsvoorzorgen en -termijn
			staalname	in het donker, 2 dagen - te velde aanzuren tot pH 1-2 met H ₂ SO ₄ , in diepvries (<-18°C), 1 maand ⁽¹⁰⁾
Perchloraat	25 ml	P of G		- gekoeld (3 ± 2°C), 1 maand
pH	50 ml (Volledig gevuld om lucht te elimineren)	P of G	Bij voorkeur analyse ter plaatse.	- gekoeld (3 ± 2°C), 1 dag
Silicaat (totaal)	50 ml	P		- gekoeld (3 ± 2°C), 1 maand
Sulfaat	25 ml	P of G		- gekoeld (3 ± 2°C), 1 maand - in diepvries (<-18°C), 1 maand ⁽¹⁰⁾
Sulfide	150 ml (Volledig gevuld om lucht te elimineren)	P		- toevoegen van 2 ml zinkacetaat (10 g/l) (indien nodig NaOH tot pH >9 ⁽²⁾), gekoeld (3 ± 2°C), 7 dagen
Sulfiet	100 ml (Volledig gevuld om lucht te elimineren)	P or G	Ter plaatse fixeren met 1 ml van een 2.5% (massa) EDTA oplossing per 100 ml monster	- gekoeld (3 ± 2°C), 2 dagen
TOC	20 ml	P of G		- aanzuren tot pH 1-2 met H ₂ SO ₄ , H ₃ PO ₄ of HCl, 7 dagen - gekoeld (3 ± 2°C), 7 dagen - in diepvries (<-18°C), 1 maand ⁽¹⁰⁾
Totale hardheid (met titrimetrie)	100 ml	P of G		- gekoeld (3 ± 2°C), 1 maand
Totale hardheid (met berekeningsmethode)	100 ml	P of G	Mg, Ca: bij toepassing IC mag conservering tot pH 3 ± 0.5 met HNO ₃ ⁽⁴⁾	- aanzuren tot pH 1-2 met HNO ₃ , 1 maand
Totale stikstof	100 ml	P of G		- aanzuren tot pH 1-2 met H ₂ SO ₄ ⁽⁸⁾ of met HCl (9), 1 maand - in diepvries (<-18°C), 1 maand ⁽¹⁰⁾
Troebelingsgraad	100 ml	P of G	Analyse bij voorkeur ter plaatse	- gekoeld (3 ± 2°C) in het donker, 1 dag
Ureum	100 ml	P of G		- per liter monster 1 ml natriumthiosulfaatoplossing (30 g/l), gekoeld (3 ± 2°C), 4 dagen ⁽³⁾
Vrij CO ₂	(Volledig gevuld om lucht te elimineren)	P of G	Analyse bij voorkeur ter plaatse	- gekoeld (3 ± 2°C), 1 dag
Zwevende stoffen	1000 ml	P of G		- gekoeld (3 ± 2°C), 2 dagen

P: plastic, G: glas, PP: polypropyleen, PE: polyethyleen

- 1) 0.1 N KBr/KBrO₃ oplossing cfr NBN EN ISO 12846:2012: Los 1.39 g KBrO₃ op in 250 ml water. Los 5.95 g KBr op in 250 ml water. Meng gelijke delen van KBrO₃ oplossing met KBr oplossing. Aan 100 ml monster wordt 2 ml 0.1 N KBr/KBrO₃ oplossing toegevoegd (en eventueel 1 ml HCl). Varianten op de concentratie van de reagentia zijn mogelijk. Opmerking: indien het monster niet geconserveerd werd met HCl, dient bij toevoeging van KBr/KBrO₃ oplossing eveneens HCl toegevoegd te worden. Opmerking: De additie van BrCl-oplossing tot 6 dagen na bemonstering wordt enkel in uitzonderlijke gevallen toegestaan.
- 2) Indien voorafgaand aan de bemonstering het recipiënt wordt voorzien van zinkacetaat, dient NaOH pas worden toegevoegd na de bemonstering (vermijden van neerslagvorming).
- 3) Referentie: Kohler P, *Ringversuch für die enzymatische Bestimmung von Harnstoff in badewasser*, Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg., 76, 1985, 470-477.
- 4) Referentie: ISO 14911:1998 Water quality - Determination of dissolved Li⁺, Na⁺, NH₄⁺, K⁺, Mn²⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Sr²⁺ and Ba²⁺ using ion chromatography - Method for water and waste water
- 5) Rekening houdend met de bijkomende opmerkingen beschreven in § 10 van ISO 5815-1.
- 6) Eén recipiënt voor de bepaling van de elementen én Hg
- 7) Referentie: ISO 12846 en VITO rapport 2011/MANT/R/021 (C. Vanhoof, K. Duyssens en K. Tirez, *Monsterconservering en -bewaring van anorganische parameters*).
- 8) Bij toepassing van de oxidatieve digestiemethode cfr WAC/III/D/032 mag worden aangezuurd tot pH < 4.
- 9) Bij toepassing van de chemiluminiscentie methode cfr WAC/III/D/033
- 10) Het invriezen van monsters ter conservering is een uitzonderingsmaatregel. In praktijk wordt als vuistregel gehanteerd dat maximaal 10% van de te analyseren monsters bij uitzondering mogen worden ingevroren.
- 11) Indien een afzonderlijk recipiënt voor Hg is voorzien, aangezuurd tot pH 1-2 met HNO₃ of HCl kan bij aankomst in het labo onmiddellijk en binnen 3 dagen na monsternamen BrCl-oplossing⁽¹⁾ worden toegevoegd.
- 12) Indien conservering ter plaatse niet mogelijk is, kan dit leiden tot een positieve bias van het meetresultaat. Bij overschrijding van de normwaarde moet hierover een opmerking op het analyseverslag worden gemaakt.

Tabel 3: Water microbiologische parameters

Bepaling van	Minimale volume	Materiaal van het recipiënt	Opmerking	Aanbevolen en aanvaardbare bewaringsvoorzorgen en -termijn in uren volgens 150 19458	
				Gekoelde bewaring (5±3°C)	
				aanbevolen	aanvaardbaar ^b
Totaal kiemgetal (22°C, 36°C)	20 ml	P of G, steriel ^a	monsterfles niet volledig vullen	8	12
Coliformen	100 ml			12	18
<i>E.coli</i>	100 ml			12	18
Enterokokken	100 ml			12	18
<i>Salmonella spp.</i>	1000 ml			12	18
<i>Legionella pneumophila</i> en <i>Legionella species</i>	250 ml			24	48
Coagulase positieve stafylokokken	100 ml			8	24

<i>Clostridium perfringens</i> (vegetatieve cellen)	100 ml			12	18
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100 ml			8	12
Virussen: somatische colifagen	1000 ml			48	72

500 ml monsterrecipiënten zijn meestal voldoende, indien minder dan vijf types micro-organismen worden gemeten, waarvoor telkens maximaal een volume van 100 ml nodig is. In sommige gevallen zijn andere volumes nodig: voor *Legionella spp.* is er minimaal 250 ml nodig of minimaal 500 ml indien de screening met PCR gebeurt, voor flessenwater is er voor analyse 250 ml per parameter nodig, voor *Salmonella spp.* en voor somatische colifagen is er tot 1 liter nodig.

^a Voor drinkwater worden voorgeconserveerde steriele monsterrecipiënten gebruikt met 0,1 ml 1,8% natriumthiosulfaat pentahydraat-oplossing voor elke 100 ml volume van de monsterrecipiënt of een equivalente hoeveelheid vast product.

Voor waterbemonstering in therapiebaden en whirlpools/bubbelbaden, alsook bij koeltorens/klimaatregelingen, worden steriele monsterrecipiënten gebruikt waaraan minimum 0,2 ml 1,8% natriumthiosulfaat pentahydraat-oplossing of een equivalente hoeveelheid vast product voor elke 100 ml volume van de monsterrecipiënt wordt toegevoegd.

Chelaatvormers zijn aanbevolen om bacteriën te beschermen tegen de werking van toxische zware metalen zoals koper of zink. EDTA (ethyleendiaminetetra-azijnzuur) of NTA (nitrilotriazijnzuur) kan worden gedoseerd via een filter-gesteriliseerde oplossing bij een eindconcentratie van ongeveer 5 mg per 100 ml monster.

Zilver kan worden geïnactiveerd door natriumsulfide, met een dosering van 0,1 ml van 0,1 mg/ml natriumsulfide-oplossing per 100 ml monster.

^b De tijdsduur tussen bemonstering en analyse kan afbreuk doen aan de betrouwbaarheid van de resultaten. Bijgevolg dienen bemonstering en analyses zo afgestemd te worden dat het aantal te analyseren monsters op de dag na de monsterneming tot een minimum wordt beperkt. Het laboratorium dient te streven naar de aanvaardbare termijnen door per parameter de watermonsters chronologisch in te zetten volgens het uur van monsternamen en door de meest kritische parameters (zoals totaal kiemgetal en *Pseudomonas aeruginosa*) prioriteit te geven.

Vanuit praktisch oogpunt geldt voor alle bacteriologische parameters (met uitzondering van *Legionella*) een tolerantie van 24 uur vanaf dag/uur van monsternamen. Het overschrijden van deze tolerantie moet vermeld worden op het analyseverslag.

Tabel 4: Water – ecotoxicologische parameters en bioeliminatie

Bepaling van	Minimale hoeveelheid	Materiaal van het recipiënt	Opmerkingen	Bewaringsvoorzorgen en maximale bewaartermijn
Bacterietest	100 ml	P of G		- 4 dagen gekoeld (1-5°C) ⁽²⁾ - 14 dagen diepvries (<-18°C) ⁽³⁾
Algentest	1000 ml	P of G		- 4 dagen gekoeld (1-5°C) ⁽²⁾ - 14 dagen diepvries (<-18°C) ⁽³⁾
Watervlo test	1000 ml	P of G		- 4 dagen gekoeld (1-5°C) ⁽²⁾ - 14 dagen diepvries (<-18°C) ⁽³⁾

Vistest met zebravisembryo	1000 ml	P of G	Test enkel in te zetten indien geleidbaarheid < 14000 µS/cm	- 4 dagen gekoeld (1-5°C) ⁽²⁾ - 14 dagen diepvries (<-18°C) ⁽³⁾
Vistest met juveniele forel	50 l	P of G	Test enkel in te zetten indien geleidbaarheid ≥ 14000 µS/cm	- 4 dagen gekoeld (1-5°C) ⁽²⁾ - 14 dagen diepvries (<-18°C) ⁽³⁾
Zahn-Wellens	25 l water + 2.5 l actief slib van ontvangende WZI ⁽¹⁾	P of G		- 24 u gekoeld (1-5°C) (water) - 24 u, luchtdicht, donker, gekoeld (1-5°C), (actief slib) ⁽⁴⁾

- (1) Volumes voor bacterie, alg, watervlo en zebravisembryo test. Hoeveelheid slib en afvalwater herrekenen bij uitvoering van een vistest met forel, i.f.v. grootte van de vissen.
- (2) Bij uitzonderlijke omstandigheden (zoals herhalingen) kan de bewaartermijn in de koelkast verlengd worden tot 7 dagen. Indien verlenging van bewaartermijn van toepassing is voor een test wordt dit steeds gerapporteerd als afwijking.
- (3) Het invriezen van monsters ter conservering is een uitzonderingsmaatregel. In praktijk wordt als vuistregel gehanteerd dat maximaal 10% van de te analyseren monsters bij uitzondering mogen worden ingevroren. Indien de test werd uitgevoerd op ingevroren monsters dan wordt dit altijd gerapporteerd als afwijking.
- (4) Zie ISO 5667-15 (2009) m.b.t. parameters respiratie, biodegradatie.

4 VOORBEHANDELING

4.1 HOMOGENISATIE

Opdat het deelmonster representatief zou zijn voor het gehele laboratoriummonster dient voorafgaand een homogenisatie van het monster te worden uitgevoerd. Watermonsters worden veelal manueel geschud.

4.2 DEELBEMONSTERING

Vooraleer tot deelbemonstering wordt overgegaan, dient het monster zorgvuldig te worden gemengd (zie homogenisatie).

De deelbemonstering van waterstalen beperkt zich in hoofdzaak tot het uitgieten van een hoeveelheid monster in een deelmonsterrecipiënt of pipetteren van een welbepaalde hoeveelheid uit het oorspronkelijk reciënt.

Bij de deelbemonstering rechtstreeks uit het oorspronkelijk reciënt van het analysemonster dienen de nodige voorzorgen genomen te worden om mogelijk contaminatiegevaar te vermijden.

5 REFERENTIES

- ISO 5667-3:2018 Water quality — Sampling — Part 3: Preservation and handling of water samples
- ISO 5667-15:2009 Water quality - Sampling - Part 15: Guidance on preservation and handling of sludge and sediment samples
- ~~NEN 5730:1991~~ **NEN 5709:2006** Bodem - Monstervoorbehandeling voor de bepaling van organische en anorganische parameters in grond
- ~~NEN 5870:1995~~ **NPR 5870:2016** Afvalstoffen - Analyse van afvalstoffen - Monstervoorbehandeling voor de bepaling van het gehalte aan organische en anorganische parameters

- Vito rapport 2011/MANT/R/021, *Monsterconservering en -bewaring van anorganische parameters*, C. Vanhoof, K. Duyssens en K. Tirez, https://reflabos.vito.be/onderzoeksrapporten/2010_Rapport_conservering_finaal.pdf
- **NBN EN ISO 12846:2012** Water quality – Determination of mercury – Method using atomic absorption spectrometry (AAS) with and without enrichment (**ISO 12846:2012**).
- EN 25813:1992 Water quality - Determination of dissolved oxygen - Iodometric method (ISO 5813:1983)
- **NBN EN ISO 19458: 2006** Water quality - Sampling for microbiological analysis (**ISO 19458:2006**).
- **NBN EN ISO 5667-3:2024** Water quality — Sampling — Part 3: Preservation and handling of water samples (**ISO 5667-3:2024**)

Bepaling van het debiet in controle-inrichtingen voor afvalwater

INHOUD

1	Doel en Toepassingsgebied	4
2	Definities	4
3	Apparatuur, materieel en benodigdheden	6
3.1	Gesloten controle-inrichting voor afvalwater	6
3.1.1	Debietmeter gesloten controle-inrichting	6
3.2	Open controle-inrichting voor afvalwater	7
3.2.1	Meetgoten (venturi)	7
3.2.2	Meetschotten	10
3.2.3	Debietmeter open controle-inrichting	11
3.3	Debietregistratie-apparatuur	13
3.4	Overige benodigdheden en materieel	13
4	Bepaling van het debiet in een gesloten controle-inrichting	14
5	Bepaling van het debiet in een open controle-inrichting	14
5.1	Identificatie controle-inrichting	14
5.1.1	Bepalen van de afmetingen van de controle-inrichting	14
5.1.2	Typering controle-inrichting	16
5.1.3	Staat van de open controle-inrichting	16
5.1.4	Omgaan met afwijkingen bij een open controle-inrichting	16
5.2	Plaatsing debietmeetsysteem	16
5.2.1	Plaatsing van het borrelbuisstelsel	16
5.2.2	Plaatsing van het ultrasoon systeem	17
5.3	Debietformule	17
5.4	Instelling nulpunt	18
5.5	Controle waterhoogte	19
5.5.1	Meetlocatie van de waterhoogte bij een meetgoot	19
5.5.2	Meetlocatie van de waterhoogte bij een meerschot	20
6	Registratie van het debiet	20
6.1	Instellen registratietoestel (printer, logger)	20
6.2	Weergave van het debiet	21
6.2.1	Ogenblikkelijk debiet	21
6.2.2	Totale debieten	21
7	Verzegeling	21
8	Rapportering	21
9	Kwaliteitscontrole	22
9.1	Gesloten controle-inrichting	22
9.2	Open controle-inrichting	22

9.2.1	Controle van de actuele t.o.v. de gemeten waterhoogte	22
9.2.2	Controle van de omrekening van de hoogtemeting naar debiet door de debietmeter	22
9.2.3	Controle van de lineariteit	23
10	Referenties	23
	BIJLAGE A : Maat- en typeringstabellen open controle-inrichtingen	24
	BIJLAGE B : Debiettabellen open controle-inrichtingen	38
	BIJLAGE C : Omrekeningsformule(s) waterhoogte - debiet voor open meetgoten (informatief)	39
C.1	Vlakke meetgoten met rechthoekige doorsnede	39
C.1.1	Debietformule conform ISO 4359	39
C.1.2	Vereenvoudigde debietformule	39
C.1.3	Herberekening debiet met werkelijke maten conform ISO 4359	40
C.2	Vlakke meetgoten met parabolische doorsnede	40
C.3	Khafagi meetgoten	41
C.3.1	Khafagi QV	41
C.3.2	Hydrologic	41
C.4	Parshall meetgoten	41
C.5	Meetschot met driehoekige uitsnijding (V-schot, Thomson)	41
	BIJLAGE D : Beschrijving en omrekeningsformules van rechthoekige en trapeziumvormige meetschotten (informatief)	43
D.1	Meetschot met rechthoekige contractie	43
D.2	Meetschot met trapeziumvormige contractie (Cipolletti)	45
	BIJLAGE E : Rekenblad voor debietsbeoordeling (informatief)	46

1 DOEL EN TOEPASSINGSGEBIED

Deze procedure beschrijft de bepaling van het debiet in een open of gesloten controle-inrichting voor het lozen van afvalwater.

Deze methode is toepasbaar op de debietmeting in, enerzijds gesloten controle-inrichting waar een elektromagnetische of inductieve debietmeter is geïnstalleerd door het bedrijf, en anderzijds op open controle-inrichtingen waarbij het debiet via een hoogtemeting in een meetgoot (venturi) of meetschot wordt bepaald. In deze methode worden zowel meetgoten met vlakke en parabolische bodem behandeld, alsook Parshall-goot, Khafagi-goten en meetschotten met driehoekige opening (V-schot).

De debietsmeting in deze methode kan ook deel uitmaken van een debietsgebonden monsternamen conform WAC/I/A/004.

2 DEFINITIES

- Gesloten controle-inrichting: meetsysteem dat het debiet meet in een gesloten leiding of in een gesloten drukleiding, waarbij het afvalwater niet in contact staat met de buitenlucht.
- Open controle-inrichting: bij een open afvoer voor het lozen van afvalwater kan het debiet bepaald worden via een zogenaamde 'open controle-inrichting' of 'open kanaal'. Dit open kanaal kan een meetgoot of een meetschot zijn.
- Meetgoot (synoniem venturi): een betonnen, metalen of kunststoffen constructie waarbij de goot een kunstmatige vernauwing van de zijwanden vertoont, al dan niet met een ingebouwde verhoging of verdieping van de bodem ter plaatse van de vernauwing waardoor kritische stroming wordt teweeg gebracht om debieten te kunnen meten. Meetgoten worden onderverdeeld volgens de vorm van de bodem in de meetgoot (bijv. vlak, parabolisch,...), alsook van het profiel.
- Meetschot: vlakke plaat met een uitsparing, die dwars in het afvoerkanaal (meetput) wordt geplaatst. Het afvalwater wordt hierdoor opgestuwd en stroomt door een uitsparing van het schot weg. Het waterniveau voor het schot is evenredig met het doorstromende debiet.
- Keel: het gedeelte van een meetgoot waarin kritische stroming optreedt, meestal waar de natte dwarsdoorsnede van de meetgoot het kleinst is. De keel kan een rechthoekig, trapeziumvormige, U-vormige of een andere speciaal ontworpen vorm (bijv. parabolisch) hebben. Binnen deze WAC worden enkel de rechthoekige en parabolische meetgoten behandeld.
- Debietmeter: meter waarmee (bijvoorbeeld door middel van druk of ultrasoon) het debiet gemeten wordt.
- Elektromagnetische of inductieve debietmeter: een debietsmeter die werkt volgens het principe dat wanneer stromend water zich in een gesloten leiding door een magnetisch veld verplaatst, er een elektrische spanning opgewekt wordt. De opgewekte spanning wordt doorgestuurd naar de afleeseenheid, die zet de spanning om in een genormaliseerd uitgangsignaal evenredig met het debiet.

- Borrelbuis: een instrument voor de hoogtemeting van een vloeistof bestaande uit een buis met een in- en uitgang die verbonden is met de debietmeter en waarin langs de ingang lucht wordt geblazen en langs de uitgang de druk wordt gemeten.
- Ultrasoonsensor: een zender die periodiek een ultrasoon signaal stuurt dat na terugkaatsing wordt ontvangen.
- Blockafstand: dode zone onder de ultrasoonsensor waarbinnen geen stabiele meting wordt bekomen.
- Debietregistratietoestel: apparaat dat continu, of met regelmatige tussenpozen, de parameters gemeten door de bijbehorende sensors (bijv. debiet) registreert.
- Ogenblikkelijk debiet: de hoeveelheid geloosd afvalwater gedurende een moment van meting.
- Totaal uur- of dagdebiet: de totale hoeveelheid geloosd afvalwater gedurende één uur resp. 24 h van meting.
- Technisch dossier: documentatie van de historiek van de controle-inrichting en van het debietmeet- en registratiesysteem (oa. meetverslagen, onderhoudsrapporten, controles), zoals opgelegd in de Code van Goede Praktijk voor installatie, onderhoud en controle van een open^b of gesloten^a controle-inrichting voor debietmeting van afvalwater. De vorm waaronder deze documentatie en registraties worden uitgevoerd, ligt niet vast maar de vereiste gegevens moeten op eenvoudige wijze kunnen voorgelegd worden.
- Uitgangssignaal: het analoge 4-20 mA signaal of digitaal pulssignaal van een debietmeter.
- $h_{\min}$: de minimale waarde (ondergrens) van de waterhoogte h waarbij het debiet ($Q_{\min}$) met een voldoende nauwkeurigheid kan bepaald worden.
- $h_{\max}$: de maximale waarde (bovengrens) van de waterhoogte h waarbij het debiet ($Q_{\max}$) met een voldoende nauwkeurigheid kan bepaald worden.
- h_{overloop} : de waterhoogte gelijk aan de hoogte van het meetgedeelte van de controle-inrichting, en waarbij de controle-inrichting overloopt

3 APPARATUUR, MATERIEEL EN BENODIGDHEDEN

3.1 GESLOTEN CONTROLE-INRICHTING VOOR AFVALWATER

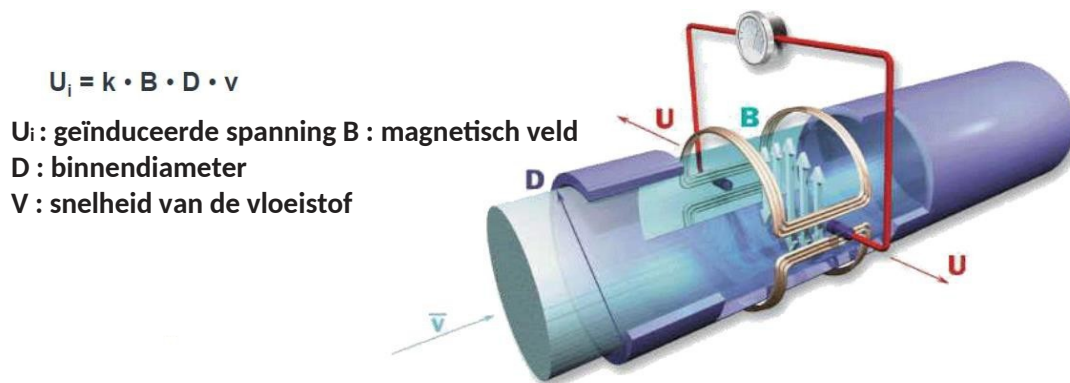
Een gesloten controle-inrichting bestaat uit een gesloten debietmeetsysteem dat op, of tussen, een gesloten leiding wordt geplaatst waarlangs het water wordt geloosd. Het gesloten meetsysteem dient in zodanige staat geïnstalleerd en onderhouden te worden, dat een debietmeting steeds kwaliteitsvol en veilig kan gebeuren. De voorwaarden voor het lozen van het afvalwater via een gesloten of open afvoer staan in VLAREM II Bijlage 4.2.5.1. Controle-inrichting voor lozingen van afvalwaters, en is voor gesloten afvoeren verder uitgewerkt in de Code van Goede Praktijk (CvGP) voor gesloten controle-inrichtingen^a. De uitvoering van deze voorwaarden, en documentatie ervan in een zogenaamd 'technisch dossier', vallen onder de verantwoordelijkheid van de exploitant. De exploitant stelt het technisch dossier, of relevante onderdelen m.b.t. het uitvoeren van de debietsmeting ervan, op diens vraag ter beschikking aan het laboratorium.

3.1.1 DEBIETMETER GESLOTEN CONTROLE-INRICHTING

De meest gangbare methode om debiet in gesloten leidingen te meten is met behulp van een **elektromagnetische (EM) debietmeter**, ook wel magnetisch- inductieve meter (MID) genoemd.

Het principe van de elektromagnetische debietmeter, is gebaseerd op 'de wet van Faraday'. Volgens deze wet wekt een elektrische geleider (het water dat door de debietmeter stroomt) die zich beweegt in een magneetveld (opgewekt door twee veldspoelen aan weerszijde van de meetbuis van de elektromagnetische debietmeter) een spanning op.

Twee meetelektroden in de meetbuis, die loodrecht op de veldspoelen zijn geplaatst, detecteren de opgewekte spanning, welke wordt opgewekt door het stromende water. Het signaal wordt versterkt door een meetversterker, waarbij de opgewekte spanning proportioneel is aan de doorstromingssnelheid van de vloeistof, en dus ook aan het debiet.



Figuur 1: principe EM debietmeter

Een elektromagnetische debietmeter bestaat enerzijds uit de meetbuis dat omringd is door een spoel en een elektrodepaar bevat, en anderzijds uit een signaalomvormer die de schakelcircuits bevat om de gegevens van het stroomsignaal van de elektrode om te zetten in een standaard uitvoersignaal dat direct evenredig is met het debiet. Voor het geheel van het meetsysteem geldt dat:

- het ogenblikkelijk debiet en/of de actuele waterhoogte lokaal afleesbaar moet zijn

- de software en hardware beveiligd moet zijn tegen accidentele ongewenste wijzigingen of veranderingen van de instellingen waardoor onjuiste meetgegevens kunnen worden verkregen.

Bij een gesloten controle-inrichting voert het erkend laboratorium doorgaans geen eigen debietmeting uit, maar moeten zij gebruik maken van het uitgangssignaal van de (elektromagnetische) debietmeter die geïnstalleerd is door het bedrijf zelf.

Voor de eisen die het laboratorium moet stellen bij het gebruik van een debietmeter van het bedrijf, wordt verwezen naar 4.

3.2 OPEN CONTROLE-INRICHTING VOOR AFVALWATER

In een open controle-inrichting voor het lozen van afvalwater wordt het debiet bepaald in een zogenaamd 'open kanaal' waardoor het afvalwater stroomt en waarin, ofwel een meetgoot, ofwel een meetschot, geïnstalleerd is. Voor een debietmeting in een open controle-inrichting installeert het erkend laboratorium een (eigen) debietmeetsysteem (bijv. borrelbuis of ultrasoon) in het bestaande open kanaal (meetgoot of meetschot) van het bedrijf.

Voor het erkend laboratorium dat de debietmeting uitvoert, is het vooral belangrijk dat de verschillende types controle-inrichtingen (3.2.1 en 3.2.2) gekend en geïdentificeerd kunnen worden. Deze typering bepaald namelijk de toe te passen debietformule om van de gemeten waterhoogte om te rekenen naar debiet.

De volledige specificaties voor een open controle-inrichting zijn opgenomen in VLAREM II Bijlage 4.2.5.1^c en in de Code van Goede Praktijk voor open controle-inrichtingen^b.

Het open kanaal (meetgoot of meetschot) op zich dient in zodanige staat geïnstalleerd en onderhouden te worden, dat de meting van het debiet steeds kwaliteitsvol en in alle veiligheid kan gebeuren. De voorwaarden hiervoor zijn tevens opgenomen in de Code van Goede Praktijk voor open controle-inrichtingen^b. De uitvoering ervan valt onder de verantwoordelijkheid van de exploitant, maar overlapt ook (gedeeltelijk) met de uit te voeren kwaliteitscontroles bij de debietmeting. De exploitant is verantwoordelijk voor de documentatie van de controle-inrichting in een zogenaamd 'technisch dossier'. Dit technisch dossier, of relevante onderdelen m.b.t. het uitvoeren van de debietsmeting ervan, worden op diens vraag ter beschikking gesteld aan het laboratorium.

3.2.1 MEETGOTEN (VENTURI)

Een meetgoot bestaat uit een kanaal waarin een lokale vernauwing wordt aangebracht. Deze vernauwing wordt meestal aangeduid als de keel van de meetgoot. De dwarssectie van deze keel is meestal rechthoekig (vlakke meetgoot), maar kan ook parabolisch zijn (parabolische meetgoot). Er bestaan ook meetgoten met een trapezoidale of met U-vormige dwarsdoorsnede, maar deze types worden niet behandeld in deze WAC-methode.

Omdat er stroomafwaarts van de keel geen opstuwing wordt veroorzaakt, wordt in de keel de kritische waterhoogte bereikt. Dit betekent dat er op deze plaats een uniek verband bestaat tussen het debiet en de waterhoogte in de keel van de meetgoot. De waterhoogte wordt echter meestal bepaald in het aanvoerkanaal (vaak is er op die plaats een zijdelingse meetput geïnstalleerd). Stroomopwaarts van de keel is de stroming immers veel kalmer en is het eenvoudiger en meer betrouwbaar om de waterhoogte te meten. Er bestaat dan een uniek verband tussen waterhoogte ter hoogte van de meetsectie en het debiet dat door het kanaal stroomt.

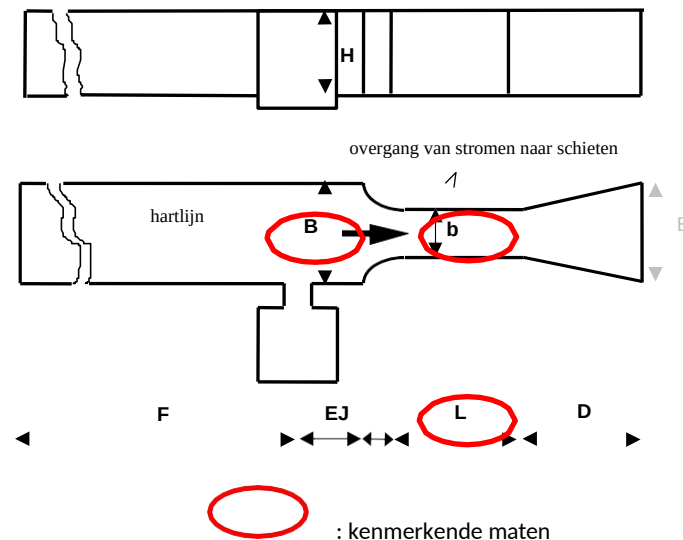
Meetgoten worden ingedeeld op basis van de vorm van de doorsnede en de lengte van de keel.

3.2.1.1 VLAKE MEETGOOT MET RECHTHOEKIGE DOORSNEDE EN LANGE KEEL

De grootste groep van meetgoten zijn deze met vlakke bodem, rechthoekige doorsnede en lange keel. De configuratie van een vlakke meetgoot en de identificatie van de afmetingen zijn weergegeven in Figuur 2.

Vlakke meetgoten bestaan in verschillende groottes (afhankelijk van het debiet dat geloosd wordt) en in types/fabricaten, meestal uitgevoerd in gestandaardiseerde afmetingen. Om dit type meetgoot te herkennen moet men letten op de vorm van de keel: na de vernauwing is deze constant.

De kenmerkende maten van een vlakke meetgoot met rechthoekige doorsnede zijn: B (breedte van het kanaal), b (breedte van de keel) en L (de lengte van de keel).

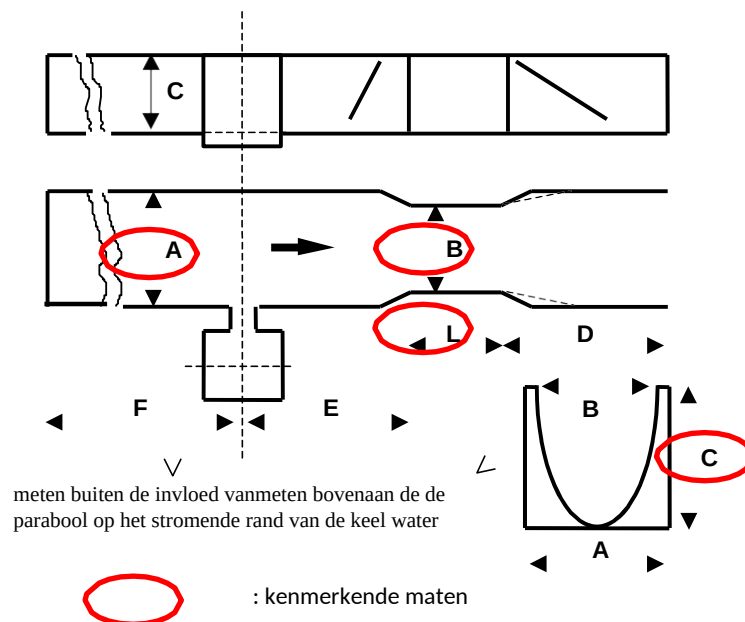


Figuur 2: Schematische voorstelling meetgoten met vlakke bodem, rechthoekige doorsnede en lange keel [B: breedte van het aanvoerkanaal; b: breedte van de keel; D: lengte van het divergerende deel van de meetgoot (uitgang meetsectie); E: lengte hartlijn meetput tot aan de keel; F: lengte aanvoerkanaal-hartlijn meetput J: lengte van de convergerende zone (ingang meetsectie); L: lengte van de keel; H: hoogte van de meetgoot] (bron: VMM)

3.2.1.2 MEETGOTEN MET PARABOLISCHE DOORSNEDE EN LANGE KEEL

Naast de meetgoten met vlakke bodem, bestaan er ook meetgoten met een paraboolvormige keeldoorsnede. Er zijn parabolische meetgoten verkrijgbaar in verschillende groottes met gestandaardiseerde afmetingen (PI t.e.m. PVII), afhankelijk van het debiet dat geloosd wordt. De configuratie van een parabolische meetgoot en is weergegeven in Figuur 3.

De kenmerkende maten zijn: de breedte van de parabool (B), de breedte van het aanvoerkanaal (A) en de hoogte van de meetgoot (C) of de lengte van de keel (L).



Figuur 3: Schematische voorstelling van meetgoot met parabolische bodem met aanduiding van maten [A: breedte van het aanvoerkanaal; B: breedte van de keel (parabool)]; C: hoogte van de meetgoot; D: lengte afvoerkanaal vanaf de vernauwing/keel; E: lengte hartlijn meetput tot aan de vernauwing/keel; F: lengte aanvoerkanaal-hartlijn meetput; L: lengte van de vernauwing/keel] (bron: VMM)

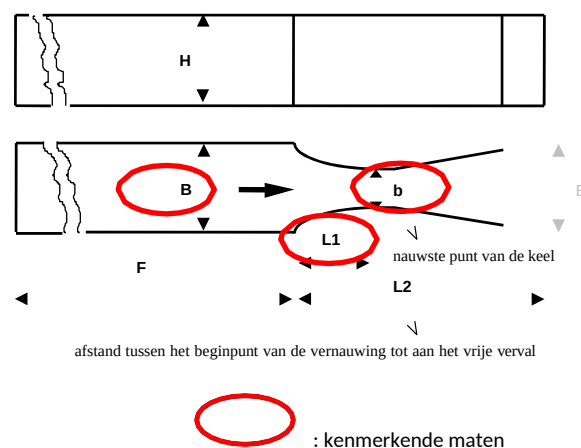
3.2.1.3 KHAFAGI MEETGOOT

In alle lozingsformules voor rechthoekige meetgoten wordt de effectieve kromming van het stromingsprofiel in de versmalling niet meegerekend. Om meer nauwkeurige waarden voor het debiet, afhankelijk van het waterniveau te krijgen, heeft Khafagi een ander model meetgoot ontwikkeld.

Kenmerkend voor deze meetgoot is dat de inlooptengete van de versmalling relatief kort wordt gehouden en dat de versmalling zelf de vorm heeft van een boog.

Ter identificatie is het noodzakelijk om 3 kenmerkende maten te bepalen: B (breedte van het kanaal), b (breedte van de keel gemeten op het smalste punt) en L1 (radius van de boog).

De configuratie van een meetgoot van het type Khafagi QV is weergegeven in Figuur 4.



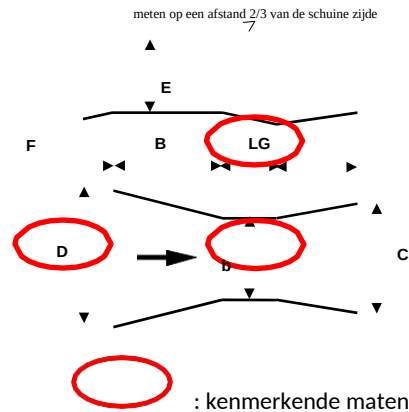
Figuur 4 Schematische voorstelling van Venturi meetgoot type Khafagi QV met aanduiding van maten (bron: VMM) [B: breedte van het aanvoerkanaal; b: breedte van de keel; L1: radius van de boog; L2: lengte afvoerkanaal vanaf de vernauwing/keel; F: lengte aanvoerkanaal-hartlijn meetput; H: hoogte van de meetgoot]

Er bestaan nog andere types Khafagi-achtige meetgoten (bijv. type Hydrologic); voor meer informatie hierover wordt verwezen naar de CVGP voor gesloten controle-inrichtingen^b (bijlage A.3).

3.2.1.4 PARSHALL MEETGOOT

De configuratie van een meetgoot van het type Parshall en de identificatie van de afmetingen zijn weergegeven in Figuur 5. Deze meetgoot heeft rechtopstaande wanden en een knik in de bodem. Dit laatste is het belangrijkste herkenningspunt. In principe is het een speciale toepassing van een meetgoot met vlakke bodem.

Opnieuw worden 3 kenmerkend maten gekarakteriseerd: b (de breedte van de vernauwing), L (lengte vernauwing) en D (breedte kanaal voor vernauwing).



Figuur 5: Schematische voorstelling van Venturi meetgoot type Parshall met aanduiding van maten (bron: VMM)
[b: breedte van de vernauwing; B: lengte van het convergerende gedeelte voor de vernauwing; C: breedte van het afvoerkanaal; D: breedte van het aanvoerkanaal; E: afstand van de verhoging tot de rand van de meetgoot; L: lengte van de vernauwing; G: lengte van het divergerende gedeelte na de vernauwing]

3.2.2 MEETSCHOTTEN

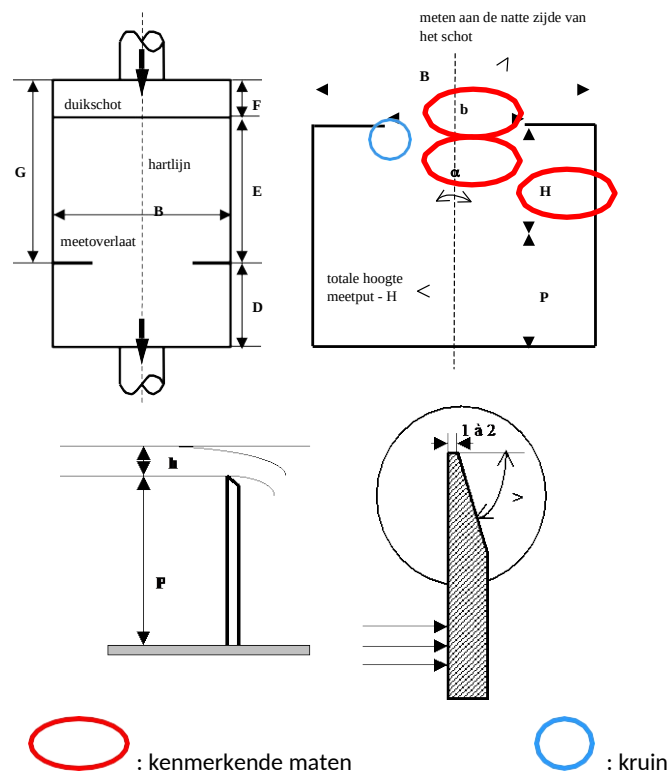
Bij een open afvoer van afvalwater is een meetschot als controle-inrichting ook toegelaten. De drie gekende types meetschotten zijn het V-meetschot (3.2.2.1), het rechthoekige meetschot (BIJLAGE D) en het trapeziumvormige meetschot (Cipolletti overlaat, BIJLAGE D).

3.2.2.1 V-SCHOT (THOMSON-MEETSCHOT)

Een V-meetschot heeft een driehoekige opening. Dit type is geschikt voor het meten van kleine stromen met een hoge nauwkeurigheid en/of voor sterk wisselende doorstromingen. V-schotten zijn de meest voorkomende. De hoogte (H) van het V-schot (gemeten in de uitsparing tot aan de bovenste rand) en de breedte (b) van de opening worden gemeten en op basis van deze waarden wordt de hoek van de uitsnijding (α) berekend.

$$\tan \frac{\alpha}{2} = \frac{b/2}{h}$$

In praktijk zijn 3 hoeken in gebruik: 28°4, 53°8' of 90°.



Figuur 6: Schematische voorstelling van meetschot met Thomson overlaat met aanduiding van maten (bron: VMM)
 [B: breedte van het aanvoerkanaal; α : hoek van de V-vormige uitsnijding; H: hoogte van de V-vormige uitsnijding; h: waterhoogte; P: hoogte van het puntje van de V-vormige uitsnijding ten opzichte van de vloer; D: stroomafwaartse afstand van het meetschot tot aan de putwand; E: afstand tussen duikschot en meetschot; F: stroomopwaartse afstand van putwand tot aan het duikschot; G: stroomopwaartse afstand van de putwand tot aan het meetschot]

3.2.3 DEBIETMETER OPEN CONTROLE-INRICHTING

Bij een open controle-inrichting installeert het erkend laboratorium een (*eigen*) debietmeetsysteem (bijv. borrelbuis of ultrasoon) in het bestaande open kanaal (meetgoot of meetschot) van het bedrijf. Het geloosde debiet wordt gerelateerd aan het waterniveau voor een obstructie in het open kanaal. Er bestaan meerdere systemen om dit waterniveau te meten, maar de twee meest gebruikte mobiele systemen in dit kader zijn het **borrelbuisstelsel** (3.2.3.1) en het **ultrasoonstelsel** (3.2.3.2). Beiden hebben hun voor- en nadelen, en gezien geen van beide in alle omstandigheden bruikbaar zijn, is het noodzakelijk dat een erkend laboratorium over beide systemen beschikt en kan toepassen.

Voor beide meetsystemen geldt dat:

- de hoogtemeting voldoende nauwkeurigheid moet behalen in functie van de te meten hoogte of afstand. Deze nauwkeurigheid dient beter te zijn dan de toegestane tolerantie op de hoogtemeting bij controle van de waterhoogte. Deze tolerantie is per type controle-inrichting vermeld in de betreffende debiettabel ("Tolerantie h");
- het ogenblikkelijk debiet en/of de actuele waterhoogte lokaal afleesbaar moet zijn;
- de software en hardware beveiligd moet zijn tegen accidentele ongewenste wijzigingen of veranderingen van de instellingen waardoor onjuiste meetgegevens kunnen worden verkregen.

In bepaalde gevallen, wanneer het laboratorium geen eigen debietmeting kan installeren, wordt gebruik gemaakt van het uitgangssignaal de vast opgestelde debietmeter van het bedrijf (bijv. ultrasoon sensor). Het laboratorium documenteert in dat geval in het meetverslag de

omstandigheden waarbij de installatie van een eigen debietmeting niet mogelijk was. Het laboratorium vraagt voor aanvang van de debietmeting bij het bedrijf een kopie op van een geldige kwaliteitscontrole cfr. de CvGP van de gebruikte debietmeter^b, of voert een eigen kwaliteitscontrole van het debietmeetsysteem uit (9.2.1 en 9.2.2). De datum van uitvoering van de kwaliteitscontrole wordt door het erkend laboratorium gedocumenteerd in het meetverslag.

3.2.3.1 BORRELBUIS

Een borrelbuis maakt gebruik van een interne luchtcompressor om een vaste hoeveelheid lucht via een borrelbuis in het water te duwen. Door de druk te meten die noodzakelijk is om deze luchthoeveelheid uit de borrelbuis te krijgen bepaalt men de waterhoogte. Bij een hogere of lagere waterstand in de open controle-inrichting, is er resp. een grotere of kleinere druk nodig om het water uit de borrelbuis weg te drukken. Dit drukverschil is een maat voor de hoogte van het water in het meetkanaal.

Borrelbuizen zijn mobiel en makkelijk op te stellen, en vandaar vaak gebruikt als tijdelijke opstelling door erkende laboratoria. In situaties met bv. zwevende delen, vet, enz. bestaat het risico dat de opening van de borrelbuis vernauwt waardoor het gemeten debiet hoger is dan het werkelijk geloosde debiet. Het borrelbuisstelsel is, mits voldoende corrosiebestendig uitgevoerd, geschikt voor alle typen water.

Wanneer er geen zijdelingse meetput aanwezig is, moet een ultrasone sensor gebruikt worden. In geen geval mag de borrelbuis in de controle-inrichting of het aan- en afvoerkanaal geplaatst worden.

3.2.3.2 ULTRASONE SENSOR

Een zender, geplaatst boven de meetgoot of meetschot, zendt een ultrasonische golf uit die op het vloeistofoppervlak als echosignaal weerkaatst wordt. De tijd tussen de uitzending van het signaal en de opname van de echo is een maat voor de afstand tussen ultrasone sensor en wateroppervlak. Bij een juiste instelling van het nulpunt is deze tijd dus ook een maat voor de waterhoogte in de controle-inrichting. Het voordeel van deze methode is dat er geen contact is met het afvalwater. De snelheid van het signaal wordt beïnvloed door de omgevingstemperatuur, zodat een (ingebouwde) temperatuurscompensatie noodzakelijk is. Dit moet een zeer nauwkeurige temperatuurmeting zijn, die beschermd moet worden tegen bijvoorbeeld de invloed van direct zonlicht.

De ultrasoonsonde moet worden toegepast bij meetgoten waar geen zijdelingse meetput aanwezig is. De opstelling van een ultrasoonsonde vergt meer aandacht en voorzieningen, en vandaar dat deze techniek minder vaak als mobiele of tijdelijke debietmeting wordt toegepast (enkel in situaties waar de borrelbuis niet toepasbaar is). De sensor moet namelijk perfect horizontaal (waterpas) boven het wateroppervlak opgesteld worden. De sensor moet aan een stevige, vaste constructie bevestigd worden, zodat de horizontale positie en de verticale montage-afstanden gedurende de periode van debietmeting behouden kunnen blijven. Tevens moet de minimale afstand tussen de het wateroppervlak en de ultrasoonsonde gerespecteerd worden; raadpleeg hiervoor de voorschriften van de leverancier van de sonde.

Bij schuimvorming, waterdamp, of indien er condensatie van het water onderaan de ultrasoonsonde optreedt, wordt de meting gestoord en moet een ander debietmeetsysteem geïnstalleerd worden.

3.2.3.3 ANDERE DEBIETMEETSYSTEMEN

Andere debietmeetsystemen worden toegelaten indien aan de bevoegde overheid kan worden aangetoond dat de nauwkeurigheid overeenkomstig deze van de ultrasone sensor en van borrelbuis is (zie 3.2.3).

3.3 DEBIETREGISTRATIE-APPARATUUR

De registratie van de meting gebeurt via printer/plotter of via digitale opslag die aan de debietmeter wordt gekoppeld of ingebouwd is. De software van het registratiesysteem moet beveiligd zijn tegen accidentele ongewenste wijzigingen of veranderingen van de instellingen waardoor onjuiste meetgegevens kunnen worden verkregen.

3.4 OVERIGE BENODIGDHEDEN EN MATERIEEL

- 3.4.1. Kunststof tubing borrelbuis - debietmeter
- 3.4.2. Elektrisch kabelmateriaal voor koppeling debietmeter met registratie-apparatuur
- 3.4.3. Lange meetlat, rei, winkelhaak, voetjespasser of schuifpasser, rolmeter om maten van de meetinrichting te bepalen, afleesbaar op min. 1 mm
- 3.4.4. T-Lat, L-Lat of speciaal daarvoor ontwikkelde meetopstelling voor meten van de waterhoogte bij een meetschot
- 3.4.5. Waterpas
- 3.4.6. Hellingsmeter met weergave in mm/m, of mogelijkheid tot omrekening naar mm/m
- 3.4.7. Min-max-mallen ($\pm 2\%$) voor vormcontrole van parabolische meetgoten (zie leverancier paraboolgoot)
- 3.4.8. Dunne (max. 2 mm) meetlat, afleesbaar op min. 1 mm voor het meten van de waterhoogte. De lat moet met de smalle zijde loodrecht in de stroming geplaatst kunnen worden zonder dat deze plooit of buigt door druk, en dient in die zin dus niet plooibaar of buigzaam te zijn.
- 3.4.9. Waterdetectiepasta of wateroplosbare stift
- 3.4.10. Klemmen en/of bevestigingsmateriaal voor borrelbuis of ultrasoonsensor
- 3.4.11. Verzegeldraad en zegels
- 3.4.12. Meetblad controle-inrichting
- 3.4.13. Maattabellen voor typering/identificatie van een open controle-inrichting
- 3.4.14. Debiетtabellen (relatie waterhoogte-debiet) per type open controle-inrichting
- 3.4.15. Fototoestel (facultatief)

4 BEPALING VAN HET DEBIET IN EEN GESLOTEN CONTROLE-INRICHTING

Het erkend laboratorium maakt in dit geval gebruik van het uitgangssignaal van de elektromagnetische debietmeter die door het bedrijf zelf geïnstalleerd is in de gesloten controle-inrichting. Voor opstart van de debietmeting wordt technisch dossier van de gebruikte debietmeter opgevraagd bij de exploitant. Volgende afspraken moeten tussen beide partijen gemaakt worden:

- Het bedrijf moet een continu beschikbaar analoog en/of digitaal uitgangssignaal ter beschikking stellen aan de debietmeter, waaraan de registratie-apparatuur van het laboratorium (zie ook 6.1) kan gekoppeld worden.
Conform de CvGP voor gesloten controle-inrichtingen^a zouden de aansluitmogelijkheden van de debietmeter gedocumenteerd moeten zijn in het technisch dossier van de gebruikte debietmeter, en moet deze informatie door het bedrijf ter inzage voorgelegd worden aan het erkend laboratorium dat de debietmeting uitvoert.
- Het erkend laboratorium vraagt voor aanvang van de debietmeting bij het bedrijf een kopie op van een geldige kwaliteitscontrole cfr. de CvGP van de gebruikte debietmeter^a. De aan-/of afwezigheid van een geldige kwaliteitscontrole en de datum van uitvoering ervan, wordt door het erkend laboratorium gedocumenteerd in het meetverslag.

5 BEPALING VAN HET DEBIET IN EEN OPEN CONTROLE-INRICHTING

5.1 IDENTIFICATIE CONTROLE-INRICHTING

Voor opstart van de debietmeting wordt technisch dossier van de open controle-inrichting opgevraagd bij de exploitant.

Ter plaatse wordt, op basis van de visuele kenmerken zoals beschreven in 3.2.1 (meetgoten) en 3.2.2 (meetschotten), het type controle-inrichting bepaald aan de hand van de maattabellen (BIJLAGE A). Ter bevestiging worden minimaal de kenmerkende maten van de controle-inrichting bepaald:

- i. bij een eerste debietmeting worden alle maten van controle-inrichting (zie BIJLAGE A) ter identificatie gemeten conform 5.1.1 en genoteerd op het meetblad.
- ii. bij elke volgende debietmeting worden minimaal jaarlijks of minimaal per heffingsperiode indien deze langer is dan 1 jaar, de kenmerkende maten (zie 3.2.1 en 3.2.2) gemeten conform 5.1.1 en genoteerd op het meetblad. De kenmerkende maten van een meetinrichting zijn aangegeven in Figuur 2 t.e.m. Figuur 6.

5.1.1 BEPALEN VAN DE AFMETINGEN VAN DE CONTROLE-INRICHTING

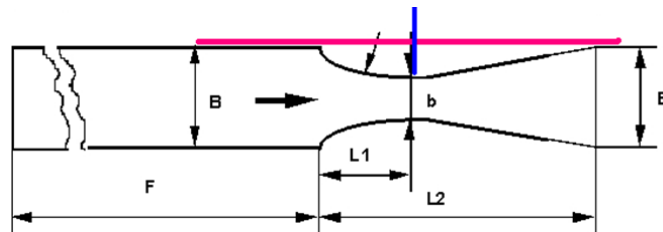
De afmetingen worden opgemeten aan de hand van een meetlat, rei, schuifpasser of voetjespasser (voor kleine meetgoten); voor bepaalde afmetingen kan ook een rolmeter worden gebruikt:

- Horizontale en verticale lijnen van kleine meetgoten (met $h_{\max} \leq 25$ cm) worden nagezien aan de hand van een waterpas¹.
Bij grotere meetgoten (met $h_{\max} > 25$ cm) wordt een helling(sgraad) bepaald met een hellingsmeter (mm/m)².

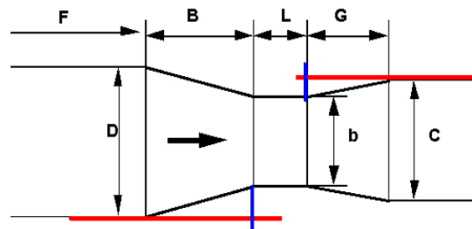
¹ Voor het criterium "waterpas" geldt in langs- en dwarsligging waterpas.

² Volgende toleranties op de hellingsgraad worden toegelaten:

- De **breedtes** van het kanaal en van de vernauwing(keel) wordt gemeten op 3 plaatsen:
 - begin – midden – einde, van het kanaal resp. vernauwing
 In het midden wordt de breedte van het aanvoerkanaal en van de vernauwing (keel) tevens op 3 hoogtes gemeten:
 - bodem (tussen 0-5 cm)
 - midden (1/2 hoogte meetgoot)
 - boven (aan de bovenrand van de goot).
- Bij een meetgoot met vlakke bodem wordt de lengte van de keel (L) gemeten door het plaatsen van een meetlat in de vernauwing recht tegen de zijwand. De vernauwing begint met een boog en eindigt met een knikpunt. De lat wordt gelijkgelegd met het knikpunt (0 cm van de meetlat) en de plaats waar de lat de vernauwing niet meer raakt (het buigpunt) is het punt waar L wordt gemeten.
- Bij een meetgoot met parabolische bodem dient de kromming gecontroleerd te worden met de overeenkomstige min-max-mallen per type parabool ($\pm 2\%$).
- Bij een meetgoot van het type Khafagi, of van het type Parshall, worden resp. de L1 en L2 waarden en B en G waarden bepaald door een lat met T- of L-profiel of winkelhaak (Figuur 7 en 7 rode indicatie) tegen de rechte zijwand van de aanvoer- of afvoergoot te plaatsen; Figuur 7 en Figuur 8 blauwe indicatie) op de meetlat of rei bepalen de correcte waarden. Een lijklem kan zeker gebruikt worden om de lat of rei stabiel vast te maken.



Figuur 7: Opmeting L1 en L2 bij Venturi type Khafagi



Figuur 8: Opmeting B en G bij type Parshall [bron: VMM]

- Indien het in de praktijk door omstandigheden onmogelijk is om bepaalde afmetingen te meten, dient dit duidelijk genoteerd te worden op het meetblad.

- helling bodem keel in stromingsrichting: max. 5 mm/m
- helling bodem kanaal in stromingsrichting tot meetsectie: max. 10 mm/m
- helling bodem kanaal in stromingsrichting tussen meetsectie en convergentie: max. 5 mm/m
- helling bodem kanaal dwars op stromingsrichting tot meetsectie: 10 mm/m
- helling bodem kanaal dwars op stromingsrichting tussen meetsectie en convergentie: 5 mm/m
- afwijking keelwand van verticaliteit: 10 mm/m
- afwijking kanaalwand van verticaliteit: 10 mm/m

5.1.2 TYPERING CONTROLE-INRICHTING

De gemeten maten worden vergeleken met de nominale maten van de betreffende controle-inrichting en de hierop toegelaten toleranties. Deze toleranties zijn per type inrichting opgelijst in de maattabellen van BIJLAGE A.

Zowel gemeten (werkelijke) als de nominale maten en toleranties hierop, worden gedocumenteerd in het meetverslag.

5.1.3 STAAT VAN DE OPEN CONTROLE-INRICHTING

De huidige staat van de controle-inrichting wordt nagegaan conform de checklijst bij de maattabellen in BIJLAGE A. Hiermee worden bepaalde eisen m.b.t. de meetconstructie, onderhoud, en omgevingsfactoren beperkt gecontroleerd opdat een goede debietsmeting in de open controle-inrichting kan uitgevoerd worden.

Afwijkingen op de meetconstructie (bijv. beschadigingen, niet volledig waterpas¹/horizontaal²/verticaal²,...) worden gedocumenteerd in het meetverslag.

5.1.4 OMGAAN MET AFWIJINGEN BIJ EEN OPEN CONTROLE-INRICHTING

Aangezien afwijkingen een belangrijke invloed uitoefenen op de debietmeting dienen ze te worden gerapporteerd aan VMM én vermeld op het verslag van de debietmeting.

Afwijkende maten kunnen aanleiding geven tot het uitsluiten van bepaalde (verkorte) berekeningsmethoden van hoogte naar debiet, of herberekeningen op basis van de gemeten (werkelijke) maten in plaats van de nominale maten. Raadpleeg hiervoor §5.3.

Afwijkingen op de meetconstructie (bv. afwijkende maten, beschadigingen, niet volledig horizontaal, afwijkingen op de algemene voorwaarden,...) geven geen aanleiding tot afkeuren van de controle-inrichting, maar moeten wel gedocumenteerd worden in het verslag van de debietmeting. Bij een niet-conforme eis wordt de invloed op de debietsmeting door de uitvoerder nagegaan: afwijkingen die aanleiding geven tot een lager debiet dan het werkelijk debiet zijn niet aanvaardbaar en worden voor de meting gemeld aan en/of overlegd met VMM.

5.2 PLAATSING DEBIETMEETSYSTEEM

Het debietmeetsysteem wordt geplaatst volgens de instructies van de leverancier, en rekening houdend met de specifieke plaatsingsinstructies voor open controle-inrichtingen in 5.2.1 (borrelbuis) of 5.2.2 (ultrasoon).

5.2.1 PLAATSING VAN HET BORRELBUISSYSTEEM

Een borrelbuis moet opgesteld worden op een plaats waar geen turbulentie is:

- bij een meetgoot wordt de borrelbuis, indien mogelijk, in het midden van de meetput van een controle-inrichting geplaatst. Indien er geen meetput aanwezig is, moet een ultrasoon systeem worden gebruikt. De debietmeting met borrelbuis mag nooit in de meetgoot, of in aan- of afvoerkanaal zelf uitgevoerd worden.
- bij een meetschot wordt de borrelbuis geplaatst waar het water vlak en rustig is en steeds buiten de kromming van het wegstromende water, stroomopwaarts van het meetschot, bij voorkeur op een afstand gelijk aan $2 \text{ à } 4 h_{\max}$ (met een maximum van 1 meter).

De borrelbuis wordt dusdanig geplaatst dat de onderkant van de buis zich steeds onder het nulniveau van de meetfunctie bevindt. De borrelbuis dient enkele cm boven de bodem gemonteerd te worden om de opstuwdruk in de buis mogelijk te maken (1-3 luchtballen per seconde), en loodrecht op het waterniveau.

De leidingen mogen geen lekken, condensatie en ijsvorming vertonen.

5.2.2 PLAATSING VAN HET ULTRASOON SYSTEEM

De sensor moet zodanig gemonteerd worden dat er zich geen belemmeringen bevinden tussen de sensor en het wateroppervlak. De sensor moet loodrecht en perfect horizontaal (waterpas) geplaatst worden op de waterspiegel met inachtneming van de minimaal voorgeschreven afstand ('blockafstand, meestal wordt deze nog vergroot met een veiligheidsafstand van meestal 100 mm; raadpleeg hiervoor de voorschriften van de leverancier van de sonde). Om de horizontale positie gedurende de periode van debietmeting te behouden moet de sensor aan een stevige, vaste constructie bevestigd worden.

De ingebouwde of externe temperatuursmeting (temperatuurscorrectie) moet beschermd worden tegen de invloed van direct zonlicht. De hoogtemeting is optimaal als de temperatuursmeting van de sonde niet meer dan 5°C afwijkt van de gemiddelde temperatuur tussen wateroppervlak en sonde.

De ultrasone meting mag niet beïnvloed worden door waterdamp of condensatie van het water. Indien er schuimvorming, onder de ultrasoonsensor optreedt, wordt de meting gestoord en moet een ander debietmeetsysteem geïnstalleerd worden.

Een ultrasoonsensor wordt als volgt opgesteld:

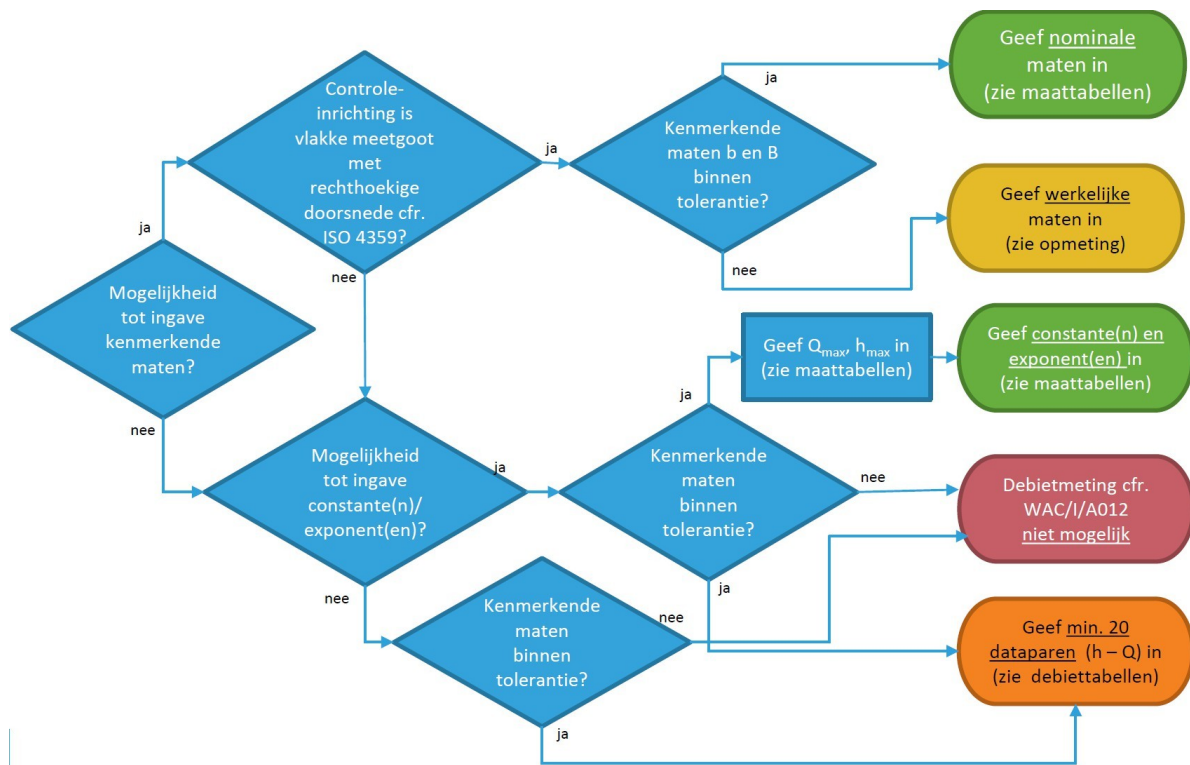
- bij meetgoten, wordt de ultrasoon sensor bij voorkeur bevestigd boven de meetput (indien deze aanwezig is), en anders boven het aanvoerkanaal op een afstand gelijk aan 3 à 4 $h_{\max}$ stroomopwaarts gemeten vanaf het begin van de vernauwing.
- bij de Parshall meetgoot wordt de sensor geplaatst op 2/3 van de schuine zijde stroomopwaarts vanaf de keel.
- bij een meetschot wordt de sensor geïnstalleerd buiten de kromming van het wegstromende water waar het vlak en rustig is, bij voorkeur op een afstand gelijk aan 2 à 4 $h_{\max}$.

5.3 DEBIETFORMULE

Voor elk type controle-inrichting bestaat er een omrekeningsformule om uit de gemeten waterhoogte het overeenkomstige debiet te berekenen. Deze omrekening is afhankelijk van het type (meetgoot of -schot) en de specifieke vorm/profiel en afmetingen van de meetinrichting, de watersnelheid in het aanvoerkanaal (snelheidscoëfficiënt) en de wrijvingsverliezen (debietscoëfficiënt). Voor meer informatie met betrekking tot de toe te passen formules, wordt verwezen naar BIJLAGE C.

Deze formules zijn ingebouwd in de debietmeters of in het registratietoestel, en de omrekening gebeurt automatisch. Bij de plaatsing van het debietmeetsysteem worden daarom de nodige parameters voor de omrekening ingegeven in het toestel. Sommige toestellen bieden een mogelijkheid om gebruik te maken van de uitgebreide formule (bijv. voor vlakke meetgoot conform ISO 4359) met ingave van de maten van de meetgoot, of via verkorte (vereenvoudigde) formules met ingave van een constante(n) en exponent(en). De in te geven parameters per type controle-inrichting kunnen teruggevonden worden in de maattabellen van BIJLAGE A ("debietformules").

De keuze-mogelijkheden voor het instellen van de debietformules zijn weergegeven in Figuur 9.



Figuur 9: Ingave parameters bij instelling van de debietmeter

De omrekeningsformules zijn niet geldig indien één of meerdere van de kenmerkende maten buiten de toleranties van de maattabellen vallen.

Voor *vlakke meetgoten met rechthoekige doorsnede* is er dat geval wel een mogelijkheid om de overeenkomstige debieten (debiets tabel) te **herberekenen** op basis van de gemeten (werkelijke maten) (0). Voor deze herberekening wordt verwezen naar de instructies in Bijlage C.1.1. De herberekende debiets tabel wordt in dat geval als bijlage toegevoegd aan het meetblad. Deze omrekening valt onder de verantwoordelijkheid van het bedrijf, maar kan ook uitgevoerd worden door het erkende laboratorium.

Voor andere controle-inrichtingen is geen herberekening mogelijk, en moet de verdere uitvoering van de debietmeting overlegd/besproken worden met VMM.

Indien het toestel niet toelaat om de omrekening van een bepaald type controle-inrichting via formule (uitgebreide of verkorte formule) in te stellen (bijv. minder courant type meetgoot), is interpolatie van debietwaarden op basis van ingegeven debiets tabellen (dataparen hoogte-debiet) toegelaten. Minimaal 20 dataparen gespreid tussen h_{min} en $h_{overloop}$ van de controle-inrichting, met minstens 10 dataparen tussen 50 en 100% van h_{max} , kunnen geselecteerd worden uit de overeenkomstige debiets tabel van de betreffende controle-inrichting (zie BIJLAGE B).

5.4 INSTELLING NULPUNT

Het nulpunt van het debietmeetsysteem wordt zodanig ingesteld dat de hoogte aangegeven op het display van de debietmeter overeenstemt met de werkelijke waterhoogte gemeten met een meetlat. In het ideale geval wordt dit gedaan als de meetgoot leeg is en komt het referentiepunt van de controle-inrichting overeen met nul.

Er zijn géén correcties voor het nulpunt toegestaan ingeval de controle-inrichting niet volledig leeg is bij nullozing (aanwezigheid van zogenaamd “standwater”). In geen geval mag het standwater in mindering gebracht worden bij het gemeten debiet.

Het referentiepunt van het nulpunt:

- voor meetgoten, met uitzondering van Parshall, is de het referentiepunt de bodem van de keel (zonder correctie voor niet-leeglopende goten);
- bij een Parshall meetgoot is het referentiepunt de bodem op een afstand 2/3 van de schuine zijde stroomopwaarts vanaf de keel;
- voor een meetschot is dit de onderzijde van de uitsnijding (voor V-schot het puntje van de V-vormige uitsnijding).

Indien permanent water wordt geloosd is deze aanpak niet mogelijk en wordt de nul ingesteld zodanig dat de afgelezen hoogte overeen komt met de gemeten hoogte (5.5).

5.5 CONTROLE WATERHOOGTE

Het waterniveau (hoogte) wordt na instelling van het nulpunt gecontroleerd ten opzichte van het referentiepunt (5.3).

Doorgaans wordt dit uitgevoerd met behulp van een stevige dunne meetlat, die behandeld is met een speciale meetpasta (waterdetectiepasta) of met een wateroplosbare stift. Voor de grotere meetgoten zijn andere meetinstrumenten toegelaten (zelfde nauwkeurigheid).

- De meetlat wordt op de meetlocatie (zie hieronder) loodrecht, met de smalste zijde in de stroming geplaatst (niet dwars op de stroming). De actuele hoogte van het waterniveau wordt door de verkleurde pasta of opgeloste stiftindicatie aangegeven.
- Simultaan wordt het actuele waterniveau afgelezen van de debietmeter (mogelijk moet hiervoor een 2^e persoon aanwezig zijn), en wordt de afgelezen waarde (display debietmeter) vergeleken met de gemeten waarde (meetlat).

De toegestane afwijking tussen de gemeten en de afgelezen waarde is afhankelijk van het type controle-inrichting, en is vermeld in de debiettabellen in BIJLAGE B (“tolerantie h”). Pas de instellingen aan indien de afwijking tussen de gemeten en de afgelezen waarde groter is dan de toegestane tolerantie. Herhaal de controle van de waterhoogte tot deze conform is.

5.5.1 MEETLOCATIE VAN DE WATERHOOGTE BIJ EEN MEETGOOT

Bij een meetgoot met zijdelingse meetput wordt de hoogte gemeten *in het midden van het aanvoerkanaal, ter hoogte van het verbindingskanaal naar de meetput*.

Indien het verbindingsstuk vlak is, er geen vervuiling in aanwezig is en essentieel zich op dezelfde hoogte als de goot bevindt, mag ook *in het verbindingskanaal* gemeten worden.

Opmerking:

Omdat de hoogte van het verbindingskanaal in praktijk kan afwijken van de referentiehoogte (door een gebrek aan installatie-eisen voor het verbindingskanaal), is het risico reëel dat er daardoor een verkeerde hoogte in de debietmeter ingegeven wordt. Anderzijds biedt het verbindingskanaal het voordeel dat er minder niveau-schommelingen zijn, en dat er door de meting geen obstructie van de waterstroom veroorzaakt wordt, wat een nauwkeurigere meting kan opleveren. Bij een hoogtemeting in verbindingskanaal dient steeds de hoogte in de goot zelf bijkomend gecontroleerd te worden om na te gaan of er een hoogteverschil is.

Indien er geen meetput is, wordt de hoogte bepaald op een *welbepaalde afstand in de controle-inrichting*:

- bij de meetgoten met vlakke bodem, en zonder zijdelingse meetput (ook Khafagi) wordt de waterhoogte gemeten op een afstand $3 \text{ à } 4 \times h_{\max}$ stroomopwaarts van de vernauwing.
- bij een meetgoot met een paraboolvormige keeldoorsnede die niet voorzien is van een meetput, wordt op een afstand gelijk aan $2 \text{ à } 4 \times h_{\max}$ (breedte van het aanvoerkanaal (A) van de vernauwing), ook weer stroomopwaarts, de hoogte gemeten.
- bij de Parshall meetgoot wordt de hoogte niet gemeten in het aanvoerkanaal maar in de vernauwing op het platform. Dit is in het convergerende gedeelte van de meetgoot en wel op een afstand $2/3$ van de lengte van de schuine kant voor vernauwing (B) gemeten van het smalste gedeelte van de controle-inrichting stroomopwaarts in de goot.

5.5.2 MEETLOCATIE VAN DE WATERHOOGTE BIJ EEN MEETSCHOT

Bij een V-schot is het referentiepunt van het nulpunt de onderzijde van de V-vormige uitsnijding. De meetplaats voor de hoogte bevindt zich stroomopwaarts van het meetschot, buiten de kromming veroorzaakt door de uitstroming. Aangezien bij een meetschot de snelheid nul moet benaderen is er een ruime keuze voor de meetplaats. Er wordt afgesproken dat op een minimale afstand gelijk aan $3 \times h_{\max}$ stroomopwaarts van het meetschot wordt gemeten bij $h_{\max} < 20 \text{ cm}$ of voor nieuwe meetputten met meetschot, en op een afstand gelijk aan $1.5 \times h_{\max}$ bij $h_{\max} > 20 \text{ cm}$ (maximaal 1 m).

Opmerking:

De hoogte van het water mag nooit gemeten worden in de V (te laag wegens uitstroming) of tegen de wand (wandeffect).

Indien de controle-inrichting geen vaste voorziening voor de hoogtemeting heeft voorzien, moet hiervoor wordt een (los) meetapparaat gebruikt dat waterpas is (of waterpas kan worden gecontroleerd) en dat toestaat om de hoogte te meten: lijmklem, T-Lat, L-Lat, speciaal daarvoor ontwikkelde meetopstelling),....

6 REGISTRATIE VAN HET DEBIET

6.1 INSTELLEN REGISTRATIE TOESTEL (PRINTER, LOGGER)

Voor open meetinrichtingen installeert het laboratorium een eigen debietmeetsysteem (zie 3.2.3). Deze debietmeter kan een ingebouwd registratietoestel bevatten, maar indien nodig installeert het laboratorium een apart registratietoestel voor het vastleggen van de debieten. Het registratietoestel registreert continu het ogenblikkelijk debiet. ~~Sluit het~~ Dit registratietoestel kan aangesloten worden aan op het mA (milli-ampere) of pulssignaal van de debietmeter.

In bepaalde gedocumenteerde gevallen kan gebruik gemaakt van de debietmeter van het bedrijf (zie 3.2.3); ook in dat geval dient het registratietoestel van het labo aangesloten op het mA- of pulssignaal van de debietmeter van het bedrijf.

Controleer de gegevensoverdracht: datum, uur, ogenblikkelijk debiet overeenkomstig met de debietmeter (voor debietmeters met ingebouwde logger, is dit niet van toepassing).

³ Meetputten met meetschot die vanaf de publicatiedatum van de CvGP voor open controle-inrichtingen in gebruik genomen werden

6.2 WEERGAVE VAN HET DEBIET

Bij gebruik van het mA-sigitaal wordt het ogenblikkelijk debiet weergegeven in m³/h.

Bij gebruik van het pulssigitaal wordt het optellen van het aantal pulsen weergegeven. De pulsinstelling op de debietmeter en het registratietoestel dient hetzelfde te zijn.

6.2.1 OGENBLIKKELIJK DEBIET

De aflezing van het ogenblikkelijk debiet wordt afgerond op 2 cijfers na de komma. Het tijdstip van de aflezing wordt hierbij genoteerd.

6.2.2 TOTALE DEBIETEN

Bij heffingscampagnes moeten **geregistreerde** uur- en dagdebieten gerapporteerd worden.

Indien **bij andere campagnes dan heffingscampagnes** gebruik wordt gemaakt van het debietmeetsysteem van het bedrijf zelf is het mogelijk dat er geen uurdebieten **beschikbaar** ~~voorhanden~~ zijn **bij het gebruik het debietmeetsysteem van het bedrijf, dienen steeds de** dagdebieten ~~dienen echter steeds~~ beschikbaar te zijn.

De registraties van de dagdebieten worden gecontroleerd of deze gelegen zijn tussen de gestelde $h_{\min}$ en $h_{\max}$ van de controle-inrichting. Indien metingen lager dan $h_{\min}$ of hoger dan $h_{\max}$ waargenomen worden, moet er worden nagegaan welk percentage van het dagdebiet van de campagne lager lag dan $h_{\min}$ en hoger dan $h_{\max}$. Het percentage wordt berekend op basis van de uurdebieten. Voor deze berekening kan bijv. gebruikt gemaakt worden van het rekenblad in BIJLAGE E.

Het begin- en eindtijdstip van elke meetperiode of meetcyclus wordt genoteerd.

7 VERZEGELING

In het kader van heffingscampagnes is het vereist dat alle onderdelen van het debietmeet- en registratiesysteem, en bijhorende klemmen, verzegeld worden zodat de debietmeting niet beïnvloed kan worden.

8 RAPPORTERING

Een meetverslag wordt opgemaakt conform WAC/VI/A/004, en moet bijkomend volgende gegevens bevatten:

- Meetblad met typering, gemeten en nominale maten incl. toleranties, staat van de controle-inrichting;
- Aan-/afwezigheid van het technisch dossier van de controle-inrichting;
- Datum en uur van de meetperiode en/of -cycli;
- $h_{\min}$ en $h_{\max}$ of $Q_{\min}$ - $Q_{\max}$ van de open of gesloten controle-inrichting + % debiet dat buiten $h_{\min}$ en $h_{\max}$ waargenomen werden tijdens de meetperiode;

- Ogenblikkelijk debiet en kwaliteitscontrole(s) voor gesloten (9.1) en open (9.2.1, 9.2.2) controle-inrichtingen;
- Overzicht **geregistreerde (§6)** uurdebieten (m^3/h) en dagdebieten (m^3/dag)
- Mogelijke afwijkingen

9 KWALITEITSCONTROLE

9.1 GESLOTEN CONTROLE-INRICHTING

Het laboratorium vraagt voor aanvang van de debietmeting bij het bedrijf een kopie op van een geldige kwaliteitscontrole cfr. de CvGP van de gebruikte debietmeter^a. De aan-/of afwezigheid van een geldige kwaliteitscontrole en de datum van uitvoering ervan, wordt door het erkend laboratorium gerapporteerd.

9.2 OPEN CONTROLE-INRICHTING

9.2.1 CONTROLE VAN DE ACTUELE T.O.V. DE GEMETEN WATERHOOGTE

De hoogtemeting van de debietmeter in een open controle-inrichting moet regelmatig gecontroleerd worden ten opzichte van de gemeten waterhoogte vanaf de bodem van de meetinrichting (zie 5.5).

In het kader van heffingscampagnes moet dit bij elke meetdag van de monsternamecampagne uitgevoerd worden. Indien er geen lozing (bijv. batch-lozing, nullozing) is op het moment van de deze controle, moet dit gedocumenteerd. Binnen een 3-daagse meetcampagne moet er tenminste één controle (verschillend van de controle bij instelling) uitgevoerd worden, en bij een 5-daagse campagne minstens 2 controles. Vraag eventueel aan de exploitant informatie omtrent de lozingsuren of de mogelijkheid om een lozing op gang te brengen. Afwijkingen hiervan worden geregistreerd, gerapporteerd en gemotiveerd.

Het hoogteverschil tussen de reële waterhoogte en de afgelezen waarde op de debietsmeter mag niet meer bedragen dan de toegestane tolerantie op de waterhoogte. Deze toegestane tolerantie is afhankelijk van de grootte van de controle-inrichting, en is per inrichting vermeld in de debiettabellen in BIJLAGE B ("tolerantie h"). Indien het verschil tussen de gemeten en de afgelezen hoogte meer dan de toegestane tolerantie bedraagt, worden de instellingen van de debietsmeter gecontroleerd en desgevallend aangepast. Er wordt onmiddellijk een nieuwe controle uitgevoerd. Mogelijke aanpassingen van de instellingen wordt gedocumenteerd op het meetblad. Indien de afwijking na (her)controle(s) nog steeds buiten de toegestane tolerantie valt, dient de VMM op de hoogte gebracht te worden.

9.2.2 CONTROLE VAN DE OMREKENING VAN DE HOOGTEMETING NAAR DEBIET DOOR DE DEBIETMETER

Controleer voor aanvang van de debietmeting de omrekening van afgelezen debiet op de debietmeter ten opzichte van het berekende (theoretische) debiet o.b.v. de afgelezen waterhoogte in 9.2.1. Gebruik de overeenkomstige debiettabel (BIJLAGE B of herberekende tabel voor vlakke meetgoot met rechthoekige doorsnede met afwijkende kenmerkende maten) om het berekende (theoretische) debiet te bepalen.

De afwijking tussen het theoretisch en het afgelezen debiet mag maximaal 2% bedragen.

Indien de afwijking meer bedraagt, worden de instellingen nagegaan alvorens een nieuwe controle van de omrekening uit te voeren. Aanpassingen aan de instellingen van de debietmeter moeten geregistreerd worden.

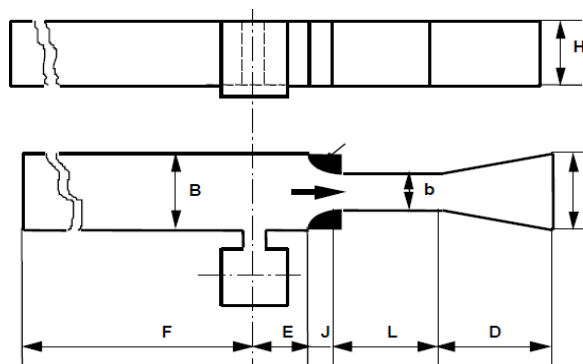
9.2.3 CONTROLE VAN DE LINEARITEIT

De debietmeter wordt bij indienstelling gecontroleerd ten opzichte van een opstelling met gekende waterhoogte (opstelling met vaste meetlat). Er worden minimaal 5 waterhoogtes gecontroleerd, waaronder ook lage hoogtes (<20 mm). Noteer de gemeten hoogte op de debietmeter en de afgelezen hoogte op de meetlat. De afwijking mag niet meer dan toegestane tolerantie op de waterhoogte bedragen, zie debiettabellen in BIJLAGE B ("tolerantie h").

10 REFERENTIES

- a. Code van goede praktijk voor installatie, onderhoud en controle van elektromagnetische debietmeting van afvalwater in gesloten systemen, 2016, VITO i.o.v. het Department Leefmilieu, Natuur en Energie (2016/REE/R/021), https://emis.vito.be/nl/CvGP_afvalwater
- b. Code van goede praktijk voor installatie, onderhoud en controle van een open controle-inrichting voor debietmeting van afvalwater, 2018, VITO-studie i.o.v. het Departement Omgeving (2018/REE/R/02), https://emis.vito.be/nl/CvGP_afvalwater
- c. Titel II van het VLAREM, Bijlage 4.2.5.1. Controle-inrichting voor lozingen van afvalwaters (artikel 4.2.5.1.1. van titel II van het VLAREM)
- d. WAC/I/A/004 – Algemeen - Monsterneming en voorbehandeling – Procedure voor het nemen van een verzamelmonster
- e. WAC/VI/A/004 – Validatie - Voorwaarden voor rapportering van monsternamingsgegevens en analyseresultaten door een erkend laboratorium
- f. ISO 9104:1991, Measurement of fluid flow in closed conduits- Methods of evaluating the
- g. performance of electromagnetic flow-meters for liquids
- h. ISO 6817:1992, Measurement of conductive liquid flow in closed conduits - Method using electromagnetic flowmeters
- i. ISO 1438:2008, Hydrometry – Open channels flow measurements
- j. ISO 4359:2013, Flow measurement structures - Rectangular, trapezoidal and U-shaped flumes
- k. ISO 9826:1992, Measurement of liquid flow in open channels – Parshall and Sanirrii flumes
- l. NBN ISO 4373:2008, Hydrometry -- Water level measuring devices
- m. NBN EN ISO 772:2011, Hydrometry -- Vocabulary and symbols
- n. Kritische kijk op debietformules voor venturi meetgoten met rechthoekige keeldoorsnede (ISO – VLAREM), Water, januari 2003, ir. Gert Luyckx (K.U.Leuven, Laboratorium voor Hydraulica)
- o. Technischel fiche "Open venturi kanalen VKP constructie C.R.A. nv", CRA
- p. Technical information, TI 372D.01/14/en/10.94, Khafagi-Venturi flumes QV 302... QV 316 - Flowrate measuring in open channels, Endress+Hauser
- q. Technische fiche "CANAUX VENTURI", Hydrologic
- r. Etude hydraulique des canaux Venturi Hydrologic, M. Dufresne, J. Vazquez, M. Fischer, Ecole Nationale du Genie de l'eau et de l'environnement de Strasbourg (ENGEES), 2013
- s. Afvalwater, meet- en regeltechniek, Endress+Hauser, uitgave 1995

BIJLAGE A: MAAT- EN TYPERINGSTABELLEN OPEN CONTROLE-INRICHTINGEN



J / N	bodem van de keel waterpas
J / N	wanden van de keel loodrecht
J / N	wanden van de keel evenwijdig
J / N	bodem van aanvoerkanaal waterpas
J / N	wanden van aanvoerkanaal loodrecht
J / N	wanden van aanvoerkanaal evenwijdig
J / N	leeglopen bij nuldebiet
J / N	aangt roomsnelheid vlak
J / N	zijdelingse meetkamer aanwezig

Meetgoot met vlakke bodem: maten

B	b	L	F	E	D	J	H

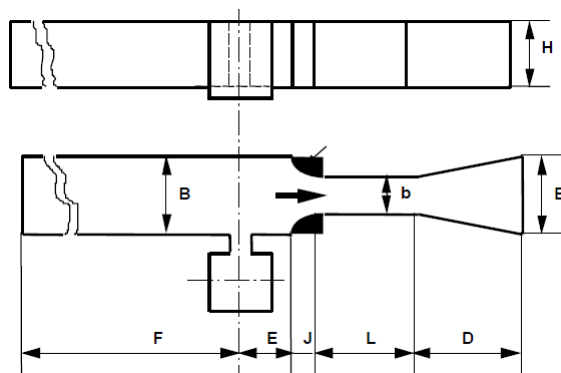
CRA: toleranties maten												
TYPE	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	
maat	30 m³/h (mm)	60 m³/h (mm)	90 m³/h (mm)	180 m³/h (mm)	360 m³/h (mm)	720 m³/h (mm)	1080 m³/h (mm)	1440 m³/h (mm)	1800 m³/h (mm)	3600 m³/h (mm)	7200 m³/h (mm)	
b	min (b-2%)	73	98	122	196	245	261	326	470	548	705	882
	75	100	125	200	250	267	333	480	560	720	900	
B	max (b+2%)	77	102	128	204	255	273	340	490	572	735	918
	min (B-2%)	147	196	245	392	490	392	490	784	784	1176	1470
	150	200	250	400	500	400	500	800	800	1200	1500	
L	max (B+2%)	153	204	255	408	510	408	510	816	816	1224	1530
	min (L-5%)	285	356	427	570	712	769	997	855	1140	1235	1710
	300	375	450	600	750	810	1050	900	1200	1300	1800	
H	max (L+5%)	315	394	473	630	788	851	1103	945	1260	1365	1890
	min (H-5%)	190	237	285	380	475	593	665	760	760	1140	1425
	200	250	300	400	500	625	700	800	800	1200	1500	
D	max (H+5%)	210	263	315	420	525	657	735	840	840	1260	1575
	min (D-5%)	213	285	356	570	712	380	475	912	684	1368	1710
	225	300	375	600	750	400	500	960	720	1440	1800	
E	max (D+5%)	237	394	394	630	788	420	525	1008	756	1512	1890
	min (E-5%)	213	230	247	270	494	1045	1235	1235	1235	1615	2185
	225	243	260	285	520	1100	1300	1300	1300	1700	2300	
F	max (E+5%)	237	256	273	300	546	1155	1365	1365	1365	1785	2415
	min (F-5%)	1425	1900	2375	3800	4750	3800	4750	7600	7600	11400	14250
	1500	2000	2500	4000	5000	4000	5000	8000	8000	12000	15000	
J	max (F+5%)	1575	2100	2625	4200	5250	4200	5250	8400	8400	12600	15750
	min (J-5%)	95	125	156	251	313	167	209	401	301	603	754
	100	132	165	265	330	176	221	423	317	635	794	
	max (J+5%)	105	139	174	279	347	185	233	445	333	667	834

CRA: toepassingsgebied												
TYPE	I 30 m³/h	II 60 m³/h	III 90 m³/h	IV 180 m³/h	V 360 m³/h	VI 720 m³/h	VII 1080 m³/h	VIII 1440 m³/h	IX 1800 m³/h	X 3600 m³/h	XI 7200 m³/h	
$h_{\min}$ (m)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	
$h_{\max}$ (m)	0.16	0.21	0.24	0.27	0.37	0.54	0.61	0.59	0.60	0.83	1.14	
h_{verloop} (m)	0.20	0.25	0.30	0.40	0.50	0.625	0.70	0.80	0.80	1.20	1.5	
$Q_{\min}$ (m³/h)	5.2	6.9	8.6	14	16	19	23	33	39	47	56	
$Q_{\max}$ (m³/h)	30	60	90	180	360	720	1080	1440	1800	3600	7200	

CRA: vereenvoudigde debietformules*											
TYPE Q_{vlarem}	I 30 m³/h	II 60 m³/h	III 90 m³/h	IV 180 m³/h	V 360 m³/h	VI 720 m³/h	VII 1080 m³/h	VIII 1440 m³/h	IX 1800 m³/h	X 3600 m³/h	XI 7200 m³/h
Coëfficiënten**											
k	0.132200	0.177700	0.21758	0.352173	0.442932	0.499057	0.623700	0.88160	1.065186	1.322276	1.65099
u (exp)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Q_{max} **	38	72	120	300	520	660	1200	1400	2520	3600	7200

* enkel toepasbaar indien kenmerkende maten voldoen aan toleranties

** bron: Kritische kijk op debietformules voor venturi meetgoten met rechthoekige keeldoorsnede (ISO - VLAREM), Water, januari 2003, ir. Gert Luyckx (K.U.Leuven, Laboratorium voor Hydraulica)



Meetgoot met vlakke bodem: maten

J / N	bodem van de keel waterpas
J / N	wanden van de keel loodrecht
J / N	wanden van de keel evenwijdig
J / N	bodem van aanvoerkanaal waterpas
J / N	wanden van aanvoerkanaal loodrecht
J / N	wanden van aanvoerkanaal evenwijdig
J / N	leeglopen bij nuldebiet
J / N	aanstroomsnelheid vlak
J / N	zijdelingse meetkamer aanwezig

B	b	L	F	E	D	J	H

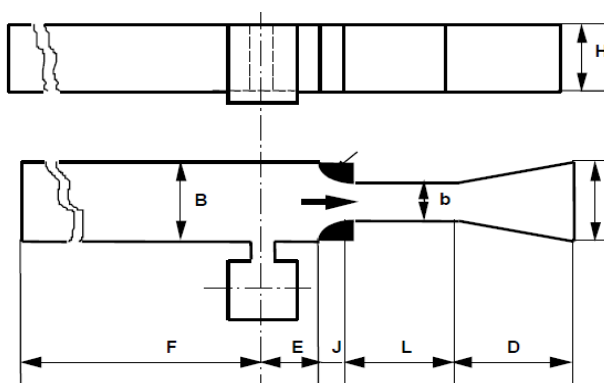
ARKON Z1561: maten									
TYPE maat	50 l/s (mm)	100 l/s (mm)	200 l/s (mm)	300 l/s (mm)	400 l/s (mm)	500 l/s (mm)	800 l/s (mm)	1000 l/s (mm)	1500 l/s (mm)
b	min (b-2%) 130 max (b+2%) 136	196 204	261 273	326 340	358 374	424 442	522 544	588 612	653 681
B	min (B-2%) 196 max (B+2%) 204	294 306	392 408	490 510	539 561	637 663	784 816	882 918	980 1020
L	min (L-5%) 489 max (L+5%) 541	593 657	769 851	997 1103	1045 1155	1235 1365	1425 1575	1615 1785	1700 1865
H	min (H-5%) 380 max (H+5%) 420	451 499	593 657	688 762	760 840	807 893	950 1050	1073 1187	1235 1365
D	min (D-5%) 190 max (D+5%) 210	285 315	380 420	475 525	522 578	617 683	760 840	855 945	950 1050
E	min (E-5%) 190 max (E+5%) 210	285 315	380 420	475 525	522 578	617 683	760 840	855 945	950 1050
F	min (F-5%) 1900 max (F+5%) 2100	2850 3150	3800 4200	4750 5250	5225 5775	6175 6825	7600 8400	8550 9450	9500 10500
J	min (J-5%) 79 max (J+5%) 89	125 139	167 185	209 233	230 256	272 302	335 371	377 417	418 464

ARKON Z1561: toepassingsgebied									
TYPE	50 l/s	100 l/s	200 l/s	300 l/s	400 l/s	500 l/s	800 l/s	1000 l/s	1500 l/s
h_{min} (m)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
h_{max} (m)	0.34	0.42	0.54	0.60	0.70	0.73	0.87	1.0	1.1
$h_{overloop}$ (m)	0.40	0.48	0.63	0.73	0.80	0.85	1.00	1.1	1.3
Q_{min} (m³/h)	9.1	14	19	23	25	30	36	40	43
Q_{max} (m³/h)	180	360	720	1080	1440	1800	2880	3960	5400

ARKON Z1561: vereenvoudigde debietformules*									
TYPE	50 l/s	100 l/s	200 l/s	300 l/s	400 l/s	500 l/s	800 l/s	1000 l/s	1500 l/s
Coëfficiënten**									
k	0.250632	0.378141	0.503965	0.628565	0.689087	0.816652	1.004140	1.128765	1.253008
u (exp)	1.51	1.51	1.51	1.51	1.51	1.51	1.51	1.51	1.51

* enkel toepasbaar indien kenmerkende maten voldoen aan toleranties

** bron: Aquafin



Meetgoot met vlakke bodem: maten

J / N	bodem van de keel waterpas
J / N	wanden van de keel loodrecht
J / N	wanden van de keel evenwijdig
J / N	bodem van aanvoerkanaal waterpas
J / N	wanden van aanvoerkanaal loodrecht
J / N	wanden van aanvoerkanaal evenwijdig
J / N	leeglopen bij nuldebiet
J / N	aanstroomsnelheid vlak
J / N	zijdelingse meetkamer aanwezig

B	b	L	F	E	D	J

ARKON Z1458: maten						
TYPE maat	2,5 l/s (mm)	5 - 10 l/s (mm)	25 l/s (mm)	50 - 100 l/s (mm)	250 l/s (mm)	500 - 1000 l/s (mm)
b	min (b-2%)	74	99	174	298	447
	max (b+2%)	76	102	178	305	457
B	min (B-2%)	148	224	373	597	896
	max (B+2%)	152	229	381	610	915
L	min (L-5%)	144	241	338	579	869
	max (L+5%)	152	254	356	610	915
H	min (H-5%)	96	181	253	385	603
	max (H+5%)	102	191	267	406	635
D	min (D-5%)	217	361	579	869	1303
	max (D+5%)	229	381	610	915	1372
E	min (E-5%)	144	217	361	579	869
	max (E+5%)	152	229	381	610	915
F	min (F-5%)	1425	2185	3610	5795	8692
	max (F+5%)	1500	2300	3800	6100	9150
J	min (J-5%)	96	156	253	386	579
	max (J+5%)	102	165	267	407	610

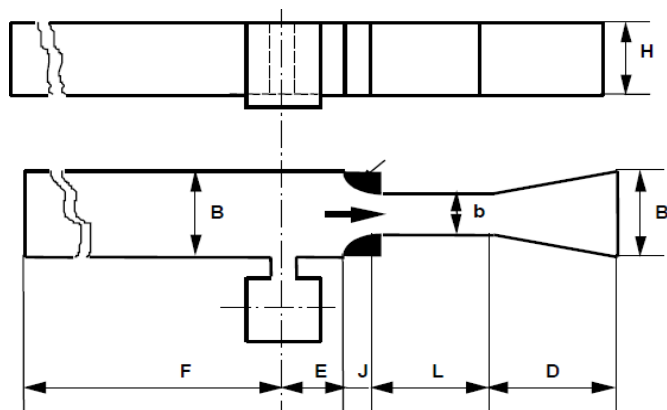
ARKON Z1458: toepassingsgebied						
TYPE	2,5 l/s	5 - 10 l/s	25 l/s	50 - 100 l/s	250 l/s	500 - 1000 l/s
$h_{\min}$ (m)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
$h_{\max}$ (m)	0.07	0.15	0.19	0.33	0.46	0.82
h_{overloop} (m)	0.10	0.19	0.27	0.41	0.64	1.02
$Q_{\min}$ (m³/h)	5.4	7.1	12	21	30	48
$Q_{\max}$ (m³/h)	9	36	90	360	900	3600

ARKON Z1458: vereenvoudigde debietformules*						
TYPE	2,5 l/s	5 - 10 l/s	25 l/s	50 - 100 l/s	250 l/s	500 - 1000 l/s***
Vlaar-coëfficiënten**						
k	0.1348	0.1783	0.3134	0.5417	0.8111	1.355249
u (exp)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.52
$Q_{\max}$ **	14.4	42	120	480	1300	-

* enkel toepasbaar indien kenmerkende maten voldoen aan toleranties

** bron: Kritische kijk op debietformules voor venturi meetgoten met rechthoekige keeldoorsnede (ISO - VLAREM), Water, januari 2003, ir. Gert Luyckx (K.U.Leuven, Laboratorium voor Hydraulica)

*** bron: Aquafin



J / N	bodem van de keel waterpas
J / N	wanden van de keel loodrecht
J / N	wanden van de keel evenwijdig
J / N	bodem van aanvoerkanaal waterpas
J / N	wanden van aanvoerkanaal loodrecht
J / N	wanden van aanvoerkanaal evenwijdig
J / N	leeglopen bij nuldebiet
J / N	aanstroomsnelheid vlak
J / N	zijdelingse meetkamer aanwezig

Meetgoot met vlakke bodem: maten

B	b	L	F	E	D	J

OCK-P: maten					
TYPE	OCK-P-50	OCK-P-100	OCK-P-250	OCK-P-500	OCK-P-1000
maat	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)
b min (b-2%)	298	298	447	746	746
b max (b+2%)	305	305	457	762	762
B min (B-2%)	597	597	896	1493	1493
B max (B+2%)	610	610	915	1524	1524
L min (L-5%)	579	579	869	1447	1447
L max (L+5%)	610	610	915	1524	1524
H min (H-5%)	385	385	603	965	965
H max (H+5%)	406	406	635	1016	1016
D min (D-5%)	869	869	1303	2171	2171
D max (D+5%)	915	915	1372	2286	2286
E min (E-5%)	579	579	869	1447	1447
E max (E+5%)	610	610	915	1524	1524
F min (F-5%)	3800	6175	8740	10925	15200
F max (F+5%)	4000	6500	9200	11500	16000
J min (J-5%)	386	386	579	1447	1447
J max (J+5%)	407	407	610	1524	1524

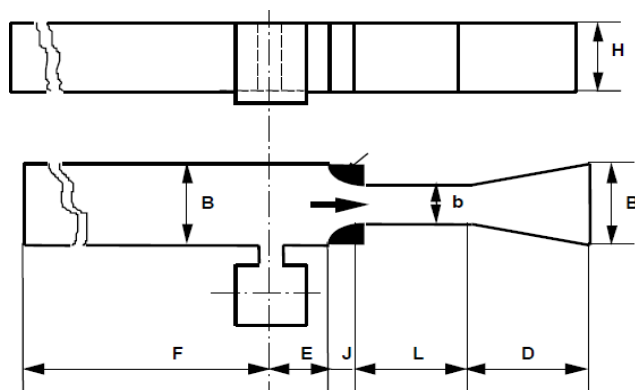
OCK-P: toepassingsgebied					
TYPE	OCK-P-50	OCK-P-100	OCK-P-250	OCK-P-500	OCK-P-1000
h_{min} (m)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
h_{max} (m)	0.21	0.33	0.46	0.52	0.82
$h_{overloop}$ (m)	0.41	0.41	0.64	1.02	1.02
Q_{min} (m ³ /h)	21	21	30	48	48
Q_{max} (m ³ /h)	180	360	900	1800	3600

OCK-P: vereenvoudigde debietformules*					
TYPE	OCK-P-50	OCK-P-100	OCK-P-250	OCK-P-500	OCK-P-1000
Vlaem-coëfficiënten**					
k	0.5417	0.5417	0.8111	1.355249***	1.355249***
u (exp)	1.5	1.5	1.5	1.52***	1.52***

* enkel toepasbaar indien kenmerkende maten voldoen aan controle-eisen

** bron: Kritische kijk op debietformules voor venturi meetgoten met rechthoekige keeldoorname (ISO - VLAREM), Water, januari 2003, ir. Gert Luyckx (K.U.Leuven, Laboratorium voor Hydraulica)

*** bron: Aquafin



J / N	bodem van de keel waterpas
J / N	wanden van de keel loodrecht
J / N	wanden van de keel evenwijdig
J / N	bodem van aanvoerkanaal waterpas
J / N	wanden van aanvoerkanaal loodrecht
J / N	wanden van aanvoerkanaal evenwijdig
J / N	leeglopen bij nuldebiet
J / N	aanstroomsnelheid vlak
J / N	zijdelingse meetkamer aanwezig

Meetgoot met vlakke bodem: maten

B	b	L	F	E	D	J	H

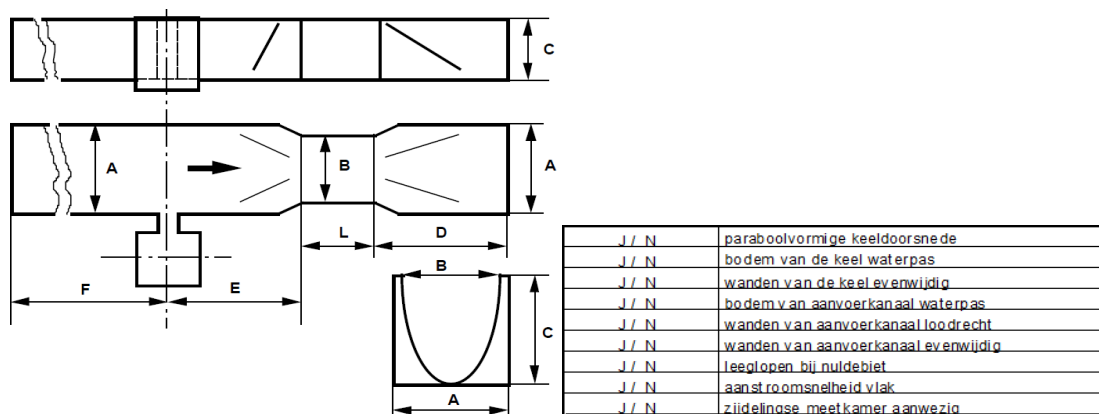
FISCHER&PORTER: maten									
TYPE maat	50 l/s (mm)	100 l/s (mm)	200 l/s (mm)	300 l/s (mm)	430 l/s (mm)	540 l/s (mm)	800 l/s (mm)	1100 l/s (mm)	1500 l/s (mm)
b <i>min (b-2%)</i>	130	196	261	326	392	457	522	588	653
<i>max (b+2%)</i>	133	200	267	333	400	467	533	600	667
B <i>min (B-2%)</i>	196	294	392	490	588	686	784	882	980
<i>max (B+2%)</i>	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
L <i>min (L-5%)</i>	489	589	769	855	983	1026	1225	1401	1605
<i>max (L+5%)</i>	515	620	810	900	1035	1080	1290	1475	1690
H <i>min (H-5%)</i>	380	451	593	688	760	807	950	1073	1235
<i>max (H+5%)</i>	400	475	625	725	800	850	1000	1130	1300
D <i>min (D-5%)</i>	190	285	380	475	570	665	760	855	950
<i>max (D+5%)</i>	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
E+F <i>min ((E+F)-5%)</i>	2137	2850	3800	4750	5700	6650	7600	8550	9500
<i>max ((E+F)+5%)</i>	2250	3000	4000	5000	6000	7000	8000	9000	10000
J <i>min (J-5%)</i>	79	125	167	209	251	292	335	377	418
<i>max (J+5%)</i>	84	132	176	221	265	308	353	397	441

FISCHER&PORTER: toepassingsgebied									
TYPE	50 l/s	100 l/s	200 l/s	300 l/s	430 l/s	540 l/s	800 l/s	1100 l/s	1500 l/s
h_{min} (m)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
h_{max} (m)	0.34	0.41	0.54	0.61	0.69	0.721	0.86	0.98	1.13
h_{overloop} (m)	0.40	0.48	0.63	0.73	0.80	0.85	1.00	1.13	1.30
Q_{min} (m³/h)	9.6	14	19	23	28	32	36	40	43
Q_{max} (m³/h)	180	360	720	1080	1548	1944	2880	3960	5400

FISCHER&PORTER: vereenvoudigde debietformules*									
TYPE	50 l/s	100 l/s	200 l/s	300 l/s	430 l/s	540 l/s	800 l/s	1100 l/s	1500 l/s
Coëfficiënten**									
k	0.250632	0.378216	0.503946	0.628565	0.754832	0.882454	1.004400	1.12915	1.253187
u (exp)	1.51	1.51	1.51	1.51	1.51	1.51	1.51	1.51	1.51

* enkel toepasbaar indien kenmerkende maten voldoen aan controle-eisen

** bron: Aquafin



Meetgoot met parabolische doorsnede: maten

A	B	C	D	E	F	L

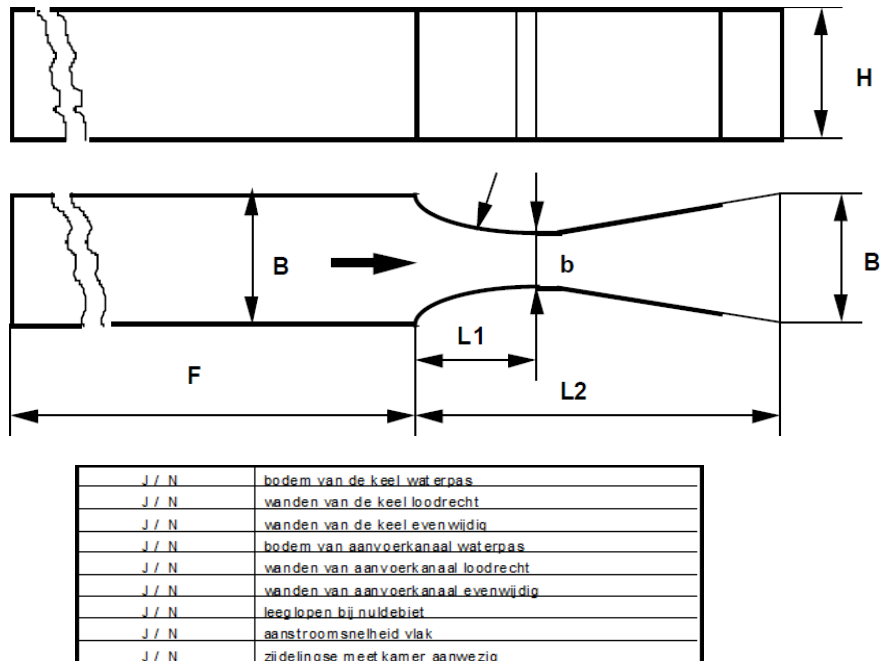
parabool: maten							
TYPE maat	P I (mm)	P II (mm)	P III (mm)	P IV (mm)	P V (mm)	P VI (mm)	P VII (mm)
A	min (b-2%)	88	127	186	274	411	539
	max (b+2%)	92	133	194	286	429	561
B	min (B-2%)	71	100	147	217	330	438
	max (B+2%)	75	106	155	227	344	456
C	min (L-5%)	190	237	294	361	437	570
	max (L+5%)	210	263	326	399	483	630
D	min (D-5%)	213	308	451	665	1026	1282
	max (D+5%)	237	342	499	735	1134	1418
E	min (E-5%)	159	230	337	495	744	974
	max (E+5%)	177	256	373	549	824	1078
F	min (F-5%)	1900	2375	2850	3325	4275	5700
	max (F+5%)	2000	2500	3000	3500	4500	6000
L	min (L-5%)	66	95	142	209	323	427
	max (L+5%)	74	105	158	231	357	473

parabool: toepassingsgebied							
TYPE	P I	P II	P III	P IV	P V	P VI	P VII
$h_{\min}$ (m)	0.021	0.028	0.033	0.042	0.047	0.061	0.082
$h_{\max}$ (m)	0.16	0.20	0.27	0.34	0.42	0.55	0.72
h_{overloop} (m)	0.20	0.25	0.31	0.38	0.46	0.60	0.80
$Q_{\min}$ (m ³ /h)**	0.21	0.43	0.9	1.8	3.6	7.2	14.4
$Q_{\max}$ (m ³ /h)**	20	40	90	180	360	720	1400

parabool: debietformule* $Q_{[m^3/h]} = C * h^{np_{[m]}} * 3600$							
TYPE	P I	P II	P III	P IV	P V	P VI	P VII
Coëfficiënten**							
C	0.39885	0.44187	0.46362	0.54419	0.61851	0.71726	0.77152
exponent	2.3	2.3	2.2	2.2	2.1	2.1	2.1

* enkel toepasbaar indien kenmerkende maten voldoen aan controle-eisen

** bron: CRA



Meetgoot Khafagi: maten

B	b	L 1	L 2	F	H

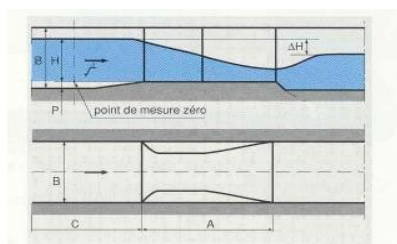
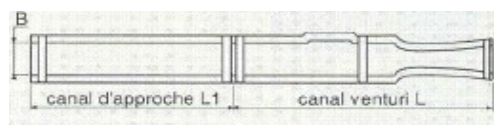
Kafhagi QV: maten (mm)									
TYPE	QV302 10 l/s 36 m³/h	QV303 25 l/s 90 m³/h	QV304 50 l/s 180 m³/h	QV305 75 l/s 270 m³/h	QV306 100 l/s 360 m³/h	QV308 250 l/s 900 m³/h	QV310 500 l/s 1800 m³/h	QV313 800 l/s 2880 m³/h	QV316 1500 l/s 5400 m³/h
b	min (b-2%) 47	117	156	196	235	313	392	509	627
	max (b+2%) 48	120	160	200	240	320	400	520	640
B	min (B-2%) 117	294	392	490	588	784	980	1274	1568
	max (B+2%) 120	300	400	500	600	800	1000	1300	1600
L1	min (L1-5%) 114	285	380	475	570	760	950	1235	1520
	max (L1+5%) 126	315	420	525	630	840	1050	1365	1680
L2	min (L2-5%) 399	997	1330	1662	1995	2660	3325	4322	5320
	max (L2+5%) 420	1050	1400	1750	2100	2800	3500	4550	5600
F	min (F-5%) 902	2660	3420	4560	5225	7410	9500	11400	13300
	max (F+5%) 998	2940	3780	5040	5775	8190	10500	12600	14700
H	min (H-5%) 285	285	380	427	427	636	826	969	1254
	max (H+5%) 300	300	400	450	450	670	870	1020	1320

Kafhagi QV: toepassingsgebied									
TYPE	QV302	QV303	QV304	QV305	QV306	QV308	QV310	QV313	QV316
h_{min} (m)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
h_{max} (m)**	0.17	0.25	0.35	0.38	0.40	0.60	0.80	0.95	1.25
Q_{min} (m³/h)	4	9	11	14	17	23	28	37	45
Q_{max} (m³/h)**	25	105	230	320	410	1025	1980	3300	6200

Kafhagi QV: debietformule * $Q [m^3/h] = c_1 * b [m] * h^{1.5} [m] + h^{2.5} [m] * 3.6$									
TYPE	QV302 10 l/s 36 m³/h	QV303 25 l/s 90 m³/h	QV304 50 l/s 180 m³/h	QV305 75 l/s 270 m³/h	QV306 100 l/s 360 m³/h	QV308 250 l/s 900 m³/h	QV310 500 l/s 1800 m³/h	QV313 800 l/s 2880 m³/h	QV316 1500 l/s 5400 m³/h
Coëfficiënten**									
c_1	0.01744	0.01744	0.01744	0.01744	0.01744	0.01744	0.01744	0.01744	0.01744
γ	0.00091	0.00091	0.00091	0.00091	0.00091	0.00091	0.00091	0.00091	0.00091

* enkel toepasbaar indien kenmerkende maten voldoen aan controle-eisen

** bron: Endress+Hauser



J / N	bodem van de keel waterpas
J / N	vanden van de keel loodrecht
J / N	vanden van de keel evenwijdig
J / N	bodem van aanvoerkanaal waterpas
J / N	vanden van aanvoerkanaal loodrecht
J / N	vanden van aanvoerkanaal evenwijdig
J / N	leeg lopen bij nuldebiet
J / N	aanstroomsnelheid vlak
J / N	zijdelingse meetkamer aanwezig

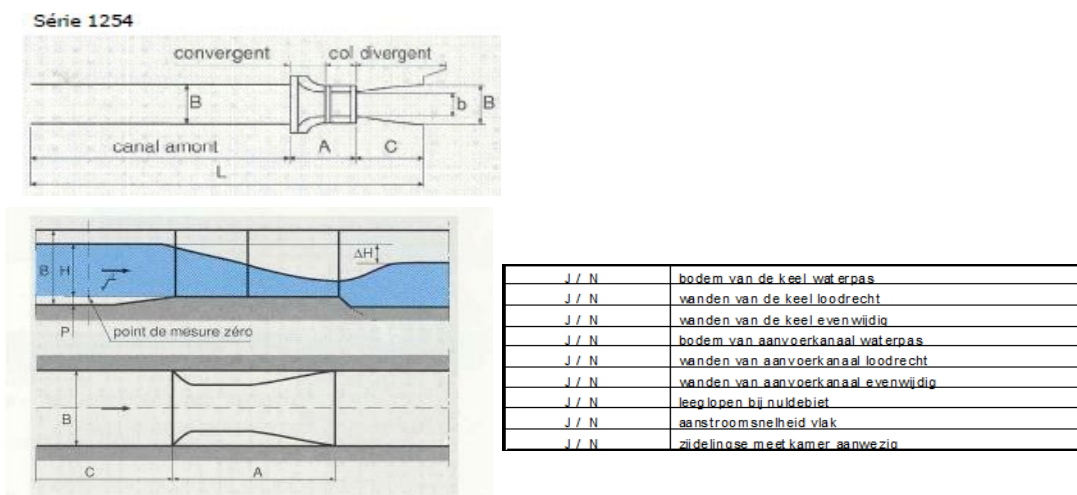
B	L	L1	H

Hydrologic 1253: maten (mm)												
TYPE	1253 AV	1253 AW	1253 AX	1253 AY	1253 AZ	1253 A	1253 B	1253 C	1253 D	1253 E	1253 F	
B	min (B-2%)	39	53	83	98	122	147	196	245	294	396	490
	40	55	85	100	125	150	200	250	300	405	500	
L	max (B+2%)	41	57	87	102	128	153	204	255	306	414	510
	min (L-5%)	318	427	684	755	878	1007	1349	1691	2023	2698	3372
L	335	450	720	795	925	1060	1420	1780	2130	2840	3550	
	max (L+5%)	351	472	756	834	971	1113	1491	1869	2236	2982	3727
L1	min (L1-5%)	190	261	403	475	593	712	950	1187	1425	1892	2372
	200	275	425	500	625	750	1000	1250	1500	1960	2450	
L1	max (L1+5%)	210	288	446	525	656	787	1050	1312	1575	2048	2550
	min (H-2.5%)	90	99	150	171	209	213	285	356	427	570	712
H	95	105	158	180	220	225	300	375	450	600	750	
	max (H+2.5%)	100	111	166	189	231	237	315	394	473	630	780

Hydrologic 1253: debietformule* $Q_{[m^3/h]} = (a \cdot h^4 - b \cdot h^3 + c \cdot h^2 + d \cdot h - e) \cdot 3,6$ [h in m]											
TYPE	1253 AV	1253 AW	1253 AX	1253 AY	1253 AZ	1253 A	1253 B	1253 C	1253 D	1253 E	1253 F
constanten**											
a	10000	7000	3100	2700	1900	1360	1000	690	530	330	240
b	1310	1400	1020	1020	897	790	750	650	602	504	453
c	184	239	295	329	365	398	470	522	575	654	725
d	2.46	4.05	8.66	10.71	15.29	21	31.7	46	61.2	96	137
e	0.0063	0.013	0.041	0.055	0.1	0.17	0.32	0.6	0.96	1.99	3.66
toepassingsgebied											
h_{min} (mm)**	8	10.5	17.5	20	25	30	40	50	60	80	100
h_{max} (mm)**	52	68	110.5	130	162.5	195	260	325	390	520	650
$h_{overloop}$ (mm)	95	105	158	180	220	225	300	375	450	600	750
Q_{min} (m³/h)	0.09	0.21	0.74	1.0	1.8	2.9	6.0	11	19	35	61
Q_{max} (m³/h)**	1.8	3.9	13	20	34	55	112	200	400	650	1100

* enkel toepasbaar indien kenmerkende maten voldoen aan controle-eisen

** bron: Hydrologic



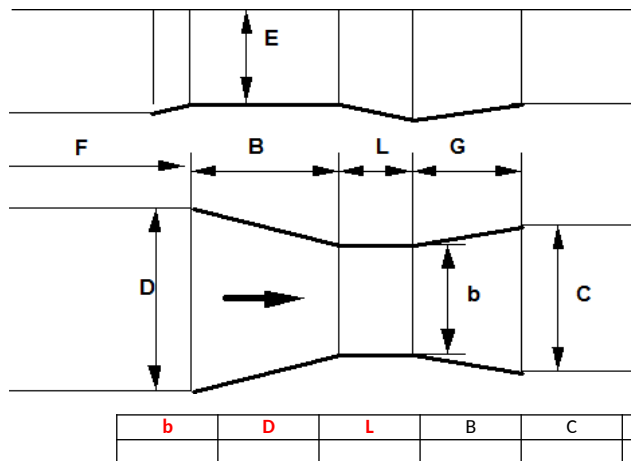
B	b	A	C	L	H

Hydrologic 1254: maten (mm)								
TYPE	1254 A	1254 B	1254 C	1254 D	1254 E	1254 F	1254 I	
B	min (B-2%)	637	784	931	1078	1225	1372	1764
		650	800	950	1100	1250	1400	1800
	max (B+2%)	663	816	969	1122	1275	1428	1836
b	min (b-2%)	382	470	558	646	735	823	1058
		390	480	570	660	750	840	1080
	max (b+2%)	398	490	582	674	765	857	1102
A	min (A-5%)	671	815	959	1102	1244	1387	1824
		707	858	1010	1160	1310	1460	1920
	max (A+5%)	743	901	1061	1218	1376	1533	2016
C	min (C-5%)	1007	1206	1396	1605	1805	2004	2536
		1060	1270	1470	1690	1900	2110	2670
	max (C+5%)	1113	1334	1544	1775	1995	2216	2804
L	min (L-5%)	7790	9595	11400	13110	14915	16625	21470
		8200	10100	12000	13800	15700	17500	22600
	max (L+5%)	8610	10605	12600	14490	16485	18375	23730
H	min (H-5%)	883	1073	1273	1463	1653	1852	2384
		930	1130	1340	1540	1740	1950	2510
	max (H+5%)	977	1187	1407	1617	1827	2048	2636

Hydrologic 1254: debietformule* $Q_{[m^3/h]} = (a \cdot h^4 - b \cdot h^3 + c \cdot h^2 + d \cdot h - e) \cdot 3,6$ [h in m]							
TYPE	1254 A	1254 B	1254 C	1254 D	1254 E	1254 F	1254 I
constanten**							
a	170	125	95	76	61	53	36
b	383	349	312	290	270	255	221
c	814	903	977	1052	1119	1181	1332
d	194	271	354	445	539	645	953
e	6.1	11	17	25	33	45	87
toepassingsgebied							
h_{min} (m)**	1.3	1.6	1.9	0.22	0.25	0.28	0.36
h_{max} (m)**	0.845	1.04	1.235	1.43	1.625	1.82	2.34
$h_{overloop}$ (m)	0.93	1.13	1.34	1.54	1.74	1.95	2.51
Q_{min} (m³/h)	120	200	300	440	600	630	1500
Q_{max} (m³/h)**	2000	3000	5600	8000	11000	12000	28000

* enkel toepasbaar indien kenmerkende maten voldoen aan controle-eisen

** bron: Hydrologic



/ / N	knik in bodem van de keel
/ / N	wanden van de keel loodrecht
/ / N	wanden van de keel evenwijdig
/ / N	bodem van aanvoerkanaal waterpas
/ / N	wanden van aanvoerkanaal loodrecht
/ / N	wanden van aanvoerkanaal evenwijdig
/ / N	leeglopen bij nuldebiet
/ / N	aanstroomsnelheid vlak
/ / N	zijdelingse meetkamer aanwezig

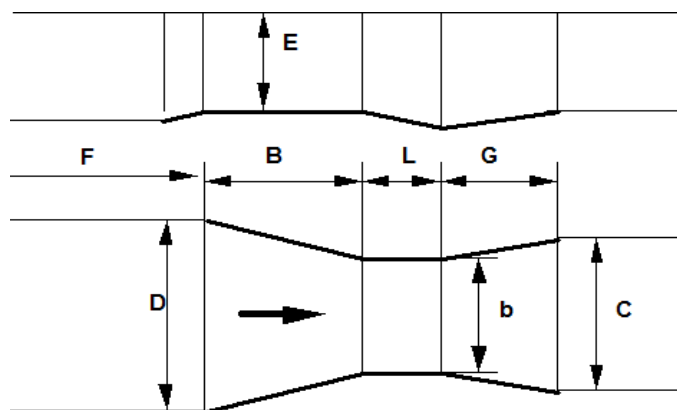
parshall: maten (mm)												
TYPE	1"	2"	3"	6"	9"	1'	1'6"	2'	3'	4'	5'	
b	min (b-2%)	24	49	74	148	224	298	447	597	895	1194	1493
	max (b+2%)	25	51	76	152	229	305	457	610	914	1219	1524
D	min (D-2%)	163	209	253	389	563	828	1005	1181	1540	1898	2255
	max (D+2%)	167	214	259	397	575	845	1026	1206	1572	1937	2302
L	min (L-5%)	72	108	144	289	289	579	579	579	579	579	579
	max (L+5%)	76	114	152	305	305	610	610	610	610	610	610
B	min (B-5%)	338	385	434	579	820	1275	1348	1420	1562	1704	1845
	max (B+5%)	356	406	457	610	864	1343	1419	1495	1645	1794	1943
C	min (C-2%)	91	132	174	386	373	597	746	895	1194	1493	1792
	max (C+2%)	93	135	178	394	381	610	762	914	1219	1524	1829
E	min (E-5%)	217	241	434	579	723	868	868	868	868	868	868
	max (E+5%)	229	254	457	610	762	914	914	914	914	914	914
G	min (G-5%)	192	241	289	579	434	868	868	868	868	868	868
	max (G+5%)	203	254	305	610	457	914	914	914	914	914	914

parshall: toepassingsgebied											
TYPE	1"	2"	3"	6"	9"	1'	1'6"	2'	3'	4'	5'
h_{min} (m) **	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.045	0.045	0.06	0.06
h_{max} (m)	0.17	0.19	0.34	0.46	0.57	0.69	0.69	0.69	0.69	0.69	0.69
h_{overloop} (m)	0.23	0.25	0.46	0.61	0.76	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91
Q_{min} (m³/h)**	0.95	1.9	2.8	5.4	9	12	17	42	61	125	155
Q_{max} (m³/h)	14	33	119	416	816	1414	2148	2892	4397	5921	7456

parshall: debietformule* $Q [m^3/s] = C \cdot h^{exp} [m] \cdot 3600$											
TYPE	1"	2"	3"	6"	9"	1'	1'6"	2'	3'	4'	5'
Coëfficiënten**											
C	0.0604	0.1207	0.1765	0.3812	0.5354	0.6909	1.0560	1.4290	2.1840	2.9540	3.7320
exponent	1.55	1.55	1.547	1.58	1.53	1.522	1.538	1.55	1.566	1.578	1.587

* enkel toepasbaar indien kenmerkende maten voldoen aan controle-eisen

** bron: Aquafin



J / N	knik in bodem van de keel
J / N	wanden van de keel loodrecht
J / N	wanden van de keel evenwijdig
J / N	bodem van aanvoerkanaal waterpas
J / N	wanden van aanvoerkanaal loodrecht
J / N	wanden van aanvoerkanaal evenwijdig
J / N	leeglopen bij nuldebiet
J / N	aanstroomsnelheid vlak
J / N	zijdelingse meetkamer aanwezig

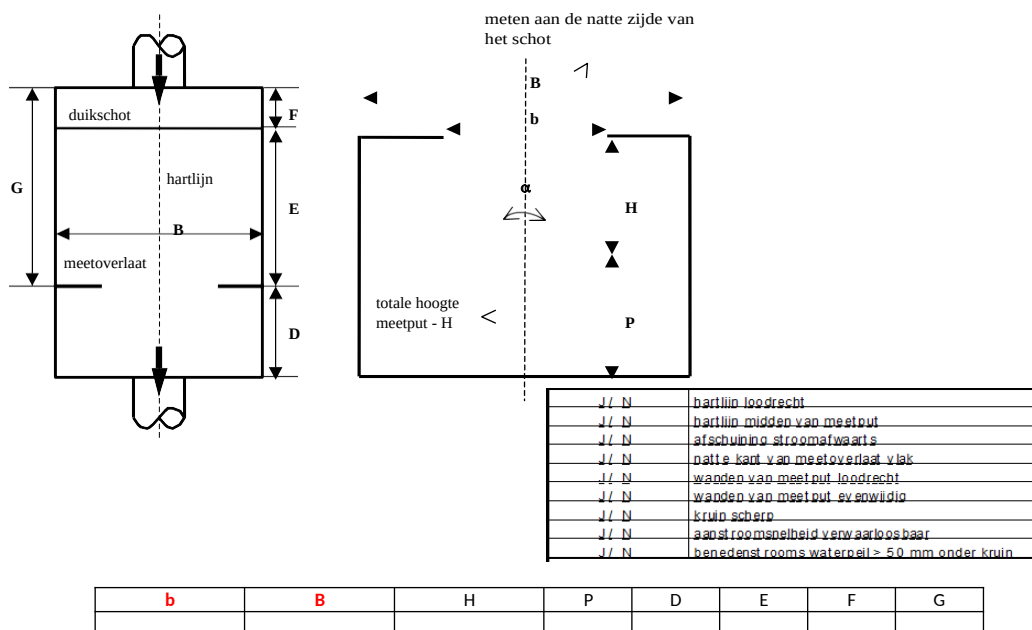
b	D	L	B	C	E	G

parshall: maten (mm)										
6'	7'	8'	10'	12'	15'	20'	25'	30'	40'	50'
1791	2091	2389	2987	3584	4480	5974	7467	8961	11947	14935
1828	2134	2438	3048	3658	4572	6096	7620	9144	12191	15240
1865	2177	2487	3109	3732	4664	6218	7773	9327	12435	15545
2613	2971	3329	4660	5494	7467	8961	10454	12066	15171	18158
2667	3032	3397	4756	5607	7620	9144	10668	12313	15481	18529
2721	3093	3465	4852	5720	7773	9327	10882	12560	15791	18900
579	579	579	868	868	1158	1737	1737	1737	1737	1737
610	610	610	914	914	1219	1829	1829	1829	1829	1829
641	641	641	960	960	1280	1921	1921	1921	1921	1921
1987	2129	2271	4053	4633	7239	7239	7239	7528	7818	7818
2092	2242	2391	4267	4877	7620	7620	7620	7925	8230	8230
2197	2355	2511	4481	5121	8001	8001	8001	8322	8642	8642
2091	2389	2688	3584	4380	5476	7168	8762	10354	13541	16926
2134	2438	2743	3658	4470	5588	7315	8941	10566	13818	17272
2177	2487	2798	3732	4560	5700	7462	9120	10778	14095	17618
868	868	868	1158	1447	1737	2027	2027	2027	2027	2027
914	914	914	1219	1524	1829	2134	2134	2134	2134	2134
960	960	960	1280	1601	1921	2241	2241	2241	2241	2241
868	868	868	1737	2316	2895	3475	3763	4053	4633	5791
914	914	914	1829	2438	3048	3658	3962	4267	4877	6096
960	960	960	1921	2560	3201	3841	4161	4481	5121	6401

parshall: toepassingsgebied										
6'	7'	8'	10'	12'	15'	20'	25'	30'	40'	50'
0.075	0.075	0.075								
0.69	0.69	0.69	0.91	1.14	1.37	1.60	1.60	1.60	1.60	1.60
0.91	0.91	0.91	1.22	1.52	1.83	2.13	2.13	2.13	2.13	2.13
261		342								
9005		12126	23063	39339	65277	110362	137048	163734	217107	270478

parshall: debietformule * Q [m³/s] = C * h ^{exp} [m] * 3600										
6'	7'	8'	10'	12'	15'	20'	25'	30'	40'	50'
4.5210		6.1150	7.4629	8.8607	10.9574	14.4519	17.9465	21.4410	28.4301	35.4191
1.595		1.607	1.600	1.600	1.600	1.600	1.600	1.600	1.600	1.600

enkel toepasbaar indien kenmerkende maten voldoen aan controle-eisen bron: Aquafin



V-schot: maten				
TYPE	28°4'	53°8'	90°	
maat				
min (b/H-5%)	0.48	0.95	1.90	
b/H	0.5	1	2	
max (b/H+5%)	0.53	1.05	2.10	
min (α-5%)	26°39'47"	50°28'36"	87°3'44"	
α	28°4'	53°8'	90°	
max (α+5%)	29°28'11"	55°47'23"	92°47'39"	
min	min. 190	min. 380	min. 760	
b				
min	min. 380	min. 380	min. 380	
H				
min	min. 1000	min. 1000	min. 1000	
B				
min	min. 450	min. 450	min. 450	
P				
min	min. 500	min. 500	min. 500	
D				
min	min. 1500	min. 1500	min. 1500	
E				
min	min. 500	min. 500	min. 500	
F				
min	min. 2000	min. 2000	min. 2500	
G				

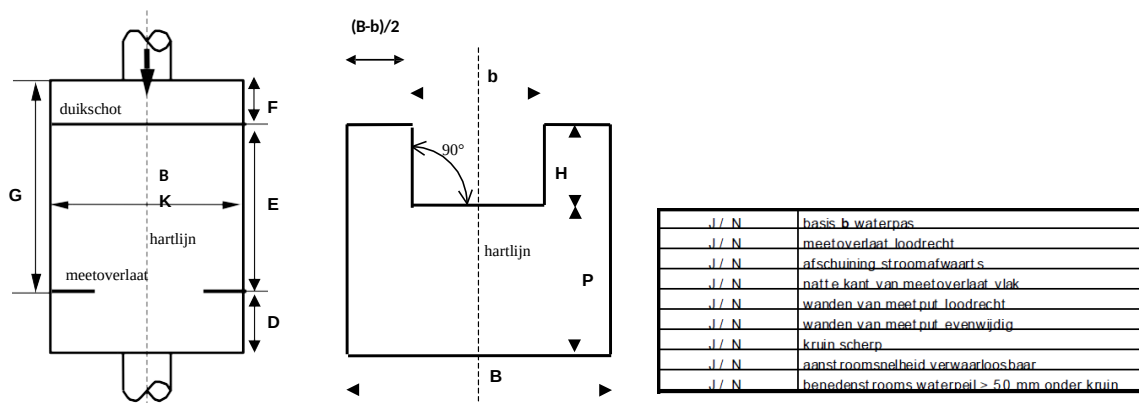
V-schot: toepassingsgebied °				
TYPE	28°4'	53°8'	90°	
h _{min} (m)*	0.05	0.05	0.05	
h _{max} (m)*	0.38	0.38	0.38	
Q _{min} (m³/h)	0.8	1.5	2.9	
Q _{max} (m³/h)	113	222	443	

V-schot: debietformule° Q [m³/h] = c * Cd * h ^{exp} [m]				
TYPE	28°4'	53°8'	90°	
Coëfficiënten*				
c	0.590625	1.18125	2.3625	
C _d	in functie van h, zie Table E.3 ISO 1438:2008			
exponent	2.5	2.5	2.5	

V-schot: vereenvoudigde debietformule** Q [m³/s] = C * h ^{exp} [m]				
TYPE	28°4'	53°8'	90°	
Coëfficiënten**				
C	0.3652	0.7079	1.38	
exponent	2.5	2.5	2.5	

° ISO 1438:2008

** bron: Aquafin



Rechthoekig meetschot met contractie: maten

b	B	H	P	D	E	F	G

rechthoekig meetschot met contractie: controle-eisen (mm)									
TYPE	0.3	0.4	0.5	0.6	0.8	1.0	1.5	2.0	3.0
b <i>min (b/H-5%)</i>	285	380	475	570	760	950	1425	1900	2850
<i>max (b/H+5%)</i>	315	420	525	630	840	1050	1575	2100	3150
B ^{**} [(B-b)/2 $\geq$ 2h _{max}]	min. 700	min. 933	min. 1167	min. 1400	min. 1867	min. 2333	min. 3500	min. 4667	min. 7000
H [H $\geq$ h _{max}]	min. 100	min. 133	min. 167	min. 200	min. 267	min. 333	min. 500	min. 667	min. 1000
P ^{**} [P $\geq$ 2h _{max}]	min. 200	min. 267	min. 333	min. 400	min. 533	min. 667	min. 1000	min. 1333	min. 2000
D	min. 500	min. 500	min. 500	min. 500	min. 500	min. 500	min. 500	min. 500	min. 500
E	min. 1500	min. 1500	min. 1500	min. 1500	min. 1500	min. 1500	min. 1500	min. 1500	min. 1500
F	min. 500	min. 500	min. 500	min. 500	min. 500	min. 500	min. 500	min. 500	min. 500
G	min. 2000	min. 2000	min. 2500	min. 3000	min. 4000	min. 5000	min. 7500	min. 10000	min. 15000

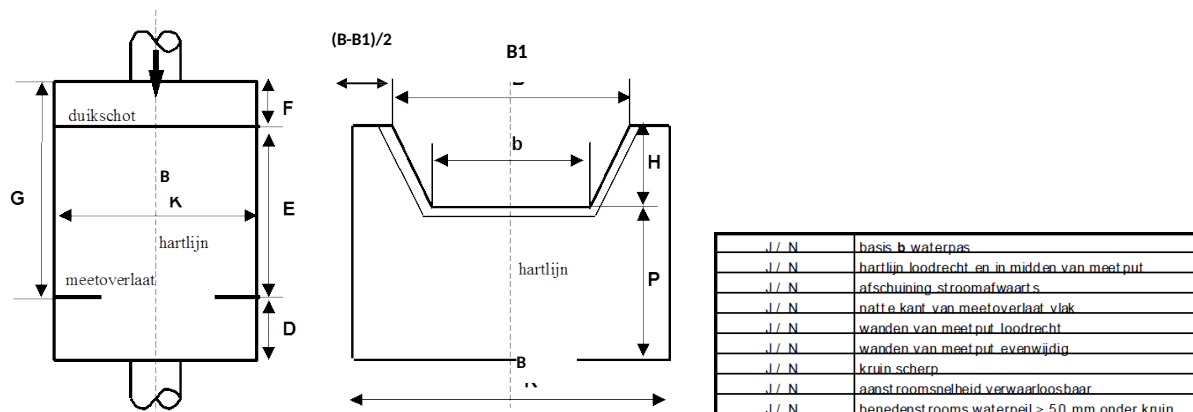
rechthoekig meetschot met contractie: toepassingsgebied **									
TYPE	0.3	0.4	0.5	0.6	0.8	1.0	1.5	2.0	3.0
h_{min} (m)*	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.045	0.045
h_{max} (m)**	0.10	0.13	0.17	0.20	0.27	0.33	0.50	0.67	1.00
Q_{min} (m³/h)*	10	13	17	20	27	34	51	68	103
Q_{max} (m³/h)**	60	116	216	331	693	1171	3275	6771	18527

rechthoekig meetschot met contractie: vereenvoudigde debietformule**									
TYPE	0.3	0.4	0.5	0.6	0.8	1.0	1.5	2.0	3.0
Coëfficiënten***									
c	1.838	1.838	1.838	1.838	1.838	1.838	1.838	1.838	1.838
exponent	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5

* ISO 1438:2008

** bij gebruik vereenvoudigde debietformule (bron: Water Measurements Manual, United States Department of the Interior Bureau of Reclamation); enkel toepasbaar indien meetschot voldoet aan toepassingsvoorwaarden: P $\geq$ 2h_{max}; (B-b)/2 $\geq$ 2h_{max}

*** bron: Aquafin



Meetschot met trapeziumvormige doorlaat (Cipolletti): maten

b	B	B1	H	P	D	E	F	G

Cipolletti meetschot: controle-eisen (mm)									
TYPE	0.3	0.4	0.5	0.6	0.8	1.0	1.5	2.0	3.0
b	min (b/H-5%)	285	380	475	570	760	950	1425	2850
	max (b/H+5%)	315	420	525	630	840	1050	1575	3150
H [H ≥ h _{max}]	min	min. 100	min. 133	min. 167	min. 200	min. 267	min. 333	min. 500	min. 1000
P [P ≥ 2h _{max}]	min	min. 200	min. 267	min. 333	min. 400	min. 533	min. 667	min. 1000	min. 1333
B	min	min. 1000	min. 1000	min. 1000	min. 1000	min. 1000			
B1	min		afhankelijk van H; B1 moet voldoen aan de toepassingsvoorwaarde: (B-B1)/2 ≥ 2h _{max}						
D	min	min. 500	min. 500	min. 500	min. 500	min. 500	min. 500	min. 500	min. 500
E	min	min. 1500	min. 1500	min. 1500	min. 1500	min. 1500	min. 1500	min. 1500	min. 1500
F	min	min. 500	min. 500	min. 500	min. 500	min. 500	min. 500	min. 500	min. 500
G	min	min. 2000	min. 2000	min. 2500	min. 3000	min. 4000	min. 5000	min. 7500	min. 10000

Cipolletti meetschot: toepassingsgebied*									
TYPE	0.3	0.4	0.5	0.6	0.8	1.0	1.5	2.0	3.0
h_{min} (m)*	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06
h_{max} (m)*	0.10	0.13	0.17	0.20	0.27	0.33	0.50	0.67	1.00
Q_{min} (m³/h)	29	38	48	58	78	97.0	146	195	294
Q_{max} (m³/h)	63	117	218	335	700	1185	3313	6848	18739

Debietformule Cipolletti meetschot* $Q [m^3/h] = C \times b [m] \times h^{exp} [m] \times 3600$									
TYPE	0.3	0.4	0.5	0.6	0.8	1.0	1.5	2.0	3.0
Coëfficiënten**									
C	1.859	1.859	1.859	1.859	1.859	1.859	1.859	1.859	1.859
exponent	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5

* bij gebruik vereenvoudigde debietformule (bron: Water Measurements Manual, United States Department of the Interior Bureau of Reclamation); enkel toepasbaar indien meetschot voldoet aan toepassingsvoorwaarden: $P \geq 2h_{max}$; $(B-B1)/2 \geq 2h_{max}$

** bron: Aquafin

BIJLAGE B: DEBIETTABELLEN OPEN CONTROLE-INRICHTINGEN

[zie zip-bestand *Bijlage B_WAC-I-A-012_debiettabellen*]

BIJLAGE C: OMREKENINGSFORMULE(S) WATERHOOGTE - DEBIET VOOR OPEN MEETGOTEN (INFORMATIEF)

C.1 Vlakke meetgoten met rechthoekige doorsnede

C.1.1 Debietformule conform ISO 4359

De basisformule om uit de waterhoogte in een vlakke meetgoot met rechthoekige doorsnede het debiet te berekenen (conform ISO 4359) is als volgt:

$$Q = \left(\frac{2}{3}\right)^{1,5} * \sqrt{g} * C_d * C_v * b * h^{1,5}$$

met: Q debiet dat door de meetgoot stroomt (m³/s)
 C_d debietcoëfficiënt
 C_v snelheidscoëfficiënt
 g zwaartekrachtversnelling (9.81 m/s²)
 b breedte van de keel (m)
 h waterhoogte, gemeten stroomopwaarts van de keel t.h.v. de meetsectie

en waarbij:

$$C_d = \left(1 - 2 \frac{\delta}{L}\right) * \left(1 - \frac{\delta}{b}\right)^{1,5}$$

$$\left(\frac{2}{3} * \frac{b}{B}\right)^2 * C_d^2 * C_v^2 * C^2 + 1 = 0$$

met:

L lengte van de keel (m)
 δ dikte van de laminaire grenslaag (m)
 B breedte van het aanvoerkanaal (m)

De verhouding δ/L geeft de relatieve dikte van de laminaire grenslaag weer. Voor gladde wanden van meetgoten die binnen de gestelde toleranties vallen, wordt deze verhouding δ/L gelijk gesteld worden aan 0,003.

Opmerking:

De verhouding δ/L stijgt bij ruwere wanden van de meetgoot. De verhouding δ/L werd experimenteelⁿ bepaald op bijvoorbeeld 0.0035 voor plastic, en 0.0058 voor roestvrij staal. Om de overeenkomsten met de vereenvoudigde formule te behouden, werd gekozen om de verhouding δ/L ongewijzigd op 0,003 te behouden. Voor meetgoten met ruwere wanden (bijv. beton) zal dit steeds een **overschatting opleveren van het werkelijk debiet**.

C.1.2 Vereenvoudigde debietformule

Voor vlakke meetgoten met rechthoekige doorsnede, kan het debiet ook voorgesteld worden onder een vereenvoudigde vorm:

$$Q = k * h^u * f$$

met: Q debiet dat door de meetgoot stroomt (m³/h)
 k constante afhankelijk van het type venturi (zie BIJLAGE A, indien beschikbaar)
 h waterhoogte (m), gemeten stroomopwaarts van de keel ter hoogte van de meetsectie

u exponent afhankelijk van het type meetgoot (u is standaard 1,5)

f omrekeningsfactor naar m^3/h gelijk aan 3600

Deze vereenvoudigde debietformule houdt geen rekening met afwijkende maten, of met de wrijving aan de wanden. Daarom is het belangrijk dat de kenmerkende maten binnen de gestelde controle-eisen vallen.

Opmerking:

Voor meetgoten met gladde wanden biedt de vereenvoudigde formule een vrij goede benadering, vooral dan bij voldoende vulhoogte. Voor meetgoten met ruwere wanden (bijv. beton) gaat de vereenvoudigde formule het debiet overschatten. Deze overschatting bedraagt 2-5% bij maximale vullingsgraad van de meetgoot ($h \approx H$), en loopt op tot 10-15% voor een waterhoogte gelijk aan $0,1L$ ($h \approx 0,1 L$)ⁿ. Voor betonnen en plastic goten zijn ook aangepaste u en k -waarden beschikbaar, die een betere benadering geven van het debiet, maar deze zijn binnen deze Code van Goed Praktijk niet van toepassing.

C.1.3 Herberekening debiet met werkelijke maten conform ISO 4359

Indien echter de kenmerkende maten buiten de gestelde toleranties vallen, moet de relatie waterhoogte-debiet herberekend worden op basis van de werkelijke (gemeten) maten. De standaard debiettabellen met nominale maten in BIJLAGE B mogen in dat geval NIET toegepast worden.

- Een herberekening van de debiettabel op basis van de werkelijke maten kan uitgevoerd worden met behulp van de standaard debiettabellen in BIJLAGE B (excel versie), mits aanpassing van de nominale maten (rechterbovenhoek van tabel).
- ISO 4359 stelt tevens een rekenblad ter beschikking om het overeenkomstig debiet te bepalen bij een bepaalde waterhoogte in een rechthoekige of of trapezoïdale meetgoot met de vastgestelde (werkelijke) maten van de controle-inrichting: <http://standards.iso.org/iso/4359> (bestand "flume 1").

Opmerking:

Voor rechthoekige meetgoten worden volgende parameters in het rekenblad ingegeven:

- b , B , L (werkelijke maten), h
- m , m_A en p gelijk gesteld aan 0 (verklaring symbolen: zie bestand "flume 1")

C.2 Vlakke meetgoten met parabolische doorsnede

Voor parabolische meetgoten, waarvan de afmetingen binnen de gestelde toleranties vallen, wordt het debiet voorgesteld onder de vorm:

$$Q = C * h^{exp} * f$$

met:

Q	debiet dat door de meetgoot stroomt (m^3/h)
C	constante afhankelijk van het type meetgoot (zie maattabellen)
h	waterhoogte (m), gemeten stroomopwaarts van de keel ter hoogte van de meetsectie
exp	exponent afhankelijk van het type meetgoot
f	omrekeningsfactor naar m^3/h gelijk aan 3600

C.3 Khafagi meetgoten

C.3.1 Khafagi QV

Voor Khafagi meetgoten van het type QV, waarvan de afmetingen binnen de gestelde toleranties vallen, wordt het debiet voorgesteld onder de vorm:

$$Q = 0.01744 * b * h^{1.5} + 0.00091 * h^{2.5} * f$$

met:	Q	debiet dat door de meetgoot stroomt (m ³ /h)
	b	breedte van de keel gemeten op het smalste punt (cm)
	h	waterhoogte (cm)
	f	omrekeningsfactor naar m ³ /h gelijk aan 3,6

C.3.2 Hydrologic

Voor meetgoten van het type Hydrologic, waarvan de afmetingen binnen de gestelde toleranties vallen, wordt het debiet voorgesteld onder de vorm:

$$Q = (a * h^4 - b * h^3 + c * h^2 + d * h - e) * f$$

met:	Q	debiet dat door de meetgoot stroomt (m ³ /h)
	a,b,c,d,e	constanten afhankelijk van het type meetgoot (zie maattabel)
	h	waterhoogte (m)
	f	omrekeningsfactor naar m ³ /h gelijk aan 3,6

C.4 Parshall meetgoten

Voor de Parshall meetgoten, zoals vermeld in bovenstaande maattabel en waarvan de afmetingen binnen de gestelde toleranties vallen, wordt het debiet voorgesteld onder de vorm:

$$Q = C_1 * h^n * f$$

met:	Q	debiet dat door de meetgoot stroomt (m ³ /h)
	C ₁	constanten afhankelijk van het type meetgoot (zie maattabel)
	h	waterhoogte (m)
	n	exponent, afhankelijk van het type meetgoot (zie maattabel)
	f	omrekeningsfactor naar m ³ /h gelijk aan 3600

C.5 Meetschot met driehoekige uitsnijding (V-schot, Thomson)

De basisformule om vanuit de waterhoogte het debiet te berekenen is als volgt (Kindsvater-Shen formule conform ISO 1438):

$$Q = \frac{8}{15} * C_d * \frac{b}{2} * \sqrt{2g} * h^{2.5} * f$$

met:	Q	debiet dat door de meetgoot stroomt (m ³ /h)
	C _d	debietcoëfficiënt (zie maattabellen of Annex E van ISO 1438:2008)

g	zwaartekrachtversnelling (9.8066 m/s ²)
h	waterhoogte (m), gemeten stroomopwaarts van de keel t.h.v. de meetsectie
f	omrekeningsfactor naar m ³ /h gelijk aan 3600

In praktijk worden in Vlaanderen enkel gestandaardiseerde V-schotten toegepast, waarbij volgende formule, in functie van het type meetschot, kan toegepast worden:

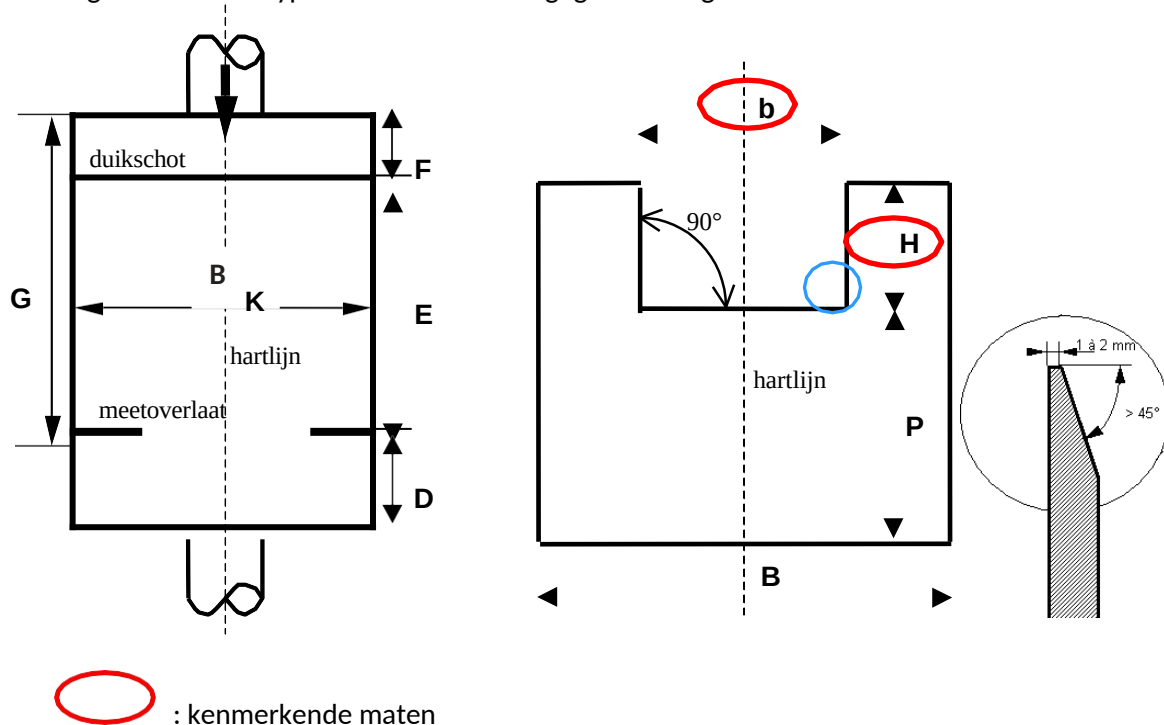
- $\alpha = 28^{\circ}4'$: $Q = 0.590625 * C_d^5 * h^{1/2} * f$
- $\alpha = 53^{\circ}8'$: $Q = 1.18125 * C_d^5 * h^{1/2} * f$
- $\alpha = 90^{\circ}$: $Q = 2.3625 * C_d^5 * h^{1/2} * f$

BIJLAGE D: BESCHRIJVING EN OMREKENINGSFORMULES VAN RECHTHOEKIGE EN TRAPEZIUMVORMIGE MEETSCHOTTEN (INFORMATIEF)

D.1 Meetschot met rechthoekige contractie

Bij dit meetschot loopt de overstortrand parallel ten opzichte van het wateroppervlak. De overstortopening bestaat uit een rechthoek in het midden van het schot. Meetschotten met rechthoekige overstort zijn geschikt voor grotere hoeveelheden afvalwater met een quasi constante afvoer.

De configuratie van dit type meetschot is weergegeven in Figuur 10.



Figuur 10: Schematische voorstelling van meetschot met rechthoekige overlaat met insnoering met aanduiding van maten (bron: VMM) [B: breedte van het aanvoerkanaal/meetput; b: breedte van de rechthoekige uitsnijding; H: hoogte van de rechthoekige uitsnijding; P: hoogte van de onderzijde van de rechthoekige uitsnijding ten opzichte van de vloer; D: stroomafwaartse afstand van het meetschot tot aan de putwand; E: afstand tussen duikschot en meetschot; F: stroomopwaartse afstand van putwand tot aan het duikschot; G: stroomopwaartse afstand van de putwand tot aan het meetschot; H: hoogte van de rechthoekige uitsnijding]

De basisformule om vanuit de waterhoogte het debiet met een rechthoekig meetschot (voor alle waarden b/B) te berekenen, is als volgt (Kinds water-Carter formule conform ISO 1438):

$$Q = Cd * \sqrt[3]{\frac{2g}{1.5}} * b * h * f$$

met:	Q	debiet dat door de meetgoot stroomt (m ³ /h)
	C _d	debietcoëfficiënt
	g	zwaartekrachtversnelling (9.81 m/s ²)
	b	breedte van de rechthoekige uitsparing (m)
	h	waterhoogte, gemeten stroomopwaarts van het meetschot
	f	omrekeningsfactor naar m ³ /h gelijk aan 3600

waarbij, voor specifieke verhoudingen b/B (met B de breedte van het aanvoerkanaal waarin het meetschot geplaatst werd), volgende lineaire relatie tussen C_d en de verhouding h/P kon worden vastgesteld (zie Tabel 1).

De geometrie en onderlinge verhoudingen van de afmetingen van het meetschot zijn belangrijk opdat de relatie tussen debiet en de opwaartse waterhoogte (zie debiettabellen in Bijlage A.5.2) kan toegepast worden:

- de hoogte P , van de bodem van de meetput tot aan de rechthoekige uitsnijding, moet minimaal 0,10 m zijn ($P \geq 0,10$ m);
- de verhouding tussen de waterhoogte (h) en de hoogte van rechthoekig uitsnijding t.o.v. de vloer (P) mag maximaal 2,5 bedragen ($h/P \leq 2,5$);
- de breedte van de uitsnijding (b) moet minimaal 0.15 m zijn ($b \geq 0,15$ m);
- de waterhoogte h mag niet minder dan 0.03 m bedragen ($h \geq 0.03$ m);
- de verhouding $(B-b)/2$ moet minimaal 0.1

voor $\frac{b}{B}$	debietcoëfficiënt $C_d =$
1,0	$0,602 + 0,075 \frac{h}{P}$
0,9	$0,598 + 0,064 \frac{h}{P}$
0,8	$0,596 + 0,045 \frac{h}{P}$
0,7	$0,594 + 0,030 \frac{h}{P}$
0,6	$0,593 + 0,018 \frac{h}{P}$
0,5	$0,592 + 0,010 \frac{h}{P}$
0,4	$0,591 + 0,0058 \frac{h}{P}$
0,2	$0,589 + 0,0018 \frac{h}{P}$

Tabel 1: relatie tussen debietcoëfficiënt C_d in functie van verhouding h/P
(tussenvallende waarden voor b/B kunnen geïnterpoleerd worden)

Het debiet in een rechthoekige meetgoot kan ook voorgesteld worden onder een vereenvoudigde vorm (Francis formule):

$$Q = 1.8380 * (b - 0,2 * h) * h^{1,5} * f$$

met: Q debiet dat door de meetgoot stroomt (m^3/h)
 h waterhoogte (m), gemeten stroomopwaarts van het meetschot
 f omrekeningsfactor naar van m^3/s naar m^3/h gelijk aan 3600

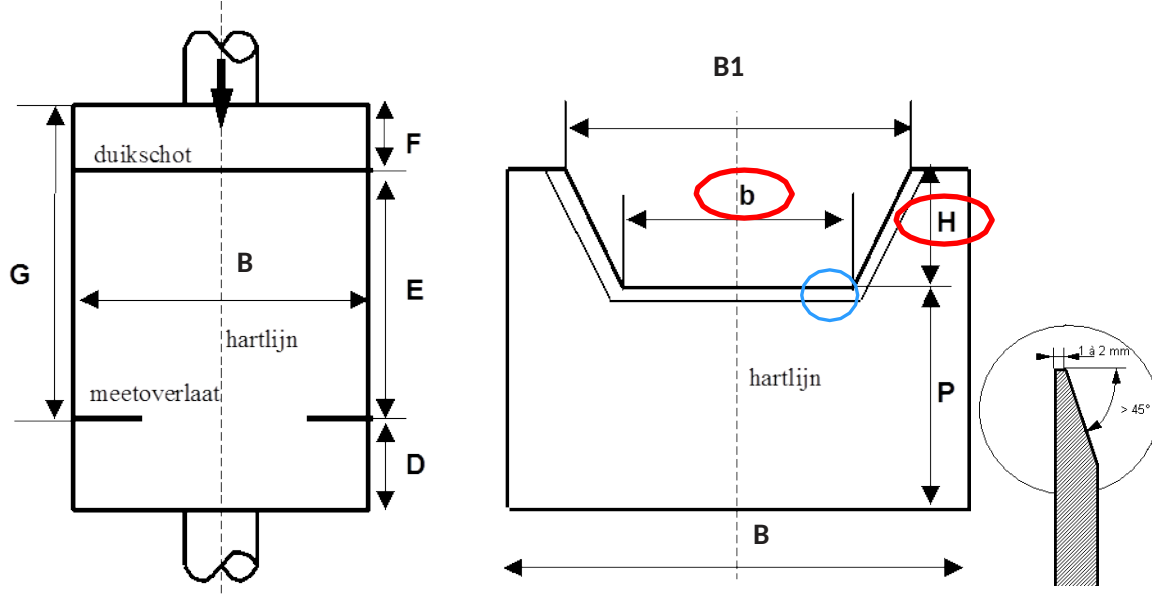
Bovenstaande relatie tussen debiet en de opwaartse waterhoogte is enkel geldig mits rekening te houden met volgende toepassingsvoorwaarden:

- P moet groter zijn dan $2h_{\max}$ ($P \geq 2h_{\max}$);
- $(B-b)/2$ moet groter zijn dan $2h_{\max}$ ($(B-b)/2 \geq 2h_{\max}$);

- de waterhoogte h mag niet minder dan 0.03 m bedragen ($h \geq 0.03$ m), maar mag niet meer zijn dan $b/3$ (tenzij een verificatie bij grotere waterhoogtes aantoont dat deze formule nog toepasbaar is).

Δ.2 Meetschot met trapeziumvormige contractie (Cipolletti)

De configuratie van dit type meetschot is weergegeven in Figuur 11.



Figuur 11: Schematische voorstelling van meetschot Cipoletti met trapezoidale overlaat met aanduiding van maten (bron: VMM) [B: breedte van de meetput, waarin het meetschot geïnstalleerd werd; B1: breedte van de bovenzijde van de trapeziumvormige uitsnijding; b: breedte van de onderzijde van de trapeziumvormige uitsnijding; H: hoogte van de uitsnijding; P: hoogte van de onderzijde van de rechthoekige uitsnijding ten opzichte van de vloer; D: stroomafwaartse afstand van het meetschot tot aan de putwand; E: afstand tussen duikschot en meetschot; F: stroomopwaartse afstand van putwand tot aan het duikschot; G: stroomopwaartse afstand van de putwand tot aan het meetschot; H: hoogte van de rechthoekige uitsnijding]

Het debiet in een meetgoot met trapeziumvormige doorlaat kan voorgesteld worden onder een vereenvoudigde vorm:

$$Q = 1.859 * b * h^{1.5} * f$$

met: Q debiet dat door de meetgoot stroomt (m^3/h)
 h waterhoogte (m), gemeten stroomopwaarts van het meetschot
 f omrekeningsfactor m^3/s naar m^3/h gelijk aan 3600

Bovenstaande relatie tussen debiet en de opwaartse waterhoogte is enkel geldig mits rekening te houden met volgende toepassingsvoorwaarden:

- de schuine zijden van het meetschot moeten een verticaal-tot-horizontaal verhouding hebben van 4/1;
- P moet groter zijn dan $2h_{\text{max}}$ ($P \geq 2h_{\text{max}}$);
- $(B-B1)/2$ moet groter zijn dan $2h_{\text{max}}$ ($(B-B1)/2 \geq 2h_{\text{max}}$);
- de waterhoogte h mag niet minder dan 0.06 m bedragen ($h \geq 0.06$ m), maar mag niet meer zijn dan $b/3$ (tenzij een verificatie bij grotere waterhoogtes aantoont dat deze formule nog toepasbaar is).

BIJLAGE E: REKENBLAD VOOR DEBIETSBEOORDELING (INFORMATIEF)

[zie excel-bestand *Bijlage E_WAC-I-A-012_Debietsbeoordeling Campagnes*]

E.1 Inleiding

De nauwkeurigheid van een debietsmeting aan de hand van een meetgoot is het grootst tussen het minimum- en maximum debiet. Deze $Q_{\min}$ en $Q_{\max}$ liggen vast voor elk type meetgoot. Aan de hand van het rekenblad kan makkelijk nagaan worden hoeveel procent van het geloosde afvalwater binnen deze marges valt. Wanneer een meetgoot te groot of te klein voor de geloosde debieten is, kunnen we dit visueel duidelijk maken aan de hand van grafieken.

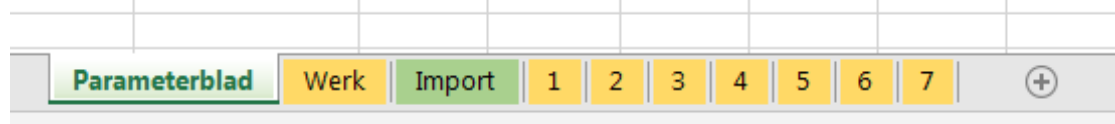
De berekening gebruikt de gelogde gegevens van de debietmeting, met name de uurdebieten, om een percentage te berekenen aan de hand van de volgende formule:

$$\frac{\% \text{urdebieten} > Q_{\max}}{\text{Dagdebiet}} \quad \text{en} \quad \% = \frac{\text{Urdebieten} < Q_{\min}}{\text{Dagdebiet}}$$

Er worden automatisch grafieken gegenereerd waarin de gelogde uurdebieten gespiegeld worden aan de $Q_{\min}$ en $Q_{\max}$. De grafieken van $Q_{\min}$ en $Q_{\max}$ komen enkel tevoorschijn als er waardes binnen een marge van 30% liggen.

E.2 Gebruik van het rekenblad

1. Open het excel-rekenblad 'debietsbeoordeling campagnes'



2. Op het werkblad 'Parameterblad', druk op de knop '1) Initialisatie', hierdoor wordt het werkblad gereed gemaakt voor een nieuwe berekening.



3. Op het werkblad 'Parameterblad' worden de volgende parameters ingevuld: **bedrijfsnaam**, **meetputnummer**, **type meetgoot** en **staalnamedagen**. Bij type meetgoot kan je een meetgoot kiezen uit het menu.

Opgelet: enkel de groene cellen dienen ingevuld te worden, de gele cellen worden automatisch ingevuld!

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	Bedrijf	Meetputnummer									
2	UZ Leuven Gasthuisberg	3000005									
3											
4											
5											
6	Type meetgoot	Qmin	Qmax								
7	CRA V (360 m²/u)	16	360								
8											
9											
10											
11	Volgnummer	Staalnamedagen									
12		17/07/18									
13		18/07/18									
14		19/07/18									
15		20/07/18									
16		21/07/18									
17											
18											
19											
20											
21											
22											
23											
24											
25											
26											
27											
28											

4. Kopieer de gelogde gegevens van de debietmeting in rekenblad op het tabblad 'Import'.

Parameterblad	Werk	Import	1	2	3	4	5	6	7	+

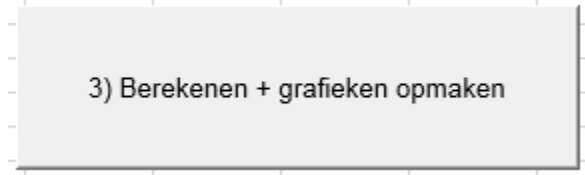
5. Controleer of alle gegevens gekopieerd zijn en de cijfers vanaf rij 4 beginnen.

	A	B	C	D	E	F	G
1		Time period	Time period	Time period	Time period	Uurdebiet	Uurdebiet A
2		from	from	to	to	Kanaal 1	Kanaal 4
3		Date d/MM/yyyy	Time H:mr	Date d/MM/yyyy	Time H:mr	m³	m³
4	1	16/07/2018	11:34:49	16/07/2018	12:00:24	184	26,57
5	2	16/07/2018	12:00:24	16/07/2018	13:00:00	76	109,6
6	3	16/07/2018	13:00:00	16/07/2018	14:00:00	55	54,57
7	4	16/07/2018	14:00:00	16/07/2018	15:00:00	55	55,54
8	5	16/07/2018	15:00:00	16/07/2018	16:00:00	52	52,42
9	6	16/07/2018	16:00:00	16/07/2018	17:00:00	44	44,66
10	7	16/07/2018	17:00:00	16/07/2018	18:00:00	52	51,95
11	8	16/07/2018	18:00:00	16/07/2018	19:00:00	32	32,67
12	9	16/07/2018	19:00:00	16/07/2018	20:00:00	26	25,44
13	10	16/07/2018	20:00:00	16/07/2018	21:00:00	21	21,7
14	11	16/07/2018	21:00:00	16/07/2018	22:00:00	15	15,05

6. Ga naar het tabblad 'Parameterblad' en druk op de knop '2) Gegevens splitsen'. Hierdoor worden de gegevens per dag gesplitst en op de tabbladen met overeenkomstig volgnummer geplaatst.

2) Gegevens splitsen

7. Blijf op het tabblad '**Parameterblad**' en druk op de knop '**3) Berekenen + grafieken opmaken**'. Hierdoor wordt er per dag een grafiek opgemaakt en berekeningen gemaakt.



Nu kunnen de gegevens per dag bekeken worden door naar de tabbladen met de overeenkomstige volgnummers te gaan.

Indien er gegevens verkeerd genoteerd of geselecteerd waren (zoals bijvoorbeeld de meetgoot) kan de knop '**4) Grafieken verwijderen**' gebruikt worden om de grafieken te verwijderen. Hierna kunnen de knoppen '**2) Gegevens splitsen**' en '**3) Berekenen + grafieken opmaken**' opnieuw gebruikt worden om de gegevens gewoonweg te overschrijven.

Bepaling van opgeloste zuurstof

1 TOEPASSINGSGEBIED

De beschreven methode laat om de opgeloste zuurstof te bepalen in water door middel van een elektrochemische cel die afgesloten is met gaspermeabel membraan. De methode kan toegepast worden op alle soorten water. Bij gebruik voor zout water, zoals zeewater, moet er een correctie voor het zoutgehalte toe gepast worden.

Opgeloste zuurstof kan ook bepaald worden met jodometrie (NBN EN 25813:1992) of met een luminescentie sensor (ISO 17289:2014, EPA method 360.3).

De procedure zoals beschreven in NBN EN ISO 5814:2012 is van toepassing mits volgende aanpassingen.

2 AANVULLINGEN BIJ NBN EN ISO 5814:2012

- §7.1 Monstername: Voor de monstername van grondwater wordt verwezen naar WAC/I/A/005.
- §7.1.1. Voor de conservering en behandeling van watermonsters wordt verwezen naar WAC/I/A/010.
- § 7.3.2. Andere concentraties aan natriumsulfiet mogen toegevoegd worden mits zuurstofvrij water wordt bekomen. Zuurstofvrij water kan ook bekomen worden na doorborreling met N₂. Het toevoegen van kobalt(II) als katalysator is optioneel.
- § 7.3.3. Bij de huidige technieken wordt gebruik gemaakt van OxiCal® voor de bepaling van 100 % zuurstofverzadiging.
- § 7.3.4. Niet uit te voeren.
- ~~§8.2 Matrix drink- en grondwater: Bij berekening van opgelost zuurstof, uitgedrukt als % saturatie, wordt bijkomend op het analyseverslag de temperatuur en de saliniteit (of geleidbaarheid bij referentietemperatuur van 20°C) gerapporteerd indien geleidbaarheid > 0,5 S/m (20°C).~~
§8.2 Bij berekening van opgelost zuurstof, uitgedrukt als % saturatie, wordt bijkomend op het analyseverslag de temperatuur en de saliniteit (of geleidbaarheid bij referentietemperatuur van 20°C (drink-, grond- en oppervlaktewater) of 25°C (afvalwater)) gerapporteerd **indien geleidbaarheid > 0,55 S/m (25°C).**
- Annex A.1 Om de saliniteit te berekenen op basis van de geleidbaarheid gemeten bij een andere temperatuur dan 20°C, kan een vaste temperatuurscorrectie op de geleidbaarheid van 1,9 tot 2 % per °C worden toegepast.

3 AANDACHTSPUNTEN LUMINESCENTIE SENSOR (ISO 17289, METHODE EPA 360.3)

- Het bewegen van de electrode in het water is voor de luminescentie meting niet noodzakelijk (zie §6.1.4 voor electrochemische electrode).
- De luminescentie sensor dient droog bewaard te worden en rechtstreeks zonlicht wordt bij voorkeur vermeden.

- Bij berekening van opgelost zuurstof, uitgedrukt als % saturatie, wordt bijkomend op het analyseverslag de temperatuur en de saliniteit (of geleidbaarheid bij referentietemperatuur van 20°C (drink-, grond- en oppervlaktewater) of 25°C (afvalwater)) gerapporteerd.

4 KWALITEITSCONTROLE

Volgende controles dienen te worden uitgevoerd: nulpunt (periodiek, 2x per jaar), 100 % verzadiging (dagelijks) en temperatuur (minimaal jaarlijks).

5 REFERENTIES

- NBN EN ISO 5814:2012 Water quality - Determination of dissolved oxygen – Electrochemical probe method (ISO 5814:2012).
- NBN EN 25813:1992 Water quality - Determination of dissolved oxygen -Iodometric method (ISO 5813:1983).
- ISO 17289:2014 Water quality - Determination of dissolved oxygen - Optical sensor method
- EPA method 360.3 Measurement of Dissolved Oxygen in Water and Wastewater.

Berekening van de saturatie-index

INHOUD

1	Doel	3
2	Toepassingsgebied	3
3	Werkwijze	3
3.1	<i>Doel van de berekening</i>	3
3.2	<i>Stappenplan van de berekening</i>	4
3.3	<i>Rekensheet</i>	7

1 DOEL

Deze procedure beschrijft hoe het kalk-koolzuurevenwicht en de bijhorende parameters CO_2 , HCO_3^- , CO_3^{2-} en OH worden berekend op basis van de resultaten van pH, geleidbaarheid, temperatuur en TAM; tevens kan met de extra parameter Ca ook de saturatie-index berekend worden.

Parameter	Naam	WAC methode
OH	Hydroxiden berekend	WAC/III/A/006
CO_2	Vrije koolstofdioxide berekend	WAC/III/A/006
HCO_3^-	Bicarbonaten berekend	WAC/III/A/006
CO_3^{2-}	Carbonaten berekend	WAC/III/A/006
pH	Zuurtegraad	WAC/III/A/005
GEL	Geleidbaarheid	WAC/III/A/004
TEMP	Temperatuur	WAC/III/A/003
TAM	m-alkaliteit	WAC/III/A/006
Ca	Calcium	WAC/III/B

2 TOEPASSINGSGEBIED

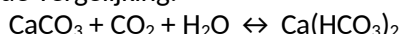
Deze berekening kan worden uitgevoerd indien de resultaten van alle vereiste parameters gekend zijn. Het toepassingsgebied is derhalve beperkt tot het toepassingsgebied van de onderliggende parameters, zoals afgebakend in de resp. analyseprocedures. Alle berekende parameters werden bekomen onder evenwichtsomstandigheden.

3 WERKWIJZE

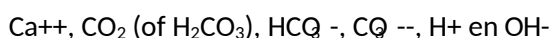
3.1 DOEL VAN DE BEREKENING

In het Besluit van de Vlaamse regering *van 20 januari 2023 over de kwaliteit, kwantiteit en levering van water bestemd voor menselijke consumptie* ~~13 december 2002 'Reglementering inzake de kwaliteit en levering van drinkwater bestemd voor menselijke consumptie'~~ staat vermeld dat het water niet agressief mag zijn (opmerking 1, deel C in bijlage I bij parameters Cl^- , geleidbaarheid, pH en SO_4^{2-}). Niet-agressief betekent dat het water kalkafzettend of in evenwicht is wat betreft het calcium en het koolzuurgehalte.

Hiervoor geldt de volgende vergelijking:



Voor elk type water zal er zich dus bij een bepaalde pH en temp een evenwicht instellen tussen de volgende ionen:



Nu kan er een saturatie-index (is de langelierindex) worden gedefinieerd als het verschil tussen de reële pH van de oplossing (gemeten met een pH-elektrode) en de pH (= pH_{ev}) indien het water in evenwicht zou zijn bij de gemeten temp, de alkaliteit en het calciumgehalte:

Dus

$$SI = pH - pH_{ev}$$

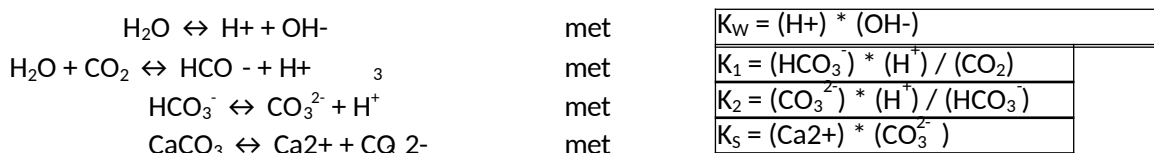
en er geldt dus voor een kalkafzettend water: $SI > 0$
agressief water: $SI < 0$

3.2 STAPPENPLAN VAN DE BEREKENING

Deze berekeningsmethode is volledig gebaseerd op het programma Aqua 0.1, op CD uitgegeven door Kluwer (Ten Hage Stam in Nederland), ontwikkeld door emeritus professor Dirk Wilms, gewezen hoogleraar aan de KULeuven. De nauwkeurigheid van deze methode is vergeleken met de methode van Standard Methods (1998, 20^e editie, 2330B p. 2:30-33).

Het probleem wordt dus herleid tot het bepalen van de evenwichtspH uitgaande van de parameters pH, temp en de gehalten van de ionen Ca^{++} , CO_2 , HCO_3^- en CO_3^{--} .

Tussen de hogervermelde parameters gelden nu de volgende reactievergelijkingen:



met K_i de thermodynamische evenwichtsconstante en (i) de actieve concentratie van component i .

Deze evenwichtsbetrekkingen zijn ook geldig voor oplossingen waar ook andere ionen aanwezig zijn maar dan moeten de **thermodynamische** evenwichtsconstanten die gelden voor **actieve** concentraties (i) vervangen worden door de **schijnbare** evenwichtsconstanten K'_i ; men kan dan m.a.w. de ionensterkte μ van de oplossing niet meer verwaarlozen en deze wordt gedefinieerd als:

$$\mu = \frac{1}{2} * \sum (z_i^{2*} [i])$$

met z_i de lading van component i en
 $[i]$ de **analytische** concentratie van component i

Om niet steeds de volledige ionenbalans te moeten bepalen wordt veelal voor de ionensterkte van de oplossing gebruik gemaakt van de eenvoudige relatie tussen de geleidbaarheid (een ter plaatse gemeten parameter) en de ionensterkte μ :

$$\mu = \text{GEL} / 54,5 \cdot 0.001 \text{ met GEL in } \mu\text{S/cm bij } 20^\circ\text{C en } \mu \text{ in mol/l}$$

Tussen de actieve (i) en de analytische [i] concentratie geldt nu het volgende verband:

$$[i] = f_i * [i]$$

waarbij de activiteitscoëfficiënt f_i afhankelijk is van de ionensterkte van de oplossing

Hiervoor kan de betrekking van Davies worden toegepast (voor $\mu < 0,5$ mol/l):

$$\log f_i = -\frac{1}{2} z_i^2 M \quad \text{en} \quad M = (\sqrt{\mu}/(1+\sqrt{\mu})) - 0,2\mu$$

Zo verkrijgt men via de evenwichtsbetrekkingen van de thermodynamische evenwichtsconstanten K_i en de schijnbare evenwichtsconstanten K_i' de volgende relaties:

$$\begin{aligned}\log (K_w' / K_w) &= M \\ \log (K_1' / K_1) &= M \\ \log (K_2' / K_2) &= 2M \\ \log (K_s' / K_s) &= 4M\end{aligned}$$

Dus via de geleidbaarheid berekent men de ionensterkte μ en hieruit de factor M die toelaat uitgaande van de thermodynamische K_i de schijnbare K_i' te berekenen en dit bij de gemeten temperatuur.

De temperatuursafhankelijkheid van de evenwichtsconstanten wordt gegeven door de vergelijking van Plummer en Busenberg, *Geochimica et Cosmochimica, Acta*, 46, 1011-1040, 1982:

$$\log K = A + B \cdot T + C/T + D \cdot \log T + E/T^2$$

met A , B , C , D en E empirische coëfficiënten (zie hoger vermelde referentie) en T de temperatuur in graden Kelvin; dus bij een bepaalde gemeten temperatuur kunnen steeds de overeenkomstige waarden voor de evenwichtsconstanten worden berekend.

Naast de hoger vermelde evenwichtsbetrekkingen kan ook nog de materiebalans voor koolzuur worden opgeschreven en voor de totale hoeveelheid koolzuur C_T geldt:

$$C_T = (CO_2) + (HCO_3^-) + (CO_3^{2-})$$

Het oplossen van dit stelsel van vergelijkingen (evenwichten en materiebalans) om uiteindelijk de concentraties van CO_2 , HCO_3^- , CO_3^{2-} en tevens H^+ (en dus pH_s) te bepalen wordt fel vereenvoudigd door het invoeren van de verdelingscoëfficiënten α_i die de fracties aangeven waaronder het koolzuur voorkomt als resp. CO_2 , HCO_3^- en CO_3^{2-} .

Dus

$$\begin{aligned}CO_2 &= \alpha_0 \cdot C_T \\ HCO_3^- &= \alpha_1 \cdot C_T \\ CO_3^{2-} &= \alpha_2 \cdot C_T\end{aligned}\quad \text{en} \quad \sum \alpha_i = 1$$

Men kan uit de evenwichtsbetrekkingen en de materiebalans afleiden dat:

$$\begin{aligned}\alpha_1 &= [(H^+) / K_1 + 1 + K_2 / (H^+)]^{-1} \\ \alpha_0 &= \alpha_1 \cdot (H^+) / K_1 \\ \alpha_2 &= \alpha_1 \cdot K_2 / (H^+)\end{aligned}$$

dus bij een bepaalde pH en temp zijn deze α_i onmiddellijk te berekenen en zijn dus onafhankelijk van het totale gehalte aan koolzuur.

Belangrijk hierbij te vermelden is dat de **pH gemeten met een glaselektrode** een maat is voor de **actieve concentratie** en er kan dus geschreven worden dat:

$$pH = -\log (H^+) \quad \text{en} \quad pH = \frac{1}{2} \cdot M - \log [H^+] \quad \text{en} \quad [H^+] = 10^{(1/2 \cdot M - pH)}$$

Kunnen we dus C_T bepalen en de α_i berekenen (als functie van pH en temp) dan kunnen we de individuele componenten CO_2 , HCO_3^- en CO_3^{2-} berekenen.

We kunnen nu C_T bepalen via het meten van de m-alkaliteit (TAM: titratie met zuur met methylooranje als indicator). Dit is mogelijk via de algemene alkaliteitsvergelijking die wordt afgeleid van de ladingsbalans:

of:
$$[H^+] = [OH^-] + [HCO_3^-] + 2 * [CO_3^{2-}]$$
 indien C_T mol/l wordt opgelost in zuiver water

of
$$0 = [HCO_3^-] + 2 * [CO_3^{2-}] + [OH^-] - [H^+]$$

of
$$0 = (\alpha_1 + 2 \alpha_2) C_T + [OH^-] -$$

Wil men dit water een alkaliteit m geven, dan dient men m mol/l NaOH toe te voegen en de ladingsbalans wordt nu (met $[Na^+] = m$):

$$m = (\alpha_1 + 2 \alpha_2) C_T + [OH^-] -$$

stellen we nu $\alpha_1 + 2 \alpha_2 = \varphi$ en

$[OH^-] - [H^+] = \psi$ met φ en ψ beide grootheden die enkel afhankelijk zijn van de temp en pH (en van μ), dan bekomen we de **algemene alkaliteitsvergelijking**:

$$m = \varphi * C_T + \psi$$

met deze vergelijking kan via het meten van de pH, temp, geleidbaarheid en m-alkaliteit de C_T worden berekend en vervolgens kunnen de parameters OH^- (via pH), CO_2 , HCO_3^- en CO_3^{2-} worden bepaald.

Om water dat niet in evenwicht is, in evenwicht te brengen zal een hoeveelheid $CaCO_3$ moeten oplossen of neerslaan; tijdens dit proces veranderen de concentraties van Ca , CO_2 , HCO_3^- en CO_3^{2-} voortdurend zodat dit een iteratief rekenproces zou vergen om de evenwichtspH te berekenen.

Om deze iteratieve berekening te omzeilen kan men als goede benadering de methode van Langelier gebruiken die geldig is voor waters die niet sterk zuur of sterk alkalisch zijn ($pH > 4$ en < 10). Aan een water dat niet in evenwicht is, kan men theoretisch een hoeveelheid Δ mmol/l CO_2 toevoegen of onttrekken om het in evenwicht te brengen; voor dit water met een gegeven temp, pH, μ (of geleidbaarheid), m en C_T geeft dit een nieuwe alkaliteitsvergelijking:

$$m = \varphi * (C_T + \Delta) + \psi$$

Daar het water nu in evenwicht is, geldt ook het oplosbaarheidsproduct van $CaCO_3$:

$$K_{S'} = [Ca^{++}] * [CO_3^{2-}] = [Ca]^{++} \alpha_2 * (C_T + \Delta)$$

Elimineert men nu de factor $(C_T + \Delta)$ uit de twee bovenstaande vergelijkingen en houdt men rekening met het feit dat:

$$\varphi / \alpha_2 = 2 + [H^+]_s / K_2$$

dan bekomt men de evenwichtsconcentratie aan waterstofionen die de evenwichtspH zal geven:

$$[H^+]_s = K_2^{1/2} * (m * [Ca]^{++} / K_{S'} - 2)$$

en

$$pH_{ev} = -\log [H^+]_s +$$

De uiteindelijke **stabiliteitsindex van Langelier** geeft dan:

$$SI = pH - pH_{ev}$$

Op te merken valt dat deze index enkel een **kwantitatieve** en dus geen kwantitatieve maat is voor de graad van onder- of oververzadiging van het water.

3.3 REKENSHEET

De rekensheet voor de berekening van de saturatie-index SI is te raadplegen onder deze [link](#).

Methoden voor de bepaling van elementen

1 ANALYSEMETHODEN VOOR DE BEPALING VAN ELEMENTEN

Informatie omtrent de conservering en behandeling van watermonsters wordt gegeven in WAC/I/A/010.

Voor de bepaling van de opgeloste fractie van de elementen (inclusief Hg) dient het monster gefiltreerd te worden over een membraanfilter, met een nominale poriëngrootte van 0.45 µm, zo snel mogelijk na monsternamen (te velde)

Opmerking: Indien neerslag wordt gevormd na filtratie en aanzuren van het monster of tijdens transport/bewaring, wordt het monster gedestruëerd conform WAC/III/B/001 of WAC/III/B/002.

Voor de bepaling van de totaalconcentraties van elementen als bedoeld in titel II van het VLAREM wordt een ontsluiting uitgevoerd op een niet gefiltreerd monster conform WAC/III/B/001 of WAC/III/B/002. Indien specifiek het gehalte aan Al incl. Al₂O₃, Ce incl. CeO₂, Ti incl. TiO₂ en/of Sn incl. SnO₂ wordt aangevraagd, wordt de speciale ontsluitingsmethode zoals beschreven in WAC/III/B/002 bijlage E toegepast. Op het analyseverslag dient duidelijk vermeld te worden welke ontsluitingsmethode werd toegepast.

Bij toepassing van de CV-AAS/AFS methode voor de bepaling van Hg kunnen volgende ontsluitingen worden uitgevoerd:

- Ontsluiting met BrCl oplossing bij kamertemperatuur gedurende min. 24 u volgens [NBN EN ISO 12846:2012](#) § 7.4
- Ontsluiting met 2 à 4% BrCl-reagens bij 60°C gedurende 2 uur. Een volledige oxidatie kan worden bepaald door visueel te controleren of een permanente gele kleur overblijft in het monster of door gebruik te maken van een zetmeeljodide indicatorpapier om resterend vrij oxidatiemiddel te testen.¹

Bij de bepaling van de elementen (inclusief Hg) in water, bestemd voor menselijke consumptie, wordt geen filtratie uitgevoerd. Het geconserveerde monster wordt geanalyseerd zonder bijkomende digestie.

Opmerking: Indien neerslag aanwezig is, wordt het monster gedestruëerd conform WAC/III/B/001 of WAC/III/B/002.

In kader van Bijlage 4.2.5.2. (Controle en beoordeling van de meetresultaten op lozingen van bedrijfsafvalwater en koelwater) wordt voor volgende bepalingen verwezen naar:

Fe en Ti in zwevend stof, opgevangen op membraan 0,45 µm	• Digestie volgens WAC/III/B/001 en WAC/III/B/002 • Bepaling volgens WAC/III/B
Fe en Ti in sediment	• Digestie volgens CMA/2/II/A.3 • Bepaling volgens CMA/2/I/B
Fe en Ti in levende organismen	• Digestie met bijv. HNO₃/H₂O₂ • Bepaling volgens WAC/III/B

¹ Method 1631, Revision E: Mercury in Water by Oxidation, Purge and Trap, and Cold Vapor Atomic Fluorescence Spectrometry, August 2002.

De volgende analysemethoden kunnen gebruikt worden voor het bepalen van **elementen** in water.

aluminium	• NBN EN ISO 11885:2009 Water quality — Determination of selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) (ISO 11885:2007) (WAC/III/B/010) • NBN EN ISO 17294-1:2024 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 1: General guidelines (ISO 17294-1:2004) • NBN EN ISO 17294-2:2023 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 2: Determination of selected elements including uranium isotopes (ISO 17294-2:2023) (WAC/III/B/011) • NBN EN ISO 15586:2003 Water quality – Determination of trace elements using atomic absorption spectrometry with graphite furnace (ISO 15586:2003) • NBN ISO 12020: 2000 Water quality – Determination of aluminium – Atomic absorption spectrometric methods (ISO 12020:1997)
antimoon	• NBN EN ISO 11885:2009 Water quality — Determination of selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) (ISO 11885:2007) (WAC/III/B/010) • NBN EN ISO 17294-1:2024 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 1: General guidelines (ISO 17294-1:2004) • NBN EN ISO 17294-2: 2023 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 2: Determination of selected elements including uranium isotopes (ISO 17294-2: 2023) (WAC/III/B/011) • NBN EN ISO 15586:2003 Water quality – Determination of trace elements using atomic absorption spectrometry with graphite furnace (ISO 15586:2003) • ISO 17378-1:2014 Water quality - Determination of arsenic and antimony - Part 1: Method using hydride generation atomic fluorescence spectrometry (HG-AFS) • ISO 17378-2:2014 Water quality - Determination of arsenic and antimony - Part 2: Method using hydride generation atomic absorption spectrometry (HG-AAS) (WAC/III/B/012)
arseen	• NBN EN ISO 11885:2009 Water quality — Determination of selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) (ISO 11885:2007) (WAC/III/B/010) • NBN EN ISO 17294-1:2024 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 1: General guidelines (ISO 17294-1:2004) • NBN EN ISO 17294-2: 2023 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 2: Determination of selected elements including uranium isotopes (ISO 17294-2: 2023) (WAC/III/B/011) • NBN EN ISO 15586:2003 Water quality – Determination of trace elements using atomic absorption spectrometry with graphite furnace (ISO 15586:2003) • ISO 17378-1:2014 Water quality - Determination of

	arsenic and antimony - Part 1: Method using hydride generation atomic fluorescence spectrometry (HG-AFS) • ISO 17378-2:2014 Water quality - Determination of arsenic and antimony - Part 2: Method using hydride generation atomic absorption spectrometry (HG-AAS) (WAC/III/B/012) • NEN 6432:1993 Water – Bepaling van het gehalte aan arseen met behulp van atomaire absorptiespectrometrie (hydridegeneratietechniek). Ontsluiting met salpeterzuur en zoutzuur.
barium	• NBN EN ISO 11885:2009 Water quality — Determination of selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) (ISO 11885:2007) (WAC/III/B/010) • NBN EN ISO 17294-1:2024 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 1: General guidelines (ISO 17294-1:2004) • NBN EN ISO 17294-2: 2023 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 2: Determination of selected elements including uranium isotopes (ISO 17294-2: 2023) (WAC/III/B/011)
boor	• NBN EN ISO 11885:2009 Water quality — Determination of selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) (ISO 11885:2007) (WAC/III/B/010) • NBN EN ISO 17294-1:2024 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 1: General guidelines (ISO 17294-1:2004) • NBN EN ISO 17294-2: 2023 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 2: Determination of selected elements including uranium isotopes (ISO 17294-2: 2023) (WAC/III/B/011)
cadmium	• NBN EN ISO 11885:2009 Water quality — Determination of selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) (ISO 11885:2007) (WAC/III/B/010) • NBN EN ISO 17294-1:2024 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 1: General guidelines (ISO 17294-1:2004) • NBN EN ISO 17294-2: 2023 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 2: Determination of selected elements including uranium isotopes (ISO 17294-2: 2023) (WAC/III/B/011) • NBN EN ISO 15586:2003 Water quality – Determination of trace elements using atomic absorption spectrometry with graphite furnace (ISO 15586:2003) • ISO 8288: 1986 Water quality – Determination of cobalt, nickel, copper, zinc, cadmium and lead – Flame atomic absorption spectrometric methods • ISO 5961: 1994 Water quality: Determination of cadmium by atomic absorption spectrometry
calcium	• NBN EN ISO 11885:2009 Water quality — Determination of selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) (ISO 11885:2007) (WAC/III/B/010)

	• NBN EN ISO 17294-1:2024 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 1: General guidelines (ISO 17294-1:2004) • NBN EN ISO 17294-2: 2023 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 2: Determination of selected elements including uranium isotopes (ISO 17294-2: 2023) (WAC/III/B/011) • NBN EN ISO 14911:1999 Water quality - Determination of dissolved Li^+, Na^+, NH_4^+, K^+, Mn^{2+}, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Sr^{2+} and Ba^{2+} using ion chromatography - Method for water and waste water (ISO 14911:1998)
cerium	• WAC/III/B/010 Bepaling van de geselecteerde elementen met inductief gekoppeld plasma – atomaire emissiespectrometrie • NBN EN ISO 17294-1:2024 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 1: General guidelines (ISO 17294-1:2004) • NBN EN ISO 17294-2: 2023 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 2: Determination of selected elements including uranium isotopes (ISO 17294-2: 2023) (WAC/III/B/011)
chroom	• NBN EN ISO 11885:2009 Water quality — Determination of selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) (ISO 11885:2007) (WAC/III/B/010) • NBN EN ISO 17294-1:2024 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 1: General guidelines (ISO 17294-1:2004) • NBN EN ISO 17294-2: 2023 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 2: Determination of selected elements including uranium isotopes (ISO 17294-2: 2023) (WAC/III/B/011) • NBN EN ISO 15586:2003 Water quality – Determination of trace elements using atomic absorption spectrometry with graphite furnace (ISO 15586:2003) • NBN EN 1233: 1996 Water quality – Determination of chromium – Atomic absorption spectrometric methods
ijzer	• NBN EN ISO 11885:2009 Water quality — Determination of selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) (ISO 11885:2007) (WAC/III/B/010) • NBN EN ISO 17294-1:2024 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 1: General guidelines (ISO 17294-1:2004) • NBN EN ISO 17294-2: 2023 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 2: Determination of selected elements including uranium isotopes (ISO 17294-2: 2023) (WAC/III/B/011) • NBN EN ISO 15586:2003 Water quality – Determination of trace elements using atomic absorption spectrometry with graphite furnace (ISO 15586:2003)
fosfor	• Zie WAC/III/D in functie van het matrixtype

kalium	• NBN EN ISO 11885:2009 Water quality — Determination of selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) (ISO 11885:2007) (WAC/III/B/010) • NBN EN ISO 17294-1:2024 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 1: General guidelines (ISO 17294-1:2004) • NBN EN ISO 17294-2: 2023 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 2: Determination of selected elements including uranium isotopes (ISO 17294-2: 2023) (WAC/III/B/011) • NBN EN ISO 14911:1999 Water quality - Determination of dissolved Li^+, Na^+, NH_4^+, K^+, Mn^{2+}, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Sr^{2+} and Ba^{2+} using ion chromatography - Method for water and waste water (ISO 14911:1998)
kobalt	• NBN EN ISO 11885:2009 Water quality — Determination of selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) (ISO 11885:2007) (WAC/III/B/010) • NBN EN ISO 17294-1:2024 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 1: General guidelines (ISO 17294-1:2004) • NBN EN ISO 17294-2: 2023 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 2: Determination of selected elements including uranium isotopes (ISO 17294-2: 2023) (WAC/III/B/011) • NBN EN ISO 15586:2003 Water quality – Determination of trace elements using atomic absorption spectrometry with graphite furnace (ISO 15586:2003) • ISO 8288: 1986 Water quality – Determination of cobalt, nickel, copper, zinc, cadmium and lead – Flame atomic absorption spectrometric methods
koper	• NBN EN ISO 11885:2009 Water quality — Determination of selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) (ISO 11885:2007) (WAC/III/B/010) • NBN EN ISO 17294-1:2024 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 1: General guidelines (ISO 17294-1:2004) • NBN EN ISO 17294-2: 2023 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 2: Determination of selected elements including uranium isotopes (ISO 17294-2: 2023) (WAC/III/B/011) • NBN EN ISO 15586:2003 Water quality – Determination of trace elements using atomic absorption spectrometry with graphite furnace (ISO 15586:2003) • ISO 8288: 1986 Water quality – Determination of cobalt, nickel, copper, zinc, cadmium and lead – Flame atomic absorption spectrometric methods
lood	• NBN EN ISO 11885:2009 Water quality — Determination of selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) (ISO 11885:2007) (WAC/III/B/010) • NBN EN ISO 17294-1:2024 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 1: General guidelines (ISO 17294-1:2004)

	• NBN EN ISO 17294-2: 2023 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 2: Determination of selected elements including uranium isotopes (ISO 17294-2: 2023) (WAC/III/B/011) • NBN EN ISO 15586:2003 Water quality – Determination of trace elements using atomic absorption spectrometry with graphite furnace (ISO 15586:2003) • ISO 8288: 1986 Water quality – Determination of cobalt, nickel, copper, zinc, cadmium and lead – Flame atomic absorption spectrometric methods
magnesium	• NBN EN ISO 11885:2009 Water quality — Determination of selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) (ISO 11885:2007) (WAC/III/B/010) • NBN EN ISO 17294-1:2024 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 1: General guidelines (ISO 17294-1:2004) • NBN EN ISO 17294-2: 2023 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 2: Determination of selected elements including uranium isotopes (ISO 17294-2: 2023) (WAC/III/B/011) • NBN EN ISO 14911:1999 Water quality - Determination of dissolved Li^+, Na^+, NH_4^+, K^+, Mn^{2+}, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Sr^{2+} and Ba^{2+} using ion chromatography - Method for water and waste water (ISO 14911:1998)
mangaan	• NBN EN ISO 11885:2009 Water quality — Determination of selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) (ISO 11885:2007) (WAC/III/B/010) • NBN EN ISO 17294-1:2024 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 1: General guidelines (ISO 17294-1:2004) • NBN EN ISO 17294-2: 2023 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 2: Determination of selected elements including uranium isotopes (ISO 17294-2: 2023) (WAC/III/B/011) • NBN EN ISO 15586:2003 Water quality – Determination of trace elements using atomic absorption spectrometry with graphite furnace (ISO 15586:2003)
molybdeen	• NBN EN ISO 11885:2009 Water quality — Determination of selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) (ISO 11885:2007) (WAC/III/B/010) • NBN EN ISO 17294-1:2024 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 1: General guidelines (ISO 17294-1:2004) • NBN EN ISO 17294-2: 2023 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 2: Determination of selected elements including uranium isotopes (ISO 17294-2: 2023) (WAC/III/B/011) • NBN EN ISO 15586:2003 Water quality – Determination of trace elements using atomic absorption spectrometry with graphite furnace (ISO 15586:2003)

natrium	• NBN EN ISO 11885:2009 Water quality — Determination of selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) (ISO 11885:2007) (WAC/III/B/010) • NBN EN ISO 17294-1:2024 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 1: General guidelines (ISO 17294-1:2004) • NBN EN ISO 17294-2: 2023 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 2: Determination of selected elements including uranium isotopes (ISO 17294-2: 2023) (WAC/III/B/011) • NBN EN ISO 14911:1999 Water quality - Determination of dissolved Li^+, Na^+, NH_4^+, K^+, Mn^{2+}, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Sr^{2+} and Ba^{2+} using ion chromatography - Method for water and waste water (ISO 14911:1998)
nikkel	• NBN EN ISO 11885:2009 Water quality — Determination of selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) (ISO 11885:2007) (WAC/III/B/010) • NBN EN ISO 17294-1:2024 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 1: General guidelines (ISO 17294-1:2004) • NBN EN ISO 17294-2: 2023 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 2: Determination of selected elements including uranium isotopes (ISO 17294-2: 2023) (WAC/III/B/011) • NBN EN ISO 15586:2003 Water quality – Determination of trace elements using atomic absorption spectrometry with graphite furnace (ISO 15586:2003) • ISO 8288: 1986 Water quality – Determination of cobalt, nickel, copper, zinc, cadmium and lead – Flame atomic absorption spectrometric methods
seleen	• NBN EN ISO 11885:2009 Water quality — Determination of selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) (ISO 11885:2007) (WAC/III/B/010) • NBN EN ISO 17294-1:2024 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 1: General guidelines (ISO 17294-1:2004) • NBN EN ISO 17294-2: 2023 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 2: Determination of selected elements including uranium isotopes (ISO 17294-2: 2023) (WAC/III/B/011) • NBN EN ISO 15586:2003 Water quality – Determination of trace elements using atomic absorption spectrometry with graphite furnace (ISO 15586:2003) • ISO/TS 17379-1:2013 Water quality - Determination of selenium - Part 1: Method using hydride generation atomic fluorescence spectrometry (HG-AFS) • ISO/TS 17379-2:2013 Water quality - Determination of selenium - Part 2: Method using hydride generation atomic absorption spectrometry (HG-AAS) (WAC/III/B/012)
tellurium	• NBN EN ISO 11885:2009 Water quality — Determination of selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) (ISO 11885:2007) (WAC/III/B/010)

	• NBN EN ISO 17294-1:2024 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 1: General guidelines (ISO 17294-1:2004) • NBN EN ISO 17294-2: 2023 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 2: Determination of selected elements including uranium isotopes (ISO 17294-2: 2023) (WAC/III/B/011)
thallium	• NBN EN ISO 17294-1:2024 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 1: General guidelines (ISO 17294-1:2004) • NBN EN ISO 17294-2: 2023 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 2: Determination of selected elements including uranium isotopes (ISO 17294-2: 2023) (WAC/III/B/011)
uranium	• NBN EN ISO 11885:2009 Water quality — Determination of selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) (ISO 11885:2007) (WAC/III/B/010) • NBN EN ISO 17294-1:2024 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 1: General guidelines (ISO 17294-1:2004) • NBN EN ISO 17294-2: 2023 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 2: Determination of selected elements including uranium isotopes (ISO 17294-2: 2023) (WAC/III/B/011)
vanadium	• NBN EN ISO 11885:2009 Water quality — Determination of selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) (ISO 11885:2007) (WAC/III/B/010) • NBN EN ISO 17294-1:2024 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 1: General guidelines (ISO 17294-1:2004) • NBN EN ISO 17294-2:2023 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 2: Determination of selected elements including uranium isotopes (ISO 17294-2:2023) (WAC/III/B/011) • NBN EN ISO 15586:2003 Water quality – Determination of trace elements using atomic absorption spectrometry with graphite furnace (ISO 15586:2003)
tin	• NBN EN ISO 11885:2009 Water quality — Determination of selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) (ISO 11885:2007) (WAC/III/B/010) • NBN EN ISO 17294-1:2024 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 1: General guidelines (ISO 17294-1:2004) • NBN EN ISO 17294-2: 2023 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 2: Determination of selected elements including uranium isotopes (ISO 17294-2: 2023) (WAC/III/B/011)
titanium	• NBN EN ISO 11885:2009 Water quality — Determination of selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) (ISO 11885:2007) (WAC/III/B/010)

	• NBN EN ISO 17294-1:2024 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 1: General guidelines (ISO 17294-1:2004) • NBN EN ISO 17294-2: 2023 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 2: Determination of selected elements including uranium isotopes (ISO 17294-2: 2023) (WAC/III/B/011)
zilver	• NBN EN ISO 11885:2009 Water quality — Determination of selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) (ISO 11885:2007) (WAC/III/B/010) • NBN EN ISO 17294-1:2024 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 1: General guidelines (ISO 17294-1:2004) • NBN EN ISO 17294-2: 2023 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 2: Determination of selected elements including uranium isotopes (ISO 17294-2: 2023) (WAC/III/B/011) • NBN EN ISO 15586:2003 Water quality – Determination of trace elements using atomic absorption spectrometry with graphite furnace (ISO 15586:2003)
zink	• NBN EN ISO 11885:2009 Water quality — Determination of selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) (ISO 11885:2007) (WAC/III/B/010) • NBN EN ISO 17294-1:2024 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 1: General guidelines (ISO 17294-1:2004) • NBN EN ISO 17294-2: 2023 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 2: Determination of selected elements including uranium isotopes (ISO 17294-2: 2023) (WAC/III/B/011) • NBN EN ISO 15586:2003 Water quality – Determination of trace elements using atomic absorption spectrometry with graphite furnace (ISO 15586:2003) • ISO 8288: 1986 Water quality – Determination of cobalt, nickel, copper, zinc, cadmium and lead – Flame atomic absorption spectrometric methods
kwik	• NBN EN ISO 12846:2012 Water quality : Determination of mercury - Method using atomic absorption spectrometry (AAS) with and without enrichment (ISO 12846:2012) (WAC/III/B/014) • NBN EN ISO 17852:2008 Water quality : Determination of mercury - Method using atomic fluorescence spectrometry (ISO 17852:2006) (WAC/III/B/014) • NBN EN ISO 17294-1:2024 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 1: General guidelines (ISO 17294-1:2004) • NBN EN ISO 17294-2: 2023 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 2: Determination of selected elements including uranium isotopes (ISO 17294-2: 2023) (WAC/III/B/011) • EPA 200.8 Determination of trace elements in waters and wastes by inductively coupled plasma- mass spectrometry.

2 REFERENTIES

- C. Vanhoof, W. Brusten, K. Duyssens, K. Tirez, *Bepaling van Sn en Ti in afvalwater*, VITO rapport 2010/MANT/R/004,
https://reflabos.vito.be/onderzoeksrapporten/referentielabo_LNE_water_rapport_Sn-Ti_2009.pdf
- C. Vanhoof, K. Duyssens en K. Tirez, *Definiëren van de ontsluitingsmethode en stabilisatie van Sb en Ag in water*, VITO rapport 2014/SCT/R/15,
https://reflabos.vito.be/onderzoeksrapporten/2013_Stabilisatie_Sb_en_Ag-finaal.pdf
- C. Vanhoof, K. Duyssens, W. Wouters en K. Tirez, *Bepaling van Hg in afvalwater*, VITO rapport 2014/SCT/R/24,
https://reflabos.vito.be/onderzoeksrapporten/2013_Rapport_Hg_bepaling_in_AW-finaal.pdf
- C. Vanhoof, F. Beutels, K. Duyssens, J. De Wit, K. Tirez en J. Annys, *Bepaling van Hg met ICP-MS*, VITO rapport 2018/SCT/R/1586 ,
<https://reflabos.vito.be/onderzoeksrapporten/2017%20Rapport%20bepaling%20van%20Hg%20ICP-MS-finaal2.pdf>
- C. Vanhoof en K. Tirez, *Update terminologie VLAREM parameters en aanvulling prestatiekenmerken – partim anorganische parameters*, VITO rapport 2021/SCT/R/2629.

Bepaling van de geselecteerde elementen met inductief gekoppeld plasma – atomaire emissiespectrometrie

1 TOEPASSINGSGEBIED

De beschreven methode laat toe de elementen aluminium, antimoon, arseen, barium, beryllium, bismuth, boor, calcium, cadmium, cerium, chroom, fosfor, gallium, ijzer, indium, kalium, kobalt, koper, lithium, lood, magnesium, mangaan, molybdeen, natrium, nikkel, seleen, silicium, strontium, tellurium, titaan, vanadium, tin, **uranium**, wolfraam, zilver, zink, zirkonium en zwavel te bepalen met de inductief gekoppeld plasma atomaire-emissiespectrometrie analysetechniek. De beschreven analysemethode kan gebruikt worden voor het bepalen van bovenvermelde elementen in water (bijvoorbeeld grond-, drink-, oppervlakte- en afvalwater), uitlogingen, alsook in de ontsluitingsvloeistoffen van de vernoemde watermatrices.

De procedure zoals beschreven in ISO 11885:2007 is van toepassing mits volgende aanpassingen:

2 DEFINITIES

Een beschrijving van de definities betreffende de prestatiekenmerken en meetonzekerheid wordt gegeven in WAC/I/B/001.

Definities in §3 van ISO 11885:2007 norm zijn niet van toepassing

3 MONSTERBEWARING

- Voor de conservering en behandeling van watermonsters wordt verwezen naar WAC/I/A/010.
- §9.2 Het toevoegen van HCl als stabilisator is optioneel. Daarnaast kan bij de bepaling van Sb, mits validatie, naast het toevoegen van HCl als stabilisator ook een andere stabilisator (bv. tartaarzuur, HF) worden gebruikt.
- §9.3 van ISO 11885 norm is niet van toepassing
- Toevoegen bij §9.4: voor de bepaling van het totaal gehalte van drinkwater dienen de monsters bij troebelheid gedeutereerd te worden.

4 MONSTERVOORBEHANDELING

- §9.5.2 van ISO 11885 norm is niet van toepassing
- §9.5.3 Voor de destructie wordt eveneens verwezen naar WAC/III/B/001 en WAC/III/B/002.

5 INTERFERENTIES

Bijkomende duiding:

- Het meten van 2 analytische lijnen per element om spectrale interferenties op te sporen is noodzakelijk (tenzij technisch niet mogelijk) en de beoordeling hiervan dient als “expert judgement” te worden onderbouwd. Voor elk element wordt aangegeven welke de aanbevolen lijn is, alsook de alternatieve lijn(en) indien beschikbaar.

- Minimaal wordt tijdens de validatie de interferentie van Fe op Cd onderzocht en wordt hiervoor een criterium vooropgesteld.
- Het opvolgen van niet spectrale interferenties door gebruik te maken van interne standaarden is noodzakelijk, tenzij het laboratorium over voldoende evidentie beschikt dat de matrix constant is en/of ondervangen wordt door de toegepaste methode (bv. standaard additie).

6 APPARATUUR EN MATERIAAL

6.1 APPARATUUR

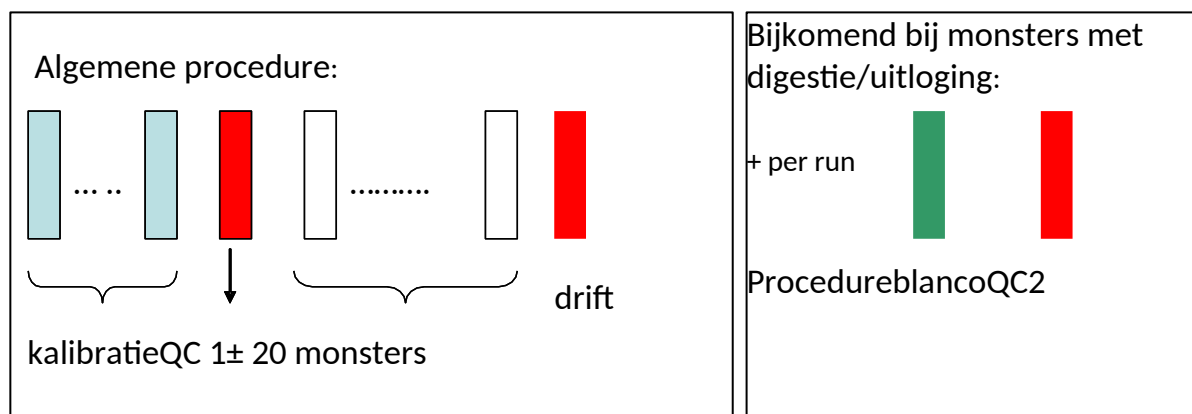
Hydridegeneratiesysteem (toevoegen)

Voor de bepaling van arseen, seleen en antimoon op laag niveau kan er overgestapt worden naar hydridegeneratie. As(III), Sb(III) en Se(IV) worden gereduceerd naar de gasvormige hydridevorm (AsH_3 , SbH_3 , SeH_2) met tetrahydroboraat in een zoutzuur medium. Deze hydrides worden door een argonstroom in het plasma geleid. Belangrijk bij deze techniek is dat de elementen enkel voorkomen in hun hierboven beschreven oxidatiegraad (pre-reductie). Voor de pre-reductie en de hydridegeneratie wordt verwezen naar WAC-procedure WAC/III/B/012.

7 PROCEDURE

- §10.1: 2 (kalibratieblanco + standaard) of meerpunts-kalibratie wordt toegestaan
- §10.3: correctie voor procedure blanco is facultatief. Controle en opvolgen van de waarde van procedureblanco is wel noodzakelijk.

In onderstaand schema wordt volgende verduidelijking van procedure geformuleerd:



- QC 1: onafhankelijk aangemaakte controle;
- Analysereeks van ± 20 monsters: dit is een indicatief aantal, de laboratoria moeten kunnen aantonen dat de frequentie van uitvoering van QA/QC zo gekozen is dat het voldoende kwaliteitsgaranties biedt;
- Drift: kalibratiestandaard of onafhankelijke standaard (QC1), minstens om de 20 monsters en de gemeten concentratie mag maximum 10% afwijken van de werkelijke waarde;
- Bij monsters met een destructie/uitloging dient per reeks (run van een digestie/uitlogingstoestel) een procedureblanco en een QC monster (QC2) die beiden de hele procedure hebben doorlopen, mee geanalyseerd te worden.

Voor de kwaliteitscontroles QC1 en QC2 kan gebruik gemaakt worden van het controlemonster LCS zoals beschreven in §8 *Kwaliteitscontrole*.

Het ondervangen van mogelijke memory effecten dient bijkomend voorzien te worden.

8 KWALITEITSCONTROLE

De QA/QC richtlijnen zoals beschreven in ISO 11885 zijn niet van toepassing.

Volgende kwaliteitscontroles (en bijkomende criteria) worden bij elke meetreeks (minstens 1x per dag) uitgevoerd:

QA/QC oplossing	Definitie	Criterium
Procedureblanco	Procedureblanco	Minimum: $\geq -\frac{1}{2}$ wettelijke rapportagegrens of $\geq -\frac{1}{2}$ LOQ Maximum: $\leq \frac{1}{2}$ wettelijke rapportagegrens of $\leq \frac{1}{2}$ LOQ
LOQ	Bepalingsgrens (Limit of Quantification)	$6 \times \text{st. dev.} = \text{LOQ} \leq \text{wettelijke RG} (*) / \text{controle gevoeligheid}$
LCS	Controlestaal (Laboratory Control Sample)	$\pm 20 \% \text{ juiste waarde}$
Interne standaard	Interne standaard	70 -130 % terugvinding

Opmerking: De wettelijke rapportagegrenzen/LOQ_{max} zijn beschreven in Bijlage B van WAC/VI/A/001

Prestatiekenmerken. (*) Het criterium " $6 \times \text{st. dev.} = \text{LOQ} \leq \text{wettelijke RG}$ " moet bij de validatie en minimaal jaarlijks bij de evaluatie van de prestatiekenmerken worden aangetoond.

Samenstelling van de controlemonsters (LOQ en LCS) voor de matrices oppervlaktewater (OW), afvalwater (AW), grondwater (GW) en drinkwater (DW):

	LOQ AW	LOQ OW***	LOQ GW/DW	LCS AW	LCS OW	LCS GW/DW
element	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l
aluminium	100		10	300		30
antimoon	10	10	3	30	30	9
arseen	5	2,5	3	15	7,5	9
barium	10	10	10	30	30	30
beryllium	1	0,5		3	1,5	
boor	100	100	100	300	300	300
cadmium	0,8	0,4	0,75	2,4	1,2	2,25
cerium	10			30		
chroom	10	10	10	30	30	30
fosfor*	(300)	(50)		(900)	(150)	
ijzer	100		100	300		300
kobalt	0,6	0,3	0,3	1,8	0,9	0,9
koper	10	10	10	30	30	30
lood	10	10	3	30	30	9

	LOQ AW	LOQ OW***	LOQ GW/DW	LCS AW	LCS OW	LCS GW/DW
element	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l
mangaan	10		10	30		30
molybdeen	10	10		30	30	
nikkel	10	10	10	30	30	30
seleen	5	3	3	15	9	9
tellurium	10	10		30	30	
thallium	1	0,5		3	1,5	
tin	10	10		30	30	
titanium	10	10		30	30	
uranium	0,5	0,3		1,5	0,9	
vanadium	5	2,5		15	7,5	
zilver	1	0,4		3	1,2	
zink	50	50	50	150	150	150
Element/matrix	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
calcium	200	100	100	200	100	100
chloride	100	50	50	100	50	50
fosfor*	(1)	(0,5)	(0,5)	(1)	(0,5)	(0,5)
zwavel	50	25	25	50	25	25
magnesium	20	10	10	20	10	10
natrium	50	25	25	50	25	25
kalium	10	5	5	10	5	5
koolstof**	20	10	10	20	10	10

*In de LOQ en LCS oplossing kan het element P facultatief worden toegevoegd als te bepalen element of als matrix element.

** Als koolstofbron voor de matrixoplossing kan natriumacetaat gebruikt worden.

***De gehalten opgenomen in de tabel gelden voor de bepaling van de LOQ van het totaal gehalte van elementen. De bepaling van de LOQ van het opgelost gehalte van elementen kan worden uitgevoerd op minstens een 2.5 x verdunning hiervan (in eenzelfde matrixsamenstelling).

Opmerking: De beschreven gehalten voor de LOQ oplossing zijn maximale waarden.

9 REFERENTIES

- ISO 11885:2007 Water quality – Determination of selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES).
- K. Tirez, F. Beutels, K. Duyssens, W. Brusten, W. Wouters, C. Vanhoof en G. Vanermen, *Vastleggen rapportagegrenzen voor afval-, grond- en oppervlaktewater in het kader van de erkenningen*, VITO rapport 2015/SCT/R/050, https://reflabos.vito.be/onderzoeksrapporten/2014_Rapport_rapportagegrenzen_finaal.pdf
- K. Tirez, F. Beutels, K. Duyssens, W. Brusten, C. Vanhoof, *Rapportagegrenzen voor afval-, grond- en oppervlaktewater in het kader van de erkenningen – innovatieve ICP-MS methodes*, VITO rapport 2015/SCT/R/0506, https://reflabos.vito.be/onderzoeksrapporten/2016_rapport_rapportagegrenzen_LNE.pdf

Methoden voor de bepaling van anionen

INHOUD

1	Drinkwater	3
2	Afvalwater	6
3	Grondwater	9
4	Oppervlaktewater	11

Voor de conservering en behandeling van watermonsters wordt verwezen naar WAC/I/A/010.

1 DRINKWATER

Voor de matrix drinkwater kunnen de verschillende analysemethoden, mits toepassing van de geschikte conservering, rechtstreeks op het monster worden uitgevoerd. Er dient geen voorafgaandelijk destructie/voorbehandeling te worden uitgevoerd.

De volgende analysemethoden kunnen gebruikt worden voor het bepalen van anionen in drinkwater:

Bromaat	• NBN EN ISO 15061:2001 Water quality – Determination of dissolved bromate – Method by liquid chromatography of ions (ISO 15061:2001) • NBN EN ISO 11206:2013 Water quality - Determination of dissolved bromate -Method using ion chromatography (IC) and post column reaction (PCR) (ISO 11206:2011) • EPA Method 321.8: Determination of bromate in drinking waters by Ion Chromatography Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry • EPA Method 557: Determination of haloacetic acids, bromate, and dalapon in drinking water by ion chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (IC-ESI-MS/MS)
Chloride (a)	• NBN EN ISO 10304-1:2009 Water quality - Determination of dissolved anions by liquid chromatography of ions - Part 1: Determination of bromide, chloride, fluoride, nitrate, nitrite, phosphate and sulfate (ISO 10304-1:2007) (WAC/III/C/001) • NBN EN ISO 10304-4:2022 Water quality - Determination of dissolved anions using liquid chromatography of ions. Part 4: Determination of chlorate, chloride and chlorite in water with low contamination (ISO 10304-4:2022) • ISO 9297:1989 Water quality – Determination of chloride – Silver nitrate titration with chromate indicator (Mohr's method) • NBN EN ISO 15682:2001 Water quality – Determination of chloride by flow analysis (CFA and FIA) and photometric or potentiometric detection (EN ISO 15682:2000) • NBN EN ISO 15923-1:2024 Water quality – Determination of selected parameters by discrete analysis systems - Part 1: Ammonium, nitrate, nitrite, chloride, orthophosphate, sulfate and silicate with photometric detection (ISO 15923-1:2013) (WAC/III/C/002)
Chloraat	• NBN EN ISO 10304-4:2022 Water quality - Determination of dissolved anions using liquid chromatography of ions. Part 4: Determination of chlorate, chloride and chlorite in water with low contamination (ISO 10304-4:2022)
Chloriet	• NBN EN ISO 10304-4:2022 Water quality - Determination of dissolved anions using liquid chromatography of ions. Part 4: Determination of chlorate, chloride and chlorite in water with low contamination (ISO 10304-4:2022)
Perchloraat	• EPA Method 314 Determination of Perchlorate in Drinking Water Using Ion Chromatography • EPA Method 332 Determination of Perchlorate in Drinking Water Using Ion Chromatography with suppressed conductivity and electrospray ionization mass spectrometry

Nitraat (c)	• NBN EN ISO 10304-1:2009 Water quality - Determination of dissolved anions by liquid chromatography of ions - Part 1: Determination of bromide, chloride, fluoride, nitrate, nitrite, phosphate and sulfate (ISO 10304-1:2007) (WAC/III/C/001) • NBN EN ISO 13395:1996 Water quality - Determination of nitrite nitrogen and nitrate nitrogen and the sum of both by flow analyses (CFA en FIA) and spectrometric detection (ISO 13395:1996) (WAC/III/D/031) • ISO 7890-3:1988 Water quality - Determination of nitrate - Part 3: Spectrometric method using sulfosalicylic acid • NBN EN ISO 15923-1:2024 Water quality - Determination of selected parameters by discrete analysis systems - Part 1: Ammonium, nitrate, nitrite, chloride, orthophosphate, sulfate and silicate with photometric detection (ISO 15923-1:2013) (WAC/III/C/002)
Nitriet	• NBN EN ISO 10304-1:2009 Water quality - Determination of dissolved anions by liquid chromatography of ions - Part 1: Determination of bromide, chloride, fluoride, nitrate, nitrite, phosphate and sulfate (ISO 10304-1:2007) (WAC/III/C/001) • NBN EN ISO 13395:1996 Water quality - Determination of nitrite nitrogen and nitrate nitrogen and the sum of both by flow analyses (CFA en FIA) and spectrometric detection (ISO 13395:1996) (WAC/III/D/031) • NBN EN 26777:1993 Water quality - Determination of nitrite - Molecular absorption spectrometric method (ISO 6777:1984) • NBN EN ISO 15923-1:2024 Water quality - Determination of selected parameters by discrete analysis systems - Part 1: Ammonium, nitrate, nitrite, chloride, orthophosphate, sulfate and silicate with photometric detection (ISO 15923-1:2013) (WAC/III/C/002)
Fluoride	• NBN EN ISO 10304-1:2009 Water quality - Determination of dissolved anions by liquid chromatography of ions - Part 1: Determination of bromide, chloride, fluoride, nitrate, nitrite, phosphate and sulfate (ISO 10304-1:2007) (WAC/III/C/001) • ISO 10359-1:1992 Water quality - Determination of fluoride - Part 1: Electrochemical probe method for potable and light polluted water (WAC/III/C/020)(b) • WAC/III/C/022 Bepaling van fluoride met doorstroomanalyse
Sulfaat	• NBN EN ISO 10304-1:2009 Water quality - Determination of dissolved anions by liquid chromatography of ions - Part 1: Determination of bromide, chloride, fluoride, nitrate, nitrite, phosphate and sulfate (ISO 10304-1:2007) (WAC/III/C/001) • ISO 22743:2006 Water quality - Determination of sulfates - Method by continuous flow analysis (CFA) • NBN EN ISO 15923-1:2024 Water quality - Determination of selected parameters by discrete analysis systems - Part 1: Ammonium, nitrate, nitrite, chloride, orthophosphate, sulfate and silicate with photometric detection (ISO 15923-1:2013) (WAC/III/C/002)

- (a) Voor de bepaling van chloride wordt bij toepassing van de titrimetrische methode, de doorstroomanalysemethode en de discrete analyser steeds een totaal halogeen gehalte (chloride, bromide, jodide) bepaald. Ionenchromatografie daarentegen is in staat om selectief chloride te meten.

- (b) Voor de bepaling van fluoride met ion-selectieve elektrode volgens ISO 10359-1 wordt het gebruik van de buffer zoals beschreven in DIN 38405-D4 aanbevolen. De validatiegegevens opgenomen in ISO 10359-1 zijn eveneens bepaald op basis van deze buffer.
- (c) Opmerking op het verslag indien de berekende meetonzekerheid bij een verschilmeting > 15% (meetonzekerheid opgenomen in het Besluit kwaliteit en levering van water, bestemd voor menselijke consumptie)

2 AFVALWATER

De volgende analysemethoden kunnen gebruikt worden voor het bepalen van anionen in afvalwater:

Chloride (a)	• NBN EN ISO 10304-1:2009 Water quality - Determination of dissolved anions by liquid chromatography of ions - Part 1: Determination of bromide, chloride, fluoride, nitrate, nitrite, phosphate and sulfate (ISO 10304-1:2007) (WAC/III/C/001) • ISO 9297:1989 Water quality - Determination of chloride - Silver nitrate titration with chromate indicator (Mohr's method) • NBN EN ISO 15682:2001 Water quality - Determination of chloride by flow analysis (CFA and FIA) and photometric or potentiometric detection (EN ISO 15682:2000) • NBN EN ISO 15923-1:2024 Water quality - Determination of selected parameters by discrete analysis systems - Part 1: Ammonium, nitrate, nitrite, chloride, orthophosphate, sulfate and silicate with photometric detection (ISO 15923-1:2013) (WAC/III/C/002)
Nitraat (c)	• NBN EN ISO 10304-1:2009 Water quality - Determination of dissolved anions by liquid chromatography of ions - Part 1: Determination of bromide, chloride, fluoride, nitrate, nitrite, phosphate and sulfate (ISO 10304-1:2007) (WAC/III/C/001) • NBN EN ISO 13395:1996 Water quality - Determination of nitrite nitrogen and nitrate nitrogen and the sum of both by flow analyses (CFA en FIA) and spectrometric detection (ISO 13395:1996) (WAC/III/D/031) • ISO 7890-3: 1988 Water quality - Determination of nitrate - Part 3: Spectrometric method using sulfosalicylic acid • NBN EN ISO 15923-1:2024 Water quality - Determination of selected parameters by discrete analysis systems - Part 1: Ammonium, nitrate, nitrite, chloride, orthophosphate, sulfate and silicate with photometric detection (ISO 15923-1:2013) (WAC/III/C/002)
Nitriet	• NBN EN ISO 10304-1:2009 Water quality - Determination of dissolved anions by liquid chromatography of ions - Part 1: Determination of bromide, chloride, fluoride, nitrate, nitrite, phosphate and sulfate (ISO 10304-1:2007) (WAC/III/C/001) • NBN EN ISO 13395:1996 Water quality - Determination of nitrite nitrogen and nitrate nitrogen and the sum of both by flow analyses (CFA en FIA) and spectrometric detection (ISO 13395:1996) (WAC/III/D/031) • NBN EN 26777:1993 Water quality - Determination of nitrite - Molecular absorption spectrometric method (ISO 6777:1984) • NBN EN ISO 15923-1:2024 Water quality - Determination of selected parameters by discrete analysis systems - Part 1: Ammonium, nitrate, nitrite, chloride, orthophosphate, sulfate and silicate with photometric detection (ISO 15923-1:2013) (WAC/III/C/002)
Fluoride	• NBN EN ISO 10304-1:2009 Water quality - Determination of dissolved anions by liquid chromatography of ions - Part 1: Determination of bromide, chloride, fluoride, nitrate, nitrite, phosphate and sulfate

	(ISO 10304-1:2007) (WAC/III/C/001) • ISO 10359-1:1992 Water quality – Determination of fluoride – Part 1: Electrochemical probe method for potable and light polluted water (WAC/III/C/020)(b) • WAC/III/C/022 Bepaling van fluoride met doorstroomanalyse
Orthofosfaat	• NBN EN ISO 10304-1:2009 Water quality - Determination of dissolved anions by liquid chromatography of ions - Part 1: Determination of bromide, chloride, fluoride, nitrate, nitrite, phosphate and sulfate (ISO 10304-1:2007) (WAC/III/C/001) • NBN EN ISO 15681-1:2005 Water quality – Determination of orthophosphate and total phosphorus contents by flow analysis (FIA and CFA) – Part 1: Method by flow injection analysis (FIA) (ISO 15681-1: 2003) • NBN EN ISO 15681-2:2019 Water quality – Determination of orthophosphate and total phosphorus contents by flow analysis (FIA and CFA) – Part 2: Method by continuous flow analysis (CFA) (ISO 15681-2:2018) (WAC/III/C/010) • NBN EN ISO 6878:2004 Water quality – Determination of phosphorus – Ammonium molybdate spectrometric method (ISO 6878: 2004) • NBN EN ISO 15923-1:2024 Water quality – Determination of selected parameters by discrete analysis systems - Part 1: Ammonium, nitrate, nitrite, chloride, orthophosphate, sulfate and silicate with photometric detection (ISO 15923-1:2013) (WAC/III/C/002)
Sulfaat	• NBN EN ISO 10304-1:2009 Water quality - Determination of dissolved anions by liquid chromatography of ions - Part 1: Determination of bromide, chloride, fluoride, nitrate, nitrite, phosphate and sulfate (ISO 10304-1:2007) (WAC/III/C/001) • ISO 22743:2006 Water quality - Determination of sulfates - Method by continuous flow analysis (CFA) • NBN EN ISO 15923-1:2024 Water quality – Determination of selected parameters by discrete analysis systems - Part 1: Ammonium, nitrate, nitrite, chloride, orthophosphate, sulfate and silicate with photometric detection (ISO 15923-1:2013) (WAC/III/C/002)
Sulfide	• WAC/III/C/040 Potentiometrische bepaling van sulfide • WAC/III/C/041 Spectrofotometrische bepaling van sulfide
Chroom(VI)	• NBN EN ISO 10304-3:1997 Water quality - Determination of dissolved anions using liquid chromatography of ions. Part 3: Determination of chromate, iodide, sulfite, thiocyanate and thiosulfate (ISO 10304-3:1997) • EPA 218.6:1996 Determination of dissolved hexavalent chromium in drinking water, groundwater and industrial wastewater effluents by ion chromatography (WAC/III/C/050) • EPA 218.7:2011 Determination of hexavalent chromium in drinking water by ion chromatography with post-column derivatization and UV-Visible detection (WAC/III/C/050) • EPA 7199:1996 Determination of hexavalent chromium in drinking water, groundwater and industrial waste water effluents by ion chromatography (WAC/III/C/050) • ISO 11083:1994 Water quality – Determination of chromium(VI) – Spectrometric method using 1,5 diphenylcarbazine (d)

Vrije en totaal chloor	• NBN EN ISO 7393-2:2018 Water quality -- Determination of free chlorine and total chlorine -- Part 2: Colorimetric method using N,N-diethyl-1,4-phenylenediamine, for routine control purposes • NBN EN ISO 7393-1:2000 Water quality - Determination of free chlorine and total chlorine - Deel 1 : Titrimetric method using N,N-diethyl-1,4-phenylenediamine (ISO 7393-1:1985) • EPA method 330.5 Chlorine, Total Residual (Spectrophotometric, DPD)
Vrije cyanide	• NBN EN ISO 14403-2: 2012 Water quality - Determination of total cyanide and free cyanide using flow analysis (FIA and CFA) – Part 2: Method using continuous flow analysis (CFA) (ISO 14403-2: 2012) (WAC/III/C/030)

- Voor de bepaling van chloride wordt bij toepassing van de titrimetrische methode, de doorstroomanalysemethode en de discrete analyser steeds een totaal halogeen gehalte (chloride, bromide, jodide) bepaald. Ionenchromatografie daarentegen is in staat om selectief chloride te meten.
- Voor de bepaling van fluoride met ion-selectieve elektrode volgens ISO 10359-1 wordt het gebruik van de buffer zoals beschreven in DIN 38405-D4 aanbevolen. De validatiegegevens opgenomen in ISO 10359-1 zijn eveneens bepaald op basis van deze buffer.
- Opmerking op het verslag indien de berekende meetonzekerheid bij een verschilmeting > 30% (meetonzekerheid opgenomen in VLAREM II Bijlage 4.2.5.2)
- Bij toepassing van de rechtstreekse methode zonder IC scheiding conform ISO 11083:1994 zijn verschillende interferenties mogelijk. Bij aanwezigheid van oxiderende en/of reducerende bestanddelen dient de in de norm beschreven voorbehandelingsprocedure gevolgd te worden.

3 GRONDWATER

De volgende analysemethoden kunnen gebruikt worden voor het bepalen van anionen in grondwater:

Chloride (a)	• NBN EN ISO 10304-1:2009 Water quality - Determination of dissolved anions by liquid chromatography of ions - Part 1: Determination of bromide, chloride, fluoride, nitrate, nitrite, phosphate and sulfate (ISO 10304-1:2007) (WAC/III/C/001) • NBN EN ISO 10304-4:2022 Water quality - Determination of dissolved anions using liquid chromatography of ions. Part 4: Determination of chlorate, chloride and chlorite in water with low contamination (ISO 10304-4:2022) • ISO 9297:1989 Water quality – Determination of chloride – Silver nitrate titration with chromate indicator (Mohr's method) • NBN EN ISO 15682:2001 Water quality – Determination of chloride by flow analysis (CFA and FIA) and photometric or potentiometric detection (EN ISO 15682:2000) • NBN EN ISO 15923-1:2024 Water quality – Determination of selected parameters by discrete analysis systems - Part 1: Ammonium, nitrate, nitrite, chloride, orthophosphate, sulfate and silicate with photometric detection (ISO 15923-1:2013) (WAC/III/C/002)
Nitraat (c)	• NBN EN ISO 10304-1:2009 Water quality - Determination of dissolved anions by liquid chromatography of ions - Part 1: Determination of bromide, chloride, fluoride, nitrate, nitrite, phosphate and sulfate (ISO 10304-1:2007) (WAC/III/C/001) • NBN EN ISO 13395:1996 Water quality – Determination of nitrite nitrogen and nitrate nitrogen and the sum of both by flow analyses (CFA en FIA) and spectrometric detection (ISO 13395:1996) (WAC/III/D/031) • ISO 7890-3:1988 Water quality – Determination of nitrate – Part 3: Spectrometric method using sulfosalicylic acid • NBN EN ISO 15923-1:2024 Water quality – Determination of selected parameters by discrete analysis systems - Part 1: Ammonium, nitrate, nitrite, chloride, orthophosphate, sulfate and silicate with photometric detection (ISO 15923-1:2013) (WAC/III/C/002)
Nitriet	• NBN EN ISO 10304-1:2009 Water quality - Determination of dissolved anions by liquid chromatography of ions - Part 1: Determination of bromide, chloride, fluoride, nitrate, nitrite, phosphate and sulfate (ISO 10304-1:2007) (WAC/III/C/001) • NBN EN ISO 13395:1996 Water quality – Determination of nitrite nitrogen and nitrate nitrogen and the sum of both by flow analyses (CFA en FIA) and spectrometric detection (ISO 13395:1996) (WAC/III/D/031) • NBN EN 26777:1993 Water quality – Determination of nitrite – Molecular absorption spectrometric method (ISO 6777:1984) • NBN EN ISO 15923-1:2024 Water quality – Determination of

	selected parameters by discrete analysis systems - Part 1: Ammonium, nitrate, nitrite, chloride, orthophosphate, sulfate and silicate with photometric detection (ISO 15923-1:2013) (WAC/III/C/002)
Fluoride	• NBN EN ISO 10304-1:2009 Water quality - Determination of dissolved anions by liquid chromatography of ions - Part 1: Determination of bromide, chloride, fluoride, nitrate, nitrite, phosphate and sulfate (ISO 10304-1:2007) (WAC/III/C/001) • ISO 10359-1:1992 Water quality - Determination of fluoride - Part 1: Electrochemical probe method for potable and light polluted water (WAC/III/C/020)(b) • WAC/III/C/022 Bepaling van fluoride met doorstroomanalyse
Sulfaat	• NBN EN ISO 10304-1:2009 Water quality - Determination of dissolved anions by liquid chromatography of ions - Part 1: Determination of bromide, chloride, fluoride, nitrate, nitrite, phosphate and sulfate (ISO 10304-1:2007) (WAC/III/C/001) • ISO 22743:2006 Water quality - Determination of sulfates - Method by continuous flow analysis (CFA) • NBN EN ISO 15923-1:2024 Water quality - Determination of selected parameters by discrete analysis systems - Part 1: Ammonium, nitrate, nitrite, chloride, orthophosphate, sulfate and silicate with photometric detection (ISO 15923-1:2013) (WAC/III/C/002)

- Voor de bepaling van chloride wordt bij toepassing van de titrimetrische methode, de doorstroomanalysemethode en de discrete analyser steeds een totaal halogeen gehalte (chloride, bromide, jodide) bepaald. Ionenchromatografie daarentegen is in staat om selectief chloride te meten.
- Voor de bepaling van fluoride met ion-selectieve elektrode volgens ISO 10359-1 wordt het gebruik van de buffer zoals beschreven in DIN 38405-D4 aanbevolen. De validatiegegevens opgenomen in ISO 10359-1 zijn eveneens bepaald op basis van deze buffer.
- Opmerking op het verslag indien de berekende meetonzekerheid bij een verschilmeting > 30%.

4 OPPERVLAKTEWATER

De volgende analysemethoden kunnen gebruikt worden voor het bepalen van anionen in oppervlaktewater:

Chloride (a)	• NBN EN ISO 10304-1:2009 Water quality - Determination of dissolved anions by liquid chromatography of ions - Part 1: Determination of bromide, chloride, fluoride, nitrate, nitrite, phosphate and sulfate (ISO 10304-1:2007) (WAC/III/C/001) • NBN EN ISO 10304-4:2022 Water quality - Determination of dissolved anions using liquid chromatography of ions. Part 4: Determination of chlorate, chloride and chlorite in water with low contamination (ISO 10304-4:2022) • ISO 9297:1989 Water quality - Determination of chloride - Silver nitrate titration with chromate indicator (Mohr's method) • NBN EN ISO 15682:2001 Water quality - Determination of chloride by flow analysis (CFA and FIA) and photometric or potentiometric detection (EN ISO 15682:2000) • NBN EN ISO 15923-1:2024 Water quality - Determination of selected parameters by discrete analysis systems - Part 1: Ammonium, nitrate, nitrite, chloride, orthophosphate, sulfate and silicate with photometric detection (ISO 15923-1:2013) (WAC/III/C/002)
Nitraat (c)	• NBN EN ISO 10304-1:2009 Water quality - Determination of dissolved anions by liquid chromatography of ions - Part 1: Determination of bromide, chloride, fluoride, nitrate, nitrite, phosphate and sulfate (ISO 10304-1:2007) (WAC/III/C/001) • NBN EN ISO 13395:1996 Water quality - Determination of nitrite nitrogen and nitrate nitrogen and the sum of both by flow analyses (CFA en FIA) and spectrometric detection (ISO 13395:1996) (WAC/III/D/031) • ISO 7890-3: 1988 Water quality - Determination of nitrate - Part 3: Spectrometric method using sulfosalicylic acid • NBN EN ISO 15923-1:2024 Water quality - Determination of selected parameters by discrete analysis systems - Part 1: Ammonium, nitrate, nitrite, chloride, orthophosphate, sulfate and silicate with photometric detection (ISO 15923-1:2013) (WAC/III/C/002)
Nitriet	• NBN EN ISO 10304-1:2009 Water quality - Determination of dissolved anions by liquid chromatography of ions - Part 1: Determination of bromide, chloride, fluoride, nitrate, nitrite, phosphate and sulfate (ISO 10304-1:2007) (WAC/III/C/001) • NBN EN ISO 13395:1996 Water quality - Determination of nitrite nitrogen and nitrate nitrogen and the sum of both by flow analyses (CFA en FIA) and spectrometric detection (ISO 13395:1996) (WAC/III/D/031) • NBN EN 26777:1993 Water quality - Determination of nitrite - Molecular absorption spectrometric method (ISO 6777:1984) • NBN EN ISO 15923-1:2024 Water quality - Determination of selected parameters by discrete analysis systems - Part 1: Ammonium, nitrate, nitrite, chloride, orthophosphate, sulfate and silicate with photometric

	detection (ISO 15923-1:2013) (WAC/III/C/002)
Fluoride	• NBN EN ISO 10304-1:2009 Water quality - Determination of dissolved anions by liquid chromatography of ions - Part 1: Determination of bromide, chloride, fluoride, nitrate, nitrite, phosphate and sulfate (ISO 10304-1:2007) (WAC/III/C/001) • ISO 10359-1:1992 Water quality - Determination of fluoride - Part 1: Electrochemical probe method for potable and light polluted water (WAC/III/C/020)(b) • WAC/III/C/022 Bepaling van fluoride met doorstroomanalyse
Orthofosfaat	• NBN EN ISO 10304-1:2009 Water quality - Determination of dissolved anions by liquid chromatography of ions - Part 1: Determination of bromide, chloride, fluoride, nitrate, nitrite, phosphate and sulfate (ISO 10304-1:2007) (WAC/III/C/001) • NBN EN ISO 15681-1:2005 Water quality - Determination of orthophosphate and total phosphorus contents by flow analysis (FIA and CFA) - Part 1: Method by flow injection analysis (FIA) (ISO 15681-1: 2003) • NBN EN ISO 15681-2:2019 Water quality - Determination of orthophosphate and total phosphorus contents by flow analysis (FIA and CFA) - Part 2: Method by continuous flow analysis (CFA) (ISO 15681-2:2018) (WAC/III/C/010) • NBN EN ISO 6878:2004 Water quality - Determination of phosphorus - Ammonium molybdate spectrometric method (ISO 6878: 2004) • NBN EN ISO 15923-1:2024 Water quality - Determination of selected parameters by discrete analysis systems - Part 1: Ammonium, nitrate, nitrite, chloride, orthophosphate, sulfate and silicate with photometric detection (ISO 15923-1:2013) (WAC/III/C/002)
Sulfaat	• NBN EN ISO 10304-1:2009 Water quality - Determination of dissolved anions by liquid chromatography of ions - Part 1: Determination of bromide, chloride, fluoride, nitrate, nitrite, phosphate and sulfate (ISO 10304-1:2007) (WAC/III/C/001) • ISO 22743:2006 Water quality - Determination of sulfates - Method by continuous flow analysis (CFA) • NBN EN ISO 15923-1:2024 Water quality - Determination of selected parameters by discrete analysis systems - Part 1: Ammonium, nitrate, nitrite, chloride, orthophosphate, sulfate and silicate with photometric detection (ISO 15923-1:2013) (WAC/III/C/002)

- (a) Voor de bepaling van chloride wordt bij toepassing van de titrimetrische methode, de doorstroomanalysemethode en de discrete analyser steeds een totaal halogeen gehalte (chloride, bromide, jodide) bepaald. Ionenchromatografie daarentegen is in staat om selectief chloride te meten.
- (b) Voor de bepaling van fluoride met ion-selectieve elektrode volgens ISO 10359-1 wordt het gebruik van de buffer zoals beschreven in DIN 38405-D4 aanbevolen. De validatiegegevens opgenomen in ISO 10359-1 zijn eveneens bepaald op basis van deze buffer.
- (c) Opmerking op het verslag indien de berekende meetonzekerheid bij een verschilmeting > 30%.

Bepaling van ionen met een discreet analysesysteem en spectrofotometrische detectie – ammonium, chloride, nitraat, nitriet, orthofosfaat en sulfaat

1 DOEL EN TOEPASSINGSGEBIED

Deze procedure beschrijft methoden voor de automatische uitvoering van spectrofotometrische en turbidimetrische analyses met een discreet analysesysteem voor de bepaling van ammonium, chloride, nitraat, nitriet, orthofosfaat en sulfaat. De methode is toepasbaar voor drinkwater, grondwater, oppervlaktewater, afvalwater, eluaten en ketelwater.

De procedure zoals beschreven in **NBN EN ISO 15923-1:2024** is van toepassing mits volgende aanvullingen:

- § 5 Andere reagentia en concentraties mogen gebruikt worden mits deze voldoen voor deze toepassing.
- § 7 Voor de conservering en behandeling van watermonsters wordt verwezen naar WAC/I/A/010.
- Annex B t.e.m.H: Afwijkingen aan de uitvoering van de beschreven methoden zijn toegestaan zolang de procedure is gebaseerd op hetzelfde principe als een bestaande EN of ISO norm en zolang voldaan wordt aan de vereiste prestatiekenmerken.
- §8.1 en 8.2: Bij de bepaling van ammonium, nitraat en nitriet kunnen vals negatieve resultaten optreden bij zeer hoge concentraties. Bijgevolg wordt bij de analyse van afvalwater voor deze parameters minimaal één van de volgende kwaliteitscontroles uitgevoerd:
 - Analyse van het afvalwater met minimum 1 dopering waarvan de bias tov de theoretische waarde max. 10% mag bedragen
 - Minstens 2 metingen van hetzelfde monster waarvan de verdunningsfactor minstens een factor 2 verschilt, resulterend in 2 meetresultaten binnen het meetgebied die max. 10% van elkaar verschillen

Opmerking 1: In het meetgebied tussen de rapportagegrens en maximaal 5 maal de rapportagegrens mag een absolute waarde voor de toegestane afwijking tussen de 2 verdunningen worden gedefinieerd (maximaal ½ van de rapportagegrens).

2 REFERENTIES

- **NBN EN ISO 15923-1:2024** Water quality – Determinations of ions by a discrete analysis system and spectrophotometric detection – Part 1: Ammonium, chloride, nitrate, nitrite, orthophosphate, silicate and sulfaat (**ISO 15923:2013**)
- NEN 6604:2007 Water – bepaling van het gehalte aan ammonium, nitraat, nitriet, chloride, ortho-fosfaat, sulfaat en silicaat met een discreet analysesysteem en spectrofotometrische detectie.

Potentiometrische bepaling van sulfiden

INHOUD

1	TOEPASSINGSGEBIED	3
2	PRINCIPE	3
3	MONSTERVEROORBEHANDELING	3
4	OPMERKINGEN	3
5	APPARATUUR EN MATERIAAL	3
6	REAGENTIA en OPLOSSINGEN	4
6.1	<i>Reagentia</i>	4
6.2	<i>Oplossingen</i>	4
7	PROCEDURE	5
7.1	<i>Monstervoorbereiding</i>	5
7.2	<i>Potentiometrische bepaling</i>	5
8	BEREKENING	6
9	KWALITEITSCONTROLE	6
10	STANDAARDISATIE VAN DE SULFIDEOPLOSSING	6
10.1	<i>Principe: jodometrie</i>	6
10.2	<i>Reagentia</i>	6
10.3	<i>Werkwijze</i>	7
10.4	<i>Berekening</i>	7
11	STANDAARDISATIE VAN EEN THIOSULFAATOPLOSSING	7
11.1	<i>Standaardisatie</i>	7
11.2	<i>Berekening</i>	7
12	STANDAARDISATIE VAN EEN JODIUMOPLOSSING	8
12.1	<i>Standaardisatie</i>	8
12.2	<i>Berekening</i>	8
13	REFERENTIES	8

1 TOEPASSINGSGEBIED

Deze methode beschrijft de potentiometrische bepaling van het gehalte aan sulfide in afvalwater. Het beschreven analyseprocédé is toepasbaar indien het sulfidegehalte in het te analyseren monster hoger is dan 0,05 mg/l.

2 PRINCIPE

Na het doorborrelen van het destillatietoestel met stikstofgas gedurende 5 minuten wordt 100 ml van het gehomogeniseerd monster in de destillatiekolf gebracht. De oplossing wordt onder constant roeren verwarmd tot 90 à 95 °C. De sulfiden worden vrijgezet na toevoegen van 20 ml geconcentreerd zwavelzuur en doorborrelen van stikstofgas gedurende 30 minuten. De vrijzetbare sulfiden worden opgevangen in een wasfles met SAOB oplossing, waarna het sulfidengehalte potentiometrisch bepaald wordt m.b.v. een sulfide ion-selectieve elektrode (ISE).

3 MONSTERVEROORBEHANDELING

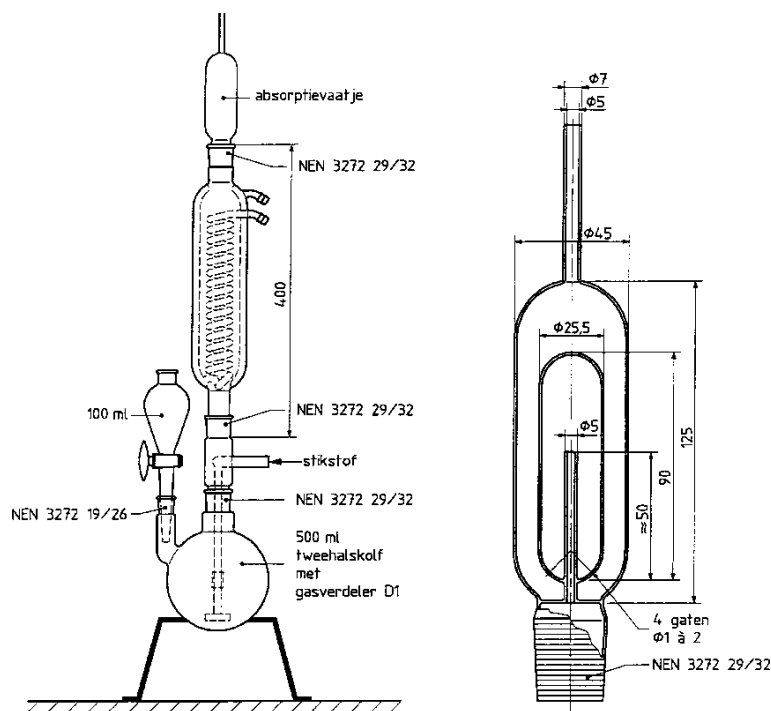
- Monsterveroorbehandling: zie procedure monsterveroorbehandling WAC/I/A/010.

4 OPMERKINGEN

Na aanzuren van sulfiden bevattende monsters kan toxisch H_2S -gas vrijgezet worden. Sulfiden in water komen voor onder vrije (opgeloste) vorm (H_2S , HS^- of S^{2-}), als complex (complexen met Sn, As, Sb en elementaire S) of als onopgeloste metaalsulfide (vb. FeS , ZnS , CuS ...). Het is enkel de fractie die onder de beschreven specifieke omstandigheden oplosbaar is, die bepaald wordt met de onderstaande methode. Dit betekent dat er een aantal metaalsulfiden niet mee bepaald worden.

5 APPARATUUR EN MATERIAAL

- 5.1 Analytische balans (0,1 mg)
- 5.2 Destillatieopstelling (figuur 1): absorptievat kan vervangen worden door een gaswasfles
- 5.3 Sulfide ion-selectieve elektrode
- 5.4 Referentie elektrode
- 5.5 mV-meter
- 5.6 Roerder
- 5.7 Gaswasflessen
- 5.8 Algemeen glaswerk
- 5.9 Roer- verwarmingseenheid



Figuur 1: Destillatieopstelling



6 REAGENTIA EN OPLOSSINGEN

6.1 REAGENTIA

- 6.1.1 NaOH
- 6.1.2 Geconcentreerd H_2SO_4 ($d = 1,84 \text{ g/ml p.a.}$)
- 6.1.3 Stikstofgas, met een zuiverheid $> 99,996\%$
- 6.1.4 HCl geconcentreerd
- 6.1.5 Ammoniummetavanadaat
- 6.1.6 Zinkpoeder
- 6.1.7 Kwik
- 6.1.8 $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$
- 6.1.9 Ascorbinezuur p.a.
- 6.1.10 Di Na EDTA

6.2 OPLOSSINGEN

- 6.2.1 Stikstofreinigingsoplossing (zuurstoffiltrerende oplossing)
50 ml HCl conc. en 5 g ammoniummetavanadaat (kook de oplossing tot alles is opgelost). Leng aan met N_2 -uitgeblazen ultra puur water tot 500 ml.
Weeg 15 g zinkpoeder in de wasfles (500 ml), zet juist onder water, voeg 3 druppels HCl conc toe en 4 druppels kwik.
Giet de 500 ml vanadiumoplossing bij in de wasfles.

Opmerking 1: Stikstofreinigingsoplossing is enkel van toepassing indien de zuiverheid van het stikstofgas niet voldoet aan de vereiste specificaties.

Opmerking 2: Gelijkwaardige oplossingen mogen gebruikt worden.

- 6.2.2 SAOB: los 80 g NaOH, 35 g ascorbinezuur en 67 g di-Na-EDTA op in stikstof uitgeblazen ultra puur water in een maatkolf van 1 liter. Leng aan tot aan de maatstreep met stikstof uitgeblazen ultra puur water. Vervang bovenstaande lucht door stikstof. Als de oplossing bruin verkleurd dient deze vervangen te worden.

7 PROCEDURE

7.1 MONSTERVERBEREIDING

De opstelling wordt gedurende 5 minuten doorborreld met stikstofgas. Vervolgens wordt 100 ml te analyseren monster in de destillatiekolf gebracht. Via een toevloeihtrechter wordt voorzichtig (druppels gewijs) 20 ml geconcentreerd zwavelzuur toegevoegd.

De destillatie wordt uitgevoerd onder constant roeren bij 90 à 95 °C gedurende minimum 30 minuten. De vrijkomende zwavelwaterstof wordt door de matige stroom stikstof uitgedreven en opgevangen in een opvangvat dat gevuld is met 50 ml SAOB. Na de destillatie wordt de inhoud van het opvangvat overgebracht in een maatkolf en aangelengd met ultra puur water tot 100 ml.

De sulfiden in deze oplossing worden potentiometrisch bepaald.

Als absorptievloeistof is het mogelijk om een oplossing met NaOH of een zinkacetaatoplossing te voorzien om alzo de sulfidenconcentratie spectrofotometrisch te bepalen.

7.2 POTENTIOMETRISCHE BEPALING

Voorbeeld van kalibratiecurve

De kalibratie wordt opgesteld aan de hand van 6 meetwaarden gelegen in het werkgebied van 0 tot ± 14 mg/l. Deze kalibratie oplossing moeten dagelijks opnieuw bereid worden.

De gebruikte natriumsulfideoplossing is geen primaire standaard en is onstabiel vanwege luchtoxidatie. Deze standaardoplossing moet gesteld worden via de jodometrische methode (zie paragraaf 10).

In maatkolven van 50 ml wordt achtereenvolgens toegevoegd:

- 25 ml SAOB oplossing
- 0, 50, 100, 250, 1000 en 5000 μ l natriumsulfide standaard (~ 140 mg/l)
- aanlengen tot de maatstreep met ultra puur water
- stel de kalibratiecurve op door het elektroden paar achtereenvolgens in de verschillende kalibratie oplossingen te dompelen. Begin bij de laagste concentratie. Alle oplossingen moeten dezelfde temperatuur hebben en worden met eenzelfde constante snelheid geroerd tijdens de meting. De meting is voltooid als de uitlezing gedurende ten minste 15 seconden stabiel blijft (niet meer dan 0.1 mV verschilt). Tussen de bekomen meetresultaten in mV en de sulfide concentratie bestaat een logaritmisch verband.

Opmerking: andere concentraties mogen gebruikt worden mits deze voldoen voor de toepassing.

Metten van onbekenden

De monsters kunnen na de destillatie als dusdanig gemeten worden.

Valt de meting buiten het ijkgebied dan kan het monster verdund worden. Er dient wel rekening gehouden te worden dat SAOB concentratie na verdunning dezelfde dient te zijn als voor de verdunning.

De monsters dienden ook gemeten te worden bij dezelfde temperatuur en dezelfde roersnelheid als de kalibratie-oplossingen.

8 BEREKENING

Sulfide concentratie in de vloeistof

De sulfidenconcentratie in de absorptievloeistof kan direct uit de kalibratiecurve worden afgeleid; rekening houdend met eventuele verdunningen.

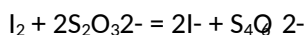
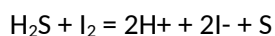
9 KWALITEITSCONTROLE

Ter controle wordt bij een reeks metingen een rendementsbepaling uitgevoerd op bv. een zinksulfide of ijzersulfide standaard, deze stoffen worden als vast product toegevoegd.

10 STANDAARDISATIE VAN DE SULFIDEOPLOSSING

Opmerking: Voor de standaardisatie van de sulfideoplossing mogen methoden gelijkwaardig met onderstaande procedure toegepast worden.

10.1 PRINCIPE: JODOMETRIE



10.2 REAGENTIA

- 10.2.1 Zoutzuur: HCl 6M: 51 ml geconcentreerd HCl 36 % wordt aangelengd tot 100 ml met ultra puur water.
- 10.2.2 Standaard jodiumoplossing: 20 à 25 g KI wordt opgelost in ultra puur water. Ongeveer 3,2 g jodium wordt toegevoegd. Nadat het jodium is opgelost (m.b.v. ultrasoonbad) wordt de oplossing aangelengd tot 1 l met ultra puur water. Deze oplossing wordt gestandaardiseerd t.o.v. een standaard thiosulfaatoplossing 0,025 M met zetmeel als indicator. De jodiumoplossing is onbeperkt houdbaar.
- 10.2.3 Standaard thiosulfaatoplossing ($\pm 0,025$ M): ongeveer 6,205 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ wordt opgelost in ultra puur water. 0,4 g NaOH wordt toegevoegd en de oplossing wordt aangelengd tot 1 l met ultra puur water.
- 10.2.4 Zetmeeloplossing: 2 g oplosbaar zetmeel en 0,2 salicylzuur worden opgelost in 100 ml kokend ultra puur water (houdbaar 6 maand). Indien er een troebeling optreedt, dient er een nieuwe oplossing aangemaakt te worden

10.3 WERKWIJZE

In een erlenmeyer van 250 ml achtereenvolgens 20,0 ml jodiumoplossing, 20,0 ml van de sulfide oplossing en 2 ml 6N HCl toevoegen.

De overmaat aan jood wordt getitreerd met een standaard thiosulfaatoplossing. Een paar druppels zetmeeloplossing toevoegen op het einde van de titratie. De kleuromslag is van blauw naar kleurloos.

10.4 BEREKENING

$$\text{mg S}^{-2} / \text{L} = \frac{([A \times B] - [C \times D] \times \text{S.F.}) \times \text{MM}_s \times \text{C.F.}}{E}$$

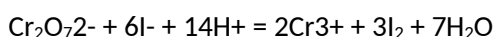
met:

- A = hoeveelheid joodoplossing (in liter)
- B = molariteit joodoplossing (in mol/l)
- C = hoeveelheid thiosulfaatoplossing (in liter)
- D = molariteit thiosulfaatoplossing (in mol/l)
- E = hoeveelheid staal (in liter)
- S.F. (stoechiometrische factor) = 1/2
- C.F. (correctiefactor) = 1000 (omzetting van g naar mg)
- MM_s = 32,066 g/mol

11 STANDAARDISATIE VAN EEN THIOSULFAATOPLOSSING

11.1 STANDAARDISATIE

0,0200 tot 0,0400 g K₂Cr₂O₇ p.a. (2 u drogen in droogstoof op 105°C en afkoelen in exsicator) wordt opgelost in 80 ml ultra puur water in een erlenmeyer. 0,2 g KI wordt al schuddend toegevoegd. Als alles opgelost is voegt men 20 ml HCl 1M toe. De erlenmeyer wordt gedurende 15 minuten in het donker gezet. Ondertussen treedt volgende reactie op:



Na deze 15 minuten wordt getitreerd met Na₂S₂O₃. Op het einde van de titratie (bij lichtgele kleur) worden enkele druppels zetmeelindicator toegevoegd. De kleuromslag is van blauw naar kleurloos.

11.2 BEREKENING

$$\frac{\text{conc. S O}_2^{-} (\text{mol} / \text{l})}{2 \quad 3} = \frac{M \times \text{S.F.}}{V \times \text{MM}}$$

met:

- M = massa K₂Cr₂O₇ (in g)
- V = volume S₂O₃²⁻ (in l)
- MM = molaire massa K₂Cr₂O₇ = 293,99 g/mol
- S.F. = 6

12 STANDAARDISATIE VAN EEN JODIUMOPLOSSING

Jodiumoplossingen zijn weinig stabiel en moeten gestandaardiseerd worden voor gebruik. Jodium is zeer vluchtig zelfs in een I_3^- -oplossing.

12.1 STANDAARDISATIE

10,0 ml jodiumoplossing wordt in een erlenmeyer gepipetteerd en 2 ml HCl 6M wordt toegevoegd. De oplossing wordt getitreerd met standaard $Na_2S_2O_3$. Zetmeelindicator wordt toegevoegd als de oplossing licht geel gekleurd is. Titreer tot de blauwe kleur verdwijnt.

12.2 BEREKENING

$$MI_2 \text{ (mol / l)} = \frac{MS_2O_3^2 \times V_1}{V_2 \times S.F.}$$

met:

$$\begin{aligned} V_1 &= \text{volume } S_2O_3^{2-} \text{ (in ml)} \\ V_2 &= \text{volume } I_2 \text{ (in ml)} \\ S.F. &= 2 \end{aligned}$$

13 REFERENTIES

- Environmental Toxicology and Chemistry, vol. 12, pp. 1441-1453, 1993
- NEN-6608:1996 Water. Fotometrische bepaling van het sulfidegehalte
- ~~ASTM-D4658-92 (1996): Standard test method for sulfide in water~~
- ISO 13358: 1997 Water quality – Determination of easily released sulfide

Spectrofotometrische bepaling van sulfiden

INHOUD

1	TOEPASSINGSGEBIED	3
2	PRINCIPE	3
3	MONSTERVOORBEHANDELING	3
4	OPMERKINGEN	3
5	APPARATUUR EN MATERIAAL	3
6	REAGENTIA en OPLOSSINGEN	4
6.1	<i>Reagentia</i>	4
6.2	<i>Oplossingen</i>	4
7	PROCEDURE	5
7.1	<i>Monstervoorbereiding</i>	5
7.2	<i>Spectrofotometrische bepaling</i>	5
8	BEREKENING	6
9	KWALITEITSCONTROLE	6
10	STANDAARDISATIE VAN DE SULFIDEOPLOSSING	6
10.1	<i>Principe: jodometrie</i>	6
10.2	<i>Reagentia</i>	6
10.3	<i>Werkwijze</i>	7
10.4	<i>Berekening</i>	7
11	STANDAARDISATIE VAN EEN THIOSULFAATOPLOSSING	7
11.1	<i>Standaardisatie</i>	7
11.2	<i>Berekening</i>	8
12	STANDAARDISATIE VAN EEN JODIUMOPLOSSING	8
12.1	<i>Standaardisatie</i>	8
12.2	<i>Berekening</i>	8
13	REFERENTIES	8

1 TOEPASSINGSGEBIED

Deze methode beschrijft de spectrofotometrische bepaling van het gehalte aan sulfide in afvalwater. Het beschreven analyseprocédé is toepasbaar indien het sulfidegehalte in het te analyseren monster hoger is dan 0,05 mg/l.

2 PRINCIPE

Na het doorborrelen van het destillatietoestel met stikstofgas wordt 100 ml van het gehomogeniseerd monster in de destillatiekolf gebracht. De oplossing wordt onder constant roeren verwarmd tot 90 à 95 °C. De sulfiden worden vrijgezet na toevoegen van 20 ml geconcentreerd zwavelzuur en doorborrelen van stikstofgas. De vrijzetbare sulfiden worden opgevangen in een wasfles met natriumhydroxideoplossing, waarna een spectrofotometrische bepaling bij 660 nm met dimethyl-p-phenyleendiamine als kleurreagens wordt uitgevoerd.

3 MONSTERVEROORBEHANDELING

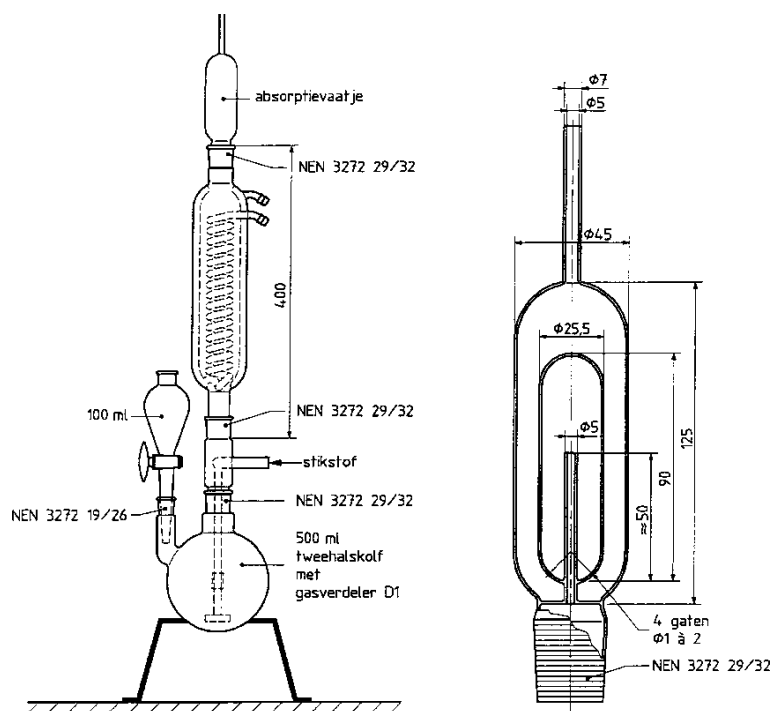
- Monsterveroorbehandling: zie procedure monsterveroorbehandling WAC/I/A/010.

4 OPMERKINGEN

Na aanzuren van sulfiden bevattende monsters kan toxisch H₂S-gas vrijgezet worden. Sulfiden in water komen voor onder vrije (opgeloste) vorm (H₂S, HS⁻ of S₂⁻), als complex (complexen met Sn, As, Sb en elementaire S) of als onopgeloste metaalsulfide (vb. FeS, ZnS, CuS ...). Het is enkel de fractie die onder de beschreven specifieke omstandigheden oplosbaar is, die bepaald wordt met de onderstaande methode. Dit betekent dat er een aantal metaalsulfiden niet mee bepaald worden.

5 APPARATUUR EN MATERIAAL

- 5.1 Analytische balans (0,1 mg)
- 5.2 Destillatieopstelling (figuur 1): absorptievat kan vervangen worden door een gaswasfles
- 5.3 Spectrofotometer (660 nm)
- 5.4 Gaswasflessen
- 5.5 Algemeen glaswerk
- 5.6 Roer- verwarmingseenheid



Figuur 1: Destillatieopstelling

6 REAGENTIA EN OPLOSSINGEN

6.1 REAGENTIA

- 6.1.1 NaOH 0,5 N
- 6.1.2 Geconcentreerd H_2SO_4 ($d = 1,84 \text{ g/ml p.a.}$)
- 6.1.3 Stikstofgas, met een zuiverheid $> 99,996\%$
- 6.1.4 HCl geconcentreerd
- 6.1.5 Ammoniummetavanadaat
- 6.1.6 Zinkpoeder
- 6.1.7 Kwik
- 6.1.8 Zinkacetaat $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O p.a.}$
- 6.1.9 $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$
- 6.1.10 Dimethyl-p-phenyleendiaminehydrochloride $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_2 \text{ p.a.}$
- 6.1.11 Ijzer(III)ammoniumsulfaat, $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O p.a.}$

6.2 OPLOSSINGEN

- 6.2.1 Stikstofreinigingsoplossing (zuurstoffiltrerende oplossing)
 50 ml HCl conc. en 5 g ammoniummetavanadaat (kook de oplossing tot alles is opgelost). Leng aan met N_2 -uitgeblazen ultra puur water tot 500 ml.
 Weeg 15 g zinkpoeder in de wasfles (500 ml), zet juist onder water, voeg 3 druppels HCl conc toe en 4 druppels kwik.
 Giet de 500 ml vanadiumoplossing bij in de wasfles.

Opmerking 1: Stikstofreinigingsoplossing is enkel van toepassing indien de zuiverheid van het stikstofgas niet voldoet aan de vereiste specificaties

Opmerking 2: Gelijkwaardige oplossingen mogen gebruikt worden.

- 6.2.2 Zinkacetaatoplossing: 2 g zinkacetaat wordt opgelost in 100 ml ultra puur water
- 6.2.3 Natriumsulfide (stockoplossing) ± 1 g $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (afgedroogde kristallen) oplossen in N_2 -uitgeblazen water en aanlengen tot 1 liter. De lucht boven de vloeistof vervangen door stikstof (houdbaarheid min 3 maanden).
- 6.2.4 Amine-oplossing: 2 g dimethyl-p-phenyleendiaminehydrochloride wordt opgelost in 200 ml ultra puur water in een maatkolf van 1 l, vervolgens wordt voorzichtig 200 ml H_2SO_4 (1,84 g/ml) toegevoegd en na afkoelen wordt aangelengd met ultra puur water tot aan de maatstreep
- 6.2.5 Ijzeroplossing: 50 g ijzer(III)ammoniumsulfaat wordt in een maatkolf van 500 ml gebracht en er wordt 10 ml H_2SO_4 (1,84 g/ml), aan toegevoegd, de oplossing wordt aangelengd met ultra puur water tot aan de maatstreep

7 PROCEDURE

7.1 MONSTERVOORBEREIDING

De opstelling wordt gedurende 5 minuten doorborreld met stikstofgas. Vervolgens wordt 100 ml te analyseren monster in de destillatiekolf gebracht. Via een toevloeihtrechter wordt voorzichtig (druppels gewijs) 20 ml geconcentreerd zwavelzuur toegevoegd.

De destillatie wordt uitgevoerd onder constant roeren bij 90 à 95 °C gedurende minimum 30 minuten. De vrijkomende zwavelwaterstof wordt door de matige stroom stikstof uitgedreven en opgevangen in een opvangvat dat gevuld is met 50 ml NaOH 0,5M (spectrofotometrische bepaling). Na de destillatie wordt de inhoud van het opvangvat overgebracht in een maatkolf, welke 5 ml zinkacetaat (20g/l) bevat, en aangelengd met ultra puur water tot 100 ml.

Alternatief kan in het opvangvat onmiddellijk een zinkacetaatoplossing voorzien worden. De sulfiden in deze oplossing worden spectrofotometrisch bepaald.

Als absorptie vloeistof is het mogelijk om een oplossing met SAOB-buffer te voorzien om also de sulfidenbepaling uit te voeren met een ISE (ion selectieve elektrode).

7.2 SPECTROFOTOMETRISCHE BEPALING

Voorbeeld van kalibratiecurve

De kalibratie wordt opgesteld aan de hand van 6 meetwaarden gelegen in het werkgebied van 0 tot 0,80 mg/l.

De gebruikte natriumsulfideoplossing is geen primaire standaard en is onstabiel vanwege luchtoxidatie. Deze standaardoplossing moet gesteld worden via de jodometrische methode (zie 8). In maatkolven van 100 ml wordt achtereenvolgens toegevoegd:

- 10 ml zinkacetaat oplossing
- 0, 50, 100, 200, 400 en 600 μl natriumsulfide standaard (~ 140 mg/l)
- aanlengen tot ongeveer 85 ml met ultra puur water
- 10 ml amineoplossing toevoegen langs de wand van de kolf
- voorzichtig omschudden
- 0,5 ml ijzeroplossing toevoegen
- omschudden
- aanlengen tot de maatstreep met ultra puur water
- 15 minuten wachten en meten bij 660 nm

Opmerking: andere concentraties mogen gebruikt worden mits deze voldoen voor de toepassing.

Metten van onbekenden

In maatkolven van 100 ml wordt achtereenvolgens toegevoegd:

- 10 ml zinkacetaat oplossing
- x ml absorptievloeistof van het monster (aantal ml in functie van het meetbereik van de ijking)
- aanlengen tot ongeveer 85 ml met ultra puur water
- 10 ml amineoplossing toevoegen langs de wand van de kolf
- voorzichtig omschudden
- 0,5 ml ijzeroplossing toevoegen
- omschudden
- aanlengen tot de maatstreep met ultra puur water
- 15 minuten wachten en meten bij 660 nm

8 BEREKENING

Sulfide concentratie in de vloeistof

De sulfide concentratie in de absorptie vloeistof kan direct uit de kalibratiecurve worden afgeleid; rekening houdend met de verdunning.

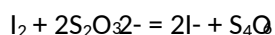
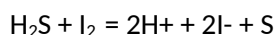
9 KWALITEITSCONTROLE

Ter controle wordt bij een reeks metingen een rendementsbepaling uitgevoerd op bv. een zinksulfide of ijzersulfide standaard, deze stoffen worden als vast product toegevoegd.

10 STANDAARDISATIE VAN DE SULFIDEOPLOSSING

Opmerking: Voor de standaardisatie van de sulfideoplossing mogen methoden gelijkwaardig met onderstaande procedure toegepast worden.

10.1 PRINCIPE: JODOMETRIE



2-

10.2 REAGENTIA

10.2.1 Zoutzuur: HCl 6M: 51 ml geconcentreerd HCl 36 % wordt aangelengd tot 100 ml met ultra puur water.

10.2.2 Standaard jodiumoplossing: 20 à 25 g KI wordt opgelost in ultra puur water. Ongeveer 3,2 g jodium wordt toegevoegd. Nadat het jodium is opgelost (m.b.v. ultrasoonbad)

wordt de oplossing aangelengd tot 1 l met ultra puur water. Deze oplossing wordt gestandaardiseerd t.o.v. een standaard thiosulfaatoplossing 0,025 M met zetmeel als indicator. De jodiumoplossing is onbeperkt houdbaar.

10.2.3 Standaard thiosulfaatoplossing ($\pm 0,025$ M): ongeveer 6,205 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ wordt opgelost in ultra puur water. 0,4 g NaOH wordt toegevoegd en de oplossing wordt aangelengd tot 1 l met ultra puur water.

10.2.4 Zetmeeloplossing: 2 g oplosbaar zetmeel en 0,2 salicylzuur worden opgelost in 100 ml kokend ultra puur water (houdbaar 6 maand). Indien er een troebeling optreedt, dient er een nieuwe oplossing aangemaakt te worden

10.3 WERKWIJZE

In een erlenmeyer van 250 ml achtereenvolgens 20,0 ml jodiumoplossing, 20,0 ml van de sulfide oplossing en 2 ml 6N HCl toevoegen.

De overmaat aan jood wordt getitreerd met een standaard thiosulfaatoplossing. Een paar druppels zetmeeloplossing toevoegen op het einde van de titratie. De kleuromslag is van blauw naar kleurloos.

10.4 BEREKENING

$$\text{mg S}^{-2} / \text{L} = \frac{([A \times B] - [C \times D]) \times \text{S.F.}}{E} \times \text{MM}_s \times \text{C.F.}$$

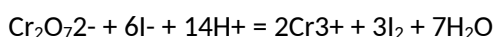
met:

- A = hoeveelheid joodoplossing (in liter)
- B = molariteit joodoplossing (in mol/l)
- C = hoeveelheid thiosulfaatoplossing (in liter)
- D = molariteit thiosulfaatoplossing (in mol/l)
- E = hoeveelheid staal (in liter)
- S.F.(stoechiometrische factor) = 1/2
- C.F. (correctiefactor) = 1000 (omzetting van g naar mg)
- MM_s = 32,066 g/mol

11 STANDAARDISATIE VAN EEN THIOSULFAATOPLOSSING

11.1 STANDAARDISATIE

0,0200 tot 0,0400 g $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ p.a. (2 u drogen in droogstoof op 105°C en afkoelen in exsicator) wordt opgelost in 80 ml ultra puur water in een erlenmeyer. 0,2 g KI wordt al schuddend toegevoegd. Als alles opgelost is voegt men 20 ml HCl 1M toe. De erlenmeyer wordt gedurende 15 minuten in het donker gezet. Ondertussen treedt volgende reactie op:



Na deze 15 minuten wordt getitreerd met $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Op het einde van de titratie (bij lichtgele kleur) worden enkele druppels zetmeelindicator toegevoegd. De kleuromslag is van blauw naar kleurloos.

11.2 BEREKENING

$$\frac{\text{conc. S O}_3^{2-} \text{ (mol / l)}}{V \times \text{MM}} = \frac{M \times \text{S.F.}}{V \times \text{MM}}$$

met:

M = massa $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (in g)
 V = volume $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ (in l)
 MM = molaire massa $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 = 293,99 \text{ g/mol}$
 S.F. = 6

12 STANDAARDISATIE VAN EEN JODIUMOPLOSSING

Jodiumoplossingen zijn weinig stabiel en moeten gestandaardiseerd worden voor gebruik. Jodium is zeer vluchtig zelfs in een I_3^- -oplossing.

12.1 STANDAARDISATIE

10,0 ml jodiumoplossing wordt in een erlenmeyer gepipetteerd en 2 ml HCl 6M wordt toegevoegd. De oplossing wordt getitreerd met standaard $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Zetmeelindicator wordt toegevoegd als de oplossing licht geel gekleurd is. Titreer tot de blauwe kleur verdwijnt.

12.2 BEREKENING

$$\text{MI}_2 \text{ (mol / l)} = \frac{\text{MS}_2\text{O}_3^2 \times V_1}{V_2 \times \text{S.F.}}$$

met:

V_1 = volume $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ (in ml)
 V_2 = volume I_2 (in ml)
 S.F. = 2

13 REFERENTIES

- Environmental Toxicology and Chemistry, vol. 12, pp. 1441-1453, 1993
- NEN-6608: 1996 Water. Fotometrische bepaling van het sulfidegehalte
- ~~ASTM D4658-92: 1996 Standard test method for sulfide in water~~
- ISO 13358: 1997 Water quality – Determination of easily released sulfide

Methoden voor de bepaling van groepsparameters

INHOUD

1	Drinkwater	3
2	Afvalwater	5
3	Grondwater	8
4	Oppervlaktewater	11

Voor de conservering en behandeling van watermonsters wordt verwezen naar WAC/I/A/010.

1 DRINKWATER

Voor de matrix drinkwater kunnen de verschillende analysemethoden, mits toepassing van de geschikte conservering en met uitzondering van totaal fosfor, rechtstreeks op het monster worden uitgevoerd. Er dient geen voorafgaandelijk destructie/voorbehandeling te worden uitgevoerd. Een rechtstreekse bepaling van totaal fosfor in drinkwater kan uitgevoerd worden indien ICP-AES (WAC/III/B/010) of ICP-MS (ISO 17294-2) wordt toegepast. Niettegenstaande kan totaal fosfor spectrofotometrisch bepaald worden na destructie.

Oxideerbaarheid	• NBN EN ISO 8467:1995 Water quality – Determination of permanganate index (ISO 8467:1993) (WAC/III/D/022)
Totaal cyanide	• NBN EN ISO 14403-2:2012 Water quality - Determination of total cyanide and free cyanide using flow analysis (FIA and CFA) – Part 2: Method using continuous flow analysis (CFA) (ISO 14403-2:2012) (WAC/III/D/036)
TOC/DOC	• NBN EN 1484:1997 Wateranalyse – Richtlijn voor het bepalen van de totale organische koolstof (TOC) en van de opgeloste organische koolstof (DOC) (WAC/III/D/050) • ISO 8245:1999 Water quality - Guidelines for the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC) (WAC/III/D/050) • NBN EN ISO 20236:2024 Water quality - Determination of total organic carbon (TOC), dissolved organic carbon (DOC), total bound nitrogen (TNb) and dissolved bound nitrogen (DNb) after high temperature catalytic oxidative combustion (ISO 20236:2024) (WAC/III/D/050)
Fosfor (a)	• NBN EN ISO 11885:2009 Water quality — Determination of selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) (ISO 11885:2007) (WAC/III/B/010) • NBN EN ISO 17294-1:2024 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 1: General guidelines (ISO 17294-1:2024) • NBN EN ISO 17294-2:2023 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 2: Determination of 62 elements (ISO 17294-2:2023) (WAC/III/B/011) • NBN EN ISO 6878:2004 Water quality – Determination of phosphorus – Ammonium molybdate spectrometric method (ISO 6878: 2004) • NBN EN ISO 15681-1:2005 Water quality – Determination of orthophosphate and total phosphorus contents by flow analysis (FIA and CFA) – Part 1: Method by flow injection analysis (FIA) (ISO 15681-1: 2003) • NBN EN ISO 15681-2:2019 Water quality – Determination of orthophosphate and total phosphorus contents by flow analysis (FIA and CFA) – Part 2: Method by continuous flow analysis (CFA) (ISO 15681-2:2018) (WAC/III/C/010) • NBN EN ISO 10304-1:2009 Water quality - Determination of

dissolved anions by liquid chromatography of ions - Part 1:
Determination of bromide, chloride, fluoride, nitrate, nitrite,
phosphate and sulfate (ISO 10304-1:2007) (WAC/III/C/001)

- NBN EN ISO 15923-1:2024 Water quality – Determination of selected parameters by discrete analysis systems - Part 1: Ammonium, nitrate, nitrite, chloride, orthophosphate, sulfate and silicate with photometric detection (ISO 15923-1:2013) (WAC/III/C/002)
-

(a) De in het besluit van de Vlaamse Regering van *20 januari 2023 over de kwaliteit, kwantiteit en levering van water bestemd voor menselijke consumptie* ~~13 december 2002 houdende reglementering inzake de kwaliteit en levering van water, bestemd voor menselijke consumptie~~ gedefinieerde parameter fosfor dient geïnterpreteerd te worden als totaal ortho-fosfaat.

2 AFVALWATER

De volgende analysemethoden kunnen gebruikt worden voor het bepalen van groepsparameters in afvalwater:

Bezinkbare stoffen	NBN T 91-101: 1974 Wateronderzoek - Bepaling van de bezinkbare stoffen (WAC/III/D/001)
Zwevende stoffen	- NBN EN 872:2005 Water quality - Determination of suspended solids - Method by filtration through glass fibre filters (WAC/III/D/002) - ISO 11923:1997 Water quality - Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters (WAC/III/D/002)
Afmeting zwevende stoffen	WAC/III/D/003 Bepaling afmeting zwevende stoffen
BZV	- NBN EN ISO 5815-1:2019 Water quality - Determination of biochemical oxygen demand after n days (BOD_n) - Part 1: Dilution and seeding method with allylthiourea addition (ISO 5815-1:2019) (WAC/III/D/010) - ISO 5815-2:2003 Water quality - Determination of biochemical oxygen demand after n days (BOD_n) - Part 1: Method for undiluted samples(c, d) - NBN EN 1899-2:1998 Water quality - Determination of biochemical oxygen demand after n days (BOD_n) - Part 2: Method for undiluted samples (ISO 5815:1989, modified) (c, d)
CZV	WAC/III/D/020 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik (COD)
Kjeldahl-N (e)	- NBN EN 25663:1994 Water quality - Determination of Kjeldahl nitrogen - Method after mineralization with selenium (ISO 5663:1984) (WAC/III/D/030) - Verschil van totaal N en (nitraat + nitriet)
Totaal stikstof (e)	- NBN EN ISO 11905-1:1998 Water quality - Determination of nitrogen - Part 1: Method using oxidative digestion with peroxodisulfate (ISO 11905-1:1997) (WAC/III/D/032) (a) - ISO 29441:2010 Water quality - Determination of total nitrogen after UV digestion - Method using flow analysis (CFA and FIA) and spectrometric detection (a) - NBN EN ISO 20236:2024 Water quality - Determination of total organic carbon (TOC), dissolved organic carbon (DOC), total bound nitrogen (TNb) and dissolved bound nitrogen (DNb) after high temperature catalytic oxidative combustion (ISO 20236:2024) (a) (WAC/III/D/033) - Som van kjeldahl-N en nitriet en nitraat
TON	NBN EN ISO 13395:1996 Water quality - Determination of nitrite nitrogen and nitrate nitrogen and the sum of both by flow analyses (CFA en FIA) and spectrometric detection (ISO 13395:1996) (WAC/III/D/031)
Totaal cyanide	NBN EN ISO 14403-2:2012 Water quality - Determination of total cyanide and free cyanide using flow analysis (FIA and CFA) - Part 2:

	Method using continuous flow analysis (CFA) (ISO 14403-2: 2012) (WAC/III/D/036)
MBAS	• NBN EN ISO 16265:2012 Water quality - Determination of the methylene blue active substances (MBAS) index - Method using continuous flow analysis (CFA) (ISO 16265:2009)
TOC/DOC	• NBN EN 1484:1997 Wateranalyse – Richtlijn voor het bepalen van de totale organische koolstof (TOC) en van de opgeloste organische koolstof (DOC) (WAC/III/D/050) • ISO 8245:1999 Water quality - Guidelines for the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC) (WAC/III/D/050) • NBN EN ISO 20236:2024 Water quality - Determination of total organic carbon (TOC), dissolved organic carbon (DOC), total bound nitrogen (TNb) and dissolved bound nitrogen (DNb) after high temperature catalytic oxidative combustion (ISO 20236:2024) (WAC/III/D/050)
Fosfor (b)	• NBN EN ISO 11885:2009 Water quality — Determination of selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) (ISO 11885:2007) (WAC/III/B/010) • NBN EN ISO 17294-1:2024 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 1: General guidelines (ISO 17294-1:2024) • NBN EN ISO 17294-2:2023 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 2: Determination of 62 elements (ISO 17294-2:2023) (WAC/III/B/011) • NBN EN ISO 6878:2004 Water quality – Determination of phosphorus – Ammonium molybdate spectrometric method (ISO 6878: 2004) • NBN EN ISO 15681-1:2005 Water quality – Determination of orthophosphate and total phosphorus contents by flow analysis (FIA and CFA) – Part 1: Method by flow injection analysis (FIA) (ISO 15681-1:2003) • NBN EN ISO 15681-2: 2019 Water quality – Determination of orthophosphate and total phosphorus contents by flow analysis (FIA and CFA) – Part 2: Method by continuous flow analysis (CFA) (ISO 15681-2: 2018) (WAC/III/C/010)

- (a) Hoge concentraties aan organische substanties kunnen resulteren in een onderschatting van de stikstof concentratie omdat de oxidatiecapaciteit ontoereikend is.
- (b) Voor de bepaling van fosfor in afvalwaters wordt de ICP-AES of de ICP-MS techniek aanbevolen. Deze worden uitgevoerd na zuurontsluiting volgens WAC/III/B/001 en WAC/III/B/002.
- Spectrofotometrische methoden worden hier niet aanbevolen. Toepassing van de spectrofotometrische methode na H_2SO_4 destructie conform ISO 6878 kan bij (textiel)afvalwaters leiden tot een onderschatting van de werkelijke waarde.
- (c) Om vergelijkbaarheid van data tussen de laboratoria te verbeteren, wordt voor zowel de verdunde als de onverdunde methode een commercieel entmiddel toegevoegd en nitrificatie inhibitor.
- (d) Na incubatie moet de resterende opgeloste zuurstofconcentratie ten minste 2 mg/l bedragen. Het zuurstofverbruik moet ten minste de bepalingsgrens van de BZV-meting zijn.

- (e) Op het analyseverslag moet duidelijk aangegeven worden (1) welke parameter berekend werd (bv. Kjeldahl-N), (2) welke de analyseresultaten zijn van de parameters die gebruikt werden voor de berekening (bv. Totaal N, TON), (3) opmerking indien de berekende meetonzekerheid bij een verschilmeting > 30% (meetonzekerheid opgenomen in VLAREM II Bijlage 4.2.5.2).

Bij berekening van som of verschil, worden volgende richtlijnen gevolgd:

- a. Indien 1 van de parameters < rapportagegrens, wordt de lower bound benadering toegepast (i.e. meetwaarde = 0). (voorbeeld: Kj-N = 5 mg N/l, TON < 0.1 mg N/l, resultaat: totaal N = 5.0 mg N/l)
- b. Indien beide parameters < rapportagegrens, wordt steeds de hoogste rapportagegrens gebruikt (voorbeeld 1: Totaal N < 1 mg N/l, TON < 0.1 mg N/l, resultaat: Kj-N < 1 mg N/l; voorbeeld 2: Kj-N < 1 mg N/l, TON < 0.1 mg N/l, resultaat: Totaal N < 1 mg N/l)

3 GRONDWATER

De volgende analysemethoden kunnen gebruikt worden voor het bepalen van groepsparameters in grondwater:

Bezinkbare stoffen	• NBN T 91-101:1974 Wateronderzoek - Bepaling van de bezinkbare stoffen (WAC/III/D/001)
Zwevende stoffen	• NBN EN 872:2005 Water quality - Determination of suspended solids - Method by filtration through glass fibre filters (WAC/III/D/002) • ISO 11923:1997 Water quality - Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters (WAC/III/D/002)
BZV (f)	• NBN EN ISO 5815-1:2019 Water quality - Determination of biochemical oxygen demand after n days (BOD$_n$) - Part 1: Dilution and seeding method with allylthiourea addition (ISO 5815-1:2019) (WAC/III/D/010) • ISO 5815-2:2003 Water quality - Determination of biochemical oxygen demand after n days (BOD$_n$) - Part 1: Method for undiluted samples (e, g) • NBN EN 1899-2:1998 Water quality - Determination of biochemical oxygen demand after n days (BOD$_n$) - Part 2: Method for undiluted samples (ISO 5815:1989, modified) (e, g)
CZV	• WAC/III/D/020 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik (COD)
Oxideerbaarheid	• NBN EN ISO 8467:1995 Water quality - Determination of permanganate index (ISO 8467:1993) (WAC/III/D/022)
Kjeldahl-N (h)	• NBN EN 25663:1994 Water quality - Determination of Kjeldahl nitrogen - Method after mineralization with selenium (ISO 5663:1984) (WAC/III/D/030) (a) • NEN 6645:2005 Water - Monstervoorbehandeling voor de fotometrische bepaling van de som van de gehalten aan ammoniumstikstof en aan organisch gebonden stikstof en van het totale gehalte aan fosforverbindingen met een doorstroomanalysesysteem - Ontsluiting met zwavelzuur en kaliumsulfaat. (b) • Verschil van totaal N en (nitraat + nitriet)
Totaal stikstof (h)	• NBN EN ISO 11905-1:1998 Water quality - Determination of nitrogen - Part 1: Method using oxidative digestion with peroxodisulfate (ISO 11905-1:1997) (WAC/III/D/032) (d) • ISO 29441:2010 Water quality - Determination of total nitrogen after UV digestion - Method using flow analysis (CFA and FIA) and spectrometric detection (d) • NBN EN ISO 20236:2024 Water quality - Determination of total organic carbon (TOC), dissolved organic carbon (DOC), total bound nitrogen (TNb) and dissolved bound nitrogen (DNb) after high temperature catalytic oxidative combustion (ISO 20236:2024) (d) (WAC/III/D/033) • Som van kjeldahl-N en nitriet en nitraat
TON	• NBN EN ISO 13395:1996 Water quality - Determination of nitrite

	nitrogen and nitrate nitrogen and the sum of both by flow analyses (CFA en FIA) and spectrometric detection (ISO 13395:1996) (WAC/III/D/031)
Totaal cyanide	• NBN EN ISO 14403-2:2012 Water quality - Determination of total cyanide and free cyanide using flow analysis (FIA and CFA) – Part 2: Method using continuous flow analysis (CFA) (ISO 14403-2: 2012) (WAC/III/D/036)
TOC/DOC	• NBN EN 1484:1997 Wateranalyse – Richtlijn voor het bepalen van de totale organische koolstof (TOC) en van de opgeloste organische koolstof (DOC) (WAC/III/D/050) • ISO 8245:1999 Water quality - Guidelines for the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC) (WAC/III/D/050) • NBN EN ISO 20236:2024 Water quality - Determination of total organic carbon (TOC), dissolved organic carbon (DOC), total bound nitrogen (TNb) and dissolved bound nitrogen (DNb) after high temperature catalytic oxidative combustion (ISO 20236:2024) (WAC/III/D/050)
Fenolindex	• WAC/IV/B/001 Fotometrische bepaling van de fenolindex
Fosfor (c)	• NBN EN ISO 11885:2009 Water quality — Determination of selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) (ISO 11885:2007) (WAC/III/B/010) • NBN EN ISO 17294-1:2024 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 1: General guidelines (ISO 17294-1:2024) • NBN EN ISO 17294-2:2023 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 2: Determination of 62 elements (ISO 17294-2:2023) (WAC/III/B/011) • NBN EN ISO 6878: 2004 Water quality – Determination of phosphorus – Ammonium molybdate spectrometric method (ISO 6878: 2004) • NBN EN ISO 15681-1:2005 Water quality – Determination of orthophosphate and total phosphorus contents by flow analysis (FIA and CFA) – Part 1: Method by flow injection analysis (FIA) (ISO 15681-1: 2003) • NBN EN ISO 15681-2:2019 Water quality – Determination of orthophosphate and total phosphorus contents by flow analysis (FIA and CFA) – Part 2: Method by continuous flow analysis (CFA) (ISO 15681-2:2018) (WAC/III/C/010) • NEN 6645:2005 Water - Monstervoorbehandeling voor de fotometrische bepaling van de som van de gehalten aan ammoniumstikstof en aan organisch gebonden stikstof en van het totale gehalte aan fosforverbindingen met een doorstroomanalysesysteem - Ontsluiting met zwavelzuur en kaliumsulfaat.

- (a) Bij de bepaling van Kjeldahl-N wordt in ISO 5663 een aantoonbaarheidsgrens van 1 mg/l gehanteerd.
- (b) Bij toepassing van NEN 6645 kunnen lagere bepalingsrendementen bekomen worden voor de bepaling van ammoniumstikstof en organisch gebonden stikstof vergeleken met de resultaten verkregen volgens ISO 5663.

- (c) Bij de bepaling van totaal fosfor met ICP-AES kan de aantoonbaarheidseis analytisch een probleem opleveren.
- (d) Hoge concentraties aan organische substanties kunnen resulteren in een onderschatting van de stikstof concentratie omdat de oxidatiecapaciteit ontoereikend is.
- (e) Om vergelijkbaarheid van data tussen de laboratoria te verbeteren, wordt voor zowel de verdunde als de onverdunde methode een commercieel entmiddel toegevoegd en nitrificatie inhibitor.
- (f) Monsters met een BZV gehalte $< 6 \text{ mg O}_2/\text{l}$ worden geanalyseerd met de onverdunde methode.
- (g) Na incubatie moet de resterende opgeloste zuurstofconcentratie ten minste 2 mg/l bedragen. Het zuurstofverbruik moet ten minste de bepalingsgrens van de BZV-meting zijn.
- (h) Op het analyseverslag moet duidelijk aangegeven worden (1) welke parameter berekend werd (bv. Kjeldahl-N), (2) welke de analyseresultaten zijn van de parameters die gebruikt werden voor de berekening (bv. Totaal N, TON), (3) opmerking indien de berekende meetonzekerheid bij een verschilmeting $> 30\%$. Bij berekening van som of verschil, worden volgende richtlijnen gevolgd:
 - a. Indien 1 van de parameters $<$ rapportagegrens, wordt de lower bound benadering toegepast (i.e. meetwaarde = 0). (voorbeeld: Kj-N = 5 mg N/l , TON $< 0.1 \text{ mg N/l}$, resultaat: totaal N = 5.0 mg N/l)
 - b. Indien beide parameters $<$ rapportagegrens, wordt steeds de hoogste rapportagegrens gebruikt (voorbeeld 1: Totaal N $< 1 \text{ mg N/l}$, TON $< 0.1 \text{ mg N/l}$, resultaat: Kj-N $< 1 \text{ mg N/l}$; voorbeeld 2: Kj-N $< 1 \text{ mg N/l}$, TON $< 0.1 \text{ mg N/l}$, resultaat: Totaal N $< 1 \text{ mg N/l}$)

4 OPPERVLAKTEWATER

De volgende analysemethoden kunnen gebruikt worden voor het bepalen van groepsparameters in oppervlaktewater:

Bezinkbare stoffen	NBN T 91-101:1974 Wateronderzoek - Bepaling van de bezinkbare stoffen (WAC/III/D/001)
Zwevende stoffen	- NBN EN 872:2005 Waterkwaliteit - Bepaling van vaste stoffen in suspensie – Methode door filtratie op glasvezelfilter (WAC/III/D/002) - ISO 11923:1997 Water quality - Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters (WAC/III/D/002)
BZV (e)	- NBN EN ISO 5815-1:2019 Water quality - Determination of biochemical oxygen demand after n days (BOD_n) - Part 1: Dilution and seeding method with allylthiourea addition (ISO 5815-1:2019) (WAC/III/D/010) - ISO 5815-2:2003 Water quality – Determination of biochemical oxygen demand after n days (BOD_n) – Part 1: Method for undiluted samples (d, f) - NBN EN 1899-2:1998 Water quality - Determination of biochemical oxygen demand after n days (BOD_n) - Part 2: Method for undiluted samples (ISO 5815:1989, modified) (d, f)
CZV	WAC/III/D/020 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik (COD)
Oxideerbaarheid	NBN EN ISO 8467:1995 Water quality – Determination of permanganate index (ISO 8467:1993) (WAC/III/D/022)
Kjeldahl-N (g)	- NBN EN 25663:1994 Water quality – Determination of Kjeldahl nitrogen – Method after mineralization with selenium (ISO 5663:1984) (WAC/III/D/030) (WAC/III/D/030) (a) - NEN 6645:2005 Water - Monstervoorbehandeling voor de fotometrische bepaling van de som van de gehalten aan ammoniumstikstof en aan organisch gebonden stikstof en van het totale gehalte aan fosforverbindingen met een doorstroomanalysestelsel - Ontsluiting met zwavelzuur en kaliumsulfaat. (b) - Verschil van totaal N en (nitraat + nitriet)
Totaal stikstof (g)	- NBN EN ISO 11905-1:1998 Water quality – Determination of nitrogen – Part 1: Method using oxidative digestion with peroxodisulfate (ISO 11905-1:1997) (WAC/III/D/032) (c) - ISO 29441:2010 Water quality – Determination of total nitrogen after UV digestion – Method using flow analysis (CFA and FIA) and spectrometric detection (c) - NBN EN ISO 20236:2024 Water quality - Determination of total organic carbon (TOC), dissolved organic carbon (DOC), total bound nitrogen (TNb) and dissolved bound nitrogen (DNb) after high temperature catalytic oxidative combustion (ISO 20236: 2024) (c) (WAC/III/D/033) - Som van kjeldahl-N en nitriet en nitraat
TON	NBN EN ISO 13395:1996 Water quality – Determination of nitrite

	nitrogen and nitrate nitrogen and the sum of both by flow analyses (CFA en FIA) and spectrometric detection (ISO 13395:1996) (WAC/III/D/031)
Totaal cyanide	• NBN EN ISO 14403-2:2012 Water quality - Determination of total cyanide and free cyanide using flow analysis (FIA and CFA) – Part 2: Method using continuous flow analysis (CFA) (ISO 14403-2: 2012) (WAC/III/D/036)
MBAS	• NBN EN ISO 16265:2012 Water quality - Determination of the methylene blue active substances (MBAS) index - Method using continuous flow analysis (CFA) (ISO 16265:2009)
TOC/DOC	• NBN EN 1484:1997 Wateranalyse – Richtlijn voor het bepalen van de totale organische koolstof (TOC) en van de opgeloste organische koolstof (DOC) (WAC/III/D/050) • ISO 8245:1999 Water quality - Guidelines for the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC) (WAC/III/D/050) • NBN EN ISO 20236:2024 Water quality - Determination of total organic carbon (TOC), dissolved organic carbon (DOC), total bound nitrogen (TNb) and dissolved bound nitrogen (DNb) after high temperature catalytic oxidative combustion (ISO 20236:2024) (WAC/III/D/050)
Fenolindex	• WAC/IV/B/001 Fotometrische bepaling van de fenolindex
	• NBN EN ISO 11885:2009 Water quality — Determination of selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) (ISO 11885:2007) (WAC/III/B/010) • NBN EN ISO 17294-1:2024 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 1: General guidelines (ISO 17294-1:2024) • NBN EN ISO 17294-2:2023 Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – Part 2: Determination of 62 elements (ISO 17294-2:2023) (WAC/III/B/011) • NBN EN ISO 6878:2004 Water quality – Determination of phosphorus – Ammonium molybdate spectrometric method (ISO 6878: 2004)
Fosfor	• NBN EN ISO 15681-1:2005 Water quality – Determination of orthophosphate and total phosphorus contents by flow analysis (FIA and CFA) – Part 1: Method by flow injection analysis (FIA) (ISO 15681-1: 2003) • NBN EN ISO 15681-2:2019 Water quality – Determination of orthophosphate and total phosphorus contents by flow analysis (FIA and CFA) – Part 2: Method by continuous flow analysis (CFA) (ISO 15681-2:2018) (WAC/III/C/010) • NEN 6645:2005 Water - Monstervoorbehandeling voor de fotometrische bepaling van de som van de gehalten aan ammoniumstikstof en aan organisch gebonden stikstof en van het totale gehalte aan fosforverbindingen met een doorstroomanalysesysteem - Ontsluiting met zwavelzuur en kaliumsulfaat.

(a) Bij de bepaling van Kjeldahl-N wordt in ISO 5663 een aantoonbaarheidsgrens van 1 mg/l gehanteerd.

- (b) Bij toepassing van NEN 6645 kunnen lagere bepalingrendementen bekomen worden voor de bepaling van ammoniumstikstof en organisch gebonden stikstof vergeleken met de resultaten verkregen volgens ISO 5663.
- (c) Hoge concentraties aan organische substanties kunnen resulteren in een onderschatting van de stikstof concentratie omdat de oxidatiecapaciteit ontoereikend is.
- (d) Om vergelijkbaarheid van data tussen de laboratoria te verbeteren, wordt voor zowel de verdunde als de onverdunde methode een commercieel entmiddel toegevoegd en nitrificatie inhibitor.
- (e) Monsters met een BZV gehalte < 6 mg O₂/l worden geanalyseerd met de onverdunde methode.
- (f) Na incubatie moet de resterende opgeloste zuurstofconcentratie ten minste 2 mg/l bedragen. Het zuurstofverbruik moet ten minste de bepalingsgrens van de BZV-meting zijn.
- (g) Op het analyseverslag moet duidelijk aangegeven worden (1) welke parameter berekend werd (bv. Kjeldahl-N), (2) welke de analyseresultaten zijn van de parameters die gebruikt werden voor de berekening (bv. Totaal N, TON), (3) opmerking indien de berekende meetonzekerheid bij een verschilmeting > 30%. Bij berekening van som of verschil, worden volgende richtlijnen gevolgd:
 - a. Indien 1 van de parameters < rapportagegrens, wordt de lower bound benadering toegepast (i.e. meetwaarde = 0). (voorbeeld: Kj-N = 5 mg N/l, TON < 0.1 mg N/l, resultaat: totaal N = 5.0 mg N/l)
 - b. Indien beide parameters < rapportagegrens, wordt steeds de hoogste rapportagegrens gebruikt (voorbeeld 1: Totaal N < 1 mg N/l, TON < 0.1 mg N/l, resultaat: Kj-N < 1 mg N/l; voorbeeld 2: Kj-N < 1 mg N/l, TON < 0.1 mg N/l, resultaat: Totaal N < 1 mg N/l)

Bepaling van het biochemisch zuurstofverbruik (BZV) na 5 dagen

1 TOEPASSINGSGEBIED

Deze methode beschrijft de bepaling van het biochemisch zuurstofverbruik (BZV) van water door verdunning en enting met onderdrukking van nitrificatie.

De methode is toepasbaar op alle soorten water met een BZV groter dan 3 mg/l en kleiner dan 6000 mg/l.

De procedure zoals beschreven in ISO 5815-1:2019 is van toepassing mits volgende aanpassingen:

ISO 5815-1 beschrijft de bepaling van BZV na 5 en 7 dagen. Enkel de incubatietijd van 5 dagen wordt weerhouden.

2 REAGENTIA

- § 5.2 van ISO 5815-1: Als entwater wordt omwille van vergelijkbaarheid enkel e) *commercieel beschikbaar entmateriaal* weerhouden. Voor intern gebruik kunnen andere enten worden toegevoegd mits vermelding op het analyseverslag.
- § 5.9: Andere concentraties van de controle oplossing kunnen gebruikt worden.

3 APPARATUUR

- §6.4 van ISO 5815-1: Temperatuurkast, - kamer of incubator, in staat om een temperatuur van $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ te behouden en in het donker.

Opmerking: Bij de temperatuursopvolging mag de temperatuursonde geplaatst worden in een recipiënt met bijv. water.

- § 6.5: Voor de bepaling van het zuurstofgehalte wordt verwezen naar WAC/III/A/008.
- § 6.6: Richtlijnen voor de conservering en behandeling van watermonsters worden gegeven in WAC/I/A/010.

4 MONSTERBEWARING

Richtlijnen voor de conservering en behandeling van watermonsters worden gegeven in WAC/I/A/010.

5 INTERFERENTIES

- §8.4 Interferenties van peroxiden: bij vermoeden van aanwezigheid van peroxiden (bijv. hoge CZV/BZV-ratio, afwijkende lineariteit tussen het zuurstofverbruik en het monstervolume) wordt dit als afwijking in het analyseverslag vermeld. Bij voorkeur wordt ook de aanwezigheid van peroxiden getest en bevestigd met een peroxide teststrip/testkit.

6 PROCEDURE

6.1 STANDAARD INCUBATIEPROCEDURE

- § 9.2 van ISO 5815-1 Indien de temperatuur van het monster na verdunnen (20 ± 2) °C is, moet men niet eerst voorafgaandelijk het monster als geheel tot (20 ± 2) °C brengen.
- § 9.2 + §9.4 (aantal verdunningen): Voor een gekend monster met minimale schommelingen in BOD concentratie, dienen minstens 3 verdunningen ingezet te worden. Voor onbekende monsters worden minstens 5 verdunningen ingezet.
- § 9.6 Voor de bepaling van het zuurstofgehalte wordt verwezen naar WAC/III/A/008, waarbij enkel de controle van de 100 % verzadiging (dagelijks) van toepassing is.
- § 9.6 Als incubatietijd wordt 5 dagen $\pm$ 6 uur weerhouden.
- § 9.7 Andere concentraties van de controle oplossing kunnen gebruikt worden.
- § 10.1 Het minimaal zuurstofverbruik in de laagst mogelijke verdunning bedraagt 2 mg O₂/l.
- § 10.3
 - Andere concentraties van de glutamine-glucose zuur controle oplossing kunnen gebruikt worden.
 - Het minimaal zuurstofverbruik in de laagst mogelijke verdunning bedraagt 2 mg O₂/l.
- §11 Rapportering volgens afspraken in WAC/VI/A/004 met, indien van toepassing, volgende vermeldingen op het rapport:
 - Meting van BOD₅ of BOD₂₊₅
 - Melding van aanwezige interferenten
 - Melding indien het monster werd ingevroren

6.2 ALTERNATIEVE INCUBATIEPROCEDURE (ANNEX A VAN ISO 5815-1)

De standaard BZV procedure omvat een incubatie van 5 dagen bij 20 °C. Door incubatie van het monster gedurende maximaal 2 dagen bij (0 - 4) °C gevolgd door een incubatie gedurende 5 dagen bij 20 °C, wordt een BZV₂₊₅ resultaat bekomen.

Voor het bepalen van BZV₂₊₅ wordt de standaard incubatieprocedure gevolgd mits volgende wijziging:

- Plaats de flessen met de verdunde test oplossingen gedurende maximaal 2 dagen $\pm$ 2 uur in het donker bij (0 - 4) °C, en plaats deze vervolgens in de incubator in het donker bij een temperatuur van de verdunningen geëquilibreerd bij (20 ± 1) °C voor 5 dagen $\pm$ 6 uur.
- Tijdstip t_0 wordt bepaald bij (20 ± 1)°C na aanmaak van de verdunningen en vóór bewaring bij (0 - 4)°C.

7 REFERENTIES

- NBN EN ISO 5815-1: 2019 Water Quality – Determination of biochemical oxygen demand after n days (BOD_n) – Part 1: Dilution and seeding method with allylthiourea addition (ISO 5815-1:2019).
- ISO 9408:1999 Water quality – Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium by determination of oxygen demand in a closed respirometer.

Bepaling van de totale gebonden stikstof (TNb) en opgeloste gebonden stikstof (DNb) na katalytische oxidatieve verbranding bij hoge temperatuur

1 TOEPASSINGSGEBIED

Deze methode beschrijft de bepaling van de totale gebonden stikstof (TNb) en opgeloste gebonden stikstof (DNb) onder de vorm van vrije ammonium, ammonium, nitriet, nitraat en organische stikstofverbindingen die door de beschreven oxidatie kunnen omzetten naar stikstofoxiden.

De methode is geschikt voor de analyse van watermonsters (bijv. drinkwater, grondwater, oppervlaktewater, zeewater of afvalwater, eluaat, effluent).

De methode maakt een bepaling mogelijk van TNb en DNb ≥ 1 mg/l. Het bovenste werkbereik wordt beperkt door instrumentafhankelijke omstandigheden (bijv. injectievolume). Hogere concentraties kunnen worden bepaald na geschikte verdunning van het monster.

Opmerking: Voor de bepaling van totaal stikstof in oppervlaktewater wordt een ondergrens van 0.5 mg/l gebruikt.

De procedure zoals beschreven in NBN EN ISO 20236:2024 is van toepassing mits volgende aanvullingen.

2 NBN EN ISO 20236:2024

- §6 Reagentia: Andere reagentia en concentraties mogen gebruikt worden mits deze voldoen voor deze toepassing.
- §8.1 System check: nicotinamide of nicotinezuur kunnen als controlestandaard worden gebruikt of als alternatief afzonderlijke meting van ammonium en nitraat, met berekening van de responsfactor (zie §10.3).
- §8.2 Particle processing control: niet van toepassing
- §9 Sample preparation:
 - Voor de conservering en behandeling van watermonsters wordt verwezen naar WAC/I/A/010.
 - Bij aanwezigheid van deeltjes moet het monster worden gehomogeniseerd (gemixt). Filtratie over 0.45 μm filter is niet toegestaan.
- §10.2 Calibration: Het meetgebied mag worden opgesteld i.f.v. de eigen methode. De kalibratie oplossingen dienen minimaal te bestaan uit een mix van ammonium en nitraat, en de zuurmatrix moet identiek zijn aan deze van de te analyseren monsters (matrix matching).
- §10.3 Validity check:
 - De uit te voeren kwaliteitscontroles bij elke meetreeks hebben betrekking op het vaststellen van mogelijke contaminaties, de oxidatie-efficiëntie en de responsfactor. Volgende kwaliteitscontroles komen hiervoor in aanmerking:
 - Blanco bepaling
 - Optioneel: Nicotinamide of nicotinezuur controlestandaard om de efficiëntie van de oxidatie op te volgen, waarbij de toegelaten afwijking $\leq \pm 10\%$.
 - Afzonderlijke meting van ammonium en nitraat, met berekening van de responsfactor (verhouding ammonium/nitraat), waarbij de toegelaten afwijking op de theoretische

waarde van de individuele controlemonsters $\leq 10\%$ is en de responsfactor ≥ 0.9 en ≤ 1.1 bedraagt.

3 REFERENTIE

- NBN EN ISO 20236:2024 Water quality - Determination of total organic carbon (TOC), dissolved organic carbon (DOC), total bound nitrogen (TNb) and dissolved bound nitrogen (DNb) after high temperature catalytic oxidative combustion (ISO 20236:2024).

Bepaling van de totale organische koolstof (TOC) en/of de opgeloste organische koolstof (DOC)

1 DOEL EN TOEPASSINGSGEBIED

Totaal organische koolstof (TOC) is een maat voor het koolstofgehalte van het in het water aanwezige opgeloste en onopgeloste organische materiaal. Het geeft geen informatie over de aard van de organische substantie.

De methode is geschikt voor de analyse van watermonsters (bijv. drinkwater, grondwater, oppervlaktewater, zeewater of afvalwater, eluaat, effluent).

De bepaling van de totale organische koolstof (TOC) en/of de opgeloste organische koolstof (DOC), is beschreven in NBN EN ISO 20236:2024 enerzijds en in NBN EN 1484 / ISO 8245 anderzijds.

De methode beschreven in NBN EN ISO 20236:2024 maakt een bepaling mogelijk van TOC en DOC ≥ 1 mg/l. Het bovenste werkbereik wordt beperkt door instrumentafhankelijke omstandigheden (bijv. injectievolume). Hogere concentraties kunnen worden bepaald na geschikte verdunning van het monster. **De bepaling van concentraties <1 mg/l is afhankelijk van de instrument condities en het toepassen van een geschikte kalibratie.**

2 NBN EN ISO 20236:2024

De procedure zoals beschreven in NBN EN ISO 20236:2024 is van toepassing mits volgende aanvullingen.

- §6 Reagentia: Andere reagentia en concentraties mogen gebruikt worden mits deze voldoen voor deze toepassing.
- §8.2 Particle processing control: zie §4 Kwaliteitscontrole in deze WAC procedure
- §9 Sample preparation:
 - Voor de conservering en behandeling van watermonsters wordt verwezen naar WAC/I/A/010.
 - Bij aanwezigheid van deeltjes moet het monster worden gehomogeniseerd (gemixt). Filtratie over 0.45 μ m filter is niet toegestaan.
- §10.2 Calibration: Het meetgebied mag worden opgesteld i.f.v. de eigen methode.
- §10.3 Validity check: zie §4 Kwaliteitscontrole in deze WAC procedure

3 NBN EN 1484 / ISO 8245

De procedure zoals beschreven in NBN EN 1484/ISO 8245 is van toepassing mits volgende aanvullingen.

- Reagentia: Andere reagentia en concentraties mogen gebruikt worden mits deze voldoen voor deze toepassing.
- Monstervoorbehandeling:
 - Voor de conservering en behandeling van watermonsters wordt verwezen naar WAC/I/A/010.
 - Bij aanwezigheid van deeltjes moet voor de bepaling van het TOC gehalte het monster worden gehomogeniseerd (gemixt).
- Kalibratie: Het meetgebied mag worden opgesteld i.f.v. de eigen methode.

- **Kwaliteitscontrole:** zie §4

4 KWALITEITSCONTROLE

Volgende kwaliteitscontroles moeten uitgevoerd worden:

- Blanco bepaling
- Per meetreeks wordt steeds een onafhankelijke controlestandaard(en) geanalyseerd bestaande uit een organische koolstofverbinding en een anorganische koolstofverbinding.
- Particle processing control: Deze controle is van toepassing bij de bepaling van TOC in oppervlakte- en afvalwater **en de concentratie mag gekozen worden in functie van het meetgebied**. Voor de bepaling van DOC is dit niet van toepassing.
Er moeten minimaal drie onafhankelijke herhalingsmetingen van de cellulose testoplossing worden uitgevoerd. De gemiddelde waarde van een drievoudige meting mag niet meer dan $\pm 20\%$ afwijken van de theoretische waarde. De herhaalbaarheidsvariatiecoëfficiënt moet $\leq 10\%$ zijn.

5 RAPPORTERING

Voor de bepaling van de parameter TOC wordt de NPOC methode toegepast op het niet gefiltreerde monster. Bij aanwezigheid van deeltjes moet het monster worden gehomogeniseerd (gemixt). De parameter wordt als TOC gerapporteerd.

Voor de bepaling van de parameter DOC wordt de NPOC methode toegepast, na filtratie van het monster over een $0.45 \mu\text{m}$ filter. De parameter wordt als DOC gerapporteerd.

6 REFERENTIES

- NBN EN ISO 20236:**2024** Water quality - Determination of total organic carbon (TOC), dissolved organic carbon (DOC), total bound nitrogen (TNb) and dissolved bound nitrogen (DNb) after high temperature catalytic oxidative combustion (ISO 20236:**2024**).
- NBN EN 1484:1997 Wateranalyse – Richtlijn voor het bepalen van de totale organische koolstof (TOC) en van de opgeloste organische koolstof (DOC)
- ISO 8245:1999 Water quality - Guidelines for the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC)

Specifieke bepaling van niet-ionogene surfactanten in water met LC-am-MS

INHOUD

1	Doel en toepassingsgebied	3
2	Principe	3
3	Materiaal	3
4	Reagentia en standaarden	4
5	Monsterbewaring	5
6	Voorbehandeling	5
7	LC-MS Meting	5
7.1	LC-condities	5
7.2	MS-condities	6
7.3	Identificatie en integratie	8
7.4	Kalibratie en kwantificatie	8
7.5	Gehalte van de surfactanten in het watermonster	9
8	Kwaliteitscontrole	10
8.1	Responslineariteit	10
8.2	Instrumentele detectielimieten	10
8.3	Controle op de kalibratie	11
8.4	Procedureblanco	11
8.5	QC-monster	11
8.6	Duplobepaling	11
8.7	Matrixadditie (controlestaal)	12
8.8	Chromatografische scheiding	12
9	Veiligheid	12
BIJLAGE 1: Voorbeeld van kalibratiereeks voor niet-ionogene surfactanten		13
BIJLAGE 2: Chromatogram en massaspectrum voor nonylfenoethoxylaet		14
BIJLAGE 3: Chromatogram en massaspectrum voor cocamide MEA		15
BIJLAGE 4: Samenstelling QC-referentiestockoplossing onafhankelijke standaard (voorbeeld)		16

1 DOEL EN TOEPASSINGSGEBIED

Deze procedure **vervangt de procedure van juni 2022** en beschrijft een methode voor de extractie, zuivering en analyse van de meest voorkomende niet-ionogene surfactanten, met name:

- alcoholethoxylaten (AEO)
- alkylfenoethoxylaten (APEO)
- alkanolamides

De methode is toepasbaar op drink-, grond-, oppervlakte- en afvalwater. ~~vanaf een concentratie van 10 µg/l.~~

Opmerkingen:

- de meest voorkomende AEO zijn ~~C10 tot C16~~ C10, C11, C12, C13, C14, C16 en C18 alcoholen met 0 tot 9 ethyleenoxide-eenheden; een AEO is steeds een mengsel van polyethoxylaateverbindingen met verschillende polymerisatiegraad; een C13-EO₁₂ bv. staat voor een tridecylalcoholethoxylaate (polyoxyethylene tridecyl ether, polyethylene glycol tridecyl ether) met gemiddelde polymerisatiegraad 12
- de meest voorkomende APEO zijn C8 en C9 fenolen met 1 tot 20 ethyleenoxide-eenheden; een APEO is steeds een mengsel van polyethoxylaateverbindingen met verschillende polymerisatiegraad; een C9P-EO₁₂ bv. staat voor een nonylfenoethoxylaate (polyoxyethylene nonylphenyl ether, polyethylene glycol nonylphenyl ether) met gemiddelde polymerisatiegraad 12
- de meest voorkomende alkanolamides zijn cocamide monoethanolamide (MEA) **en** diethanolamide (DEA) ~~en monoisopropanolamide (MIPA)~~; cocamide is een mengsel van verzadigde even C8 tot C18 vetzuuramides
- **onverzadigde AEO en gehydrogeneerde APEO kunnen met deze methode niet bepaald worden**
- vetzuuresterethoxylaten worden niet bepaald omwille van de snelle degradatie in water

2 PRINCIPE

Waterstalen worden verdund door toevoeging van een gelijke hoeveelheid acetonitrile. De oplossingen worden vervolgens gefiltreerd over een 0,45 µm membraanfilter ofwel gecentrifugeerd. Het filtraat wordt overgebracht naar een meetvial en geanalyseerd met vloeistofchromatografie met accurate massa massaspectrometrische detectie. Het gehalte aan niet-ionogene surfactanten wordt bepaald aan de hand van externe kalibratie.

3 MATERIAAL

- Gebruikelijk laboratoriumglaswerk
- Analytische balans met een afleesnauwkeurigheid van 0.1 mg
- Bovenweger met een afleesnauwkeurigheid van 0.01 g
- LC-MS bestaande uit:

- o een LC-systeem (hoge druk of ultra hoge druk) met injectie-automaat, vloeistofpomp, gethermostatiseerde kolom en ontgassingseenheid
 - o een hoge resolutie massaspectrometer **met accurate massa**, time-of-flight (TOF) of Orbitrap Fourier Transform, met electrospray interface
 - o een datastation voor de instelling van de instrumentele settings, de data-acquisitie en de data-analyse
- LC-kolom: een reversed phase kolom met een C18-fase, bv. XTerra C18, 100 x 2.1 mm, 3.5 um of Acquity BEH C18 100 x 2.1 mm, 1.7 um of gelijkwaardig.

4 REAGENTIA EN STANDAARDEN

- Methanol: bv. Merck 'gradiënt grade, for liquid chromatography'
- Acetonitrile: bv. Merck 'gradiënt grade, for liquid chromatography'
- Water: ultrapuur
- Azijnzuur : bv. Merck p.a.
- Ammoniumacetaat: bv. Merck 99,999 %
- ~~Stockstandaarden van bovenvermelde niet-ionogene surfactanten: vaste en vloeibare producten van ChemService of andere leveranciers, bv. AEO C12, AEO C13, AEO C16, AEO C18, APEO C8, APEO C9, APEO C12, cocamide MEA, cocamide DEA en cocamide MIPA; verifieer de zuiverheid aan de hand van een LC-chromatogram en MS-spectrum; bepaal ook het droge stof gehalte; maak hiervan oplossingen in methanol/water 1/1 voor het vastleggen van de retentietijdsgebieden. Opmerking: in geval deze producten als standaard met certificaat aangekocht worden is de controle van de zuiverheid en van het droge stof gehalte niet nodig.~~
- Kalibratiestockstandaardoplossingen: maak uitgaande van de zuivere producten van ~~AEO C12, APEO C9, cocamide MEA en cocamide DEA en cocamide MIPA~~ AEO C10, AEO C12, AEO C13, AEO C14, AEO C16, AEO C18, APEO C8, APEO C9, cocamide MEA en cocamide DEA een verdunning van 200 mg/l in methanol. ~~Merk op dat APEO C8 niet als kalibratiestandaard gebruikt mag worden maar wel voor de aanmaak van de additieplossing en de QC-referentieoplossing onafhankelijke controlestandaard.~~
- Kalibratiewerkstandaarden: maak uitgaande van de bovenstaande stockstandaardoplossingen een reeks verdunningen met concentraties lopende van ~~ea ongeveer 2 tot 250 50 tot 2500~~ µg/l in methanol/water 1/1 ~~of acetonitrile/water 1/1 (zie voorbeeld in bijlage 1)~~

Opm.: de kalibratiewerkstandaarden zijn maximaal 1 maand houdbaar.

- ~~Kalibratiecontrolestandaard: deze bevat de bovenstaande surfactanten in een concentratie van ca 1 mg/l in methanol/water 1/1~~
~~Opm.: De kalibratiewerkstandaarden zijn maximaal 1 maand houdbaar.~~
- Additiestockstandaardoplossing: maak uitgaande van de zuivere producten van ~~AEO C10~~, AEO C12, AEO C13, AEO C16, AEO C18, APEO C8, APEO C9, ~~APEO C12~~, cocamide MEA ~~en~~ cocamide DEA ~~en cocamide MIPA~~ een verdunning van 200 mg/l in methanol
- ~~QC-referentiestockoplossing~~ Onafhankelijke controlestandaard; dit is een onafhankelijke standaardoplossing in methanol die een aantal AEO, APEO en alkanolamides bevat in een concentratie van ~~bv.~~ 200 mg/L. ~~Deze standaard bevat minstens 3 componenten. zie samenstelling in bijlage 4.~~
- ~~QC-referentiestockoplossing~~ Onafhankelijke controlestandaard meetoplossing: QC-referentiemonster: maak uitgaande van de QC-referentie stockoplossing een verdunning in ~~water/methanol~~ of water/ACN 1/1 van 1 mg/l.

5 MONSTERBEWARING

Voor de monsterconservering en –bewaring wordt verwezen naar WAC/I/A/010.

6 VOORBEHANDELING

Waterstalen die zwevend materiaal bevatten, worden voor de deelmonsternamen gehomogeniseerd door opschudden. De deelmonsters worden voorafgaandelijk aan de filtratie tweemaal verdund door toevoeging van een gelijke hoeveelheid acetonitrile (deze verdunningsstap vervalt indien aan het monster reeds ter bewaring een gelijke hoeveelheid acetonitrile werd toegevoegd); typisch wordt aan 10 ml waterstaal 10 ml acetonitrile toegevoegd. De filtratie wordt uitgevoerd met een 0,45 µm membraanfilter. Alternatief kan gekozen worden voor ultracentrifugatie.

De verdunning met acetonitrile verhindert de adsorptie van niet-ionogene surfactanten aan zowel zwevend materiaal in het monster als aan de membraanfilter. 1 ml van het filtraat wordt overgebracht in een meetvial en hiervan wordt een deel geïnjecteerd in de LC-MS.

Opmerking:

- Controleer vooraf of het gekozen filtreermateriaal vrij is van surfactanten
- De bepaling van niet-ionogene surfactanten met deze LC-MS methode is voldoende gevoelig, zodat er geen nood is aan opconcentreren.

7 LC-MS METING

7.1 LC-CONDITIES

Geschikte LC-instellingen zijn **toestelafhankelijk en** bij wijze van voorbeeld hieronder opgenomen. Andere LC-instellingen kunnen tot vergelijkbare resultaten leiden.

Van de monsterextracten wordt typisch 5 µl in de LC-MS geïnjecteerd. ~~Elk monster wordt minstens in duplo gemeten (zie ook 8.6):~~

De LC-analyse gebeurt **bv.** op een C18 kolom met gradiëntelutie.

Een voorbeeld van een geschikte UPLC kolom is Acquity BEH C18, 100 mm × 2,1 mm × 1.7 µm

De kolomtemperatuur bedraagt **bv.** 40°C.

De samenstelling van de gradiënt is **bv.:**

A = water + 20 mM NH₄Ac+0.1% azijnzuur

B = ACN/MeOH (1/1) + 20mM NH₄Ac +0.1% azijnzuur

De gradiënt is **bv.** als volgt geprogrammeerd:

Tijd (min)	A %	B %	Debiet (ml/min)
0,00	50,0	50,0	0,40
9,00	0	100,0	0,40
11,00	0	100,0	0,40
11,10	50,0	50,0	0,40
15,00	50,0	50,0	0,40

Typische retentietijden voor de verschillende niet-ionogene surfactanten bekomen op een Acquity UPLC BEH C18 kolom zijn opgenomen in tabel 1.

Opmerking: Aan de mobiele fase wordt ~~20 mM~~ NH₄Ac (bv 20 mM) toegevoegd om de vorming van NH₄⁺-adducten van AEO en APEO te bevorderen.

7.2 MS-CONDITIES

De ionisatie gebeurt via electrospray, met acquisitie van de gevormde ionen in positieve modus (ES+).

De MS opname gebeurt met volgende typische instellingen:

Scan range: 100 – 1000 m/z
Resolution: 10.000 of hoger
Lock mass: 391.28428
Sheat gas flow rate: 60
ml/min Aux gas flow rate: 30
ml/min Spray voltage: 3500 V
Capillary temp.: 350°C
Capillary voltage: 38 V
Tube lens voltage: 120 V
Skimmer voltage: 21V

De identificatie en kwantificatie van de surfactanten gebeuren op basis van de exacte massa's opgenomen in tabel 1.

De dataverwerking gebeurt met de software van het apparaat.

Voorbeelden van UPLC-MS chromatogramen zijn voor APEO C8 en cocamide MEA opgenomen in bijlage 2, samen met de typische MS spectra. Spectra van AEO en APEO worden gekenmerkt door een gaussiaanse verdeling van pieken gescheiden door 44 massa-eenheden, overeenkomend met de massa van ethyleenoxide. De scheiding van niet-ionogene surfactanten op een omgekeerde fase kolom gebeurt op basis van de alkyl(fenol)ketenlengte en is quasi onafhankelijk van de polyethoxylaatketenlengte. Vertakte alkylketens vertonen minder retentie dan lineaire ketens.

Tabel 1: m/z waarden voor niet-ionogene surfactanten (de retentietijden zijn indicatief)

surfactant	structuur	retentietijd (min)	m/z ([M+H] ⁺ of [M+NH ₄] ⁺)
cocamide MEA	mengsel	2.31, 4.23, 6.14, 7.68, 8.9, 9.9	188.16451, 216.19581, 244.22711, 272.25841, 300.28971, 328.32101
cocamide DEA	mengsel	2.23, 4.12, 5.98, 7.51, 8.74, 9.74	232.19072, 260.22202, 288.25332, 316.28462, 344.31592, 372.34722
APEO C8	C ₈ H ₁₇ C ₆ H ₄ (OCH ₂ CH ₂) _n OH	7.5	356.28015, 400.30636, 444.33257, 488.35878, 532.38499, 576.4112, 620.43741, 664.46362, 708.48983, 752.51604, 796.54225, 840.56846, 884.59467, 928.62088, 972.64709, 1016.6733
APEO C9	C ₉ H ₁₉ C ₆ H ₄ (OCH ₂ CH ₂) _n OH	8.14	370.29581, 414.32202, 458.34823, 502.37444, 546.40065, 590.42686, 634.45307, 678.47928, 722.50549, 766.5317, 810.55791, 854.58412, 898.61033, 942.63654, 986.66275, 1030.68896
AEO C10	C ₁₀ H ₂₁ (OCH ₂ CH ₂) _n OH	7.36	308.28017, 352.30638, 396.33259, 440.3588, 484.38501, 528.41122, 572.43743, 616.46364, 660.48985, 704.51606, 748.54227, 792.56848, 836.59469, 880.6209, 924.64711, 968.67332
AEO C10 branched	C ₁₀ H ₂₁ (OCH ₂ CH ₂) _n OH	7.08	308.28017, 352.30638, 396.33259, 440.3588, 484.38501, 528.41122, 572.43743, 616.46364, 660.48985, 704.51606, 748.54227, 792.56848, 836.59469, 880.6209, 924.64711, 968.67332
AEO C11	C ₁₁ H ₂₃ (OCH ₂ CH ₂) _n OH	8.02	322.29583, 366.32204, 410.34825, 454.37446, 498.40067, 542.42688, 586.45309, 630.4793, 674.50551, 718.53172, 762.55793, 806.58414, 850.61035, 894.63656, 938.66277, 982.68898
AEO C11 branched	C ₁₁ H ₂₃ (OCH ₂ CH ₂) _n OH	7.63	322.29583, 366.32204, 410.34825, 454.37446, 498.40067, 542.42688, 586.45309, 630.4793, 674.50551, 718.53172, 762.55793, 806.58414, 850.61035, 894.63656, 938.66277, 982.68898
AEO C12	C ₁₂ H ₂₅ (OCH ₂ CH ₂) _n OH	8.62	336.31149, 380.3377, 424.36391, 468.39012, 512.41633, 556.44254, 600.46875, 644.49496, 688.52117, 732.54738, 776.57359, 820.5998, 864.62601, 908.65222, 952.67843, 996.70464
AEO C12 branched	C ₁₂ H ₂₅ (OCH ₂ CH ₂) _n OH	8.1	336.31149, 380.3377, 424.36391, 468.39012, 512.41633, 556.44254, 600.46875, 644.49496, 688.52117, 732.54738, 776.57359, 820.5998, 864.62601, 908.65222, 952.67843, 996.70464
AEO C13	C ₁₃ H ₂₇ (OCH ₂ CH ₂) _n OH	9.14	350.32715, 394.35336, 438.37957, 482.40578, 526.43199, 570.4582, 614.48441, 658.51062, 702.53683, 746.56304, 790.58925, 834.61546, 878.64167, 922.66788, 966.69409, 1010.7203
AEO C13 branched	C ₁₃ H ₂₇ (OCH ₂ CH ₂) _n OH	8.52	350.32715, 394.35336, 438.37957, 482.40578, 526.43199, 570.4582, 614.48441, 658.51062, 702.53683, 746.56304, 790.58925, 834.61546, 878.64167, 922.66788, 966.69409, 1010.7203
AEO C14	C ₁₄ H ₂₉ (OCH ₂ CH ₂) _n OH	9.61	364.34281, 408.36902, 452.39523, 496.42144, 540.44765, 584.47386, 628.50007, 672.52628, 716.55249, 760.5787, 804.60491, 848.63112, 892.65733, 936.68354, 980.70975, 1024.73596
AEO C14 branched	C ₁₄ H ₂₉ (OCH ₂ CH ₂) _n OH	8.94	364.34281, 408.36902, 452.39523, 496.42144, 540.44765, 584.47386, 628.50007, 672.52628, 716.55249, 760.5787, 804.60491, 848.63112, 892.65733, 936.68354, 980.70975, 1024.73596
AEO C16	C ₁₆ H ₃₃ (OCH ₂ CH ₂) _n OH	10.46	392.37413, 436.40034, 480.42655, 524.45276, 568.47897, 612.50518, 656.53139, 700.5576, 744.58381, 788.61002, 832.63623, 876.66244, 920.68865, 964.71486, 1008.74107, 1052.76728
AEO C18	C ₁₈ H ₃₇ (OCH ₂ CH ₂) _n OH	11.4	420.40545, 464.43166, 508.45787, 552.48408, 596.51029, 640.5365, 684.56271, 728.58892, 772.61513, 816.64134, 860.66755, 904.69376, 948.71997, 992.74618, 1036.77239, 1080.7986

7.3 IDENTIFICATIE EN INTEGRATIE

Extraheer voor elke surfactant uit tabel 1 het overeenstemmende ionchromatogram op basis van de gesommeerde ionen.

De identificatiecriteria zijn:

- het voorkomen van pieken met een signaal-ruisverhouding groter dan 6 en met een retentietijd overeenkomstig ~~met deze uit tabel 1~~ deze in de kalibratiestandaard (voor de criteria mbt retentietijd wordt verwezen naar WAC/VI/A/003);
- van elke LC-piek wordt het geregistreerde spectrum weergegeven; een positieve identificatie van AEO en APEO gebeurt op basis van het voorkomen van een regelmatige verdeling van ionen in het massaspectrum, waarbij de ionen gescheiden zijn met 44 massa-eenheden.

In bijlage 2 en 3 zijn bij wijze van voorbeeld de chromatogrammen en massaspectra voor resp. nonylfenoethoxylaate en cocamide MEA weergegeven.

Bepaal van elke geïdentificeerde piek de oppervlakte.

Ga voor de kalibratiestandaarden ~~(APEO C9, AEO C12 en de alkanolamides)~~ op dezelfde manier te werk.

Opmerkingen:

- gezien de samenstelling van de mobiele fase worden in geval van AEO en APEO voornamelijk ammonium adducten gemeten
- in geval van lange ethoxylaatketenlengtes (>C20) kunnen ook dikationen waargenomen worden; deze zijn gescheiden met $\Delta m/z = 22$; deze ionen worden niet in rekening gebracht
- in het chromatogram kunnen andere pieken aangetroffen worden met een regelmatig $\Delta m/z$ 44 of $\Delta m/z$ 22 patroon zonder dat deze toegewezen kunnen worden aan de APEO of AEO uit tabel 1; het betreft in dit geval andere niet-ionogene surfactanten zoals onverzadigde AEO, gehydrogeneerde APEO of vetzuuresterethoxylaten

7.4 KALIBRATIE EN KWANTIFICATIE

De kwantificatie gebeurt met de externe standaardmethode, waarbij de gehalten van de gedetecteerde APEO, AEO en alkanolamides berekend worden aan de hand van de uit de kalibratiereeks bekomen kalibratiecoëfficiënten. ~~AEO worden gekwantificeerd t.o.v. AEO C12, APEO t.o.v. APEO C9, alkanolamides t.o.v. de overeenkomstige standaarden.~~ De AEO, APEO en cocamides worden gekwantificeerd tov hun overeenkomstige standaard, behalve AEO C11:

- AEO C10, C12, C13, C14, C16 en C18 tov respectievelijk AEO C10, C12, C13, C14, C16 en C18
- AEO C11 tov AEO C12
- APEO C8, C9 tov respectievelijk APEO C8, C9
- Cocamide MEA en DEA tov respectievelijk cocamide MEA en DEA

~~De kalibratie omvat de injectie van minstens 5 standaardoplossingen die de te bepalen surfactantstandaarden bevatten in oplopende concentraties (zie voorbeeld in bijlage 1). De kalibratievergelijking heeft gewoonlijk een lineair verloop:~~

$$\text{A}_i = aC_i + b$$

met

A_i = de gemeten piekoppervlakte voor de surfactant i in de standaardoplossing

C_i = de concentratie van de surfactant i in $\mu\text{g/l}$ in de standaardoplossing

De gemeten piekoppervlakten worden voor elke te bepalen surfactant uitgezet i.f.v. van de concentratie. De coëfficiënten a (helling of reponsfactor) en b (afgesneden stuk) worden bepaald door lineaire regressie met inbegrip van het punt (0,0) en met $1/X$ weging (dit gebeurt al dan niet automatisch met de software van het apparaat).

De correlatiecoëfficiënt dient > 0.994 . Het werkgebied wordt bepaald door de concentraties waarvoor de residuele afwijking tot de rechte $< 30\%$.

De kalibratie kan op een aantal verschillende manieren gebeuren (voor de kwaliteitseisen waaraan de kalibratie moet voldoen wordt verwezen naar WAC/VI/A/003) :

- aan de hand van kalibratierechten. In dit geval worden aan het begin van de analysereeks minimaal 4 kalibratieoplossingen geanalyseerd met concentraties groter dan 0 en verspreid over het lineair gebied. De laagste concentratie mag niet hoger zijn dan 2 keer de ondergrens van het meetbereik. Op de X-as en de Y-as worden de verhoudingen uitgezet van resp. de concentraties en de piekoppervlakten van de natieve PFAS en de overeenkomstige interne standaard. Vervolgens wordt dmv lineaire regressie de vergelijking van de kalibratierechte berekend. De afwijking van elk punt tot de rechte mag maximum 20% bedragen.
- aan de hand van kwadratische curven. Indien bij de lineariteitstest gebleken is dat er geen lineair maar een kwadratisch verband is tussen concentratie en respons, dan kunnen kwadratische curven gebruikt worden voor de kalibratie. Daartoe worden aan het begin van de analysereeks minimaal 5 kalibratie-oplossingen geanalyseerd met concentraties verspreid over het meetgebied. De laagste concentratie mag niet hoger zijn dan 2 keer de ondergrens van het meetbereik. Op de X-as en de Y-as worden de verhoudingen uitgezet van resp. de concentraties en de piekoppervlakten van de natieve PFAS en de overeenkomstige interne standaard. Vervolgens wordt dmv kwadratische curve fitting de vergelijking van de curve berekend. De afwijking van elk punt tot de curve mag maximum 15% bedragen.

De berekening van de kalibratiecurve gebeurt bij elke analysereeks. Om een aantal monsterinjecties (bv. elke 10 monsters) wordt de geldigheid van de kalibratierechte gecontroleerd door injectie van een kalibratiecontrolestandaard.

7.5 GEHALTE VAN DE SURFACTANTEN IN HET WATERMONSTER

Uitgaande van de integratiewaarden voor het monster en de kalibratierechte/curve bepaald voor de kalibratiestandaard worden de gehalten van de verschillende verbindingen in het monster berekend.

De concentraties in het monster worden vervolgens berekend als volgt:

$$C_i(\text{monster}) = \left(\frac{A_i - b}{a} \right) \cdot vf$$

met

$C_i(\text{monster})$ = de concentratie van de surfactantverbinding i in het monster in $\mu\text{g/l}$

A_i	=	de gemeten piekoppervlakte voor de surfactantverbinding i in het monsterextract
a en b	=	de coëfficiënten van de kalibratievergelijking
vf	=	de verdunningsfactor (gewoonlijk 2)

~~De gemiddelde waarde van de duplo- of meervoudige bepaling wordt gerapporteerd.~~

Het totaal gehalte niet-ionogene surfactanten wordt tenslotte berekend door de sommatie van de gehalten van de gedetecteerde surfactanten:

$$C_{\text{totaal}} = \sum C_i$$

Opmerkingen:

- ~~Bij het maken van de som wordt het "lower bound" principe toegepast~~
- Bij overschrijding van de bovenste grens van het werkgebied dient voor de bepaling van de betrokken surfactantverbinding het extract verdund te worden met ACN/water 1/1 en opnieuw gemeten.
- ~~In geval van zwaar beladen monsters (dit kan afgeleid worden uit het total ion chromatogram) kan het~~ Het signaal van de surfactanten kan beïnvloed zijn door coëlutie met matrixcomponenten waarbij meestal ionisatiesuppressie maar soms ook ionisatieversterking optreedt. Een controle op de aanwezigheid van matrixeffecten ~~kan gebeuren wordt bij elk staal uitgevoerd~~ met behulp van standaardadditie (zie ook hieronder 8.7 matrixadditie). Aan het monsterextract worden a.h.v. de additiestockstandaard gekende hoeveelheden surfactanten aan het monster toegevoegd in de verwachte concentratie(s) en de terugvindingen worden bepaald a.h.v. de gemeten oppervlakten bekomen met en zonder additie. De terugvindingen moet gelegen zijn tussen 70-130%. ~~Merk op dat de terugvinding niet juist kan berekend worden als het staal concentraties bevat die veel hoger liggen dan de additie; in dat geval wordt een additie uitgevoerd aan het verdund staal. In het andere geval dient voor de terugvinding gecorrigeerd te worden of wordt in het rapport aangegeven dat het gehalte mogelijk overschat resp. onderschat is.~~
- Voor de AEO's wordt de som van lineair en vertakt als resultaat gerapporteerd.

8 KWALITEITSCONTROLE

Voor de kwaliteitseisen ivm kalibratie, procedureblanco, driftcontrole en onafhankelijke controlestandaard wordt verwezen naar WAC/VI/A/003

8.1 RESPONSLINEARITEIT

~~Voor de werkwijze voor de bepaling van de lineariteit wordt verwezen naar de validatieprocedure 6/A van het CMA. Een controle van de lineariteit wordt uitgevoerd bij elke ernstige instrumentele ingreep. Indien niet aan lineariteit is voldaan mag overgeschakeld worden op een andere (bv. kwadratische) functie.~~

8.2 INSTRUMENTELE DETECTIELIMIETEN

De instrumentele detectielimiet is een maat voor de gevoeligheid van het apparaat. Aan de hand van het chromatogram van de laagste kalibratie-oplossing wordt voor elke surfactantstandaard de kleinste meetbare concentratie bepaald, gedefinieerd als:

met $DL(instr) = 3 * RG * conc/PH$

DL(instr) = de instrumentele detectielimiet in µg/l
RG = de "peak-to-peak" ruishoogte aan de voet van de chromatogrampiek van de surfactantverbinding
PH = de piekhoogte van de surfactantverbinding
C = concentratie van de surfactantverbinding in de kalibratie-oplossing in µg/l

De instrumentele detectielimieten moeten van die aard zijn dat zonder problemen de gevraagde rapporteergrenzen kunnen gehaald worden. ~~Een streefwaarde is 50 µg/l voor elke surfactant. De~~ bepalingsgrenzen voor individuele AEO, APEO en cocamides mag niet meer dan 10 µg/l bedragen. Voor de rapportagegrens-eisen van AEO en APEO wordt verwezen naar WAC/VI/A/001. Bij het maken van de som van individuele surfactanten wordt het "lower bound" principe toegepast.

8.3 ~~CONTROLE OP DE KALIBRATIE~~

~~Om een welbepaald aantal monsters (bv. 6) wordt de geldigheid van de kalibratievergelijking gecontroleerd. Hiertoe wordt één van de standaardoplossingen uit de kalibratiereeks opnieuw geïnjecteerd. De concentraties in de oplossing worden berekend met de kalibratievergelijking en mogen niet meer dan 15% afwijken van de werkelijke concentraties. Indien de afwijking groter is dan 15% dient een herkalibratie te gebeuren met inzetten van de volledige kalibratiereeks.~~

8.4 ~~PROCEDUREBLANCO~~

~~Bij elke analysereeks wordt tenminste één procedureblanco bepaald. Hierbij wordt de volledige analyseprocedure gevolgd, doch zonder inname van monster.~~

~~M.b.t. de blancobijdrage worden volgende regels gehanteerd:~~

- ~~—— voor monsterwaarden groter dan 5 maal de rapporteergrens: de chromatogrammen dienen vrij te zijn van pieken in een concentratie groter dan 10% van de monsterwaarde~~
- ~~—— voor monsterwaarden kleiner dan 5 maal de rapporteergrens: de chromatogrammen dienen vrij te zijn van pieken in een concentratie groter dan de helft van de rapporteergrens.~~

8.5 ~~QC-MONSTER~~

~~Om de terugvinding en de reproduceerbaarheid te controleren wordt bij elke meetreeks het QC referentiemonster geanalyseerd. De terugvindingen moeten gelegen zijn tussen 75% en 125%. De gehalten worden opgetekend in controlekaarten en de opgetekende waarden worden getoetst aan de voor controlekaarten geldende criteria.~~

8.6 ~~DUPLOBEPALING~~

~~Elk monster wordt in 2-voud opgewerkt en gemeten. De bekomen gehalten mogen niet meer dan 20% van mekaar afwijken.~~

8.7 MATRIXADDITIE (CONTROLESTAAL)

Aan ~~een deel van het watermonster~~ elk monster wordt een gekende hoeveelheid van de additiestockstandaard toegevoegd. Het monster worden opgewerkt en gemeten en de terugvindingen worden bepaald, rekening houdend met het oorspronkelijk aanwezige gehalte. De terugvindingen dienen gelegen te zijn tussen 70 en 130% (dit criterium geldt voor addities die minstens het in het monster aanwezige gehalte bedragen; ~~indien het staal concentraties bevat die veel hoger liggen dan de additie wordt een additie uitgevoerd aan het verdund staal~~). ~~Bij afwijkende terugvindingen dient het gehalte bepaald te worden a.d.h.v. standaardadditie.~~ Het eerste monster van elke meetreeks wordt als controlestaal beschouwd en de terugvindingen van minstens 4 surfactanten in dit staal worden op controlekaart geregistreerd (zie ook WAC/VI/A/003 tabel 2).

8.8 CHROMATOGRAFISCHE SCHEIDING

De kolomkwaliteit wordt geverifieerd aan de hand van de scheiding van een kritische paar in het chromatogram. De scheiding van het kritisch paar kan op 3 manieren gecontroleerd worden:

- o aan de hand van de piekresolutie. De resolutie dient minsten 0.5 te bedragen. De resolutie wordt gedefinieerd als de verhouding van de afstand tussen de maxima van twee pieken enerzijds en hun gemiddelde piekbreedte aan de basis anderzijds;
- o aan de hand van de piekhoogte en de valleihogte. De verhouding tussen de valleihogte enerzijds en de hoogte van de piek met de laagste respons dient kleiner te zijn dan 0.5;
- o alternatief kan gebruik gemaakt worden van de verhouding tussen enerzijds (piekhoogte laagste piek – valleihogte) en anderzijds de piekhoogte van de laagste piek, deze verhouding dient groter te zijn dan 0.5.

Alternatief kan de kolomkwaliteit opgevolgd worden aan de hand van het schotelgetal.

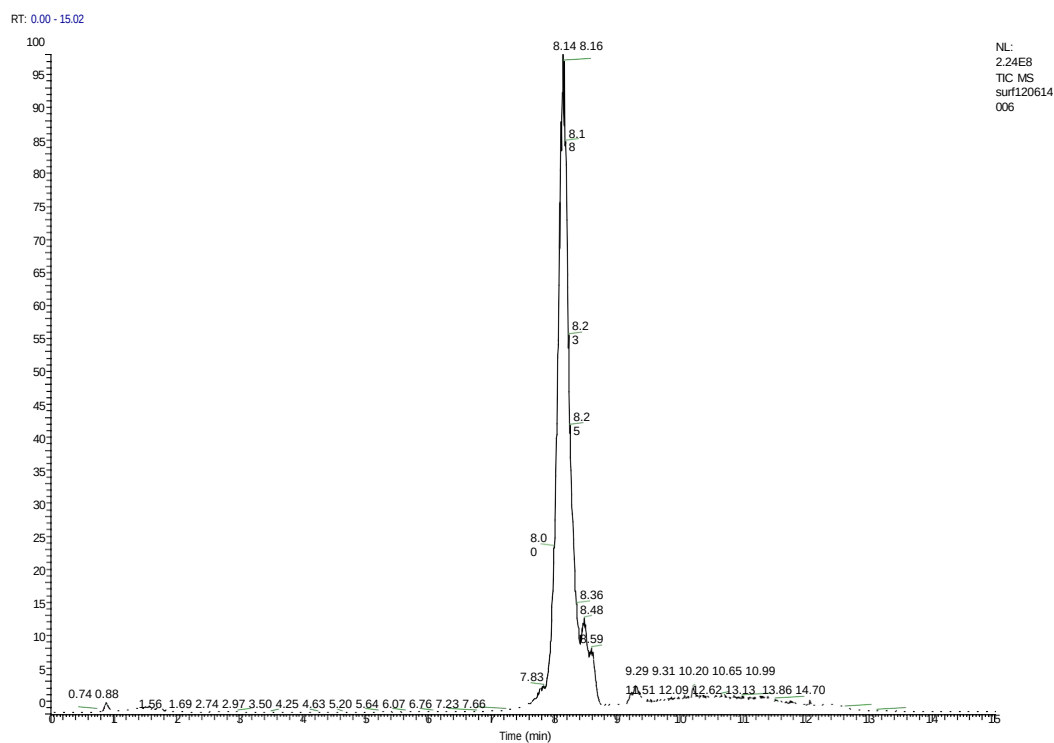
9 VEILIGHEID

De scheikundige producten die bij deze analysemethode gebruikt worden, zijn ondergebracht bij de potentieel giftige en kankerverwekkende stoffen. Dit maakt het noodzakelijk de voorziene maatregelen in het laboratorium toe te passen om blootstelling aan of contact met deze producten tot een minimum te herleiden.

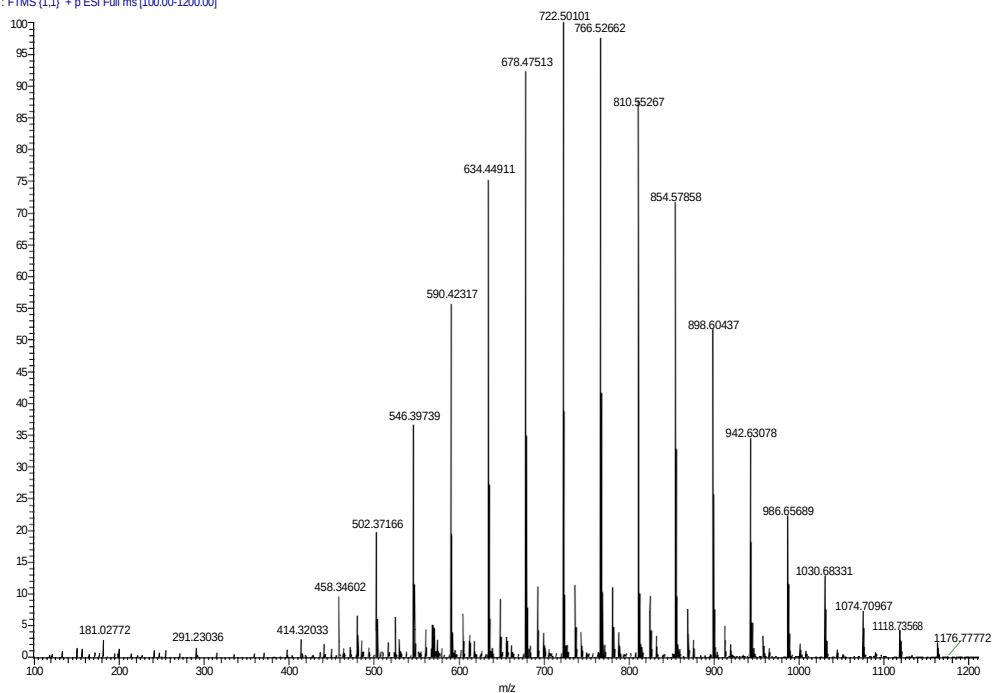
BIJLAGE 1: VOORBEELD VAN KALIBRATIEREELS VOOR NIET-IONOGENE SURFACTANTEN

Meetoplossingen in 50/50 MeOH/water, in µg/l

Surfactant	St1	St2	St3	St4	St5
APEO-C9	2578	537	255	127	54
AEO-C12	1405	293	139	69	29
Cocamide-MEA	2811	586	278	138	59
Cocamide-DEA	2576	537	255	127	54
Cocamide-MIPA	2530	527	250	124	53

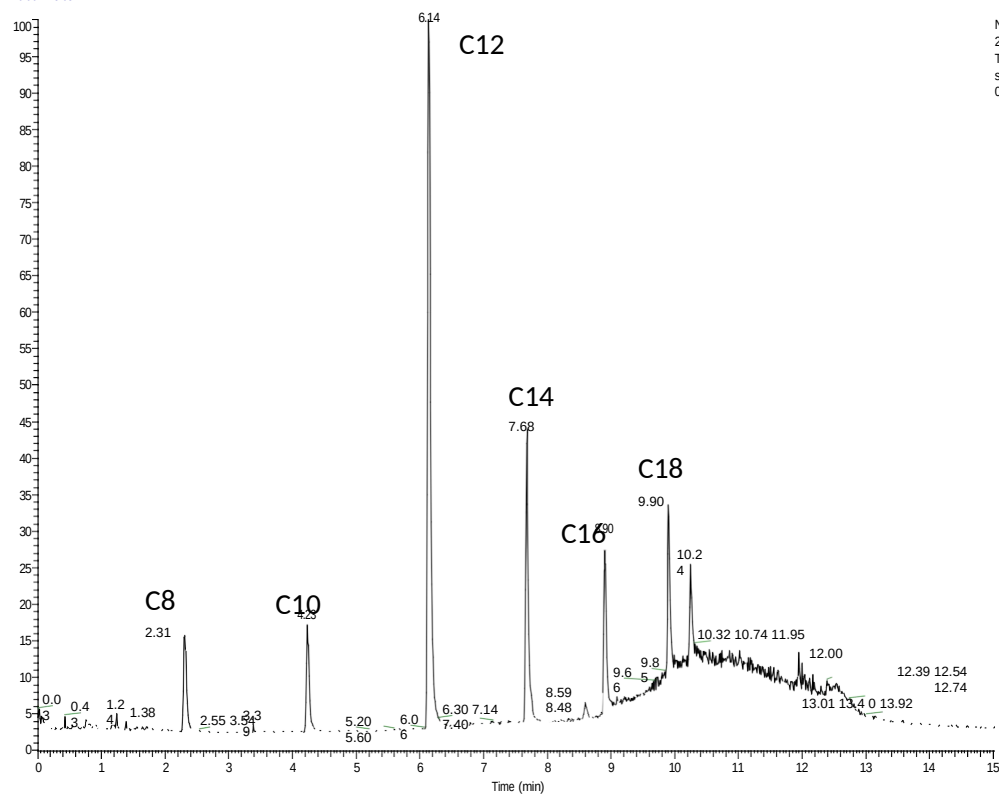
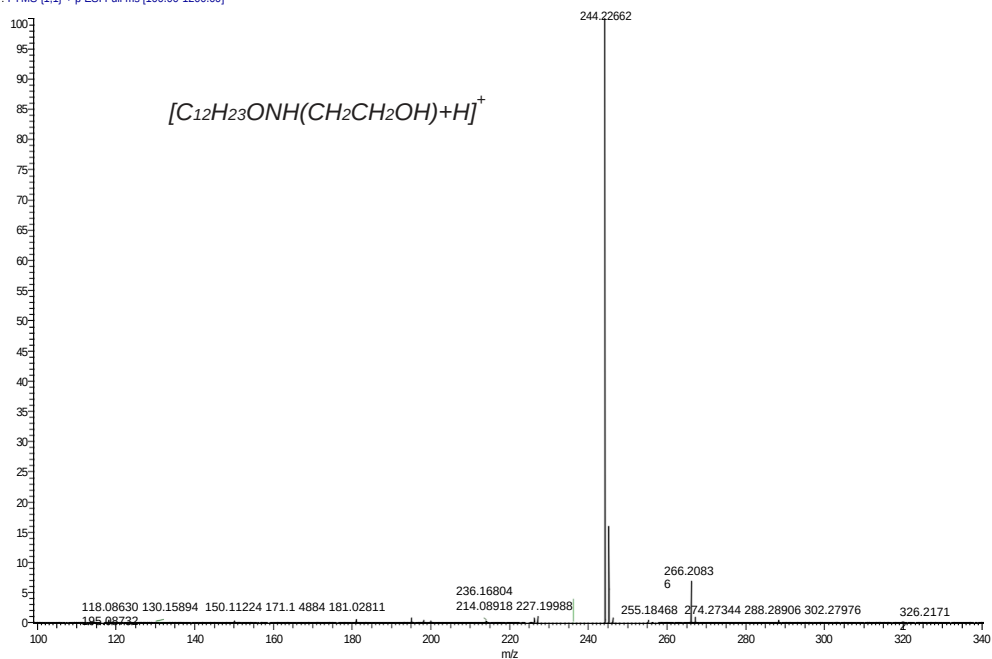
**BIJLAGE 2: CHROMATOGRAM EN MASSASPECTRUM VOOR
NONYLFENOLETHOXYLAAT**

surf120614006 #682-804 RT: 7.75-8.70 AV: 123 NL: 3.11E6
T: FTMS (1.1) + p ESI Full ms (100.00-1200.00)



BIJLAGE 3: CHROMATOGRAM EN MASSASPECTRUM VOOR COCAMIDE MEA

RT: 0.00 - 15.03

NL:
2.45E7
TIC MS
surf120614
002surf120614002 #532-548 RT: 6.06-6.21 AV: 17 NL: 4.76E6
T: FTMS (1,1) + p ESI Full ms [100.00-1200.00]

BIJLAGE 4: SAMENSTELLING QC-REFERENTiestockoplossing ONAFHANKELIJKE STANDAARD (VOORBEELD)

<i>Merksnaam</i>	<i>Surfactant</i>	<i>Synoniem</i>	<i>Afkorting</i>	<i>Concentratie mg/L</i>
Octaethylene glycol monodecyl ether	polyethylene glycol (8)decyl ether	decylalcoholethoxyla	AEO C10	1200
Thesit	polyethylene glycol (10) dodecyl ether	dodecylalcoholethoxyla	AEO C12	200
Polyoxyethylene (10) tridecylether	polyethylene glycol (10) tridecyl ether	tridecylalcoholethoxyla	AEO C13	200
Pentaethylene glycol monotetradecyl ether	polyethylene glycol (5) tetradecyl ether	tetradecylalcoholethoxyla	AEO C14	200
Brij C10	polyethylene glycol (10) hexadecyl ether	hexadecylalcoholethoxyla	AEO C16	200
Brij S10	polyethylene glycol (10) octadecyl ether	octadecylalcoholethoxyla	AEO C18	200
Polyethylene glycol monooleate	Polyethylene glycol oleyl ether	oleylalcoholethoxyla	AEO C18:1	200
Triton-X100	polyethylene glycol octylfenyl ether	octylfenoethoxyla	APEO C8	200
Tergitol NP-9	polyethylene glycol nonylfenyl ether	nonylfenoethoxyla	APEO C9	200
Stearic acid diethanol amide	Stearic acid diethanol amide	Stearic acid diethanol amide	C18 DEA	200
		TOTAAL		3000

Bepaling van per- en polyfluoralkylverbindingen (PFAS) in water met LC-MS/MS

INHOUD

1	Doel en toepassingsgebied	3
2	Principe	4
3	Materiaal	5
4	Reagentia en standaarden	5
5	Monsterbewaring	7
6	Analyseprocedure	7
6.1	<i>Extractie</i>	7
6.2	<i>Meting</i>	8
6.2.1	LC-condities	8
6.2.2	MS-condities	9
6.2.3	Identificatie en integratie	12
6.3	<i>Kalibratie</i>	12
6.4	<i>Kwantificatie</i>	12
7	Kwaliteitscontroles	13
7.1	<i>Chromatografische scheiding</i>	13
7.2	<i>Terugvinding van de isotoopgemerkte fluorverbindingen</i>	13
8	Rapportering	14
9	Referenties	14

1 DOEL EN TOEPASSINGSGEBIED

De hieronder beschreven analysemethode vervangt de procedure WAC/IV/A/025 van juni 2024 en wordt gebruikt voor het bepalen van per- en polyfluoralkylverbindingen (PFAS):

in drink-, grond- en oppervlaktewater
in afvalwater

en is gericht op de kwantificering van volgende componenten:

Tabel 1: kwantitatieve PFAS

PFAS	Afkorting	CAS nr
perfluor-n-butaanzuur	PFBA	375-22-4
perfluor-n-pentaanzuur	PFPeA	2706-90-3
perfluor-n-hexaanzuur	PFHxA	307-24-4
perfluor-n-heptaanzuur	PFHpA	375-85-9
perfluor-n-octaanzuur	PFOA	335-67-1
perfluor-n-nonaanzuur	PFNA	375-95-1
perfluor-n-decaanzuur	PFDA	335-76-2
perfluor-n-undecaanzuur	PFUnDA	2058-94-8
perfluor-n-dodecaanzuur	PFDODA	307-55-1
perfluor-n-tetradecaanzuur	PFTeDA	376-06-7
perfluor-n-hexadecaanzuur	PFHxDA	67905-19-5
perfluor-n-butaansulfonzuur	PFBS	375-73-5
perfluor-n-pentaansulfonzuur	PFPeS	2706-91-4
perfluor-n-hexaansulfonzuur	PFHxS	355-46-4
perfluor-n-heptaansulfonzuur	PFHpS	375-92-8
perfluor-n-octaansulfonzuur	PFOS	1763-23-1
perfluor-n-nonaansulfonzuur	PFNS	68259-12-1
perfluor-n-decaansulfonzuur	PFDS	335-77-3
4:2 fluortelomeersulfonzuur	4:2 FTS	757124-72-4
6:2 fluortelomeersulfonzuur*	6:2 FTS	27619-97-2
8:2 fluortelomeersulfonzuur	8:2 FTS	39108-34-4
perfluor-n-octaansulfonamide	PFOSA	754-91-6
N-methylperfluor-n-octaansulfonamide	MePFOSA	31506-32-8
N-ethylperfluor-n-octaansulfonamide	EtPFOSA	4151-50-2
N-methylperfluor-n-octaansulfonamido-azijnzuur	MePFOSAA	2355-31-9
N-ethylperfluor-n-octaansulfonamido-azijnzuur	EtPFOSAA	2991-50-6
8:2 fluortelomeerfosfaat diester	8:2 diPAP	678-41-1
perfluor-2-propoxypropaanzuur	HFPO-DA	13252-13-6
4,8-dioxa-3H-perfluornonaanzuur	DONA	919005-14-4
perfluor-4-ethylcyclohexaansulfonzuur	PFECHS	646-83-3
perfluor-n-butaansulfonamide	PFBSA	30334-69-1
N-methylperfluor-n-butaansulfonamide	MePFBSA	68298-12-4
N-methylperfluor-n-butaansulfonamide azijnzuur	MePFBSAA	159381-10-9
perfluor-n-hexaansulfonamide	PFHxSA	41997-13-1

* in DW, GW en OW

De verbindingen kunnen bepaald worden vanaf een concentratie van 10 ng/l voor drink-, grond- en oppervlaktewater en 20 ng/l voor afvalwater.

Opmerkingen:

- Tegelijk kunnen de onderstaande verbindingen bepaald worden. Afhankelijk van de toegepaste methode kunnen hiervoor minder betrouwbare gehalten bekomen als gevolg van onvoldoende terugvinding, verlies door adsorptie of mogelijke interferentie. De gemeten gehalten kunnen in dat geval enkel gerapporteerd worden als indicatief. Deze verbindingen kunnen bepaald worden vanaf 50 ng/l.

Tabel 2: indicatieve PFAS

PFAS	Afkorting	CAS nr
perfluor-n-tridecaanzuur	PFTTrDA	72629-94-8
perfluor-n-octadecaanzuur	PFODA	16517-11-6
perfluor-n-dodecaansulfonzuur	PFD _o DS	79780-39-5
perfluor-n-undecaansulfonzuur	PFUnDS	749786-16-1
perfluor-n-tridecaansulfonzuur	PFTTrDS	791563-89-8
10:2 fluortelomeersulfonzuur	10:2 FTS	120226-60-0
6:2 fluortelomeerfosfaat diester	6:2 diPAP	57677-95-9
6:2/8:2 fluortelomeerfosfaat diester	6:2/8:2 diPAP	943913-15-3
6:2 fluortelomeersulfonzuur*	6:2 FTS	27619-97-2

* in AW

- Van de meeste perfluorverbindingen komt uitsluitend de lineaire vorm voor; de beschikbare standaarden zijn ook lineair. Van een aantal perfluorverbindingen (PFOA, PFOS, PFOSA, MePFOSA, EtPFOSA en PFHxS) kunnen ook vertakte vormen teruggevonden worden, die al dan niet afhankelijk van regelgeving en aard van het water mee gekwantificeerd wordt (zie 6.4). In deze procedure worden voor PFOA, PFOS, PFOSA, MePFOSA, EtPFOSA en PFHxS zowel de lineaire vormen als het totaal van de lineaire en vertakte vormen bepaald. Het totaal van de lineaire en vertakte vormen, gerapporteerd als respectievelijk PFOAtotaal, PFOS_{totaal}, PFOSAtotaal, MePFOSAtotaal, EtPFOSAtotaal en PFHxStotaal, kan bepaald worden vanaf 10 ng/l voor drink-, grond- en oppervlaktewater en 20 ng/l voor afvalwater.

2 PRINCIPE

Aan waterstalen worden gekende hoeveelheden isotoopgemerkte fluorverbindingen toegevoegd. De waterstalen worden vervolgens geëxtraheerd met vaste fase extractie. De vaste fase wordt geëluëerd met methanol en het methanolextract wordt ingedampt. Het residu wordt opgenomen in een gekend volume mobiele fase en geanalyseerd met vloeistofchromatografie met massaspectrometrische detectie. Het gehalte van de verschillende PFAS wordt berekend met de interne standaard methode.

Opmerkingen:

- Afhankelijk van de aard van de monsters, de toestelgevoeligheid en de gewenste rapportagemaxima, kan de meting rechtstreeks gebeuren zonder voorafgaandelijke opwerking.

- Voor sommige PFAS kan geen isotoopdilutie toegepast worden omdat de identieke isotoopgemerkte verbinding niet beschikbaar is. Deze PFAS worden gekwantificeerd aan de hand van een zo goed mogelijk gelijkende isotoopgemerkte verbinding (zie ook tabel onder 6.2.2). Alternatief mag voor deze componenten de externe standaardmethode toegepast worden (met controle op de aanwezigheid van matrixeffecten), ofwel kwantificatie aan de hand van standaard additie, op voorwaarde dat aangetoond wordt dat daarmee betere resultaten bekomen worden. In geval de meetreeks steeds hetzelfde type monster omvat dan kan de kalibratiereeks aangemaakt worden in het monster of het monsterextract ("matrix matched calibration").

3 MATERIAAL

- 3.1 Gebruikelijk laboratoriumglaswerk
- 3.2 Injectiespuiten van 25 tot 100 µl voor het doperen van isotoopgemerkte fluorverbindingen of matrixaddities
- 3.3 Analytische balans met een afleesnauwkeurigheid van 0.1 mg
- 3.4 Bovenweger met een afleesnauwkeurigheid van 0.01 g
- 3.5 Opstelling voor elutie van de SPE patronen
- 3.6 SPE patronen met een zwakke anionenwisselaar fase, bv OASIS WAX 6cc cart, 150mg. Andere patronen kunnen ook gebruikt worden mits gevalideerd.
- 3.7 Eenheid voor indampen onder stikstofstroom met regelbaar debiet
- 3.8 LC-MS systeem bestaande uit:
 - een HPLC of UPLC vloeistofchromatograaf met injectie-automaat, vloeistofpomp, gethermostatiseerde kolom en ontgassingseenheid
Opm.: met het oog op de reductie van de systeemblanko wordt een isolator of delay kolom, die geplaatst wordt tussen LC-pomp en injector, sterk aanbevolen
 - een tandem quadrupool massaspectrometer met electrospray ionisatiekamer
Opm.: Alternatief kan gebruik gemaakt worden van een ion trap of een hoge resolutie accurate massa (time-of-flight (TOF) of Fourier Transform) massaspectrometer
 - een datastation voor de instelling van de instrumentele settings, de data-acquisitie en de data-analyse
- 3.9 LC-kolom:
 - bv. voor UPLC: Waters Acquity UPLC BEH Shield RP18, 1.7µm, 2.1 x 100 mm kolom en bijhorende prekolom
 - bv. voor HPLC: Altima C18, 5 µm, 4 x 150 mm en bijhorende prekolom*Opmerking:*
Van PFECHS komen 2 isomeren voor (cis- en trans-), die op een C18-kolom niet gescheiden zijn. Er zijn echter kolomfases waarop deze wel gescheiden zijn. In beide gevallen wordt onder PFECHS het totaal van de 2 isomeren verstaan.

4 REAGENTIA EN STANDAARDEN

- 4.1 Methanol, p.a.
- 4.2 Water, ultrapuur
- 4.3 Ammoniumacetaat, p.a.
- 4.4 NH₃-oplossing, p.a.: bv. 25 %
- 4.5 Ammoniak/methanol oplossing: 0,4 ml van een 25 % NH₃-oplossing in 99,6 ml methanol

- 4.6 Stock kalibratieoplossingen van natieve PFAS in methanol: monocomponent stockoplossingen, aangekocht of zelf aangemaakt vanuit de zuivere stoffen
- 4.7 Stock controlestandaard van natieve PFAS: dit is een onafhankelijke mengstandaard in methanol
- 4.8 Standaardoplossing van isotoop aangerijkte PFAS (inwendige standaarden): deze wordt als mengstandaardoplossing aangekocht of aangemaakt mbv individuele standaarden in een concentratie van bv. 400 µg/l. De volgende isotoopgemerkte PFAS worden minimaal gebruikt :

Perfluor-n-[1,2,3,4- ¹³ C ₁]-butaanzuur	¹³ C ₄ -PFBA
Perfluor-n-[¹³ C ₅]-pentaanzuur	¹³ C ₅ -PFPeA
Perfluor-n-[1,2- ¹³ C ₂]-hexaanzuur	¹³ C ₂ -PFHxA
Perfluor -n-[1,2,3,4- ¹³ C ₄]-octaanzuur	¹³ C ₄ -PFOA
Perfluor-n-[1,2,3,4,5- ¹³ C ₅]-nonaanzuur	¹³ C ₅ -PFNA
Perfluor-n-[1,2- ¹³ C ₂]-decaanzuur	¹³ C ₂ -PFDA
Perfluor-n-[1,2- ¹³ C ₂]-undecaanzuur	¹³ C ₂ -PUnDA
Perfluor-n-[1,2- ¹³ C ₂]-dodecaanzuur	¹³ C ₂ -PFDoDA
Perfluor-n-[1,2- ¹³ C ₂]-tetradecaanzuur	¹³ C ₂ -PFTeDA
Perfluor-n-[1,2- ¹³ C ₂]-hexadecaanzuur	¹³ C ₂ -PFHxDA
Perfluor-1-hexaan[¹⁸ O ₂]sulfoaat	¹⁸ O ₂ -PFHxS
Perfluor-1-[1,2,3,4- ¹³ C ₄]-octaansulfoaat	¹³ C ₄ -PFOS
Natrium 1H,1H,2H,2H-perfluor-1-[1,2- ¹³ C ₂]-octaansulfoaat	¹³ C ₂ -
6:2FTS Perfluor-1-[¹³ C ₈]-octaansulfonamide	¹³ C ₈ -
PFOSA	
N-methyl-d ₃ -perfluor-1-octaansulfonamide	D ₃ -MePFOSA
N-methyl-d ₃ -perfluor-1-octaansulfonamidoazijnzuur	D ₃ -MePFOSAA
Natrium bis(1H,1H,2H,2H-[1,2- ¹³ C ₂]perfluordecyl)fosfaat	¹³ C ₄ -8:2
diPAP	
2,3,3,3-Tetrafluor-2-(1,1,2,2,3,3,3-heptafluorpropoxy)- ¹³ C ₃ -propaanzuur	¹³ C ₃ -HFPO-DA
d ₄ -10:2 fluortelomeersulfonzuur	D ₄ -10:2 FTS

Opmerkingen :

- van sommige isotoop gemerkte verbindingen zijn ook varianten beschikbaar (bv. ¹³C₃-PFHxS, ¹³C₈-PFOS, ¹³C-10:2FTS,...). Deze varianten mogen ook gebruikt worden in plaats van bovenstaande.
- ¹³C₃-HFPO-DA is mogelijk niet stabiel in acetonitrile en oplossingen worden beter aangemaakt in methanol

- 4.9 Kalibratiestandaarden: maak uitgaande van de stock kalibratieoplossingen van natieve PFAS en de standaardoplossing van isotoop aangerijkte PFAS een reeks verdunningen in 1/1 methanol/water met wisselende concentraties aan natieve PFAS, lopende van bv. 0.1 tot 100 µg/l, en constante concentraties aan isotoop aangerijkte PFAS van ca. 4 µg/l; deze oplossingen worden bij elke meetreeks opnieuw aangemaakt
- 4.10 QC standaarden: uitgaande van de stock controlestandaard worden twee QC standaarden in 1/1 methanol/water aangemaakt op één of meer concentratieniveaus
- 4.16 PFOS standaard voor de controle van de chromatografische scheiding: uitgaande van technische PFOS wordt een oplossing van bv. 50 µg/l in 1/1 methanol-water gemaakt

5 MONSTERBEWARING

Voor de monsterconservering en –bewaring wordt verwezen naar WAC/I/A/010.

Grondwaterstalen (gewoonlijk bemonsterd in het kader van bodemonderzoek) worden bij aankomst in het labo opgeschud en men laat de stalen gedurende minstens 4 uur rusten zodat de deeltjes kunnen uitzakken. Aansluitend worden de stalen voorzichtig gedecanteerd. Niet meer dan de helft van de bovenstaande waterlaag wordt gedecanteerd om zo weinig mogelijk deeltjes in bewerking te nemen. Waterstalen die geanalyseerd worden in het kader van menselijke consumptie worden niet gedecanteerd.

Opmerkingen:

- Contact met teflon of andere fluorhoudende polymeren dient vermeden te worden.
- De concentratie van >C10 PFAS in waterstalen neemt af bij toenemende bewaartijd, door sorptie aan recipientwand of neerslaan.
- Het is belangrijk om het volledige monster (voor grondwater: het volledig monster na decantatie) in bewerking te nemen, gevolgd door naspoelen van monsterfles met methanol; afhankelijk van de laboratoriumwerkwijze, toestelgevoeligheid en aard van het staal worden de watermonsters genomen in recipiënten van geschikt volume; de flessen worden volledig gevuld om de verhouding specifiek oppervlak/volume zo klein mogelijk te houden.
- In geval van analyse via directe injectie is het toevoegen van een organisch solvent aan het watermonster in de monsterfles noodzakelijk (bv. 50% methanol) ofwel wordt de monsterfles in het laboratorium geledigd en vervolgens gespoeld met voldoende methanol, waarna het water en de methanol samengevoegd worden vooraleer een deelmonster te nemen.
- In geval omwille van concentratieredenen of de organische belading van het water het monster niet in zijn volledigheid kan opgewerkt worden en verdunning van een deelmonster noodzakelijk blijkt, dan zal de monsterfles eerst geledigd worden en vervolgens gespoeld met voldoende methanol, waarna het water en de methanol samengevoegd worden vooraleer een deelmonster te nemen. Het laboratorium vermeldt in dit geval op het verslag dat de analyse uitgevoerd werd op een deelmonster.
- De staalnamerecipiënten dienen bij in gebruikname van een nieuwe batch gecontroleerd te worden op contaminatie met PFAS.

6 ANALYSEPROCEDURE

6.1 EXTRACTIE

- Weeg de monsterfles met stop en inhoud.
- Voeg een geschikte hoeveelheid van de standaardoplossing van isotoop gemerkte PFAS toe, zodat de theoretische concentratie van de IS in het meetextract gelijk is aan deze in de kalibratiestandaarden.
- Schud het geheel krachtig op.
- Voor de extractie wordt gebruik gemaakt van een SPE-patroon (3.6). De procedure omvat volgende stappen:
 - conditioneer het SPE-patroon met 4 ml ammoniak/MeOH oplossing;
 - conditioneer het SPE-patroon met 4 ml MeOH;
 - spoel het SPE-patroon met 4 ml ultrapuur water; let erop om het patroon niet droog te laten komen;

- breng het volledige staal over het SPE-patroon;
- spoel de monsterfles met 4 ml methanol en elueer hiermee het SPE-patroon; vang deze fractie op;
- spoel de monsterfles met 4 ml methanol/ammoniak oplossing (4.6) en elueer hiermee het SPE-patroon; combineer deze fractie met de voorgaande;
- damp indien nodig het extract in onder een N₂ stroom bij 40 – 65 °C tot 500 µl; laat het extract daarbij niet droggdampen; (voeg eventueel een keeper toe, bv. 50 µl DMF);
- leng het extract desgewenst aan met ultrapuur water en/of methanol; de kalibratiestandaarden dienen in hetzelfde solventmengsel aangemaakt te worden als de meetextracten;
- breng over in een meetvial;
- bepaal het volume van het opgebrachte staal door herweging van de monsterfles met stop.

Van het extract wordt typisch 10 µl in de LC-MS geïnjecteerd.

De houdbaarheid van preparaten bedraagt, bij bewaring in de koelkast, 1 maand. Preparaten die in de koelkast hebben gestaan worden best gevortext vooraleer deze in de injectie-automaat te plaatsen.

6.2 METING

6.2.1 LC-CONDITIES

Een voorbeeld van een geschikte kolom voor de UPLC bepaling van perfluorverbindingen is Acquity UPLC BEH Shield RP18, 1.7µm, 2.1 x 100 mm.

Typische UPLC-instellingen zijn:

- mobiele fase:
 - A= Water + 5 % MeOH en 2 mM ammoniumacetaat
 - B= MeOH + 2 mM ammoniumacetaat
- debiet: 0.3 ml/min
- kolomtemperatuur: 40°C
- injectievolume: 10 µl
- gradiënt:

Tijd	A%	B%
min	%	%
0	70	30
0.5	70	30
25	10	90
27	10	90
28	1	99
30	70	30

Opmerkingen:

- De LC-analyse kan ook gebeuren met een HPLC configuratie, gebruikmakend van een C18 kolom en gradiëntelutie.

6.2.2 MS-CONDITIES

Alle opnamen worden met Multiple Reaction Monitoring (MRM) uitgevoerd, met ionisatie via electrospray in negatieve modus (ES⁻).

Hieronder zijn bij wijze van voorbeeld, voor een Waters Xevo TQ-S, typische instellingen voor de MS- acquisitie gegeven:

Ion Mode :	ES ⁻
Capillary Voltage :	1kV
Cone Voltage :	componentafhankelijk
Source Offset :	30V
Desolvation Temperature :	450°C
Source Temperature :	150°C
Desolvation :	800L/Hr
Cone :	150L/Hr
Nebuliser :	7Bar
Ion Energy1 :	0.9
Ion Energy2 :	1.1
Collision gas flow :	0.20 ml/min
Collision energy:	componentafhankelijk

De onderstaande ionentransities worden geregistreerd. Tegelijk zijn typische UPLC retentietijden aangegeven. Deze kunnen verschuiven afhankelijk van de gebruikte kolom. In de tabel is ook aangegeven welke isotoop gemerkte interne standaard gebruikt kan worden voor de kwantificatie van de natieve verbinding. Om zoveel mogelijk problemen van geringe terugvinding of spreiding van resultaten te vermijden (agv. sorptie aan recipiëntwand of injector en/of matrixonderdrukking/versterking), dient ernaar gestreefd te worden om een zo groot mogelijk aantal overeenkomstige inwendige standaarden te gebruiken.

Tabel 3: ionentransities van de PFAS

Compound	Parent (m/z)	Daughter (m/z)	(Q/q)	Cone (V)	Collision (V)	IS	Rt NH ₄ Ac (min)	Rt NH ₃ (min)
PFBA	213	169	Q	30	8	13C-PFBA	2.01	3.91
PFPeA	263	219	Q	30	8	13C-PFPeA	4.78	5.96
PFHxA	313	119	q	40	20	13C-PFHxA	8.72	7.24
		269	Q	40	8			
PFHpA	363	169	q	40	20	13C-PFHxA	12.21	8.75
		319	Q	40	11			
PFOA	413	169	q	40	17	13C-PFOA	14.94	11.81
		369	Q	40	11			
PFNA	463	169	q	40	17	13C-PFNA	17.13	14.48
		419	Q	40	11			
PFDA	513	219	q	40	20	13C-PFDA	18.95	15.69
		469	Q	40	11			
PFUnDA	563	169	q	40	23	13C-PFUnDA	20.5	16.57
		519	Q	40	11			

PFDODA	613	319 569	q Q	40 40	20 11	13C-PFDODA	21.84	17.27
PFTrDA	663	319 619	q Q	40 40	23 14	13C-PFDODA	22.97	17.87
PFTeDA	713	319 669	q Q	40 40	20 14	13C-PFTeDA	23.96	18.4
PFHxDA	813	219 769	q Q	40 40	32 14	13C-PFHxDA	25.56	19.24
PFODA	913	219 869	q Q	50 50	29 17	13C-PFHxDA	26.79	19.89
PFBS	299	80 99	Q q	50 50	41 41	13C-PFHxS	5.76	6.84
PFPeS	349	80 99	Q q	50 50	32 30	18O2-PFHxS	9.53	8.09
PFHxS	399	80 99	Q q	50 50	38 32	18O2-PFHxS	12.7	10.4
PFHpS	449	80 99	Q q	50 50	41 36	13C-PFHxS	15.23	13.8
PFOS	499	80 99	Q q	60 60	50 40	13C-PFOS	17.29	15.26
PFNS	549	80 99	Q q	60 60	46 45	13C-PFOS	19.04	16.2
PFDS	599	80 99	Q q	65 65	50 50	13C-PFOS	20.53	16.94
PFDoS	699	80 99	Q q	65 65	49 47	13C-PFOS	22.95	18.11
PFUnDS	649	80 99	Q q	65 65	49 47	13C-PFOS		
PFTrDS	749	80 99	Q q	65 65	49 47	13C-PFOS		
4:2 FTS	327	80.5 306.9	q Q	40 40	26 20	13C 6:2 FTS	8.37	7
6:2 FTS	427	80.7 406.9	q Q	40 40	28 30	13C 6:2 FTS	14.8	10.83
8:2 FTS	527	80.7 506.9	q Q	40 40	32 34	13C 6:2 FTS	18.92	15.44
10:2 FTS	627	80.7 606.9	q Q	40 40	37 30	D4-10:2 FTS	21.87	17.14
PFOSA	498	78 169	Q q	50 50	29 32	13C-PFOSA	19.99	14.67
MePFOSA	512	169 219	Q q	40 40	25 22	D3-MePFOSA	22.64	15.84
EtPFOSA	526	169 219	Q q	50 50	25 25	D3-MePFOSA	23.49	16.69
MePFOSAA	570	419 483	Q q	40 40	19 15	D3-MePFOSAA	19.7	16.05
EtPFOSAA	584	419	Q	40	20	D3-MePFOSAA	20.44	16.45

		526	q	40	20			
6:2 diPAP	789	97 443	Q q	40 40	31 19	13C 8:2 diPAP	23.75	18.19
6:2/8:2 diPAP	889	97 443	Q q	40 40	30 20	13C 8:2 diPAP	25.18	19
8:2 diPAP	989	97 543	Q q	50 50	30 25	13C 8:2 diPAP	26.3	19.63
HFPO-DA	285	185 169	Q q	7 7	18 14	13C HFPO-DA	9.7	7.64
DONA	376.97	84.95 250.96	q Q	8 8	26 12	13C HFPO-DA	12.54	9.31
PFECHS	461	99 381	q Q	40 40	24 24	13C-PFOA	14.84	13.47
PFBSA	298	78 64	q Q	50 50	29 32	13C-PFOSA		
MePFBSA	312	219 65	q Q	40 40	25 22	13C-PFOSA		
MePFBSAA	370	283 312	q Q	86 86	26 28	13C-PFOSA		
PFHxSA	398	78 119	q Q	50 50	29 32	13C-PFOSA		
13C-PFBA	217	172	IS	30	8		2.01	3.9
13C-PFPeA	268	223	IS	30	8		4.77	5.96
13C-PFHxA	315	270	IS	40	11		8.72	7.24
13C-PFOA	417	372	IS	40	8		14.95	11.8
13C-PFNA	468	423	IS	40	11		17.13	14.47
13C-PFDA	515	470	IS	50	11		18.95	15.69
13C-PFUnDA	565	520	IS	50	14		20.5	16.57
13C-PFDoDA	615	570	IS	50	14		21.84	17.27
13C-PFTeDA	715	670	IS	50	14		23.96	18.4
13C-PFHxDA	815	770	IS	50	14		25.56	19.25
18O2-PFHxS	403	84	IS	50	40		12.7	10.41
13C-PFOS	503	80	IS	60	40		17.28	15.26
13C 6:2 FTS	429	409	IS	10	24		14.8	10.82
13C-PFOSA	506	78	IS	50	40		19.99	14.68
D3-MePFOSA	515	169	IS	50	40		22.62	15.82
D3-MePFOSAA	573	419	IS	40	20		19.69	16.03
13C 8:2 PAP	545	97	IS	32	16			8.62
13C 8:2 diPAP	993	97	IS	25	20		23.75	18.19
13C HFPO-DA	287	119	IS	10	18		9.7	7.64
D4-10:2 FTS	633	612	IS	40	30		21.87	17.14

Q: transitie voor kwantificatie van de component

q: transitie ter bevestiging (kwalificatie) van de kwantificatietransitie

Opmerking:

Voor 8:2 diPAP is de quantifier transitie (Q) soms geïnterfereerd. Voor deze PFAS mag ook de qualifier transitie (q) gebruikt worden als quantifier.

6.2.3 IDENTIFICATIE EN INTEGRATIE

De per- en polyfluoralkylverbindingen en de interne standaarden worden geïdentificeerd op basis van de criteria voor retentietijden en ionenratio's zoals vermeld in WAC/VI/A/003.

De geïdentificeerde pieken worden geïntegreerd met behulp van de software van de apparatuur en manueel geverifieerd.

6.3 KALIBRATIE

De kalibratie kan op een aantal verschillende manieren gebeuren (voor de kwaliteitseisen waaraan de kalibratie moet voldoen wordt verwezen naar WAC/VI/A/003) :

- aan de hand van kalibratierechten. In dit geval worden aan het begin van de analysereeks minimaal 4 kalibratieoplossingen geanalyseerd met concentraties groter dan 0 en verspreid over het lineair gebied. De laagste concentratie mag niet hoger zijn dan 2 keer de ondergrens van het meetbereik. Op de X-as en de Y-as worden de verhoudingen uitgezet van resp. de concentraties en de piekoppervlakten van de natieve PFAS en de overeenkomstige interne standaard. Vervolgens wordt dmv lineaire regressie de vergelijking van de kalibratierechte berekend. De afwijking van elk punt tot de rechte mag maximum 20% bedragen.
- aan de hand van kwadratische curven. Indien bij de lineariteitstest gebleken is dat er geen lineair maar een kwadratisch verband is tussen concentratie en respons, dan kunnen kwadratische curven gebruikt worden voor de kalibratie. Daartoe worden aan het begin van de analysereeks minimaal 5 kalibratie-oplossingen geanalyseerd met concentraties verspreid over het meetgebied. De laagste concentratie mag niet hoger zijn dan 2 keer de ondergrens van het meetbereik. Op de X-as en de Y-as worden de verhoudingen uitgezet van resp. de concentraties en de piekoppervlakten van de natieve PFAS en de overeenkomstige interne standaard. Vervolgens wordt dmv kwadratische curve fitting de vergelijking van de curve berekend. De afwijking van elk punt tot de curve mag maximum 15% bedragen.

6.4 KWANTIFICATIE

Voor de monsterextracten worden de transitie's geregistreerd op identieke wijze als hierboven beschreven voor de standaardoplossingen. Uitgaande van de integratiewaarden voor het monster en de kalibratierechte/curve bepaald voor de kalibratiestandaard worden de gehalten van de verschillende verbindingen in het monster berekend.

Opmerkingen:

- Het eindextract bedraagt in de regel 1 ml, het monstervolume 50 ml voor drink- en oppervlaktewater en 25 ml voor afvalwater.
- Bij overschrijding van de bovenste grens van het werkgebied dient voor de bepaling van de betrokken fluorverbinding het extract verdund te worden met mobiele fase en opnieuw gemeten. Het extract mag daarbij maximum 10 keer verdund worden. Indien dit niet volstaat mag verder verdund worden met toevoeging van verse interne standaard, op voorwaarde dat de terugvinding van de betrokken IS in het oorspronkelijk extract tussen 30% en 200% ligt; op het analyseverslag dient dit vermeld te worden.
- Voor een aantal perfluorverbindingen (PFOA, PFOS, PFOSA, MePFOSA, EtPFOSA en PFHxS) bestaan de technische mengsels uit zowel lineaire als vertakte isomeren. De standaarden daarentegen zijn zuiver lineaire vormen. Kwantificeer, in afwachting van geschikte

standaarden en duidelijke regelgeving/internationale afspraken, zowel de lineaire als de vertakte vormen gebruikmakend van de MRM-transitie en de RRF-waarde bekomen voor de lineaire vorm.

- Voor PFOA, PFOS, PFOSA, MePFOSA, EtPFOSA en PFHxS worden zowel de lineaire vormen als het totaal van de lineaire en vertakte vormen bepaald. Het totaal van de lineaire en vertakte vormen wordt gerapporteerd als resp. PFOAtotaal, PFOS totaal, PFOSAtotaal, MePFOSAtotaal, EtPFOSAtotaal en PFHxStotaal.
- Als er een som van PFAS gemaakt wordt dan dient het "lower bound" principe toegepast te worden.
- Indien de vertakte PFAS afzonderlijk gerapporteerd dienen te worden dan worden deze berekend als het verschil van het resultaat voor de lineaire en vertakte vormen en het resultaat van de lineaire vorm.

7 KWALITEITSCONTROLES

Voor de kwaliteitseisen ivm kalibratie, procedureblanco, controle op gevoeligheid, controlestaal, driftcontrole en onafhankelijke controlestandaard wordt verwezen naar WAC/VI/A/003.

7.1 CHROMATOGRAFISCHE SCHEIDING

De kolomkwaliteit wordt geverifieerd aan de hand van de scheiding van **het een** kritisch paar, bv. PFOS(vertakt)-PFOS(lineair) **of 2 pieken van vertakte PFOS** in het chromatogram van de oplossing met technische PFOS (zie 4.16).

De scheiding kan op 3 maniere gecontroleerd worden:

- o aan de hand van de piekresolutie. De resolutie dient minsten 0.5 te bedragen. De resolutie wordt gedefinieerd als de verhouding van de afstand tussen de maxima van twee pieken enerzijds en hun gemiddelde piekbreedte aan de basis anderzijds;
- o aan de hand van de piekhoogte en de valleihogte. De verhouding tussen de valleihogte enerzijds en de hoogte van de piek met de laagste respons dient kleiner te zijn dan 0.5;
- o alternatief kan gebruik gemaakt worden van de verhouding tussen enerzijds (piekhoogte laagste piek – valleihogte) en anderzijds de piekhoogte van de laagste piek, deze verhouding dient groter te zijn dan 0.5.

7.2 TERUGVINDING VAN DE ISOTOOPGEMERKTE FLUORVERBINDINGEN

Voor elk monster wordt de terugvinding van de isotoopgemerkte interne standaarden bepaald, d.i. de experimenteel teruggevonden hoeveelheid van elk van de bij het begin van de analyse toegevoegde standaarden. Dit gebeurt door vergelijking van de oppervlakte van de isotoop aangerijkte verbinding bekomen voor het monster ($A_{is}(\text{monster})$) t.o.v. de oppervlakte bekomen voor een kalibratiestandaard ($A_{is}(\text{kalibratiestandaard})$) waarin ongeveer dezelfde concentratie aan natieve verbinding aanwezig is als gemeten in het monsterpreparaat (dit om rekening te houden met de onderdrukking van het signaal van de isotoopgemerkte verbinding door de coëluerende natieve verbinding). De terugvinding wordt gegeven door:

$$R\% = A_{is}(\text{monster}) * 100 / A_{is}(\text{kalibratiestandaard})$$

Het terugvindingsrendement is afhankelijk van sorptiefenomenen, signaalsuppressie/versterking door matrixbestanddelen en extractierendement. Voor een verantwoorde kwantificering dient het terugvindingsrendement van de ^{13}C -gemerkte fluorverbindingen minimaal 30 % en maximaal 200% te bedragen, met uitzondering van 13C-8:2diPAP en 13C-PFHxDA waar de ondergrens 10% bedraagt.

Opmerking:

Als voor een bepaalde interne standaard in praktijk systematisch te hoge of te lage terugvindingen bekomen worden, dan hoeft dit niet als afwijking op het analyserapport vermeld te worden op voorwaarde dat aan de hand van validatiegegevens aangetoond werd dat dit geen negatieve invloed heeft op het resultaat.

8 RAPPORTERING

Vermeld op het analyseverslag het gehalte van elke component in $\mu\text{g/l}$ of ng/l . Vermeld op het verslag ook eventueel vastgestelde afwijkingen.

9 REFERENTIES

ISO 21675:2019: *Water quality — Determination of perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in water — Method using solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)*

Bepaling van ultrakorte keten per- en polyfluoralkylverbindingen (PFAS) in water met LC-MS/MS

INHOUD

1	Doel en toepassingsgebied	3
2	Principe	3
3	Materiaal	4
4	Reagentia en standaarden	4
5	Monsterbewaring	5
6	Analyseprocedure	5
6.1	<i>Staalvoorbereiding</i>	5
6.2	<i>Meting</i>	6
6.2.1	LC-condities	6
6.2.2	MS-condities	6
6.2.3	Identificatie en integratie	7
6.3	<i>Kalibratie</i>	8
6.4	<i>Kwantificatie</i>	8
7	Kwaliteitscontroles	8
7.1	<i>Terugvinding van de isotoopgemerkte fluorverbindingen</i>	8
8	Rapportering	9

1 DOEL EN TOEPASSINGSGEBIED

Deze procedure vervangt procedure WAC/IV/A/026 van oktober 2024. De hieronder beschreven analysemethode wordt gebruikt voor het bepalen van ultra korte keten per- en polyfluoralkylverbindingen (PFAS):

in drink-, grond- en oppervlaktewater
in afvalwater

en is gericht op de kwantificering van volgende componenten:

PFAS	Afkorting	CAS nr
trifluorazijnzuur	TFA	76-05-1
perfluor-n-propaanzuur	PFPrA	422-64-0
perfluor-n-propaansulfonzuur	PFPrS	423-41-6
trifluor-n-methaansulfonzuur	TFMS	1493-13-6
~~penta~~ perfluor-n-ethaansulfonzuur	PFEtS	354-88-1
2,3,3,3-tetrafluor-n-propaanzuur	2,3,3,3-TeFPrA	359-49-9
2,2,3,3-tetrafluor-n-propaanzuur	2,2,3,3-TeFPrA	756-09-2

De verbindingen kunnen bepaald worden vanaf een concentratie zoals vastgelegd in onderstaande tabel:

ng/l	Directe injectie
TFA	4000
PFPrA	500
PFPrS	1000
PFEtS	500
TFMS	500
2,3,3,3-TeFPrA	2500
2,2,3,3-TeFPrA	500

2 PRINCIPE

De waterstalen worden verdund met acetonitrile of methanol en na toevoeging van interne standaarden direct geïnjecteerd in een vloeistofchromatograaf met tandem massaspectrometrische detectie. Waterstalen kunnen ook rechtstreeks (zonder additie van acetonitrile of methanol) geïnjecteerd worden, na toevoeging van de interne standaarden. Het gehalte van de verschillende PFAS wordt berekend met de interne standaard methode.

Opmerkingen:

- ~~Voor sommige PFAS kan geen isotoopdilutie toegepast worden omdat de identieke isotoopgemerkte verbinding niet beschikbaar is. Deze PFAS worden gekwantificeerd aan de hand van een zo goed mogelijk gelijkende isotoopgemerkte verbinding. Als interne standaarden moeten isotoopgemerkte PFAS gebruikt worden. De keuze van interne~~

standaarden is vrij, behalve voor TFA waarvoor verplicht ^{13}C -TFA gebruikt moet worden. ~~Alternatief mag voor deze componenten~~ Voor componenten waarvoor geen identieke isotoopgemerkte verbinding beschikbaar is mag de externe standaardmethode toegepast worden (met controle op de aanwezigheid van matrixeffecten), ofwel kwantificering aan de hand van standaard additie, op voorwaarde dat bij de validatie aangetoond wordt dat daarmee betere resultaten bekomen worden. In geval de meetreeks steeds hetzelfde type monster omvat dan kan de kalibratiereeks aangemaakt worden in het monster of het monsterextract ("matrix matched calibration").

- Om blancoproblemen met ultra korte keten PFAS te minimaliseren kan het nodig zijn om gebruik te maken van "positive displacement" pipetten en/of om de opwerking uit te voeren in een geoptimaliseerd lokaal dat afgezonderd is van de rest van het laboratorium.
- De staalnamerecipiënten en gebruiksmaterialen dienen bij ingebruikname van een nieuwe batch gecontroleerd te worden op contaminatie met ultra korte PFAS
- Ultra korte keten PFAS kunnen in reële stalen soms in hoge concentraties voorkomen. Er bestaat in dat geval een risico dat de daaropvolgende stalen in een meetreeks gecontamineerd worden door overdracht (cross-contamination). Als er een vermoeden is van cross-contamination dan dienen de daaropvolgende stalen opnieuw geanalyseerd te worden.

3 MATERIAAL

- 3.1 Gebruikelijk laboratoriumglaswerk
- 3.2 Injectiespuiten van 25 tot 100 μl voor het doperen van isotoopgemerkte fluorverbindingen of matrixaddities
- 3.3 Analytische balans met een afleesnauwkeurigheid van 0.1 mg
- 3.4 Bovenweger met een afleesnauwkeurigheid van 0.01 g
- 3.5 LC-MS systeem bestaande uit:
 - een HPLC of UPLC vloeistofchromatograaf met injectie-automaat, vloeistofpomp, gethermostatiseerde kolom en ontgassingseenheid
Opm.: met het oog op de reductie van de systeemblanco wordt een isolator of delay kolom, die geplaatst wordt tussen LC-pomp en injector, sterk aanbevolen
 - een tandem quadrupool massaspectrometer met electrospray ionisatiekamer
Opm.: Alternatief kan gebruik gemaakt worden van een ion trap of een hoge resolutie accurate massa (time-of-flight (TOF) of Fourier Transform) massaspectrometer
 - een datastation voor de instelling van de instrumentele settings, de data-acquisitie en de data-analyse
- 3.6 LC-kolom:
 - bv. voor UPLC: Grace Davison PREVAIL $3\mu\text{M}$ C18-SELECT COLUMN 150X2.1MM of PREVAIL $5\mu\text{M}$ C18-SELECT COLUMN 150X2.1MM

4 REAGENTIA EN STANDAARDEN

- 4.1 Methanol, p.a.
- 4.2 Acetonitrile p.a.
- 4.3 Water, ultrapuur
- 4.4 Ammoniumacetaat, p.a.
- 4.5 NH_3 -oplossing, p.a.: bv. 25 %

- 4.6 Stock kalibratieoplossingen van natieve PFAS in methanol: monocomponent stockoplossingen, aangekocht of zelf aangemaakt vanuit de zuivere stoffen
- 4.7 Stock controlestandaard van natieve PFAS: dit is een onafhankelijke mengstandaard in methanol
- 4.8 Standaardoplossing van isotoop aangerijkte PFAS (inwendige standaarden): deze wordt als mengstandaardoplossing aangekocht of aangemaakt mbv individuele standaarden in een concentratie van bv. 400 µg/l. De volgende isotoopgemerkte PFAS worden minimaal gebruikt:

pefluor-n-[1,2,3- ¹³ C ₁]-propaanzuur	¹³ C ₃ -PFPrA
perfluor-n-[1,2,3,4- ¹³ C ₁]-butaansulfonzuur	¹³ C ₃ -PFBS
¹³ C-trifluorazijnzuur	¹³ C ₂ -TFA

- 4.9 Kalibratiestandaarden: maak uitgaande van de stock kalibratieoplossingen van natieve PFAS en de standaardoplossing van isotoop aangerijkte PFAS een reeks verdunningen in acetonitrile/water (1/1) met wisselende concentraties aan natieve PFAS, lopende van bv. 0.1 tot 150 µg/l, en constante concentraties aan isotoop aangerijkte PFAS van bv. 4 µg/l; deze oplossingen worden bij elke meetreeks opnieuw aangemaakt
- 4.10 QC standaarden: uitgaande van de stock controlestandaard worden QC standaarden in acetonitrile/water (1/1) aangemaakt op één of meer concentratieniveaus

5 MONSTERBEWARING

Voor de monsterconservering wordt verwezen naar WAC/I/A/010. ~~voor de monsterbewaring gebeurt bij 4°C in het donker en maximaal gedurende 1 week.~~ Grondwaterstalen (gewoonlijk bemonsterd in het kader van bodemonderzoek) worden bij aankomst in het labo opgeschud en men laat de stalen gedurende minstens 4 uur rusten zodat de deeltjes kunnen uitzakken. Aansluitend worden de stalen voorzichtig gedecanteerd. Niet meer dan de helft van de bovenstaande waterlaag wordt gedecanteerd om zo weinig mogelijk deeltjes in bewerking te nemen. Waterstalen die geanalyseerd worden in het kader van menselijke consumptie worden niet gedecanteerd.

6 ANALYSEPROCEDURE

6.1 STAALVOORBEREIDING

- Bij verdunning met acetonitrile: neem een deelstaal van 1 mL en meng met 1 mL acetonitrile; homogeniseer en vul een meetvial met een afgemeten hoeveelheid van het mengsel en voeg een geschikte hoeveelheid isotoop gemerkte PFAS toe, zodat de theoretische concentraties van de interne standaarden in de meetoplossing gelijk zijn aan deze in de kalibratiestandaarden.

Opmerking: bij verdunning van stalen in ACN kan met sommige LC-kolommen peak splitting van TFA optreden.

- Bij rechtstreekse injectie van het waterstaal: homogeniseer het staal en vul een meetvial met een afgemeten hoeveelheid van het staal; voeg een geschikte hoeveelheid isotoop gemerkte PFAS toe, zodat de theoretische concentraties van de interne standaarden in de meetoplossing gelijk zijn aan deze in de kalibratiestandaarden.

- Analyseer de meetoplossing met directe injectie LC-MS/MS.

De houdbaarheid van meetoplossingen in water:ACN 1:1 bedraagt bij bewaring in de koelkast 1 maand. Preparaten die in de koelkast hebben gestaan worden best gevortext vooraleer deze in de injectie-automaat te plaatsen.

6.2 METING

6.2.1 LC-CONDITIES

Onderstaand zijn typische instellingen weergegeven voor een Grace Davison PREVAIL 3µM C18-SELECT 150X2.1MM kolom.

Typische UPLC-instellingen zijn **bv.:**

- mobiele fase:
 - A= ~~10 mM~~ 2 mM ammoniumacetaat (pH 5)
 - B= acetonitrile
- debiet: 0.3 ml/min
- kolomtemperatuur: 45°C
- injectievolume: 2 µl
- gradiënt:

Tijd min	A%	B%
0	98	2
3	98	2
9	60	40
10	5	95
10.5	5	95
11	98	2
15	98	2

Opmerkingen:

- De LC-analyse kan ook gebeuren met een HPLC configuratie, gebruikmakend van een Grace Davison PREVAIL 5µM C18-SELECT COLUMN 150X2.1MM kolom en gradiënt elutie.
- Voor analyse van waterstalen met hoge zoutconcentraties kunnen betere piekvormen bekomen worden met mobiele fase A = 10 mM ammoniumacetaat (pH 5).

6.2.2 MS-CONDITIES

Alle opnamen worden met Multiple Reaction Monitoring (MRM) uitgevoerd, met ionisatie via electrospray in negatieve modus (ES⁻).

Hieronder zijn bij wijze van voorbeeld, voor een Waters Xevo TQ-S, typische instellingen voor de MS-acquisitie gegeven:

Ion Mode :	ES ⁻
Capillary Voltage :	0.5 kV
Cone Voltage :	componentafhankelijk

Source Offset :	30 V
Desolvation Temperature :	450 °C
Source Temperature :	150 °C
Desolvation :	1000 L/Hr
Cone :	150 L/Hr
Nebuliser :	7 Bar
Ion Energy1 :	1.0
Ion Energy2 :	2.0
Collision gas flow :	0.20 ml/min
Collision energy:	componentafhankelijk

De onderstaande ionentransities worden geregistreerd. Tegelijk zijn typische UPLC retentietijden aangegeven. In de tabel is ook aangegeven welke isotoop gemerkte interne standaard gebruikt kan worden voor de kwantificatie van de natieve verbinding. Om zoveel mogelijk problemen van geringe terugvinding of spreiding van resultaten te vermijden (als gevolg van sorptie aan de recipiëntwand of injector en/of matrixonderdrukking/versterking), dient ernaar gestreefd te worden om een zo groot mogelijk aantal overeenkomstige inwendige standaarden te gebruiken. Voor TFA dient steeds ¹³C-TFA als interne standaard gebruikt te worden.

Compound	Parent (m/z)	Daughter (m/z)	(Q/q)	Cone (V)	Collision (V)	IS	Rt (min)
TFA	113	69	Q	20	12	¹³ C-TFA	3.12
PFPrA	163	119	Q	20	10	¹³ C-PFPrA	6.04
PFPrS	249	80	Q	20	30	¹³ C-PFBS	9.56
PFEtS	199	80	Q	10	20	¹³ C-PFBS	8.00
TFMS	149	80	Q	20	10	¹³ C-PFBS	5.40
2,3,3,3-TeFPrA	145 145	81 101	q Q	10 10	15 15	¹³ C-PFPrA	3.23
2,2,3,3- TeFPrA	145 145	81 101	q Q	10 10	10 15	¹³ C-PFPrA	3.86
¹³ C-TFA	115	70	IS	10	10		3.12
¹³ C-PFPrA	166	121	IS	20	10		6.08
¹³ C-PFBA	217	172	IS	30	8		8.15
¹³ C-PFBS	302	80	IS	50	30		10.0

Q: transitie voor kwantificatie van de component

q: transitie ter bevestiging (kwalificatie) van de kwantificatietransitie

6.2.3 IDENTIFICATIE EN INTEGRATIE

De per- en polyfluoralkylverbindingen en de interne standaarden worden geïdentificeerd op basis van de criteria voor retentietijden en ionenratio's zoals vermeld in WAC/VI/A/003.

De geïdentificeerde pieken worden geïntegreerd met behulp van de software van de apparatuur en manueel geverifieerd.

6.3 KALIBRATIE

De kalibratie kan op een aantal verschillende manieren gebeuren, zie WAC/VI/A/003. Voor de kwaliteitseisen waaraan de kalibratie moet voldoen wordt eveneens verwezen naar WAC/VI/A/003.

6.4 KWANTIFICATIE

Voor de monsterextracten worden de transitie's geregistreerd op identieke wijze als hierboven beschreven voor de standaardoplossingen. Uitgaande van de integratiewaarden voor het monster en de kalibratierechte/curve bepaald voor de kalibratiestandaard worden de gehalten van de verschillende verbindingen in het monster berekend.

Opmerkingen:

- De meetoplossing bedraagt in de regel 1 ml
- Bij overschrijding van de bovenste grens van het werkgebied dient voor de bepaling van de betrokken fluorverbinding de meetoplossing verdund te worden met ofwel water ofwel water:acetonitrile 1:1. Er mag maximum 10 keer verdund worden zodat de interne standaard nog meetbaar is. Indien de concentraties dermate hoog zijn dat meer dan 10 keer verdund moet worden, dan moet verse interne standard toegevoegd worden.
- Als er een som van PFAS gemaakt wordt dan dient het "lower bound" principe toegepast te worden.

7 KWALITEITSCONTROLES

Voor de kwaliteitseisen in verband met kalibratie, procedureblanco, controle op gevoeligheid, controlestaal, driftcontrole en onafhankelijke controlestandaard wordt verwezen naar WAC/VI/A/003.

7.1 TERUGVINDING VAN DE ISOTOOPGEMERKTE FLUORVERBINDINGEN

Voor elk monster wordt de terugvinding van de isotoopgemerkte interne standaarden bepaald, d.i. de experimenteel teruggevonden hoeveelheid van elk van de bij het begin van de analyse toegevoegde standaarden. Dit gebeurt door vergelijking van de oppervlakte van de isotoop aangerijkte verbinding bekomen voor het monster ($A_{is}(\text{monster})$) t.o.v. de oppervlakte bekomen voor een kalibratiestandaard ($A_{is}(\text{kalibratiestandaard})$) waarin ongeveer dezelfde concentratie aan natieve verbinding aanwezig is als gemeten in het monsterpreparaat (dit om rekening te houden met de onderdrukking van het signaal van de isotoopgemerkte verbinding door de coëluerende natieve verbinding). De terugvinding wordt gegeven door:

$$R\% = A_{is}(\text{monster}) * 100 / A_{is}(\text{kalibratiestandaard})$$

Het terugvindingsrendement is afhankelijk van sorptiefenomenen, signaalsuppressie/versterking door matrixbestanddelen en extractierendement. Voor een verantwoorde kwantificering dient het terugvindingsrendement van de ^{13}C -gemerkte fluorverbindingen minimaal 30 % en maximaal 200% te bedragen.

Opmerking:

Als voor een bepaalde interne standaard in praktijk systematisch te hoge of te lage terugvindingen bekomen worden, dan hoeft dit niet als afwijking op het analyserapport vermeld te worden op voorwaarde dat aan de hand van validatiegegevens aangetoond werd dat dit geen negatieve invloed heeft op het resultaat.

8 RAPPORTERING

Vermeld op het analyseverslag het gehalte van elke component in µg/l of ng/l. Vermeld op het verslag ook eventueel vastgestelde afwijkingen.

Bepaling van 17-beta-estradiol in drinkwater

INHOUD

1	Doel en toepassingsgebied	3
2	Principe	3
3	Materiaal	3
4	Reagentia en standaarden	4
5	Monsterbewaring	4
6	Voorbehandeling	4
7	Extractie	4
8	Meting	5
8.1	<i>Meetcondities</i>	5
8.2	<i>Identificatie en integratie</i>	6
8.3	<i>Kalibratie en kwantificatie</i>	6
9	Kwaliteitscontrole	7
9.1	<i>Terugvinding van de interne standaard</i>	7
9.2	<i>QC monster</i>	7
10	Veiligheid	8
11	Referentie	8

1 DOEL EN TOEPASSINGSGEBIED

Deze procedure is nieuw en wordt gebruikt voor de analyse van 17-beta-estradiol in drinkwater. De methode is gericht op de kwantificering van:

Naam	CAS-nr
17-beta-estradiol	50-28-2

2 PRINCIPE

Aan waterstalen worden gekende hoeveelheden isotoop gemerkte verbindingen toegevoegd. De waterstalen worden vervolgens geëxtraheerd met vaste fase extractie. De vaste fase wordt geëluëerd met methanol en het methanolextract wordt ingedampt. Het residu wordt opgenomen in een gekend volume mobiele fase en geanalyseerd met vloeistofchromatografie met massaspectrometrische detectie. Het gehalte van 17-beta-estradiol wordt berekend met de interne standaard methode.

Opmerkingen:

- In deze methode is een offline vaste fase extractie beschreven. De vaste fase extractie kan alternatief ook met een online SPE module uitgevoerd worden.

3 MATERIAAL

- Gebruikelijk laboratoriumglaswerk
- Analytische balans met een afleesnauwkeurigheid van 0.1 mg
- Bovenweger met een afleesnauwkeurigheid van 0.01 g
- Injectiespuiten of micropipetten voor de additie van isotoopgemerkte hormonen of van natieve hormonen (matrixaddities)
- Meetvials
- SPE-opstelling voor elutie van de SPE disks
- SPE disks, bv. Supelco Empore C18 (47 mm)

Opmerkingen:

- o Andere SPE fasen zijn mogelijk; validatie-experimenten dienen aan te tonen dat voldoende terugvinding en reproduceerbaarheid wordt bekomen.
 - o Ook online SPE is toegelaten
 - o In plaats van SPE-disks kunnen ook SPE-kolommetjes toegepast worden.
- Eenheid voor indampen onder stikstofstroom met regelbaar debiet
- LC-MS/MS bestaande uit:
 - o een LC-systeem (hoge druk of ultra hoge druk) met injectie-automaat, vloeistofpomp, gethermostatiseerde kolom en ontgassingseenheid

- o een tandem quadrupool massa spectrometer met electrospray en ev. APCI interface
Opm.: alternatief kan gebruik gemaakt worden van een ion trap of een accurate massa (time-of-flight (TOF) of Fourier Transform) massaspectrometer
 - o een datastation voor de instelling van de instrumentele settings, de data-acquisitie en de data-analyse
- LC-kolom: een reversed phase kolom, bv. Waters Acquity UPLC BEH C18, 1.7 μm , 2.1 x 100 mm voor UPLC-meting

4 REAGENTIA EN STANDAARDEN

- Methanol: bv. Merck 'gradiënt grade, for liquid chromatography'
- Acetonitrile: bv. Merck 'gradiënt grade, for liquid chromatography'
- Water: ultrapuur
- Ascorbinezuur: p.a. (conserveringsmiddel)
- Ammoniumhydroxyde 29% p.a.
- Stockstandaard 17-beta-estradiol: uitgaande van zuiver vast product of van een aangekochte oplossing wordt een stockoplossing van bv. 1000 $\mu\text{g/ml}$ in methanol bereid.
- Interne standaard: isotoop gelabeld 17-beta-estradiol, bv. $^{13}\text{C}_3$ -17-beta-estradiol
- Stockstandaard interne standaard: uitgaande van zuiver vast product of van een aangekochte oplossing wordt een stockoplossing van bv. 500 $\mu\text{g/ml}$ in methanol bereid.
- Werkoplossing interne standaard: uitgaande van de stockstandaard van de interne standaard wordt een werkoplossing gemaakt in methanol die bv. 100 $\mu\text{g/l}$ bevat.
- Kalibratiewerkstandaarden: maak uitgaande van de stockstandaarden een reeks van minstens 4 verdunningen (bij kwadratische kalibratie: 5 verdunningen) in 50% methanol in water. De concentraties van 17-beta-estradiol variëren van bv. 0.05 tot 10 $\mu\text{g/l}$ en de concentraties van de interne standaarden zijn constant, bv. 2 $\mu\text{g/l}$.
- QC-controlestaal: maak een controlestaal aan door additie van 17-beta-estradiol aan een blanco waterstaal. De concentratie van 17-beta-estradiol ligt bij voorkeur in het midden van het meetbereik.

5 MONSTERBEWARING

Voor de monsterconservering en -bewaring wordt verwezen naar WAC/I/A/010.

6 VOORBEHANDELING

Alle stalen, inclusief procedureblanco's en controlestalen, dienen conserveringsmiddel te bevatten (150 mg/l ascorbinezuur). De stalen worden niet gefiltreerd.

7 EXTRACTIE

Voeg aan het volledige waterstaal (1 liter) een gekende hoeveelheid interne standaard werkoplossing toe zodat de concentratie van de interne standaard in het staaextract ongeveer gelijk is aan de concentratie van de IS in de kalibratiewerkoplossingen. Het watermonster wordt vervolgens gehomogeniseerd door opschudden.

Een voorbeeld van extractiewijze met C18 SPE disk patronen is hieronder opgenomen.

De procedure omvat volgende stappen:

- Reinig de SPE-disk met achtereenvolgens 10 ml en 5 ml methanol
- conditioneer de SPE-disk met 10 ml MeOH, laat onder vacuüm intrekken tot er nog 1 ml over blijft (de disk mag niet droog komen)
- conditioneer de SPE-disk vervolgens met 10 ml water, laat onder vacuüm intrekken tot er nog 1 ml over blijft (de disk mag niet droog komen)
- breng het waterstaal (1 liter) op de disk, laat onder vacuüm intrekken tot er nog 1 ml overblijft (de disk mag niet droog komen)
- spoel de monsterfles na met 10 ml MeOH 15% in water
- trek de disk droog gedurende 10 tot 15 min
- plaats een collecteervial onder de disk
- breng 5 ml MeOH op de disk en laat 1 minuut inwerken, zet daarna het vacuüm aan en vang het eluaat op (traag elueren)
- herhaal nog 2 keer met telkens 5 ml MeOH
- damp het extract in onder een N₂ stroom tot 0.5 ml
- voeg 0.5 ml water:methanol (1:1) toe

8 METING

8.1 MEETCONDITIES

Een voorbeeld van een geschikte kolom voor UPLC bepaling is de Acquity UPLC BEH C18, 1.7 µm, 2.1 x 100 mm.

Typische UPLC-instellingen zijn:

- mobiele fase: A= Water + 0.02% NH₄OH
- mobiele fase B= MeOH + 0.02% NH₄OH
- debiet: 0.3 ml/min
- kolomtemperatuur: 50 °C
- injectievolume: 100 µl
- gradiënt:

Tijd (min)	%A	% B
0	70	30
1.00	70	30
2.50	5	95
4.00	5	95
4.20	70	30
6.00	70	30

Hieronder zijn typische instellingen voor de MS-acquisitie gegeven:

MS parameter	HPLC-MS/MS
Polariteit	ESI-
Capillary Voltage (kV)	2.5
Brontemperatuur	150
N2 desolvation temperatuur (°C)	650
N2 desolvation gas flow, (L/Hr)	1200
Cone gas flow (L/hr)	150
Cone voltage (V)	40
Collision gas flow (ml/min)	0.2
Collision cell pressure (bar)	7

De onderstaande ionentransities worden typisch geregistreerd.

component	ESI mode	Parent (m/z)	daughter (m/z)	Cone (V)	Collision (eV)	Interne standaard
17-beta-estradiol	ESI+	271.2	145.1	50	40	13C6-estradiol
		271.2	183.0	50	40	
13C3-estradiol	ESI+	274.2	148.1	50	40	
		274.2	186.1	50	40	

8.2 IDENTIFICATIE EN INTEGRATIE

De dataverwerking gebeurt met de software van het apparaat. Extraheer voor elke verbinding uit bovenstaande tabel de overeenstemmende ionen chromatogrammen en bepaal van elke geïdentificeerde piek de oppervlakte. De identificatie en kwantificatie van 17-beta-estradiol gebeurt op basis van de retentietijden en van de ionenratio's van de transities in bovenstaande tabel, op basis van de criteria vermeld in WAC/VI/A/003.

8.3 KALIBRATIE EN KWANTIFICATIE

De kalibratie kan op een aantal verschillende manieren gebeuren (voor de kwaliteitseisen waaraan de kalibratie moet voldoen wordt verwezen naar WAC/VI/A/003) :

- aan de hand van kalibratierechten. In dit geval worden aan het begin van de analysereeks minimaal 4 kalibratieoplossingen geanalyseerd met concentraties groter dan 0 en verspreid over het lineair gebied. De laagste concentratie mag niet hoger zijn dan 2 keer de ondergrens van het meetbereik. Op de X-as en de Y-as worden de verhoudingen uitgezet van resp. de concentraties en de piekoppervlakten van de natieve hormonen en de overeenkomstige interne standaard. Vervolgens wordt dmv lineaire regressie de vergelijking van de kalibratierechte berekend. De afwijking van elk punt tot de rechte mag maximum 20% bedragen.
- aan de hand van kwadratische curven. Indien bij de lineariteitstest gebleken is dat er geen lineair maar een kwadratisch verband is tussen concentratie en respons, dan kunnen kwadratische curven gebruikt worden voor de kalibratie. Daartoe worden aan het begin van de analysereeks minimaal 5 kalibratie-oplossingen geanalyseerd met concentraties verspreid over het meetgebied. De laagste concentratie mag niet hoger zijn dan 2 keer de ondergrens van het meetbereik. Op de X-

as en de Y-as worden de verhoudingen uitgezet van resp. de concentraties en de piekoppervlakten van de natieve hormonen en de overeenkomstige interne standaard. Vervolgens wordt dmv kwadratische curve fitting de vergelijking van de curve berekend. De afwijking van elk punt tot de curve mag maximum 15% bedragen.

De berekening van de kalibratiecurve gebeurt bij elke analysereeks. Om de 10 monsterinjecties wordt de geldigheid van de kalibratierechte gecontroleerd door injectie van een kalibratiestandaard uit het midden van de kalibratiereeks. De berekende concentratie mag maximum 30% afwijken van de werkelijke concentratie.

De concentraties van 17-beta-estradiol in het monster wordt vervolgens berekend met behulp van de kalibratierechte of curve.

Opmerking: bij overschrijding van de bovenste grens van het werkgebied het staal verdund te worden met 50% methanol. Er mag maximum 10 keer verdund worden. Indien omwille van lineariteit meer verdund moet worden dan wordt verse interne standaard aan het meetextract toegevoegd; dit dient op het analyseverslag vermeld te worden.

9 KWALITEITSCONTROLE

Voor de kwaliteitseisen ivm procedureblanco en controle op gevoeligheid wordt verwezen naar WAC/VI/A/003.

9.1 TERUGVINDING VAN DE INTERNE STANDAARD

Voor elk monster wordt de terugvinding van de isotoopgemerkte interne standaard bepaald, dit is de experimenteel teruggevonden hoeveelheid van de bij het begin van de analyse toegevoegde interne standaard. Dit gebeurt door vergelijking van de piekoppervlakte van de isotoop gemerkte verbinding bekomen voor het monster ($A_{is(monster)}$) t.o.v. de gemiddelde piekoppervlakte bekomen voor een kalibratiestandaarden ($A_{is(standaard)}$).

De terugvinding wordt gegeven door:

$$\text{Terugvinding \%} = A_{is(monster)} / A_{is(standaard)} * 100$$

Voor een verantwoorde kwantificering dient het terugvindingsrendement van de ^{13}C -gemerkte interne standaard minimaal 50 % en maximaal 200% te bedragen.

Opmerking: bij waterstalen die veel ijzer bevatten kan door reactie met ascorbinezuur een neerslag ontstaan dat de extractie hindert. In dat geval kan de terugvinding van de interne standaard lager liggen dan 50%. Als de terugvinding tussen 10% en 50% ligt mag een kwantitatief resultaat gerapporteerd worden mits toevoeging van een opmerking op het analyseverslag. Bij een terugvinding van minder dan 10% mag geen kwantitatief resultaat gerapporteerd worden.

9.2 QC MONSTER

Om de terugvinding en de reproduceerbaarheid te controleren wordt bij elke meetreeks het QC-controlestaal geanalyseerd (zie punt 4: Reagentia en standaarden). De terugvindingen van 17-beta-

estradiol moet gelegen zijn tussen 70% en 130%. Het gehalte wordt opgetekend in een controlekaart en de opgetekende waarden worden getoetst aan de voor controlekaarten geldende criteria.

10 VEILIGHEID

De scheikundige producten die bij deze analysemethode gebruikt worden, zijn ondergebracht bij de potentieel giftige en kankerverwekkende stoffen. Dit maakt het noodzakelijk de voorziene maatregelen in het laboratorium toe te passen om blootstelling aan of contact met deze producten tot een minimum te herleiden.

11 REFERENTIE

EPA method 539: Determination of hormones in drinking water by solid phase extraction (SPE) and liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS)

Bepaling van totaal kiemgetal

INHOUD

1	TOEPASSINGSGEBIED	3
2	PRINCIPE	3
3	OPMERKINGEN	3
4	APPARATUUR EN MATERIAAL	4
4.1	<i>Apparatuur</i>	4
4.2	<i>Materiaal</i>	4
5	REAGENTIA EN BEREIDINGEN	4
5.1	<i>Reagentia</i>	4
5.2	<i>Bereidingen</i>	4
5.2.1	Yeast extract agar	4
5.2.2	EasyDisc YEA	5
6	PROCEDURE	5
6.1	<i>Monstervoorbereiding</i>	5
6.2	<i>Analyse</i>	5
6.3	<i>Incubatie</i>	6
7	RAPPORTERING	6
7.1	<i>Berekening van het resultaat</i>	6
7.2	<i>Rapport</i>	7
8	REFERENTIES	7

1 TOEPASSINGSGEBIED

De procedure is van toepassing bij het bacteriologisch onderzoek van drinkwater, mineraal water, grondwater, afvalwater, oppervlaktewater en recreatiewater.

Bepaling van de parameter totaal kiemgetal in water bij 22°C en 36°C (ISO 6222) wordt uitgevoerd door gebruik te maken van YEA. [...]

Voor de analyse van drinkwater DW mag de techniek EasyDisc YEA van IDEXX gebruikt worden.

Totaal kiemgetal of leefbare telling van water omvat alle cultiveerbare aërobe bacteriën, gisten en schimmels die kolonies vormen in het medium yeast extract agar volgens de hieronder beschreven omstandigheden.

Theoretisch kan de aanwezigheid van één kolonievormende eenheid per ml bepaald worden. Door de aanwezigheid van stoorflora en andere matrix-invloeden is dit niet altijd het geval.

2 PRINCIPE

Een monster, en/of verdunningen ervan worden rechtstreeks via de YEA gietplaatmethode (inoculatie van het monster in een specifiek groeimedium in petriplaten) of voor DW met EasyDisc geanalyseerd. De platen worden geïncubeerd bij 22°C en bij 36°C.

Het aantal kve worden per ml bij een welbepaalde temperatuur bepaald.

3 OPMERKINGEN

Voor de conservering en behandeling van watermonsters wordt verwezen naar WAC/I/A/010.

Voor kwaliteitscontrole wordt verwezen naar WAC/VI/A/003.

Het laboratorium dient uitgerust te zijn met een microbiologische veiligheidswerkkast MVK (4.1.9) en een gevalideerde autoclaaf (4.1.1).

Elk werkoppervlak wordt voor en na gebruik ontsmet met een biocide naar keuze (5.1.3).

Na het gieten van het YEA (5.1.1) agarmedium in petriplaten, dient het oppervlak van de agarplaten gedroogd te worden. Hiervoor worden de platen, met de agarbodem naar boven, dakpansgewijs van het deksel geplaatst en gedroogd in een MVK (4.1.9), [...] (15 tot 30 minuten).

4 APPARATUUR EN MATERIAAL

4.1 APPARATUUR

- 4.1.1 Autoclaaf $121 \pm 3^{\circ}\text{C}$
- 4.1.2 Warmwaterbad afgestemd zodat het YEA medium in het gebruikte recipiënt voldoet aan $45 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 4.1.3 Incubator $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- 4.1.4 Incubator $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- 4.1.5 Schudtoestel
- 4.1.6 Vortex
- 4.1.7 Kolonietelapparaat
- 4.1.8 Pipetus akku
- 4.1.9 Microbiologische veiligheidswerkkast MVK
- 4.1.10 Koelkast $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$

4.2 MATERIAAL

- 4.2.1 Automatische pipet van 1000 μl met steriele tips met filter
- 4.2.2 Glazen tubes en flessen
- 4.2.3 Wegwerppipetten
- 4.2.4 Steriele petriplaten

5 REAGENTIA EN BEREIDINGEN

5.1 REAGENTIA

- 5.1.1 Yeast extract agar YEA of EasyDisc YEA¹
- 5.1.2 Ringer 1/4 of 1/40 oplossing²
- 5.1.3 Umonium³⁸ 2,5% of gelijkwaardig biocide
- 5.1.4 Ultra puur water

5.2 BEREIDINGEN

5.2.1 YEAST EXTRACT AGAR

Los YEA (5.1.1) in ultra puur water (5.1.4), autoclaveer (4.1.1) bij $121 \pm 3^{\circ}\text{C}$ gedurende 15 ± 1 minuten en breng de recipiënten (flessen of tubes 4.2.2) onmiddellijk in een warmwaterbad (4.1.2) tot het medium volledig op temperatuur van $45 \pm 1^{\circ}\text{C}$ gekomen is (nodige tijd te valideren en maximum 4 uren).

Indien de YEA niet dagvers gebruikt wordt, stockeer het gestold medium gedurende maximum 3 maanden in een koelkast (**Fout! Verwijzingsbron niet gevonden.**). Smelt het medium op vóór

¹ NF validatie versus ISO 6222

² Om een verdunningsreeks van een watermonster aan ten maken mogen naast Ringer 1/4 of 1/40 andere geschikte diluenten worden gebruikt zoals vermeld in ISO 8199 (Water quality - General guide to the enumeration of micro-organisms by culture) alsook steriel leidingswater. De ISO lijst is niet beperkend.

gebruik en breng in een warmwaterbad (4.1.2) tot het medium volledig op temperatuur van $45\pm 1^\circ\text{C}$ gekomen is (voorwaarden zie hierboven).

5.2.2 EASYDISC YEA

Gebruik de kant en klare EasyDisc YEA. Deze dienen bewaard te worden bij 2 - 25°C, buiten bereik van licht en vochtigheid. Ongebruikte platen moeten in een afgesloten zakje bewaard worden.

6 PROCEDURE

6.1 MONSTERVERBEREIDING

Een monster wordt gehomogeniseerd door de fles grondig te schudden, ofwel door de fles op een schudtoestel (4.1.5) te brengen en gedurende de voorbereidingen van de analyses te schudden.

Uit voorkennis van een monster wordt -indien nodig- een verdunningsreeks gemaakt. Van een te verdunnen watermonster worden drie opeenvolgende verdunningen geanalyseerd 10^0 tot 10^{-2} , of van 10^{-1} tot 10^{-3} .

Aan de hand van wegwerppipetten (4.2.3) bediend door de pipetus (4.1.8) wordt een verdunning uitgevoerd met stappen factor 10:

- in tubes (4.2.2) gevuld met 9 ml (of een veelvoud hiervan) steriele diluent (5.1.2) waaraan 1 ml (of een veelvoud hiervan) van de suspensie van de hoogste verdunning wordt toegevoegd; mengen met vortex (4.1.6).
- in flessen (4.2.2) gevuld met 450 ml steriele diluent (voor ringtestmonsters) (5.1.2) waaraan 50 ml van de suspensie van de hoogste verdunning wordt toegevoegd; mengen met de hand of op een schudtoestel (4.1.5).

De procedure wordt achtereenvolgend uitgevoerd tot de gewenste verdunningen zijn bereikt.

6.2 ANALYSE

Volgens ISO 6222 is theoretisch het inzetten in enkelvoud van de platen per verdunning en per temperatuur voldoende, maar het is aanbevolen om telkens twee platen te testen.

6.2.1 via de gietplaatmethode

- Identificeer telkens één/twee petriplaten (4.2.4) per temperatuur voor elke verdunning.
- Nadat het te analyseren monster goed gehomogeniseerd is, inoculeer de platen bestemd voor de twee incubatietemperaturen telkens met 1 ml van elke verdunning aan de hand van een automatische pipet (4.2.1) met steriele tip. Voeg hieraan 15 - 20 ml vloeibare YEA.
- Na grondig vermengen door cirkelvormige beweging worden de platen gedroogd in de veiligheidskabinet (4.1.9) door de deksels dakpansgewijs op een half open petrischaal te verplaatsen (zie punt 3).

6.2.2 via EasyDisc³

- Identificeer telkens één/twee EasyDisc YEA platen (4.2.4) per temperatuur voor elke verdunning.

³ Voor het gebruik van EasyDisc YEA voor DW dient een beperkte implementatie-verificatie uitgevoerd te worden (intra-labo reproduceerbaarheid en terugvinding) ten opzichte van de ISO 6222 referentiemethode.

- Nadat het te analyseren monster goed gehomogeniseerd is, verwijder het wit deksel en voeg telkens 1 ml van elke verdunning (aan de hand van een automatische pipet (4.2.1) met steriele tip) toe aan een EasyDisc YEA-plaat bestemd voor de twee incubatietemperaturen.
- Draai elke plaat voorzichtig rond om de vloeistof over het volledig oppervlak te verdelen, plaats het deksel erop en laat de plaatjes gedurende ± 20 minuten bij kamertemperatuur staan.

6.3 INCUBATIE

- Incubeer de platen (YEA geïnverteerd / EasyDisc met wit deksel naar boven) in een incubator van:
 - $36 \pm 2^\circ\text{C}$ (4.1.4) gedurende 40 - 48 h.
 - $22 \pm 2^\circ\text{C}$ (4.1.3) gedurende 64 - 72 h.
- Lees de platen zo vlug mogelijk af na verwijderen uit de incubator, zoniet bewaar ze eerst in de koelkast (**Fout! Verwijzingsbron niet gevonden.**) en lees ze af binnen de 48 uur.
- Elimineer elke schaal die een confluerende groei vertoont.
- Tel de kolonies met behulp van een kolonietelapparaat (4.1.7). Voor de EasyDisc tel de **blauwe en mogelijks doorschijnende/ beige** kolonies doorheen de transparante zijde van een plaatje. Bepaal (indien twee platen werden geïnoculeerd) de gemiddelde waarde van de kolonietellingen, en dit voor beide temperaturen. De ideale uitplating bij YEA gietplaten bevat tussen 25 en 300 kolonies, bij EasyDiscs tussen 10 en 100 kolonies.

7 RAPPORTERING

Bepaal voor elke temperatuur de kve waarden per ml watermonster aan de hand van onderstaande berekening.

Overgroeide platen mogen niet worden beoordeeld.

7.1 BEREKENING VAN HET RESULTAAT

$$Cs = \frac{Z}{V_{to} \times t} \times Vs$$

Cs is het aantal kve / ml monster

Z is de som van de kolonies geteld op een gietplaat van de verschillende diluties $d_1, d_2, \dots, d_i$

Vs is het referentievolumen om de concentratie van het aantal micro-organismen in het monster uit te drukken (= 1ml)

Vtot is berekend totaal volume van het monster overeenkomstig de getelde platen:

$$V_{tot} = (n_1 V_1 d_1) + (n_2 V_2 d_2) + \dots + (n_i V_i d_i)$$

met

$n_1, n_2, \dots, n_i$ is het aantal platen geteld met dilutie $d_1, d_2, \dots, d_i$

$V_1, V_2, \dots, V_i$ is het getest volume met dilutie $d_1, d_2, \dots, d_i$

$d_1, d_2, \dots, d_i$ is de dilutie van het getest volume $V_1, V_2, \dots, V_i$ ($d = 1$ voor een onverdund monster, $d = 0,1$ voor een 1/10 verdunning enz.).

Het eindresultaat is dus functie van het gemiddelde per verdunning van het resultaat op elke plaat.

Indien geen kolonies aanwezig zijn op platen geïncubeerd met een onverdund monster, wordt het resultaat als < 1 kve / ml of als 0 kve / ml weergegeven.

Indien meer dan 300 (YEA gietplaten), resp. 100 (EasyDiscs), kolonies op de geïnoculeerde platen met de grootste verdunning 10^{-x} voorkomen, wordt het resultaat als benaderend weergegeven (geschat aantal $> 3,0 \cdot 10^{x+2}$, resp. $> 1,0 \cdot 10^{x+2}$, kve/ml).

Het resultaat wordt uitgedrukt als een waarde tussen 1,0 en $9,9 \cdot 10^x$ kve/ml.

7.2 RAPPORT

Vermeld in het rapport:

- de identificatie van het monster, en alle gegevens over de monstername
- de verwijzing naar de betreffende WAC-methode
- (incubatietijd) en -temperatuur
- het resultaat
- bijzondere opmerkingen

8 REFERENTIES

- ISO 6222 (1999) Water quality – Enumeration of culturable micro-organisms – colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium
- NPR 6267 (2002/07) Toelichting bij NEN-EN-ISO 6222:1999. Water - Telling van kweekbare micro-organismen – Bepaling van het koloniegetal door enting in voedingsbodem van gistextract
- ISO 8199:2018 Water quality — General requirements and guidance for microbiological examinations by culture
- ISO 19458 (2006) Water quality – sampling – General guide for sampling, transport, preservation and handling of samples for microbiological analysis
- WAC/I/A/010 Conservering en behandeling van watermonsters
- WAC/VI/A/003 Kwaliteitseisen voor de analysemethoden
- ISO 16140-2:2016 Microbiology of the food chain - Method validation - Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method
- ISO 16140-3:2021 Microbiology of the food chain - Method validation - Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory
- [ASTM D8516-23](#) Standard Test Method for Quantification of Culturable Waterborne Bacteria Using a Defined Culture Medium Coated Plate with EasyDisc
- EasyDisc AFNOR NF certificering, certificaat N° [IDX 33/09-03/22](#).
- <https://www.idexx.com/en/water/water-products-services/easydisc-water-microbiology-tests/easydisc-yea-test/>

Bepaling van totale coliformen en E.coli

INHOUD

1	TOEPASSINGSGEBIED	3
2	PRINCIPE	3
2.1	Membraanfiltratie	3
2.2	Quanti-Tray Colilert methode	4
2.3	MPN microtiterplaat methode	4
2.4	Uitdrukking van de resultaten	4
3	OPMERKINGEN	5
4	APPARATUUR EN MATERIAAL	5
4.1	Apparatuur	5
4.2	Materiaal	5
5	REAGENTIA EN BEREIDINGEN	6
5.1	Reagentia	6
6	PROCEDURE	6
6.1	Monstervoorbereiding	6
6.2	Analyse via de membraanfiltratie	7
6.3	QUANTI-TRAY COLILERT methode	9
6.4	MPN microtiterplaat methode	9
6.5	Identificatie van coliformen en E.coli door middel van MALDI-TOF MS (MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION-IONIZATION TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY)	9
7	RAPPORTERING	9
8	REFERENTIES	9

1 TOEPASSINGSGEBIED

De procedure is van toepassing bij het bacteriologisch onderzoek van drinkwater, grondwater, oppervlaktewater (incl. recreatiewater) en afvalwater.

- De bepaling van de parameters coliformen en *E.coli* in waters met weinig achtergrondflora (standaard toe te passen voor drinkwater en voor grondwater) dient [...] conform de norm Water quality - Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria - Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora (ISO 9308-1:2014) uitgevoerd te worden. De chromogene voedingsbodem CCA dient een identieke samenstelling te hebben conform de norm (zie verder § 5.1.2).
Alternatief kan de "Rapid'E.coli 2 Agar for Water Testing" ¹ (AFNOR gecertificeerd conform het AFNOR protocol, Fr.) worden aangewend.
- Voor te analyseren waters met veel achtergrondflora (standaard toe te passen voor oppervlaktewater) dient de ChromoCult® Coliform Agar met het E. coli/Coliform Selectief Supplement ² (EU goedgekeurd, Sp.) of de "Rapid'E.coli 2 Agar for Water Testing" (AFNOR gecertificeerd conform het AFNOR protocol, Fr.) gebruikt te worden. Dit zijn media waaraan een supplement wordt toegevoegd om overvloedig aanwezige interfererende flora te onderdrukken.
- De bepaling van *Escherichia coli* en totale coliformen kan alternatief via de MPN methode (ISO 9308-2) uitgevoerd worden, dit voor alle types water.
- Voor oppervlakte- en afvalwater, in het bijzonder deze met veel gesuspendeerd materiaal kan eveneens *E.coli* via de microtiter / MPN methode (ISO 9308-3) uitgevoerd worden.

Totale coliformen zijn Enterobacteriaceae die β -D-galactosidase (GAL) tot expressie brengen.

Escherichia coli zijn Enterobacteriaceae die β -D-galactosidase en β -D-glucuronidase (GLUC) tot expressie brengen.

In de methodes worden media aangewend die 2 chromogene substraten bevatten:

- een substraat dat specifiek is voor GLUC en dat een specifieke kleur veroorzaakt bij de kolonies die positief zijn voor dit enzym
- een substraat dat specifiek is voor GAL en dat een bijkomende specifieke kleur veroorzaakt bij de kolonies die positief zijn voor dit enzym.

Escherichia coli (GAL+/GLUC+) vormt een gecombineerde gekleurde kolonies op chromogene media. Andere coliformen (GAL+/GLUC-) vormen andere contrasterende gekleurde kolonies.

2 PRINCIPE

2.1 MEMBRAANFILTRATIE

De ISO 9308-1 beschrijft een methode voor de telling van *E. coli* en coliformen gebaseerd op membraanfiltratie, groei op een chromogene coliform agarmedium bij 36°C, en de berekening van

¹ Geproduceerd door Bio-Rad Laboratories

² Geproduceerd door Merck (Vancomycin en Cefsulodin)

het aantal doelorganismen in het monster. Door de lage selectiviteit van het agar medium kan achtergrond groei interfereren met de kwantificering van *E. coli* en coliformen, bijvoorbeeld in oppervlaktewater of ondiep water. Deze methode is niet geschikt voor deze soorten water. De methode is bijzonder geschikt voor water met een laag aantal bacteriën tot 100 kolonies op chromogenic coliformen agar (CCA). Sommige *E.coli* stammen die β -D-glucuronidase negatief zijn zoals *Escherichia coli* O157, zullen niet als *E.coli* gedetecteerd worden. Aangezien deze enkel β -D-galactosidase positief zijn, verschijnen ze als coliformen op dit chromogene agar.

De membraanfiltratie-methode op ChromoCult® Coliform Agar met het *E. coli*/Coliform Selectief Supplement [...] gebeurt volgens hetzelfde principe, maar door de aanwezigheid van een selectief supplement in het medium worden de belangrijkste storende flora in het water afgeremd.

Rapid'E.coli for Water Testing is gevalideerd voor oppervlaktewater alsook voor drinkwater.

Om te voorkomen dat vals positieve resultaten worden veroorzaakt door oxidase positieve bacteriën zoals *Aeromonas spp.*, worden de presumptieve coliformen kolonies vanop CCA of vanop Rapid'E.coli for Water Testing bevestigd door een negatieve oxidase reactie of door een identificatie.

2.2 QUANTI-TRAY COLILERT METHODE

Voor analyse van drink-, oppervlakte-, grond(put-), of afvalwater kan voor de detectie van coliformen/ *E.coli* op basis van hetzelfde principe met dezelfde simultane detectie gebaseerd op de enzymatische reacties β -D-glucuronidase (GLUC) en β -D-galactosidase (GAL) via de MPN Quanti-Tray Colilert methode conform ISO 9308-2 gebruikt worden. De Quanti-Tray Colilert is weliswaar voorzien zijn van een supplement specifiek ter onderdrukking van nevenflora.

Aan een 100ml watermonster wordt een Colilert reagens toegevoegd, het watermonster wordt overgebracht in de Quanti-Tray, dat wordt geseald en geïncubeerd bij 36°C. Tellingen van gekleurde en UV fluorescerende cupjes worden aan de hand van MPN tabellen omgezet in een resultaat.

2.3 MPN MICROTITERPLAAT METHODE

Volgens hetzelfde principe kan de telling via ISO 9308-3 de microtiter / MPN methode gebeuren: β -D-glucuronidase-positieve micro-organismen groeien in een specifiek medium dat 4-methyl-umbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG) bevat, bij een incubatietemperatuur van 44°C.

Het verdund monster wordt geïnoculeerd in alle rijen cups van een microtiterplaat dat gedroogd medium bevat. De microtiterplaten worden onderzocht onder UV van 366 nm na minimum 36 uur tot maximum 72 uur incubatie bij 44°C. De aanwezigheid van *E.coli* wordt aangeduid met blauwe fluorescentie door hydrolyse van MUG.

2.4 UITDRUKKING VAN DE RESULTATEN

Het aantal kve totale coliformen en *E.coli* worden bij membraanfiltratie per 100 ml bepaald.

Bij de quanti-tray methode en de microtiterplaat worden de resultaten weergegeven als MPN waarde per 100ml.

Theoretisch kan respectievelijk de aanwezigheid van 1 kolonievormende eenheid per 100 ml bepaald worden met de filtratietechniek, en 2 kve per 100 ml voor de MPN techniek. Door de aanwezigheid van stoorflora en andere matrix-invloeden is dit niet altijd het geval.

3 OPMERKINGEN

Voor de conservering en behandeling van watermonsters wordt verwezen naar WAC/I/A/010.

Voor kwaliteitscontrole wordt verwezen naar WAC/VI/A/003.

Het laboratorium dient uitgerust te zijn met een microbiologische veiligheidswerkkast MVK (4.1.8) en een gevalideerde autoclaaf (4.1.1).

Elk werkoppervlak wordt voor en na gebruik ontsmet met een biocide naar keuze (5.1.6).

Vóór het enten van agarmedia in petriplaten, enkel indien nodig, dient het oppervlak van de agarplaten gedroogd te worden. Hiervoor worden de platen, met de agarbodem naar boven, dakpansgewijs van het deksel geplaatst en gedroogd in een MVK (4.1.8). Afhankelijk van de periode vanaf de bereidingsdatum tot het in gebruik nemen van de platen, kan de droogtijd variëren (15±20 minuten).

4 APPARATUUR EN MATERIAAL

4.1 APPARATUUR

- 4.1.1 Autoclaaf $121 \pm 3^{\circ}\text{C}$
- 4.1.2 Incubator $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- 4.1.3 Incubator $44 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$
- 4.1.4 Schudtoestel
- 4.1.5 Vortex
- 4.1.6 Kolonietelapparaat
- 4.1.7 Pipetus akku
- 4.1.8 Microbiologische veiligheidswerkkast MVK
- 4.1.9 Filtratietoestel met pomp
- 4.1.10 Membraandispenser met steriele $0,45 \mu\text{m}$ cellulose-esterfilters³ of gelijkwaardig
- 4.1.11 Colilert[®] / Quanti-tray[®] + Idexx sealer + frame

4.2 MATERIAAL

- 4.2.1 Pincet
- 4.2.2 Glazen tubes en flessen
- 4.2.3 Wegwerppipetten
- 4.2.4 Entnaald met Pt-öse

³ De membraanfilters moeten vrij zijn van groeiremmende of groeibevorderende eigenschappen en de drukinkt voor het raster mag geen invloed hebben op de groei van bacteriën. Indien niet steriel, zullen de filters worden gesteriliseerd volgens de instructies van de fabrikant.

5 REAGENTIA EN BEREIDINGEN

5.1 REAGENTIA

5.1.1 Ringer 1/40 oplossing⁴

5.1.2 CCA conform ISO 9308-1:2014

Samenstelling Chromogeen Coliform Agar CCA

Caseine pepton	1,0 g
Gist extract	2,0 g
Natriumchloride	5,0 g
Natriumdiwaterstoffosfaat.2H ₂ O	2,2 g
Dinatriumdiwaterstoffosfaat	2,7 g
Natriumpyruvaat	1,0 g
Sorbitol	1,0 g
Tryptofaan	1,0 g
Tergitol® 7	0,15 g
6-chloro-3-indoxyl-β-D-galactopyranoside	0,2 g
5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-β-D-glucuronzuur	0,1 g
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside	0,1 g
Agar	9 - 18 g
Water	1000 ml
pH 6,8 ±0,1 bij 25°C	

5.1.3 Oxidase reagens

5.1.4 ChromoCult® Coliform Agar met het E. coli/Coliform Selectief Supplement [...] of Rapid'E.coli 2 for water testing of Colilert reagens

5.1.5 Nutriënt agar of TSA agar

5.1.6 Umonium³⁸ 2,5% of gelijkwaardig biocide

5.1.7 Ultra puur water

6 PROCEDURE

6.1 MONSTERVOORBEREIDING

Een monster wordt gehomogeniseerd door de fles grondig te schudden ofwel door de fles op een schudtoestel (4.1.4) te brengen en gedurende de voorbereidingen van de analyses te schudden.

Uit voorkennis van een monster wordt -indien nodig- een verdunningsreeks gemaakt. Van een te verdunnen watermonster worden drie opeenvolgende verdunningen geanalyseerd 10^0 tot 10^{-2} , of van 10^{-1} tot 10^{-3} .

Aan de hand van wegwerppipetten (4.2.3) bediend door de pipetus (4.1.7) wordt een verdunning uitgevoerd met stappen factor 10:

- in flesjes (4.2.2) gevuld met 450 ml steriele Ringer 1/40 (5.1.1) waaraan 50 ml van de suspensie van de hoogste verdunning wordt toegevoegd; mengen met de hand of op een schudtoestel (4.1.4).

⁴ Voor een verdunningsreeks van een watermonster aan ten maken mogen naast Ringer 1/40 andere diluenten worden gebruikt zoals vermeld in ISO 8199 (Water quality - General guide to the enumeration of micro-organisms by culture) alsook steriel leidingswater of steriel demiwater.

- in flessen (4.2.2) gevuld met 900 ml steriele Ringer 1/40 (voor ringtestmonsters) (5.1.1) waaraan 100 ml van de suspensie van de hoogste verdunning wordt toegevoegd; mengen met de hand of op een schudtoestel (4.1.4).

De procedure wordt achtereenvolgend uitgevoerd tot de gewenste verdunningen zijn bereikt.

6.2 ANALYSE VIA DE MEMBRAANFILTRATIE

De membraanfiltratie wordt uitgevoerd met een filtratietoestel met pomp (4.1.9). Er worden steriele aangekochte kokers met filter gebruikt, of geflambeerde kokers worden aan door middel van een pincet (4.2.1) voorzien van steriele filters van 0,45 µm (4.1.10).

Van één monster wordt 100 ml (of een kleiner volume: 50 ml, 10 ml) volume gefiltreerd. Wanneer een volume van een monster minder is dan 50 ml, brengt men eerst 20 ml steriele Ringer 1/40 (5.1.1) in de filterkoker vóór het toevoegen van het monster. Dit bevordert de dispersie van de bacteriën over het volledige oppervlak van het membraan gedurende het filtratieproces.

De filter(s) worden aangebracht op een chromogeen agarmedium (5.1.2/5.1.4) (luchtbellen tussen membraan en bodem vermijden), en geïncubeerd op 36 ± 2°C (4.1.2) gedurende 21 tot 24 uur, om het aantal coliformen en *E.coli* te bepalen.

6.2.1 Analyse van waters met een lage bacteriële achtergrond flora

Alle kolonies op de CCA platen, onafhankelijk van grootte, die een roze tot rode kleuring geven (positief β-D-galactosidase reactie) worden als presumptieve coliformen beschouwd en geteld met behulp van een kolonietelapparaat (4.1.6); de waarden worden genoteerd.

Alle kolonies op de CCA platen, onafhankelijk van grootte, die een donkerblauwe tot paarse kleuring geven (positief β-D-galactosidase en β-D-glucuronidase reactie) worden als *E.coli* beschouwd⁵ en geteld met behulp van een kolonietelapparaat (4.1.6); de waarden worden genoteerd.

Alle blauwgroene kolonies (positief β-D-galactosidase reactie) op de Rapid'E.coli 2 for water testing agarplaten, worden als presumptieve coliformen⁶ beschouwd en geteld met behulp van een kolonietelapparaat (4.1.6); de waarden worden genoteerd.

Alle donker blauwe tot violette kolonies (positief β-D-galactosidase en β-D-glucuronidase reactie) op de Rapid'E.coli 2 for water testing agarplaten, worden als *E.coli* beschouwd en geteld met behulp van een kolonietelapparaat (4.1.6); de waarden worden genoteerd.

6.2.1.1 Bevestiging

Om de presumptieve coliformen die geen *E.coli* zijn te bevestigen, dient een oxidasetest uitgevoerd te worden. De test dient bij voorkeur op alle, of ten minste 10 [...] kolonies uitgevoerd te worden, en geselecteerd zoals beschreven in ISO 8199. Andere coliformen dan *E.coli* worden bevestigd met een negatieve reactie op oxidase test.

Voor deze bevestigingsstap dient een passend gecommercialiseerde oxidase (5.1.3) test gebruikt te worden, indien nodig vertrekkende van de reincultuur op een niet-selectieve agar plaat (5.1.5).

⁵ Uit studies in Hongarije en Oostenrijk blijkt dat sommige *Aeromonas* species blauwe kolonies op chromogene media kunnen vormen. Het is **sterk** aangewezen om dan ook blauwe kolonies te onderwerpen aan de oxidasetest en indoltest, door ze te strijken op een niet selectieve voedingsbodem, om ze daarop rechtstreeks te testen op oxidase en indol.

⁶ Sommige *Aeromonas* species zijn heel moeilijk te onderscheiden van coliformen op Rapid'E.coli 2. Om te voorkomen dat vals positieve resultaten worden veroorzaakt door oxidase positieve bacteriën zoals *Aeromonas* spp., is het nodig om blauwgroene kolonies te onderwerpen aan de oxidasetest, door ze te strijken op een niet selectieve voedingsbodem, om ze daarop rechtstreeks te testen op oxidase.

Een oxidase positieve reactie wordt veroorzaakt door het enzym cytochroom oxidase dat inwerkt op het N,N-dimethyl-p-fenyleendiamine, met de vorming van indofenolblauw.

De werkwijze is afhankelijk van de leverancier van de oxidase kit. De test wordt op een goed geïsoleerde kolonies van de agar uitgevoerd volgens de indicaties op de bijsluiters van het reagens⁷. Coliformen zijn oxidase negatief. Als positieve controle op de oxidase kit wordt een *Pseudomonas* sp. getest, en als negatieve controle een coliform. *Aeromonas* species, die natuurlijk voorkomen in water, zijn te onderscheiden van coliformen door een positieve oxidase reactie.

Als er veel kolonies gegroeid zijn op de membraanfilter of als een presumptieve kolonie vlak naast andere kolonies gelegen is, kan het nodig zijn om subculturen van de presumptieve kolonies te maken, teneinde te waarborgen dat de oxidase test met zuivere culturen uitgevoerd worden. Het is ook noodzakelijk om subculturen van de presumptieve kolonies te maken die te klein voor een betrouwbaar resultaat van de oxidase test. Subculturen worden opgekweekt op een niet-selectieve agar (5.1.5) bij $36 \pm 2^\circ\text{C}$ (4.1.2) gedurende 21 tot 24 uur.

6.2.2 Analyse van waters met een hoge bacteriële achtergrond flora

Alle roze tot rode kolonies (positief β -D-galactosidase reactie) op de ChromoCult® Coliform agarplaten (met het E. coli/Coliform selectief supplement) [...], worden als coliformen beschouwd en geteld met behulp van een kolonietelapparaat (4.1.6); de waarden worden genoteerd.

Alle donker blauwe tot paarse kolonies (positief β -D-galactosidase en β -D-glucuronidase reactie) op de ChromoCult® Coliform agarplaten (met het E. coli/Coliform selectief supplement) [...] worden als *E.coli* beschouwd en geteld met behulp van een kolonietelapparaat (4.1.6); de waarden worden genoteerd.

Alle blauwgroene kolonies (positief β -D-galactosidase reactie) op de Rapid'E.coli 2 for water testing agarplaten, worden als presumptieve coliformen⁸ beschouwd en geteld met behulp van een kolonietelapparaat (4.1.6); de waarden worden genoteerd.

Voer daarna de bevestiging uit conform § 6.2.1.1.

Alle donker blauwe tot violette kolonies (positief β -D-galactosidase en β -D-glucuronidase reactie) op de Rapid'E.coli 2 for Water Testing agarplaten, worden als *E.coli* beschouwd en geteld met behulp van een kolonietelapparaat (4.1.6); de waarden worden genoteerd.

6.2.3 Bijkomende bevestigingstest

Indien twijfel bestaat over de identificatie van coliformen en *E.coli* of als alternatief voor de bevestigingstest wordt een identificatie uitgevoerd aan de hand van een commerciële kit vertrekkende van de reincultuur op een niet-selectieve agar plaat (5.1.5). De analyseverantwoordelijke beslist over de noodzaak voor de identificatie.

⁷ Indien geen commerciële oxidase test wordt gebruikt, kan het oxidase-test uitgevoerd door het toevoegen 2-3 druppels verse oxidase reagens op een filterpapier in een petrischaal. De kolonies die moeten worden bevestigd, worden overgebracht op een filterpapier met een plastic of platina entnaald. Een positieve oxidase reactie blijkt bij het optreden van een donkerblauwe kleur binnen 30 s. Dit mag niet worden waargenomen voor coliformen omdat ze negatief zijn oxidase.

⁸ sommige *Aeromonas* species zijn moeilijk te onderscheiden van coliformen op Rapid'E.coli 2. Om te voorkomen dat vals positieve resultaten worden veroorzaakt door oxidase positieve bacteriën zoals *Aeromonas* spp., is het nodig om blauwgroene kolonies te onderwerpen aan de oxidasetest, door ze te strijken op een niet selectieve voedingsbodem, om ze daarop rechtstreeks te testen op oxidase.

6.3 QUANTI-TRAY COLILERT METHODE

Voor de bepaling van coliformen en E.coli per 100 ml volg de Colilert® / Quanti-tray® [protocols](#). Tel het aantal gele wells (coliformen) en de gele fluorescerende wells (E.coli) onder UV-licht. Raadpleeg de bijgeleverde MPN-tabel om de resultaten (meest waarschijnlijke aantal) te bepalen.

6.4 MPN MICROTITERPLAAT METHODE

Voor de methode wordt verwezen naar ISO 9308-3 (1998).

6.5 IDENTIFICATIE VAN COLIFORMEN EN E.COLI DOOR MIDDEL VAN MALDI-TOF MS (MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION-IONIZATION TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY)

Voor de identificatie van *coliformen* en *E.coli* of ter vervanging van de bevestigingstest kan gebruik gemaakt worden van de MALDI-TOF MS technologie. Hiervoor dient wel een validatie uitgewerkt te worden conform ISO 16140.

7 RAPPORTERING

- Bereken van het aantal bevestigde kolonies geteld op de membraanfilter het aantal *E. coli* en coliformen in 100 ml van het monster (of andere gefiltreerd volume) overeenkomstig ISO 8199. De telling van coliformen is de som van alle oxidase-negatieve (van CCA) roze tot rode kolonies (van CCA of ChromoCult® Coliform agar met supplement [...]) of blauwgroene kolonies (van Rapid'E.coli 2 for water testing agar) plus alle donkerblauwe tot violette kolonies. De *E. coli* zijn het aantal donker-blauw tot violette kolonies.
- Bij verdunningen wordt het aantal getelde kolonies vermenigvuldigd met de overeenstemmende verdunningsfactor.
- Indien geen kolonies aanwezig zijn op platen geïncubeerd met een onverdund monstermonster, vermeld het resultaat als <1 kve / 100 ml of als 0 kve / 100 ml.
- Indien meer dan 100 kolonies op de geïnoculeerde schalen met de grootste verdunning 10^{-x} voorkomen, wordt het resultaat als benaderend vermeld (geschat aantal >100 . 10^x kve/gefilt. volume).

Rapport

Vermeld in het rapport:

- de identificatie van het monster, en alle gegevens over de monsternamen
- de verwijzing naar de betreffende WAC methode
- het resultaat
- bijzondere opmerkingen

8 REFERENTIES

- ISO 8199:2018 Water quality — General requirements and guidance for microbiological examinations by culture.
- ISO 9308-1:2014 Water quality - Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria - Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora

- ISO 9308-1:2014/AMD 1:2016 Water quality — Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria — part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora — amendment 1
- **ISO 9308-2: 2012 Water quality — Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria Part 2: Most probable number method (Colilert)**
- ISO 9308-3: 1998 Water quality - Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria in surface and waste water part 3: miniaturized method by inoculation in a liquid medium.
- ISO 9308-3:1998/Cor.1:2000(en) Water quality — Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria — Part 3: Miniaturized method (Most Probable Number) for the detection and enumeration of *E. coli* in surface and waste water TECHNICAL CORRIGENDUM 1
- Validation certificate for alternative analytical method for Rapid'E.coli 2 + supplement (Water Testing) enumeration of *Escherichia coli* β -glucuronidase positive and coliform bacteria β -galactosidase positive Certificat No.: BRD 07/20-03/11. [BRD-07-20-03-11 en.pdf \(afnor.org\)](http://www.afnor.org/BRD-07-20-03-11_en.pdf)
- A medium detecting β -glucuronidase for the simultaneous membrane filtration enumeration of *Escherichia coli* and coliforms from drinking water. *Letters in Applied Microbiology*, Sartory, D.P. & Howard, L., 1992, **15**, 273-276.
- Fluorogenic assay for immediate confirmation of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, Feng, P.C.S. & Hartman, P.A., 1982, **43**, 1320-1329.
- ISO 19458 (2006) Water quality - sampling - General guide for sampling, transport, preservation and handling of samples for microbiological analysis.
- WAC/I/A/010 Conservering en behandeling van watermonsters
- WAC/VI/A/003 Kwaliteitseisen voor de analysemethoden
- MALDI-TOF MS
http://www.afsca.be/laboratories/labinfo/documents/2015-04_labinfo13-p12_en.pdf
Pavlovic, Melanie, et al. "Application of MALDI-TOF MS for the identification of food borne bacteria." *The open microbiology journal* 7 (2013): 135.

Bepaling van enterokokken

INHOUD

1	TOEPASSINGSGEBIED	3
2	PRINCIPE	3
3	OPMERKINGEN	4
4	APPARATUUR EN MATERIAAL	4
4.1	<i>Apparatuur</i>	4
4.2	<i>Materiaal</i>	4
5	REAGENTIA EN BEREIDINGEN	5
5.1	<i>Reagentia</i>	5
6	PROCEDURE	5
6.1	<i>Monstervoorbereiding</i>	5
6.2	<i>Analyse via de membraanfiltratie</i>	5
6.3	<i>Bevestigingstesten enkel vanuit de Slanetz platen</i>	6
6.4	<i>Identificatie van enterokokken door middel van MALDI-TOF MS (MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION-IONIZATION TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY)</i>	6
7	RAPPORTERING	6
8	REFERENTIES	7

1 TOEPASSINGSGEBIED

De procedure is van toepassing bij het bacteriologisch onderzoek van drinkwater, mineraal water enerzijds en grondwater, oppervlaktewater, recreatiewater, en afvalwater anderzijds.

De bepaling van de parameter enterokokken in water wordt uitgevoerd volgens ISO 7899-2.

Voor analyse van drinkwater kan voor de detectie van enterokokken, ook de detectie gebaseerd op enzymatische reacties op chromogene media gebruikt worden zowel voor membraanfiltratie als voor de Enterolert-DW MPN-methode (die voorzien zijn van een supplement specifiek ter onderdrukking van nevenflora).

Voor analyse van oppervlakte- of afvalwater kan voor de detectie van enterokokken, de ISO 7899-1 (1998) MPN-methode gebruikt worden **alsook voor oppervlakte- en recreatiewater** de Enterolert-E MPN methode (voorzien van een supplement specifiek ter onderdrukking van nevenflora).

In het kader van wateronderzoek kunnen enterokokken beschouwd worden als secundaire indicatoren voor fecale besmetting. Het principe van deze analyse is om de aanwezigheid van coliformen in een watermonster bij afwezigheid van *E.coli* te evalueren. In bepaalde gevallen kan de bepaling van het species streptokokken aanwezig in een watermonster helpen om een menselijke of dierlijke besmetting te kunnen onderscheiden.

Een aangewende analysemethode dient conform de WAC-methode te zijn. Het meetprincipe mag niet anders zijn, en het isolatiemedium moet hetzelfde zijn. Afwijkingen mogen niet kritisch zijn en geen invloed hebben op een resultaat. Extra stappen zijn aanvaardbaar, zolang ze het resultaat enkel meer ondersteunen.

Theoretisch kan de aanwezigheid van 1 kolonievormende eenheid per 100 ml bepaald worden. Door de aanwezigheid van stoorflora en andere matrix-invloeden is dit niet altijd het geval.

2 PRINCIPE

Fecale enterococci zijn Gram-positieve kokken die paren of kettingen kunnen vormen en die een Lancefield's Groep D antigeen bevatten. *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* en *E. hirae* kunnen worden gedetecteerd en geënumereerd met deze methode. Sommige andere *Enterococcus* species en sommige species van het genus *Streptococcus* (nl. *S.bovis* en *S. equinus*) kunnen mogelijks worden gedetecteerd. Deze *Streptococcus* species overleven niet lang in het water en zullen waarschijnlijk niet kwantitatief worden bepaald.

Organismen uit een watermonster worden geïsoleerd op een 0,45 µm membraanfilter en op een Slanetz & Bartley of een gelijkwaardig chromogeen medium agarplaat aangebracht die wordt geïncubeerd gedurende 40-48 uur bij 36°C.

Het Slanetz & Bartley selectief medium bevat natriumazide om de groei van Gram-negatieve bacteriën en andere Gram-positieve bacteriën te onderdrukken. Natriumazide inhibeert de enzymen catalase en cytochroom c oxydase, waardoor het elektronen-transport in de cel wordt onderbroken. Streptokokken / enterokokken en lactobacillen zijn de enige facultatief anaërobe bacteriën die geen van beide enzymen bevatten zodat hun ademhaling niet onderbroken wordt door natrium azide.

Het medium bevat eveneens de kleurloze 2,3,5-trifenyltetrazolium chloride TTC, dat door de fecale enterococci wordt gereduceerd tot rode formazan. De typische kolonies hebben een roos-rood tot bruin uitzicht van het centrum van de kolonie tot mogelijks de volledige kolonie. Ter bevestiging wordt de membraanfilter met alle kolonies overgebracht op een esculine bile agarplaat die wordt geïncubeerd gedurende 2 uur bij 44°C. De galzouten inhiberen de groei van andere Gram-positieve bacteriën. Het esculine wordt door de enterokokken omgezet tot een gehydrolyseerde verbinding die samen met het aanwezige Fe (III) citraat een zwart complex vormt.

Bij het gebruik van chromogene media zijn er geen bevestigingstesten uit te voeren. Het aantal kve enterokokken wordt per 100 ml bepaald.

3 OPMERKINGEN

Voor de conservering en behandeling van watermonsters wordt verwezen naar WAC/I/A/010. Voor kwaliteitscontrole wordt verwezen naar WAC/VI/A/003.

Het Slanetz medium beschreven in deze methode bevat sodium azide. Aangezien deze substantie hoog toxisch is, dient heel voorzichtig te worden gewerkt wanneer het medium wordt bereid, vooral wanneer het medium onder poedervorm wordt gebruikt. Natrium azide vormt explosieve verbindingen met metalen, specifiek koper en lood.

Het laboratorium dient uitgerust te zijn met een microbiologische veiligheidswerkkast MVK (4.1.8). en een gevalideerde autoclaaf (4.1.1).

Elk werkoppervlak wordt voor en na gebruik ontsmet met een biocide naar keuze (5.1.4).

Vóór het inoculeren van agarmedia in petriplaten, enkel indien nodig, dient het oppervlak van de agarplaten gedroogd te worden. Hiervoor worden de platen, met de agarbodem naar boven, dakpansgewijs van het deksel geplaatst en gedroogd in een MVK (4.1.8). Afhankelijk van de periode vanaf de bereidingsdatum tot het in gebruik nemen van de platen, kan de droogtijd variëren (15±20 minuten).

4 APPARATUUR EN MATERIAAL

4.1 APPARATUUR

- 4.1.1 Autoclaaf 121 ± 3°C
- 4.1.2 Incubator 36 ± 2°C
- 4.1.3 Incubator 44 ± 0,5°C
- 4.1.4 Schudtoestel
- 4.1.5 Membraandispenser met steriele 0,45 µm filters of gelijkwaardig systeem
- 4.1.6 Kolonietelapparaat
- 4.1.7 Pipetus akku
- 4.1.8 Microbiologische veiligheidswerkkast MVK
- 4.1.9 Filtratietoestel met pomp
- 4.1.10 Enterolert -E of -DW® / Quanti-tray® + Idexx sealer + frame

4.2 MATERIAAL

- 4.2.1 Pincet
- 4.2.2 Glazen flessen
- 4.2.3 Wegwerppipetten

5 REAGENTIA EN BEREIDINGEN

5.1 REAGENTIA

- 5.1.1 Ringer 1/40 oplossing¹
- 5.1.2 Slanetz and Bartley agar + TTC supplement of een gelijkwaardig chromogeen medium of Enterolert reagens
- 5.1.3 Bile-esculine-azide agar
- 5.1.4 Umonium³⁸ 2,5% of gelijkwaardig biocide
- 5.1.5 ultra puur water

6 PROCEDURE

6.1 MONSTERVERBEREIDING

Een monster wordt gehomogeniseerd door de fles grondig te schudden, ofwel door de fles op een schudtoestel (4.1.4) te brengen en gedurende de voorbereidingen van de analyses te schudden. Uit voorkennis van een monster wordt indien nodig een verdunningsreeks gemaakt. Van een te verdunnen watermonster worden drie opeenvolgende verdunningen geanalyseerd 10^0 tot 10^{-2} , of van 10^{-1} tot 10^{-3} .

Aan de hand van wegwerppipetten (4.2.3) bediend door de pipetus (4.1.7) wordt een verdunning uitgevoerd met stappen factor 10:

- in flesjes (4.2.2) gevuld met 90 ml steriele Ringer 1/40 (5.1.1) waaraan 10 ml van de suspensie van de hoogste verdunning wordt toegevoegd; mengen met de hand of op een schudtoestel (4.1.4).
- in flessen (4.2.2) gevuld met 900 ml steriele Ringer 1/40 (voor ringtestmonsters) (5.1.1) waaraan 100 ml van de suspensie van de hoogste verdunning wordt toegevoegd; mengen met de hand of op een schudtoestel (4.1.4).

De procedure wordt achtereenvolgend uitgevoerd tot de gewenste verdunningen zijn bereikt.

De verdunningen van de monsters dienen dusdanig gekozen te worden dat het aantal te tellen kolonies op een membraan tussen 20 en 80 ligt. De voorkeur wordt gegeven aan de verdunning met een resultaat in deze range.

6.2 ANALYSE VIA DE MEMBRAANFILTRATIE

De membraanfiltratie wordt uitgevoerd met een filtratietoestel met pomp (4.1.9). Er worden steriele aangekochte kokers met filter gebruikt, of geflambeerde kokers worden aan door middel van een pincet (4.2.1) voorzien van steriele filters van 0,45 µm (4.1.5).

Van één monster wordt 100 ml (of een kleiner volume 50 ml, 10 ml) volume gefiltreerd. Wanneer een volume van een monster minder is dan 50 ml, brengt men eerst 20 ml steriele Ringer 1/40 (5.1.1) in de filterkoker vóór het toevoegen van het monster. Dit bevordert de dispersie van de bacteriën over het volledige oppervlak van het membraan gedurende het filtratieproces.

¹ Voor een verdunningsreeks van een watermonster aan ten maken mogen naast Ringer 1/40 andere diluenten worden gebruikt zoals vermeld in ISO 8199 (Water quality - General guide to the enumeration of micro-organisms by culture) alsook steriel leidingswater of steriel demiwater

De filter(s) worden aangebracht op een Slanetz schaal of een gelijkwaardig chromogeen medium (5.1.2) (luchtbellen tussen membraan en bodem vermijden), en geïncubeerd op $36 \pm 2^\circ\text{C}$ (4.1.2) gedurende 44 ± 4 uur, om het aantal enterokokken te bepalen.

Een bijkomende incubatie van 21 ± 3 uur is nodig indien sommige enterokokken species heel kleine kolonies vormen na de eerste 44 ± 4 uur.

Alle kolonies op de Slanetz platen, onafhankelijk van grootte, die roze rode kolonies geven, of dieprode kolonies op de chromogene platen worden als typische presumptieve kolonies (Slanetz) of als bevestigde kolonies (chromogeen medium) beschouwd en geteld met behulp van een kolonietelapparaat (4.1.6); de waarde wordt genoteerd.

Indien geen typische kolonies aanwezig zijn, zijn geen presumptieve enterokokken in het monster aanwezig.

6.3 BEVESTIGINGSTESTEN ENKEL VANUIT DE SLANETZ PLATEN

De volledige filter wordt aan de hand van een geflambeerde pincet (4.2.1) op een bij 44°C voorverwarmde Bile-esculine-azide agar plaat (5.1.3) aangebracht en geïncubeerd bij 44°C (4.1.3) gedurende 2 uur ter bevestiging van de enterokokken.

Het esculine wordt door de enterokokken reeds binnen de 2 uur omgezet tot de verbinding (zie 2) dat samen met het Fe (III) citraat een zwart complex vormt. Indien alle presumptieve kolonies een zwarte verkleuring vertonen, dan is het aantal enterokokken reeds gekend. Indien slechts een deel van de presumptieve kolonies zwart zijn, worden deze geteld met behulp van een kolonietelapparaat (4.1.6), en gerapporteerd.

Indien geen zwarte kolonies aanwezig zijn geen enterokokken in het monster aanwezig.

6.4 IDENTIFICATIE VAN ENTEROKOKKEN DOOR MIDDEL VAN MALDI-TOF MS (MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION-IONIZATION TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY)

Voor de identificatie van enterokokken of ter vervanging van de bevestigingstest kan gebruik gemaakt worden van de MALDI-TOF MS technologie. Hiervoor dient wel een validatie uitgewerkt te worden conform ISO 16140.

6.5 WERKWIJZE VOOR ENTEROLERT

Voor de bepaling van enterococci per 100 ml volg de Enterolert-[E](#) of [-DW](#)® / Quanti-tray® protocols. Met de Enterolert-E tel het aantal blauwe fluorescerende wells onder UV-licht.

Met de Enterolert-DW wordt de detectie aangegeven door omslag van blauw naar groen. Elke verandering van de oorspronkelijke kleur naar groen (ook licht groen) wordt beschouwd als een positief resultaat en wordt geteld.

Raadpleeg de bijgeleverde MPN-tabel om het resultaat (meest waarschijnlijke aantal) te bepalen.

7 RAPPORTERING

- Bepaal aan de hand van het aantal karakteristieke presumptieven en bevindingen van de bevestigingstest de kve enterokokken waarden per 100 ml watermonster volgens ISO 8199, of de getelde kolonies per 100ml watermonster op de chromogene voedingsbodem of het aantal per .
- Bij verdunningen wordt het aantal getelde kolonies vermenigvuldigd met de overeenstemmende verdunningsfactor.

- Indien geen kolonies aanwezig zijn op platen geïncubeerd met een onverdund monster, vermeld het resultaat als <1 kve / 100 ml of als 0 kve / 100 ml.
- Indien meer dan 100 kolonies op de geïnoculeerde schalen met de grootste verdunning 10^{-x} voorkomen, wordt het resultaat als benaderend vermeld (geschat aantal $>100 \cdot 10^x$ kve/gefilt. volume).

Rapport

Vermeld in het rapport:

- de identificatie van het monster, en alle gegevens over de monstername
- de verwijzing naar de betreffende WAC methode
- (incubatietijd en -temperatuur)
- het resultaat
- bijzondere opmerkingen

8 REFERENTIES

- ISO 7899-2 (2000) Water quality - Detection and enumeration of intestinal enterococci part 2: Membrane filtration method
- ISO 7899-1 (1998) Water quality -- Detection and enumeration of intestinal enterococci -- Part 1: Miniaturized method (Most Probable Number) for surface and waste water
- AFNOR certificaat methodevalidatie van Enterolert/Quanti-Tray voor telling van enterococci voor drinkwater en zwemwaters. Certificaat [IDX 33/03-10/13](#)
- **AFNOR certificaat methodevalidatie van Enterolert/Quanti-Tray voor telling van enterococci voor water met Enterolert-E. Certificaat [IDX 33/04-02/15](#)**
- ISO/DIS 7899-3 Water quality Enumeration of intestinal enterococci (Enterolert) Part 3: Most probable number method
- ISO 8199:2018 Water quality - General requirements and guidance for microbiological examinations by culture.
- ISO 19458 (2006) Water quality - sampling - General guide for sampling, transport, preservation and handling of samples for microbiological analysis.
- WAC/I/A/010 Conservering en behandeling van watermonsters
- WAC/VI/A/003 Kwaliteitseisen voor de analysemethoden
- MALDI-TOF MS
http://www.afsca.be/laboratories/labinfo/documents/2015-04_labinfo13-p12_en.pdf
Pavlovic, Melanie, et al. "Application of MALDI-TOF MS for the identification of food borne bacteria." The open microbiology journal 7 (2013): 135.

Bepaling van Legionella in drinkwater en afvalwater

INHOUD

1	TOEPASSINGSGEBIED	4
2	PRINCIPE	4
3	OPMERKINGEN	5
4	APPARATUUR EN MATERIAAL	6
4.1	Apparatuur	6
4.2	Materiaal	6
5	REAGENTIA EN BEREIDINGEN	6
5.1	Reagentia	6
6	PROCEDURE	7
6.1	Monsterhomogenisatie	7
6.2	Behandeling van watermonsters	7
6.3	Concentratie van watermonsters	8
6.4	Behandelingen	9
6.5	Kweek	10
6.6	bevestiging van presumptieve legionella kolonies op cultuurmedia bcye(+cys) en bcye-cys agar	13
6.7	bijkomende bevestiging via serotypering van presumptieve Legionella kolonies met een agglutinatie of immunoassay test	13
6.8	Identificatie van Legionella door middel van MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry)	14
7	Specifieke richtlijnen voor analyse van afvalwater uit een waterzuiveringinstallatie/biologiebekken (WZI/BB)	14
7.1	Principe	14
7.2	Kweek	15
8	REAL-TIME PCR-DETECTIE EN KWANTIFICATIE VAN LEGIONELLA PNEUMOPHILA IN DRINKWATER VOOR SCREENING in kader van een beheersplan	16
8.1	Principe	16
8.2	Performantiekarakteristieken kwalitatieve real-time PCR en kwantitatieve real-time PCR (qPCR)	16
8.3	Screening	17
9	SPECIFIEKE RICHTLIJNEN BIJ EEN KLINISCH BEVESTIGDE LEGIONELLOSE OF EEN UITBRAAK	17
9.1	Aflezen van de platen bij een klinisch bevestigde Legionellose of een uitbraak	17
9.2	Bevestiging van presumptieve Legionella kolonies	18
9.3	Screening met PCR	18

10	RAPPORTERING	18
10.1	<i>Formules</i>	18
10.2	<i>Afspraken met betrekking tot rapportering</i>	19
10.3	<i>Voorbeelden</i>	20
10.4	<i>Minimale inhoud rapport</i>	21
11	REFERENTIES	21

1 TOEPASSINGSGEBIED

Deze procedure beschrijft methodes voor het aantonen en kwantificeren van *Legionella* in drinkwater en in afvalwater conform ISO 11731:2017. Sinds de versie van oktober 2019 wordt de scenariokeuze niet meer aan het laboratorium overgelaten. In de huidige versie is bijkomend de verplichte uitvoering van de rechtstreekse uitplating voor drinkwater opgenomen en werd de rapporteringswijze gewijzigd.

Deze procedure is van toepassing bij het bacteriologisch onderzoek van water, en is hier uitgewerkt voor drinkwater en afvalwater.

De door het Departement Omgeving toegekende erkenning voor *Legionella* analyses omvat twee deeldomeinen, nl. drinkwater (dw) en afvalwater (aw). Koeltorenwater wordt - onafhankelijk van het type water waarmee de koeltoren wordt gevoed - gecatalogeerd onder afvalwater.

Voor de analyse van drinkwatermonsters is watermatrix A van ISO 11731:2017 van toepassing.

Voor de in het Legionella Besluit onderverdeelde koeltorenwaters "Onderafdeling III Koeltorens die niet met oppervlaktewater werken", "Onderafdeling I Koeltorens met natuurlijke trek die gebruikmaken van oppervlaktewater", en "Onderafdeling II Koeltorens met geforceerde trek die gebruikmaken van oppervlaktewater" zijn watermatrix B en watermatrix C van ISO 11731:2017 van toepassing. De specifieke richtlijnen voor analyse van afvalwater uit een waterzuiveringinstallatie / biologiebekken van mestverwerkingsinstallaties (WZI/BB) zijn een afgeleide van de methode voor watermatrix C.

Aanvullend bij de bepaling van het Legionellagehalte in alle watermatrices dient een serologische typering te worden uitgevoerd. Dit betekent dat bij elk analyseresultaat een onderscheid dient gemaakt te worden tussen *Legionella pneumophila* serotype 1, *Legionella pneumophila* serotype 2-14 (2-15¹) en *Legionella species* (verschillend van *pneumophila* of de zgn. non-*pneumophila*)² aan de hand van een agglutinatie of immunochromatografische test.

2 PRINCIPE

Bacteriën uit de familie *Legionellaceae* zijn staafvormige (2-20 µm lang en 0,3 - 0,9 µm dik), Gramnegatieve beweeglijke bacteriën die sporen noch cysten vormen. Het organisme groeit enkel in een zuurstofhoudend milieu en heeft onder andere het zwavelhoudende aminozuur L-cysteïne nodig.

De beslissingsmatrix van de ISO 11731:2017, waarop deze procedure is gebaseerd, omvat vier stappen.

In stap 1 worden watermatrices als volgt ingedeeld:

- watermatrix A: water met lage concentratie interfererende micro-organismen (drinkwater)
- watermatrix B: water met hoge concentratie aan interfererende micro-organismen (koeltorenwater)

¹ Afhankelijk van de producent van de agglutinatie of immunochromatografische test

² *Leg. pneumophila* serotype 1 is de meest belangrijke oorzaak van Legionellose er wordt dus beschouwd als het meest kritische type *Legionella* te vinden in een watermonster. Sinds het toenemend aantal gevallen van Legionellose veroorzaakt door andere serotypes dan *L. pneumophila* en door andere *Legionella species* worden andere *Legionella species* in water ook als potentieel risico beschouwd (zie Table A.1 — *Legionella species associated with disease* in ISO 11731:2017).

- watermatrix C: water met extreem hoge concentratie aan interfererende micro-organismen (zwaar beladen koeltorenwater).

Stap 2 geeft het te volgen analyses scenario aan:

- rechtstreekse uitplating van het watermonster
- polycarbonaat of polyethersulfon membraanfiltratie (poriëngrootte 0,2 µm of 0,45 µm) gevolgd door een elutieprocedure met glasporels
- rechtstreekse verdunning van het watermonster en uitplating
- cellulose-nitraat of-ester membraanfiltratie (poriëngrootte 0,2 of 0,45 µm) en filter op plaat (optioneel met warmte voorbehandeling)

In stap 3 - om de groei van de geconcentreerde non-target bacteriën te verminderen die kunnen interfereren met de recovery van de beoogde *Legionella* - worden porties van een watermonster, een membraanfilter of een concentraat na elutieprocedure van stap 2 gecombineerd of aangevuld met warmte behandeling, zuur behandeling of een combinatie van beide.

In stap 4 wordt er aangegeven met welke *Legionella*-platen BCYE, BCYE+AB, GVPC of MWY de *Legionella* groei minimaal moet worden uitgevoerd. De behandelde porties (of een verdunning ervan) of het ongefilterd monster of de membraanfilter worden geïnoculeerd op een voedingsbodem om de *Legionella* bacteriën, na incubatie, als karakteristieke kolonies te herkennen. Ter bevestiging wordt groei van presumptieve kolonies getest op BCYE(+cys) en BCYE-cys om voor de *Legionella* bacteriën hun L-cysteïne- en ijzerbehoefte aan te tonen. Nadien wordt de serologische typering uitgevoerd met behulp van een *Legionella* agglutinatietest / immunochromatografische test, om finaal een eindresultaat te rapporteren. De platen aangegeven in stap 4 zijn telkens het minimaal aantal te gebruiken platen. De keuze om bijkomende platen te gebruiken kan een meerwaarde zijn (duplo's, inzetten van extra verdunningen, gebruik van BCYE-cys bij stap 4, ...).

In deze versie van WAC/V/A/005 werden, omwille van de vergelijkbaarheid van *Legionella* resultaten tussen erkende laboratoria, slechts een aantal van de keuzemogelijkheden vanuit ISO 11731:2017 weerhouden en werden bepaalde stappen uitgebreid.

3 OPMERKINGEN

Voor de monsternamen van watermonsters wordt verwezen naar WAC/I/A/001, WAC/I/A/002, WAC/I/A/003. Voor de conservering en behandeling van watermonsters wordt verwezen naar WAC/I/A/010. Voor kwaliteitscontrole wordt verwezen naar WAC/VI/A/003.

Legionella bacteriën zijn pathogene klasse II micro-organismen, die vooral een gevaar betekenen wanneer ze aanwezig zijn in aërosolen, en als dusdanig een mogelijke bron zijn voor besmetting bij inademing.

Het laboratorium dient uitgerust te zijn met een microbiologische veiligheidswerkkast MVK (4.1.8). en een gevalideerde autoclaaf (4.1.1).

Elk werkoppervlak wordt voor en na gebruik ontsmet met een biocide naar keuze (5.1.2) of (5.1.3). Vóór het inoculeren van agarmedia in petriplaten, enkel indien nodig, dient het oppervlak van de agarplaten gedroogd te worden. Hiervoor worden de platen, met de agarbodem naar boven, dakpansgewijs van het deksel geplaatst en gedroogd in een MVK (4.1.8). Afhankelijk van de periode vanaf de bereidingsdatum tot het in gebruik nemen van de platen, kan de droogtijd variëren (15±20 minuten).

4 APPARATUUR EN MATERIAAL

4.1 APPARATUUR

- 4.1.1 Autoclaaf 121±3°C
- 4.1.2 Incubator 36±2°C
- 4.1.3 Waterbad 50±1°C
- 4.1.4 Schudtoestel
- 4.1.5 Vortex
- 4.1.6 Ultrasoon waterbad
- 4.1.7 Kolonietelapparaat
- 4.1.8 Microbiologische veiligheidswerkkast (MVK)
- 4.1.9 Filtratietoestel met pomp
- 4.1.10 Herlaadbare pipette controller

4.2 MATERIAAL

- 4.2.1 Pincet
- 4.2.2 Steriele cellulosenitraat of cellulose-ester membraanfilter 0,2 of 0,45 µm
- 4.2.3 Steriele polycarbonaat of polyethersulfon membraanfilter 0,2 µm of 0,45 µm
- 4.2.4 Steriele (centrifuge) buisjes
- 4.2.5 Steriele flesjes met brede hals en een bodemlaag (±10g) glasparels diameter 3 mm
- 4.2.6 Instelbare pipetten en steriele tips met filter
- 4.2.7 Wegwerppipetten
- 4.2.8 Entnaald met Pt-öse
- 4.2.9 Drigalski spatel
- 4.2.10 Stereomicroscoop
- 4.2.11 UV lamp

5 REAGENTIA EN BEREIDINGEN

5.1 REAGENTIA

- 5.1.1 Ringer 1/40 oplossing of gelijkwaardig diluent - zie ISO 11731: 2017 Bijlage C
- 5.1.2 Umonium³⁸ 2,5% of gelijkwaardig biocide
- 5.1.3 Gedenatureerde ethanol 70% (of gelijkwaardig)
- 5.1.4 *Legionella* BCYE + L-cysteïne (BCYE) / BCYE(+cys)
- 5.1.5 *Legionella* BCYE + antibiotica (BCYE+AB)
- 5.1.6 *Legionella* platen type MWY
- 5.1.7 *Legionella* platen type GVPC
- 5.1.8 *Legionella* BCYE zonder L-cysteïne (BCYE-cys) (of bloed agar / nutriënt agar / TSA)
- 5.1.9 *Legionella* zure buffer - zie ISO 11731: 2017 Bijlage D
- 5.1.10 *Legionella* agglutinatie of immunochromatografische test
- 5.1.11 *Legionella pneumophila* referentiebacterie

6 PROCEDURE

6.1 MONSTERHOMOGENISATIE

Een monster wordt gehomogeniseerd door de fles grondig te schudden ofwel door de fles op een schudtoestel (4.1.4) te brengen en gedurende de voorbereidingen van de analyses te schudden.

6.2 BEHANDELING VAN WATERMONSTERS

De door de erkende laboratoria te volgen analyses scenario's worden weergegeven in onderstaand schema:

Drinkwater Scenario A

Analyse via **R** (rechtstreekse uitplating) fractie O (onbehandeld)

& **MF** (membraanfiltratie) + elutie, te filtreren volume minimaal 250 ml op 0,2 µm filter, desnoods 2 filters

Fracties

O (onbehandeld)

H (warmte behandeld)

Z (zuur behandeld)

Uitzondering:

Analyse via **MF** en filter op plaat voor heel lage aantallen *Legionella* & lage concentratie interfererende micro-organismen (volume < 250ml aanvaardbaar)

Koeltorenwater Scenario B

Analyse via **R** & via **MF** + elutie

Voor te filtreren volume streven naar 250 ml op 0,2 µm filter (criterium MF 15 minuten minimum 100 ml, zoniet scenario C) Telkens fracties

O

H

Z

Scenario C

Analyse via **R** & via **MF** + elutie

Filtratie heel moeilijk/niet mogelijk op 0,2 µm □ gebruik 0,45 µm filter Voor te filtreren volume streven naar 250 ml, desnoods 2 filters Telkens fracties

H

Z

H&Z

Om de detectie van *Legionella* uit **drinkwatermonsters** te waarborgen, dienen steeds én de concentratietechniek door membraanfiltratie gevolgd door elutieprocedure met glaspapels én de rechtstreekse uitplatingen uitgevoerd worden (zie verder 6.5.1).

In één geval is er een uitzondering:

- Uit voorkennis kan voor drinkwatermonsters met heel lage concentratie *Legionella* en een lage concentratie interfererende micro-organismen de membraanfiltratie gevolgd door

directe plaatsing (6.3.2) van het filtermembraan op twee agarmedia (zie verder 6.5.2) toegepast worden (dit om een lage detectiegrens te bekomen). De methode directe plaatsing mag enkel toegepast worden op zwembadwater dat sterk gechloreerd is, of als een bijkomende methode naast de membraanfiltratie en elutie.

Wanneer het *Legionella* analyseresultaat na membraanfiltratie en directe plaatsing van filter op plaat een niet telbare waarde is, en er geen ander resultaat beschikbaar is, dient een nieuw watermonster aangevraagd en ingezet te worden.

Om de detectie van *Legionella* uit **koeltorenwatermonsters** te waarborgen, dienen steeds én de concentratietechniek door membraanfiltratie gevolgd door elutieprocedure met glasporels én de rechtstreekse uitplatingen uitgevoerd te worden (zie verder 6.5.3 en 6.5.4).

Het aantal in te zetten platen wordt voor elk scenario in de tabellen onder 6.5 aangegeven.

Afhankelijk van het gewenste detectieniveau is het mogelijk om meer dan één plaat van de verschillende cultuurmedia te gebruiken.

6.3 CONCENTRATIE VAN WATERMONSTERS

6.3.1 Algemeen

Voor een algemene omschrijving van de membraanfiltratietechniek, zie ISO 8199.

6.3.2 Membraanfiltratie en elutieprocedure met glasporels

Filtreer voor watermatrix A minstens 250 ml (preferentieel 500 ml/1000 ml) watermonster door een 0,2 µm polycarbonaat of polyethersulfon membraanfilter (4.2.3), desnoods door gebruik te maken van 2 filters voor moeilijk filtreerbare drinkwaters.

Tracht voor watermatrix B minstens 250 ml watermonster te filtreren door een 0,2 µm polycarbonaat of polyethersulfon membraanfilter (4.2.3). Bij een niet vlotte filtratie wordt deze gedurende 15 minuten aangehouden, waarna minstens een volume van 100 ml watermonster gefiltreerd moet zijn. Wanneer hieraan kan worden voldaan mag overgegaan worden tot elutie, zoniet dient de methode voor watermatrix C gevolgd te worden. Het afwijkend gefiltreerde volume van het monster wordt geregistreerd.

Voor filtratie van zwaarbeladen moeilijk filtreerbare waters nl. watermatrix C waarvan de filtratie van 250 ml op een 0,2 µm filter heel moeilijk of niet mogelijk is (door interfererende flora of door aanwezigheid van dispersanten) wordt een 0,45 µm polycarbonaat of polyethersulfon membraanfilter gebruikt. Desnoods worden 2 filters gebruikt voor de filtratie van 250 ml; in dit geval worden beide filters samen in één elutiepotje met parels geëluëerd. Wanneer in uitzonderlijk geval bij gebruik van twee filters het beoogde volume van 250 ml niet kan worden bereikt, mag overgegaan worden tot de elutie. Bij afwijking van het beoogd volume van 250 ml, wordt het gefiltreerde volume van het monster geregistreerd.

Verwijder de membraanfilter uit de filterhouder met een gedesinfecteerde pincet (4.2.1). Plaats de membraanfilter(s) met de residu-kant naar beneden in een steriele flesje met schroefdop met steriele glasporels (4.2.5) waaraan 5 ml (tot 10 ml) steriel diluent (5.1.1) of monster toegevoegd is en schud krachtig met een vortex (4.1.5) gedurende tenminste 2 minuten om de micro-organismen van de membraanfilter te wassen. Als alternatief, plaats het flesje in een ultrasoon waterbad (4.1.6) gedurende een tijdsinterval dat gevalideerd is om optimale recovery te bekomen. Zorg ervoor dat het niveau van het diluent dat het membraan dekt onder het waterniveau in het ultrasoon waterbad ligt. Verdeel aansluitend dit concentraat in drie porties voor de behandelingen van stap 3.

Opmerking 1: in plaats van een behandeling met zuuroplossing op een portie van het concentraat kan een bijkomende membraanfiltratie worden uitgevoerd voor een rechtstreekse zuur voorbehandeling op de membraanfilter in de filterhouder (zie 6.4.2).

Opmerking 2: (Her)vortex elke portie net voor het uitplaten.

6.3.3 Membraanfiltratie en directe plaatsing van het filtermembraan op agarmedium

Filtreer (4.1.9) het drinkwatermonster (zonder behandeling, na zuur behandeling en optioneel na warmte behandeling) via een 0,2 of 0,45 μm cellulosenitraat of cellulose-esters membraanfilter (4.2.2) (zie 6.5.2 Uitzondering A1). De zuur behandeling kan ook direct op de membraanfilter in de trechter worden gedaan (zie 6.4.2). Het gefiltreerd volume is afhankelijk van het deeltjesgehalte van het water of van het gewenste detectieniveau, met een minimaal filtratievolume van 10 ml. Het gefiltreerd volume van het monster wordt geregistreerd. Verwijder voorzichtig de membraanfilter uit de filterhouder met een gedesinfecteerde pincet (4.2.1) en plaats deze rechtstreeks op het agarmedium (zonder behandeling op BCYE, met behandeling(en) op antibioticaplaat) met aandacht dat er geen luchtbellen onder gevangen zitten.

6.4 BEHANDELINGEN

6.4.1 Warmte behandeling

Breng het geconcentreerd of ongeconcentreerd watermonster in een steriel recipiënt en plaats dit in een waterbad (4.1.3) bij $(50 \pm 1)^\circ\text{C}$ gedurende (30 ± 2) min. Kleine volumes (≤ 5 ml) dienen te worden gebruikt om een korte periode te borgen om de gewenste temperatuur te bereiken. Als veel monsters samen worden behandeld of grote monsters worden behandeld of dikwandige recipiënten worden gebruikt, controleer de temperatuur in een afzonderlijk recipiënt dat vergelijkbaar is met die van het monster. De tijd begint te lopen wanneer de gewenste temperatuur bereikt is. Grote monstervolumes of dikwandige containers moeten afgekoeld worden om oververhitting te vermijden nadat ze uit het waterbad zijn verwijderd.

6.4.2 Zuur behandeling

Verdun één volume van het geconcentreerd of ongeconcentreerd monster met negen volumes van de zure buffer (5.1.9), meng goed en laat inwerken gedurende $(5,0 \pm 0,5)$ min. Als het verdund en met zuur behandelde monster wordt gebruikt voor de berekening van de finale concentratie van *Legionella* in het monster, moet de verdunning in rekening worden gebracht. Volumes groter dan 0,1 ml kunnen worden uitgeplaat om de detectiegrens te verlagen.

Zuur behandeling kan na membraanfiltratie ook rechtstreeks op het membraanfilter in de filterhouder worden gedaan. Breng ongeveer 30 ml zure buffer (5.1.9) over op de membraanfilter, en laat het gedurende $(5 \pm 0,5)$ min inwerken. Verwijder de zuuroplossing door filtratie. Was de membraanfilter met minstens 20 ml diluent (5.1.1). Het is belangrijk dat het diluent het oppervlak van de filterhouder niet spoelt welke niet in contact was met de zuuroplossing.

6.5 KWEEK

6.5.1 Watermatrix A: drinkwatermonsters met een lage concentratie *Legionella* en een lage concentratie interfererende micro-organismen

Spatel (4.2.9) en inoculeer 0,1 (of 0,2) ml van elk net gevortexte geconcentreerd deel van het monster (onbehandeld, warmte behandeld en zuur behandeld) van de membraanfiltratie met elutieprocedure (zie 6.3.2) op één plaat BCYE-agar (5.1.4) en op één of meer selectieve of zeer selectieve platen van BCYE+AB-agar (5.1.5) of MWY-agar (5.1.6) of GVPC-agar plaat (5.1.7). Plaat bijkomend het watermonster **rechtstreeks** uit. Spatel (4.2.9) en inoculeer telkens **0,1 ml** van het monster op één BCYE-agar plaat (5.1.4) en één BCYE+AB-agar plaat (zie 5.1.5) of MWY-agar (5.1.6) of GVPC-agar (5.1.7).

		Stap 1	
		Watermatrix A	
		Drinkwatermonster met heel lage concentratie interfererende micro-organismen (6.5.1)	
		Stap 4	
Stap 2	Stap 3	BCYE ¹	BCYE+AB of MWY of GVPC ²
polycarbonaat of polyethersulfon membraanfiltratie 0,2 µm minstens 250 ml en elutieprocedure met glasparsels	onbehandeld	x	x
	warmte behandeling	x	x
	zuur behandeling	x	x
rechtstreekse uitplating	onbehandeld	x	x

¹ Enkel voor de membraanfiltratie kan BCYE eventueel vervangen worden door BCYE+AB op voorwaarde dat de tweede antibiotica plaat MWY of GVPC is.

² Minstens één selectieve plaat of meerdere van deze selectieve antibiotica platen.

6.5.2 Uitzondering A1: voor drinkwatermonsters met een heel lage concentratie *Legionella* en een lage concentratie interfererende micro-organismen: rechtstreekse plaatsing van membraanfilter op agarmedium na membraanfiltratie

Filtreer het monster (zie 6.3.3) en plaats de onbehandelde membraanfilter rechtstreeks op één plaat BCYE-agar (5.1.4). De membraanfilters behandeld met een zuuroplossing volgens 6.4.2 worden geplaatst op één of meer selectieve of zeer selectieve platen van BCYE+AB-agar (5.1.5) of MWY-agar (5.1.6) of GVPC-agar (5.1.7).

		Stap 1	
		Watermatrix A	
		Drinkwatermonster met lage concentratie interfererende micro-organismen (6.5.2)	
		Stap 4	
Stap 2	Stap 3	BCYE	BCYE+AB of MWY of GVPC ³
cellulose-nitraat of-ester membraanfiltratie 0,2 of 0,45 µm en filter op plaat (optioneel met warmte voorbehandeling)	onbehandeld	x	
	zuur behandeling		x

³ Minstens één selectieve plaat of meerdere van deze selectieve antibiotica platen.

6.5.3 Watermatrix B: koeltorenwaters met hoge concentratie interfererende micro-organismen

Gebruik watermonsters met een hoge concentratie van interfererende micro-organismen ongeconcentreerd (voor rechtstreekse uitplating) en geconcentreerd (membraanfiltratie + elutieprocedure zie 6.3.2) (en bijkomend het concentraat eventueel verdund (1:10)). Verdeel telkens elk submonster in drie porties. Gebruik een portie onbehandeld, het tweede gedeelte voor warmte behandeling (6.4.1) en het derde gedeelte voor behandeling met zuuroplossing (6.4.2). Spatel (4.2.9) en inoculeer voor **R 0,1 ml** en voor de MF 0,1 (of 0,2) ml van elk net gevortexte gedeelte van de submonsters minstens op één plaat MWY-agar (5.1.6) of op één plaat GVPC-agar (5.1.7).

		Stap 1
		Watermatrix B
		Watermonster: koeltorenwater met hoge concentratie interfererende micro-organismen (6.5.3)
		Stap 4
Stap 2	Stap 3	MWY of GVPC ⁴
polycarbonaat of polyethersulfon membraanfiltratie 0,2 µm van beoogd volume 250ml en elutieprocedure met glaspapels	onbehandeld	x
	warmte behandeling	x
	zuur behandeling	x
rechtstreekse uitplating	onbehandeld	x
	warmte behandeling	x
	zuur behandeling	x

⁴ Minstens één selectieve plaat of meerdere van deze selectieve antibiotica platen.

6.5.4 Watermatrix C: zwaar beladen koeltorenwaters met extreme hoge concentratie interfererende micro-organismen

Gebruik watermonsters met een extreem hoge concentratie van interfererende micro-organismen ongeconcentreerd (voor rechtstreekse uitplating) en geconcentreerd op een 0,45 µm filter (membraanfiltratie + elutieprocedure zie 6.3.2) (en bijkomend het concentraat eventueel verdund (1:10)).

Behandel de geconcentreerde fractie en het ongeconcentreerd watermonster voor rechtstreekse uitplating telkens met warmte (6.4.1) en met zuur (6.4.2) en een derde portie met een combinatie van warmte en zuur. Voor deze gecombineerde behandeling wordt eerst de warmte behandeling (zie 6.4.1) gedaan, gevolgd door de zuur behandeling (zie 6.4.2) waardoor de verdunning 1:10 wordt bekomen. Eventueel wordt deze fractie na de dubbele behandeling nog eens extra verdund (= finaal 1:100) in steriel diluent (5.1.1). Het is belangrijk om het met warmte behandelde monster af te koelen tot kamertemperatuur voordat de zuur behandeling wordt uitgevoerd.

Spatel (4.2.9) en inoculeer voor **R 0,1 ml** en voor de MF 0,1 (of 0,2) ml van elk net gevortexte gedeelte van de submonsters minstens op één plaat MWY-agar (5.1.6) of op één plaat GVPC-agar (5.1.7).

		Stap 1
		Watermatrix C
		Watermonster: zwaar beladen koeltorenwater, ander afvalwater met extreem hoge concentratie interfererende micro-organismen (6.5.4)
		Stap 4
Stap 2	Stap 3	MWY of GVPC ⁶
polycarbonaat of polyethersulfon membraanfiltratie 0,45 µm ⁵ van beoogd volume 250ml en elutieprocedure met glaspereels	warmte behandeling	x
	zuur behandeling	x
	combinatie eerst warmte dan zuur behandeling	x
rechtstreekse uitplating (eventueel na verdunning)	warmte behandeling	x
	zuur behandeling	x
	combinatie eerst warmte dan zuur behandeling	x

⁵ Filtratie van beoogd volume van 250ml op een 0,45 µm filter, desnoods gebruik van 2 filters; beide filters worden samen in één elutiepotje met parels geëluëerd.

⁶ Minstens één selectieve plaat of meerdere van deze selectieve antibiotica platen.

6.5.5 Incubatie

Laat de geïnoculeerde platen staan totdat het geïnoculeerde volume is geabsorbeerd, draai de platen om en incubeer ze bij (36±2)°C (4.1.2) gedurende **10±1 d**. Maak een vochtige atmosfeer om uitdroging van de platen te voorkomen, bijvoorbeeld door ze in te pakken in plastic zakjes of dozen, of door te incuberen in een incubator met een vochtigheid-controlesysteem.

Opmerking: validatiegegevens met behulp van gespikete monsters hebben geen verschil in tellingen tussen 7 d en 10 d incubatie aangetoond. Natuurlijke monsters met wilde *Legionella* stammen kunnen echter de volledige incubatietijd van 10±1 d nodig hebben om de groei te bekomen.

6.5.6 Aflezen van de platen

Controleer de platen voor het eerst op dag 3, 4 of 5, dit ter identificatie van monsters waar zich overgroei voordoet, gevolgd door minstens een finale controle aan het einde van de incubatieperiode.

Voor drinkwater: bij de eerste aflezing op dag 3, 4 of 5, dient minstens het tijdstip van de controle geregistreerd te worden. Wanneer overgroei dreigt, dient ook het resultaat van de telling geregistreerd te worden. Bij de daaropvolgende aflezingen dienen het tijdstip en het resultaat van de controle geregistreerd te worden.

Voor koeltorenwater: bij elke aflezing dient het tijdstip en het resultaat van de controle geregistreerd te worden.

Het uiteindelijke kwantitatieve resultaat is enkel beschikbaar aan het einde van de incubatieperiode (6.5.5). Aangezien *Legionella* langzaam groeit en kan worden gemaskeerd door de groei van andere micro-organismen, worden platen bij voorkeur beoordeeld met een stereomicroscop (4.2.10) met schuine invalsverlichting. Noteer het aantal van elk type presumptieve aanwezige *Legionella*.

Legionella kolonies zijn in het algemeen witgrijs maar kunnen ook in andere kleuren verschijnen. Ze hebben een karakteristieke morfologie: kolonies hebben een gave rand en vertonen een typische matglazen uitstraling⁷.

⁷ De kolonies *Legionella pneumophila* vertonen vaak een groenroze rand onder een stereomicroscop

6.5.7 Bevestiging van Legionella verdachte kolonies met ultraviolet licht

Onder een ultraviolet lamp (4.2.11), autofluoresceren verschillende soorten *Legionella* kolonies als helderblauw/briljant wit (*L. anisa*, *L. bozemanii*, *L. cherrii*, *L. dumoffii*, *L. gormanii*, *L. gratiana*, *L. parisiensis*, *L. steigerwaltii* en *L. tucsonensis*); *L. erythra* en *L. rubrilucens* lijken rood. Kolonies *L. pneumophila* lijken dof groen, vaak met gele tinten, en autofluoresceren niet. De kleur van de fluorescentie kan bijdragen tot het differentiëren van kolonies in monsters die verschillende soorten *Legionella* bevatten. Om te vermijden dat *Legionella* kolonies kunnen worden of beschadigd of afgedood zodat ze niet verder kunnen worden gekweekt, mogen platen niet langer aan ultraviolet licht blootgesteld worden dan nodig is. Er dient opgemerkt te worden dat nieuwe soorten *Legionella* andere eigenschappen kunnen bezitten dan deze hierboven beschreven. *Legionella* verdachte kolonies die onder UV licht helderblauw/briljant wit oplichten hoeven niet te worden bevestigd en worden gerapporteerd als *Legionella* species (non-pneumophila). Van de presumptieve *Legionella* die niet onder UV fluoresceren worden nog steeds (minstens) 6 kolonies verder bevestigd via de gebruikelijke bevestigingsstappen zie 6.6, 0 en 6.8 (overenting / serotypering of Maldi-Tof / serotypering).

6.6 BEVESTIGING VAN PRESUMPTIEVE LEGIONELLA KOLONIES OP CULTUURMEDIA BCYE(+CYS) EN BCYE-CYS AGAR

In de loop van de incubatie van de platen die onder 6.5.5 wordt uitgevoerd dienen er **per behandeling** bevestigingstesten gedaan te worden, vertrekkend van de pla(a)t(en) met het hoogste aantal **presumptieve** *Legionella* kolonies per volume-eenheid (zie 6.5.6). Kies per behandeling en per morfologische vorm minstens twee presumptieve *Legionella* kolonies, met een minimum van 6 presumptieve *Legionella* kolonies in totaal van alle behandelingen (indien het totaal presumptieve *Legionella* kolonies minder dan zes kolonies bedraagt worden alle presumptieve *Legionella* kolonies bevestigd).

Legionella kolonies behorende tot verschillende species en/of serotypes vertonen doorgaans verschillen⁸ in morfologie of kleur, en zijn mogelijks ook na verschillende incubatietijden zichtbaar (*Legionella pneumophila* bijvoorbeeld is reeds zichtbaar na 3 dagen incubatie, bepaalde *Legionella* species worden pas na 5 dagen incubatie zichtbaar). Op die basis kunnen *Legionella* kolonies van verschillende types op eenzelfde of verschillende platen worden onderscheiden.

Voor de bevestiging worden de presumptieve *Legionella* bacteriën overgeënt met een entnaald met Pt-öse (4.2.8) op één BCYE(+cys) plaat (5.1.4) en één BCYE-cys plaat of evenwaardig (5.1.8). Neem de nodige voorzorgen om geen cultuurmedium samen met de kolonie over te brengen en ent eerst een plaat van BCYE-cys agar plaat en pas daarna de BCYE(+cys)-agar plaat.

De platen worden geïncubeerd gedurende 3 d tot 5 d bij $36 \pm 2^\circ\text{C}$ (4.1.2) tot er groei optreedt. Platen die na drie dagen geen groei vertonen worden verder geïncubeerd tot 5 dagen. *Legionella* vertoont groei op de BCYE(+cys) en niet op de BCYE-cys. Noteer de resultaten voor elke plaat.

L. oakridgensis en *L. spiritensis* vereisen L-cysteïne en ijzer (III) voor de primaire isolatie, maar groeien daarna soms zwak in afwezigheid van toegevoegd L-cysteïne. Bijgevolg moet een zorgvuldige vergelijking gemaakt worden met de verschillen in groeimedia met of zonder toevoeging.

⁸ Belangrijk: het kan voorkomen dat verschillende species of serotypes toch eenzelfde morfologie vertonen, en andersom kunnen kolonies met verschillende morfologie toch tot eenzelfde species of serotype behoren.

6.7 BIJKOMENDE BEVESTIGING VIA SEROTYPERING VAN PRESUMPTIEVE LEGIONELLA KOLONIES MET EEN AGGLUTINATIE OF IMMUNOASSAY TEST

De *Legionella* kolonies dienen bijkomend bevestigd te worden via serotypering met een agglutinatietest of met een immunochromatografische test (5.1.10). Alle presumptieve *Legionella*

bacteriën die groei vertonen op de BCYE(+cys) en niet op de BCYE-cys uit 6.6. worden getest volgens de procedure in de bijsluiter.

Voor de agglutinatie test gaan antilichaampartikels agglutineren in aanwezigheid van specifieke *Legionella* celwandantigenen waarbij duidelijke zichtbare precipitaten worden gevormd.

Voor serotypering met de immunochromatografische test voor de kwalitatieve detectie van *Legionella* wordt een immunoassay uitgevoerd.

Een test dient een indeling in drie groepen toe te laten:

Legionella pneumophila serotype 1

Legionella pneumophila serotype 2-14 (2-15)

Legionella species (non- *pneumophila*).

Alle waarnemingen worden genoteerd.

Met bepaalde commerciële serologische kits voor serotypering van "*Legionella species non-pneumophila*" worden er slechts een zevental species bepaald (*L. longbeachae* 1 en 2, *L. bosemanii*, *L. dumofii*, *L. gormanii*, *L. jordanis*, *L. micdadei*, *L. anisa*).

Wanneer presumptieve *Legionella* niet groeien op BCYE-L-cysteïne en wel groeien BCYE+L-cysteïne en niet reageren met het *Legionella species* reagens betekent dit niet dat ze geen *Legionella* zijn. Ze kunnen tot een ander species behoren dan *L. pneumophila*, *L. longbeachae*, *L. bosemanii*, *L. dumofii*, *L. gormanii*, *L. jordanis*, *L. micdadei*, *L. anisa*. Hier biedt het gebruik van bv. MALDI-TOF (zie 6.8) een grote ondersteuning voor een correcte identificatie van presumptieven die mogelijk behoren tot species die niet met een kit geserotypeerd worden.

De immunoassay test daarentegen laat de detectie toe van alle *Legionella species*. Met een dergelijke kit worden om elk *Legionella*-isolaat te classificeren monoklonale antilichamen Mab (monoclonal antibodies) tegen verschillende componenten van de bacteriecelwand gebruikt. Mabs tegen de peptidoglycan-geassocieerd lipoproteïne PAL voorkomend in alle *Legionella*-soorten wordt gebruikt voor de *Legionella* genusdetectie.

6.8 IDENTIFICATIE VAN *LEGIONELLA* DOOR MIDDEL VAN MALDI-TOF MS (MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION-IONIZATION TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY)

Voor de identificatie van *Legionella* en ter aanvulling van de bevestigingstesten kan gebruik gemaakt worden van de MALDI-TOF MS technologie. Hiervoor dient wel een verificatie uitgevoerd te worden conform ISO 16140.

Voor de identificatie van *Legionella* door middel van MALDI-TOF MS dient zoals aangegeven in 6.6 per behandeling en per morfologische vorm minstens twee presumptieve *Legionella* kolonies, met een minimum van 6 presumptieve *Legionella* kolonies in totaal van alle behandelingen getest te worden. Voor deze bevestiging kan er weliswaar gekozen worden om voorafgaandelijk geen overenting op BCYE(+cys) (5.1.4) / BCYE-cys plaat of evenwaardig (5.1.8) uit te voeren.

7 SPECIFIEKE RICHTLIJNEN VOOR ANALYSE VAN AFVALWATER UIT EEN WATERZUIVERINGINSTALLATIE/BIOLOGIEBEKKEN (WZI/BB)

7.1 PRINCIPE

De bepaling van *Legionella* in afvalwater van een WZI/BB dient uitgevoerd te worden gebaseerd op de methode voor watermatrix C mits volgende aanpassingen nodig om de analyse van dergelijke zwaar beladen monsters toe te laten.

De membraanfiltratie met deze matrix is heel moeilijk uitvoerbaar en genereert geen bruikbare resultaten. Voor kwantificatie van *Legionella* bacteriën dient er geen membraanfiltratie uitgevoerd te worden maar enkel rechtstreekse uitplatingen met inbegrip van voorbehandelingen en

verduunningen. Vanwege de aard van het afvalwater is het eluaat van de membraanfilter zo beladen met slurry en storende flora dat de groei van Legionella op de selectieve platen geheel of gedeeltelijk onderdrukt wordt.

Doorgaans vertoont een watermonster van een WZI/BB - wanneer het onaangeroerd staat - een supernatans en een slibfase dat uitzakt. De concentratie van Legionella is één tot twee logwaarden hoger in de uitgezakte slurryfase dan in het supernatans.

Daarom wordt een voorafgaande ultrasone behandeling uitgevoerd alsook wordt er tussen elke behandeling en elke analysestap een grondige homogenisatie gehandhaafd.

Naast de rechtstreekse uitplantingen na behandelingen met zuur en gecombineerde behandeling warmte met zuur worden verduunningen van deze fracties in meervoud uitgeplaat.

7.2 KWEEK

Analyseer watermonsters uit WZI/BB (extreem hoge concentratie van interfererende micro-organismen) enkel via rechtstreekse uitplanting.

Meng het afvalwatermonster grondig door herhaaldelijk omkeren (± 15 keer).

Neem een volume van 20-40 ml en breng dit over in een steriel recipiënt van 50 ml.

Plaats het recipiënt in een onverwarmd ultrasoon waterbad van 40-45 kHz en zorg ervoor dat het niveau van het waterbad zich boven het monsterniveau bevindt; pas ultrasoon toe gedurende 9 minuten.

Homogeniseer grondig bij elk volgende analysestap.

Behandel een eerste portie van het watermonster voor rechtstreekse uitplanting enerzijds met zuur (6.4.2) en een tweede portie met een combinatie van warmte en zuur. Voor deze gecombineerde behandeling wordt eerst de warmte behandeling (zie 6.4.1) gedaan, gevolgd door de zuur behandeling (zie 6.4.2). Het is belangrijk om het met warmte behandelde monster af te koelen tot kamertemperatuur voordat de zuur behandeling wordt uitgevoerd.

Beide fracties zijn na de behandeling met zuur reeds als verdunning 1:10, verdun beide fracties verder tot 1:100 en tot 1:1000 in steriel diluent (5.1.1). Spatel (4.2.9) en inoculeer 0,1 ml van elk net gevortexte submonster op minstens drie platen GVPC-agar (5.1.7).

		Stap 1
		Watermatrix C afvalwater van WZI/BB
		Stap 4
Stap 2	Stap 3	GVPC
ultrasoon 9 min rechtstreekse uitplantingen	Z 1/10: zuur behandeling (monster 1 : 9 zuurverhouding)	3 x
	Z 1/100 verdere verdunning tot 1/100	3 x
	Z 1/1000 verdere verdunning tot 1/1000	3 x
	TZ 1/10: warmte / zuur behandeling (monster 1 : 9 zuurverhouding)	3 x
	TZ 1/100 verdere verdunning tot 1/100	3 x
	TZ 1/1000 verdere verdunning tot 1/1000	3 x

Vervolg de analyse zoals 6.5.5 en verder. Het belang van nemen van foto's wordt benadrukt alsook het noteren van de hoedanigheid van het monster (aanwezigheid of niet van een uitgezakte slurryfase).

8 REAL-TIME PCR-DETECTIE EN KWANTIFICATIE VAN *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* IN DRINKWATER VOOR SCREENING IN KADER VAN EEN BEHEERSPLAN

8.1 PRINCIPE

De aanwezigheid van *Legionella pneumophila* in een drinkwatermonster wordt aangetoond door real-time PCR uit te voeren volgens de referentiemethode ISO/TS 12869. Een watermonster wordt eerst gefiltreerd, het DNA vanop de filter wordt geëxtraheerd en opgezuiverd met een purificatiekit. Dit DNA-extract wordt gebruikt voor een specifieke amplificatie van een DNA-sequentie dat codeert voor het virulentiegen mip.

Het al dan niet optreden van een PCR signaal wijst op de aan- of afwezigheid van *Legionella pneumophila* in het watermonster.

Bij real-time PCR gaat tijdens amplificatiecycli een fluorescent gelabelde probe specifiek voor de geamplificeerde sequentie gaan hybridiseren met het amplicon. Deze probe geeft enkel een fluorescerend signaal vrij in gebonden toestand met zijn target sequentie, zoniet wordt het fluorescerend signaal gequencht (geabsorbeerd). De intensiteit van het fluorescerend signaal stijgt tijdens de PCR-reactie volgens de hoeveelheid van het amplicon in het monster. Deze fluorescentie wordt gedetecteerd door de optische unit van een geschikte real-time PCR toestel met fluorofor specifieke filters en wordt met behulp van software weergegeven als een duidelijk te interpreteren resultaat.

Het al dan niet optreden van een fluorescerend signaal wijst op de aan- of afwezigheid van *Legionella pneumophila* in het watermonster.

Bij de kwantitatieve real-time PCR wordt een kalibratiecurve gemaakt met een standaardreeks DNA, en kan het target DNA gekwantificeerd worden.

Een volledige validatie dient aan te tonen dat deze alternatieve microbiologische methode geschikt is voor detectie van *Legionella pneumophila* in drinkwater (ISO 16140).

Voor implementatie is het dus aangewezen om een real-time PCR toestel samen met een commerciële kit bestemd voor real-time PCR-detectie en voor de DNA-extractie te gebruiken die reeds gevalideerd is door een derde partij. Dan dient voor ingebruikname geen diepgaande validatie meer uitgevoerd te worden, maar slechts een verificatie, zoals aangegeven in ISO/TS 12869 en NF T90-471.

8.2 PERFORMANTIEKARAKTERISTIEKEN KWALITATIEVE REAL-TIME PCR EN KWANTITATIEVE REAL-TIME PCR (qPCR)

Voor de kwalitatieve real-time PCR verificatie dienen concreet volgende criteria nagezien te worden:

- Positieve en negatieve controles
- Robuustheid van de methode, op steriele watermonsters en op een complexe matrix
- Deelname aan een interlaboratorium ringtest

Voor de qPCR verificatie dienen concreet volgende criteria nagezien te worden:

- Evaluatie van de kalibratiecurve
- Verificatie van de kwantificatielimiet LQqPCR uit de validatieprocedure
- Verificatie van de detectielimiet LDqPCR
- Robuustheid van de methode, op steriele watermonsters en op een complexe matrix
- Deelname aan een interlaboratorium ringtest.

Het betreft hier een beperkte verificatie omdat de kwantitatieve real-time PCR voorlopig enkel kan ingezet worden voor screening doeleinden, gezien het niet eenduidig verband tussen qPCR (GU/l) en kweek (kve/l).

8.3 SCREENING

Het is de bedoeling om de real-time PCR-techniek in te zetten louter voor het screenen van watermonsters binnen een beheersplan. Hiertoe wordt een 'dubbel' volume bemonsterd⁹, en een standaard volume getest met real-time PCR. Van de monsters die positief zijn (voor kwalitatieve real-time PCR een positief signaal) (voor qPCR dus met een resultaat groter dan de kwantificatielimiet LQqPCR), wordt het standaardvolume water onderworpen aan de uitplaatmethode voor kwantificatie, en wordt het resultaat van deze methode gerapporteerd. Voor monsters waarbij het resultaat met real-time PCR melding maakt van partiële, totale inhibitie, of een ongeldig resultaat wordt overgegaan tot de uitplaatmethode.

Voor monsters die negatief uit de real-time PCR komen, stopt de analyse en wordt een negatief resultaat gerapporteerd.

Indien een installatie dient gescreend en bemonsterd te worden waarbij voor desinfectie een 'thermische shockbehandeling' is uitgevoerd, dient de bemonstering minstens 24 uur na deze behandeling uitgevoerd te worden, daar er mogelijk nog aanwezige *Legionella* DNA fragmenten tijdens de PCR zouden kunnen interfereren.

Via de PCR-screening wordt enkel de wettelijke drinkwaterparameter *Legionella pneumophila* bepaald die beschouwd kan worden als indicatorparameter voor screening van installaties binnen een beheersplan.

Een negatief resultaat van de PCR-screening wordt uitgedrukt als "*Legionella pneumophila*: niet gedetecteerd" in het onderzochte volume, met de verwijzing naar de gebruikte methode.

9 SPECIFIEKE RICHTLIJNEN BIJ EEN KLINISCH BEVESTIGDE LEGIONELLOSE OF EEN UITBRAAK

9.1 AFLEZEN VAN DE PLATEN BIJ EEN KLINISCH BEVESTIGDE LEGIONELLOSE OF EEN UITBRAAK

Controleer de platen op dag 3, 4 of 5 zodat reeds overgegaan kan worden naar de bevestigingstest (zie 6.6). Na 3 tot 5 dagen incubatietijd van de bevestigingsplaten en uitvoeren van de serotypering (zie 0 en 6.8) dient dan aan het Agentschap Zorg en Gezondheid een indicatief *Legionella* resultaat doorgegeven te worden in het kader van verplichte melding bij vastgestelde Legionellose of een uitbraak.

De incubatie wordt dan verdergezet tot het einde van de volledige periode van 10±1 dagen waarna nogmaals de aflezing en bevestiging (bij bijkomende waargenomen verdachte groei) wordt uitgevoerd (zie 6.5.6, 6.6 en 0), en finaal opnieuw gerapporteerd aan het Agentschap Zorg en Gezondheid.

⁹ Zie WAC/1/A/001 of WAC/1/A/002

9.2 BEVESTIGING VAN PRESUMPTIEVE LEGIONELLA KOLONIES

Indien species-identificatie van de *Legionella* kolonies moet worden uitgevoerd (zie ISO 11731: 2017 Bijlage G) en opgenomen in het testrapport, dienen alle typische morfologieën uit alle platen te worden bevestigd en worden de identificaties gemeld.

9.3 SCREENING MET PCR

Screening (zie 8.3) enkel op *Legionella pneumophila* is niet van toepassing bij een klinisch bevestigde Legionellose of bij een uitbraak, gezien ook *Legionella non-pneumophila* Legionellose kunnen veroorzaken.

10 RAPPORTERING

10.1 FORMULES

Bereken het aantal kve/l *Legionella* in het oorspronkelijke monster (zie voorbeelden hieronder), conform ISO 8199, als volgt.

- ✓ Membraanfiltratie met elutieprocedure (onrechtstreekse filtratie)

$$C_s = \frac{a \times V_c}{V \times V_{\text{tot}}} \times V_s$$

- ✓ Rechtstreeks uitplating

$$C_s = \frac{a}{V_{\text{tot}}} \times V_s$$

- ✓ Membraanfiltratie, filter op plaat

$$C_s = \frac{a}{V_{\text{tot}}} \times V_s$$

Waarbij:

C_s is het aantal *Legionella* in kve/l

a is het aantal berekende bevestigde *Legionella* kolonies

$$a = \frac{\text{fractie positief bevestigd}}{\text{fractie totaal bevestigd}} \times \text{totaal aantal}$$

V_c is het (geconcentreerde) monstervolume in ml

V is het monstervolume geïnoculeerd per plaat of set platen (van zelfde groeimedum) in ml

V_{tot} is het totaal geanalyseerd monstervolume in ml

V_s is het gekozen referentievolumen om de concentratie van de micro-organismen in het watermonster weer te geven (gewoonlijk 1 000 ml)

10.2 AFSPRAKEN MET BETREKKING TOT RAPPORTERING

Rapporteer voor zowel **drinkwater** en **koeltorenwater**:

Legionella pneumophila serotype 1

Legionella pneumophila serotype 2-14 (2-15)

Legionella species (non- *pneumophila*)

Rapporteer telkens de hoogste omgerekende waarde in kve/l uit de voor de bevestigingstesten weerhouden platen, onafhankelijk vanuit membraanfiltratie of rechtstreekse uitplating, rekening houdend met de hieronder beschreven bijkomende voorwaarden. Bij het bepalen van de hoogste omgerekende waarde in kve/l dient rekening gehouden te worden met de verdunning.

Bij de rapportering vanuit de rechtstreekse uitplating (R) gelden voor elk van de verschillende *Legionella* species volgende bijkomende voorwaarden:

- indien het totaal aantal Legionellakolonies op een plaat minstens 3 bedraagt en **dus** een hoogste omgerekende waarde van ≥ 30.000 kve/l geeft, wordt vanuit de rechtstreekse uitplating gerapporteerd
- in de andere gevallen wordt gerapporteerd uit de membraanfiltratie met elutie
- indien de aanwezigheid van kolonies op de R een hoogste omgerekende waarde geeft en deze < 30.000 kve/l bedraagt, moet de aanwezigheid van deze kolonies als opmerking op het analyseverslag worden vermeld.

Dit kan op twee manieren:

- o Zonder indicatieve waarde:
Een hoger eindresultaat van de rechtstreekse uitplating werd niet in rekening gebracht wegens een laag aantal kolonies per species geteld
- o Met indicatieve waarde:
Een hoger eindresultaat van de rechtstreekse uitplating (indicatief: x kve/l) werd niet in rekening gebracht wegens een laag aantal kolonies per species geteld
- wanneer er geen resultaat is bij membraanfiltratie maar wel 1 of 2 kolonies op rechtstreekse uitplating moet een volwaardig eindresultaat gerapporteerd worden van bv. 10.000 resp. 20.000 kve/l; als opmerking wordt dan op het analyseverslag aangegeven dat enkel een resultaat bekomen werd vanuit de rechtstreekse uitplating op basis van een laag aantal kolonies nl. 1 of 2 per species.

Rapporteer bijkomend voor **koeltorenwater**:

het totale aantal *Legionella* spp, namelijk de som van de waarden *Legionella pneumophila* serotype 1 + *Legionella pneumophila* serotype 2-14(15) + *Legionella* species non-pneumophila.

Hierbij worden waarden $<$ rapportagegrens als nul beschouwd.

Zoals aangeven in 0 worden niet alle *Legionella* species non-pneumophila gedetecteerd bij gebruik van bepaalde agglutinatie kits. Het te rapporteren aantal *Legionella* species non-pneumophila is dan het aantal dat groeit op BCYE+cys én geen groei vertoont op BCYE-cys én via de bevestigingstest niet als *Legionella pneumophila* bepaald wordt.

Uitzonderlijk kan bij de serotypering geen onderscheid gemaakt worden tussen *Legionella pneumophila* serotype 1 en serotype 2-14 (2-15):

- wanneer een kruisreactie ontstaat, d.w.z. wanneer de serotypering geen éénduidig resultaat oplevert
- wanneer morfologisch identieke presumptieve *Legionella* kolonies bij de serotypering geen éénduidig resultaat opleveren.

Rapporteer in dit geval niet *Legionella pneumophila* serotype 1 en *Legionella pneumophila* serotype 2-14 (2-15) afzonderlijk, maar de som van beiden.

Bij afwezigheid, wordt de rapportagegrens vermeld in kve/l berekend volgens de gebruikte procedure (zie ISO 11731: 2017 tabel J.1). Indien een verdunningsfactor van toepassing is wordt de rapportagegrens met deze factor verhoogd.

In geval er geen of slechts een tussentijds resultaat beschikbaar is vanwege overgroei, is een opmerking op het analyseverslag vereist:

- indien er van alle geïncubeerde platen door overgroei geen enkel resultaat voor *Legionella* kan gegenereerd worden, dan betekent dit niet dat er geen *Legionella* aanwezig is in het watermonster. Hier dient de opmerking aangegeven te worden dat 'door overgroei van interfererende flora niet kan gegarandeerd worden dat *Legionella* in het watermonster afwezig is'. In geen geval mag het resultaat uitdrukt worden als "niet gedetecteerd" in het onderzochte volume of mag < rapportagegrens als resultaat doorgegeven worden.
- indien er eerst een tussentijdse telling van gedetecteerde presumptieve (en na bevestiging aangetoonde) *Legionella* is uitgevoerd en in latere fase door overgroei van interfererende flora geen finaal *Legionella* resultaat kan bepaald worden, dient bij het resultaat van de tussentijdse telling een opmerking aangegeven te worden dat 'door overgroei van interfererende flora voor dit watermonster enkel een indicatief *Legionella* spp. resultaat kan gerapporteerd worden'.

Voor de rapportering in geval van **PCR-screening** gelden andere afspraken zie 7.

Rapporteer voor afvalwater:

Sommeer de tellingen van de drie (of meer indien uitgevoerd) platen per behandeling. Rapporteer de hoogste omgerekende waarde in kve/l uit alle behandelingen, rekening houdend met de verdunningen voor

Legionella pneumophila serotype 1

Legionella pneumophila serotype 2-14 (2-15)

Legionella species (non- *pneumophila*)

Voor de detectielimiet rapporteer deze van de verdunning waarvan de platen geen overgroei vertonen en dus interpreteerbaar zijn.

10.3 VOORBEELDEN

- Filtratie van drinkwater 1000 ml; uitplatingen 100 µl

		DW aantal kolonies omgerekend met verdunning 1/10 via zuurbehandeling							
		R		MF elutie in 5 ml oplossing					
				onbehandeld		warmte		zuur	
		BCYE	BCYE+AB	BCYE	MWY	BCYE	MWY	BCYE	MWY
Legionella pneumophila serotype 1		3	0	273	242	176	192	320	180
Legionella pneumophila serotype 2-14(15)		0	0	38	36	40	27	30	40
Legionella species		0	0	0	0	0	0	0	0

- rapporteer
- 3.10⁴ of 30.000 kve/l *Legionella pneumophila* serotype 1
- 2.10³ of 2.000 kve/l *Legionella pneumophila* serotype 2-14(15)
- < 50 kve/l *Legionella* species (non- *pneumophila*)

- Filtratie van koeltorenwater 250 ml; uitplatingen 100 µl

	AW scenario B		aantal kolonies omgerekend met verdunning 1/10 via zuurbehandeling						
	R		MF elutie in 5 ml oplossing						
	GVPC			onbehandeld			warmte		zuur
	onbehandeld	warmte	zuur	MWY	GVPC	MWY	GVPC	MWY	GVPC
	0	0	0	overgroeit	38	46	35	70	40
<i>Legionella pneumophila</i> serotype 1	0	0	0		overgroeit	0	0	0	0
<i>Legionella pneumophila</i> serotype 2-14(15)	0	0	0		24	31	26	30	20
<i>Legionella</i> species	0	1	0						

□ rapporteer $1,4 \cdot 10^4$ of 14.000 kve/l *Legionella pneumophila* serotype 1
 < 200 kve/l *Legionella pneumophila* serotype 2-14(15)
 $6,2 \cdot 10^3$ of 6.200 kve/l *Legionella* species (non- *pneumophila*) (opmerking: een hoger eindresultaat van de rechtstreekse uitplating (10.000 kve/l *Legionella* species (non-*pneumophila*)) werd niet in rekening gebracht wegens een laag aantal kolonies geteld)
 Totaal aantal *Legionella*: $2,02 \cdot 10^4$ of 20.200 kve/l

- Analyse van afvalwater: watermonsters uit WZI
 Tellingen van rechtstreekse uitplating (100 µl) op de drie GVPC platen voor de behandelingen

Z 1/1000 : *Legionella pneumophila* serotype 1 7, 31, 19

TZ 1/1000 : *Legionella pneumophila* serotype 1 15, 20, 6

voor zuur behandeling sommeer $7 + 31 + 19 = 57$

voor TZ behandeling sommeer $15 + 20 + 11 = 46$

□ rapporteer

omgerekend $57 \times \frac{1000}{0,3} \times 1000$ (0,3 ml uitplaten en omrekenen naar 1 liter, wegens verdunning 1/1000)
 0,3

$1,9 \cdot 10^8$ kve/l *Legionella pneumophila* serotype 1

Voor de detectielimiet rapporteer aannemend dat de verdunning 1/100 interpreteerbaar is

< $3 \cdot 10^5$ kve/L *Legionella pneumophila* serotype 2-14(15)

< $3 \cdot 10^5$ kve/L *Legionella* species (non-*pneumophila*)

omgerekend $1 \times \frac{1000}{0,3} \times 100$ (0,3 ml uitplaten en omrekenen naar 1 liter, wegens verdunning 1/100)
 0,3

10.4 MINIMALE INHOUD RAPPORT

Vermelding in het rapport:

- de resultaten
- het volume van het in behandeling genomen watermonster
- de verwijzing naar de betreffende WAC methode en de verwijzing van het gebruikte scenario of watermatrix
- de monsteromschrijving en gegevens van het monsternamformulier
- de gemeten temperatuur bij monsternam
- de monsternemer
- bijzondere opmerkingen (bv. het gebruik van 0,45 µm filter voor watermatrix C bij de elutieprocedure)

11 REFERENTIES

- ISO 11731 (2017) Water quality - Enumeration of *Legionella*

- ISO 8199:2018 Water quality - General requirements and guidance for microbiological examinations by culture.
- ISO 16140-1:2016 Microbiology of the food chain - Method validation - Part 1: Vocabulary
- ISO 16140-2:2016 Microbiology of the food chain - Method validation - Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method
- WAC/I/A/010 Conservering en behandeling van watermonsters
- WAC/VI/A/003 Kwaliteitseisen voor de analysemethoden
- Bevestiging van Legionella verdachte kolonies [met ultraviolet licht](#) die geïsoleerd zijn uit water.
- ISO/TS 12869:2019 Water quality - Detection and qualification of *Legionella spp.* and/or *Legionella pneumophila* by concentration and genic amplification by quantitative polymerase chain reaction (qPCR)
- An international trial of quantitative PCR for monitoring *Legionella* in artificial water systems. J.V. Lee et al Journal of Applied Microbiology 110, 1032-1044 2011
- NF T90-471 Juin 2015 Qualité de l'eau - Détection et quantification des *Legionella* et/ou *Legionella pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (qPCR)
- <https://www.zorg-en-gezondheid.be/sites/default/files/atoms/files/Legionella%20Final.pdf>
- MALDI-TOF MS
<http://www.gene-quantification.de/qpcr-ngs-2013/posters/P036-qPCR-NGS-2013.pdf>
- http://www.afsca.be/laboratoria/labinfo/documents/2015-04_labinfo13-p12_nl.pdf
- Pavlovic, Melanie, et al. "Application of MALDI-TOF MS for the identification of food borne bacteria." The open microbiology journal 7 (2013): 135.

Bepaling van *Pseudomonas aeruginosa*

INHOUD

1	Toepassingsgebied	3
2	Principe	3
3	Opmerkingen	4
4	Reagentia en bereidingen	5
5	Apparatuur en materiaal	5
6	Procedure	6
6.1	<i>Monstervoorbereiding</i>	6
6.2	<i>Analyse via de membraanfiltratie</i>	6
6.3	<i>Bevestigingstesten vanuit PCN</i>	7
6.4	<i>Identificatie van <i>Pseudomonas aeruginosa</i> door middel van MALDI-TOF MS (MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION-IONIZATION TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY)</i>	8
6.5	<i>Telling</i>	8
7	Rapportering	8
7.1	<i>Rapport</i>	8
8	Referenties	9

1 TOEPASSINGSGEBIED

Dit voorschrift volgt enerzijds de ISO 16266:2006 procedure, die een methode geeft voor het aantonen en kwantificeren van *Pseudomonas aeruginosa* in water.

De procedure is van toepassing bij het onderzoek van gebotteld water alsook bijvoorbeeld van water bestemd voor menselijke consumptie, recreatiewater en oppervlaktewater.

Daarnaast kan het NF gevalideerde medium RAPID'*P.aeruginosa* agar aangewend worden als alternatieve methode vergelijkbaar met de norm ISO 16266 (zie 8 Referenties).

Het RAPID'*P.aeruginosa* is geschikt voor het testen van water voor menselijke consumptie, gebotteld water, onbehandeld water zoals putwater, behandeld recreatiewater zoals zwembadwater en thermaal water.

Voor analyse van drinkwater, niet-koolzuurhoudend gebotteld water voor menselijke consumptie, grondwater, zwembad- en spa-water, inclusief water met hoge achtergrondconcentraties van heterotrofe bacteriën kan voor de detectie van *Pseudomonas aeruginosa* ook de de Pseudalert MPN methode gebruikt worden.

Een aangewende analysemethode dient conform de WAC methode te zijn. Het meetprincipe mag niet anders zijn, en het isolatiemedium moet hetzelfde zijn. Afwijkingen mogen niet kritisch zijn en geen invloed hebben op een resultaat. Extra stappen zijn aanvaardbaar, zolang ze het resultaat enkel meer ondersteunen.

2 PRINCIPE

Pseudomonas aeruginosa zijn opportunistische humane (en animale en plant-) pathogenen, in staat om te groeien in water met heel lage concentraties aan voedingsstoffen.

Bacteriën van het genus *Pseudomonas* zijn Gram-negatieve, katalase positieve niet-sporevormende staafjes die beweeglijk zijn door het bezit van één of meer polaire flagellen. Ze zijn strikt aëroob (uitgez. soorten die nitraat als waterstofacceptor kunnen gebruiken) en zetten suikers uitsluitend oxidatief om. Vele stammen produceren pigmenten waaronder het geel-groene pyoverdine en het blauwe pyocyanine die van diagnostische waarde zijn. Cf. ISO 16266 is er om de pigmentproductie te bevorderen in het groeimedium magnesiumchloride en kaliumsulfaat aanwezig. Cetrimide is de selectieve agens van *Pseudomonas* in het groeimedium.

De analyse omvat een membraanfiltratie (0,45µm) van een bepaald volume water, en het aantal karakteristieke kolonies op het membraan worden geteld na incubatie. Pyocyanine producerende kolonies worden als bevestigde *Pseudomonas aeruginosa* beschouwd. Andere fluorescerende of roodbruine kolonies vereisen een bevestiging.

Ter specifieke bevestiging worden presumptieve kolonies gegroeid op nutrient agar (of een gelijkwaardig niet-selectief medium zonder fermenteerbare C-bron). Na incubatie worden culturen die initieel niet fluorescent waren getest op oxidase reactie. De oxidase-positieve culturen worden getest op de productie van fluoresceïne en de eigenschap om ammoniak te produceren vanuit acetamide. Culturen die oorspronkelijk fluorescent waren worden getest op de eigenschap om ammoniak te produceren uit acetamide.

RAPID'*P.aeruginosa* is een selectief chromogeen medium voor de directe telling van *Pseudomonas aeruginosa* met behulp van de membraanfiltratiemethode zonder verdere bevestigingstesten. Het principe van het RAPID'*P.aeruginosa*-medium is gebaseerd op de opsporing van een enzymatische activiteit die typisch is voor *Pseudomonas aeruginosa*. Onder invloed van het enzym wordt een specifiek chromogeen substraat gesplitst, wat leidt tot de vorming van een blauw tot blauwgroen neerslag op de *Pseudomonas aeruginosa*-kolonies.

Het selectieve mengsel remt het merendeel van de interfererende flora en andere *Pseudomonas* species. Hun kolonies zien er transparant of geel gepigmenteerd uit en zijn gemakkelijk te onderscheiden van die van *Pseudomonas aeruginosa*.

De Pseudalert is gebaseerd op een bacteriële enzymdetectietechnologie die de aanwezigheid van *Pseudomonas aeruginosa* aangeeft d.m.v. hydrolyse van een substraat dat aanwezig is in het Pseudalert-reagens. *Pseudomonas aeruginosa* cellen groeien snel en reproduceren zich met de rijke voorradige aminozuren, vitaminen en andere voedingsstoffen aanwezig in het Pseudalert-reagens. Actief groeiende stammen van *Pseudomonas aeruginosa* hebben een enzym dat het substraat opsplijst om een blauwe fluorescentie te produceren onder UV-licht. Pseudalert detecteert *Pseudomonas aeruginosa* bij 1 MPN in monsters van 100/250 ml binnen 24 uur.

In Richtlijn 2009/54/EG is omschreven dat vanaf de bron en ook bij de verkoop van mineraal water of bronwater deze vrij moet zijn van *Pseudomonas aeruginosa* (in een monster van 250 ml). Waters zoals oa. zwembadwater worden getest, en water voor menselijke consumptie kan met het oog op volksgezondheid worden getest op *Pseudomonas aeruginosa*. Het aantal kve *Pseudomonas aeruginosa* wordt dan per 100 ml bepaald.

Theoretisch kan de aanwezigheid van 1 kolonievormende eenheid per 100/250 ml bepaald worden. Door de aanwezigheid van stoorflora en andere matrix-invloeden is dit niet altijd het geval.

Omschrijving van *Pseudomonas aeruginosa* conform de ISO 16266

Pseudomonas aeruginosa zijn micro-organismen die:

- groeien op selectieve media die cetrimide bevatten en die pyocyanine produceren
- of groeien op selectieve media die cetrimide bevatten, oxidase positief zijn en fluoresceren onder UV 360 ± 20 nm en die in staat zijn ammoniak te produceren uit acetamide
- of groeien op RAPID'*P.aeruginosa* agar onder vorm van blauwe tot blauwgroene kolonies
- of groeien in het Pseudalert-reagens en een blauwe fluorescentie onder UV-licht veroorzaken.

Pseudomonas aeruginosa is het type species van het genus *Pseudomonas*.

Het is een Gram-negatieve, niet-sporevormende staaf dat oxidase en katalase positief is. Het vertoont oxidatieve metabolisme zoals weergegeven door Hugh en Leifson test, reduceert normaal nitraat tot een verder stadium dan nitriet en produceert ammoniak uit de afbraak van acetamide, en de meeste stammen (98%) produceren een wateroplosbaar fluorescerend pigment. Het overgrote deel van de stammen groeien bij 42°C en niet bij 4°C. Op deze basis kan een onderscheid worden gemaakt tussen *Pseudomonas aeruginosa* en *Pseudomonas fluorescens* die groeit bij 4°C en niet bij 42°C. Gelatine wordt vervloeid, caseïne gehydrolyseerd, maar zetmeel wordt niet gehydrolyseerd. Het pigment pyocyanine (blauw/groen) wordt door meer dan 90% van de stammen geproduceerd.

3 OPMERKINGEN

Voor de conservering en behandeling van watermonsters wordt verwezen naar WAC/I/A/010. Voor kwaliteitscontrole wordt verwezen naar WAC/VI/A/003.

Het laboratorium dient uitgerust te zijn met een microbiologische veiligheidswerkkast MVK (5.1.7). en een gevalideerde autoclaaf (5.1.8).

Elk werkoppervlak wordt voor en na gebruik ontsmet met een biocide naar keuze (4.1.8).

Vóór het inoculeren van agarmedia in petriplaten, enkel indien nodig, dient het oppervlak van de agarplaten gedroogd te worden. Hiervoor worden de platen, met de agarbodem naar boven, dakpansgewijs van het deksel geplaatst en gedroogd in een MVK (**Fout! Verwijzingsbron niet gevonden.**). Afhankelijk van de periode vanaf de bereidingsdatum tot het in gebruik nemen van de platen, kan de droogtijd variëren (15±20 minuten).

4 REAGENTIA EN BEREIDINGEN

- 4.1.1 Pseudomonas agar base + supplement PCN platen of RAPID'*P.aeruginosa* agar of Pseudalert reagens
- 4.1.2 King's B medium
- 4.1.3 Acetamide bouillon
- 4.1.4 Nutrient agar platen
- 4.1.5 Oxidase reagens
- 4.1.6 Nessler reagens
- 4.1.7 Ringer 1/40¹ oplossing
- 4.1.8 Umonium³⁸ 2,5% of gelijkwaardig biocide
- 4.1.9 ultra puur water

5 APPARATUUR EN MATERIAAL

- 5.1.1 Schudtoestel
- 5.1.2 Pipetus akku
- 5.1.3 Filtratietoestel met pomp
- 5.1.4 Membraandispenser met steriele cellulose ester 0,45 µm filters
- 5.1.5 Incubator 36 ± 2°C
- 5.1.6 Kolonietelapparaat
- 5.1.7 Veiligheidskabinet
- 5.1.8 Autoclaaf 121 ± 3°C
- 5.1.9 Wegwerppipetten
- 5.1.10 Steriele flessen
- 5.1.11 Automatische pipetten en wegwerptips
- 5.1.12 Pincet
- 5.1.13 Entnaald met Pt-öse
- 5.1.14 UV lamp met golflengte 360 ±20 nm
- 5.1.15 Pseudalert[®] / Quanti-tray[®] + Idexx sealer + frame

¹ Voor een verdunningsreeks van een watermonster aan ten maken mogen naast Ringer 1/4 of 1/40 alsook steriel leidingswater of andere geschikte diluenten worden gebruikt zoals vermeld in ISO 8199 (Water quality - General guide to the enumeration of micro-organisms by culture). De ISO lijst is niet beperkend.

6 PROCEDURE

6.1 MONSTERVEROEBEREIDING

Een monster wordt gehomogeniseerd door de fles grondig te schudden, ofwel door de fles op een schudtoestel (5.1.1) te brengen.

Uit voorkennis van een monster wordt indien nodig een verdunning gemaakt. Van een te verdunnen watermonster wordt aan de hand van wegwerppipetten (5.1.9) bediend door de pipetus (5.1.2) een verdunning uitgevoerd van een factor 10:

in een fles (5.1.10) gevuld met 225 ml steriele Ringer 1/40 (4.1.7) wordt 25 ml van de suspensie van de hoogste verdunning toegevoegd; vermenging met de hand of op een schudtoestel (5.1.1).

De procedure wordt achtereenvolgend uitgevoerd tot de gewenste verdunningen zijn bereikt.

De verdunningen van de monsters dienen dusdanig gekozen te worden dat het aantal te tellen kolonies op een membraan standaard tussen 10 en 100 ligt. De voorkeur wordt gegeven aan de verdunning met een resultaat in deze range. Aangezien *Pseudomonas aeruginosa* doorgaans grote kolonies vormen, zal in de praktijk de hoogste telbare waarde op een filter lager liggen.

6.2 ANALYSE VIA DE MEMBRAANFILTRATIE

De membraanfiltratie wordt uitgevoerd met een filtratietoestel met pomp (5.1.3). De steriele filtratiekokers worden of zijn voorzien van steriele 0,45µm membraanfilters (5.1.4).

Een volume van 250 ml of 100 ml monster wordt gefiltreerd.

De filters worden aan de hand van een steriele pincet (5.1.12) telkens aangebracht op een PCN agar of RAPID'*P.aeruginosa* agar (luchtbellen tussen membraan en bodem vermijden) (4.1.1), en geïncubeerd op 36 ± 2°C (5.1.5). **De agarplaten worden na 22 tot 44±4 uur voor PCN agar en tot max 30 uur voor RAPID'*P.aeruginosa* agar afgelezen.** De kolonies op het membraan worden geteld met behulp van een kolonietelapparaat (5.1.6).

- Blauwe tot blauwgroene kolonies op het chromogeen medium RAPID'*P.aeruginosa* agar worden als bevestigde *Pseudomonas aeruginosa* beschouwd.
- Pyocyanine producerende kolonies op PCN die een blauw-groene tot geel-groene kleur vertonen worden als bevestigde *Pseudomonas aeruginosa* beschouwd.
- Het membraan op PCN wordt onderzocht onder een ultraviolet lamp (5.1.14) van 360 nm ± 20 nm in een donkere kamer. De tijd dient beperkt te worden tot een minimum zodat de bacteriën niet worden afgedood en niet meer zouden groeien op de bevestigingsmedia. Alle niet-pyocyanine producerende fluorescerende kolonies worden geteld als presumptieve *Pseudomonas aeruginosa* en bevestigd in een acetamide bouillon (4.1.3).
- Alle andere roodbruine gepigmenteerde kolonies die niet fluoresceren worden als presumptieve *Pseudomonas aeruginosa* geteld en bevestigd met oxidase test (4.1.5), acetamide bouillon (4.1.3) en King's B (4.1.1).

De tellingen worden genoteerd; de hoogste telling in zijn totaliteit wordt gerapporteerd.

Overzicht van nodige bevestigingstesten van kolonies op PCN agar

Omschrijving van kolonie op PCN agar	Ammonium uit acetamide	Oxidase productie	Fluorescentie op King's B	Bevestigd als <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Blauw/groen	NG	NG	NG	Ja
Fluorescent (geen blauw/groen)	+	NG	NG	Ja
Roodbruin	+	+	+	Ja
Andere type kolonies	NG	NG	NG	Nee
NG: niet getest				

6.3 BEVESTIGINGSTESTEN VANUIT PCN**Nutriënt agar**

Met een Entnaald met Pt-öse (5.1.13) alle of zoveel mogelijke (5-tal) kolonies strijken op nutriënt agar (4.1.4) die een bevestiging eisen, en gedurende 22 ± 2 uur bij 36 ± 2 °C (5.1.5) incuberen. De subculturen op zuiverheid controleren.

De oorspronkelijke roodbruine kolonies aan een oxidasetest onderwerpen.

Oxidasetest

De oxidase test wordt uitgevoerd aan de hand van een oxidase reagens (4.1.5) volgens specificaties vermeld in de bijsluiter. Een oxidase positieve reactie wordt veroorzaakt door het enzyme cytochroom oxidase dat inwerkt op het N,N-dimethyl-p-fenyleendiamine, met de vorming van indofenolblauw. Het reagens wordt op een goed geïsoleerde kolonie van een nutriënt plaat getest en na een vastomschreven tijd afgelezen. Indien geen kleurverandering optreedt, leest men nog eens af na een langere tijdspanne.

Pseudomonas zijn oxidase positief en vormen een blauwe verkleuring. Als negatieve controle wordt bijvoorbeeld een *E.coli* cultuur (**Fout! Verwijzingsbron niet gevonden.**) getest.

King's B medium

De oxidase positieve roodbruine culturen enten in een King's B medium (4.1.1) en 24 uur (tot 5 dagen) incuberen bij 36 ± 2 °C (5.1.5). De groei onder UV licht (5.1.14) bekijken en de aanwezigheid van fluorescentie noteren.

De reactie is positief wanneer fluorescentie binnen de 5 dagen voorkomt.

Acetamide bouillon

Een tube acetamide bouillon (4.1.3) inoculeren van een kolonie uit elke plaat nutriënt agar en gedurende 22 ± 2 uur bij 36 ± 2 °C (5.1.5) incuberen. Aan de hand van een automatische pipet en wegwerptips (5.1.11) nadien 1 à 2 druppels Nessler reagens (4.1.6) toevoegen en de tubes op ammoniak vorming onderzoeken door het waarnemen van een kleuromslag variërend van geel tot siennarood afhankelijk van de concentratie.

Deze reeks bevestigingstesten kunnen door een commerciële identificatiekit voor *Pseudomonas* spp. vervangen worden.

6.4 IDENTIFICATIE VAN PSEUDOMONAS AERUGINOSA DOOR MIDDEL VAN MALDI-TOF MS (MATRIX- ASSISTED LASER DESORPTION-IONIZATION TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY)

Voor de identificatie van *Pseudomonas aeruginosa* of ter vervanging van de bevestigingstesten kan gebruik gemaakt worden van de MALDI-TOF MS technologie. Hiervoor dient wel een validatie uitgewerkt te worden conform ISO 16140.

6.5 WERKWIJZE VOOR PSEUDALERT

Voor de bepaling van *Pseudomonas aeruginosa* per 100/250 ml volg de Pseudalert[®] / Quanti-tray[®] protocols (zie bijlagen).

6.6 TELLING

Vanuit PCN:

Al de bevestigde *Pseudomonas aeruginosa* kolonies tellen die pyocyanine produceren (blauw/groen pigment) of die een oxidase positief zijn en fluoresceren onder UV licht en in staat zijn om ammoniak te produceren uit acetamide.

Opmerking: kolonies die fluoresceren op het oorspronkelijk PCN membraan zijn steeds oxidase positief en dienen dus hiervoor niet te worden getest.

Indien geen blauw/groene kolonies of geen positief bevestigde kolonies aanwezig zijn, zijn geen *Pseudomonas aeruginosa* in het monster aanwezig.

Vanuit het chromogeen medium:

Alle blauwe tot blauwgroene kolonies op het chromogeen medium RAPID'*P.aeruginosa* agar.

Vanuit Pseudalert:

Tel het aantal blauwe fluorescerende wells onder UV-licht. Raadpleeg de bijgeleverde MPN-tabel om het resultaat (meest waarschijnlijke aantal) te bepalen.

7 RAPPORTERING

- De kve *Pseudomonas aeruginosa* waarden per 250 ml (mineraal water, flessenwater, bronwater) of per 100 ml watermonster bepalen, rekening houdend met de verhouding uitgevoerde bevestigingstesten.
- Bij verdunningen wordt het aantal getelde *Pseudomonas aeruginosa* (waarde tussen 10-100 kolonies) vermenigvuldigd met de overeenstemmende verdunningsfactor.
- Indien geen kolonies aanwezig zijn op platen geïncubeerd met een onverdund monster, wordt het resultaat als <1 kve / 100 of 250 ml of als 0 kve / 100 of 250 ml vermeld.
- Indien meer dan 100 kolonies op de geïnoculeerde schalen met de grootste verdunning 10^{-x} voorkomen, wordt het resultaat als benaderend vermeld (geschat aantal $>100 \cdot 10^x$ kve/gefilt. volume).

7.1 RAPPORT

Vermelding in het rapport van:

- de identificatie van het monster, en alle gegevens over de monstername
- de verwijzing naar de betreffende WAC-methode
- het resultaat

- bijzondere opmerkingen

8 REFERENTIES

- ISO 16266 (2006) Water quality -- Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* -- Method by membrane filtration.
- ISO 16266-2 (2018) Water Quality – Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* - Part 2: Most probable number method.
- NF validatierapport voor RAPID'*P.aeruginosa* agar (attest n° [BRD 07/21-04/12](#))
- AFNOR certificaat methodevalidatie van Pseudalert/Quanti-Tray voor telling van *Pseudomonas aeruginosa*. [NF Validation Report 2016](#).
- ISO/TR 13843 performantie / validatie van Pseudalert/Quanti-Tray voor de kwantitatieve detectie van *Pseudomonas aeruginosa* in water. [Report 100465-00 2011](#).
- ISO 8199:2018 Water quality - General requirements and guidance for microbiological examinations by culture.
- ISO 19458 (2006) Water quality - sampling - General guide for sampling, transport, preservation and handling of samples for microbiological analysis.
- EN 12780 (05/2002) Water quality - Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* by membrane filtration.
- WAC/I/A/010 Conservering en behandeling van watermonsters
- WAC/VI/A/003 Kwaliteitseisen voor de analysemethoden
- MALDI-TOF MS
http://www.afsca.be/laboratories/labinfo/documents/2015-04_labinfo13-p12_en.pdf
Pavlovic, Melanie, et al. "Application of MALDI-TOF MS for the identification of food borne bacteria." The open microbiology journal 7 (2013): 135.

Opsporing en telling van somatische colifagen

INHOUD

1	Toepassingsgebied	3
2	Principe	3
3	Opmerkingen	4
4	Reagentia en oplosmiddelen	4
5	Apparatuur en materiaal	4
6	Werkwijze	5
6.1	<i>Gastheercultuur</i>	5
6.1.1	Keuze van de host	5
6.1.2	<i>Escherichia coli</i> glycerol stock- en werkcultuur	5
6.2	<i>Bacteriofaagcultuur</i>	6
6.2.1	Leefbare telling van de aangekochte <i>E. coli</i> faag phiX174 suspensie	6
6.2.2	Kweek van <i>E. coli</i> faag phiX174	6
6.2.3	Monstervoorbereiding	7
6.2.4	Facultatieve concentratiestap	7
6.2.5	Analysemethode	7
6.3	<i>ISO 10705-3 Waterkwaliteit - Detectie en bepaling van het aantal bacteriofagen: validatieprocedure</i>	10
6.4	<i>Bereiding van afvalwatermonsters voor spiking</i>	10
6.5	<i>Validatie van methoden voor de concentratie van bacteriofagen uit water: procedure analyse van watermatrix</i>	11
6.5.1	Vorbereiding van gespikete monsters	11
6.5.2	Berekeningen	12
6.6	<i>Analytische kwaliteitscontrole van het rendement bij concentreren</i>	13
7	Rapportering	13
8	Referenties	14

1 TOEPASSINGSGEBIED

Deze procedure beschrijft een methode voor de opsporing en telling van somatische colifagen in water. De procedure is van toepassing bij het onderzoek van water bestemd voor menselijke consumptie (drinkwater) en ruw water (grondwater, oppervlaktewater).

In de [richtlijn 2020/2184 van het Europees Parlement en de Raad betreffende de kwaliteit van voor menselijke consumptie bestemd water](#) is de microbiologische parameter somatische colifagen¹ ingevoerd in het operationele monitoringprogramma. Deze omvat de monitoring van virussen in het ruwe water om de doeltreffendheid van de zuiveringsprocessen tegen microbiologische risico's te controleren. Indien deze parameter in onbehandeld water wordt aangetroffen in een concentratie > 50 pve /100 ml, dan moet hij na de behandelingen worden geanalyseerd om via de aanwezige barrières een log verwijdering te bepalen. Dit om te beoordelen of het risico op doorbraak van pathogene virussen voldoende wordt beheerst.

De parameter colifagen² is eveneens opgenomen in de [EU Verordening 2020/741 - Minimumeisen voor hergebruik van water](#) (p.52 van NL versie). Voor de kwaliteitseisen van teruggewonnen water voor landbouwirrigatie zijn minimumeisen voor validatiemonitoring geformuleerd. Deze monitoring behelst het meten van de indicatormicro-organismen voor elk van de groepen pathogenen nl. bacteriën, virussen (nl. F-specifieke colifagen, somatische colifagen of colifagen) en protozoa. De validatiemonitoring vindt plaats voor klasse A, de strengste kwaliteitsklasse voor teruggewonnen water, om te beoordelen of er wordt voldaan aan de prestatiestreefwaarden voor colifagen nl. $\log_{10}$ -reductie $\geq 6,0$.

De methodes opgenomen in deze WAC-procedure zijn conform de werkwijzen beschreven in de normen ISO 10705 Waterkwaliteit - Opsporing en telling van bacteriofagen - Deel 2 'Telling van somatische colifagen' en Deel 3 'Validatie van methoden voor concentratie van bacteriofagen uit water' (voor rendementbepaling).

2 PRINCIPE

ISO 10705-2 Somatische colifagen

Dit deel van ISO 10705 specificeert een methode voor de detectie en telling van somatische colifagen door incubatie van het monster met een geschikte gastheerstam (host).

Een hoeveelheid watermonster wordt gemengd met een klein volume semi-solide agar.

Een cultuur van de gastheer *E. coli* stam (WG5) wordt toegevoegd en uitgespreid over een vaste voedingsbodem. Tijdens de incubatie infecteren de bacteriofagen van het watermonster de gastheer *E. coli* waarna de fagen zich vermeerderen in de *E. coli* cellen en vervolgens lysis veroorzaken. Hierdoor ontstaan er heldere zones in de confluerende bacterielaag (plaques). Na incubatie bij 36°C worden de platen afgelezen op zichtbare plaques. Het resultaat wordt uitgedrukt als het aantal "plaque-vormende eenheden", pve (ook wel "plaque-forming units", pfu genoemd), per eenheid van het monstervolume. Als positieve controle wordt de somatische colifaag ϕ X174 gebruikt.

¹ Somatische colifagen: bacterieel virus dat een geselecteerde gastheer *E. coli* (en verwante stammen) kan infecteren door aanhechting aan de bacteriële celwand als eerste stap van het infectieproces.

² Totaal aantal colifagen wordt geselecteerd als de meest geschikte indicator voor virussen. Indien het echter niet mogelijk is om het totaal aantal colifagen te analyseren, wordt ten minste één ervan (F-specifieke of somatische colifagen) geanalyseerd.

ISO 10705-3 Validatie van methoden voor de concentratie van bacteriofagen uit water

Bij lage aantallen colifagen in het monster is een voorafgaande concentratiestap nodig. Het watermonster wordt behandeld volgens een methode naar keuze, waarbij de bacteriofagen worden geconcentreerd van een relatief groot volume monster (100 ml tot enkele liters) tot een kleiner volume (meestal van enkele tot maximaal 20 ml). Het geconcentreerde monster wordt vervolgens geanalyseerd op de detectie en telling van somatische colifagen volgens ISO 10705-2. De validatieprocedure bestaat uit het bepalen van de recovery van bacteriofagen uit een reeks monsters, gevoed met natuurlijk verontreinigd water (ruw of gezuiverd afvalwater). De recovery wordt bestudeerd in een reeks van volumes met een rendementsbepaling, met bijzondere aandacht voor de reproduceerbaarheid.

3 OPMERKINGEN

Voor de conservering en behandeling van watermonsters wordt verwezen naar WAC/I/A/010.

De kwaliteitscontrole wordt in § 6.7 toegelicht.

Voor toepassen van alle eisen voor bioveiligheid wordt verwezen naar de [Belgian Biosafety Server](#).

4 REAGENTIA EN OPLOSMIDDELEN

- 4.1.1 Escherichia bacteriofaag phiX174 (ATCC 13706-B1)
- 4.1.2 Geselecteerde host: Escherichia coli (zie 6.1)
- 4.1.3 Steriel glycerol
- 4.1.4 Modified Scholtens' Agar (MSA)
- 4.1.5 Semi-solid Modified Scholtens' Agar (ssMSA)
- 4.1.6 Steriele calcium chloride oplossing (1 mol/l)
- 4.1.7 Modified Scholtens' Broth (MSB)
- 4.1.8 Selectieve groeimedium voor E. coli naar keuze (vb. McConkey agar)
- 4.1.9 Nalidixinezuur oplossing (in 1 mol/l NaOH)
- 4.1.10 Biocide-oplossing (vb. 2,5% Umonium)
- 4.1.11 Diluents (zie ISO 6887 vb. steriele pepton zout oplossing)
- 4.1.12 Optioneel: benodigde reagentia van de gevalideerde concentratiemethode

5 APPARATUUR EN MATERIAAL

- 5.1.1 Schudtoestel
- 5.1.2 Vortex
- 5.1.3 Papierfilter of polypropylene prefilter
- 5.1.4 Concentratieunit voor virale partikels (Concentrating Pipette Select Innovaprep® of ultrafiltratie Centricon® filters Millipore)
- 5.1.5 Single-use Concentrating Pipette Tips (CPTs) Innovaprep®
- 5.1.6 Elutiebuffer Wet Foam Elution Innovaprep®
- 5.1.7 Incubator op (36 ± 2)°C
- 5.1.8 Waterschudbad of schudincubator op (36 ± 2)°C
- 5.1.9 Waterbad of equivalent op (45 ± 1)°C
- 5.1.10 Waterbad of equivalent om agar media te smelten
- 5.1.11 Microbiologische veiligheidswerkkast MVK

- 5.1.12 Autoclaaf (121 ± 3)°C
- 5.1.13 Kolonieteller
- 5.1.14 Diepvriezer bij (-20 ± 5)°C
- 5.1.15 Diepvriezer bij (-70 ± 10)°C of opslagvat met vloeibare stikstof
- 5.1.16 Koelkast op (5 ± 3)°C
- 5.1.17 Glazen flessen
- 5.1.18 Glazen trechter
- 5.1.19 Schudkolf of culture flask
- 5.1.20 Kweekbuisjes met dop
- 5.1.21 Plastic vials 1,5 - 3 ml
- 5.1.22 Automatische pipetten en wegwerptips
- 5.1.23 Pipettus accu
- 5.1.24 Wegwerppipetten
- 5.1.25 0,45 µm steriele wegwerpfILTER
- 5.1.26 Steriele petriplaten van 90 mm
- 5.1.27 Entnaald met öse
- 5.1.28 Steekentnaald
- 5.1.29 Spectrofotometer

6 WERKWIJZE

6.1 GASTHEERCULTUUR

6.1.1 KEUZE VAN DE HOST

Gebruik voor monsters met een laag bacteriegehalte (drinkwater, niet-verontreinigd natuurlijk water) de *Escherichia coli* DSM 13127. In de ISO 10705-2 wordt *Escherichia coli* stam C, ATCC 13706 aangegeven, maar de stam C bezit geen restrictie/modificatiesysteem. Hierdoor wordt de stam niet langer aanbevolen als gastheer voor faag PhiX174. Gebruik dus in plaats daarvan DSM 13127.

Monsters met grote aantallen bacteriën (verontreinigd natuurlijk water, afvalwater) moeten worden onderzocht met de nalidixinezuur-resistente mutant *E. coli* stam CN (ATCC 700078), ook bekend als WG5. Deze laatste *E. coli* stam kan ook voor alle types water worden gebruikt.

6.1.2 *ESCHERICHIA COLI* GLYCEROL STOCK- EN WERKCULTUUR

De *E. coli* stock kan bereid worden uit een gevriesdroogde cultuur of kant-en-klaar aangekocht worden. Rehydrateer de inhoud van een gevriesdroogde ampule van de *E. coli* in 3-5 ml MSB a.d.h.v. een steriele wegwerppipet en pipettus. Breng de suspensie over in een steriele schudkolf / culture flask met (50 ± 5) ml MSB. Incubeer gedurende (20 ± 4) uur in een schudincubator of waterschudbad bij (36 ± 2)°C. Voeg een steriele glyceroloplossing toe tot een eindconcentratie van 15 % tot 20 % (volume fractie) en meng goed. Verdeel in geschikte plastic vials per 0,5 ml en bewaar bij (-70 ± 10)°C of in vloeibare stikstof.

Voor de aanmaak van een werkcultuur, start uit een geïsoleerde *E. coli* kolonie vanuit een stockvial dat werd gestreken op een selectief groeimedium voor *E. coli*.

De aanmaak van de werkcultuur heeft een vergelijkbare aanmaak als de stock, maar verschilt in groeitijd: deze is (5 ± 1) uur voor de werkcultuur. Vervolgens wordt wel weer glycerol toegevoegd en ingevroren (per 1,2 ml). De houdbaarheid van de werkculturen is maximaal 2 jaar bij -20°C / -70°C.

referentiestam <i>E. coli</i> stam CN (ATCC 700078)	overnachtcultuur in MSB; steriele glyceroloplossing toevoegen tot eindconcentratie van 15 % tot 20 % (volume fractie)	stockcultuur 0.5 ml aliquots bewaar bij (-70 ± 10)°C of in vloeibare stikstof	log-fase cultuur in MSB van lactose-positieve kolonies; steriele glyceroloplossing toevoegen tot eindconcentratie van 15 % tot 20 % (volume fractie)	werkkultuur 0.1, 2 ml aliquots houdbaarheid werkculturen maximaal 2 jaar bij (-70 ± 10)°C	log-fase cultuur in MSB	gebruik de inoculumcultuur binnen dezelfde werkdag

6.2 BACTERIOFAAGCULTUUR

De fagen stock kan bereid worden uit een aangekochte suspensie of kant-en-klaar aangekocht worden. **Indien fagen niet kant-en-klaar aangekocht zijn, dient de concentratie experimenteel vastgelegd te worden.** Fagen dienen onmiddellijk na ontvangst in een koelkast (5 ± 3) °C bewaard te worden.

Het uitvoeren van lysis is mogelijk in een vloeibare bacteriële hostcultuur of op platen door gebruik te maken van de dubbele agarlaagtechniek met boven- en onderagar.

6.2.1 LEEFBARE TELLING VAN DE AANGEKOCHTE *E. COLI* FAAG PHIX174 SUSPENSIE

Smelt een fles met 50 ml ssMSA in een kokend waterbad en plaats ze in een waterbad bij (45 ± 1)°C. Verdeel nadien aliquots van 2,5 ml in kweekbuisjes met dop, geplaatst in een waterbad van (45 ± 1)°C. Maak een verdunningsreeks aan van de faag stocksuspensie in MSB (verdunningen 10⁻² tem 10⁻⁹).

Bereid de host inoculumcultuur zoals beschreven in §6.3.2.1.

Voeg 1 ml inoculumcultuur toe aan elke kweekbuisje met ssMSA.

1 ml van elke verdunning van de faag wordt toegevoegd aan een geïdentificeerd tube met ssMSA met host *E.coli*, meng zorgvuldig om de vorming van luchtballen te vermijden en giet de inhoud uit op een 9 cm MSA petrischaal die voorverwarmd is bij kamertemperatuur. Verdeel gelijkmatig en laat stollen op een horizontaal, koel oppervlak. Droog de platen door ze te incuberen met gedeeltelijk geopende deksels, dek ze vervolgens af en incubeer de platen ondersteboven bij (36 ± 2)°C gedurende (18 ± 2) uur. Stapel niet meer dan 6 platen op elkaar.

Tel het aantal plaques van de platen in een telbare range na overnacht incubatie met indirect schuin licht op elke duplo plaat. Bepaal de concentratie van de faag phiX174 in de stock. Onderzoek elk aliquot ten minste in duplo.

6.2.2 KWEEK VAN *E. COLI* FAAG PHIX174

Er wordt een kweek uitgevoerd van faag phiX174 a.d.h.v. een werkkultuur *E. coli* host. Nadien wordt in duplo een leefbare telling uitgevoerd van de aangerijkte faag.

Breng 25 ml MSB in een schudkolf / culture flask en inoculeer met de *E. coli* host. Incubeer gedurende (20 ± 4) uur in een schudincubator of waterschudbad bij (36 ± 2)°C.

Inoculeer 25 ml MSB (op kamertemperatuur) in een schudkolf / culture flask met 0,25 ml van de hostcultuur.

Incubeer zoals hierboven beschreven gedurende 90 min. Voeg phiX174 toe uit een stockoplossing om een eindconcentratie van ongeveer 10⁷ pve/ml te verkrijgen.

Incubeer zoals hierboven beschreven gedurende 4 tot 5 uur. Voeg 2,5 ml chloroform (CHCl₃) toe, meng goed en plaats overnacht bij (5 ± 3) °C.

Decanteer de waterige fase in centrifugebuizen en centrifugeer bij minimaal 3000 g gedurende 20 min.

Pipetteer het supernatans met bacteriofagen voorzichtig en bewaar het bij (5 ± 3) °C.

OPMERKING 1 De titer van de faagsuspensie moet hoger zijn dan 10⁹ /ml. In sommige gevallen kan het nodig zijn de cyclus te herhalen om voldoende hoge titers te verkrijgen; in dat geval kunnen hogere faaginputs worden gebruikt.

OPMERKING 2 De titer van de faagstocksuspensie zal langzaam afnemen met de tijd.

6.3 MONSTERVOORBEREIDING

Aan 1000 ml watermonster wordt 10 ml 0,8% Tween 80 toegevoegd en het wordt gehomogeniseerd door de fles grondig te schudden, ofwel door de fles op een schudtoestel te brengen en gedurende de voorbereidingen van de analyses te schudden.

Om het eventueel sediment te verwijderen wordt het watermonster gecentrifugeerd bij 1000 g gedurende 20 minuten, of gefiltreerd door een 8 µm tot 25 µm membraanfilter of plooifilter met een steriel gemaakte glazen trechter om viruscontaminatie te vermijden.

Het watermonster wordt op kamertemperatuur gebracht alvorens de analyse te starten.

6.3.1 FACULTATIEVE CONCENTRATIESTAP

Bij lage aantallen colifagen in het monster is een voorafgaande concentratiestap nodig. Het watermonster wordt behandeld volgens een methode naar keuze, waarbij de bacteriofagen worden geconcentreerd van een relatief groot volume monster (100 ml tot enkele liters) tot een kleiner volume (meestal van enkele tot maximaal 20 ml).

6.3.2 ANALYSEMETHODE

6.3.2.1 Bereiding van inoculumculturen

Haal een vial gastheer werkcultuur (§ 6.1) uit de diepvries en laat chamberen tot kamertemperatuur (15-30 °C). Voeg (50 ± 5) ml MSB toe aan een erlenmeyer en laat het voorverwarmen tot ten minste kamertemperatuur (snellere groei treedt op als de bouillon wordt voorverwarmd tot (36 ± 2)°C). Verifieer of de gastheercultuur voldoende is gegroeid door middel van een absorbantiemeting (bij 600 nm).

Inoculeer 0,5 ml gastheer werkcultuur in MSB. Incubeer bij (36 ± 2)°C onder zacht schudden in een incubator of waterbad. Meet elke 30 minuten de absorptie. Neem bij een absorptie die overeenkomt met een celdichtheid van ongeveer 10⁸ kve/ml, de inoculumcultuur uit de incubator. Gebruik de inoculumcultuur binnen dezelfde werkdag.

Indien de WG5 stam wordt gebruikt voor de gastheercultuur, voeg nalidixinezuur toe aan de cultuur voor enten van de watermonsters.

OPMERKING 3 Als een groot aantal tests wordt verwacht, kunnen verschillende erlenmeyers parallel worden geënt. In dat geval moet de inhoud van de verschillende schudkolven vóór de analyse worden gemengd en gehomogeniseerd of, als alternatief, moet voor elke schudkolf of inoculumcultuur een referentiecontrole van phiX174 worden uitgevoerd.

6.3.2.2 Enten van het watermonster

Smelt fles(sen) met 50 ml ssMSA in een kokend waterbad en plaats ze in een waterbad bij (45 ± 1)°C. Voeg aseptisch 300 µl van een op kamertemperatuur voorverwarmde calciumchlorideoplossing toe. Meng en verdeel nadien aliquots van 2,5 ml in kweekbuisjes met dop, geplaatst in een waterbad van (45 ± 1)°C.

Voeg aan elke kweekbuis 1 ml van het oorspronkelijke monster (of verdund of geconcentreerd monster) toe, voorverwarmd bij kamertemperatuur. Onderzoek elk aliquot ten minste in duplo.

Voeg 1 ml inoculumcultuur toe aan elke kweekbuisje met het monster en ssMSA, meng zorgvuldig om de vorming van luchtbellens te vermijden en giet de inhoud uit op een 9 cm MSA petrischaal die voorverwarmd is bij kamertemperatuur. Verdeel gelijkmatig en laat stollen op een horizontaal, koel oppervlak. Droog de platen door ze te incuberen met gedeeltelijk geopende deksels, dek ze vervolgens af en incubeer de platen ondersteboven bij $(36 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ gedurende (18 ± 2) uur. Stapel niet meer dan 6 platen op elkaar.

Tel het aantal plaques op elke plaat binnen 4 uur na het beëindigen van de incubatie met indirect schuin licht.

OPMERKING 4 Indien nodig kunnen de platen na 6 uur incubatie worden afgelezen. Dit kan nuttig zijn als een voorlopige telling nodig is en ook als een hoge achtergrondflora wordt verwacht. Als er na 6 uur wordt afgelezen, moet dit worden genoteerd bij het weergave van de resultaten (§ 6.3.2.7).

OPMERKING 5 Vers bereide trifenyltetrazoliumchlorideoplossing kan aan ssMSA worden toegevoegd om het contrast voor het tellen van plaques te vergroten.

OPMERKING 6 De toevoeging van monster en ijskoude gastheercultuur aan de halfvaste agar kan leiden tot een scherpe temperatuurdaling en stolling van het medium. Zorg voor voldoende tijd tussen deze twee stappen om opnieuw opwarmen mogelijk te maken. Zorg er echter voor dat geënte buisjes niet langer dan 10 minuten in het waterbad $(45 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ blijven.

OPMERKING 7 Kwaliteitsborging duplo's zie criterium T1 Cochran spreidingstest (§ 6.3.2.6).

6.3.2.3 Methode voor monsters met een hoge bacteriële achtergrondflora (OW, AW)

Idem te werk gaan als hierboven.

Voeg nalidixinezuur toe aan ssMSA tot een eindconcentratie van $250 \mu\text{g/ml}$.

Gebruik *E. coli* WG5 als inoculumcultuur.

OPMERKING 8 Nalidixinezuur is hittestabiel. Het kan toegevoegd worden uit een gesteriliseerde oplossing na het smelten van soft agar, of het kan toegevoegd worden voor het autoclaveren.

6.3.2.4 Methode voor monsters met lage aantallen colifagen

Ga te werk zoals hierboven beschreven, maar gebruik de volgende modificaties:

10 ml ssMSA, $60 \mu\text{l}$ calciumchlorideoplossing, 1 ml gastheercultuur en 5 ml monster in duplo .

Gebruik twee petrischalen die elk 20 ml MSA bevatten (of één 14 - 15 cm diameter petriplaat met 50 ml MSA).

OPMERKING 9 Met deze procedure kan één pve in 50 ml of 100 ml worden gedetecteerd als 10 of 20 platen parallel worden geënt. Vanwege het hoge verbruik van kweekmedia kan het raadzaam zijn om concentratiemethoden te gebruiken (§6.3.1 en §6.3.2.5), die ook nodig zullen zijn voor nog lagere tellingen.

6.3.2.5 Methode voor monsters die een concentratiestap vereisen (ISO 10705-03)

Voor monsters met hele lage aantallen fagen, voer voor een DW- en GW-monster een rechtstreekse filtratie uit via een geschikte concentratieunit.

Als de turbiditeit voor een OW-monster hoog is (te beoordelen aan de hand van het blokkeren van het filter voordat het gewenste volume is gefilterd), voer voorafgaand een prefiltratie op ploofilter uit (bijvoorbeeld belangrijk in seizoen van algenbloei) (§6.3). Gebruik hiervoor een ploofilter in een glazen trechter dat behandeld is met een biocide en nagespoeld werd met steriel water.

Voor het concentreren van de virale partikels: filtreer 500 ml watermonster met bv. een Innovaprep unit aan de hand van 'concentrating pipets 0,05 µm filter'. Als alternatief kunnen [centricons](#)³ filterunits aangewend worden.

Om het gefiltreerde volume op te volgen, vang het filtraat op een maatcilinder om het correcte volume van 500 ml te bepalen.

Maak van het bekomen concentraat – indien uit voorkennis – de geschikte verdunning(en) telkens in duplo (1:5 of 1:10 verdunning).

6.3.2.6 Kwaliteitsborging

Onderzoek bij elke serie monsters een procedureblanco met steriele diluents⁴ als monster en een referentiecontrole van phiX174, als volgt bereid.

Bereid uit een faagkweek met een hoge titer (§6.2.2) een decimale verdunningsreeks en plaat deze uit. Bewaar de verdunningsreeks een nacht in de koelkast. Tel het aantal plaques uit de verdunningsreeks en bereid 100 ml tot 1000 ml van een suspensie met een verwachte pve-concentratie van phiX174 van ongeveer 100 ml⁻¹. Voeg 5% (volumefractie) glycerol toe. Verdeel in geschikte plastic vials in aliquots van 2,4 ml en bewaar bij (-70 ± 10) °C. Ontdooi flacons met de referentiecontrole van phiX174 voor gebruik en zet de platen uit volgens de gebruikte procedure (DW, GW, OW of AW). Zet de resultaten uit op een controlekaart. Gooi de referentiecontrolemonsters weg als het gemiddelde aantal pve/ml afneemt.

Gebruik eventueel daarnaast een natuurlijk verontreinigd referentiecontrolemonster van afval- of oppervlaktewater, verdund tot een pve-concentratie van ongeveer 100 ml⁻¹ in pepton-zout oplossing en 5 % (volumefractie) glycerol en bewaar bij (-70 ± 10)°C. Gooi de referentiecontrole-monsters weg als de concentratie somatische colifagen afneemt en na een hertest nog steeds afneemt.

6.3.2.7 Weergave van resultaten (ISO 8199; ISO 10705-02)

Procedures voor het tellen van plaques (DW, GW of OW AW)

Selecteer platen met goed gescheiden, en bij voorkeur meer dan 30 plaques wanneer deze aanwezig zijn. Als er alleen aantallen van minder dan 30 per plaat worden gevonden, selecteer dan platen die met het grootste volume monster zijn geënt. Bereken uit het aantal getelde plaques het aantal X pve van somatische colifagen in 1 ml van het monster als volgt:

Formule:

$$X = \frac{N}{\sum_{i=1}^n (n_i V_i F_i)} = \frac{N}{\sum_{i=1}^n (n_i V_i F_i)}$$

waarbij

- X het aantal plaquevormende deeltjes somatische colifagen per milliliter (pve/ml);
- N het totale aantal plaques geteld op platen (DW, GW of OW AW);
- n_1, n_2 het aantal getelde herhalingen voor verdunning F_1, F_2 ;
- V_1, V_2 het testvolume in milliliters gebruikt bij verdunning F_1, F_2 ;

³ Virale deeltjes werden geconcentreerd uit 50 ml supernatans door ultrafiltratie door Centricon® Plus-70 centrifugale ultrafilters met een cut-off van 30 of 100 kDa (Millipore)

⁴ De procedureblanco kan ook uitgevoerd worden met steriel kraanwater indien de kwaliteitscontrole van het diluents conform ISO11133 wordt uitgevoerd.

F_1 , F_2 de verdunnings- of concentratiefactor voor de testportie V_1 , V_2 ($F = 1$ voor een onverdund monster, $F = 0,1$ voor een tienvoudige verdunning, $F = 10$ voor een tienvoudig concentraat enz.)
Als er maar één verdunning/concentraat wordt geteld, vereenvoudig de formule dan tot:

$$X = \frac{N}{nVF}$$

Indien geen plaquevormende deeltjes aanwezig zijn op platen met een onverdund monster, vermeld het resultaat als <1 pve of als 0 pve / **ingezet volume**.

6.4 ISO 10705-3 WATERKWALITEIT - DETECTIE EN BEPALING VAN HET AANTAL BACTERIOFAGEN:

VALIDATIEPROCEDURE

De te evalueren concentratiemethode moet zorgvuldig worden beschreven. De beschrijving omvat de detectiemethode(n) van de bacteriofagen, de te analyseren soorten water en volumes, alsook uitzonderingen op het toepassingsgebied, bijvoorbeeld wegens troebelheid.

De validatieprocedure van de methode bestaat uit het bepalen van de terugvinding van bacteriofagen uit een reeks monsters, geënt met natuurlijk verontreinigd water (ruw of behandeld afvalwater). De terugvinding en reproduceerbaarheid worden bepaald.

6.5 BEREIDING VAN AFVALWATERMONSTERS VOOR SPIKING

Neem een monster van afvalwater en centrifugeer bij 1000 g gedurende 20 minuten of filtreer door een 8 µm tot 12 µm membraanfilter (of ploofilter).

Bewaar het supernatans of het filtraat op smeltend ijs.

Tel de colifagen in volumes van 1 ml volgens de gekozen methode.

Verdund het monster zo nodig tot een concentratie van 60 tot 200 pve/ml.

Voeg glycerol toe om een uiteindelijke volumefractie van 5% te verkrijgen; goed mengen.

Verdeel in aliquots van 10 ml in geschikte plastic vials en vries in bij $(-20 \pm 5)^\circ\text{C}$ of bij voorkeur $(-70 \pm 10)^\circ\text{C}$.

Ontdooi twee vials bij kamertemperatuur.

Onderzoek uit elk vial twee aliquots van 0,5 ml op de colifagen. De gemiddelde telling moet binnen de hierboven gespecificeerde grenzen liggen (d.w.z. 30 tot 100 pve per plaat). Analyseer de tellingen op homogeniteit binnen en tussen de vials.

$$T_1 = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \left[\left(z_{ij} - \frac{z_{i+}}{J} \right)^2 / \left(\frac{z_{i+}}{J} \right) \right]$$

waarbij

T_1	de Cochran spreidingstest om de variatie in pve binnen één vial referentiemateriaal te bepalen
z_{i+}	het totale aantal pve van de duplo's van één vial
I	het aantal vials (in dit geval 2)
J	het aantal duplo's is (in dit geval 2)

Het aantal vrijheidsgraden voor T_1 is gelijk aan $I(J-1)$ en

$$T_2 = \sum_{j=1}^J \left[\left(z_{j+} - \frac{z_{++}}{I} \right)^2 / \left(\frac{z_{++}}{I} \right) \right]$$

waarbij

T_2 de Cochran spreidingstest om de variatie in pve binnen verschillende vials van één batch referentiemateriaal te bepalen

z_{++} het totale aantal pve voor alle vials en duplo's

$$z_{++} = \sum_{i=1}^I (\sum z_{ij})$$

Het aantal vrijheidsgraden voor T_2 is gelijk aan $I-1$.

Als de fagen willekeurig verdeeld zijn in en tussen de vials, volgen T_1 en T_2 bij benadering een χ^2 verdeling met respectievelijk 2 en 1 vrijheidsgraden.

Accepteer de monsters als $0,01 < T_1 < 5,99$ en $T_2 < 3,84$

OPMERKING 10: Somatische colifagen die van nature voorkomen in ruw afvalwater ondervinden geen significante inactivering bij invriezen met een volumefractie van 5 % glycerol en kunnen bevroren worden bewaard bij $(-20 \pm 5) ^\circ\text{C}$ of bij voorkeur bij $(-70 \pm 10)^\circ\text{C}$ zonder significante afname van de aantallen gedurende ten minste één jaar.

6.6 VALIDATIE VAN METHODEN VOOR DE CONCENTRATIE VAN BACTERIOFAGEN UIT WATER: PROCEDURE ANALYSE VAN WATERMATRIX (TOEPASSING VAN ISO 10705-3 ANNEX A)

6.6.1 VOORBEREIDING VAN GESPIKETE MONSTERS

6.6.1.1 Batchmethode

Neem van het te onderzoeken type water monsters op verschillende dagen, bij voorkeur in verschillende seizoenen en klimatologische omstandigheden. Onderzoek minimaal vijf monsters voor elk type water. V_{max} is het maximale volume van het monster dat met een bepaalde concentratieunit moet worden behandeld. Het voor de validatieprocedure te verkrijgen monstervolume moet dan ten minste $3 \times V_{max}$ bedragen. Bereid recipiënten met de volgende monstervolumes voor:

- $0,125 \times V_{max}$;
- $0,250 \times V_{max}$;
- $0,500 \times V_{max}$;
- V_{max} .

Voeg aan elke recipiënt 1 ml bij kamertemperatuur voorverwarmd spike suspensie toe. Bewaar de rest van de spike op smeltend ijs.

6.6.1.2 In-line concentratiemethode

Neem van het te onderzoeken type water monsters op verschillende dagen, bij voorkeur in verschillende seizoenen en klimatologische omstandigheden. Onderzoek minimaal vijf monsters per watertype. V_{max} is het maximale volume van het monster dat moet worden behandeld door de concentratiemethode. Bereid recipiënten met de volgende monstervolumes:

- $0,125 \times V_{max}$;
- $0,250 \times V_{max}$;
- $0,500 \times V_{max}$;
- V_{max} .

Behandel elk volume zoals beschreven in het protocol van de concentratieprocedure. Voeg 1 ml "spike"-materiaal voorverwarmd tot kamertemperatuur toe aan ongeveer 10 ml diluents. Laat de concentratieunit onder stabiele omstandigheden werken. Injecteer vervolgens het totale volume diluent plus de spike in de toevoer naar de concentratieunit (bijvoorbeeld door de naald van een injectiespuit door een slang te steken) in vier gelijke porties, elk na passage van ongeveer een vijfde van het te behandelen watervolume.

6.6.1.3 Evaluatie van de recovery

Behandel de gespikete monsters zoals beschreven in het protocol van de testconcentratie-methode, met inbegrip van alle monstertransport- en conserveringsstappen. Vervoer en bewaar elk monster, waarbij het vervoer van natuurlijke monsters zoveel mogelijk worden nagebootst. Bepaal het totale volume van het eindconcentraat in porties van 1 ml, of fracties indien het eindvolume van het concentraat niet een heel aantal milliliters is. Mogelijks colifagen die op de concentratieoppervlakken achterblijven moeten indien mogelijk worden getest, zoals bijvoorbeeld fagen die in de filters achterblijven.

Analyseer tegelijkertijd twee aliquots van 0,5 ml spikemateriaal. De verkregen waarden worden gebruikt om de concentratie-efficiëntie te berekenen, dit laat toe om het aantal fagen te bepalen in de verschillende te concentreren volumes en laat ook toe om de T_1 en T_2 te berekenen van elk van de vials ten opzichte van andere vials. Indien meer dan 20 % (1 op 5) van de gespikete monsters niet voldoet aan de aanvaardbare waarden van T_1 en/of T_2 , verwijder dan het spikemateriaal. Indien ≤ 20 % van de gespikete monsters niet voldoet aan T_1 en/of T_2 , dienen deze resultaten buiten beschouwing gelaten te worden en voer dan een nieuwe bepaling uit.

Afwijkende of extreme resultaten zijn kenmerkend voor microbiologische metingen. Soms is het aanvaardbaar om een resultaat te verwerpen op basis van een eenvoudige waarneming van de data. Het verdient echter de voorkeur een geschikte statistische test toe te passen. Gebruik de Dixon-test om extreme waarden te verwijderen.

Voer vóór de analyse van de gegevens ten minste vijf experimenten uit met resultaten die niet zijn verworpen.

Indien de methode wordt geëvalueerd aan de hand van natuurlijk water waarvan vermoed wordt dat het fagen bevat voor dezelfde bacteriële host als de testcolifagen, bepaal dan de achtergrondtelling van fagen. Plaats een aliquot of concentreer V_{max} en tel het concentraat. Indien het monster een aantal fagen bevat > 20 % van de fagen die in het monster zijn gespiket, verwarm het water en hou het gedurende 30 minuten op 80°C en laat het vóór gebruik afkoelen.

Indien het aantal natuurlijk voorkomende colifagen < 20 % van de toegevoegde fagen bedraagt, worden deze geteld en neem ze in aanmerking bij de gegevensanalyse (zie volgend hoofdstuk).

6.6.2 BEREKENINGEN

Bereken de terugvinding, η , uitgedrukt als percentage, als volgt:

$$\eta = N_c/N_s \times 100 \%$$

of in het geval dat het monster verontreinigd is met natuurlijk voorkomende bacteriofagen:

$$\eta = (N_c - N_{no})/N_s \times 100 \%$$

waarbij

- N_c totale aantal teruggewonnen plaques uit een concentraat is;
- N_s het aantal plaques uit 1 ml van het monstermateriaal;
- N_{no} het aantal natuurlijk voorkomende bacteriofagen in het watermonster.

Bereken voor alle geanalyseerde volumes de rekenkundig gemiddelde terugvinding $\bar{x}$, de standaardafwijking s en het betrouwbaarheidsinterval.

Het empirische bewijsmateriaal wijst erop dat de terugvindingswaarden een normale verdeling volgen of normaal verdeeld zijn. Voor een betere schatting van de betrouwbaarheidsintervallen wordt de volgende wiskundige uitdrukking aanbevolen.

$$\text{waarbij} \quad \left\{ \bar{x} - t_s / \sqrt{n} ; \bar{x} + t_x / \sqrt{n} \right\}$$

$\bar{x}$	het rekenkundig gemiddelde herstel
s	de standaardafwijking
n	het aantal η -waarden

t de waarde van de t -verdeling is (t -waarden voor verschillende combinaties van betrouwbaarheidsintervallen en vrijheidsgraden zijn te vinden in t -distributietabellen). In het geval van $n = 5$ (vrijheidsgraden = 4) en een 95 %-betrouwbaarheidsinterval $t = 2,776$.

Zet η plus de betrouwbaarheidsintervallen uit tegen het volume van het monster en onderzoek op lineariteit. Als de betrouwbaarheidsintervallen van η voor de verschillende volumes overlappen, kan ervan worden uitgegaan dat de respons lineair is en dat er dus geen volume-effecten zijn. Als er wel volume-effecten zijn, bepaal dan het maximale volume dat kan worden geconcentreerd.

Combineer de resultaten van alle volumes waarvoor de methode kan worden aanbevolen en bereken het rekenkundig gemiddelde van η , $\bar{x}$, de standaardafwijking s , en de relatieve standaardafwijking $s/\bar{x}$.

Het gemiddelde van η met alle gegevens geeft een betere schatting van de terugvindingsefficiëntie van de methode.

De relatieve standaardafwijking, $s/\bar{x}$, geeft een indicatie van de betrouwbaarheid van de methode. Beschouw de methode als betrouwbaar als $s/\bar{x} < 0,5$.

Zie ISO 10705-3 bijlage B voor een voorbeeld van het validatieproces en de weergave van de resultaten.

Als de methode regelmatig in een laboratorium wordt gebruikt, wordt aan de gebruikers aanbevolen om de terugvindingsgegevens grafisch op te volgen.

6.7 ANALYTISCHE KWALITEITSCONTROLE VAN HET RENDEMENT BIJ CONCENTREREN

Herhaal de in § 6.6.1.3 uitgewerkte evaluatie van de recovery periodiek indien de methode in routine wordt gebruikt. Het is dan voldoende om de resultaten bij $0,5 \times V_{max}$ te analyseren.

7 RAPPORTERING

Het testrapport bevat de volgende informatie

- een verwijzing naar de ISO 10705-3;
- een verwijzing naar de norm die de colifaag-testmethode beschrijft;
- een verwijzing naar het protocol waarin de concentratiemethode wordt beschreven;
- alle bijzonderheden die nodig zijn voor een volledige identificatie van het monster;
- alle informatie over ongebruikelijke kenmerken van het monster die van invloed kunnen zijn geweest op de recovery: troebelheid, algengroei, oppervlakteverontreinigingen, kleur enz.
- alle resultaten;
- alle andere voor de methode relevante informatie;
- de verwijzing naar de betreffende WAC methode.

8 REFERENTIES

- ISO 10705 Waterkwaliteit - Opsporing en telling van bacteriofagen - Deel 1 'Telling van F-specifiek RNA bacteriofagen'
- ISO 10705 Waterkwaliteit - Opsporing en telling van bacteriofagen - Deel 2 'Telling van somatische colifagen'
- ISO 10705 Waterkwaliteit - Opsporing en telling van bacteriofagen - Deel 3 'Validatie van methoden voor concentratie van bacteriofagen uit water'
- ISO 8199 Water quality General requirements and guidance for microbiological examinations by culture
- ISO 6887-1 Microbiology of the food chain Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions
- ISO 11133 Microbiologie van voedingsmiddelen, diervoeders en water - Bereiding, productie, bewaring en bepaling prestatiekenmerken van kweekmedia
- WAC/I/A/010 Conservering en behandeling van watermonsters
- WAC/VI/A/003 Kwaliteitseisen voor de analysemethoden
- Leo Heijnen, Goffe Elsinga, Miranda de Graaf, Richard Molenkamp, Marion P.G. Koopmans, Gertjan Medema: *Droplet digital RT-PCR to detect SARS-CoV-2 signature mutations of variants of concern in wastewater*, Science of The Total Environment, Volume 799, 2021, 149456, ISSN 0048-9697, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149456>.

Ecotoxiciteitstest met invertebraten: acute toxiciteit voor de watervlo (*Daphnia magna*) of het pekelkreeftje (*Artemia franciscana*)

INHOUD

1	TOEPASSINGSGEBIED	4
2	KEUZE VAN TESTORGANISME	4
3	PRINCIPE VAN DE TESTEN	5
3.1	<i>Immobiliteit als eindpunt voor acute toxiciteit bij invertebraten</i>	5
3.2	<i>Limiettest</i>	5
3.3	<i>Verdunningsreeks</i>	5
4	DEFINITIES	5
5	ACUTE TOXICITEIT VOOR DE WATERVLO, DAPHNIA MAGNA	6
5.1	<i>Inleiding</i>	6
5.2	<i>Apparatuur en materiaal</i>	7
5.3	<i>Reagentia en oplossingen</i>	7
5.4	<i>Watermonster</i>	7
5.5	<i>Werkwijze</i>	8
5.5.1	Controle medium of verdunningswater	8
5.5.2	Testorganismen	9
5.5.3	Testoplossingen van het watermonster	9
5.5.4	Blootstelling	10
5.5.5	Evaluatie van test	11
5.5.6	Berekening van resultaat voor acute toxiciteit na 48 u	11
5.5.7	Kwaliteitscontrole	12
5.5.8	Rapportering	13
6	ACUTE TOXICITEIT VOOR HET PEKELKREEFTJE, ARTEMIA FRANCISCANA	14
6.1	<i>Inleiding</i>	14
6.2	<i>Apparatuur en materiaal</i>	14
6.3	<i>Reagentia en oplossingen</i>	14
6.4	<i>Watermonster</i>	15
6.5	<i>Werkwijze</i>	16
6.5.1	Zoutwater medium of verdunningswater	16
6.5.2	Testorganismen	16
6.5.3	Testoplossingen van het watermonster	17
6.5.4	Blootstelling	17
6.5.5	Evaluatie van test	18
6.5.6	Berekening van resultaat voor acute toxiciteit na 24 u	19
6.5.7	Kwaliteitscontrole	19
6.5.8	Rapportering	20
7	REFERENTIES	21

BIJLAGE A : Labocultuur van watervlo, <i>Daphnia magna</i>	22
A.1 Kweek van watervlooien	22
BIJLAGE B : Controle en verdunningsmedium voor watervlo test	23
B.1 Bereiding stockoplossingen	23
B.2 Bereiding van verdunningsmedium	23

1 TOEPASSINGSGEBIED

Deze procedure beschrijft de werkwijze om de acute toxiciteit voor 2 soorten van aquatische invertebraten (kreeftachtigen) te bepalen. Deze organismen vertegenwoordigen het trofische niveau van de primaire consumenten in het aquatisch ecosysteem.

De procedure is van toepassing voor

- Diverse waterige milieumatrices: afval-, oppervlakte-, drink- en grondwater.
- Waterige oplossingen met chemische stoffen (zoals voor eerstelijnscontrole), mits deze goed oplosbaar zijn in water, of in oplossing blijven als stabiele suspensie of via dispersie, of met gebruik van een solvent.

De invertebraten test op watermonsters wordt normaal uitgevoerd met het zoetwaterorganisme *Daphnia magna*, de watervlo.

Echter in sommige waters kan de geleidbaarheid door aanwezige zouten zodanig hoog zijn, dat er schadelijke effecten kunnen optreden voor het zoetwaterorganisme (bv. toxiciteit door osmotische stress). De acute toxiciteit door milieugevaarlijke stoffen kan bijgevolg beïnvloed of gemaskeerd worden door effecten van het zout. Om die reden worden er voor een testorganisme zogenaamde 'randvoorwaarden' voor de fysicochemische parameters gedefinieerd. Er werd via VITO onderzoek aangetoond dat het meten van de geleidbaarheid een goede maat is voor de totale ionensterkte van de aanwezige zouten, waarvan chloriden en sulfaten de belangrijkste zijn. Indien de fysicochemische parameter geleidbaarheid voor de watervlo overschreden is, dan zal men voor de invertebraten test het zoutwaterorganisme *Artemia franciscana*, of het pekelkreeftje kiezen.

2 KEUZE VAN TESTORGANISME

Voor de juiste keuze van het testorganisme is meting van geleidbaarheid in het water een vereiste. Deze meting van geleidbaarheid wordt getoetst aan de randvoorwaarde voor de watervlo (Tabel 1). Bij een overschrijding moet gekozen worden voor het pekelkreeftje als testorganisme (zie 6). De meetresultaten voor deze randvoorwaarde wordt gedateerd en gerapporteerd, ter motivatie voor de keuze van het testorganisme.

Tabel 1: Randvoorwaarde geleidbaarheid in water voor de watervlo

Parameter	Geleidbaarheid ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
Watervlo, <i>Daphnia magna</i>	≤ 6700

3 PRINCIPE VAN DE TESTEN

3.1 IMMOBILITEIT ALS EINDPUNT VOOR ACUTE TOXICITEIT BIJ INVERTEBRATEN

Bij de acute toxiciteitstest met de watervlo, *Daphnia magna* (zie 5) of het pekelkreeftje, *Artemia franciscana* (zie 6) worden de testorganismen respectievelijk 48 u of 24 u blootgesteld aan het watermonster en dit in vergelijking met het controle medium. De immobiliteit van de testorganismen wordt op het einde van de blootstellingsperiode gemeten. Acut toxische effecten worden uitgedrukt als % effect, berekend op basis van het aantal mobiele organismen in de testgroep t.o.v. totaal aantal mobiele bij aanvang van de test. Een organisme wordt als immobiel gescoord wanneer het niet meer in staat is om te zwemmen, nadat het testrecipiënt zachtjes wordt bewogen.

3.2 LIMIETTEST

Voor het meten van de toxiciteit van waters wordt standaard een limiettest uitgevoerd op onverdund water (100%). Voor de watervlo wordt het % effect na 48 u blootstelling aan het onverdunde water gerapporteerd, en voor het pekelkreeftje het % effect na 24 u blootstelling, en dit telkens in vergelijking met het % effect bij blootstelling aan controle medium.

3.3 VERDUNNINGSREEKS

Uitzonderlijk worden de testen uitgevoerd op een verdunningsreeks van het watermonster. Dit kan van toepassing zijn wanneer dit vereist is in het kader van de bijzondere voorwaarde in een vergunning of bij verder onderzoek naar oorzaken van acute toxiciteit (TIE-Toxiciteit identificatie & evaluatie). Ook bij het testen van een referentiestof, als deel van kwaliteitscontrole, kan de test in een verdunningsreeks opgezet worden. Daarbij wordt het watermonster (of de referentiestof) in een reeks van minstens 5 concentraties getest, bijvoorbeeld 100%, 50%, 25%, 12.5% en 6.25%, naast de controle conditie op basis van een verdunningsfactor 2, die groter kan zijn naargelang de beoogde concentratierange. De concentratiereeks van het watermonster of de referentiestof wordt zodanig gekozen dat de hoogste concentratie ongeveer 100% effect oplevert, en de laagste concentratie 0% effect (of niet significant verschillend van de controle). Dit laat toe een grafiek met concentratie- effect voor immobiliteit te genereren, alsook een EC_{50} -waarde te berekenen die de concentratie van het watermonster of referentiestof geeft waarbij 50% van de testorganismen geïmmobiliseerd zijn. Bij deze test met een verdunningsreeks kan eveneens het % effect, zoals in de limiettest, bepaald worden voor het onverdunde water of de hoogste testconcentratie van de reeks.

4 DEFINITIES

- Cysten: startmateriaal van testorganismen in de Microbiotests ArtoxkitM voor het pekelkreeftje. Deze cysten worden verzameld van *Artemia* vrouwtjes die in ongunstige omstandigheden gekweekt worden; deze cysten zijn droge dormante stadia die langere tijd kunnen bewaard worden.
- Ehippia (of rusteieren, ook dormante stadia): startmateriaal van testorganismen in de Microbiotests DaphtoxkitF voor watervlo. Dit zijn bevruchte eieren, die gevormd worden bij ongunstige omstandigheden, en een langere periode kunnen overleven, en onder die vorm in de testkits worden aangeboden.

- EC₅₀ (50 % effectconcentratie): dit is de concentratie van het watermonster of een referentiestof waarbij 50% van de testorganismen in een testgroep geïmmobiliseerd zijn na een bepaalde blootstellingsperiode.
- Immobiele organismen: testorganismen die niet in staat zijn om, nadat de testbeker of de multiwell plaat zachtjes wordt bewogen, te zwemmen in eerstvolgende 15 seconden (enkel bewegen van de antennes is niet voldoende).
- Limiettest: in de test wordt 1 concentratie van het water (nl. de hoogste concentratie 100% of het onverdunde water) geëvalueerd in vergelijking met controle medium.
- Neonaat: pasgeboren, of nieuw ontloken watervlo, minder dan 24 u oud.
- Randvoorwaarden: voor het watermonster geldende grenzen voor fysicochemische parameters, zoals pH, O₂, geleidbaarheid, waarbij er geen effect op (acute) toxiciteit wordt verwacht ten opzichte van de controle conditie.
- Referentiestof: een referentiestof wordt getest om aan te tonen dat de gevoeligheid van de geteste soort onder laboratoriumomstandigheden niet in belangrijke mate veranderd is en/of de uitvoering van de test voldoet aan vooropgestelde criteria qua te verwachten toxische effecten voor de referentiestof (positieve controle).
- Toxiciteit identificatie en evaluatie (TIE): onderzoek naar de oorzaken van toxiciteit door watermonsters te onderwerpen aan diverse behandelingen (filtratie, actieve kool, organische extractie) met het doel de toxiciteit toe te wijzen aan bepaalde fracties uit deze behandelingsstappen.

5 ACUTE TOXICITEIT VOOR DE WATERVLO, DAPHNIA MAGNA

5.1 INLEIDING

Voor de watervlo test is deze WAC-methode gebaseerd op de internationale richtlijnen ISO 6341 (2012) en OECD 202 (2004).

Voor de uitvoering van deze test wordt een commerciële kit gebruikt, de DaphtokitF (<https://www.microbiotests.com/>). Stocks van het controle medium (of dilutie medium), testrecipiënt en organismen, in de vorm van te ontluiken watervlooien uit rusteieren maken deel uit van de kit. De werkwijze wordt hierna verder beschreven, en voor meer informatie kan beroep gedaan worden op de handleiding bij de kit.

Voor deze test is het ook toegestaan gebruik te maken van watervlooien uit een continue cultuur in het labo, mits deze gezond zijn en geen tekenen van stress vertonen (specificaties: zie BIJLAGE A), waarbij neonaten minder dan 24 u oud worden afgezeefd voor blootstelling in de test. Verder kan het controle medium (en dilutie medium) zelf bereid worden in het labo vertrekkende van reagentia van analytische kwaliteit. Een werkwijze voor de bereiding en de samenstelling van het medium zijn te vinden in BIJLAGE B.

De test moet uitgevoerd worden met 20 testorganismen per conditie, verdeeld in 4 technische replica's van elk 5 organismen. Voor elk testorganisme is een minimum volume van 2 ml test oplossing vereist, zodat een testrecipiënt 5 organismen (1 replica) in minstens 10 ml testvolume bevat. De test wordt uitgevoerd bij $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$ en dit kan in volledig donker, of bij een 16 u licht/8 u donker regime. Binnen één testreeks moeten steeds dezelfde omstandigheden aangehouden worden.

5.2 APPARATUUR EN MATERIAAL

- Zuurstofmeter voor bepaling conform WAC/III/A/008
- Thermometer en logger voor registratie min./max. temperatuur
- pH-meter voor pH meting conform WAC/III/A/005
- Geleidbaarheidsmeter voor meting geleidbaarheid conform WAC/III/A/004
- Materiaal en apparatuur voor de bepaling van ammonium
- Analytische balans, aflezing tot 0.1 mg
- Klimaatkamer of incubator met instelbare temperatuur (20 ± 2)°C, en instelbare lichtcyclus
- Beluchting systeem (olie-vrij)
- Lichtbron, 6000-8000 Lux
- Lux meter
- Pipetten en toebehoren
- Standaard labo glasmateriaal: maatkolven, maatcilinders voor bereiding van testoplossingen en verdunningen
- Recipiënten voor meting van fysicochemische parameters
- Petriplaat (5cm ϕ) met deksel voor het ontluiken van de ehippia (zie DaphtoxkitF)
- Multiwell testplaten met parafilm (zie DaphtoxkitF) of glazen testbekers voor min. 10 ml testvolume elk, met losse deksel
- Micropipetten voor transfer van testorganismen
- Tube met ehippia van *Daphnia magna* (zie DaphtoxkitF) of organismen uit eigen kweek (zie BIJLAGE A).
- Tube met *Spirulina* poeder (zie DaphtoxkitF)
- Zeef 100 μm ϕ
- Lichttafel, vergrootglas met licht of omgekeerde microscoop (10x)

5.3 REAGENTIA EN OPLOSSINGEN

- Gedemineraliseerd water ($< 10 \mu\text{S/cm}$).
- Geconcentreerde zoutoplossingen (zie DaphtoxkitF) of 4 zouten, nl. calciumchloride, magnesiumsulfaat, natriumbicarbonaat en kaliumchloride van analytische kwaliteit voor de bereiding van controle medium en verdunningsmedium (bereiding, zie BIJLAGE B).
- HCl, 0.1N en NaOH, 0.1N
- Kaliumbichromaat, analytische kwaliteit (referentiestof, zie 5.5.7, Kwaliteitscontrole).

5.4 WATERMONSTER

Voor de monsternamen en houdbaarheid wordt verwezen naar respectievelijk WAC/I/A/003, WAC/I/A/004 en WAC/I/A/010.

Bij gebruik voor fysicochemische metingen om de randvoorwaarden te controleren wordt een gehomogeniseerd, en representatief deelstaal van het water genomen en op kamertemperatuur gezet.

Naast de meting van geleidbaarheid bij keuze van testorganisme (zie 2) moet eveneens pH, zuurstof en ammonium gemeten en gerapporteerd worden. Voor de meeste van deze parameters zijn er aanvaardbare ranges gedefinieerd waarbij er geen effect verschillend van controle ($\leq 10\%$) op immobiliteit mag optreden (Tabel 2, Postma et al. 2002, en gegevens Microbiotests).

Tabel 2: Randvoorwaarde voor fysicochemische parameters voor watervlo

Parameter	pH	Zuurstof (mg/l)	Ammonium (mg/l NH_4^+)	Geleidbaarheid ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
Watervlo, <i>Daphnia magna</i>	6 – 8.5 > 8.5 – 9	≥ 3.6	< 54 < 15	≤ 6700

Indien de pH van het watermonster buiten de toegelaten range valt (< 6 of > 9), dan wordt meteen de pH aangepast met zuur of base tot een pH-waarde overeenkomstig die van het controle medium

± 0.1 .

Indien het zuurstofgehalte lager is dan 3.6 mg/l, dan wordt het watermonster gedurende 20 min., net voor aanvang van de test, belucht.

De aanpassingen voor pH en zuurstof worden gerapporteerd.

De meting van ammonium wordt gerapporteerd. In geval van afwijkende randvoorwaarde voor ammonium wordt er niet gecorrigeerd, maar wordt overschrijding van randvoorwaarde duidelijk vermeld in het rapport, als mogelijke parameter die bijdraagt tot gemeten toxiciteit, naast deze die te wijten zou zijn aan milieugevaarlijke stoffen.

In overleg met de opdrachtgever kan bij afwijking van ammonium alsnog een nieuwe test worden uitgevoerd door aanpassingen te doen aan het water (bijv. beluchten om ammoniak te strippen, of bufferen voor pH om ammonium/ammoniak effect uit te sluiten) gevolgd door meting van ammonium. Dergelijke aanpassingen aan het watermonster moeten gerapporteerd worden als een afwijking op de methode.

5.5 WERKWIJZE

5.5.1 CONTROLE MEDIUM OF VERDUNNINGSWATER

Er zijn 4 flesjes in de DaphtokitF met geconcentreerde zoutoplossingen, om 2 liter medium te maken dat qua samenstelling beantwoordt aan het ISO 6341 medium 'Standard freshwater'. Voor de volledige bereiding vertrekkende van het afwegen van de respectievelijke zouten wordt verwezen naar BIJLAGE B.

Dit medium wordt eveneens gebruikt om de rusteieren te ontluiken (zie 5.5.2.1).

Tabel 3: Geconcentreerde zoutoplossingen in DaphtokitF

Flesje	Zoutoplossing	Hoeveelheid (voor 2 liter medium)	Concentratie in bereid medium
1	NaHCO_3	129.5 mg	64.75 mg/l
2	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	588 mg	294 mg/l
3	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246.5 mg	123.25 mg/l
4	KCl	11.5 mg	5.75 mg/l

- Neem een maatkolf van 2 liter, en vul met ongeveer 1 liter gedemineraliseerd water.
- Open het flesje 1 en breng volledige inhoud in de 2 liter kolf.
- Doe dit achtereenvolgens ook voor flesjes 2, 3 en 4.
- Leng aan tot 2 liter in de maatkolf, sluit af en goed mengen.
- Label de kolf, en bewaar in het donker en koel (5 ± 3)°C tot gebruik.

Bij gebruik van het medium voor het ontluiken van rusteieren of om verdunningen te maken, wordt het langzaam op kamertemperatuur gebracht, en wordt het gedurende 15 minuten voor gebruik belucht via doorborreling.

Controleer de pH voor het 1^{ste} gebruik ($\text{pH } 7.8 \pm 0.5$).

5.5.2 TESTORGANISMEN

De acute toxiciteitstest met watervlo wordt gestart met neonaten, nl. organismen jonger dan 24 u bij gebruik van neonaten uit een continue cultuur van watervlooien of pas ontloken organismen uit rusteieren van de watervlo.

Voor het gebruik van neonaten uit een continue cultuur van watervlooien wordt verwezen naar BIJLAGE A.

5.5.2.1 ONTLUIKEN VAN RUSTEIEREN

In de DaphtoxkitF is er een tube voorzien met rusteieren of ephippia in bewaarmedium. Het ontluiken van de rusteieren wordt gestart 3 dagen voor aanvang van de toxiciteitstest.

- Giet de inhoud van het buisje met rusteieren over de zeef (100 μm poriën), en verifieer of de volledige inhoud verwijderd is, en spoel na met leidingwater.
- Spoel de rusteieren op de zeef grondig na met leidingwater zodat het bewaarmedium verwijderd wordt.
- Breng de rusteieren in een petriplaat (5 cm ϕ), die gevuld is met 15 ml belucht controle medium.
- Dek de petriplaat af, en plaats gedurende 72 u, bij 20 - 22°C (watertemperatuur) onder continue belichting van minstens 6000 lux (vereiste lichtintensiteit aan het oppervlak van de petriplaat).
- Bij optimale omstandigheden van licht en temperatuur zullen de 1^{ste} watervlooien reeds ontluiken vóór 72 u, maar de meerderheid zal ontluiken tussen 72 u en 80 u.

5.5.2.2 VOEDING VAN NEONATEN

De neonaten gecollecteerd uit een continue cultuur (zie BIJLAGE A) zullen voedsel (algen) opnemen vanuit de stockcultuur waarin ze geboren zijn, hetgeen volstaat als energiereserve tijdens de 48 u blootstelling.

De neonaten gecollecteerd uit rusteieren van de DaphtoxkitF dienen gevoed te worden vóór aanvang van de toxiciteitstest.

- Neem een tube met Spirulina poeder uit de DaphtoxkitF, leng aan met het bereid controle medium (zie 5.3) en sluit de tube af.
- Homogeniseer zorgvuldig door te vortexen.
- Breng tussen 2 u en 2 u 30' vóór de start van de toxiciteitstest de volledige inhoud met Spirulina in de petriplaat met de ontluikende ephippia, en warrel voorzichtig zodat de voeding goed verdeeld is.

5.5.3 TESTOPLOSSINGEN VAN HET WATERMONSTER

Het water wordt op kamertemperatuur gebracht, en goed gehomogeniseerd door schudden voor gebruik. De testoplossingen worden vers bereid tot maximum 4 uur voor aanvang van de test.

Voor elk van de testoplossingen wordt minstens 100 ml gemaakt, zodat er voldoende is om per testconditie 4 replica's van elk 10 ml voor de blootstelling op te zetten en meting van fysicochemische parameters te doen.

5.5.3.1 LIMIETTEST VOOR % EFFECT

Het watermonster wordt standaard in een limiettest geëvalueerd als onverdund water (hoogste testconcentratie of 100% water) in vergelijking met een controle conditie (100% verdunningswater).

5.5.3.2 TEST MET EEN VERDUNNINGSREEKS VOOR EC₅₀ BEPALING

Indien van toepassing (bijv. volgens bijzondere voorwaarde in vergunning van het bedrijf) moet het watermonster in een verdunningsreeks getest worden om een EC₅₀ waarde te bepalen. Hiervoor wordt het water verdund met verdunningswater (zie 5.5.1), voor minstens 5 concentraties met bijv. een verdunningsfactor 2, namelijk 100%, 50%, 25%, 12.5% en 6.25% in vergelijking met controle (0% water in verdunningswater).

Uitzonderlijk is een range finding test nodig, bijv. indien zeer hoge toxiciteit verwacht wordt. Hierbij wordt een verdunningsreeks opgezet met hoge verdunningsfactor, bijv. 10 om de 0-100% effectrange te vinden. Uit deze test wordt de verfijnde testrange (met lagere verdunningsfactor, minimum 2) afgeleid met concentraties van water waarbij minstens 1 punt met 100% effect en een punt met een effect $\leq 10\%$, en met indien mogelijk meerdere punten op de helling van de concentratie-effect curve om een nauwkeurige EC₅₀ waarde te berekenen. Indien er weinig tot geen effect is ($< 50\%$ acute toxiciteit), kan er geen EC₅₀ waarde bepaald worden.

5.5.4 BLOOTSTELLING

5.5.4.1 BLOOTSTELLINGSCONDITIES

- Duur: (48 ± 2) u
- Licht-donker cyclus: volledige duisternis (DaphtokitF) of 16 u licht/8 u donker
- Temperatuur van testoplossingen: $(20 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ tijdens blootstelling, een temperatuur-gecontroleerde ruimte te gebruiken voor de test. Via een temperatuurlogger in een testbeker (10 ml test vloeistof) naast de testrecipiënten wordt de temperatuur opgevolgd gedurende de blootstellingsperiode. Gedurende de test mag het temperatuurverschil niet meer dan 2°C bedragen
- Testrecipiënt: well plaat zoals voorzien bij DaphtokitF, 4 x 6 wells van 10 ml en 6 wells om te spoelen, of glazen testbekers van voldoende volume. Testrecipiënten worden afgedekt met parafilm of losse deksel
- Testvolume: 2 ml per neonaat, en 5 organismen per replica, dus 10 ml per replica van een testconditie, nl. controle of concentratie(s) van het watermonster
- Replica's: 4 per testconditie
- Deze condities zijn dezelfde bij de limiettest en test met verdunningsreeks.

5.5.4.2 TRANSFER NEONATEN NAAR TESTOPLOSSINGEN

- Voorzie het nodige aantal organismen (leeftijd < 24 u) uit stock cultuur of na ontluiken van rusteieren (en gevoed) en voorzie hulpmiddel (bv. lichttafel, omgekeerde microscoop) en een micropipet voor de transfer.
- Vul testrecipiënten (wells of bekertjes) met het vereiste testvolume van water of controle medium.
- Voorzie voor elk van de verschillende testcondities, 1 gevuld recipiënt voor de transfer van de neonaten (= spoelrecipiënt: well of beker).
- Breng minstens 20 actief zwemmende neonaten uit de voorraad over met een micropipet naar het spoelrecipiënt voor elk van de testoplossingen, te beginnen met de controle, en dan oplopende concentratie van het watermonster. Probeer om vloeistof overdracht bij transfer van neonaten te beperken.

- Neem een zuivere micropipet, en breng nu exact 5 neonaten uit het spoelrecipiënt naar elk van de 4 replica testrecipiënten (wells of beker) per testconditie. Doe deze handeling voor elk van de condities in volgorde van oplopende concentratie watermonster. Vermijd dat de watervlooien aan het wateroppervlak blijven drijven (oppervlaktespanning!), door de micropipet met de neonaten onder het oppervlak te brengen en dan pas de neonaten vrij te laten in het medium.
- Controleer organismen in elk van de testcondities en registreer op laboformulier de gegevens van blootstelling en testorganismen. De testrecipiënten worden afgedekt en incubatie bij juiste temperatuur en lichtcondities kan starten.
- De resterende testoplossingen zullen gebruikt worden voor meting van pH en zuurstof bij start van de test. Uitsluitend in het controle medium en in de hoogste testconcentratie van het watermonster, zowel voor de limiettest, als bij de verdunningsreeks moet er gemeten worden.

5.5.5 EVALUATIE VAN TEST

- Zowel in de limiettest als bij een verdunningsreeks wordt het resultaat enkel na (48 ± 2) u afgelezen.
- De testrecipiënten worden geëvalueerd voor het aantal immobiele organismen in elk van de replica's van elke testconditie, en overeenkomstig geregistreerd. Neonaten die niet meer zwemmen, na voorzichtig schudden met recipiënt worden als immobiel gescoord, zelfs indien ze nog bewegen met hun antennes.
- De testvloeistof van de 4 replica's per testconditie wordt voorzichtig overgebracht in een meetrecipiënt (gepooled) om opnieuw pH en zuurstof te meten. Dit is enkel nodig voor de controle conditie en de hoogste concentratie van het geteste watermonster, zowel in limiettest, als test met verdunningsreeks.
- De temperatuurregistraties tijdens het verloop van de test worden afgelezen, terwijl minimum- en maximumtemperatuur voor de volledige duur van de test gerapporteerd worden.
- Verwijder de testorganismen en de testoplossingen als chemisch afval.

5.5.6 BEREKENING VAN RESULTAAT VOOR ACUTE TOXICITEIT NA 48 U

5.5.6.1 LIMIETTEST VOOR % EFFECT

De aflezing van het aantal immobiele organismen op (48 ± 2) u (gesommeerd voor de 4 replica's) resulteert in een cumulatief aantal immobiele organismen, ten opzichte van het totaal mobiele organismen ($n=20$) bij aanvang van de test. Het resultaat wordt omgerekend in % van organismen met een effect (immobiel) voor de hoogst geteste concentratie van het watermonster (onverdund) en voor de controle conditie.

5.5.6.2 TEST MET EEN VERDUNNINGSREEKS VOOR EC_{50} BEPALING

- Voor elke concentratie van het watermonster en voor de controle wordt het aantal immobiele organismen berekend en uitgedrukt als % effect na (48 ± 2) u blootstelling. Dit is naar analogie met de limiettest.
- De resultaten van % effect (Y-as) worden grafisch voorgesteld als functie van de concentratie (% verdunning) van het water (X-as). Mits een goede concentratie-effect relatie kan er ook een EC_{50} waarde berekend worden.
- Een EC_{50} waarde kan afgeleid of berekend worden op verschillende manieren (grafische interpolatie of statistische methoden, als probit analyse). Indien twee opeenvolgende

concentraties met een onderlinge concentratieverhouding van 2 respectievelijk 0 en 100% effect veroorzaken, is het voldoende de EC_{50} te situeren tussen deze beide concentraties.

5.5.7 KWALITEITSCONTROLE

5.5.7.1 EERSTELIJNSCONTROLE

Beslissingscriterium voor geldigheid van de test:

- De immobiliteit in de controlegroep moet op het einde van de test voldoen aan $\leq 10\%$. De waarde(n) voor immobiliteit in de controlegroep moeten bijgehouden worden in een limietkaart.
- De variatie tussen replica's per testconditie moet minder zijn dan 3 organismen, en dit voor alle testcondities van een watermonster.

Herkomst en kwaliteit van testorganismen:

- Bij het gebruik van ehippia uit de DaphtoxkitF wordt steeds het batchnummer op het laboformulier vermeld. De gegevens over de gevoeligheid van elke gebruikte batch in de vorm van een EC_{50} voor referentiestof, uitgevoerd door Microbiotests worden bijgehouden in een databestand.
- Bij gebruik van neonaten uit eigen kweek is een logboek ter beschikking om het onderhoud met medium verversing, voeding en gezondheid van de kweek op te volgen.

5.5.7.2 TWEEDELIJNSCONTROLE

- De methode toegepast in het labo, hetzij met ehippia, hetzij met organismen uit eigen stock, wordt op de hieronder vermelde frequenties uitgevoerd met een positieve controle (Kaliumbichromaat) waarvoor de EC_{50} bepaald wordt na 24 u en 48 u voor een dilutiereeks van 3.2 tot 0.32 mg/l (voor details zie handleiding DaphtoxkitF):
 - o De EC_{50} wordt geregistreerd in een statistische controlekaart, naast deze van de corresponderende batch voor de DaphtoxkitF, indien van toepassing.
 - o De minimale frequentie voor een intralaboratorium test met positieve controle is als volgt:
 - Bij wekelijkse uitvoering van de test: driemaandelijks positieve controle testen
 - Bij maandelijkse uitvoering: zesmaandelijks een positieve controle test
 - Bovendien zal ieder van de betrokken uitvoerders minstens 1 maal per jaar een test met positieve controle uitvoeren.
- Het laboratorium is verplicht om minstens 1x/maand, in iedere maand waarin minstens één test uitgevoerd wordt, een test in parallel op te zetten van een verdunningsreeks van enerzijds het ruwe monster, en anderzijds het monster met een spike van 1 concentratie van steeds eenzelfde referentiestof (bijv. deze die gebruikt werden in ISO ringtesten):
 - o Men kiest een willekeurig monster dat bij aankomst en na controle van de randvoorwaarden in 2 deelstalen wordt verdeeld.
 - o De spike wordt gedoseerd aan steeds dezelfde concentratie die het 50% effect benadert. Voor de bereiding van de spike moet de verdunning vanuit een stockoplossing in het monster worden toegevoegd aan maximum 5% v/v of lager.
 - o De resultaten als % immobiliteit bij elke concentratie van het milieumonster, en van het milieumonster met spike worden bijgehouden op een controlekaart en zullen gebruikt worden voor het bepalen van de reproduceerbaarheid van de methode.

5.5.7.3 DERDELIJNSCONTROLE

Minstens 1x per jaar deelnemen aan een externe ringtest indien georganiseerd (bijv. Aquacheck).

5.5.7.4 OPVOLGING VAN AFWIJKINGEN

Indien de EC₅₀ resultaten van de positieve controles niet voldoen aan de statistische grenzen of de door Microbiotests aangegeven grenzen op de 'Specification sheet', of als de negatieve controle niet voldoet (>10% immobiliteit), dan dient een analyse van de oorzaak en reikwijdte uitgevoerd te worden. Indien hieruit blijkt dat bepaalde resultaten onbetrouwbaar zijn mogen deze niet gerapporteerd worden en dient een nieuwe bemonstering te worden uitgevoerd van de geteste waters. Indien van toepassing dient ook de impact op eerder gerapporteerde resultaten te worden nagegaan.

5.5.8 RAPPORTERING

Het testrapport bevat:

- De identificatie van het watermonster, gegevens over monstername, datum van testuitvoering met monster, resultaten van meting van alle randvoorwaarden en aanpassingen, indien van toepassing.
- Verwijzing naar de betreffende WAC-methode voor ecotoxiciteit, en WAC-methode voor bepaling van fysicochemische parameters.
- Gegevens over het testorganisme (naam, herkomst, batch), motivatie voor keuze van testorganisme a.d.h.v. gemeten geleidbaarheid en type test (limiet, of verdunningsreeks).
- Resultaten:
 - o Fysicochemische parameters van testoplossingen en controle op T = 0 en T = 48 u
 - o % effect voor immobiliteit na (48 ± 2) u in controle en watermonster (limiettest) of
 - o EC₅₀, met methode van berekening, voor immobiliteit na (48 ± 2) u bij verdunningsreeks van het watermonster, met % effect in de hoogst geteste concentratie en grafiek voor concentratie-effect op 48 u.
- Opmerkingen en afwijkingen.

6 ACUTE TOXICITEIT VOOR HET PEKELKREEFTJE, ARTEMIA FRANCISCANA

6.1 INLEIDING

Deze test met pekelkreeftje, *Artemia franciscana* is het brak tot zoutwater alternatief voor een invertebraten test wanneer geleidbaarheid te hoog is voor de zoetwater species ($> 6700 \mu\text{S}/\text{cm}$, zie 2).

Voor de uitvoering van deze test maakt men gebruik van een commerciële kit, de ArtoxkitM (<https://www.microbiotests.com/>), of zijn gelijkaardige varianten qua uitvoering toegestaan mits voldaan wordt aan test- en kwaliteitscriteria. Stocks van het controle medium (of dilutie medium), testrecipiënt en organismen, in de vorm van te ontluiken organismen uit droge cysten maken deel uit van de commerciële kit. De werkwijze wordt hierna verder beschreven, en voor meer informatie kan beroep gedaan worden op de handleiding bij de kit.

6.2 APPARATUUR EN MATERIAAL

- Zuurstofmeter
- Thermometer en logger voor registratie min./max. temperatuur
- pH-meter voor pH meting conform WAC/III/A/005
- Geleidbaarheidsmeter voor meting geleidbaarheid conform WAC/III/A/004
- Materiaal en apparatuur voor de bepaling van ammonium
- Analytische balans, aflezing tot 0.1 mg
- Klimaatkamer of incubator met instelbare temperatuur ($25 \pm 2^\circ\text{C}$)
- Lichtbron, 3000-4000 lux
- Lux meter
- Beluchting systeem (olie-vrij)
- Pipetten en toebehoren
- Standaard labo glasmateriaal: maatkolven en maatcilinders
- Recipiënten voor meting fysicochemische parameters
- Petriplaat met deksel (ϕ 5 cm) voor ontluiken van cysten
- Multiwell testplaten (24 wells) met parafilm (zie bijv. ArtoxkitM)
- Micropipetten voor transfer van testorganismen (zie bijv. ArtoxkitM)
- Tube met cysten van *Artemia franciscana* (zie bijv. ArtoxkitM)
- Lichttafel, vergrootglas met licht of omgekeerde microscoop (10x)

6.3 REAGENTIA EN OPLOSSINGEN

- Gedemineraliseerd water ($< 10 \mu\text{S}/\text{cm}$)
- Geconcentreerde zoutoplossingen (zie ArtoxkitM): 7 flesjes voor de bereiding van 'Standard Seawater', voor het ontluiken van cysten, en als zoutwater controle medium of verdunningswater
- HCl (0.1N) en NaOH (0.1N)
- Kaliumbichromaat, analytische kwaliteit (referentiestof, zie 6.5.7, Kwaliteitscontrole)

6.4 WATERMONSTER

Voor de monsternamen en houdbaarheid wordt verwezen naar respectievelijk WAC/I/A/003, WAC/I/A/004 en WAC/I/A/010.

Bij gebruik voor fysicochemische metingen om de randvoorwaarden te controleren wordt een gehomogeniseerd en representatief deelstaal genomen van het watermonster en op kamertemperatuur gezet.

Naast de meting van geleidbaarheid bij keuze van testorganisme (zie 2) moet eveneens pH, zuurstof en ammonium gemeten en gerapporteerd worden. Voor de meeste van deze parameters zijn er aanvaardbare ranges gedefinieerd waarbij er geen effect verschillend van de controle ($\leq 10\%$) op immobiliteit zou optreden (Tabel 4, Postma et al., 2002, gegevens Microbiotests)

Tabel 4: Randvoorwaarde voor parameters in het watermonster voor pekelkreeftje

Parameter	pH	Zuurstof (mg/l)	Geleidbaarheid ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Ammonium (mg/l NH_4^+)
Pekelkreeftje, <i>Artemia franciscana</i>	5 - 9	≥ 3.0	> 6700– 47900	< 1200

Indien de pH van het watermonster buiten de toegelaten range valt (< 5 of > 9), dan wordt meteen de pH aangepast met zuur of base tot een pH-waarde overeenkomstig die van het zoutwater controle medium ± 0.1 .

Indien het zuurstofgehalte lager is dan 3 mg/l, dan wordt het watermonster gedurende 20 min., net voor aanvang van de test, belucht.

De aanpassingen voor pH en zuurstof worden gerapporteerd.

Indien een overschrijding van randvoorwaarde voor geleidbaarheid in het watermonster, namelijk $> 47900 \mu\text{S}/\text{cm}$, dan zal het watermonster getest worden bij 50% als hoogste concentratie in de limiettest met het pekelkreeftje na verdunning van het watermonster met zout verdunningsmedium ('Standard Seawater', zie 6.5.1). Bij het testen van een verdunningsreeks zal het watermonster zodanig verdund worden dat de hoogste concentratie van de reeks overeenkomt met een geleidbaarheid van max. $47900 \mu\text{S}/\text{cm}$, en van daaruit verder verdund worden om een EC_{50} af te leiden.

De meting van ammonium wordt gerapporteerd. In geval van afwijkende randvoorwaarde voor ammonium wordt er niet gecorrigeerd, maar wordt overschrijding van randvoorwaarde duidelijk vermeld in het rapport, als mogelijke parameter die bijdraagt tot gemeten toxiciteit, naast deze die te wijten zou zijn aan milieugevaarlijke stoffen.

In overleg met de opdrachtgever kan bij afwijking van ammonium alsnog een nieuwe test worden uitgevoerd door aanpassingen te doen aan het water (bijv. beluchten om ammoniak te strippen, of bufferen voor pH om ammonium/ammoniak effect uit te sluiten) gevolgd door meting van ammonium. Dergelijke aanpassingen aan het watermonster moeten gerapporteerd worden als een afwijking op de methode.

6.5 WERKWIJZE

6.5.1 ZOUTWATER MEDIUM OF VERDUNNINGSWATER

Er zijn 7 flesjes in de ArtoxkitM met geconcentreerde zoutoplossingen, om 1 l medium te maken dat qua samenstelling gedefinieerd wordt als 'Standard Seawater' (Tabel 5) met een saliniteit van 35 ppt of een geleidbaarheid¹ van 47.9 mS/cm.

Dit medium wordt eveneens gebruikt om de cysten te ontluiken (zie 6.5.2.1).

Tabel 5: Geconcentreerde zoutoplossingen in ArtoxkitM

Flesje	Zoutoplossing	Hoeveelheid (voor 1 liter medium)	Concentratie in bereid medium
1	NaCl	26.4 g	26.4 g/l
2	KCl	840 mg	840 mg/l
3	CaCl ₂ ·2H ₂ O	1670 mg	1670 mg/l
4	MgCl ₂ ·6H ₂ O	4600 mg	4600 mg/l
5	MgSO ₄ ·7H ₂ O	5580 mg	5580 mg/l
6	NaHCO ₃	170 mg	170 mg/l
7	H ₃ BO ₃	30 mg	30 mg/l

- Neem een maatkolf van 1 liter, en vul met ongeveer 800 ml gedemineraliseerd water.
- Open het flesje 1 (NaCl) en breng volledige inhoud in de 1 liter kolf. Sluit de kolf af, en schud krachtig tot het zout is opgelost.
- Open het flesje 2 (KCl) en breng over in de kolf, sluit af, krachtig schudden tot het zout is opgelost.
- Herhaal dit voor elk van de andere flesjes 3-7.
- Leng aan tot 1 liter in de maatkolf met gedemineraliseerd water, sluit af en goed mengen.
- Label de kolf, en bewaar in het donker en koel (5 ± 3)°C tot gebruik (houdbaarheid 3 maanden).

Bij gebruik van het zoutwater medium voor het ontluiken van cysten of om verdunningen te maken, wordt het op kamertemperatuur gebracht, en wordt het gedurende 15 minuten voor gebruik belucht via doorborreling.

6.5.2 TESTORGANISMEN

De acute toxiciteitstest met het pekelkreeftje wordt gestart met instar II-III larven, nl. organismen bekomen uit cysten na 30u ontluikingsperiode.

6.5.2.1 ONTLUIKEN VAN CYSTEN

In de ArtoxkitM is er een tube voorzien met cysten. Het ontluiken van de cysten wordt gestart 30 u voor aanvang van de toxiciteitstest.

- Doe 10 ml van het beluchte zoutwater medium in de petriplaat.
- Giet de inhoud van het buisje met cysten in de petriplaat, en controleer dat alle cysten uit de tube zijn overgebracht. Meng voorzichtig voor een gelijkmatige verdeling van de cysten in het zoutwatermedium.

¹ Omrekening saliniteit naar geleidbaarheid bij 20°C, volgens <https://www.oceanlife.it/index.php/en/19-notizie/370-water-salinity-converter-en>, en resultaat in lijn met annex in NBN EN ISO 5814

- Dek de petriplaat af, en plaats gedurende 30 u $\pm$ 30 min. , bij 25°C $\pm$ 1°C (temperatuur in het water) onder continue belichting van 3000-4000 lux.
- Bij optimale omstandigheden van licht en temperatuur zullen de cysten ontluiken rond 18 - 20 u incuberen, en na 30 u zullen de meeste larven in het instar II-III stadium zijn voor gebruik in de test.

6.5.3 TESTOPLOSSINGEN VAN HET WATERMONSTER

Het watermonster wordt op kamertemperatuur gebracht, en goed gehomogeniseerd door schudden voor gebruik. De testoplossingen worden vers bereid tot maximum 4 uur voor aanvang van de test. Het zoutwater medium wordt gebruikt als controle conditie (zie **Fout! Verwijzingsbron niet gevonden.**), en wordt eveneens gebruikt voor verdunningen van het watermonster indien een test met verdunningsreeks vereist is.

Voor elk van de testoplossingen wordt voldoende testoplossing, minstens 40 ml gemaakt. Per testconditie zijn er 4 replica's nodig, zowel voor de limiettest als bij een verdunningsreeks, met elk 1 ml testoplossing, en 1 spoel-well met 1 ml testoplossing voor de transfer van de organismen, terwijl 25 ml testoplossing nodig is voor meting van fysicochemische parameters.

6.5.3.1 LIMIETTEST VOOR % EFFECT

Het water wordt standaard in een limiettest geëvalueerd als onverdund water (hoogste testconcentratie of 100% water) in vergelijking met een controle conditie (zoutwater medium), tenzij de randvoorwaarde voor geleidbaarheid overschreden is en men als hoogste concentratie bij 50% watermonster moet testen (zie 0).

6.5.3.2 TEST MET EEN VERDUNNINGSSREEKS VOOR EC₅₀ BEPALING

Indien van toepassing (bijv. volgens bijzondere voorwaarde in vergunning van het bedrijf) moet het water in een verdunningsreeks getest worden om een EC₅₀ waarde te bepalen. Hiervoor wordt het water verdund met het zoute verdunningswater (zie 6.5.1), voor minstens 5 concentraties met bijv. verdunningsfactor 2, in vergelijking met controle (zoutwater medium). De hoogste testconcentratie van het watermonster moet een geleidbaarheid hebben $\leq 47900 \mu\text{S}/\text{cm}$.

Uitzonderlijk is een range finding test nodig, bijv. indien zeer hoge toxiciteit verwacht wordt. Hierbij wordt een verdunningsreeks opgezet met hogere verdunningsfactor, bijv. 10 om de 0 - 100% effectrange te vinden. Uit deze test wordt de verfijnde testrange (met lagere verdunningsfactor, minimum 2) afgeleid met concentraties van water waarbij minstens 1 punt met 100% effect en een punt met een effect $\leq 10\%$, en met indien mogelijk meerdere punten op de helling van de concentratie-effect curve om een nauwkeurige EC₅₀ waarde te berekenen. Indien er weinig tot geen effect is ($< 50\%$ acute toxiciteit), kan er geen EC₅₀ waarde bepaald worden.

6.5.4 BLOOTSTELLING

6.5.4.1 BLOOTSTELLINGSCONDITIES

- Duur: (24 $\pm$ 2) u
- Licht-donker cyclus: continu volledige duisternis
- Temperatuur: (25 $\pm$ 2)°C tijdens blootstelling. Via een temperatuurlogger in een testbeker (25 ml testvloeistof) naast de testrecipiënten wordt de temperatuur opgevolgd gedurende de blootstellingsperiode. Gedurende de test mag het temperatuurverschil niet meer dan 2°C bedragen.

- Testrecipiënt: well plaat zoals voorzien in de ArtoxkitM, 4 x 6 wells waarvan 4 (limiet) of 3 (verduunningsreeks) replica wells per testconditie, en een afzonderlijke well per testconditie te voorzien voor de transfer. Er is in de kit parafilm voorzien om de plaat af te dekken tijdens de incubatie.
- Testvolume: 1 ml per replica, en 10 larven per replica van een testconditie, nl. controle of concentratie(s) van watermonster. Dit is hetzelfde in de limiettest en bij een verduunningsreeks. Er wordt een afzonderlijke beker met 25 ml testvloeistof geïncubeerd voor meting van fysicochemische parameters voor controle en hoogste concentratie watermonster.
- Replica's: 4 voor controle en 4 voor hoogste concentratie water in de limiettest, en 3 per testconditie bij een verduunningsreeks.

6.5.4.2 TRANSFER LARVEN NAAR TESTOPLOSSINGEN

- Voorzie het nodige aantal instar II-III larven (leeftijd < 24 u) na ontluiken van cysten en voorzie hulpmiddel (bv. Lichttafel met vergrootglas of omgekeerde microscoop) en een micropipet voor de transfer. Neem de petriplaat met ontloken larven uit de incubator.
 - Vul testrecipiënten (wells) met 1 ml water of zoutwater controle medium.
 - Voorzie voor elk van de verschillende testcondities, 1 gevulde well voor de transfer van de larven (= spoelrecipiënt).
 - Breng minstens 50 larven uit de petriplaat over met een micropipet naar het spoelrecipiënt voor elk van de testoplossingen, te beginnen met de controle, en dan oplopende concentratie van water. Probeer om vloeistof overdracht bij transfer van larven te beperken.
 - Neem een zuivere micropipet, en breng nu telkens 10 larven uit het spoelrecipiënt naar elk van de 4 replica wells per testconditie. Controleer de aantallen per well door de larven te tellen bij het verlaten van de micropipet. Doe deze handeling voor elk van de condities, te beginnen met de controle, en vervolgens met oplopende concentratie water.
 - Controleer organismen in elk van de testcondities en registreer op laboformulier de gegevens van blootstelling en testorganismen. De testplaat wordt afgedekt met parafilm en weggezet bij $(25 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ in het donker om (24 ± 2) u blootstelling te starten.
 - Zet voor de controle en hoogste testconcentratie water een beker met testoplossing (25 ml) in de incubator voor metingen na (24 ± 2) u. Gebruik deze beker eveneens voor de temperatuurlogger om min. en max. temperatuur te registreren.
- De resterende testoplossingen zullen gebruikt worden voor meting van pH en zuurstof bij start van de test. Uitsluitend in de controle conditie, en in de hoogste testconcentratie, zowel voor de limiettest als bij de test met verduunningsreeks moet er gemeten worden.

6.5.5 EVALUATIE VAN TEST

- Zowel in de limiettest als bij een verduunningsreeks wordt het resultaat na (24 ± 2) u afgelezen.
- De wells worden geëvalueerd met een omgekeerde microscoop (of vergrootglas boven lichtbak) voor het aantal immobiele organismen in elk van de replica's van elke testconditie, en overeenkomstig geregistreerd. Larven die niet meer zwemmen, of bewegen gedurende 10 sec van observatie worden als immobiel of dood gescoord.
- De testvloeistof in de afzonderlijke beker wordt gebruikt voor pH en zuurstof metingen na 24 u. Dit is enkel nodig voor de controle conditie en de hoogste concentratie van het geteste watermonster, zowel in de limiettest, als test met verduunningsreeks.
- De temperatuurregistraties tijdens het verloop van de test worden afgelezen, en minimum- en maximumtemperatuur tijdens (24 ± 2) u blootstelling worden gerapporteerd.
- Verwijder de testorganismen en de testoplossingen als chemisch afval.

6.5.6 BEREKENING VAN RESULTAAT VOOR ACUTE TOXICITEIT NA 24 U

6.5.6.1 LIMIETTEST VOOR % EFFECT

De aflezing van het aantal immobiele larven op (24 ± 2) u, gesommeerd voor de 4 replica's resulteert in een cumulatief aantal immobiele larven, ten opzichte van het totaal mobiele larven ($n = 40$) bij aanvang van de test. Het resultaat wordt omgerekend in % van organismen met een effect (immobiel) voor de hoogst geteste concentratie van het water (onverdund) en voor de controle conditie.

6.5.6.2 TEST MET EEN VERDUNNINGSREEKS VOOR EC_{50} BEPALING

- Voor elke concentratie watermonster en voor de controle wordt het cumulatief aantal immobiele organismen berekend en uitgedrukt als % effect na 24 u blootstelling. Dit is naar analogie met de limiettest.
- De resultaten van % effect (Y-as) worden grafisch voorgesteld als functie van de concentratie (% verdunning) van het watermonster (X-as). Mits een goede concentratie-effect relatie kan er ook een EC_{50} waarde berekend worden.
- Een EC_{50} waarde kan afgeleid of berekend worden op verschillende manieren (grafische interpolatie of statistische methode, als probit analyse). Indien twee opeenvolgende concentraties met een onderlinge concentratieverhouding van 2 respectievelijk 0 en 100% effect veroorzaken, is het voldoende de EC_{50} te situeren tussen deze beide concentraties.

6.5.7 KWALITEITSCONTROLE

6.5.7.1 EERSTELIJNSCONTROLE

Beslissingscriterium voor geldigheid van de test:

- De immobiliteit in de controlegroep moet op het einde van de test voldoen aan $\leq 10\%$. De waarde(n) voor immobiliteit in de controlegroep moeten bijgehouden worden in een limietkaart.
- De variatie tussen respectievelijke replica's per testconditie moet minder zijn dan 5 organismen, en dit voor alle testcondities van een watermonster.

Herkomst en kwaliteit van testorganismen:

Bij het gebruik van cysten uit de ArtoxkitM wordt steeds het batchnummer op het laboformulier vermeld. De gegevens over de gevoeligheid van elke gebruikte batch in de vorm van een EC_{50} voor referentiestof, uitgevoerd door Microbiotests worden bijgehouden in een databestand.

6.5.7.2 TWEEDELIJNSCONTROLE

De methode toegepast in het labo wordt op de hieronder vermelde frequenties uitgevoerd met een positieve controle (Kaliumbichromaat) waarvoor de EC_{50} bepaald wordt na (24 ± 2) u voor een dilutiereeks van 100 tot 10 mg/l (voor details zie handleiding ArtoxkitM):

- De EC_{50} wordt geregistreerd in een statistische controlekaart, naast deze van de corresponderende batch voor de ArtoxkitM.
- De minimale frequentie voor een test met positieve controle is als volgt:
 - o Bij wekelijkse uitvoering van de test: driemaandelijks positieve controle testen
 - o Bij maandelijks uitvoering: zesmaandelijks een positieve controle test
 - o Bovendien zal ieder van de betrokken uitvoerders minstens 1 maal per jaar een test met positieve controle uitvoeren.

6.5.7.3 DERDELIJNSCONTROLE

Minstens 1x per jaar deelnemen aan een externe ringtest, indien georganiseerd.

6.5.7.4 OPVOLGING VAN AFWIJINGEN

Indien de EC₅₀ resultaten van de positieve controle niet voldoen aan de statistische grenzen of de door Microbiotests aangegeven grenzen op de 'Specification sheet' van de batch cysten, of als de negatieve controle niet voldoet (>10% immobiliteit), dan dient een analyse van de oorzaak en reikwijdte uitgevoerd te worden. Indien hieruit blijkt dat bepaalde resultaten onbetrouwbaar zijn mogen deze niet gerapporteerd worden en dient een nieuwe bemonstering te worden uitgevoerd van de geteste waters. Indien van toepassing dient ook de impact op eerder gerapporteerde resultaten te worden nagegaan.

6.5.8 RAPPORTERING

Het testrapport bevat:

- De identificatie van het watermonster, gegevens over monsternamen, datum van testuitvoering met monster, resultaten van meting van al de randvoorwaarden en aanpassingen, indien van toepassing.
- Verwijzing naar de betreffende WAC-methode voor ecotoxiciteit, en WAC-methode voor bepaling van fysicochemische parameters.
- Gegevens over het testorganisme (naam, herkomst, batch), motivatie voor keuze van testorganisme a.d.h.v. gemeten randvoorwaarde en type test (limiet, of verdunningsreeks)
- Resultaten:
 - Fysicochemische metingen in testoplossingen en controle op T=0 en T=24 u
 - % effect voor immobiliteit na (24 ± 2) u in controle en watermonster (limiettest) of
 - EC₅₀, met methode van berekening, voor immobiliteit na (24 ± 2) u bij verdunningsreeks van watermonster, met % effect in de hoogst geteste concentratie van het watermonster, en grafiek voor concentratie-effect op 24u
- Opmerkingen en afwijkingen.

7 REFERENTIES

- NBN EN ISO 6341 (2012). Waterkwaliteit - Bepaling van de remming van de mobiliteit van *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Acute toxiciteitsproef.
- OECD202 (2004). OECD guideline for testing of chemicals. *Daphnia* sp., Acute immobilization test.
- Handleidingen van de testkits DaphtoxkitF en ArtoxkitM.
- Postma J.F., De Valk S., Dubbeldam M., Maas J.L., Tonkes M., Schipper C.A. & B. J. Kater (2002). Confounding factors in bioassays with freshwater and marine organisms. *Ecotoxicology and environmental safety* 53, 226-237.

BIJLAGE A: LABOCULTUUR VAN WATERVLO, *DAPHNIA MAGNA*

A.1 Kweek van watervlooien

Testorganismen voor de acute test zijn neonaten (jongen <24u), afkomstig van een kweek van watervlooien, soort *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Brachiopoda, Crustacea), zoals hierna summier beschreven.

Een stock cultuur met 25-50 organismen per liter medium wordt opgezet. De watervlooien moeten gedurende minstens 3 generaties in het laboratorium gekweekt zijn via acyclische parthenogenese in welomschreven testcondities, vrij van zichtbare ziekten, zonder wintereieren en met een bekende geschiedenis (bv. voorbehandelingen ...) die gedocumenteerd wordt in een logboek.

Ze worden gekweekt op een rijk kweekmedium (bijv. Elendt M4), waarvoor we verwijzen we Annex A van ISO-richtlijn 6341 (2012). De voeding bestaat uit een suspensie van algen en tetramin.

De moederdieren worden gebruikt in de kweek tot ze 6 weken oud zijn. Ondertussen zorgt men voor nieuwe kweekdieren. Als de oudere moederdieren $\pm$ 30 dagen oud zijn worden met jonge watervlooien nieuwe kweekpotten opgestart, die afgescheiden worden via zeven. In geval een nieuwe kweek werd opgestart, worden vanaf $\pm$ 7 dagen de eerste jongen geboren. Deze jongen worden niet gebruikt voor de testen. De jongen vanaf de 2^{de} week van de kweek kunnen gebruikt worden om testen uit te voeren.

Daags (maximaal 24 uur) voor het opstarten van de eigenlijke test worden in minstens één kweekcompartiment (met voeding) de volwassen individuen afgezonderd door de jongen te verwijderen (via zeven die de jongen doorlaten en de ouderorganismen tegenhouden). De jongen die dan op de dag van start van de test in het compartiment zwemmen, zijn neonaten van maximaal 24 uur oud die geschikt zijn voor gebruik in de test.

BIJLAGE B: CONTROLE EN VERDUNNINGSMEDIUM VOOR WATERVLO TEST**B.1 Bereiding stockoplossingen**

Voor de bereiding van 4 stockoplossingen met zouten worden reagentia met gekende analytische zuiverheid gebruikt.

- Calciumchloride: los 11.76 g calciumchloride dihydraat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) op in gedemineraliseerd water en leng aan tot 1 liter in een maatkolf.
- Magnesiumsulfaat: los 4.93 g magnesiumsulfaat heptahydraat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) op in gedemineraliseerd water en leng aan tot 1 liter in een maatkolf.
- Natriumbicarbonaat: los 2.59 g natriumbicarbonaat (NaHCO_3) op in gedemineraliseerd water en leng aan tot 1 liter in een maatkolf.
- Kaliumchloride: los 0.23 g kaliumchloride (KCl) op in gedemineraliseerd water en leng aan tot 1 liter in een maatkolf.

Deze oplossingen worden gelabeld en gedateerd, en kunnen gedurende 6 maanden donker en koel (5 ± 3)°C bewaard worden.

B.2 Bereiding van verdunningsmedium

Elk van de 4 stockoplossingen wordt gebruikt bij een 1:40 verdunning. Een 1 liter maatkolf wordt ongeveer half gevuld met gedemineraliseerd water, en vervolgens wordt 25 ml van elk van de 4 stocks in de maatkolf toegevoegd, waarna er aangelengd wordt tot 1 liter met gedemineraliseerd water.

Deze oplossing wordt belucht tot zuurstofverzadiging en stabiele pH. Vervolgens wordt de pH gecontroleerd en als nodig bijgesteld met NaOH of HCl tot $\text{pH } 7.8 \pm 0.5$.

Het medium is gereed voor gebruik of kan koel (5 ± 3)°C en donker bewaard worden gedurende maximum 3 maanden. De samenstelling van het medium staat in volgende tabel, en is conform het ISO 6341 standaardmedium.

Tabel 6: samenstelling van controle- en verdunningsmedium in de watervlo test

Zout	Concentratie (mg/l)
NaHCO_3	64.8
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	294
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	123.3
KCl	5.8

Ecotoxiciteitstest met algen: groei-inhibitietest met de zoetwateralg (*Pseudokirchneriella subcapitata*) of de mariene alg (*Phaeodactylum tricornutum*)

INHOUD

1	Toepassingsgebied	4
2	Keuze van testorganisme	4
3	Principe van de test	5
3.1	Groei-inhibitie als eindpunt voor toxiciteit bij algen	5
3.2	Limiettest	5
3.3	Verdunningsreeks	5
4	Definities	6
5	Groei-inhibitie test met de zoetwateralg, <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	6
5.1	Inleiding	6
5.2	Apparatuur en materiaal	7
5.3	Reagentia en oplossingen	8
5.4	Watermonster	8
5.5	Werkwijze	9
5.5.1	Algengroei-medium (controle) of verdunningswater	9
5.5.2	Testorganismen	10
5.5.3	Testoplossingen van watermonsters	11
5.5.4	Blootstelling	13
5.5.5	Evaluatie van test	13
5.5.6	Berekening van resultaat voor groei-inhibitie na 72 u	14
5.5.7	Kwaliteitscontrole	16
5.5.8	Rapportering	17
6	Groei-inhibitie test met de zoutwateralg, <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	18
6.1	Inleiding	18
6.2	Apparatuur en materiaal	19
6.3	Reagentia en oplossingen	19
6.4	Watermonster	19
6.5	Werkwijze	21
6.5.1	Zoutwateralgengroei-medium (controle) of verdunningswater	21
6.5.2	Testorganismen	22
6.5.3	Testoplossingen van watermonster	23
6.5.4	Blootstelling	28
6.5.5	Evaluatie van test	29
6.5.6	Berekening van resultaat voor groei-inhibitie na 72 u	30
6.5.7	Kwaliteitscontrole	32
6.5.8	Rapportering	33
7	REFERENTIES	33

BIJLAGE A : Labocultuur van algen, en bereiden van precultuur_____	35
A.1 <i>Kweek van algen</i>	35
A.2 <i>Opzetten van precultuur</i>	35
BIJLAGE B : Algengroeimedium (Controle) en verdunningswater voor de zoetwatalgen test__	36
B.1 <i>Bereiding van stockoplossingen van nutriënten</i>	36
B.2 <i>Bereiding van zoetwatalgengroeimedium, of verdunningsmedium</i>	36
BIJLAGE C : Algengroeimedium (Controle) en verdunningswater voor de zoutwatalgen test__	37
C.1 <i>Bereiding synthetisch zoutwater</i>	37
C.2 <i>Bereiding stockoplossing van nutriënten en verdunningen voor bereiding van zoutwatalgenmedium</i>	37
C.3 <i>Bereiding van zoutwatalgenmedium, of verdunningswater</i>	37

1 TOEPASSINGSGEBIED

Deze procedure beschrijft de werkwijze om de acute en chronische toxiciteit voor 2 soorten van ééncellige algen te bepalen. Deze test wordt als een chronische test beschouwd omdat de generatietijd korter is dan de blootstellingsduur. De test op algen wordt gebruikt om de toxiciteit voor het trofische niveau van de primaire producenten te meten.

De procedure is van toepassing voor

- Diverse waterige milieumatrices: afval-, oppervlakte-, drink- en grondwater.
- Waterige oplossingen met chemische stoffen (zoals deze voor de eerstelijnscontrole), mits deze goed oplosbaar zijn in water, of in oplossing blijven als stabiele suspensie of via dispersie, of met gebruik van een solvent.

De algen test op waters wordt standaard uitgevoerd met het zoetwaterorganisme *Pseudokirchneriella subcapitata*, een ééncellig groenwier of alg.

Echter in sommige waters kan de geleidbaarheid door aanwezige zouten zodanig hoog zijn, dat er schadelijke effecten kunnen optreden voor het zoetwaterorganisme (bv. toxiciteit door osmotische stress). De toxiciteit door milieugevaarlijke stoffen kan bijgevolg beïnvloed of gemaskeerd worden door effecten van het zout. Om die reden worden er voor een testorganisme zogenaamde 'randvoorwaarden' voor de fysicochemische parameters gedefinieerd. Er werd via VITO onderzoek aangetoond dat het meten van de geleidbaarheid een goede maat is voor de totale ionensterkte van de aanwezige zouten, waarvan chloriden en sulfaten de belangrijkste zijn. Indien de fysicochemische parameter geleidbaarheid voor de zoetwateralg overschreden is, dan zal men voor de algen test het zoutwaterorganisme *Phaeodactylum tricornutum* kiezen.

2 KEUZE VAN TESTORGANISME

Voor de juiste keuze van het testorganisme is meting van geleidbaarheid in het watermonster een vereiste.

De meting van geleidbaarheid wordt getoetst aan de randvoorwaarde voor de zoetwateralg, *Pseudokirchneriella subcapitata* (Tabel 1, Postma et al., 2002). Bij een overschrijding van de geleidbaarheid moet gekozen worden voor de zoutwateralg, *Phaeodactylum tricornutum* (zie 6).

De meetresultaten voor deze randvoorwaarde wordt gedateerd en gerapporteerd, ter motivatie voor de keuze van het testorganisme.

Tabel 1: Randvoorwaarde geleidbaarheid voor de zoetwateralg

Parameter	Geleidbaarheid ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
Zoetwateralg, <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	≤ 3300

3 PRINCIPE VAN DE TEST

3.1 GROEI-INHIBITIE ALS EINDPUNT VOOR TOXICITEIT BIJ ALGEN

Exponentieel groeiende culturen van ééncellige algen worden blootgesteld aan het monster gedurende verschillende generaties over een periode van 3 dagen of 72 u, in gestandaardiseerde omstandigheden, en dit in vergelijking met een controle medium. De groei van de alg is de som van een aantal cellulaire en metabole processen. Het effect van een voor algen schadelijk watermonster vertaalt zich in een verminderde toename van de biomassa en verminderde groeisnelheid. De inhibitie van de groei en groeisnelheid in verhouding tot een controlecultuur wordt gemeten op welbepaalde tijdstippen (elke 24 u, of enkel na 72 u) en uitgedrukt als % effect.

3.2 LIMIETTEST

Voor het meten van de toxiciteit van waters wordt standaard een limiettest uitgevoerd op de hoogst mogelijke concentratie van het watermonster (~97%)¹. Voor de alg wordt het % effect enkel na 72 u blootstelling aan 1 testconditie gemeten, relatief ten opzichte van de optimale groei in controle medium en resultaten voor inhibitie van groeisnelheid worden gerapporteerd.

Voor de zoutwateralg is 1 testconditie in de limiettest niet voldoende vanwege de range geleidbaarheid (randvoorwaarde) en de verschillende zouten die nodig zijn voor groeicondities. Een protocol met 3 testcondities in vergelijking met controle wordt beschreven (zie 6.5.3.1).

3.3 VERDUNNINGSREEKS

Uitzonderlijk worden de testen uitgevoerd op een verdunningsreeks van het water. Dit kan van toepassing zijn wanneer dit vereist is in het kader van de bijzondere voorwaarde in een vergunning of bij verder onderzoek naar oorzaken van acute toxiciteit (TIE-Toxiciteit identificatie & evaluatie). Ook bij het testen van een referentiestof, als deel van kwaliteitscontrole, kan de test in een verdunningsreeks opgezet worden. Daarbij wordt het water (of de referentiestof) in een reeks van minstens 5 concentraties getest, bijvoorbeeld een 1:1 verdunning uitgaande van de hoogst mogelijke concentratie water (~97%), naast de controle conditie. De concentratiereeks van het water of de referentiestof wordt best zodanig gekozen dat de hoogste concentratie ongeveer 100% effect oplevert, en de laagste concentratie 0% effect (of niet significant verschillend van de controle) door bijv. de verdunningsfactor aan te passen. Dit laat toe een grafiek met concentratie-effect voor vermindering van biomassa en groeisnelheid te genereren, alsook een EC₅₀-waarde te berekenen die de concentratie van het water of referentiestof geeft waarbij 50% groei-inhibitie optreedt. Bij deze test met een verdunningsreeks kan eveneens het % effect, zoals in de limiettest, bepaald worden voor de hoogste testconcentratie van het water van de reeks na 72 u blootstelling.

¹ In de limiettest wordt de hoogst mogelijke concentratie van afvalwater getest. Voor de algen test is 100% watermonster niet mogelijk, vermits essentiële nutriënten en inoculum van algen worden toegevoegd, zodanig dat de hoogste testconcentratie steeds iets lager is dan 100%: zie 5.5.3.1 en 6.5.3.1

4 DEFINITIES

- Biomassa: de hoeveelheid biologisch materiaal per volume, in dit geval uitgedrukt in celconcentratie (eventueel omgerekend vanuit of uitgedrukt in een equivalent signaal als fluorescentie eenheden of optische densiteit, OD bij spectrofotometrische bepaling).
- Biomassa equivalent: wanneer de celconcentratie niet rechtstreeks gemeten wordt door telling, maar indirect via fluorescentie of UV/VIS-spectrometrie, dan kan dat signaal als biomassa equivalent worden beschouwd.
- Celconcentratie: is het aantal cellen, of beter algen, per ml.
- Groei: toename van de biomassa gedurende de testperiode.
- Groeisnelheid: toename van de biomassa per tijdseenheid.
- Limiettest: in de test wordt 1 concentratie van het water (nl. de hoogste concentratie of het onverdunde water) geëvalueerd in vergelijking met controle medium.
- EC₅₀: de concentratie water of chemische stof die leidt tot een vermindering met 50% van de biomassa, E_bC₅₀, of van de groeisnelheid (rate) E_rC₅₀ ten opzichte van de controle.
- Randvoorwaarden: voor het testmonster geldende grenzen voor fysicochemische parameters, zoals pH, O₂, geleidbaarheid, waarbij er geen effect op (acute) toxiciteit wordt verwacht ten opzichte van de controle conditie.
- Referentiestof: een referentiestof wordt getest om aan te tonen dat de gevoeligheid van de geteste soort onder laboratoriumomstandigheden niet in belangrijke mate veranderd is en/of de uitvoering van de test voldoet aan vooropgestelde criteria qua te verwachten toxische effecten voor de referentiestof (ook positieve controle).
- Toxiciteit identificatie en evaluatie (TIE): onderzoek naar de oorzaken van toxiciteit door waters te onderwerpen aan diverse behandelingen (filtratie, actieve kool, organische extractie) met het doel de toxiciteit toe te wijzen aan bepaalde fracties uit deze behandelingsstappen.

5 GROEI-INHIBITIE TEST MET DE ZOETWATERALG, PSEUDOKIRCHNERIELLA SUBCAPITATA

5.1 INLEIDING

De uitvoering van de groei-inhibitietest voor de zoetwateralg is gebaseerd op internationale richtlijnen, OECD 201 (2011) en ISO 8692 (2012).

De beschrijving in deze WAC-procedure is gebaseerd op uitvoering met de AlgtoxkitF, een commerciële kit (<https://www.microbiotests.com/>). Stocks van het controle medium (of dilutie medium), test- en meetrecipiënt en algen zijn aanwezig in de kit, of kunnen afzonderlijk aangekocht worden. De algen worden aangeboden in de vorm van 'beads' of parels, waarbij de algen geïmmobiliseerd zijn in een inerte matrix en tot 5 maanden in de koelkast bij (5 ± 3)°C bewaard kunnen blijven. Bij de testkit worden spectrofotometrische cuvetten met een weglengte van 10 cm aangeboden, met een afdekplaat, die tegelijk als testrecipiënt en meetcel fungeren.

Qua uitvoering zijn er evenwel een aantal varianten qua meetmethode, testrecipiënten, startcultuur van algen mogelijk, mits aan bepaalde voorwaarden is voldaan.

- Voor deze test is het ook toegestaan gebruik te maken van algen uit een continue cultuur in het labo, mits deze gezond is door wekelijkse passage op een rijk algenmedium. De algencultuur wordt onderhouden in steriele 250 ml glazen erlenmeyers met lucht-doorlaatbare stoppen in temperatuur- en licht gecontroleerde omstandigheden. Een

precultuur wordt gemaakt 2-4 dagen voor start van de toxiciteitstest (specificaties: zie BIJLAGE A).

- De bereiding van controle medium (en dilutie medium) is mogelijk vertrekkende van reagentia van analytische kwaliteit. Een werkwijze voor de bereiding en de samenstelling van het medium is te vinden in BIJLAGE B.
- De biomassa of concentratie van algen wordt klassiek bepaald met een deeltjesteller (voor sferische deeltjes in range 2.5 - 25 µm), of via microscopische evaluatie met telkamer. Alternatieve meetmethoden, zoals fluorescentie (excitatie 465 nm, emissie 670 nm) of spectrometrie (670 nm) zijn indirecte methoden die mits voldoende gevoelig en mits een correlatie tussen het signaal en algenconcentratie is aangetoond, ook gebruikt kunnen worden om groei te meten als biomassa equivalent. De AlgtoxkitF meet biomassa via spectrofotometrische analyse, die voldoende gevoelig is door het gebruik van meetcuvetten met een weglengte van 10 cm. Verder wordt er bij elke testkit en overeenkomstige batch van algen een werkblad geleverd met de correlatie tussen het OD-signaal voor spectrofotometrie met de 10 cm cuvetten en het aantal algen. De regressievergelijking wordt gebruikt bij de berekening van de resultaten om het gemeten OD-signaal uit te drukken als aantal cellen/ml.
- De klassieke test, beschreven door OECD 201 en ISO 8692, maakt gebruik van steriele, glazen erlenmeyers (100 of 250 ml) met luchtdoorlaatbare stoppen als testrecipiënt. Gelijkaardig materiaal, als steriele wegwerp celcultuurflessen zijn een valabel alternatief alsook multiwell platen of de 10 cm cuvetten in de AlgtoxkitF. Het materiaal en de geometrie van de testrecipiënten moet zodanig zijn dat uitwisseling van gassen naar de lucht door groei van algen mogelijk is, terwijl verlies en evaporatie van potentieel toxische stoffen vermeden wordt (zie ook Annex A en B in ISO 8692). De gekozen testrecipiënten moeten zodanig zijn dat aan de geldigheidscriteria voor de test met algen voldaan wordt (zie 5.5.7.1).

5.2 APPARATUUR EN MATERIAAL

- Thermometer en logger voor registratie min./max. temperatuur
- pH-meter voor pH meting conform WAC/III/A/005
- Geleidbaarheidsmeter voor meting geleidbaarheid conform WAC/III/A/004
- Materiaal en apparatuur voor de bepaling van ammonium en hardheid.
- Analytische balans, aflezing tot 0.1 mg.
- Algenincubator, of klimaatkamer met lichtbron, instelbare temperatuur (23 ± 2)°C en schudtoestel (tenzij de algen minstens dagelijks geresuspendeerd worden via manueel schudden, zoals van toepassing bij de AlgaltokitF).
- Lichtbron, 3000-4000 Lux voor onderlangse verlichting, 10000 Lux voor zijdelingse verlichting.
- Lux meter
- Vortex
- Labocentrifuge en tubes 10-15 ml, 3000 rpm.
- Pipetten en toebehoren.
- Standaard labo glasmateriaal: maatkolven, maatcilinders voor bereiding van testoplossingen en verdunningen.
- Recipiënten voor meting van fysicochemische parameters.
- Tube met algenbeads van zoetwateralg, *Pseudokirchneriella subcapitata* (zie AlgaltokitF), met een specificatie sheet met batch nummer van het inoculum, houdbaarheidsdatum, $E_{bC_{50}}$ & $E_{rC_{50}}$ waarden van Kaliumbichromaat voor de batch, en een sheet met regressievergelijking van optische densiteit (OD) versus aantal algen (N) voor de batch algenbeads, of organismen uit eigen kweek (zie BIJLAGE A).

- Polystyreen long cells of cuvetten (10 cm), met afdekplaatje, geplaatst in verzamelbak te gebruiken als testrecipiënten (zie AlgaltokkitF), en 2 polystyreen long cells, met afdekplaatje voor 0-calibratie van spectrometer, en meten van OD in geconcentreerde algenstock.
- Spectrofotometer, met meetcel geschikt voor cuvetten van 10 cm weglengte².

5.3 REAGENTIA EN OPLOSSINGEN

- Gedemineraliseerd water (< 10 µS/cm).
- Flesje met speciaal medium 'Matrix dissolving medium', om matrix bij algenbeads te verwijderen.
- 5 flesjes met geconcentreerde zoutoplossingen voor algenmedium (zie AlgaltokkitF) of de nodige zouten van analytische kwaliteit, zoals in Tabel 5 (zie BIJLAGE B) voor de bereiding van controle medium en verdunningsmedium.
- 1N HCl en 1N NaOH voor pH aanpassing van groeimedum, of van watermonster.
- Kaliumbichromaat, analytische kwaliteit (referentiestof, zie 5.5.7, Kwaliteitscontrole).

5.4 WATERMONSTER

Voor de monsternamen en houdbaarheid wordt verwezen naar respectievelijk WAC/I/A/003, WAC/I/A/004 en WAC/I/A/010.

Bij gebruik voor fysicochemische metingen om de randvoorwaarden te controleren wordt een gehomogeniseerd en representatief deelstaal genomen van het watermonster en op kamertemperatuur gezet.

Naast de meting van geleidbaarheid bij keuze van testorganisme (zie **Fout! Verwijzingsbron niet gevonden.**) moeten eveneens pH, hardheid en ammonium gemeten en gerapporteerd worden. Voor de meeste van deze parameters zijn er aanvaardbare ranges gedefinieerd waarbij er geen effect op groei zal optreden (Tabel 2, Postma et al., 2002)

Tabel 2: Randvoorwaarde voor fysicochemische parameters voor zoetwateralg.

Parameter	pH	Zuurstof (mg/l)	Geleidbaarheid (µS/cm)	Hardheid (mg/l CaCO ₃)	Ammonium (mg/l NH ₄ ⁺ , bij pH 8 ³)
Zoetwateralg, <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	7 - 9	Niet relevant	≤ 3300	< 1000	< 25

Indien de pH van het watermonster buiten de toegelaten range valt (< 7 of > 9), dan wordt meteen de pH aangepast met zuur of base tot een pH-waarde overeenkomstig die van het controle medium

± 0.1. De aanpassing van pH wordt gerapporteerd.

De metingen van hardheid en ammonium worden gerapporteerd. In geval van afwijkende randvoorwaarden voor ammonium en hardheid wordt er niet gecorrigeerd, maar wordt overschrijding van randvoorwaarden duidelijk vermeld worden in het rapport, als mogelijke

² Andere meetinstrumenten voor fluorescentie of deeltjesteller om aantal algen in testoplossing te kwantificeren zijn mogelijk.

³ Randvoorwaarde ammonium bij pH > 8 kan lager zijn vanwege hogere toxiciteit, maar data ontbreken.

parameter die bijdraagt tot gemeten toxiciteit, naast deze die te wijten zou zijn aan milieugevaarlijke stoffen.

In overleg met de opdrachtgever kan bij afwijking van ammonium alsnog een nieuwe test worden uitgevoerd door aanpassingen te doen (bijv. beluchten om ammoniak te strippen, of bufferen voor pH om ammonium/ammoniak effect uit te sluiten), gevolgd door meting van ammonium. Dergelijke aanpassingen aan het watermonster moeten gerapporteerd worden als een afwijking op de methode.

Naast de randvoorwaarden zijn er, specifiek voor de algentest, mogelijke interferenties op de meting van de algen (meest uitgesproken bij de spectrofotometrische analyse) wanneer er veel zwevend stof is, en wanneer het water gekleurd of troebel is. De methode met de AlgaltoxF voorziat bij de spectrofotometrische meting een correctie voor kleur en turbiditeit (zie 5.5.4. Blootstelling), die men steeds moet toepassen voor milieumatrices. De eventuele aanwezigheid van turbiditeit of kleur in het watermonster wordt gerapporteerd.

Indien er echter aanwijzingen zijn dat de methode met correctie geen betrouwbare resultaten geeft dan kan in overleg met de opdrachtgever de test opnieuw worden uitgevoerd nadat men het watermonster gaat behandelen, bijv. centrifugeren om overmaat zwevend stof te verwijderen of filtreren om steriel te maken en groei van micro-organismen die turbiditeit kunnen verhogen tijdens de incubatie uit te sluiten. Bij de rapportering moeten dergelijke behandelingen gemeld worden als een afwijking op de methode.

5.5 WERKWIJZE

5.5.1 ALGENGROEI-MEDIUM (CONTROLE) OF VERDUNNINGSWATER

Er zijn 4 flesjes in de AlgaltoxF met geconcentreerde zoutoplossingen, genaamd Nutriënt stock A, B, C & D (overeenkomstig de stockoplossingen 1,2,3 & 4 in het ISO-medium, zie tabel in BIJLAGE B) om groeimedium voor algencultuur te maken. Dit medium wordt zowel gebruikt om de precultuur van de algenbeads op te starten (zie 5.5.2.1), alsook voor verdunningsmedium van het watermonster in de test (zie 5.5.3) of als controle conditie in de test.

- Neem een maatkolf van 1 liter, en vul met ongeveer 800 ml gedemineraliseerd water.
- Open het flesje 'Nutriënt stock A' en breng 10 ml in de 1 liter kolb.
- Open achtereenvolgens flesjes 'Nutriënt stock B, C en D' en voeg van elk van deze flesjes, telkens 1 ml in de kolb.
- Leng aan tot 1 liter in de maatkolb met gedemineraliseerd water, sluit af en goed mengen.
- Label de kolb, en bewaar overnacht in het donker of doorborrel gedurende 30 min. voor evenwicht instelling.
- Voor gebruik als medium, en na evenwicht instelling wordt de pH gecontroleerd en bijgesteld indien nodig tot $\text{pH } 8.1 \pm 0.2$, gebruik makend van 1N HCl of 1N NaOH.
- Het medium kan donker en koel (5 ± 3)°C bewaard worden gedurende max. 1 maand.

5.5.2 TESTORGANISMEN

Voor deze test maakt men gebruik van een snelgroeiende soort van ééncellige groene algen, *Pseudokirchneriella subcapitata*. Deze zoetwateralg kan in het labo aanwezig zijn als een continue cultuur, van waaruit voor de test een precultuur wordt gestart (zie BIJLAGE A).

Hierna beschrijven we het gebruik van algenbeads uit de AlgtoxkitF om een inoculum te bereiden geschikt voor de opzet van een toxiciteitstest, zodat een continue cultuur niet vereist is.

5.5.2.1 DE-IMMOBILISATIE VAN ZOETWATERALGEN UIT DE ALGENBEADS

- Neem een tube met algenbeads uit de kit, en giet voorzichtig bovenstaande vloeistof (bewaarmedium) af en verifieer of al de beads in de tube blijven.
- Neem het flesje 'Matrix dissolving medium', en pipetteer 5 ml in de tube met de algenbeads.
- Sluit de tube, en schud handmatig totdat de matrix rond de algen volledig is opgelost. Dit moet lukken in 5 à 10 min. Eventueel mag een vortex gebruikt worden om het proces te versnellen.
- Centrifugeer, 10 min. bij 3000 rpm.
- Giet de bovenstaande vloeistof af, en vervang met 10 ml gedemineraliseerd water.
- Sluit de tube, schud krachtig om een homogene algensuspensie te bekomen.
- Centrifugeer 10 min. bij 3000 rpm.
- Giet de bovenstaande vloeistof af, en vervang met 10 ml algengroeimedium.
- De tube is gereed voor bereiding van het geconcentreerde algeninoculum (zie )

5.5.2.2 METING VAN OPTISCHE DENSITEIT VAN ALGENSUSPENSIE VIA SPECTROMETRIE: AANDACHTSPUNTEN!

Metingen van optische densiteit (OD) zijn de maat voor hoeveelheid algen in suspensie na spectrofotometrische meting bij 670 nm, gebruik makend van de wegwerp cuvetten met weglengte 10 cm (long cells). Voor elke tube algenbeads is er een specificatie sheet met batch nummer, en overeenkomstig een sheet met de regressievergelijking voor de relatie OD en aantal algen. Indien men een andere meetmethode (of toestel) gebruikt voor het kwantificeren van algen is het nodig om het gemeten signaal (bijv. OD-meting, of fluorescentiemeting) te controleren met het tellen van de algen, en als nodig een nieuwe regressievergelijking op te stellen.

In belang van de reproduceerbaarheid van OD-metingen zijn er enkele richtlijnen die zeer strikt moeten nageleefd worden:

- De cuvetten moeten steeds in dezelfde richting in de houder van de spectrofotometer geplaatst worden, nl. met de pijlen op de zijwanden van de cuvet wijzend naar links.
- Men doet steeds een 0-calibratie met de spectrofotometer vooraleer te starten met de OD-metingen van algensuspensies. Deze 0-calibratie gebeurt steeds met dezelfde cuvet, gevuld met algengroeimedium. Men herhaalt deze 0-calibratie regelmatig (minstens om de 10 metingen) tijdens langere meetreeksen van algensuspensies.
- De algensuspensies in elk van de cuvetten, goed afgesloten met afdekplaatje worden elk apart gedurende 10 sec. grondig geschud met omkeren (zie foto's in handleiding van de testkit) voor een homogene verdeling van de algen, vlak voordat de cuvet in de spectrofotometer wordt geplaatst.
- De meting van OD gebeurt voor elke cuvet apart na ongeveer 10 sec. schudden (na het verdwijnen van eventuele luchtbelletjes en/of schuim).

5.5.2.3 BEREIDING VAN EEN GECONCENTREERDE ALGENINOCULUM

- Men zet de spectrofotometer op voor meting van algensuspensie bij 670 nm.
- Giet de 10 ml tube van de gede-immobiliseerde algenbeads in een maatkolf van 25 ml.
- Vul aan met algengroeimeidium, sluit af en schud voor een homogene algensuspensie.
- Neem de 2 cuvetten, met respectievelijk het label 'Calibration long cell' en 'Algal stock cell'.
- Vul de cuvet 'calibration long cell' met 25 ml algengroeimeidium en sluit af.
- Plaats de cuvet in de goede richting in de spectrofotometer en doe de 0-calibratie.
- Vul de cuvet 'algal stock cell' met de 25 ml uit de kolf met de algensuspensie, sluit goed af en schud gedurende 10 sec.
- Plaats de cuvet in de goede richting in de spectrofotometer en lees OD1 af na ongeveer 10sec.
- Neem de sheet met de grafiek OD/N en bereken het aantal algen (N1) overeenkomstig de gemeten OD1 van de stock.
- Het doel is om een geconcentreerd algeninoculum te maken met $1 \cdot 10^6$ algen/ml (= N2).
- Bereken de ratio N1/N2 hetgeen de verdunningsfactor is van de algensuspensie in de meetcuvet om een optische densiteit OD2 te bekomen die correspondeert met een algendensiteit van $1 \cdot 10^6$ algen/ml.
- Neem een maatkolf van 25 ml (indien verdunningsfactor < 2), of een maatkolf van 50 ml (als verdunningsfactor ≥ 2). Neem een gehomogeniseerd substraat uit de meetcuvet 'Algal stock cell', overeenkomstig de gewenste verdunning in de maatkolf, en leng aan met groeimeidium tot aan de maatstreep, sluit af en homogeniseer de algensuspensie.
- Neem een meetcuvet en vul met 25 ml van de nieuwe algenstock, sluit af en schud 10 sec. om vervolgens de OD te meten, nl. OD2. Controleer met de regressievergelijking of deze OD2 het verwachte aantal algen $1 \cdot 10^6$ algen/ml (N2) oplevert.

5.5.3 TESTOPLOSSINGEN VAN WATERMONSTERS

Het watermonster wordt op kamertemperatuur gebracht, en goed gehomogeniseerd door schudden voor gebruik. De testoplossingen worden vers bereid tot maximum 4 uur voor aanvang van de test. De test met milieumonsters wordt steeds uitgevoerd met correctie bij spectrofotometrische analyse van de testoplossingen, parallel aan controle met groeimeidium.

Voor elk van de testoplossingen (en controle met algengroeimeidium) wordt voldoende gemaakt voor de volgende testvolumes, en overeenkomstig worden maatkolven van voldoende volume gebruikt.

- Limiettest: 6 replica's x 25 ml
- Limiettest met correctie: 6 replica's x 25 ml + 1 replica 25 ml (zonder algen) voor correctie
- Verdunningsreeks: 3 replica's x 25 ml/testconditie, en volume watermonster nodig voor reeks van 5 diluties met een verdunningsfactor 2.
- Verdunningsreeks met correctie voor elke dilutie van het watermonster: 3 replica's x 25 ml + 1 replica 25 ml (zonder algen) voor correctie/ test conditie, en volume watermonster nodig voor reeks van 5 diluties met een verdunningsfactor 2.

5.5.3.1 LIMIETTEST VOOR % EFFECT

Het water wordt standaard in een limiettest geëvalueerd als onverdund water (of hoogste mogelijke testconcentratie) in vergelijking met een controle conditie (100% algengroeimeidium). Echter door het toevoegen van nutriënten stockoplossing bij het water (1.3 ml/100 ml), en een geconcentreerd algeninoculum (1ml/100 ml), overeenkomstig de nutriënten concentratie en algen in het algengroeimeidium (= controle), zal de hoogst geteste concentratie water niet helemaal 100% zijn, maar 97.7%. Deze afwijking qua geteste concentratie is beperkt en wordt verwaarloosd, mits de

verhouding toegevoegde nutriënten volume en volume algeninoculum op het totaal volume watermonster steeds overeenkomt met deze in de controle conditie.

De bereiding van testoplossingen met water, en controle met algengroei-medium voor de limiettest met correctie (voor kleur en/of turbiditeit) wordt bij wijze van voorbeeld hierna uitgewerkt⁴.

- Neem 2 maatkolven, elk van 250 ml, markeer C0 (controle) en CW (watermonster)
- Breng 250 ml algengroei-medium in kolf C0 (zie bereiding 5.5.1)
- Breng 200 ml water (100%) in kolf CW, voeg 2.5 ml van nutriëntenstock A, 0.25 ml van nutriëntenstock B, 0.25 ml van nutriëntenstock C en 0.25 ml van nutriëntenstock D, leng aan met watermonster tot aan de maatstreep voor 250ml, sluit af en homogeniseer.
- Neem 50 ml af uit de kolf C0, dit is algengroei-medium voor de 0-calibratie, en markeer als C0-calibratie.
- Neem 50 ml af uit de kolf CW, dit is testoplossing voor de kleur- en turbiditeit correctie, en markeer als CW-correctie.
- In de kolf C0 blijft 200 ml algengroei-medium; hier wordt 2 ml algeninoculum toegevoegd uit de gehomogeniseerde algenstock bereiding (zie 5.5.1) zodat de eindconcentratie algen in C0 overeenkomt met $1 \cdot 10^4$ algen/ml, sluit de kolf af en schud voor een homogene algensuspensie.
- In de kolf CW blijft 200 ml water met nutriënten; hier wordt 2 ml algeninoculum toegevoegd uit de gehomogeniseerde algenstock bereiding (zie 5.5.1) zodat de eindconcentratie algen in CW overeenkomt met $1 \cdot 10^4$ algen/ml, sluit de kolf af en schud voor een homogene algensuspensie. Deze verdunning resulteert in een hoogste testconcentratie van het watermonster van 97.7%.

5.5.3.2 TEST MET EEN VERDUNNINGSREEKS VOOR EC₅₀ BEPALING

Indien van toepassing (bijv. volgens bijzondere voorwaarde in vergunning van het bedrijf) moet het water in een verdunningsreeks getest worden om een EC₅₀ waarde te bepalen. Hiervoor wordt het water verdund met algengroei-medium (zie 5.5.1), voor minstens 5 concentraties met een verdunningsfactor 2, van het water in vergelijking met controle (0% water in algengroei-medium). Men zal analoog te werk gaan als bij de limiettest door eerst het onverdunde water aan te vullen met nutriënten, overeenkomstig het groeimedum voor de controle. Pas daarna zal de 1:1 verdunning van het watermonster met groeimedum gebeuren, en wordt algeninoculum toegevoegd bij elke testconcentratie van het watermonster, zoals bij de controle.

Uitzonderlijk is een range finding test nodig, bijv. indien zeer hoge toxiciteit verwacht wordt. Hierbij wordt een verdunningsreeks opgezet met hoge verdunningsfactor, bijv. 10 om de 0-100% effectrange te vinden. Uit deze test wordt de verfijnde testrange (met lagere verdunningsfactor, minimum 2) afgeleid met concentraties van water waarbij minstens 1 punt met 100% effect en een punt met een effect $\leq 10\%$, en met indien mogelijk meerdere punten op de helling van de concentratie-effect curve om een nauwkeurige EC₅₀ waarde te berekenen. Indien er weinig tot geen effect is ($< 50\%$ acute toxiciteit), kan er geen EC₅₀ waarde bepaald worden.

Een voorbeeld van bereiding van testoplossingen voor een dilutiereeks is terug te vinden in de handleiding bij de AlgaltokitF.

⁴ Rekenvoorbeeld voor 250 ml kolven zodat er ruimere marge is op volume testoplossing (inclusief correctie), maar overeenkomstig aan te passen voor 200 ml startvolume.

5.5.4 BLOOTSTELLING

5.5.4.1 BLOOTSTELLINGSCONDIETES

- Duur: (72 ± 2) u
- Licht-donker cyclus: continue belichting, 3000-4000 lux aan onderzijde van cuvetten, 10000 lux in geval van zijdelingse belichting.
- Dagelijks moeten de algen in de cuvetten manueel geresuspendeerd worden door schudden met omkeren (zie instructies handleiding).
- Temperatuur van testoplossingen: $(23 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ tijdens blootstelling, een temperatuur-gecontroleerde ruimte te gebruiken voor de test. Via een temperatuurlogger in een testbeker (25 ml test vloeistof) naast de testrecipiënten wordt de temperatuur opgevolgd gedurende de blootstellingsperiode.
- Testrecipiënt: polystyreen cuvetten, met afdekplaatje zoals voorzien bij AlgaltokitF (alternatieven zijn toegestaan, zie 5.1).
- Testvolume: 25 ml per cuvet (long cell) in de AlgaltokitF.
- Replica's: 6 per testconditie in de limiettest, 3 per conditie in de test met verdunningsreeks. Het aantal replica's voor de controle algengroei en de testcondities van het monster zijn gelijk.

5.5.4.2 TRANSFER TESTOPLOSSINGEN NAAR DE TESTRECIPIËNTEN (LONG CELL CUVETTEN)

- Neem het nodige aantal cuvetten (inclusief afdekplaatje), 18 per verzamelbakje, de plastic strip en rubbers om samen te houden. Markeer de cuvetten voor de verschillende testcondities, met nummering voor de replica cuvetten/conditie.
- Neem de bereide testoplossingen met algen C0, en CW, homogeniseer de oplossingen door schudden en vul de cuvetten telkens met 25 ml, met voor een limiettest 6 cuvetten per conditie (3 bij een dilutiereeks). Dus totaal 12 cuvetten voor een limiettest, en 18 cuvetten voor een dilutiereeks (3 x 5 concentraties watermonster + 3 x controle).
- Neem de 50 ml oplossingen (zonder algen) van controle (C0-calibratie), en van watermonster (voor CW-correctie). Indien men met een dilutiereeks werkt, zal er voor elke concentratie van watermonster een oplossing zijn voor correctie. Vul voor elk van de condities 1 cuvet met 25 ml algengroei-medium (C0-calibratie) of van de testoplossing (CW-correctie).
- Al de gevulde cuvetten worden afgedekt en at random verdeeld voor testcondities, en replica's over verschillende verzamelbakjes. Plaats de cuvetten volgens de pijl op de zijwand in dezelfde richting. Voor de incubatie worden de afdekplaatjes voor elk van de cuvetten deels opgelicht, en men schuift aan de halfopen zijde de plastic strip tussen de cuvetten en het afdekplaatje zodat er open ruimte is voor gasuitwisseling zodat pH variatie beperkt blijft.
- In lijn met ISO 8692, wordt er uitgegaan van een nominale algendensiteit bij start van de test (zoals kan bepaald worden op basis van OD2 meting en 1:100 verdunning), en die tussen $0.5 - 1.5 \cdot 10^4$ algen/ml moet liggen. Er wordt geen spectrofotometrische meting uitgevoerd op $T=0$.
- De verzamelbakjes worden nu voor (72 ± 2) u incubatie, bij de juiste temperatuur en lichtcondities in de incubator of gethermostatiseerde kamer gezet. De cuvetten worden dagelijks manueel geschud om de algensuspensie te homogeniseren.
- De resterende testoplossingen in de maatkolven C0 en CW, met algeninoculum worden gebruikt voor meting van pH en geleidbaarheid bij start van de test in alle testoplossingen voor rapportage bij de limiettest of test met verdunningsreeks.

5.5.5 EVALUATIE VAN TEST

- Zowel in de limiettest als bij een verdunningsreeks wordt de optische densiteit enkel na (72 ± 2) u afgelezen.
- Zet de spectrofotometer op en neem de verzamelbakjes met cuvetten uit de incubator.

- Zorg ervoor bij de meting dat de cuvetten steeds in de goede richting (pijl naar links) in de meetcel staan.
- Begin met een 0-calibratie met de cuvet met algengroei-medium (zonder algen).
- Schud elk van de controle cuvetten gedurende 10 sec. en meet binnen 10 sec. de OD voor elk van de replica's van de controlegroep en registreer op laboformulier.
- Neem de cuvet voor CW-correctie (hoogste concentratie watermonster zonder algen), **registreer het gemeten achtergrond signaal**, en doe vervolgens een 0-calibratie. Schud vervolgens de replica's van de corresponderende testoplossing watermonster met algen, en meet na ongeveer 10 sec. op de spectrofotometer. Indien een dilutiereeks getest wordt, **meet voor elke concentratie eerst de cuvet zonder algen, noteer het gemeten signaal**, en doe per dilutie vervolgens de 0-calibratie met de testoplossing zonder algen, en vervolg met de replica cuvetten met algen voor de corresponderende concentratie van testoplossing. Registreer al de gemeten OD-waarden. **Bij hoge signalen van de achtergrond (> 30% van het signaal met algen) kan dit interfereren met de spectrofotometrische metingen van de algengroei, en wordt als afwijking gemeld. In overleg met de klant zou men de test kunnen uitvoeren op een gecentrifugeerd monster indien deeltjes significant bijdragen tot het signaal.**
- De testvloeistof van de replica cuvetten met algen wordt gepoold voor meting van de pH **en de geleidbaarheid**. De meting **van beide parameters** wordt uitgevoerd **en gerapporteerd** voor de controle conditie en alle testcondities van het watermonster.
- De temperatuurregistraties tijdens de incubatieperiode worden afgelezen voor min. en max. temperatuur, die gerapporteerd wordt.

5.5.6 BEREKENING VAN RESULTAAT VOOR GROEI-INHIBITIE NA 72 U

5.5.6.1 BEREKENING BIOMASSA OPBRENGST EN GROEISNELHEID

Er worden 2 eindpunten berekend op basis van evaluaties: opbrengst (biomassa) en groeisnelheid, maar enkel de parameter groeisnelheid wordt voor beoordeling van watermonster gerapporteerd. De berekende toename van biomassa gedurende (72 ± 2) u wordt gehanteerd als geldigheids criterium voor de test.

Microbiotests beschikt over een rekentemplate beschikbaar voor verwerking van data op basis van uitgevoerde OD-metingen, en de regressievergelijking voor relatie OD versus aantal algen voor de gebruikte algenbatch. De berekeningen zijn gebaseerd op volgende formules.

Groeisnelheid

De gemiddelde specifieke groeisnelheid voor een specifieke periode is de logaritmische toename in biomassa: voor elke replica van respectievelijk de controlegroep, en een concentratie van watermonster wordt deze specifieke groeisnelheid μ berekend als volgt:

$$\mu_{i-j} = (\ln BE_j - \ln BE_i) / (t_j - t_i)$$

Waarin: BE = biomassa equivalent
 t = tijdstip van de meting (t in dagen)
 i-j = tijdsperiode waarbinnen de specifieke snelheid berekend wordt

De specifieke groeisnelheid per replica wordt gemeten voor de totale periode $(0 (=i) - 3 (=j)$ dagen).

Bereken voor de replica's van de controlegroep, een gemiddelde groeisnelheid, μ_c .

Bepaal vervolgens voor elke replica van de testoplossingen met watermonsters de procentuele inhibitie van groeisnelheid als functie van de gemiddelde groeisnelheid van de controle, μ_c , met volgende formule:

$$\%I_{ra} = (\mu_c - \mu_a) \times 100 / \mu_c$$

Waarin:	μ_c	= gemiddelde van specifieke groeisnelheid in controle
	μ_a	= specifieke groeisnelheid in replica van concentratie a
	I_{ra}	= % inhibitie van de groeisnelheid voor replica van concentratie a

Bereken voor de replica's van elke testconditie van het watermonster, een gemiddelde % groeisnelheid, I_{ra} .

Opbrengst biomassa

De opbrengst van biomassa, Y voor elke replica van de controlegroep en testoplossing wordt berekend als het verschil tussen biomassa op 72 u en op t=0 u. In laatste geval wordt de nominale concentraties voor biomassa gebruikt. De OD-waarden (biomassa equivalent) worden omgerekend in aantal algen.

$$Y_{i-j} = BE_i - BE_j$$

Waarin:	BE	= biomassa equivalent
	i-j	= tijdsperiode, met 0 (=i) – 3 (=j) dagen.

Een gemiddelde biomassa opbrengst wordt berekend voor de controlegroep Y_c , en de toename van biomassa in elke replica van de testoplossingen (Y_a) wordt uitgedrukt als % van het gemiddelde van de controlegroep via volgende formule:

$$\%I_{ba} = (Y_c - Y_a) \times 100 / Y_c$$

Waarin:	Y_c	= gemiddelde van biomassa toename in controle
	Y_a	= biomassa toename in replica a van testoplossing a
	$\%I_{ba}$	= % inhibitie van de biomassa voor replica van concentratie a

Bereken voor de replica's van elke testconditie van het watermonster, een gemiddelde procentuele biomassa I_{ba} , relatief t.o.v. controlegroep.

5.5.6.2 LIMIETTEST VOOR % INHIBITIE GROEISNELHEID

De aflezing van OD op (72 ± 2) u (voor elke van de replica's van de hoogste concentratie van watermonster), met omrekening naar aantal algen resulteert in een groeisnelheid over 3 dagen in vergelijking met de groeisnelheid voor de controle replica's. De inhibitie van groeisnelheid wordt uitgedrukt als gemiddelde van inhibitie van groeisnelheid voor de individuele replica's, relatief ten opzichte van de gemiddelde groeisnelheid van controlegroep.

Rapportage van het % effect in de limiettest is dus het gemiddelde van de % inhibitie van groeisnelheid in de hoogste concentratie van het watermonster.

5.5.6.3 TEST MET EEN VERDUNNINGSREEKS VOOR EC_{50} BEPALING

- Per replica van elke concentratie watermonster en controle wordt de groeisnelheid over periode van (72 ± 2) u berekend.
- De gemiddelde groeisnelheid van de controlegroep wordt berekend op basis van groeisnelheid van alle controle replica's.
- Het % inhibitie van de groeisnelheid, als gemiddelde van de replica's per testconcentratie van het watermonster in de verdunningsreeks, wordt uitgedrukt als functie van de gemiddelde

groeisnelheid in de controlegroep. Dit resulteert in een % effect voor elke dilutie van watermonster.

- De resultaten van % effect (Y-as) voor inhibitie algengroei worden grafisch voorgesteld als functie van de concentratie (% verdunning) van het water (X-as). Mits een goed concentratie-effect verband kan een E_rC_{50} waarde berekend worden voor de inhibitie van groeisnelheid.
- Een E_rC_{50} waarde kan afgeleid of berekend worden op verschillende manieren (grafische interpolatie of statistische methoden, als probit analyse). Indien twee opeenvolgende concentraties met een onderlinge concentratieverhouding van 2 respectievelijk 0 en 100% effect veroorzaken, is het voldoende de E_rC_{50} te situeren tussen deze beide concentraties.

5.5.7 KWALITEITSCONTROLE

5.5.7.1 EERSTELIJNSCONTROLE

Beslissingscriterium voor geldigheid van de test:

- De toename van biomassa in de controle gedurende (72 ± 2) u moet minstens een factor 16 zijn.
- De variatie van de groeisnelheid tussen de controle replica's over de periode van (72 ± 2) u mag niet groter zijn dan 7% ($n=6$, limiettest), en niet groter dan 10% ($n=3$, test verdunningsreeks).
- De pH in de controle conditie mag maximum 1.5 pH eenheid verschillen tussen begin en einde van de test.

Deze waarden worden bijgehouden in limietkaarten.

Herkomst en kwaliteit van testorganismen:

- Bij het gebruik van algenbeads uit de AlgaltoxkitF wordt steeds het batchnummer op het laboformulier vermeld. De gegevens over de gevoeligheid van elke gebruikte batch in de vorm van een E_rC_{50} en E_bC_{50} voor referentiestof, uitgevoerd door Microbiotests worden bijgehouden in een databestand.
- Bij gebruik van algen uit een continue labocultuur is een logboek ter beschikking om het onderhoud met de aankoop van algen met identificatie (bijv. bij UK, Culture Collection of Algae and Protozoa, <https://www.ccap.ac.uk/>), het gebruikte groeimedium, passages en condities van onderhoud op te volgen.

5.5.7.2 TWEEDELIJNSCONTROLE

- De methode toegepast in het labo, hetzij vertrekkende van algenbeads, hetzij met algen uit continue cultuur, wordt op de hieronder vermelde tijdstippen uitgevoerd met een positieve controle (Kaliumbichromaat) waarvoor de E_rC_{50} bepaald wordt na 72 u voor een dilutiereeks van 1.8 tot 0.18 mg/l (voor details zie handleiding AlgaltoxkitF).
 - De E_rC_{50} wordt geregistreerd in een statistische controlekaart, naast deze van de corresponderende batch voor de AlgaltoxkitF, indien van toepassing.
 - De minimale frequentie voor een test met positieve controle is als volgt:
 - Bij wekelijkse uitvoering van de test: driemaandelijks positieve controle testen.
 - Bij maandelijks uitvoering: zesmaandelijks een positieve controle test.
 - Bovendien zal ieder van de betrokken uitvoerders minstens 1 maal per jaar een test met positieve controle uitvoeren.
- Het laboratorium is verplicht om minstens 1x/maand, in iedere maand waarin minstens één test uitgevoerd wordt, een test in parallel op te zetten van een verdunningsreeks van enerzijds het ruwe monster, en anderzijds het monster met een spike van 1 concentratie van steeds eenzelfde referentiestof (bijv. deze die in ISO ringtesten worden gebruikt):

- o Men kiest een willekeurig monster⁵ dat bij aankomst en na controle van de randvoorwaarden in 2 deelstalen wordt verdeeld.
- o De spike wordt gedoseerd aan steeds dezelfde concentratie die het 50% effect benadert. Voor de bereiding van de spike moet de verdunning vanuit een stockoplossing in het monster worden toegevoegd aan maximum 5% v/v of lager.
- o De resultaten als % inhibitie bij elke concentratie van het milieumonster, en van het milieumonster met spike worden bijgehouden op een controlekaart en zullen gebruikt worden voor het bepalen van de reproduceerbaarheid van de methode.

5.5.7.3 DERDELIJNSCONTROLE

Minstens 1x per jaar deelnemen aan een externe ringtest, indien georganiseerd (bijv. Aquacheck).

5.5.7.4 OPVOLGING VAN AFWIJINGEN

Indien de ErC_{50} resultaten van de positieve controle niet voldoen aan de statistische grenzen voor algen gebruikt uit eigen kweek, of de door MicroBioTests aangegeven grenzen op de specificatie sheet van de beads, of als één of meer van de geldigheidscriteria voor de controle niet voldoen, dan dient een analyse van de oorzaak en reikwijdte uitgevoerd te worden. Indien hieruit blijkt dat bepaalde resultaten onbetrouwbaar zijn mogen deze niet gerapporteerd worden en dient een nieuwe bemonstering te worden uitgevoerd van de geteste watermonsters. Indien van toepassing dient ook de impact op eerder gerapporteerde resultaten te worden nagegaan.

5.5.8 RAPPORTERING

Het testrapport bevat:

- De identificatie van het monster, gegevens over monsternamen, datum van testuitvoering met monster, resultaten van meting van al de randvoorwaarden en aanpassingen, indien van toepassing.
- Verwijzing naar de betreffende WAC-methode voor ecotoxiciteit en WAC-methode voor bepaling van fysicochemische parameters. Gegevens over het testorganisme (naam, herkomst, batch), met motivatie voor keuze van testorganisme a.d.h.v. gemeten randvoorwaarde en type test (limiet, of verdunningsreeks).
- Resultaten:
 - o Fysicochemische parameters (pH en geleidbaarheid) van testoplossingen en controle op T=0 en T=72u
 - o % effect voor inhibitie van groeisnelheid na (72 ± 2) u in controle en watermonster (limiettest) of
 - o ErC_{50} , met methode van berekening, voor inhibitie van groeisnelheid na (72 ± 2) u bij verdunningsreeks van watermonster, met % effect als inhibitie van de groeisnelheid bij al de ~~in-de-hoogst~~ geteste concentraties in tabel samen te vatten (een grafiek voor concentratie- effect op 72u is optioneel).
- Opmerkingen en afwijkingen.

⁵ Indien voorkennis, dan kiest men bij voorkeur monsters die geen tot lage acute toxiciteit hebben ($EC_{50} < 50\%$).

6 GROEI-INHIBITIE TEST MET DE ZOUTWATERALG, PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM

6.1 INLEIDING

De uitvoering van de groei-inhibitietest voor de zoutwatalg is gebaseerd op de internationale richtlijnen, ISO 10253 (2016).

Voor de uitvoering van deze test zal men gebruik maken van een commerciële kit, de AlgtoxkitM (<https://www.microbiotests.com/>) met de zoutwatalg of kiezelwier soort, *Phaeodactylum tricornutum*. Stocks voor bereiding van synthetisch zoutwater, en stocks van nutriënten voor bereiding van zoutwatalgen medium (ook dilutie medium), test- en meetrecipiënt en algen zijn aanwezig in de kit, of kunnen afzonderlijk aangekocht worden. De algen worden aangeboden als een geconcentreerd inoculum, waarbij de algen geïmmobiliseerd zijn in een inerte matrix en tot 6 maanden in de koelkast (5 ± 3)°C bewaard kunnen blijven. Bij de testkit worden spectrofotometrische cuvetten met een weglengte van 10 cm aangeboden, met een afdekplaat, die tegelijk als testrecipiënt en meetcel fungeren.

De beschrijving in deze WAC-procedure is gebaseerd op uitvoering met de AlgtoxkitM.

Qua uitvoering zijn er evenwel een aantal varianten qua meetmethode, testrecipiënten, startcultuur van algen mogelijk, mits aan bepaalde voorwaarden is voldaan.

- Voor deze test is het ook toegestaan gebruik te maken van algen uit een continue cultuur in het labo, mits deze gezond is door wekelijkse passage op een rijk algenmedium. De algencultuur wordt onderhouden in steriele 250 ml glazen erlenmeyers met luchtdoorlaatbare stoppen in temperatuur- en licht gecontroleerde omstandigheden. Een precultuur wordt gemaakt 2-4 dagen voor start van de toxiciteitstest (specificaties: zie BIJLAGE A).
- De bereiding van zoutwatalgengroei-medium met nutriënten (en dilutie medium) is ook mogelijk vertrekkende van reagentia van analytische kwaliteit. Een werkwijze voor de bereiding en de samenstelling van het medium is te vinden in BIJLAGE C.
- De biomassa of concentratie van algen wordt klassiek bepaald met een deeltjes teller (voor sferische deeltjes in range 2.5 - 25 µm), of via microscopische evaluatie met telkamer. Alternatieve meetmethoden, zoals fluorescentie (excitatie 465 nm, emissie 670 nm) of spectrometrie (670 nm) zijn indirecte methoden die mits voldoende gevoelig en mits een correlatie tussen het signaal en algenconcentratie is aangetoond, ook gebruikt kunnen worden om groei te meten als biomassa equivalent. De AlgtoxkitM meet biomassa via spectrofotometrische analyse, die voldoende gevoelig is door het gebruik van meetcuvetten met een weglengte van 10 cm. Verder wordt er bij elke testkit en overeenkomstige batch van algen een werkblad geleverd met de correlatie tussen het OD-sigitaal voor spectrometrie met de 10 cm cuvetten en het aantal algen. De regressievergelijking wordt gebruikt bij de berekening van de resultaten om het gemeten OD-sigitaal uit te drukken als aantal algen/ml.
- De klassieke test beschreven onder ISO 10253 (2016), maakt gebruik van steriele, glazen erlenmeyers (bijv. 250 ml) met luchtdoorlaatbare stoppen als testrecipiënt. Gelijkaardig materiaal, als steriele wegwerp celcultuurflessen zijn een valabel alternatief alsook multiwell platen of de 10 cm cuvetten in de AlgtoxkitM. Het materiaal en de geometrie van de testrecipiënten moet zodanig zijn dat uitwisseling van gassen naar de lucht door groei van algen mogelijk is, terwijl verlies en evaporatie van potentieel toxische stoffen vermeden wordt (zie ook Annex B in ISO 10253). De gekozen testrecipiënten moeten zodanig zijn dat aan de geldigheidscriteria voor de test met algen voldaan wordt (zie 6.5.7.1).

6.2 APPARATUUR EN MATERIAAL

- Thermometer en logger voor registratie min. en max. temperatuur
- pH-meter voor meting conform WAC/III/A/005
- Geleidbaarheidsmeter voor meting geleidbaarheid conform WAC/III/A/004
- Materiaal en apparatuur voor de bepaling van ammonium en hardheid.
- Analytische balans, aflezing tot 0.1 mg.
- Algenincubator, of klimaatkamer met lichtbron, instelbare temperatuur (20 ± 2)°C en schudtoestel (tenzij de algen minstens dagelijks geresuspendeerd worden via manueel schudden zoals van toepassing bij de AlgaltokitF).
- Lichtbron, 3000-4000 Lux voor onderlangse verlichting, 10000 Lux voor zijdelingse verlichting.
- Lux meter
- Vortex
- Pipetten en toebehoren.
- Standaard labo glasmateriaal: maatkolven, maatcilinders voor bereiding van testoplossingen en verdunningen.
- Recipiënten voor meting van fysicochemische parameters.
- Tube met algeninoculum van zoutwateralg, *Phaeodactylum tricornutum* (zie AlgaltokitM), met een specificatie sheet met batch nummer van het inoculum, houdbaarheidsdatum, E_bC_{50} & E_rC_{50} waarden van Kaliumbichromaat voor de batch, en een sheet met regressievergelijking optische densiteit (OD) versus aantal algen (N) voor de batch.
- Polystyreen long cells of cuvetten (10 cm), met afdekplaatje, geplaatst in verzamelbak te gebruiken als testrecipiënten (zie AlgaltokitM), en 2 polystyreen long cells, met afdekplaatje voor 0-calibratie van spectrofotometer, en cuvet voor opzetten van precultuur.
- Spectrofotometer, met meetcel geschikt voor cuvetten van 10 cm weglengte⁶.

6.3 REAGENTIA EN OPLOSSINGEN

- Gedemineraliseerd water ($< 10 \mu\text{S}/\text{cm}$).
- 7 flesjes met geconcentreerde zoutoplossingen voor het synthetisch zoutwater, en 3 flesjes met geconcentreerde stocks voor nutriënten (zie AlgaltokitM) of de nodige zouten van analytische kwaliteit, zoals in Tabel 6 en Tabel 7 (zie BIJLAGE C) voor de bereiding van zoutwateralgen groeimeedium.
- 1N HCl en 1N NaOH voor pH aanpassing van groeimeedium.
- Kaliumbichromaat, analytische kwaliteit (referentiestof, zie 6.5.7, Kwaliteitscontrole).

6.4 WATERMONSTER

Voor de monsternamen en houdbaarheid wordt verwezen naar respectievelijk WAC/I/A/003, WAC/I/A/004 en WAC/I/A/010.

Bij gebruik voor fysicochemische metingen om de randvoorwaarden te controleren wordt een gehomogeniseerd en representatief deelstaal genomen en op kamertemperatuur gebracht.

Naast de meting van geleidbaarheid voor keuze van soort alg worden andere fysicochemische parameters, zoals pH, hardheid en ammonium gemeten. Voor de meeste van deze parameters zijn

⁶ Andere meetinstrumenten voor fluorescentie of deeltjesteller om aantal algen in testoplossing te kwantificeren zijn mogelijk.

er aanvaardbare ranges gedefinieerd waarbij er geen effect op groei zal optreden (Tabel 3, Postma et al., 2002).

Tabel 3: Randvoorwaarde voor fysicochemische parameters voor zoutwatalg.

Parameter	pH	Zuurstof (mg/l)	Geleidbaarheid ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Hardheid (mg/l CaCO_3)	Ammonium (mg/l NH_4^+ , bij pH 8) ⁷
Zoutwatalg, <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	7 - 9	Niet relevant	~~>22000 -~~ ~~$\geq 46000 - \leq 52000$~~ ~~46000~~	g.d.	< 60

g.d.: geen data

Op basis van de meting van geleidbaarheid in het watermonster > 3300 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (zie **Fout! Verwijzingsbron niet gevonden.**, bij keuze van testorganisme) wordt met de zoutwatalg, *Phaeodactylum tricornutum* getest. Postma et al. (2002) stelt dat een geleidbaarheid < 11500 $\mu\text{S}/\text{cm}$ in watermonsters kan bijdragen tot toxiciteit voor deze zoutwatalg. Naast eerdere preliminaire testen uitgevoerd bij Microbiotests werd via onderzoek (2021) aangetoond dat nadelige effecten op de groei van zoutwatalg in de range van >3300 tot en met 22000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ voorkomen, ondanks de toevoeging van micronutriënten. ~~Er wordt daarom in het watermonster met een geleidbaarheid in de range van >3300 – 22000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ gecorrigeerd door 10 g/l NaCl toe te voegen om tegemoet te komen aan de zouttolerantierange voor de zoutwatalg.~~ Er werd bovendien aangetoond dat toevoeging van NaCl aan een watermonster niet voldoende kan zijn voor optimale groei, maar ook de 6 andere zouten (flesjes 2-7, zie Tabel 4) kunnen bijdragen.

~~Er wordt daarom tegemoet gekomen aan optimale condities voor de zoutwatalg door het ruwe watermonsters na meten van de geleidbaarheid steeds aan te rijken met zowel nutriënten (flesjes A,B,C) en met boorzuur (flesje 7) overeenkomstig het controle medium. Verder wordt, afhankelijk van de geleidbaarheid aangevuld met de verschillende andere zouten (flesjes 2-6) zodat de samenstelling en totale geleidbaarheid van de controle conditie (zoutwatalgengroei-medium) benaderd wordt. Details voor aanpassing van het watermonster voor hetzij de limiettest, of een verdunningsreeks met toevoeging van respectievelijk NaCl en/of 6 geconcentreerde zoutoplossingen in de testoplossing worden verder beschreven (zie 6.5.3), en deze aanpassing dient gerapporteerd te worden.~~

Indien de geleidbaarheid in het watermonsters de bovengrens (52000 $\mu\text{S}/\text{cm}$) overschrijdt, dan zal in een limiettest het watermonster verdund worden ~~met gedemineraliseerd water tot de gemeten geleidbaarheid in de range is van 90-100% van het zoutalgengroei-medium in de test, en dit is dan de hoogst te testen concentratie.~~ Nutriënten en boorzuur worden toegevoegd aan hoeveelheden overeenkomstig het controle medium, en hebben geen significante invloed op de geleidbaarheid. Details voor aanpassing van het watermonster worden verder beschreven (zie 6.5.3), en deze aanpassing dient gerapporteerd te worden.

~~50% als hoogste concentratie (geen correctie met NaCl) om het % effect af te lezen. Bij het testen van een verdunningsreeks van het watermonster zullen er minstens 2 of 3 testcondities in het bereik van een geleidbaarheid $\leq 46000 \mu\text{S}/\text{cm}$ vallen (voldoet aan randvoorwaarde).~~

⁷ Randvoorwaarde ammonium bij pH > 8 kan lager zijn vanwege hogere toxiciteit, maar data ontbreken.

Indien de pH van het watermonster buiten de toegelaten range valt (< 7 of > 9), dan wordt meteen de pH aangepast met zuur of base tot een pH-waarde overeenkomstig die van het zoutwater controle medium ± 0.1 .

De metingen van hardheid en ammonium worden gerapporteerd. In geval van afwijkende randvoorwaarden voor ammonium wordt er niet gecorrigeerd, maar wordt de overschrijding duidelijk vermeld in het rapport, als mogelijke parameter die bijdraagt tot gemeten toxiciteit, naast deze die te wijten zou zijn aan milieugevaarlijke stoffen.

In overleg met de opdrachtgever kan bij afwijking van ammonium alsnog een nieuwe test uitgevoerd worden uitgevoerd door aanpassingen te doen (bijv. beluchten om ammoniak te strippen, of bufferen voor pH om ammonium/ammoniak effect uit te sluiten) gevolgd door meting van ammonium. Dergelijke aanpassingen aan het watermonster moeten gerapporteerd worden als een afwijking op de methode.

Naast de randvoorwaarden zijn er, specifiek voor de algentest, mogelijke interferenties op de meting van algen (meest uitgesproken bij de spectrofotometrische analyse) wanneer er veel zwevend stof is, en wanneer het water gekleurd of troebel is. De methode met de AlgaltoxkitM voorziet bij de spectrofotometrische meting een correctie voor kleur en turbiditeit (zie 6.5.4. Blootstelling), die men steeds moet toepassen bij een test op milieumatrices. De eventuele aanwezigheid van turbiditeit of kleur in het watermonster wordt gerapporteerd.

Indien er echter aanwijzingen zijn dat de methode met correctie geen betrouwbare resultaten geeft dan kan in overleg met de opdrachtgever de test opnieuw worden uitgevoerd nadat men het watermonster gaat behandelen, bijv. centrifugeren om overmaat zwevend stof te verwijderen of filtreren om steriel te maken en groei van micro-organismen die turbiditeit kunnen verhogen tijdens de incubatie uit te sluiten. Bij de rapportering moeten dergelijke behandelingen gemeld worden als een afwijking op de methode.

6.5 WERKWIJZE

6.5.1 ZOUTWATERALGENGROEI-MEDIUM (CONTROLE) OF VERDUNNINGSWATER

Er zijn 7 flesjes in de AlgaltoxkitM met geconcentreerde zoutoplossingen voor de bereiding van synthetisch zeewater (Tabel 4).

Tabel 4: Flesjes met geconcentreerde zoutoplossingen geleverd bij de AlgaltoxkitM

Flesje nr.	Naam zoutoplossing	Concentratie flesje	Concentratie bereid zoutwater groeimedium
1	NaCl	2112 g/l	26.4 g/l
2	KCl	67.2 g/l	840 mg/l
3	CaCl ₂ ·2H ₂ O	133.6 g/l	1670 mg/l
4	MgCl ₂ ·6H ₂ O	368 g/l	4600 mg/l
5	MgSO ₄ ·7H ₂ O	446.4 g/l	5580 mg/l
6	NaHCO ₃	13.6 g/l	170 mg/l
7	H ₃ BO ₃	2.4 g/l	30 mg/l

- Neem een maatkolf van 2 liter, en vul met ongeveer 1500 ml gedemineraliseerd water.
- Neem flesje 1 (NaCl) en breng in de kolf, en schud tot het zout is opgelost.

- Neem flesje 2 (KCl) en voeg toe in de kolf, en schudden tot opgelost is.
- Herhaal dit beurteling voor de andere flesjes, in volgorde van nummering, nl. flesje 3 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), flesje 4 ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), flesje 5 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), flesje 6 (NaHCO_3) en flesje 7 (H_3BO_3).
- Sluit de kolf af en meng door schudden.

Er zijn 3 flesjes met stockoplossingen voor nutriënten in de AlgaltokitM, flesje A, B en C die corresponderen met de samenstelling van stockoplossingen 1, 2 en 3 van nutriënten in het ISO 10253 medium (zie Tabel 7 in BIJLAGE C).

- Neem flesjes A en voeg 30 ml (2x15 ml) toe in de kolf van 2 liter, sluit af en schud.
- Neem flesje B en voeg 1 ml toe in de kolf, sluit af en schud.
- Neem flesje C en voeg 2 ml toe in de kolf
- Leng aan tot 2 liter met gedemineraliseerd water, en schud tot een homogene oplossing.
- Label de kolf, en bewaar overnacht in het donker of doorborrel gedurende 30 min. voor evenwicht instelling.
- Voor gebruik als medium, en na evenwicht instelling wordt de pH gecontroleerd en bijgesteld indien nodig tot $\text{pH } 8.0 \pm 0.2$, gebruik makend van 1N HCl of 1N NaOH.
- Het zoutwateralgengroei-medium kan donker en koel bij $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ bewaard worden gedurende max. 1 maand.

Dit medium wordt zowel gebruikt om de precultuur van de algen op te starten (zie 6.5.2.1), alsook voor verdunningsmedium van watermonster in de test (zie 6.5.3) of als controle conditie in de test.

6.5.2 TESTORGANISMEN

Voor deze test maakt men gebruik van de diatomeeën of kiezelwier soort, *Phaeodactylum tricornutum*. Deze zoutwateralg kan in het labo aanwezig zijn als een continue cultuur, van waaruit voor de test een precultuur wordt gestart (zie BIJLAGE A).

Hierna beschrijven we het gebruik van algen uit de AlgtookitM om een inoculum te bereiden geschikt voor de opzet van een toxiciteitstest, zodat een continue cultuur niet vereist is.

6.5.2.1 PRECULTUUR VAN ZOUTWATERALGEN UIT DE ALGENINOCULUM

- Start een precultuur 3 dagen voor de geplande start van de test.
- Neem een tube met algeninoculum uit de kit, schud krachtig en giet voorzichtig de volledige inhoud in een cuvet (long cell, gemarkeerd preculturing cell).
- Spoel de tube 2x met telkens 7.5 ml zoutwateralgengroei-medium (zie bereiding 6.5.1), en breng dit over in de cuvet.
- Sluit de cuvet met het afdekplaatje, en incubeer bij $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$ in een temperatuur gecontroleerde kamer of incubator, met continu licht (koel, wit fluorescente lampen met 10000 Lux bij zijdelingse belichting of 3000-4000 Lux indien onderlangse belichting).
- Na 3 dagen wordt deze gebruikt voor bereiding van het geconcentreerde algeninoculum (zie 6.5.2.3).

6.5.2.2 METING VAN OPTISCHE DENSITEIT VAN ALGENSUSPENSIE VIA SPECTROMETRIE: AANDACHTSPUNTEN!

Metingen van optische densiteit (OD) zijn de maat voor hoeveelheid algen in suspensie na spectrofotometrische meting bij 670 nm, gebruik makend van de wegwerp cuvetten met weglengte 10 cm (long cells). Voor elke tube algen is er een specificatie sheet met batch nummer, en overeenkomstig een sheet met de regressievergelijking voor de relatie OD en aantal algen. Indien men een andere methode (of toestel) spectrofotometer gebruikt voor het kwantificeren van algen is het nodig om het gemeten signaal (bijv. de OD-meting, of fluorescentiemeting) te controleren met het tellen van de algen, en als nodig een nieuwe regressievergelijking op te stellen.

In belang van de reproduceerbaarheid van OD-metingen zijn er enkele richtlijnen die zeer strikt moeten nageleefd worden:

- De cuvetten moeten steeds in dezelfde richting in de houder van de spectrofotometer geplaatst worden, nl. met de pijlen op de zijwanden van de cuvet wijzend naar links.
- Men doet steeds een 0-calibratie met de spectrofotometer vooraleer te starten met de OD-metingen van algensuspensies. Deze 0-calibratie gebeurt steeds met dezelfde cuvet, gevuld met algengroeimedium. Men herhaalt deze 0-calibratie regelmatig (minstens om de 10 metingen) tijdens langere meetreeksen van algensuspensies.
- De algensuspensies in elk van de cuvetten, goed afgesloten met afdekplaatje worden elk apart gedurende 10 sec. grondig geschud met omkeren (zie foto's in handleiding van de testkit) voor een homogene verdeling van de algen, vlak voordat de cuvet in de spectrofotometer wordt geplaatst.
- De meting van OD gebeurt voor elke cuvet apart na 10 sec. (na het verdwijnen van eventuele luchtbelletjes en/of schuim) en vooraleer de algen terug uitzakken.

6.5.2.3 BEREIDING VAN EEN GECONCENTREERDE ALGENINOCULUM

- Men zet de spectrofotometer op voor meting van algensuspensie bij 670 nm.
- Neem de cuvet met de markering 'calibration long cell' uit de kit, en vul met 25 ml zoutwateralgengroeimedium, en sluit af.
- Plaats de cuvet in de goede richting in de spectrofotometer en doe de 0-calibratie.
- Neem de cuvet (preculturing cell) na 3 dagen incubatie, en schud krachtig om de algensuspensie homogeen te maken.
- Plaats de cuvet in de goede richting in de spectrofotometer en lees OD1 af na ongeveer 10sec.
- Neem de sheet (specifiek voor de algenbatch) voor de grafiek met regressievergelijking OD/N en bereken het aantal algen (N1) overeenkomstig de gemeten OD1 van de stock.
- Het doel is om een geconcentreerd algeninoculum te maken met 1.10^6 algen/ml (= N2).
- Bereken de ratio N1/N2 hetgeen de verdunningsfactor is van de algensuspensie in de meetcuvet om een optische densiteit OD2 te bekomen die correspondeert met een algendensiteit van 1.10^6 algen/ml.
- Neem een maatkolf van 25 ml (indien verdunningsfactor < 2), of een maatkolf van 50 ml (als verdunningsfactor ≥ 2). Neem een gehomogeniseerd substraat uit de cuvet 'preculturing cell', overeenkomstig de gewenste verdunning in de maatkolf, en leng aan met groeimedium tot aan de maatstreep, sluit af en homogeniseer deze algenstock.
- Verwijder de inhoud van de cuvet 'preculturing cell', spoel met medium, en vul deze met 25 ml van de nieuwe algenstock, sluit af en schud 10 sec. om vervolgens de OD te meten, nl. OD2. Controleer met de regressievergelijking of deze OD2 het verwachte aantal algen 1.10^6 algen/ml (N2) oplevert.

6.5.3 TESTOPLOSSINGEN VAN WATERMONSTER

Het water wordt op kamertemperatuur gebracht, en goed gehomogeniseerd door schudden voor gebruik. De testoplossingen met water worden vers bereid tot maximum 4 uur voor aanvang van de test.

Voor elk van de testoplossingen (en controle met algengroeimedium) wordt voldoende gemaakt voor volgende testvolumes, en overeenkomstig maatkolven van voldoende volume gebruikt. Bij het testen van alle milieumatrices, vanwege mogelijke interferenties door kleur of turbiditeit zullen steeds cuvetten met testoplossing voor correctie worden ingezet.

— Limiettest : 3 replica's x 25 ml, voor elk van 3 testcondities (CW_{100%}, CW_{50%}, CW_{90%})

- Limiettest met correctie: **6** 3 replica's x 25 ml **bij de hoogst mogelijke testconcentratie** + 1 replica 25 ml (zonder algen) voor correctie **bij de hoogste testconcentratie**, ~~voor elk van voornoemde 3 testcondities.~~
- ~~Verdunningsreeks: 3 replica's x 25 ml/testconditie, en volume watermonster nodig voor reeks van 5 diluties met een verdunningsfactor 2.~~
- Verdunningsreeks met correctie voor elke dilutie watermonster: 3 replica's x 25 ml + 1 replica 25 ml (zonder algen) voor correctie/ test conditie, dus volume watermonster nodig voor reeks van 5 diluties (testconditie) met een verdunningsfactor 2 **vanaf de hoogst mogelijke testconcentratie.**

6.5.3.1 LIMIETTEST VOOR % EFFECT

Het watermonster wordt standaard in een limiettest geëvalueerd waarbij voor de zoutwatalg de **hoogste mogelijke concentratie** ~~bij 3 testcondities (CW_{100%}, CW_{50%}, CW_{90%})~~ met elk **6** 3 replica's in vergelijking met een controle conditie (100% algengroeimedium) opgezet worden.

We onderscheiden voor de zoutwatalg 2 scenario's: 1) watermonsters met een geleidbaarheid < 52000 µS/cm waarbij door toevoeging van nutriënten, boorzuur en zouten de samenstelling en geleidbaarheid van het zoutalgengroeimedium zo goed mogelijk wordt nagebootst en 2) monsters met een geleidbaarheid > 52000 µS/cm, die eerst verdund worden met gedemineraliseerd water tot de geleidbaarheidsrange van het zoutalgengroeimedium waarna nutriënten en boorzuur worden toegevoegd.

a) Watermonster met geleidbaarheid >3300 - ≤52000 µS/cm

Naast de nutriënten (flesjes A,B,C) wordt ook boorzuur (flesje7) voor optimale groei, overeenkomstig het zoutalgengroeimedium toegevoegd aan elk watermonster. Door het toevoegen van nutriënten stockoplossing bij het ruwe watermonster (1.65 ml/100 ml), **boorzuur (1.2 ml/100 ml)** en nadien geconcentreerd algeninoculum (1ml/100 ml), zal de hoogst geteste concentratie water niet helemaal 100%.

Daarnaast zijn ook zouten belangrijk, zodat zowel de samenstelling als de geleidbaarheid van het monster in een zelfde range is als deze van het zoutalgengroeimedium. Omdat toevoeging van zouten (flesjes 2-6), in tegenstelling tot de nutriënten, significant bijdragen tot een verhoging van de geleidbaarheid hebben we afhankelijk van de range van geleidbaarheid 2 werkwijzes:

- watermonsters met een geleidbaarheid in de range van >3300 – 39000 µS/cm:

In deze situatie kunnen de diverse zouten (flesjes 2-6) toegevoegd zonder dat de geleidbaarheid van het controle medium wordt overschreden. Deze verdere toevoeging (1.2 ml/100 ml) leidt tot een hoogst geteste concentratie van 90.15%. in het milieumonster CW (als men ook rekening houdt met eerder toegevoegde nutriënten, boorzuur, en de later toe te voegen algensuspensie van 1ml/100ml).

De geleidbaarheid in het aangepaste monster en het groeimedium wordt nu gemeten.

Verdere correctie van de geleidbaarheid van het monster, overeenkomstig de gemeten geleidbaarheid van het controle medium moet gebeuren met toevoeging van vast NaCl aan het monster, overeenkomstig het verschil in gemeten geleidbaarheid via volgende formule, en rekening houdend met het testvolume⁸:

$$\text{Saliniteit (g/L) of hoeveelheid vast NaCl (g/l) toevoegen} = \frac{\text{geleidbaarheid (cm)} - 1,0878}{1000} \times 0,4665$$

⁸ Een rekentemplate kan bij VITO opgevraagd worden.

Men controleert de geleidbaarheid van het monster na correctie met toevoeging van NaCl, en deze moet in de range van 90-100% van het zoutalgengroei-medium zijn. Zoniet is een bijkomende aanpassing of nieuwe bereiding nodig.

- watermonsters met een geleidbaarheid $> 39000 \leq 52000 \mu\text{S}/\text{cm}$:

In deze situatie kiest men ervoor geen extra zouten (flesjes 2-6) toe te voegen, vermits dit zou leiden tot overschrijding van de geleidbaarheid leiden t.o.v. het controle-medium. Voor monsters met een geleidbaarheid $> 39000 \mu\text{S}/\text{cm}$, waar reeds nutriënten en boorzuur werden toegevoegd, zal de aanpassing van geleidbaarheid uitsluitend met vast NaCl gebeuren volgens voorgaande formule.

De toevoeging van enkel vast NaCl geeft geen verdere verdunning, zodat rekening houdt met eerder toegevoegde nutriënten, boorzuur, en de later toe te voegen algensuspensie van 1ml/100ml) de hoogste testconcentratie van het monster overeenkomstig met 96.15%.

Na toevoegen van het vast NaCl controleert men steeds de geleidbaarheid voor rapportage bij de hoogste testconcentratie, en deze geleidbaarheid zou in de range van 90-100% van het zoutalgengroei-medium moeten zijn. Zoniet is een bijkomende aanpassing of nieuwe bereiding nodig.

Men rapporteert steeds de gevolgde werkwijze qua aanpassing van het watermonster (nutriënten, boorzuur, al of niet zouten, en de correctie met vast NaCl) met het resultaat van de gemeten geleidbaarheid in het monster, voor en na de aanpassingen, ter vergelijking met het zoutalgengroei-medium.

b) Watermonster met geleidbaarheid $> 52000 \mu\text{S}/\text{cm}$

Watermonsters met een hoge geleidbaarheid ($> 52000 \mu\text{S}/\text{cm}$) moeten verdund worden met gedemineraliseerd water tot de gemeten geleidbaarheid in de range is van 90-100% van de gemeten geleidbaarheid van het zoutalgengroei-medium in de test. Vervolgens wordt het verdunde watermonster aangereikt met nutriënten (flesjes A,B,C) en boorzuur (flesje 7) aan een hoeveelheid/testvolume overeenkomstig deze in het algengroei-medium. Op deze manier zal de hoogste testconcentratie van het monster zo hoog mogelijk zijn, en de samenstelling en geleidbaarheid van het zoutalgengroei-medium benaderen. Voor de berekening van de E_{C50} dient men, wanneer de verdunning van het afvalwater met gedemineraliseerd water meer dan 10% bedraagt, dit in rekening te brengen. Ook voor de limiettest wordt voor de hoogste testconcentratie het % monster berekend bij rapportage van het % effect.

De aanpassing van het watermonster, als % verdunning in de hoogste testconcentratie en toevoegingen wordt gerapporteerd, alsook het meetresultaat van de geleidbaarheid voor en na de aanpassing, ter vergelijking met het zoutalgengroei-medium.

~~Deze afwijking (97.35%) qua geteste concentratie watermonster is beperkt en wordt verwaarloosd, mits de verhouding toegevoegde nutriënten volume en volume algeninoculum op het totaal volume watermonster overeenkomt met deze in de controle conditie. Deze testconditie wordt hierna gedefinieerd als $CW_{100\%}$. Om enerzijds te voldoen aan de randvoorwaarden geleidbaarheid, en anderzijds de aanwezigheid van verschillende zouten nodig voor optimale groei te garanderen worden er 2 bijkomende testcondities voorzien. Het protocol voorziet toevoeging van NaCl (vast) indien het ruwe watermonster een geleidbaarheid heeft in de range $> 3300 - \leq 22000 \mu\text{S}/\text{cm}$. Toevoeging van NaCl is niet nodig wanneer de geleidbaarheid $> 22000 \mu\text{S}/\text{cm}$ is. Voor beide scenarios van geleidbaarheid wordt een protocol beschreven.~~

~~De bereiding van 3 testoplossingen met watermonster (100% – 50 % en zoutcorrectie 90%), en controle met algengroei-medium voor de limiettest wordt bij wijze van voorbeeld hierna uitgewerkt. Er worden voor elke testconditie 3 replica's voorzien. In geval van correctie voor kleur en/of turbiditeit zullen de testvolumes en metingen overeenkomstig moeten aangepast worden.~~

Watermonster met geleidbaarheid $>3300 - \leq 22000 \mu\text{S}/\text{cm}$ Testcondities:

- Neem 1 maatkolf, van 100 ml, markeer C0 (controle)
- Neem 1 maatkolf van 200 ml, markeer CW_{100%} (= watermonster 100%)
- Neem 1 maatkolf van 200 ml, markeer CW_{50%} (= watermonster 50%)
- Neem 1 maatkolf van 100 ml, markeer CW_{90%} (= watermonster 100% met zoutcorrectie door NaCl, en 6 zoutoplossingen om tegemoet te komen aan de groeicondities van de zoutwateralg):

Werkwijze:

- Breng 100 ml zoutwateralgengroei-medium in kolf C0
- Breng 150 ml watermonster in kolf CW_{100%}
- Voeg nu de nodige nutriënten toe bij kolf CW_{100%}: 3 ml van nutriëntenstock A, 0.100 ml van nutriëntenstock B en 0.200 ml van nutriëntenstock C, leng aan met watermonster tot aan de maatstreep voor 200 ml, sluit af en homogeniseer
- Breng 100 ml zoutwateralgengroei-medium in kolf CW_{50%}
- Neem 100 ml af uit de kolf CW_{100%} en voeg deze toe aan kolf CW_{50%}, sluit af en homogeniseer
- Verwijder vervolgens 100 ml testoplossing uit CW_{50%}
- Breng 75 ml watermonster in kolf CW_{90%}
- Weeg 1 g NaCl af. Voeg deze hoeveelheid toe aan de kolf CW_{90%}, sluit af en meng door krachtig schudden totdat al het zout is opgelost.
- Voeg nu telkens 1.200 ml van de 6 geconcentreerde zoutoplossingen, flesjes 2 t.e.m. 7 toe aan kolf CW_{90%} (volgens Tabel 4: geconcentreerde zoutoplossingen in Algaltoxkit M)
- Voeg vervolgens de nodige nutriënten toe bij kolf CW_{90%}: 1.5 ml van nutriëntenstock A, 0.050 ml van nutriëntenstock B en 0.100 ml van nutriëntenstock C, leng aan met watermonster tot aan de maatstreep voor 100 ml, sluit af en homogeniseer
- Neem 25 ml uit de kolf C0, dit is algengroei-medium voor de 0-calibratie, en markeer als C0-calibratie
- Neem 25 ml uit de kolf CW_{100%}, dit is de testoplossing voor de 0-calibratie, en markeer als CW_{100%}-calibratie
- Neem 25 ml uit de kolf CW_{50%}, dit is de testoplossing voor de 0-calibratie, en markeer als CW_{50%}-calibratie
- Neem 25 ml uit de kolf CW_{90%}, dit is de testoplossing voor de 0-calibratie, en markeer als CW_{90%}-calibratie
- In de kolf C0 blijft 75 ml algengroei-medium, hier wordt 0.75 ml algeninoculum toegevoegd uit de gehomogeniseerde algenstock bereiding (zie 6.5.2.3), zodat de eindconcentratie algen in C0 overeenkomt met $1 \cdot 10^4$ algen/ml, sluit de kolf af en schud voor een homogene algensuspensie.
- In de kolf CW_{100%} blijft 75 ml watermonster met nutriënten, hier wordt ook 0.75 ml algeninoculum toegevoegd uit de gehomogeniseerde algenstock bereiding, zodat de eindconcentratie algen in CW_{100%} overeenkomt met $1 \cdot 10^4$ algen/ml, sluit de kolf af en schud voor een homogene algensuspensie. Dit resulteert in een hoogste testconcentratie van het watermonster van 97.35%.
- In de kolf CW_{50%} blijft 75 ml watermonster met nutriënten, hier wordt ook 0.75 ml algeninoculum toegevoegd uit de gehomogeniseerde algenstock bereiding, zodat de eindconcentratie algen in CW_{50%} overeenkomt met $1 \cdot 10^4$ algen/ml, sluit de kolf af en schud voor een homogene algensuspensie.

- In de kolf $CW_{90\%}$ blijft 75 ml watermonster met nutriënten, hier wordt ook 0.75 ml algeninoculum toegevoegd uit de gehomogeniseerde algenstock bereiding, zodat de eindconcentratie algen in $CW_{90\%}$ overeenkomt met 1.10^4 algen/ml, sluit de kolf af en schud voor een homogene algensuspensie. Dit resulteert in een hoogste testconcentratie van het watermonster van 90.15%.

Watermonster met geleidbaarheid >22000 $\mu S/cm$

Testcondities:

- Neem 1 maatkolf, van 100 ml, markeer C0 (controle)
- Neem 1 maatkolf van 200 ml, markeer $CW_{100\%}$ (= watermonster 100%)
- Neem 1 maatkolf van 200 ml, markeer $CW_{50\%}$ (= watermonster 50%)
- Neem 1 maatkolf van 100 ml, markeer $CW_{90\%}$ (= watermonster 100% met 6 zoutoplossingen om tegemoet te komen aan de groeicondities van de zoutwateralg)

Werkwijze:

- Breng 100 ml zoutwateralgengroeimeidium in kolf C0
- Breng 150 ml watermonster in kolf $CW_{100\%}$
- Voeg nu de nodige nutriënten toe bij kolf $CW_{100\%} \div 3$ ml van nutriëntenstock A, 0.100 ml van nutriëntenstock B en 0.200 ml van nutriëntenstock C, leng aan met watermonster tot aan de maatstreep voor 200 ml, sluit af en homogeniseer
- Breng 100 ml zoutwateralgengroeimeidium in kolf $CW_{50\%}$
- Neem 100 ml af uit de kolf $CW_{100\%}$ en voeg deze toe aan kolf $CW_{50\%}$, sluit af en homogeniseer
- Verwijder vervolgens 100 ml testoplossing uit $CW_{50\%}$
- Breng 75 ml watermonster in kolf $CW_{90\%}$
- Voeg nu telkens 1.200 ml van de 6 geconcentreerde zoutoplossingen toe aan kolf $CW_{90\%}$ (volgens Tabel 4: geconcentreerde zoutoplossingen in Algatoxkit M)
- Voeg vervolgens de nodige nutriënten toe bij kolf $CW_{90\%} \div 1.5$ ml van nutriëntenstock A, 0.050 ml van nutriëntenstock B en 0.100 ml van nutriëntenstock C, leng aan met watermonster tot aan de maatstreep voor 100 ml, sluit af en homogeniseer
- Neem 25 ml uit de kolf C0, dit is algengroeimeidium voor de 0-calibratie, en markeer als C0 calibratie
- Neem 25 ml uit de kolf $CW_{100\%}$, dit is de testoplossing voor de 0-calibratie, en markeer als $CW_{100\%}$ calibratie
- Neem 25 ml uit de kolf $CW_{50\%}$, dit is de testoplossing voor de 0-calibratie, en markeer als $CW_{50\%}$ calibratie
- Neem 25 ml uit de kolf $CW_{90\%}$, dit is de testoplossing voor de 0-calibratie, en markeer als $CW_{90\%}$ calibratie
- In de kolf C0 blijft 75 ml algengroeimeidium, hier wordt 0.75 ml algeninoculum toegevoegd uit de gehomogeniseerde algenstock bereiding (zie 6.5.2.3), zodat de eindconcentratie algen in C0 overeenkomt met 1.10^4 algen/ml, sluit de kolf af en schud voor een homogene algensuspensie.
- In de kolf $CW_{100\%}$ blijft 75 ml watermonster met nutriënten, hier wordt ook 0.75 ml algeninoculum toegevoegd uit de gehomogeniseerde algenstock bereiding, zodat de eindconcentratie algen in $CW_{100\%}$ overeenkomt met 1.10^4 algen/ml, sluit de kolf af en schud voor een homogene algensuspensie. Dit resulteert in een hoogste testconcentratie van het watermonster van 97.35%.

- In de kolf $CW_{50\%}$ blijft 75 ml watermonster met nutriënten, hier wordt ook 0.75 ml algeninoculum toegevoegd uit de gehomogeniseerde algenstock bereiding, zodat de eindconcentratie algen in $CW_{50\%}$ overeenkomt met 1.104 algen/ml, sluit de kolf af en schud voor een homogene algensuspensie.
- In de kolf $CW_{90\%}$ blijft 75 ml watermonster met nutriënten, hier wordt ook 0.75 ml algeninoculum toegevoegd uit de gehomogeniseerde algenstock bereiding, zodat de eindconcentratie algen in $CW_{90\%}$ overeenkomt met 1.104 algen/ml, sluit de kolf af en schud voor een homogene algensuspensie. Dit resulteert in een hoogste testconcentratie van het watermonster van 90.15%.

6.5.3.2 TEST MET EEN VERDUNNINGSREEKS VOOR EC_{50} BEPALING

Indien van toepassing (bijv. volgens bijzondere voorwaarde in vergunning van het bedrijf) moet het watermonster in een verdunningsreeks getest worden om een EC_{50} waarde te bepalen. Hiervoor wordt het watermonster verdund met zoutwateralgengroei-medium voor 5 concentraties met een verdunningsfactor 2, van het watermonster in vergelijking met controle (0% watermonster in algengroei-medium).

De hoogste testconcentratie van het monster, voor bereiding van de verdunningsreeks, zal bereid worden zoals beschreven in de limiettest voor respectievelijk scenario a) geleidbaarheid $> 3300 - \leq 22000 \mu S/cm$ of scenario b) geleidbaarheid $> 52000 \mu S/cm$ (zie 6.5.3.1).

~~Men zal analoog te werk gaan als bij de limiettest door eerst het onverdunde watermonster aan te vullen met nutriënten, en vast NaCl (10 g/l) indien correctie voor geleidbaarheid nodig is (range $> 3300 - \leq 22000 \mu S/cm$). Men meet en rapporteert de geleidbaarheid van deze testoplossing in de hoogste concentratie.~~

Pas daarna zal de 1:1 verdunning van het watermonster met zoutwateralgengroei-medium gebeuren, en wordt tot slot bij elke verdunning van het watermonster het algeninoculum (1 ml/100 ml) toegevoegd.

Uitzonderlijk is een range finding test nodig, bijv. indien zeer hoge toxiciteit verwacht wordt. Hierbij wordt een verdunningsreeks opgezet met hoge verdunningsfactor, bijv. 10 om de 0-100% effectrange te vinden. Uit deze test wordt de verfijnde testrange (met lagere verdunningsfactor, minimum 2) afgeleid met concentraties van watermonster waarbij minstens 1 punt met 100% effect en een punt met een effect $\leq 10\%$, en met indien mogelijk meerdere punten op de helling van de concentratie-effect curve om een nauwkeurige EC_{50} waarde te berekenen. Indien er weinig tot geen effect is ($< 50\%$ acute toxiciteit), kan er geen EC_{50} waarde bepaald worden.

Een voorbeeld van bereiding van testoplossingen voor een dilutiereeks is terug te vinden in de handleiding bij de AlgaltoxkitM.

6.5.4 BLOOTSTELLING

6.5.4.1 BLOOTSTELLINGSCONDITIES

- Duur: (72 ± 2) u
- Licht-donker cyclus: continue belichting, 3000-4000 lux aan onderzijde van cuvetten, 10000 lux in geval van zijdelingse belichting.
- Dagelijks moeten de algen in de cuvetten manueel geresuspendeerd worden door schudden met omkeren (zie instructies handleiding).
- Temperatuur van testoplossingen: $(20 \pm 2)^{\circ}C$ tijdens blootstelling, een temperatuur-gecontroleerde ruimte te gebruiken voor de test. Via een temperatuurlogger in een testbeker

(25 ml test vloeistof) naast de testrecipiënten wordt de temperatuur opgevolgd gedurende de blootstellingsperiode.

- Testrecipiënt: polystyreen cuvetten, met afdekplaatje zoals voorzien bij AlgaltoxitM (alternatieven zijn toegestaan, zie 6.15.1).
- Testvolume: 25 ml per cuvet (long cell) in de AlgaltoxitM.
- Replica's: 3 voor elk van de 3 testcondities in de limiettest, 3 per conditie in de test met verdunningsreeks. Het aantal replica's voor de controle algengroei en de testcondities van het monster zijn gelijk per type test.

6.5.4.2 TRANSFER TESTOPLOSSINGEN NAAR DE TESTRECIPIËNTEN (LONG CELL CUVETTEN)

- Neem het nodige aantal cuvetten (inclusief afdekplaatje), 18 per verzamelbakje, de plastic strip en rubbers om samen te houden. Markeer de cuvetten voor de verschillende testcondities, met nummering voor de replica cuvetten/conditie.
- Neem de bereide testoplossingen met algen C0 (controle), en CW (aangepast monster), homogeniseer de oplossingen door schudden en vul de cuvetten telkens met 25 ml, met voor een limiettest ~~6~~ 3 cuvetten per conditie x ~~2~~ 3 condities (CW en C0). ~~100%, CW_{50%} en CW_{90%} en controle (C0).~~ Dus totaal 12 cuvetten voor een limiettest, en 18 cuvetten voor een dilutiereeks (3x 5 concentraties watermonster CW + 3 x controle C0).
- Neem de oplossingen (zonder algen) van controle (C0-calibratie), en van watermonster (voor CW-correctie). Voor de testconditie in de limiettest, CW ~~100%, CW_{50%} en CW_{90%}~~ is er een overeenkomstige testoplossing zonder algen voor correctie. Indien men met een dilutiereeks werkt, zal er voor elke concentratie van watermonster een oplossing zijn voor correctie. Vul voor elk van de condities 1 cuvet met 25 ml zoutwateralgengroeimeedium (C0-calibratie) of van de testoplossingen (CW-correctie).
- Al de gevulde cuvetten worden afgedekt en at random verdeeld voor testcondities, en replica's over verschillende verzamelbakjes. Plaats de cuvetten volgens de pijl op de zijwand in dezelfde richting. Voor de incubatie worden de afdekplaatjes voor elk van de cuvetten deels opgelicht, en men schuift aan de halfopen zijde de plastic strip tussen de cuvetten en het afdekplaatje zodat er open ruimte is voor gasuitwisseling zodat pH variatie beperkt blijft.
- In lijn met ISO 10253, wordt er uitgegaan van een nominale algendensiteit bij start van de test (zoals kan bepaald worden op basis van OD2 meting en 1:100 verdunning), en die tussen $0.5 \cdot 10^4$ algen/ml moet liggen. Er zal geen spectrofotometrische meting worden uitgevoerd op T=0.
- De verzamelbakjes worden nu voor 72 u incubatie, bij juiste temperatuur en lichtcondities in de incubator of gethermostatiseerde kamer gezet. De cuvetten worden dagelijks manueel geschud om de algensuspensie te homogeniseren.
- De resterende testoplossingen in de maatkolven C0 en CW, met algeninoculum worden gebruikt voor meting van pH en geleidbaarheid bij start van de test in alle testoplossingen, zowel voor limiettest als bij een verdunningsreeks. Indien er geen overmaat van de testoplossingen voorzien werd, dan kan men mits de nodige voorzorgen qua cross-contaminatie, voor metingen bij begin van de test de testoplossingen gebruiken die voorzien worden om de calibratie of staalcorrectie te doen voor elk van de testcondities.

6.5.5 EVALUATIE VAN TEST

- Zowel in de limiettest als bij een verdunningsreeks wordt de optische densiteit enkel na (72 ± 2) u afgelezen.
- Zet de spectrofotometer op en neem de verzamelbakjes met cuvetten uit de incubator.
- Zorg ervoor bij de meting dat de cuvetten steeds in de goede richting (pijl naar links) in de meetcel staan.
- Begin met een 0-calibratie met de cuvet met zoutwateralgengroeimeedium (zonder algen).

- Schud elk van de controle cuvetten gedurende 10 sec. en meet na ongeveer 10 sec. de OD voor elk van de replica's van de controlegroep en registreer op laboformulier.
- Neem de cuvet voor CW-correctie (hoogste concentratie watermonster zonder algen), **registreer het gemeten achtergrond signaal**, en doe vervolgens een 0-calibratie. Schud vervolgens de replica's van de corresponderende testoplossing watermonster met algen, en meet na ongeveer 10 sec. op de spectrofotometer. Indien een dilutiereeks getest wordt, **meet voor elke concentratie eerst de cuvet zonder algen, noteer het gemeten signaal**, en doe per dilutie vervolgens de 0-calibratie met de testoplossing zonder algen, en vervolg met de replica cuvetten met algen voor de corresponderende concentratie van testoplossing. Registreer al de gemeten OD-waarden. **Bij hoge signalen van de achtergrond (> 30% van het signaal met algen) kan dit interfereren met de spectrofotometrische metingen van de algengroei, en wordt als afwijking gemeld. In overleg met de klant zou men de test kunnen uitvoeren op een gecentrifugeerd monster indien deeltjes significant bijdragen tot het signaal.**
- De testvloeistof van de replica cuvetten met algen wordt gepoold voor meting van de pH **en geleidbaarheid**. De pH **en geleidbaarheids**meting wordt uitgevoerd voor de controle conditie en elke testconditie van het watermonster **en samen met metingen in de oplossingen bij start gerapporteerd**.
- De temperatuurregistraties tijdens de incubatieperiode worden afgelezen voor min. en max. temperatuur die gerapporteerd wordt.

6.5.6 BEREKENING VAN RESULTAAT VOOR GROEI-INHIBITIE NA 72 U

6.5.6.1 BEREKENING BIOMASSA OPBRENGST EN GROEISNELHEID

Er worden 2 eindpunten berekend op basis van evaluaties: opbrengst (biomassa) en groeisnelheid, maar enkel de parameter groeisnelheid wordt voor beoordeling van water gerapporteerd. De berekende toename van biomassa gedurende (72 ± 2) u wordt gehanteerd als geldigheids criterium voor de test.

Microbiotests beschikt over een rekentemplate beschikbaar voor verwerking van data op basis van uitgevoerde OD-metingen, en de regressievergelijking voor relatie OD versus aantal algen voor de gebruikte algenbatch. De berekeningen zijn gebaseerd op volgende formules.

Groeisnelheid

De gemiddelde specifieke groeisnelheid voor een specifieke periode is de logaritmische toename in biomassa: voor elke replica van respectievelijk de controlegroep, en een concentratie van watermonster wordt deze specifieke groeisnelheid μ berekend als volgt:

$$\mu_{i-j} = (\ln BE_j - \ln BE_i) / (t_j - t_i)$$

Waarin: BE = biomassa equivalent
 t = tijdstip van de meting (t in dagen)
 i-j = tijdsperiode waarbinnen de specifieke snelheid berekend wordt

De specifieke groeisnelheid per replica wordt gemeten voor de totale periode (0 (=i) – 3 (=j) dagen).

Bereken voor de replica's van de controlegroep, een gemiddelde groeisnelheid, μ_c .

Bepaal vervolgens voor elke replica van de testoplossingen met watermonsters de procentuele inhibitie van groeisnelheid als functie van de gemiddelde groeisnelheid van de controle, μ_c met volgende formule:

$$\%I_{ra} = (\mu_c - \mu_a) \times 100 / \mu_c$$

waarin :	μ_c	= gemiddelde van specifieke groeisnelheid in controle
	μ_a	= specifieke groeisnelheid in replica van concentratie a
	I_{ra}	= % inhibitie van de groeisnelheid voor replica van concentratie a

Bereken voor de replica's van elke testconditie van het watermonster, een gemiddelde groeisnelheid, I_{ra} relatief t.o.v. de controle conditie.

Opbrengst biomassa

De opbrengst van biomassa, Y voor elke replica van de controlegroep en testoplossing wordt berekend als het verschil tussen biomassa op 72 u en op t=0 u. In laatste geval wordt de nominale concentraties voor biomassa gebruikt. De OD-waarden (biomassa equivalent) worden omgerekend in aantal algen.

$$Y_{i-j} = BE_i - BE_j$$

Waarin:	BE	= biomassa equivalent
	i-j	= tijdsperiode, met 0 (=i) – 3 (=j) dagen.

Een gemiddelde biomassa opbrengst wordt berekend voor de controlegroep Y_c , en de toename van biomassa in elke replica van de testoplossingen (Y_a) wordt uitgedrukt als % van het gemiddelde van de controlegroep via volgende formule:

$$\%I_{ba} = (Y_c - Y_a) \times 100 / Y_c$$

Waarin:	Y_c	= gemiddelde van biomassa toename in controle
	Y_a	= biomassa toename in replica van testoplossing a
	$\%I_{ba}$	= % inhibitie van de biomassa voor replica van concentratie a

Bereken voor de replica's van elke testconditie van het watermonster, een gemiddelde procentuele biomassa I_{ba} relatief t.o.v. controle groep.

6.5.6.2 LIMIETTEST VOOR % INHIBITIE GROEISNELHEID

De aflezing van OD op (72 ± 2) u voor elke replica van de ~~hoogste~~ 3 testcondities ~~een~~tratie van watermonster, met omrekening naar aantal algen per replica, resulteert in een groeisnelheid in vergelijking met de groeisnelheid voor de controle replica's. De inhibitie van groeisnelheid wordt uitgedrukt als gemiddelde van inhibitie van groeisnelheid van de individuele replica's, relatief ten opzichte van de gemiddelde groeisnelheid van controlegroep.

Rapportage van het % effect voor elk van de 3 testcondities in de limiettest als gemiddelde van de % inhibitie van groeisnelheid van de replica's.

6.5.6.3 TEST MET EEN VERDUNNINGSREEKS VOOR EC_{50} BEPALING

- Per replica van elke concentratie watermonster en controle wordt de groeisnelheid over de periode van (72 ± 2) u berekend.
- De gemiddelde groeisnelheid van de controlegroep wordt berekend op basis van groeisnelheid van alle controle replica's.
- Het % inhibitie van de groeisnelheid, als gemiddelde van de replica's per testconcentratie van het watermonster in de verdunningsreeks, wordt uitgedrukt als functie van de gemiddelde groeisnelheid in de controlegroep. Dit resulteert in een % effect voor elke dilutie van watermonster.

- De resultaten van % effect (Y-as) voor inhibitie algengroei worden grafisch voorgesteld als functie van de concentratie (% verdunning) van het water (X-as). Mits een goed concentratie-effect verband kan een E_rC_{50} waarde berekend worden voor de inhibitie van groeisnelheid.
- Een E_rC_{50} waarde kan afgeleid of berekend worden op verschillende manieren (grafische interpolatie of statistische methoden, als probit analyse). Indien twee opeenvolgende concentraties met een onderlinge concentratieverhouding van 2, respectievelijk 0 en 100% effect veroorzaken, is het voldoende de E_rC_{50} te situeren tussen deze beide concentraties.

6.5.7 KWALITEITSCONTROLE

6.5.7.1 EERSTELIJNSCONTROLE

Beslissingscriterium voor geldigheid van de test:

- De toename van biomassa in de controle gedurende (72 ± 2) u moet minstens een factor 16 zijn.
- De variatie van de groeisnelheid tussen de controle replica's over de periode van 72 u mag niet groter zijn dan 7% ($n=3$, limiettest), en niet groter dan 10% ($n=3$, test verdunningsreeks).
- De pH in de controle conditie mag maximum 1.5 pH eenheid verschillen tussen begin en einde van de test.

Deze waarden worden bijgehouden in limietkaarten.

Herkomst en kwaliteit van testorganismen:

- Bij het gebruik van algen uit de AlgatoxkitM wordt steeds het batchnummer op het laboformulier vermeld. De gegevens over de gevoeligheid van elke gebruikte batch in de vorm van een E_rC_{50} en E_bC_{50} voor referentiestof, uitgevoerd door MicroBioTests worden bijgehouden in een databestand.
- Bij gebruik van algen uit een continue labocultuur is een logboek ter beschikking om het onderhoud met de aankoop van algen met identificatie (bijv. bij UK, Culture Collection of Algae and Protozoa, <https://www.ccap.ac.uk/>), het gebruikte groeimedium, passages en condities van onderhoud op te volgen.

6.5.7.2 TWEEDELIJNSCONTROLE

- De methode toegepast in het labo, hetzij vertrekkende van algen uit de kits, hetzij met algen uit continue cultuur, wordt op de hierna vermelde tijdstippen uitgevoerd met een positieve controle (Kaliumbichromaat) waarvoor de E_rC_{50} bepaald wordt na 72 u voor een dilutiereeks van 32 tot 3.2 mg/l (voor details zie handleiding AlgatoxkitM).
 - o De E_rC_{50} wordt geregistreerd in een statistische controlekaart, naast deze van de corresponderende batch voor de AlgatoxkitM, indien van toepassing.
 - o De minimale frequentie voor een intralaboratorium test met positieve controle is als volgt:
 - Bij wekelijkse uitvoering van de test: driemaandelijks positieve controle testen.
 - Bij maandelijkse uitvoering: zesmaandelijks een positieve controle test.
 - Bovendien zal ieder van de betrokken uitvoerders minstens 1 maal per jaar een test met positieve controle uitvoeren.
- Het laboratorium is verplicht om minstens 1x/maand, in iedere maand waarin minstens één test uitgevoerd wordt, een test in parallel op te zetten van een verdunningsreeks van enerzijds het ruwe monster, en anderzijds het monster met een spike van 1 concentratie van steeds eenzelfde referentiestof (bijv. deze die in ISO ringtesten worden gebruikt):

- o Men kiest een willekeurig monster⁹ dat bij aankomst en na controle van de randvoorwaarden in 2 deelstalen wordt verdeeld.
- o De spike wordt gedoseerd aan steeds dezelfde concentratie die het 50% effect benaderdt. Voor de bereiding van de spike moet de verdunning vanuit een stockoplossing in het monster worden toegevoegd aan maximum 5% v/v of lager.
- o De resultaten als % inhibitie bij elke concentratie van het milieumonster, en van het milieumonster met spike worden bijgehouden op een controlekaart en zullen gebruikt worden voor het bepalen van de reproduceerbaarheid van de methode.

6.5.7.3 DERDELIJNSCONTROLE

Minstens 1x per jaar deelnemen aan een externe ringtest indien georganiseerd.

6.5.7.4 OPVOLGING VAN AFWIJINGEN

Indien de $E_{rC_{50}}$ resultaten van de positieve controles niet voldoen aan de statistische grenzen voor algen uit eigen kweek, of de door MicroBioTests aangegeven range op de specificatie sheet van de batch algen, of als één of meer van de geldigheidscriteria voor de controle niet voldoen, dan dient een analyse van de oorzaak en reikwijdte uitgevoerd te worden. Indien hieruit blijkt dat bepaalde resultaten onbetrouwbaar zijn mogen deze niet gerapporteerd worden en dient een nieuwe bemonstering te worden uitgevoerd van de geteste watermonsters. Indien van toepassing dient ook de impact op eerder gerapporteerde resultaten te worden nagegaan.

6.5.8 RAPPORTERING

Het testrapport bevat:

- De identificatie van het monster, gegevens over monsternamen, datum van testuitvoering met monster, resultaten van meting van de randvoorwaarden en aanpassingen, indien van toepassing.
- Verwijzing naar de betreffende WAC-methode voor ecotoxiciteit, en WAC-methode voor bepaling van fysicochemische parameters. Gegevens over het testorganisme (naam, herkomst, batch), motivatie voor keuze van testorganisme a.d.h.v. gemeten randvoorwaarde (geleidbaarheid) en type test (limiet, of verdunningsreeks).
- **Werkwijze bereiding van testmonsters qua aanpassingen voor toevoegingen nutriënten, boorzuur, zouten en NaCl, en overeenkomstige meetresultaten van geleidbaarheid.**
- Resultaten:
 - o Fysicochemische parameters (**pH en geleidbaarheid**) van testoplossingen en controle op $T=0$ en $T=72u$
 - o % effect voor inhibitie van groeisnelheid na $(72 \pm 2) u$ in controle en watermonster bij de hoogst geteste concentratie **CW 3 testcondities CW_{100%}, CW_{50%} en CW_{90%}** (limiettest) of
 - o $E_{rC_{50}}$, met methode van berekening, voor inhibitie van groeisnelheid na $(72 \pm 2) u$ bij verdunningsreeks van watermonster, met % effect **als inhibitie van de groeisnelheid in de hoogst al de geteste concentratie van het watermonster in tabel samen te vatten** (**optioneel**: grafiek voor concentratie-effect op 72u).
- Opmerkingen en afwijkingen.

⁹ Indien voorkennis, dan kiest men bij voorkeur monsters die geen tot lage acute toxiciteit hebben ($EC_{50} < 50\%$).

7 REFERENTIES

- Handleiding AlgaltookitF: Freshwater toxicity test with Microalgae, Standard operating procedure.
- Handleiding AlgaltookitM: Marine toxicity test with Microalgae, Standard operating procedure.
- ISO 8692 (2012): Water quality: freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae
- ISO 10253 (2016): Water quality: marine algal growth inhibition tests with *Skeletonema* sp. and *Phaeodactylum tricornutum*.
- OECD201 (2011). OECD guideline for testing of chemicals. Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test.
- Postma J.F., De Valk S., Dubbeldam M., Maas J.L., Tonkes M., Schipper C.A. & B. J. Kater (2002). Confounding factors in bioassays with freshwater and marine organisms. *Ecotoxicology and environmental safety* 53, 226-237.

BIJLAGE A: LABOCULTUUR VAN ALGEN, EN BEREIDEN VAN PRECULTUUR

A.1 Kweek van algen

Alle handelingen worden met steriel materiaal uitgevoerd om besmetting met bacteriën of andere algen te voorkomen. Het is van wezenlijk belang dat de culturen slechts één algensoort bevatten.

De kweek bestaat uit kleine algenculturen die regelmatig (meestal eens per 2 weken, afhankelijk van de groei) in een vers medium worden overgebracht (passage) en die dienen als entmateriaal voor algentesten. Het medium voor de kweek is hetgeen welk aanbevolen wordt voor een specifiek algensoort door de leverancier van algen, de UK Culture Collection of Algae and Protozoa, CCAP (<https://www.ccap.ac.uk/>). Bij ontvangst van algen en routinepassages worden de voorraadculturen gekweekt in erlenmeyers met medium.

Bij de passage wordt 4 ml oude cultuur overgebracht in een erlenmeyer met 100 ml vers medium zodat de beginconcentratie ongeveer 50 keer kleiner is dan in de oude cultuur. Het oude recipiënt waaruit het inoculum genomen werd, wordt daarna afgevoerd. Op alle kweekrecipiënten wordt de code van de algensoort aangebracht, en het passagenummer (dat dus eigenlijk een maat is voor de ouderdom van de batch). De kweek wordt opgevolgd in een logboek. In dit logboek wordt de datum genoteerd waarop de algen toekomen in het labo en alle passages. De grootte van de kweek kan worden aangepast aan de behoeften.

De culturen worden continu belicht bij kamertemperatuur. De erlenmeyers staan op een schudtafel en worden regelmatig geschud. Zij worden regelmatig op hun kleur beoordeeld: bij twijfel of afwijking wordt een staaltje onder de microscoop bekeken. Indien blijkt dat er problemen zijn met de cultuur wordt eventueel een nieuwe batch besteld bij CCAP. Via extra verversingen kan een aangetaste batch soms toch gered worden en terug normaal groeien. Deze batches mogen dan verder gebruikt worden voor testen. Algenculturen die misvormde of afwijkende cellen bevatten of die bacterieel/mycotisch besmet zijn, mogen niet verder gebruikt worden en moeten onmiddellijk verwijderd worden.

A.2 Opzetten van precultuur

De bedoeling van de voorcultuur is voldoende algen te krijgen voor het enten van de testrecipiënten. De algen zouden in hun exponentiële groeifase moeten zijn bij het begin van de test, zodat een optimale groeicurve bekomen wordt in de controles tijdens de 72 u blootstelling in de test. De precultuur wordt geïncubeerd met het algengroeimeedium dat gebruikt zal worden voor de test. Doorgaans wordt een incubatieperiode van ongeveer drie tot maximaal 4 dagen in acht genomen:

d.w.z. op vrijdag passeren om maandag of dinsdag een test te kunnen opstarten.

BIJLAGE B: ALGENGROEIMEDIUM (CONTROLE) EN VERDUNNINGSWATER VOOR DE ZOETWATERALGEN TEST

B.1 Bereiding van stockoplossingen van nutriënten

Voor de bereiding van stockoplossingen met zouten worden reagentia met gekende analytische zuiverheid gebruikt zoals deze in Tabel 5 (uit ISO 8692, 2012).

De stockoplossingen 1, 2, 3 en 4 worden gelabeld en gedateerd. Deze oplossingen worden gesteriliseerd, hetzij door membraanfiltratie bij 0.22 µm ofwel door autoclaveren bij $(120 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ gedurende 15 minuten. Enkel stockoplossing 4 mag niet in de autoclaaf, en zal gefiltreerd worden voor sterilisatie. De gesteriliseerde stockoplossingen kunnen gedurende 3 maanden donker en koel bewaard worden bij $(5 \pm 3)^{\circ}\text{C}$.

Tabel 5: Samenstelling van nutriënten in stock- en testoplossingen voor test met zoetwateralgen

Stock solution	Nutrient	Mass concentration in stock solution	Final mass concentration in test solution
1: Macronutrients	NH ₄ Cl	1,5 g/l	15 mg/l (N: 3,9 mg/l)
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	1,2 g/l	12 mg/l (Mg: 2,9 mg/l)
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,8 g/l	18 mg/l (Ca: 4,9 mg/l)
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,5 g/l	15 mg/l (S: 1,95 mg/l)
	KH ₂ PO ₄	0,16 g/l	1,6 mg/l (P: 0,36 mg/l)
2: Fe-EDTA	FeCl ₃ ·6H ₂ O	64 mg/l	64 µg/l (Fe: 13 µg/l)
	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	100 mg/l	100 µg/l
3: Trace elements	H ₃ BO ₃ ^a	185 mg/l	185 µg/l (B: 32 µg/l)
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	415 mg/l	415 µg/l (Mn: 115 µg/l)
	ZnCl ₂	3 mg/l	3 µg/l (Zn: 1,4 µg/l)
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,5 mg/l	1,5 µg/l (Co: 0,37 µg/l)
	CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,01 mg/l	0,01 µg/l (Cu: 3,7 ng/l)
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	7 mg/l	7 µg/l (Mo: 2,8 µg/l)
4: NaHCO ₃	NaHCO ₃	50 g/l	50 mg/l (C: 7,14 mg/l)

^a H₃BO₃ can be dissolved by the addition of 0,1 mol/l NaOH.

B.2 Bereiding van zoetwateralgengroeimedium, of verdunningsmedium

Voor de bereiding van 1 liter groeimedium:

- Vul een maatkolf met 800 ml gedemineraliseerd water
- Voeg 10 ml toe van stockoplossing 1, sluit af, en homogeniseer
- Voeg 1 ml van stockoplossing 2, 1 ml van stockoplossing 3 en 1 ml van stockoplossing 4 toe, sluit af en homogeniseer
- Leng aan tot 1 liter met gedemineraliseerd water.

Laat het medium in evenwicht komen met de lucht door het overnacht te laten staan, of belucht gedurende 30 min. en meet daarna de pH, en stel die bij tot 8.1 ± 0.2 , met 1N HCl or 1N NaOH. Het medium is nu klaar voor gebruik.

BIJLAGE C: ALGENGROEI-MEDIUM (CONTROLE) EN VERDUNNINGSWATER VOOR DE ZOUTWATERALGEN TEST

X.1 Bereiding synthetisch zoutwater

Voor de bereiding van synthetisch zeewater worden zoutoplossingen gemaakt met reagentia van gekende analytische zuiverheid gebruikt. Synthetisch zeewater wordt gemaakt met de verschillende zouten en respectievelijke hoeveelheden zoals opgeleijst in Tabel 6.

De oplossing wordt gelabeld en gedateerd, en wordt gefiltreerd (0.45 µm) voor gebruik. Deze bereiding van synthetisch zeewater wordt donker en koel (5 ± 3)°C bewaard worden gedurende 6 maanden.

Tabel 6: Samenstelling van zouten met hun concentraties in synthetisch zeewater (volgens ISO 10253, 2016).

Salt	Concentration of salt in synthetic sea water
	g/l
NaCl	22
MgCl ₂ ·6H ₂ O	9,7
Na ₂ SO ₄ (anhydrous)	3,7
CaCl ₂ (anhydrous)	1,0
KCl	0,65
NaHCO ₃	0,20
H ₃ BO ₃	0,023

C.2 Bereiding stockoplossing van nutriënten en verdunningen voor bereiding van zoutwatalgenmedium

De zouten die gebruikt worden voor de bereiding van nutriënten stockoplossingen 1, 2 en 3 (zie Tabel 7) zijn van gekende analytische zuiverheid.

Er worden 3 stockoplossingen bereid met hoeveelheden zoals in tabel. De 3 nutriëntenstockoplossingen worden gesteriliseerd via filtratie (0.2 µm). Alternatief kunnen stockoplossingen 1 en 3 ook door autoclaveren bij 120°C gedurende 15 min. gesteriliseerd worden. De stocks kunnen maximum 2 maanden bewaard worden in het donker bij 4°C.

X.3 Bereiding van zoutwatalgenmedium, of verdunningswater

Gebruik het synthetisch zeewater, om de stocks van nutriënten te verdunnen.

Voor de bereiding van 1 liter zoutwatalgengroeimedium:

- Vul een maatkolf met 900 ml synthetisch zeewater (zie C.1).
- Voeg 15 ml toe van nutriëntenstockoplossing 1, sluit af, en homogeniseer
- Voeg 0.5 ml van stockoplossing 2 en 1 ml van stockoplossing 3 toe in de kolff, sluit af en homogeniseer
- Leng aan tot 1 liter met synthetisch zeewater.

Controleer de pH en stel bij tot pH 8.0 ± 0.2 met HCl of NaOH.

Label de oplossing van zoutwatalgengroeimedium, die 1 maand in het donker en koel bij (5 ± 3)°C kan bewaard worden.

Tabel 7: Samenstelling van nutriënten in stock- en testoplossingen voor bereiding van zoutwateralgengroeimeidium (volgens ISO 10253, 2016).

Nutrient	Concentration in stock solution	Final concentration in test solution
Stock solution 1		
FeCl ₃ ·6H ₂ O	48 mg/l	149 µg/l (Fe)
MnCl ₂ ·4H ₂ O	144 mg/l	605 µg/l (Mn)
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	45 mg/l	150 µg/l (Zn)
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,157 mg/l	0,6 µg/l (Cu)
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,404 mg/l	1,5 µg/l (Co)
H ₃ BO ₃	1 140 mg/l	3,0 mg/l (B)
Na ₂ EDTA	1 000 mg/l	15,0 mg/l
Stock solution 2		
Thiamin hydrochloride	50 mg/l	25 µg/l
Biotin	0,01 mg/l	0,005 µg/l
Vitamin B ₁₂ (cyanocobalamin)	0,10 mg/l	0,05 µg/l
Stock solution 3		
K ₃ PO ₄	3,0 g/l	3,0 mg/l; 0,438 mg/l P
NaNO ₃	50,0 g/l	50,0 mg/l; 8,24 mg/l N
Na ₂ SiO ₃ ·5H ₂ O	14,9 g/l	14,9 mg/l; 1,97 mg/l Si

Ecotoxiciteitstest met bacterie: acute toxiciteit voor de luminescente bacterie (*Aliivibrio fischeri*)

INHOUD

1	TOEPASSINGSGEBIED	3
2	Principe van de test	3
2.1	Eindpunt voor acute toxiciteit bij bacterie	3
2.2	Limiettest	3
2.3	Verdunningsreeks	3
3	Definities	4
4	Acute toxiciteit voor de luminescente bacterie (<i>Aliivibrio fischeri</i>)	4
4.1	Inleiding	4
4.2	Apparatuur en materiaal	5
4.3	Reagentia en oplossingen	5
4.4	Watermonster	5
4.5	Werkwijze	7
4.5.1	Protocol 81.9% basic test voor limiettest en verdunningsreeks	7
4.5.2	Correctie voor kleur en/of turbiditeit	10
4.5.3	Kwaliteitscontrole	10
4.5.4	Rapportering	12
5	REFERENTIES	12
BIJLAGE A : Methode beschrijving bij gebruik van het Microtox® toestel.		13
	Protocol 81.9% basic test voor limiettest en verdunningsreeks	13

1 TOEPASSINGSGEBIED

Deze procedure beschrijft de werkwijze om de acute toxiciteit voor de zoutwaterbacterie *Aliivibrio fischeri* (vroeger ook *Vibrio fischeri* of *Photobacterium fischeri* genoemd) te evalueren. Deze test heeft tot doel de acute toxiciteit voor het trofische niveau van micro-organismen (reducenten) in te schatten.

De procedure is van toepassing voor

- Diverse waterige milieumatrices: afval-, oppervlakte-, drink- en grondwater. Waterige oplossingen met chemische stoffen (zoals voor eerstelijnscontrole), mits deze goed oplosbaar zijn in water, of in oplossing blijven als stabiele suspensie of via dispersie, of met gebruik van een solvent.

Het testorganisme is een mariene, luminescente bacterie. Dit wil zeggen dat bij testen op watermonsters met een geleidbaarheid lager dan 28 mS/cm een correctie zal voorzien worden met toevoeging van een geconcentreerde zoutoplossing.

2 PRINCIPE VAN DE TEST

2.1 EINDPUNT VOOR ACUTE TOXICITEIT BIJ BACTERIE

De inhibitie van lichtemissie wordt gemeten in een batch cultuur van bacteriën, die blootgesteld wordt aan het water, de hoogst mogelijke concentratie al of niet met verdunningen. Het testorganisme is de mariene bacterie *Allivibrio fischeri*, een bioluminescentie bacterie. De sterkte van het luminescent signaal is een maat voor de fysiologische en metabole activiteit van de bacterie populatie. De verandering van luminescentie door toxiciteit van het watermonster wordt gemeten na een bepaalde contacttijd (30 minuten¹) aan het teststaal, en het % effect wordt gecorrigeerd ten opzichte van de verandering (= spontane daling) van het luminescentie signaal in de controle (of blanco).

2.2 LIMIETTEST

Voor het meten van de toxiciteit van waters wordt standaard een limiettest uitgevoerd op de hoogst mogelijke concentratie van het watermonster. Het % effect na 30 minuten blootstelling aan de hoogst geteste concentratie van het watermonster wordt gerapporteerd, en dit als % effect relatief t.o.v. controle medium.

2.3 VERDUNNINGSREEKS

Uitzonderlijk worden de testen uitgevoerd op een verdunningsreeks van het water. Dit kan van toepassing zijn wanneer dit vereist is in het kader van de bijzondere voorwaarde in een vergunning

¹ Metingen kunnen ook na 5' en 15 ' uitgevoerd worden, maar niet vereist voor rapportage van resultaat acute toxiciteit. Additionele aflezing in overleg met de klant.

of bij verder onderzoek naar oorzaken van acute toxiciteit (TIE-Toxiciteit identificatie & evaluatie). Ook bij het testen van een referentiestof, als deel van kwaliteitscontrole, zal de bacterietest in een verdunningsreeks opgezet worden. Daarbij wordt het watermonster (of de referentiestof) in een reeks van minstens 4 concentraties getest, naast de controle conditie. De concentratiereeks (# concentraties, en verdunningsfactor) van het water of de referentiestof wordt zodanig gekozen dat de hoogste concentratie ongeveer 100% effect oplevert, en de laagste concentratie 0% effect (of niet significant verschillend van de controle). Dit laat toe een grafiek met concentratie-effect te genereren, alsook een EC₅₀-waarde te berekenen die de concentratie van het water of referentiestof geeft waarbij 50% van de testorganismen acute toxiciteit ondervinden. Bij deze test met een verdunningsreeks kan eveneens het % effect, zoals in de limiettest, bepaald worden voor het water met de hoogste testconcentratie van de reeks.

3 DEFINITIES

Volgende definities zijn van toepassing:

- EC₅₀ (50% effect concentratie): dit is de concentratie van een watermonster of teststof waarbij 50 % inhibitie van de lichtsterkte t.o.v. de controle wordt waargenomen.
- Limiettest: in de test wordt 1 concentratie van het water (nl. de hoogst mogelijke concentratie van het water) geëvalueerd in vergelijking met controle medium.
- Randvoorwaarden: voor het testmonster geldende grenzen voor fysicochemische parameters, zoals pH, O₂, geleidbaarheid waarbij er geen effect op (acute) toxiciteit wordt verwacht ten opzichte van de controle conditie.
- Referentiestof: een referentiestof kan worden getest om aan te tonen dat de gevoeligheid van de geteste soort onder laboratoriumomstandigheden niet in belangrijke mate veranderd is en/of de uitvoering van de test voldoet aan vooropgestelde criteria qua te verwachten toxische effecten voor de referentiestof (ook positieve controle).
- Toxiciteit identificatie en evaluatie (TIE): onderzoek naar de oorzaken van toxiciteit door watermonsters te onderwerpen aan diverse behandelingen (filtratie, actieve kool, organische extractie) met het doel de toxiciteit toe te wijzen aan bepaalde fracties uit deze behandelingsstappen.

4 ACUTE TOXICITEIT VOOR DE LUMINESCENTE BACTERIE (*ALIIVIBRIO FISCHERI*)

4.1 INLEIDING

Voor deze bacteriële test is de ISO 11348 richtlijn de basis.

Reagentia en gevriesdroogde bacteriën zijn commercieel verkrijgbaar.

Er zijn specifieke toestellen beschikbaar om deze methode uit te voeren, bijv. Microtox® toestel van een gethermostatiseerde reagent en meetcellen (in bijlage A wordt de methode beschreven bij gebruik van het Microtox® toestel).

Gelijkaardige varianten van toestellen voor luminescentie metingen, met gethermostatiseerde incubatiecellen en meetcellen zijn mogelijk mits voldaan kan worden aan de incubatietemperatuur voor de bacteriën en de monsters, beschreven in de ISO-richtlijn.

Een correcte testuitvoering vergt uiterste nauwkeurigheid in het pipetteren van kleine volumes: gebruik precisiemateriaal en voer de acties correct uit met geverifieerde pipetten. Repeteerpipetten voor kleine volumes kunnen helpen bij reproduceerbare transfer van bacteriesuspensie.

4.2 APPARATUUR EN MATERIAAL

- Zuurstofmeter voor bepaling van zuurstof conform WAC/III/A/008
- Thermometer
- pH-meter voor pH meting conform WAC/III/A/005
- Geleidbaarheidsmeter voor meting geleidbaarheid conform WAC/III/A/004
- Materiaal en apparatuur voor de bepaling van ammonium.
- Analytische balans, aflezing tot 0.1 mg
- Beluchting systeem (olie-vrij)
- Pipetten en toebehoren
- Repeteerpipet, met bijhorende tips voor kleine volumes (bijv. 10 µl)
- Standaard labo glasmateriaal: maatkolven, maatcilinders voor bereiding van testoplossing referentiestof.
- Recipiënten voor meting van fysicochemische parameters.
- Klok, met chronometer
- Glazen cuvetten, **of geschikte microtiterplaten** voor luminometer
- Luminometer met gethermostatiseerde plaatsen voor cuvetten, nl. $(15 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ voor meetcuvetten en $(5.5 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ voor bacteriesuspensie, **of afzonderlijke thermoblock of incubator voor de bacteriën en de testrecipiënten of microtiterplaten.**
- Sommige commerciële toestellen als **Microtox® of Biolight® Toxy hebben** Eventueel met bijhorende software (meetprogramma 's & berekeningen).
- Spectrofotometer

4.3 REAGENTIA EN OPLOSSINGEN

- Gelyofiliseerde bacteriën), bewaren op -20°C .
- Reconstitutie oplossing (ontdooivloeistof voor de bacteriën), bewaren in koelkast.
- Diluent (verdunningsvloeistof), bewaren in koelkast.
- Osmotic Adjusting Solution (OAS) (22 % NaCl oplossing), bewaren in koelkast.
- **Natriumchloride**
- **Referentiestof, bijv.** Fenolstandaard (100 mg/l), bewaren in koelkast, donkere fles, 6 maanden houdbaar.
- Gedemineraliseerd water ($< 10 \mu\text{S/cm}$).
- NaOH, 1N en HCl, 1N

4.4 WATERMONSTER

Voor de monstername en houdbaarheid wordt verwezen naar respectievelijk WAC/I/A/003, WAC/I/A/004 en WAC/I/A/010.

Bij gebruik voor fysicochemische metingen om de randvoorwaarden te controleren wordt een gehomogeniseerd en representatief deelstaal van het watermonster genomen, en op kamertemperatuur gezet.

Voor start van de test worden de volgende fysicochemische parameters bepaald: geleidbaarheid, pH, zuurstof en ammonium. Voor de meeste van deze parameters zijn er aanvaardbare ranges gedefinieerd waarbij er geen effect in de vorm van acute toxiciteit voor de bacterie zal optreden (Tabel 1, Postma et al. 2002).

Tabel 1: Randvoorwaarde voor fysicochemische parameters in watermonsters voor bacterie

Parameter	pH	Zuurstof (mg/l)	Geleidbaarheid ($\mu\text{S/cm}$)	Ammonium (mg/l NH_4^+ , bij pH 8)
Bacterie, <i>Allivibrio fischeri</i>	6.0 – 8.5	≥ 3	28000 - 48000	< 1000

De test wordt uitgevoerd met een mariene bacterie waarvoor een geleidbaarheid van 28000 - 48000 $\mu\text{S/cm}$ optimaal is. Daarom zal bij de testuitvoering met waters van zoet – of brakwater kwaliteit met een geleidbaarheid lager dan 28 mS/cm gecorrigeerd worden met zouttoevoeging (via toevoeging van OAS-oplossing, of vast NaCl in het watermonster, zie ook 4.5.1. en wordt vermeld bij rapportage. Indien de geleidbaarheid in het watermonsters de bovengrens voor de bacterie overschrijdt, dan zal in een limiettest het watermonster verdund worden met gedemineraliseerd water tot de geleidbaarheid in het ruwe monster overeenkomt met een geleidbaarheid van 48000 $\mu\text{S/cm}$ 50% als hoogste concentratie (geen correctie met NaCl) en wordt het % effect bij die concentratie afgelezen. Bij het testen van een verdunningsreeks zal het watermonster zodanig verdund worden dat de hoogste concentratie van de reeks overeenkomt met een geleidbaarheid van 48000 $\mu\text{S/cm}$, en van daaruit 1:1 verder verdund worden om een EC_{50} af te leiden.

De bacteriën zijn pH gevoelig. Indien de pH in het water afwijkt van de randvoorwaarden (< 6 of > 8.5) dan moet deze bijgesteld worden met HCl, of NaOH tot pH 7.5 ± 0.1 . Dit wordt gerapporteerd.

Bioluminescentie activiteit van de bacteriën hangt af van zuurstof. Indien dit zuurstofgehalte lager is dan 3 mg/l dan wordt het watermonster gedurende 20 min., net voor aanvang van de test, belucht. Deze aanpassing wordt gerapporteerd.

De metingen van ~~chloriden, sulfaten en~~ ammonium worden gerapporteerd. In geval van afwijkende randvoorwaarde voor ammonium wordt er niet gecorrigeerd, maar wordt overschrijding van randvoorwaarde duidelijk vermeld in het rapport, als mogelijke parameter die bijdraagt tot gemeten toxiciteit, naast deze die te wijten zou zijn aan milieugevaarlijke stoffen.

In overleg met de opdrachtgever kan bij afwijking van ammonium alsnog een nieuwe test worden uitgevoerd door aanpassingen te doen aan het water (bijv. beluchten om ammoniak te strippen, of bufferen voor pH om ammonium/ammoniak effect uit te sluiten) gevolgd door meting van ammonium. Dergelijke aanpassingen aan het watermonster moeten gerapporteerd worden als een afwijking op de methode.

Andere factoren, dan hogervermelde randvoorwaarden kunnen interfereren met de meting van acute toxiciteit voor bacterie.

- Gechloreerde stalen, bijv. waterstalen die gecontamineerd werden met chloor zijn per definitie bacterievrij en dus toxisch. Indien er aanwijzing is voor chloortoxiciteit kan in overleg met de opdrachtgever een nieuwe meting worden uitgevoerd na verwijdering van het chloor. Om acute toxiciteit te meten zonder chloor interferentie, kunnen zulke stalen gedechloreerd worden met een natriumthiosulfaatoplossing door het doseren van 0.1 ml van een 1.8% thiosulfaatoplossing per 100ml watermonster. Dit is een afwijking van methode die gerapporteerd moet worden.
- Voor watermonsters met een complexe milieumatrix zoals kleur, aanwezigheid van deeltjes of troebeling kan de meting van bioluminescentie verstoord worden door matrixeffecten. Er wordt voor dat type stalen steeds de correctie methode toegepast (zie 4.5.2). Dit wordt overeenkomstig gerapporteerd.

4.5 WERKWIJZE

Algemeen

Bij elk gebruik van een nieuwe bacteriesuspensie voor de bacterie test moet een test opgezet worden met de positieve controle, **bijv. fenol (100 mg/l)** om de kwaliteit van de bacteriën te controleren. Deze analyse gebeurt in parallel met deze van een watermonster, volgens eenzelfde protocol.

~~In afwachting van evaluatie van een specifiek protocol voor een limiettest (met replica's)² worden voorlopig al de watermonsters waarvoor enkel de hoogste concentratie moet getest worden volgens een limiettest opgezet volgens hetzelfde protocol als hetgeen nodig is om~~

De test met de bacterie wordt opgezet in een verdunningsreeks die toelaat een EC₅₀ af te leiden, en tegelijk zoals bij een limiettest het % effect als inhibitie van bioluminescentie te bepalen testen bij de hoogst mogelijk concentratie van het monster (bijv. 90% of 81.9%). Hiervoor wordt het protocol '81.9% Basic test' gekozen, wat de bepaling van EC₅₀ toelaat en eveneens een % effect geeft voor de hoogst geteste concentratie, nl. 81.9% watermonster.

4.5.1 PROTOCOL ~~81.9%~~ BASIC TEST VOOR LIMIETTEST EN VERDUNNINGSREEKS

Dit protocol laat toe een resultaat te bekomen, als 50% effect voor inhibitie van bioluminescentie van een verdunningsreeks van het watermonster, relatief t.o.v. de spontane daling van de controle (blanco). In belang van kostenefficiëntie wordt enkel afleestijd 30 minuten gekozen. Indien een limiettest moet uitgevoerd worden is het voldoende het % effect bij de hoogst geteste concentratie te rapporteren.

~~Via dit protocol kunnen er 2 monsters gelijktijdig getest worden.~~

Testcondities:

- **Het meettoestel en toebehoren (bijv. thermoblok, incubator...) worden tijdig voor de meting opgestart zodat de vereiste temperatuurranges gehandhaafd worden voor incubatie van de bacteriën en de testoplossingen, en voor metingen tijdens de test.**
- **De gevriesdroogde bacteriën moeten na reconstitutie in suspensie gehouden worden bij een temperatuur van 4°C ± 3°C.**
- **De bereide testoplossingen worden in een incubator, of thermoblock op constante temperatuur gehouden bij 15°C ± 1°C**

Test parameters:

- 1 controle (of blanco = **diluent**), **minstens** 1 replica,
- 2-Monsters met **minstens** elk 1 replica³, en **minstens** 4 diluties met dilutie factor 2,
- Initiële **hoogste** concentratie 81.9% **of 90%, afhankelijk van geleidbaarheid en toevoeging van OAS of vast NaCl,**
- **Een chronometer wordt gebruikt om exacte en dezelfde incubatie- of meettijden voor de testoplossingen of referentiestof te handhaven,**
- Zero-time reading (**meting van activiteit op tijdstip 0**)
- Test tijd 30 min⁴

² ~~Een protocol 81.9% screening, met mogelijkheid voor testen van replica's (en geen verdunningen) wordt geëvalueerd qua bruikbaarheid voor limiettest als alternatief voor de 81.9% basic test, zoals tot hertoe voorzien in WAC-procedure.~~

³ Bij een 1^{ste} testreeks met de bacteriesuspensie zal één van de watermonsters de referentiestof, bijv. fenol zijn.

⁴ Metingen kunnen ook na 5' en 15' uitgevoerd worden, maar niet vereist voor rapportage van resultaat acute toxiciteit. Additionele aflezing in overleg met de klant kan uitgevoerd worden, met voorkeur voor 15'.

Testoplossingen:

- Deze worden bereid met diluent volgens meetprogramma van het gebruikte toestel, of volgens procedure van het labo, mits vooraf aanpassingen zoals pH, de geleidbaarheid ... om te voldoen aan de randvoorwaarde. Deze aanpassingen, met de registratie van de fysico- chemische parameters worden gerapporteerd.
- De verdunde testoplossingen worden in geschikte testrecipiënten (bijv. cuvetten, of microtiterplaat) bereid, en voor de meting op de juiste temperatuur $15^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ geïncubeerd.

Testorganismen:

- Gevriesdroogde bacteriën (commercieel verkrijgbaar, bewaard bij -20°C) worden met gekoelde reconstitutievloeistof in suspensie gebracht, mits goed homogeniseren en vervolgens incubatie bij de juiste temperatuur ($4^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, en instructies fabrikant).
- De bacteriën in suspensie kunnen binnen maximum 4 uur na reconstitutie gebruikt worden voor een test, en mits voldaan is aan de geldigheidscriteria van de test (zie 4.5.3.1).
- Voor elke nieuwe suspensie van bacteriën, indien meerdere monsters worden getest, zal in parallel de referentiestof getest worden.

Testuitvoering:

- Het gewenste volume van de bacteriesuspensie wordt in de geschikte gethermostatiseerde testrecipiënten gebracht via nauwkeurig pipetteren om op de juiste temperatuur te incuberen en men wacht 5 – 15 min⁵.
- Vervolgens wordt de luminescentie gemeten, als achtergrondmeting voor tijdstip 0 (chronometreer) van de bacteriesuspensie in elk van de testrecipiënten. Het resultaat wordt geregistreerd door het toestel, via computer of manueel als ruwe data genoteerd.
- Meteen daarna worden in steeds dezelfde volgorde, overeenkomstig de meetvolgorde de diluties van de referentiestof of monsters nauwkeurig gepipetteerd bij de bacteriënsuspensie, voor incubatie op $15^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en de klok wordt ingesteld voor meting vervolgens op 5', 15' en 30' in het toestel. Deze meetresultaten worden geregistreerd door het toestel, via computer of manueel als ruwe data genoteerd.

Berekeningen en resultaat:

- De berekeningen worden uitgevoerd aan de hand van software voorzien bij het meettoestel, of via een rekentemplate van het labo met formules volgens ISO-richtlijn 11348-3.
- De parameters m.b.t. de geldigheidscriteria van de test (zie 4.5.3.1) worden geverifieerd. Indien niet voldaan wordt zal de test herhaald worden, eventueel met een nieuwe suspensie van bacteriën.
- Het resultaat wordt uitgedrukt als het % effect (inhibitie van bioluminescentie) bij de hoogste testconcentratie na 30' afleestijd (limiettest), of als EC50 in % monster met 95% confidentielimiet na 30' afleestijd (verduunningsreeks).

~~(5) Indien deze test wordt uitgevoerd in opvolging van een voorgaande test, en binnen de 3 u van ontdooien van gelyofiliseerde bacteriën, dan kan dezelfde bacteriesuspensie gebruikt worden, zie stap 13-16, en vallen deze stappen (in blauw) in het hierna beschreven uitvoeringsschema weg.~~

Uitvoering:

1. ~~Het toestel wordt opgezet, en wanneer de testblok op temperatuur is verschijnt een groen signaal zodat er gestart kan worden.~~

⁵ Volume, type testrecipiënt en incubatietijd tot meting tijdstip 0 zijn constant voor elke 0-meting, maar kunnen beperkt variëren tussen meetinstrumenten, en overeenkomstige methode

2. ~~De te testen watermonsters/referentiestof zijn klaar voor gebruik (op kamertemperatuur, randvoorwaarden geverifieerd, en mogelijke interferenties bijv. kleurcorrectie gepland).~~
3. ~~Test parameters worden ingesteld, indien software met computer wordt gebruikt.~~
4. ~~Plaats nieuwe cuvetten in de wells A1-A5 en B1-B5 voor monster 1, C1-C5 en D1-D5 voor watermonster 2, een cuvet in de reagent well (S), en een cuvet in F3 (zie Figuur 1).~~
5. ~~Breng 1000 µl reconstitutie-oplossing in de reagent well.~~
6. ~~Breng 1500 µl diluent in cuvette F3.~~
7. ~~Breng telkens 1000 µl diluent in cuvetten in A1-A4, en 1000 µl diluent in cuvetten C1-C4.~~
8. ~~Breng monster 1 in cuvet A5;
 - o ~~Indien geleidbaarheid van het monster < 28000 µS/cm, breng 2.5 ml in cuvet A5, voeg 250 µl OAS toe, meng grondig en verwijder terug 750 µl.~~
 - o ~~Indien geleidbaarheid van het monster ≥ 28000 µS/cm en ≤ 48000 µS/cm, breng 2.0 ml in cuvet A5~~
 - o ~~Indien geleidbaarheid van het monster > 48000 µS/cm, verdun het monster met diluent in een apart recipiënt tot geleidbaarheid 48000 µS/cm, en breng van verdunde monster 2 ml in cuvet A5.~~~~
9. ~~Herhaal stap 8: voor monster 2 in cuvet C5.~~
10. ~~Maak 1:1 seriële dilutie door 1000 µl uit cuvet A5 te transfereren naar cuvet A4, goed mengen met pipet, en transfereer 1000 µl uit A4 naar A3, goed mengen en transfereer 1000 µl uit A3 naar A2, goed mengen, en tot slot verwijder 1000 µl uit A2. In cuvet A1 blijft uitsluitend 1000 µl als blanco.~~
11. ~~Herhaal stap 10: voor monster 2 in cuvetten C5-C2. In cuvet C1 blijft uitsluitend 1000 µl als blanco.~~
12. ~~Wacht 5 minuten.~~
13. ~~Men neemt een tube met gelyofiliseerde bacteriën uit de diepvries (S).~~
14. ~~Schudt de tube zodat het pellet van de bacteriesuspensie op de bodem zakt van de tube (vermijdt opwarming van tube door de handen).~~
15. ~~Neem de cuvet met gekoelde reconstitutie-oplossing uit de reagent well, en breng de inhoud bij de tube met de bacteriën. Sluit de tube af, en zwenk de tube een 3-tal keer om de bacteriesuspensie grondig te mengen.~~
16. ~~Breng het geheel over in de cuvet die in de reagent well koud staat, en suspendeer een 10-tal keer met een pipet van 500 µl om te mengen. Deze bacterie-suspensie kan maximaal gedurende 3 uur gebruikt worden.~~
17. ~~Breng nu 150 µl van de bacteriesuspensie naar cuvet F3 waarin reeds dilutie-oplossing was, en meng door herhaaldelijk te suspenderen met de pipet.~~
18. ~~Breng 100 µl uit de F3 cuvet met verdund reagent naar elk van de cuvetten B1-B5.~~
19. ~~Herhaal stap 18: voor cuvetten D1-D5.~~
20. ~~Wacht 15 minuten.~~
21. ~~Plaats een cuvet in de READ cell, en druk op set.~~
22. ~~Meet vervolgens in de READ cell nu elk van de cuvetten B1-B5, (en registreer indien niet gekoppeld met computer), dit is de I_0 -of achtergrond meting voor bioluminescentie op tijdstip 0.~~
23. ~~Pipetteer nu onmiddellijk 900 µl uit elk van de cuvetten A1-A5, en transfereer naar corresponderende wells in onderliggende rij B, dus naar B1-B5, en meng door herhaaldelijk suspenderen met de pipet. Stel de klok in op 30 min.~~
24. ~~Herhaal stap 22 voor de cuvetten D1-D5, voor meting I_0 (en registreer).~~
25. ~~Herhaal stap 23, voor de transfer van 900 µl uit cuvetten C1-C5 naar D1-D5. Stel nu ook de klok in op 30 min.~~
26. ~~Na 30 minuten worden de cuvetten B1-B5 gemeten voor bioluminescentie I_{30min} . De resultaten worden geregistreerd, of via computer connectie opgeslagen voor~~

berekening.

~~27. Herhaal stap 26 voor de cuvetten D1-D5.~~

- ~~28. De meetcuvetten uit de thermoblok worden verwijderd als toxisch afval. De bacteriesuspensie in de REAGENT-well kan gebruikt worden voor een volgende test mits binnen de 3 uur na openen van het flesje uit de diepvries.~~
- ~~29. Het resultaat wordt berekend met beschikbare software met % effect voor elke dilutie, en een EC_{50} voor 30 min met 95% confidentie interval en geregistreerd. Voor details over berekeningen wordt verwezen naar de handleiding.~~
- ~~30. De berekening van de EC_{50} voor de fenolstandaard (100 mg/l) moet tussen 13 en 26 mg/l liggen.~~

4.5.2 CORRECTIE VOOR KLEUR EN/OF TURBIDITEIT

Voor watermonsters (milieumatrices), waar interferenties door kleur, aanwezigheid van deeltjes of troebeling, het gemeten luminescentie signaal kunnen beïnvloeden bij de bacterie test moet er steeds gecorrigeerd worden.

Hiervoor wordt een spectrofotometrische meting uitgevoerd van het watermonster, bij elke concentratie die getest werd. Indien het watermonster aangepast werd met OAS, dan zal er van dit monster, en de corresponderende verdunningen, een bereiding gemaakt worden voor de spectrofotometrische meting bij 490 nm.

Resultaten van de spectrofotometrische metingen bij elk staal, en verdunning worden geregistreerd voor invoer in rekenprogramma van de **beschikbare Microtox software bij het gebruikte toestel of via eigen rekentemplate.**

~~Men roept de resultaten file op, en kiest 'Test', en vervolgens 'Enter colour correction data'. Voor de achterliggende berekeningen wordt verwezen naar de handleiding Microtox.~~

Een gecorrigeerde % effect waarde voor elke testconcentratie, en indien van toepassing een nieuwe EC_{50} waarde worden berekend en gerapporteerd als gecorrigeerde waarde.

4.5.3 KWALITEITSCONTROLE

4.5.3.1 EERSTELIJNSCONTROLE

Beslissingscriterium voor geldigheid van de test:

- Een referentiestof wordt voor elke aangemaakte bacteriesuspensie getest om te toetsen of de organismen een normale gevoeligheid vertonen. Als referentiestof wordt **bijv.** fenol gebruikt waarvan de EC_{50} waarde tussen 13 en 26 mg/l moet liggen bij de test met een verdunningsreeks voor 30 min. blootstelling.
- De spontane lichtdaling van de blanco, nl. de vermindering van I_0 tot I_{30min} , mag maximaal 60% bedragen. Een te snelle lichtafname duidt op een slechte kwaliteit van de bacteriële batch, en dan mag die niet gebruikt worden voor een test.
- De variatie tussen de metingen voor alle testcondities in eenzelfde test, op tijdstip $t=0$ (controle= achtergrond van alle stalen, I_0) moet $\leq 10\%$. Grotere afwijkingen wijzen op een pipetteerfout waardoor het bacterie-aantal niet gelijk is in iedere cuvet.

Deze waarden van de 3 criteria worden bijgehouden in controle kaarten.

Herkomst en kwaliteit van testorganismen:

- De herkomst van de organismen moet getraceerd kunnen worden (batchnummer, datum).

4.5.3.2 TWEDELIJNSCONTROLE

- Een test op een toxisch watermonster⁶ wordt in duplo uitgevoerd volgens het protocol **voor limiet en verdunningsreeks** ~~“81.9% basic test”~~ aan hierna vermelde frequentie.
 - o De EC₅₀ waarden worden geregistreerd in een statistische controlekaart, met het 95% confidentie interval.
 - o Duplo waarden voor % effect voor elke testconcentratie mogen onderling niet meer dan 20% verschillen.
 - o De minimale frequentie voor test op duplo monsters:
 - Bij wekelijkse uitvoering van de test: driemaandelijks.
 - Bij maandelijkse uitvoering: zesmaandelijks.
 - Bovendien zal ieder van de betrokken uitvoerders minstens 1 maal per jaar een test volgens het gangbare protocol om EC₅₀ te bepalen en % effect bij hoogste testconcentratie.
- Het laboratorium is verplicht om minstens 1x/maand, in iedere maand waarin minstens één test uitgevoerd wordt, een test in parallel op te zetten van een verdunningsreeks van enerzijds het ruwe monster, en anderzijds het monster met een spike van 1 concentratie van steeds eenzelfde referentiestof (bijv. deze die in ISO-ringtesten worden gebruikt):
 - o Men kiest een willekeurig monster⁷ dat bij aankomst en na controle van de randvoorwaarden in 2 deelstalen wordt verdeeld.
 - o De spike wordt gedoseerd aan steeds dezelfde concentratie die zo dicht mogelijk bij de 50% effect concentratie ligt. Voor de bereiding van de spike moet de verdunning vanuit een stockoplossing in het monster worden toegevoegd aan maximum 5% v/v of lager.
 - o De resultaten als % inhibitie bij elke concentratie van het milieumonster, en van het milieumonster met spike worden bijgehouden op een controlekaart en zullen gebruikt worden voor het bepalen van de reproduceerbaarheid van de methode.

4.5.3.3 DERDELIJNSCONTROLE

Minstens 1x per jaar deelnemen aan een externe ringtest, indien die georganiseerd wordt (bijv. Aquacheck).

4.5.3.4 OPVOLGING VAN AFWIJINGEN

Indien de EC₅₀ resultaten, of de % effect waarden van de duplo monsters niet voldoen aan de statistische grenzen, of als één of meer van de geldigheidscriteria bij testuitvoering niet voldoen, dan dient een analyse van de oorzaak en reikwijdte uitgevoerd te worden. Indien hieruit blijkt dat bepaalde resultaten onbetrouwbaar zijn mogen deze niet gerapporteerd worden en dient een nieuwe bemonstering te worden uitgevoerd van de geteste waters. Indien van toepassing dient ook de impact op eerder gerapporteerde resultaten te worden nagegaan.

⁶ Bij gebrek aan toxische milieumonsters kan een monster aangemaakt worden met toevoeging van een referentiestof (positieve controle voor de bacterietest), bijv. zinksulfaat aan 50 mg/l

⁷ Indien voorkennis, dan kiest men bij voorkeur monsters die geen tot lage acute toxiciteit hebben (EC₅₀ < 50%).

4.5.4 RAPPORTERING

Het testrapport bevat:

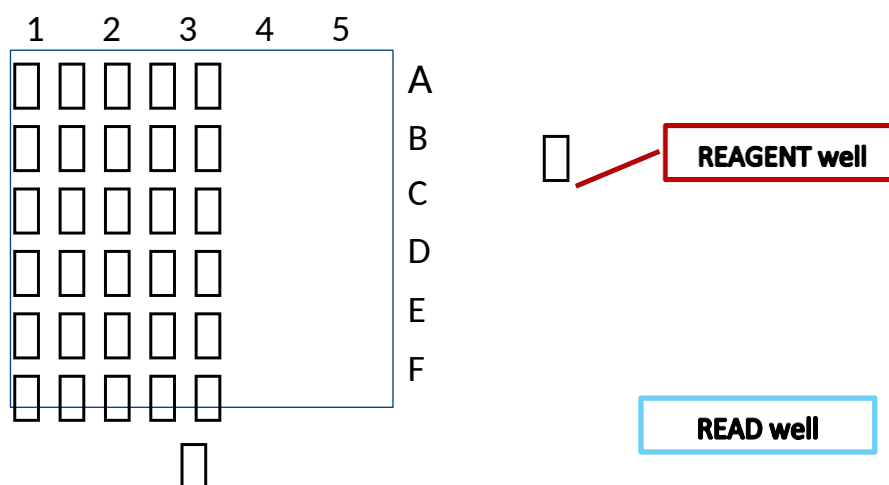
- De identificatie van het watermonster, gegevens over monsternamen, datum van testuitvoering met monster, resultaten van meting van de randvoorwaarden **in het ruwe monster met beschrijving van** aanpassingen, indien van toepassing.
- Verwijzing naar de betreffende WAC-methode voor ecotoxiciteit, en WAC-methode voor bepaling van fysicochemische parameters.
- Gegevens over het testorganisme (naam, herkomst, batch), en protocol van testuitvoering (bijv. met kleurcorrectie)
- Resultaten:
 - o Fysicochemische parameters van testoplossing, en eventuele aanpassingen (bijv. toevoeging OAS) **met rapportage van geleidbaarheid**.
 - o % effect voor bioluminescentie na 30 min. bij de hoogst geteste concentratie watermonster indien beoordeling volgens limiettest.
 - o EC₅₀ voor bioluminescentie na 30 min en % effect in de hoogst geteste concentratie van het watermonster indien beoordeling op basis van verdunningsreeks
- Opmerkingen en afwijkingen.

5 REFERENTIES

- ISO 11348 (2007). Water quality — Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test)—Part 3: Method using freeze-dried bacteria.
- Microtox Manual. A Toxicity Testing Handbook. Microbics Corporation. Versie 1992. 5 delen.
- MicrotoxOmni™ Software for Windows®, AZUR.
- Postma J.F., De Valk S., Dubbeldam M., Maas J.L., Tonkes M., Schipper C.A. & B. J. Kater (2002). Confounding factors in bioassays with freshwater and marine organisms. *Ecotoxicology and environmental safety* 53, 226-237.

BIJLAGE A : METHODE BESCHRIJVING BIJ GEBRUIK VAN HET MICROTOX® TOESTEL.

Het Microtox® toestel bestaat uit een gethermostatiseerde testblok op $(15 \pm 1)^\circ\text{C}$ voor 30 cuvetten, een gethermostatiseerde cel voor de bewaring van de bacteriën bij $(5.5 \pm 1)^\circ\text{C}$, en een gethermostatiseerde meetcel op $(15 \pm 1)^\circ\text{C}$ voor 1 cuvet. Het toestel kan onafhankelijk werken, en de meetresultaten voor luminescentie komen op een display om te registreren en apart te verwerken. Het toestel kan eveneens verbonden worden met een computer en de geschikte software (bijv. MicrotoxOmniTM Software), waarbij de meetgegevens meteen verwerkt worden volgens standaard templates. Voor specificaties van toestel en software doet men beroep op de corresponderende handleidingen (bijv. Microtox Manual).



Figuur 1: Test set up, bijvoorbeeld voor het Microtox toestel.

PROTOCOL 81.9% BASIC TEST VOOR LIMIETTEST EN VERDUNNINGSREEKS

Dit protocol laat toe een resultaat te bekomen, als 50% effect voor inhibitie van bioluminescentie van een verdunningsreeks van het watermonster, relatief t.o.v. de spontane daling van de controle (blanco). In belang van kostenefficiëntie wordt enkel afleestijd 30 minuten gekozen. Indien een limiettest moet uitgevoerd worden is het voldoende het % effect bij de hoogst geteste concentratie te rapporteren.

Via dit protocol kunnen er 2 monsters gelijktijdig getest worden.

Test parameters:

- 1 controle (of blanco), met 1 replica,
- 2 monsters (i.v.t.) met elk 1 replica⁸,
- 4 diluties met dilutie factor 2,
- Initiële concentratie 81.9%
- Test tijd 30 min⁹

⁸ Bij een 1^{ste} testreeks met de bacteriesuspensie zal één van de watermonsters de referentiestof, fenol zijn.

⁹ Metingen kunnen ook na 5' en 15' uitgevoerd worden, maar niet vereist voor rapportage van resultaat acute toxiciteit. Additionele aflezing in overleg met de klant kan uitgevoerd worden, met voorkeur voor 15'.

- Zero-time reading

(§) Indien deze test wordt uitgevoerd in opvolging van een voorgaande test, en binnen de 3 u van ontdooien van gelyofiliseerde bacteriën, dan kan dezelfde bacteriesuspensie gebruikt worden, zie stap 13-16, en vallen deze stappen (in blauw) in het hierna beschreven uitvoeringsschema weg.

Uitvoering:

1. Het toestel wordt opgezet, en wanneer de testblok op temperatuur is verschijnt een groen signaal zodat er gestart kan worden.
2. De te testen watermonsters/referentiestof zijn klaar voor gebruik (op kamertemperatuur, randvoorwaarden geverifieerd, en mogelijke interferenties bijv. kleurcorrectie gepland).
3. Test parameters worden ingesteld, indien software met computer wordt gebruikt.
4. Plaats nieuwe cuvetten in de wells A1-A5 en B1-B5 voor monster 1, C1-C5 en D1-D5 voor watermonster 2, een cuvet in de reagent well (§), en een cuvet in F3 (zie Figuur 1).
5. Breng 1000 µl reconstitutie oplossing in de reagent well.
6. Breng 1500 µl diluent in cuvette F3.
7. Breng telkens 1000 µl diluent in cuvetten in A1-A4, en 1000 µl diluent in cuvetten C1-C4.
8. Breng monster 1 in cuvet A5,
 - o Indien geleidbaarheid van het monster < 28000 µS/cm, breng 2.5 ml in cuvet A5, voeg 250 µl OAS toe, meng grondig en verwijder terug 750 µl.
 - o Indien geleidbaarheid van het monster ≥ 28000 µS/cm en ≤ 48000µS/cm, breng 2.0 ml in cuvet A5
 - o Indien geleidbaarheid van het monster > 48000 µS/cm, verdun het monster met diluent in een apart recipiënt tot geleidbaarheid 48000 µS/cm, en breng van verdunde monster 2 ml in cuvet A5.
9. Herhaal stap 8: voor monster 2 in cuvet C5.
10. Maak 1:1 seriële dilutie door 1000 µl uit cuvet A5 te transfereren naar cuvet A4, goed mengen met pipet, en transfereer 1000 µl uit A4 naar A3, goed mengen en transfereer 1000 µl uit A3 naar A2, goed mengen, en tot slot verwijder 1000 µl uit A2. In cuvet A1 blijft uitsluitend 1000 µl als blanco.
11. Herhaal stap 10: voor monster 2 in cuvetten C5-C2. In cuvet C1 blijft uitsluitend 1000 µl als blanco.
12. Wacht 5 minuten.
13. Men neemt een tube met gelyofiliseerde bacteriën uit de diepvries (§).
14. Schudt de tube zodat het pellet van de bacteriesuspensie op de bodem zakt van de tube (vermijdt opwarming van tube door de handen).
15. Neem de cuvet met gekoelde reconstitutie oplossing uit de reagent well, en breng de inhoud bij de tube met de bacteriën. Sluit de tube af, en zwenk de tube een 3-tal keer om de bacteriesuspensie grondig te mengen.
16. Breng het geheel over in de cuvet die in de reagent well koud staat, en suspendeer een 10-tal keer met een pipet van 500 µl om te mengen. Deze bacterie suspensie kan maximaal gedurende 3 uur gebruikt worden.
17. Breng nu 150 µl van de bacteriesuspensie naar cuvet F3 waarin reeds dilutie oplossing was, en meng door herhaaldelijk te suspenderen met de pipet.
18. Breng 100 µl uit de F3 cuvet met verdund reagent naar elk van de cuvetten B1-B5.
19. Herhaal stap 18: voor cuvetten D1-D5.
20. Wacht 15 minuten.
21. Plaats een cuvet in de READ cell, en druk op set.
22. Meet vervolgens in de READ cell nu elk van de cuvetten B1-B5, (en registreer indien niet gekoppeld met computer), dit is de I_0 of achtergrond meting voor bioluminescentie op tijdstip 0.

23. Pipetteer nu onmiddellijk 900 µl uit elk van de cuvetten A1-A5, en transfereer naar corresponderende wells in onderliggende rij B, dus naar B1-B5, en meng door herhaaldelijk suspenderen met de pipet. Stel de klok in op 30 min.
24. Herhaal stap 22 voor de cuvetten D1-D5, voor meting I0 (en registreer).
25. Herhaal stap 23, voor de transfer van 900 µl uit cuvetten C1-C5 naar D1-D5. Stel nu ook de klok in op 30 min.
26. Na 30 minuten worden de cuvetten B1-B5 gemeten voor bioluminescentie $I_{30\text{min}}$. De resultaten worden geregistreerd, of via computer connectie opgeslagen voor berekening.
27. Herhaal stap 26 voor de cuvetten D1-D5.
28. De meetcuvetten uit de thermoblok worden verwijderd als toxisch afval. De bacteriesuspensie in de REAGENT-well kan gebruikt worden voor een volgende test mits binnen de 3 uur na openen van het flesje uit de diepvries.
29. Het resultaat wordt berekend met beschikbare software met % effect voor elke dilutie, en een EC_{50} voor 30 min met 95% confidentie interval en geregistreerd. Voor details over berekeningen wordt verwezen naar de handleiding.
30. De berekening van de EC_{50} voor de fenolstandaard (100 mg/l) moet tussen 13 en 26 mg/l liggen.

Prestatiekenmerken

INHOUD

1	DOEL EN TOEPASSINGSGBIED	4
2	TERMEN EN DEFINITIES	5
2.1	<i>Juistheid (Eng: Trueness)</i>	5
2.2	<i>Precisie (Eng.: Precision)</i>	6
2.3	<i>Herhaalbaarheid (Eng: Repeatability)</i>	6
2.4	<i>Reproduceerbaarheid (Eng.: Reproducibility)</i>	6
2.5	<i>Meetonzekerheid (Eng: Expanded uncertainty)</i>	7
2.6	<i>Selectiviteit en specificiteit (Eng: Selectivity, Specificity)</i>	7
2.7	<i>Aantoonbaarheidsgrens (Eng: Limit of detection)</i>	7
2.8	<i>Bepalingsgrens (Eng: Limit of quantitation)</i>	8
2.9	<i>Lineariteit (Eng: Linearity)</i>	8
2.10	<i>Werkgebied of bereik (Eng: Range, Measuring range, Working range)</i>	8
2.11	<i>Robuustheid (Eng: Ruggedness, Robustness)</i>	9
2.12	<i>Analyse</i>	9
3	ALGEMEEN VALIDATIEPLAN	10
3.1	<i>Selectie van de te bepalen prestatiekenmerken</i>	10
3.2	<i>Bepaling van het toepassingsgebied en eventuele deelgebieden bij de validatie</i>	11
3.3	<i>Omgang met externe eisen</i>	11
3.4	<i>Keuze van de monsters voor een validatieonderzoek</i>	12
4	ALGEMENE PROCEDURE VOOR DE BEPALING VAN DE AFZONDERLIJKE PRESTATIEKENMERKEN	13
4.1	<i>Juistheid</i>	13
4.1.1	<i>Meervoudige analyse van een referentiemateriaal</i>	13
4.1.2	<i>Terugvindingsexperimenten op een geselecteerd monster</i>	14
4.1.3	<i>Evaluatie van de terugvinding en/of afwijking ten opzichte van de referentiewaarde voor verschillende monsters</i>	14
4.2	<i>Herhaalbaarheid en intra-reproduceerbaarheid</i>	15
4.2.1	<i>Meervoudige analyse van hetzelfde monster</i>	16
4.2.2	<i>Duplo-analyse van verschillende monsters</i>	16
4.3	<i>Selectiviteit en robuustheid</i>	17
4.4	<i>Aantoonbaarheidsgrens en bepalingsgrens</i>	18
4.4.1	<i>Meervoudige analyse van een praktijkmonster met laag gehalte</i>	18
4.4.2	<i>Duplo-analyse van verschillende praktijkmonsters met laag gehalte</i>	18
4.5	<i>Lineariteit - modelafwijking</i>	19
4.6	<i>Werkgebied</i>	20

5	REFERENTIES	21
	BIJLAGE A RICHTLIJNEN MET BETREKKING TOT ADDITIE	22
A.1	ALGEMENE RICHTLIJNEN VOOR ADDITIE	22
A.2	SPECIFIEKE RICHTLIJNEN VOOR ADDEREN VAN VERSCHILLENDE MATRICES VOOR ORGANISCHE PARAMETERS	22
A.2.1	Adderen aan vloeistoffen	22
	BIJLAGE B MINIMALE EISEN MET BETREKKING TOT BEPALINGSGRENZEN	23
B.1	ANORGANISCHE PARAMETERS	23
B.2	ORGANISCHE PARAMETERS	31

1 DOEL EN TOEPASSINGSGEBIED

Het toepassingsgebied is verruimd tot alle analysemethoden. De aanpak voor het onderzoek inzake de gelijkwaardigheid van methoden wordt niet meer opgenomen vermits een statistische benadering voor gelijkwaardigheid een aantal beperkingen inhoudt qua matrices, concentratiegebied, enz. Het oordeel van expert(en) is doorslaggevend voor de uitspraak inzake de gelijkwaardigheid van analysemethoden.

Analyseresultaten zijn slechts benaderingen van de ware waarde. De mate waarin analyseresultaten kunnen afwijken wordt gekwantificeerd met prestatiekenmerken. Zij weerspiegelen de prestatie (performantie) van een analysemethode onder verschillende omstandigheden. Het maatschappelijk belang van metingen maakt het noodzakelijk om voldoende inzicht te hebben in de mogelijkheden en beperkingen van de gebruikte analysemethoden.

De validatie van een analysemethode wordt gedefinieerd als het aantonen dat de (beschreven) analysemethode geschikt is voor de beoogde toepassing. Dit impliceert het vaststellen van de relevante prestatiekenmerken van de analysemethode en het evalueren van de geschiktheid voor het beoogde doel. Dit wordt in ISO 8402 als volgt verwoord: 'confirmation by examination and provision of objective evidence that the particular requirements for a specified intended use are fulfilled'. Hierbij dient vermeld te worden dat in de huidige praktijk er niet steeds duidelijkheid is betreffende externe eisen (uit regelgeving, contracten, ...) en de status ervan.

Methoden moeten gevalideerd worden telkens wanneer het nodig is om te verifiëren dat de prestatiekenmerken geschikt zijn voor toepassing bij een specifiek analytisch probleem. Dit is bijvoorbeeld zo voor nieuwe analysemethoden die met een bepaald doel ontwikkeld zijn, maar ook voor reeds gevalideerde analysemethoden die aangepast of uitgebreid worden, die blijkens de kwaliteitscontrole met de tijd veranderen, die in een ander laboratorium of door andere analisten of met andere apparatuur gebruikt worden, ... De verkregen prestatiekenmerken zijn daarom alleen geldig voor het desbetreffende laboratorium, en de uitvoeringsomstandigheden (analysemethode, ...) dienen hierbij te zijn vastgelegd. De uitgebreidheid van een (her)validatie hangt af van de mate van verandering. Eurachem en de nationale accreditatie-organismen zoals Belac stellen dat een minimale validatie steeds aangewezen is, ook indien een genormeerde analysemethode toegepast wordt.

Met betrekking tot de te valideren parameters kan men een onderscheid maken tussen kwalitatieve analysemethoden, kwantitatieve analysemethoden op hoog concentratieniveau en kwantitatieve analysemethoden op laag concentratieniveau. De meerderheid van de milieu-analysemethoden behoren tot laatstgenoemde categorie en bijgevolg is deze procedure ook hoofdzakelijk op dit type methoden gericht. Algemeen dient bij dergelijke validatie steeds maximale aandacht aan juistheid en precisie geschonken te worden en, indien relevant, ook aan de aantoonbaarheidsgrens.

Van elk validatieonderzoek wordt een apart rapport gemaakt, dat voldoet aan vooraf vastgelegde regels wat betreft opbouw, inhoud, beoordeling, goedkeuring en archivering.

Deze procedure behandelt enkel de intralaboratoriumvalidatie van analysemethoden voor fysische en chemische univariate grootheden. Voor de bepaling van prestatiekenmerken voor een groep van laboratoria worden o.a. in ISO 5725 procedures gegeven; de bepaling van dergelijke prestatiekenmerken vergt interlaboratoriumonderzoek.

2 TERMEN EN DEFINITIES

2.1 JUISTHEID (ENG: TRUENESS)

De juistheid van een analysemethode is de mate van overeenstemming tussen het gemiddelde van een reeks meetwaarden en de werkelijke waarde of de als werkelijk aangenomen waarde van de te bepalen grootte (cfr. ISO 3534-1). De gebruikelijke maat voor de juistheid is de bias b , die dus overeenkomt met de (positieve of negatieve) systematische fout¹.

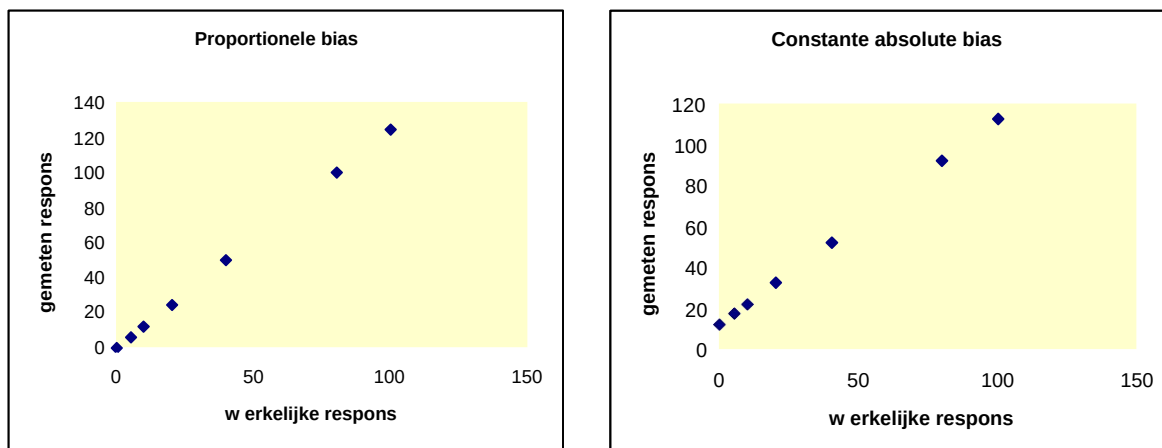
De verwijzing van juistheid naar de term accuraatheid (Eng. Accuracy), nauwkeurigheid of een afgeleide ervan wordt door Eurachem ontraden. In hun meest gangbare betekenis omvatten deze termen een combinatie van 'random' componenten en de 'bias' component, en sluiten ze dus meer aan bij de term meetonzekerheid.

Met de term terugvinding T (Eng: Recovery) wordt de fractie van de component bedoeld die bij analyse wordt teruggevonden, na toevoeging onder gedefinieerde omstandigheden van een bekende hoeveelheid component aan het monster. In dit document worden terugvindingsexperimenten als één van de mogelijke werkwijzen voor bepaling van de juistheid van een analysemethode beschouwd en wordt geen systematisch onderscheid gemaakt tussen de termen juistheid en terugvinding.

In het geval een (referentie)methode wordt opgelegd voor het meten van een welbepaalde grootte, kan juistheid eveneens worden geïnterpreteerd als zijnde de mate van overeenstemming tussen de meetwaarde van het laboratorium en de als werkelijk aangenomen waarde van de te bepalen grootte met dezelfde methode (gewoonlijk volgend uit een interlaboratoriumvergelijking). In dit geval spreekt men van de bias ten opzichte van een methodegemiddelde. De keuze van de te rapporteren bias dient uit de context van de analyse-aanvraag duidelijk te zijn, en zo nodig afgesproken te worden met de klant.

Er kan verder een opsplitsing gemaakt worden tussen twee gevallen van bias, namelijk constante absolute bias en proportionele bias. Bij proportionele bias is de relatieve afwijking op ieder concentratieniveau constant en wordt deze procentueel uitgedrukt. In het geval van absolute constante bias is de afwijking op ieder concentratieniveau, absoluut uitgedrukt, even groot. Onderstaande grafieken verduidelijken beide gevallen van juistheidseffecten ten opzichte van het ideale geval (diagonaal). Voor hogere gehalten overheerst het proportionele deel van de juistheid meestal het constante deel. Voor gehalten nabij de aantoonbaarheidsgrens spelen proportionele juistheidseffecten een ondergeschikte rol.

¹ In principe is de systematische afwijking een gemiddelde dat het resultaat is van een oneindig aantal metingen van dezelfde meetgrootte, uitgevoerd onder herhaalbaarheidscondities, verminderd met de ware waarde van de meetgrootte (cfr. NPR 2814).



2.2 PRECISIE (ENG.: PRECISION)

De precisie van een analysemethode is de mate van spreiding in de analyseresultaten die verkregen worden door de analysemethode een herhaald aantal malen onder vastgelegde condities op hetzelfde monster uit te voeren (cfr. ISO 3534-1). De gebruikelijke maat voor de precisie is de standaardafwijking of de variatiecoëfficiënt (relatieve standaardafwijking) van de testresultaten, dit wil zeggen dat de precisie wordt uitgedrukt als imprecisie. Naar de condities wordt normaal gerefereerd met de termen herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid.

2.3 HERHAALBAARHEID (ENG: REPEATABILITY)

Met herhaalbaarheid wordt bedoeld de precisie verkregen bij uitvoering van alle betreffende metingen door dezelfde analist, met dezelfde meetapparatuur, op zo dicht mogelijk bij elkaar gelegen tijdstippen (cfr. ISO 3534-1). De gebruikelijke maat is de herhaalbaarheidsstandaardafwijking s_r of de herhaalbaarheidsvariatiecoëfficiënt CV_r .

2.4 REPRODUCEERBAARHEID (ENG.: REPRODUCIBILITY)

Met reproduceerbaarheid wordt bedoeld de precisie verkregen bij uitvoering van alle betreffende metingen onder variabele omstandigheden, dit wil zeggen in verschillende laboratoriumruimten, door verschillende analisten, met verschillende apparaten en batches reagentia/standaarden, op verschillende tijdstippen met grotere tussenpozen (cfr. ISO 3534-1). Bij een uitspraak met betrekking tot reproduceerbaarheid dient bijgevolg aangegeven te worden welke condities veranderd werden.

Deze procedure richt zich enkel op de reproduceerbaarheid binnen een bepaald laboratorium (kortweg intra-reproduceerbaarheid), en als minimale eis hiervoor wordt vooropgesteld dat de factor tijd gevarieerd wordt, met andere woorden dat de betreffende analyses op verschillende dagen en in verschillende analysereeksen worden uitgevoerd (Eng.: Time-dependent intermediate precision). De gebruikelijke maat is de intra-reproduceerbaarheidsstandaardafwijking s_R of de intra-reproduceerbaarheidsvariatiecoëfficiënt CV_R .

2.5 MEETONZEKERHEID (ENG: EXPANDED UNCERTAINTY)

De meetonzekerheid U wordt gedefinieerd als de halve lengte van een interval waarbinnen de ware waarde wordt verwacht te liggen, en dit bij een bepaald betrouwbaarheidsniveau. In ISO GUM wordt dit als volgt verwoord: 'Quantity defining an interval about a result of a measurement that may be expected to encompass a large fraction of the distribution of values that could reasonably be attributed to the measurand'.

In principe dient de meetonzekerheid alle factoren te omvatten die van invloed zijn op het resultaat, gecombineerd volgens gevestigde procedures. Relevante factoren zijn:

- de monsterbewaring in het laboratorium;
- de initiële monstervoorbehandeling (bijv. homogenisatie, droging, deelmonsterneming, ...);
- de monstervoorbereiding (bijv. extractie, ontsluiting, zuiveringen, ...);
- de eigenlijke meting van het preparaat (bijv. kalibratie, interferenties, ...) en
- de berekening van het analyseresultaat (bijv. correcties, ...).

In het kader van deze procedure is er van uitgegaan dat de meetonzekerheid zich beperkt tot het eigenlijke laboratoriumgebeuren (d.w.z. de vijf hoger vermelde stappen) en dat factoren zoals de monsterneming zelf (bijv. representativiteit, ...) en het transport van het monster naar het laboratorium (bijv. conservering, ...) niet per definitie opgenomen worden in de meetonzekerheid.

De prestatiekenmerken die de meetonzekerheid - of tenminste een gedeelte ervan - bepalen zijn de intra-reproduceerbaarheid van de analysemethode (voor wat de toevallige afwijking betreft) en de juistheid van de analysemethode (voor wat de systematische afwijking betreft). Door het in rekening brengen van een factor (Eng. coverage factor) op de toevallige afwijking wordt de waarschijnlijkheid dat de ware waarde in het interval ligt voldoende groot gemaakt.

Merk op dat meetonzekerheid geen prestatiekenmerk is, maar een karakteristiek van een meetwaarde. Mede om deze reden wordt meetonzekerheid in een apart deel nader bekeken (zie WAC/VI/A/002).

2.6 SELECTIVITEIT EN SPECIFICITEIT (ENG: SELECTIVITY, SPECIFICITY)

De selectiviteit van een analysemethode is de (on)afhankelijkheid van een andere grootheid dan de meetgrootte, met andere woorden de mate waarmee ze de te bepalen component in een mengsel of matrix kan onderscheiden van andere bestanddelen (cfr. IUPAC, NEN 7777). Bij een voldoende selectieve analyse worden de bepalingcondities zo gekozen dat de bijdragen van andere bestanddelen geëlimineerd worden of binnen de onzekerheidsmarge vallen. Deze potentiële bijdragen betreffen zowel interferenties (vanwege grootheden die zelf een signaal veroorzaken) als matrixeffecten (vanwege grootheden die het signaal van de meetgrootte veranderen).

Een analysemethode is specifiek als ze enkel reageert op de te bepalen component (cfr. AOAC, IUPAC). Specificiteit kan dus beschouwd worden als de ultieme selectiviteit. Het gebruik van deze term wordt door IUPAC ontraden.

2.7 AANTOONBAARHEIDSGRENS (ENG: LIMIT OF DETECTION)

De aantoonbaarheidsgrens AG (ook wel detectielimiet genoemd) is de kleinste hoeveelheid stof of laagste concentratie van de component in het monster die met een bepaalde (en redelijke) statistische waarschijnlijkheid met de analysemethode aangetoond kan worden, met andere

woorden waarvan de aanwezigheid nog met een bepaalde (on)zekerheid kan worden vastgesteld (cfr. AOAC, IUPAC). Het is bijgevolg een kwalitatief criterium.

In de gebruikelijke operationele definitie wordt het aspect waarschijnlijkheid in rekening gebracht door de aantoonbaarheidsgrens gelijk te stellen aan 3 maal de standaardafwijking op dit niveau (cfr. IUPAC). De aantoonbaarheidsgrens is aldus de waarde van de meetgrootte waarbij de variatiecoëfficiënt bij conventie 33% bedraagt. Voor meer achtergrondinformatie hieromtrent wordt verwezen naar NEN 7777 en de daarin opgenomen referenties.

2.8 BEPALINGSGRENS (ENG: LIMIT OF QUANTITATION)

De bepalingsgrens, BG, wordt gedefinieerd als de kleinste hoeveelheid stof of laagste concentratie van de component in het monster die met een bepaalde (en redelijke) precisie en juistheid met de analysemethode gekwantificeerd kan worden, met andere woorden waarvan de meetwaarde nog met een bepaalde (on)zekerheid kan worden vastgesteld. In tegenstelling tot de aantoonbaarheidsgrens is de bepalingsgrens een kwantitatief criterium.

Pragmatisch wordt de bepalingsgrens in het kader van deze procedure gelijk gesteld aan 6 maal de standaardafwijking in eenheden van de meetgrootte. Bijgevolg is de bepalingsgrens die waarde van de meetgrootte waarbij de variatiecoëfficiënt 17% bedraagt.

2.9 LINEARITEIT (ENG: LINEARITY)

De lineariteit van een analysemethode is de eigenschap dat binnen vastgelegde grenzen er een rechtlijnig verband bestaat tussen de respons en de hoeveelheid (concentratie) van de te bepalen component. Het lineair gebied is het overeenkomstig werkgebied.

Indien niet aan lineariteit is voldaan, dient het werkgebied te worden versmald of moet worden overgeschakeld op een andere (bv. kwadratische) functie tussen respons en hoeveelheid (concentratie) van de te bepalen component.

Met het begrip modelafwijking wordt algemeen de afwijking ("lack of fit") bedoeld van het aangenomen verband tussen meetgrootte en respons.

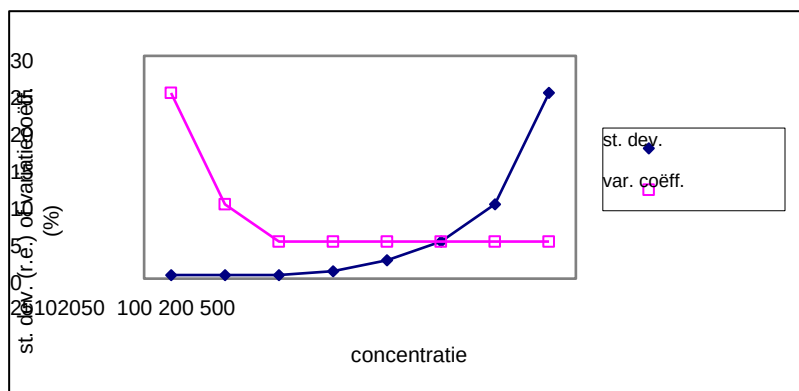
2.10 WERKGEBIED OF BEREIK (ENG: RANGE, MEASURING RANGE, WORKING RANGE)

Als extrapolatie van de IUPAC-definitie die instrumentgericht is, wordt het werkgebied van een analysemethode gedefinieerd als het interval tussen de kleinste en de grootste hoeveelheid (concentratie) van de te bepalen component waarvoor de analysemethode gevalideerd is, met andere woorden waarbinnen de prestatiekenmerken aan gedefinieerde eisen voldoen.

Hieruit volgt dat een werkgebied meestal vooropgesteld wordt bij het begin van het validatieonderzoek, rekening houdend met bv. toestelgegevens, verwachte gehalten in monsters, van toepassing zijnde regelgeving, ... Bij een optimaal werkgebied kunnen courante concentraties probleemloos worden gemeten en liggen kritische (cfr. regelgeving) concentraties niet helemaal aan de uitersten van het werkgebied.

Men noemt een werkgebied homogeen indien over het hele werkgebied de standaardafwijking (standaard deviatie) constant is (homoscedasticiteit of homogeniteit van de varianties). In praktijk is dit zelden het geval, behalve bij kleine werkgebieden; meestal is in het bovenste deel van het

werkgebied de relatieve standaardafwijking constant (variatiecoëfficiënt) en neemt met andere woorden de standaardafwijking proportioneel toe met de concentratie.



r.e.: respons eenheid

2.11 ROBUUSTHEID (ENG: RUGGEDNESS, ROBUSTNESS)

Onder robuustheid van een methode wordt de ongevoeligheid van het analyseresultaat verstaan voor kleine variaties in uitvoering, omstandigheden en hoedanigheid van afvalstoffen, zoals deze in de praktijk kunnen voorkomen (cfr. AOAC, NEN 7777).

2.12 ANALYSE

In het kader van validatie-experimenten komt het begrip analyse, zoals verder in de tekst vermeld, neer op het zo getrouw mogelijk uitvoeren van de volledige reeks stappen welke een routinemonster in het laboratorium ondergaat, van de gebruikelijke monstervoorbehandeling (deelmonsterneming, ...) tot en met de meting en berekening. Op die manier omvatten de prestatiekenmerken en de meetonzekerheid het gehele laboratoriumgebeuren en karakteriseren ze op een correcte wijze de analysemethode, respectievelijk de meetwaarden, van het laboratorium.

Wat de monstervoorbehandeling betreft komen typisch volgende situaties voor:

- in routine ondergaat het laboratoriummonster in zijn geheel een bepaalde monstervoorbehandeling (homogenisatie, droging, ...) vooraleer een analyseportie wordt afgenomen: in dat geval wordt bij de validatie-experimenten voor elke bepaling uitgegaan van een nieuwe portie van het aldus initieel voorbehandelde monster en volgt deze portie verder volledig de voor routinemonsters gebruikelijke werkwijze;
- in routine wordt uit het laboratoriummonster op welbepaalde wijze een deelmonster genomen, dat vervolgens een verdere voorbehandeling (droging, ...) ondergaat of rechtstreeks gebruikt wordt bij de monstervorbereiding: in dat geval wordt bij de validatie-experimenten voor elke bepaling uitgegaan van een nieuw, op de gebruikelijke manier bekomen, deelmonster uit het laboratoriummonster en volgt dit verder volledig de voor routinemonsters gebruikelijke werkwijze.

Voor de bepaling van parameters waarvoor het hele monster dient in behandeling te worden genomen of die onmiddellijke analyse vereisen (bv. zwevend stof, biologisch zuurstof verbruik, vluchtige organische stoffen...) kan het noodzakelijk zijn om - in het kader van validatie experimenten

- bij de monsternamen verschillende deelmonsters te voorzien.

3 ALGEMEEN VALIDATIEPLAN

In het algemeen worden bij validatieonderzoek de volgende stappen doorlopen (cfr. NEN 7777):

- bepaal op basis van het doel en de status van de analysemethode welke prestatiekenmerken bepaald moeten worden;
- bepaal het toepassingsgebied (matrices en werkgebied) waarvoor de analysemethode gevalideerd moet worden, en in hoeveel deelgebieden dit praktisch moet opgesplitst worden;
- ga na of er externe eisen gelden voor (een deel van) de prestatiekenmerken, en zo ja welke vorm deze hebben;
- ga na welke monsters nodig zijn voor het validatieonderzoek;
- voer het validatieonderzoek uit;
- beoordeel de vastgestelde prestatie in vergelijking met eventuele externe eisen, of (bij ontbreken van externe kwantitatieve eisen) rechtstreeks ten opzichte van het gebruiksdoel;
- rapporteer de resultaten in een validatierapport.

3.1 SELECTIE VAN DE TE BEPALEN PRESTATIEKENMERKEN

Welke prestatiekenmerken bepaald dienen te worden, is vooral afhankelijk van de status van de analysemethode die men wenst uit te voeren.

Voor volledig nieuwe analysemethoden (d.w.z. door het laboratorium geheel zelf ontwikkeld en niet eerder gevalideerd) geldt dat een complete validatie is vereist. Deze omvat altijd de volgende prestatiekenmerken:

- werkgebied;
- juistheid;
- intra-reproduceerbaarheid;
- selectiviteit;
- robuustheid.

indien relevant omvat deze verder:

- aantoonbaarheids- en bepalingsgrens;
- herhaalbaarheid;
- lineariteit, of meer algemeen modelafwijking.

Meestal echter zullen laboratoria bij voorkeur de referentiemethoden overnemen. Dit zijn wettelijk vastgelegde of door de bevoegde overheid aanbevolen analysemethoden, vastgelegd in bijvoorbeeld een compendium of in internationale normen. Indien zulke analysemethode zonder wijzigingen wordt overgenomen, volstaat het in principe aan te tonen dat de essentiële prestatiekenmerken in overeenstemming zijn met de gedocumenteerde en/of met het gebruiksdoel. De uit te voeren validatie omvat dan minimaal:

- juistheid;
- intra-reproduceerbaarheid.

en indien relevant tevens:

- werkgebied;
- aantoonbaarheids- en bepalingsgrens;
- herhaalbaarheid;
- selectiviteit.

Voor een gewijzigde analysemethode, d.i. een analysemethode die reeds was gevalideerd maar waarin een verandering is aangebracht, is een hervalidatie nodig gericht op die prestatiekenmerken die redelijkerwijs door de verandering kunnen beïnvloed worden.

3.2 BEPALING VAN HET TOEPASSINGSGEBIED EN EVENTUELE DEELGEBIEDEN BIJ DE VALIDATIE

Prestatiekenmerken hebben slechts betekenis bij ondubbelzinnig gedefinieerde analyseobjecten en analyseresultaten. Als de analyseprocedure hierover onvoldoende duidelijkheid verschaft, dient voorafgaand aan de validatie een duidelijke interpretatie te worden opgesteld en opgenomen in het validatierapport. Dit geldt bijvoorbeeld voor het aantal onderliggende metingen van een analyseresultaat (één of gemiddelde) en voor eventuele toegepaste correcties (voor extractiestandaarden, procedureblanco, ...). Ook het beoogde toepassingsgebied moet van tevoren worden gespecificeerd, nl. welke matrices (inclusief mogelijke interferenten) en welk werkgebied (eventueel per matrix).

Uitgangspunt is dat bij validatie gelijkaardige matrices zoveel mogelijk worden gecombineerd in één toepassingsgebied. In sommige gevallen kan het wenselijk zijn verschillende deelgebieden (zowel qua matrix als werkgebied) te onderscheiden en afzonderlijk te valideren. De belangrijkste overweging hierbij is voorkennis van, of twijfel over, de effecten van bepaalde interferenten.

In bepaalde gevallen kan worden volstaan met een validatie in de “moeilijkste” matrix. Dit geldt enkel voor zover sprake is van een ondubbelzinnige gradatie, en dient zo nodig per prestatiekenmerk bekeken te worden. Zo kan bijvoorbeeld gebruik gemaakt worden van sterk matrixbelaste afvalwaters om een methode te valideren voor huishoudelijk en industrieel afvalwater, en dergelijke, en kan de op basis van zulke monsters bekomen precisie eventueel aangewend worden als een “worst case” waarde voor het betreffende concentratiebereik in andere watertypes zoals grondwater, oppervlaktewater en drinkwater.

Globaal wordt voor de afzonderlijk te beschouwen matrices bij de validatie van analysemethoden voor water en waterige oplossingen van milieumatrices volgende vuistregel vooropgesteld:

- drinkwater
- afvalwater
 - bijkomend dienen specifieke prestatiekenmerken in oppervlaktewater en/of grondwater onderzocht te worden, voor zover niet gedekt door de reeds gevalideerde matrices, tevens is aanvullend onderzoek met betrekking tot specifieke interferenten nodig voor zover van toepassing (bijvoorbeeld zeewater, zwembadwater,...)

3.3 OMGANG MET EXTERNE EISEN

Omdat de waarde van een prestatiekenmerk wordt verkregen door metingen, is hiermee een onzekerheid verbonden. Dit is vooral van belang wanneer moet getoetst worden of aan extern opgelegde absolute grenswaarden voldaan is. In dat geval moet aangetoond worden dat het prestatiekenmerk met een betrouwbaarheid van tenminste 95% voldoet aan de eis, met andere woorden dat de numerieke waarde van het prestatiekenmerk plus (resp. minus) de onzekerheid kleiner (resp. groter) is dan de bovengrens (resp. ondergrens).

Traditioneel worden externe eisen echter meestal als een zogenaamde geschatte grenswaarde beschouwd en kan worden volstaan met het rechtstreeks vergelijken van de numerieke waarde van het prestatiekenmerk met de grenswaarde.

In de regel geldt dat eventuele uitbijters in de verzamelde analyseresultaten alleen worden verwijderd als de oorzaak bekend is en deze niet de praktijksituatie weerspiegelt (bv. foutieve preparatie van een synthetisch monster, technisch defect meettoestel, ...).

3.4 KEUZE VAN DE MONSTERS VOOR EEN VALIDATIEONDERZOEK

Als algemene regel geldt dat de monsters zoveel mogelijk representatief moeten zijn voor het toepassingsgebied (of het deelgebied). In de verzameling validatiemonsters moeten dus de meest voorkomende matrices vertegenwoordigd zijn, op basis van inzicht in de relatieve aandelen van de verschillende monsters in de monsterstroom van het laboratorium. Eventueel kan de monsterselectie toegespitst worden op de “moeilijkste” matrix, rekening houdend met de onder punt 3.2 beschreven beperkingen.

Intra-reproduceerbaarheid, herhaalbaarheid, selectiviteit en robuustheid worden in principe bepaald op praktijkmonsters of monsters die hierop zoveel mogelijk gelijk zijn (bijv. geaddeerde praktijkmonsters).

Voor validatie van de aantoonbaarheids- en bepalingsgrens gebruikt men, in volgorde van voorkeur, een praktijkmonster of representatief referentiemateriaal met gehalte nabij de verwachte aantoonbaarheidsgrens, een blanco praktijkmonster waaraan de te bepalen componenten werden geaddeerd tot een gehalte nabij de verwachte aantoonbaarheidsgrens, of een blanco praktijkmonster.

Voor validatie van de juistheid gebruikt men, in volgorde van voorkeur maar steeds de gelijkenis met praktijkmonsters voor ogen houdend:

- gecertificeerd referentiemateriaal en deelname aan interlaboratoriumtesten met herleidbare referentiewaarden, dit wil zeggen waarden gerelateerd aan een geschikte (bij voorkeur internationale) meetstandaard;
- geaddeerde praktijkmonsters waarvan de werkelijke waarde gebaseerd is op de gravimetrisch/volumetrisch toegevoegde hoeveelheid, deze kunnen zowel zelf aangemaakt zijn of deel uitmaken van een ‘proficiency testing’; hierbij dient opgemerkt te worden dat additie- experimenten te optimistische resultaten kunnen opleveren omdat het toegevoegde deel van de component niet op dezelfde wijze in het monster opgenomen wordt als het oorspronkelijke deel;
- rondzendmonsters met een consensuswaarde (bijv. gemiddelde waarde uit ‘proficiency testing’ schema’s) waarbij verschillende/gelijke methoden werden toegepast;
- niet-gecertificeerd referentiemateriaal en/of praktijkmonsters met een waarde die onafhankelijk is van het te valideren systeem, bijvoorbeeld bepaald met een andere methode waarvan de bias gekend is.

Voor de bepaling van de bias ten opzichte van een methodegemiddelde kan een gecertificeerd referentiemateriaal of een rondzendmonster met een consensuswaarde (bijvoorbeeld gemiddelde waarde uit ringtest) worden gebruikt, mits voor de berekening van de gecertificeerde waarde of consensuswaarde enkel meetresultaten, bekomen met dezelfde methode, werden verwerkt. Deze consensuswaarde kan verschillen van de werkelijke waarde.

Voor evaluatie van de lineariteit gebruikt men dezelfde matrix als bij de kalibratie (dit is meestal standaardoplossing, doch bij sommige technieken ook monster).

4 ALGEMENE PROCEDURE VOOR DE BEPALING VAN DE AFZONDERLIJKE PRESTATIEKENMERKEN

4.1 JUISTHEID

Hieronder worden eerst twee klassieke werkwijzen behandeld, nl. meervoudige analyse van een referentiemateriaal (met gekende ware waarde) en uitvoering van terugvindingsexperimenten op een geselecteerd monster.

Indien de juistheid slechts bij één concentratieniveau gevalideerd wordt, ligt dit bij voorkeur nabij de kritische waarde volgens de regelgeving, in het gebied tussen de typische waarden voor praktijkmonsters en deze kritische waarde. Bij onderzoek op meer dan één concentratieniveau (wat overigens aanbevolen wordt door Eurachem) kiest men deze tenminste een factor 10 uit elkaar.

Verder wordt een alternatieve werkwijze beschreven, namelijk evaluatie van de terugvinding en/of afwijking ten opzichte van de referentiewaarde voor verschillende monsters. Hierbij kan niet enkel de terugvinding van addities op verschillende monsters en/of verschillende concentratieniveau's gebruikt worden, maar eveneens resultaten bekomen via deelname aan 'proficiency testing' schema's (interlaboratoriumtesten), vergelijkende resultaten t.o.v. een referentiemethode, Deze

werkwijze is vooral aangewezen indien er twijfel bestaat over het effect van diverse matrices binnen het toepassingsgebied (of desgevallend deelgebied) op de prestatiekenmerken juistheid en/of selectiviteit (matrixeffect).

Elk van de klassieke werkwijzen levert, naast informatie over de juistheid, simultaan informatie over de intra-reproduceerbaarheid van de analysemethode.

4.1.1 MEERVOUDIGE ANALYSE VAN EEN REFERENTIEMATERIAAL

Indien voor het toepassingsgebied (of desgevallend een deelgebied) een monster met een ware waarde of consensuswaarde beschikbaar is, voer dan hierop minstens 5 analyses (cfr. punt 2.12) uit, onder intra-reproduceerbaarheidsomstandigheden (op verschillende dagen, met weerspiegeling van typische laboratoriumomstandigheden qua uitvoerende analisten, kalibratie, ...). Bereken het gemiddelde van de bekomen meetwaarden. De bias wordt gegeven door:

$$b_{c(\text{rel})} = \frac{X_{\text{gem}} - C_{\text{ref}}}{C_{\text{ref}}} \times 100(\%) \quad (\text{in geval van een proportionele bias als } \%),$$

of

$$b_{c(\text{abs})} = X_{\text{gem}} - C_{\text{ref}} \quad (\text{in geval van een constante absolute bias}),$$

met:

$b_{c(\text{rel})}$ procentuele bias (bij een waarde c van de meetgrootheid)

$b_{c(\text{abs})}$ absolute bias (bij een waarde c van de meetgrootheid) X_{gem} gemiddelde waarde van de meetgrootheid

C_{ref} ware waarde van het referentiemateriaal

De juistheid (uitgedrukt in %) wordt dan gegeven door $(100 + b_{c(\text{rel})})$.

De situatie van een constante absolute bias kan zich ondermeer voordoen in een laag concentratiegebied, bij een constante ongekende interferentie.

Indien binnen een bepaald toepassingsgebied op verschillende referentiematerialen dergelijke meervoudige analyse is uitgevoerd, wordt de juistheid bij voorkeur berekend door uit te middelen over de geanalyseerde afvalstoffen. Hierbij dient de zin van de afwijking (+ of -) mee in rekening te worden gebracht en dient desgevallend onderscheid gemaakt te worden tussen de situaties proportionele of constante absolute bias.

4.1.2 TERUGVINDINGSEXPERIMENTEN OP EEN GESELECTEERD MONSTER

Indien geen geschikt monster met een ware waarde of consensuswaarde beschikbaar is en de component op een representatieve manier aan het monster kan toegevoegd worden, is een terugvindingsexperiment de meest aangewezen benadering. Een nadeel hiervan is dat bepaalde systematische afwijkingen, bijvoorbeeld veroorzaakt door interferenties, niet kunnen worden vastgesteld.

Neem hiervoor minstens 10 deelmonsters (cfr. Punt 2.12) en voeg aan de helft een bekende hoeveelheid van de component zo representatief mogelijk toe, waardoor de meetgrootte met Δc wordt verhoogd. Richtlijnen met betrekking tot de werkwijze voor additie worden gegeven in BIJLAGE A.

Bepaal per monster de terugvinding uit het analyseresultaat voor het monster zonder en het monster met toevoeging van de component. Voer beide metingen zoveel mogelijk onder dezelfde omstandigheden uit, dit wil zeggen in dezelfde analysereeks. Voer minstens 5 dergelijke paren analyses onder intra-reproduceerbaarheidsomstandigheden uit (dit wil zeggen elk paar op een andere dag, met weerspiegeling van typische laboratoriumomstandigheden qua uitvoerende analisten, kalibratie, ...).

Bereken voor elk van de experimenten de terugvinding (uitgedrukt in %) als:

$$T_{\Delta c, i} = \frac{X_{c+\Delta c, i} - X_{c, i}}{\Delta c} \times 100(\%)$$

met:

$T_{\Delta c, i}$	procentuele terugvinding bij het i-de experiment (bij toevoeging Δc van de meetgrootte)
$X_{c+\Delta c, i}$	i-de analyseresultaat voor waarde c met additie Δc van de meetgrootte
$X_{c, i}$	i-de analyseresultaat voor waarde c van de meetgrootte
Δc	geaddeerde waarde van de meetgrootte

Bereken van de aldus bekomen terugvindingen de gemiddelde waarde $\bar{T}$, welke een maat is voor de juistheid, uitgedrukt in %. De procentuele bias kan berekend worden uit $b_{c, rel} = \bar{T} - 100$.

4.1.3 EVALUATIE VAN DE TERUGVINDING EN/OF AFWIJING TEN OPZICHTE VAN DE REFERENTIEWAARDE VOOR VERSCHILLENDE MONSTERS

Voor wat addities betreft, gelden bij deze methode dezelfde randvoorwaarden en beperkingen als beschreven onder punt 4.1.2.

Voeg aan een deelmonster van een reeds eerder geanalyseerd monster een bekende hoeveelheid van de component zo representatief mogelijk toe, waardoor de meetgrootte met Δc wordt verhoogd. Analyseer dit monster met additie in dezelfde meetreeks, zoveel mogelijk onder dezelfde

omstandigheden als het oorspronkelijk monster. Voer in totaal 5-10 dergelijke terugvindingsanalyses uit op verschillende monsters en concentratieniveaus, er over wakend dat deze als geheel de praktijksituatie zo goed mogelijk vertegenwoordigen. Voer de verschillende analyses op monsters met additie onder intra-reproduceerbaarheidsomstandigheden uit (op verschillende dagen, met weerspiegeling van typische laboratoriumomstandigheden qua uitvoerende analisten, kalibratie, ...).

Bereken voor elk van de minstens 5 experimenten de terugvinding (uitgedrukt in %) uit het analyseresultaat voor het monster zonder en het monster met toevoeging van de component (voor formule zie punt 4.1.2). Bereken van de aldus bekomen terugvindingen de gemiddelde waarde. De procentuele bias kan berekend worden uit $b_{c\ rel} = \bar{T} - 100$.

Bij deze werkwijze kunnen, naast terugvindingen bekomen via een additie-experiment, eveneens terugvindingen afgeleid uit de deelname aan 'proficiency testing' schema's, uit vergelijking van de methode t.o.v. een referentiemethode, ..., gebruikt worden. Hierbij blijft het belangrijkste uitgangspunt het gebruik van verschillende monsters, waarbij deze qua matrix en concentratieniveau het toepassingsgebied zo goed mogelijk moeten dekken.

4.2 HERHAALBAARHEID EN INTRA-REPRODUCEERBAARHEID

De algemene procedure voor het bepalen van de prestatiekenmerken herhaalbaarheid en intra-reproduceerbaarheid is dezelfde, met uitzondering van de analysecondities bij de experimenten (cfr. punt 2.3 en 2.4). Voor intra-reproduceerbaarheid wordt minstens de factor tijd bijkomend gevarieerd (uitvoering van de herhalingsanalyses op verschillende dagen) en voor zover relevant ook andere bronnen van variatie (analist, apparaat, kalibratie, ...). De bedoeling is om een zo goed mogelijke afspiegeling van de praktijksituatie te bekomen.

Er zijn twee klassieke werkwijzen, namelijk herhaalde analyse van hetzelfde monster en duplo-analyse van verschillende monsters (zie punt 0 en 4.2.2). Eerstgenoemde benadering heeft als nadeel dat de informatie sensu strictu beperkt blijft tot dat ene monster. Anderzijds geldt bij laatstgenoemde benadering in principe de beperkende voorwaarde dat óf de standaardafwijking óf de variatiecoëfficiënt niet mag afhangen van de waarde van de meetgrootte, wat vaak eveneens tot een klein meetbereik leidt.

Indien, volgens eerstgenoemde werkwijze, de precisie slechts bij één concentratieniveau gevalideerd wordt, ligt dit bij voorkeur nabij de kritische waarde volgens de regelgeving, in het gebied tussen de typische waarden voor praktijkmonsters en deze kritische waarde. Bij onderzoek op meer dan één concentratieniveau (wat overigens voor herhaalbaarheidsonderzoek aanbevolen wordt door Eurachem) kiest men deze tenminste een factor 10 uit elkaar.

In praktijk zal een analysemethode, na ingebruikname, meestal ook opgevolgd worden aan de hand van een relevant controlemonster, zodat voor periodieke herevaluatie van de intra-reproduceerbaarheid ook de resultaten van deze eerstelijnscontrole als input gebruikt kunnen worden.

4.2.1 MEERVOUDIGE ANALYSE VAN HETZELFDE MONSTER

Voer op een volgens de aanbevelingen in punt 3.4 gekozen monster, desgevallend per deelgebied, minstens 5 analyses (cfr. punt 2.12) uit onder herhaalbaarheidscondities, respectievelijk intra-reproduceerbaarheidscondities. Bereken hieruit de herhaalbaarheidsstandaardafwijking s_r , respectievelijk intra-reproduceerbaarheidsstandaardafwijking s_R , als:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$s \equiv$ standaardafwijking, in eenheid analyseresultaat
 $n \equiv$ aantal analyses, $n \geq 5$
 $x_i =$ i-de analyseresultaat
 $\bar{x} =$ gemiddelde van n analyseresultaten

Bij gebrek aan een geschikt monster kan eventueel gebruik gemaakt worden van een praktijkmonster waaraan een gepaste hoeveelheid van de component is geaddeerd, dit voor zover de geaddeerde component zoveel mogelijk op dezelfde wijze in het monster opgenomen is als de component van het praktijkmonster. Voor richtlijnen met betrekking tot additie wordt verwezen naar BIJLAGE A.

4.2.2 DUPLO-ANALYSE VAN VERSCHILLENDE MONSTERS

Kies de grootte van het (deel)gebied zo dat redelijkerwijs mag worden verondersteld dat óf de standaardafwijking óf de variatiecoëfficiënt van de analyseresultaten niet afhangt van de waarde van de meetgrootte. Veelal neigt de spreiding ruim boven de aantoonbaarheidsgrens naar proportionaliteit en mag in dit deel van het werkgebied de variatiecoëfficiënt constant verondersteld worden. Nabij de aantoonbaarheidsgrens mag daarentegen de standaardafwijking veelal constant verondersteld worden (cfr. punt 2.10).

Gebruik monsters volgens de aanbevelingen in punt 3.4. Analyseer (cfr. punt 2.12), desgevallend per deelgebied, minstens 5 verschillende monsters in duplo. Bij het herhaalbaarheidsonderzoek dienen beide analyses van een paar onder herhaalbaarheidscondities uitgevoerd te worden. De verschillende monsters worden wel bij voorkeur op verschillende dagen geanalyseerd. Bij het intra-reproduceerbaarheidsonderzoek mogen beide analyses van een paar niet op dezelfde dag uitgevoerd worden en dient het geheel gespreid te worden over tenminste evenveel dagen als het aantal monsterparen.

Als voor het betreffende meetbereik de standaardafwijking onafhankelijk mag worden verondersteld van de waarde van de meetgrootte (homogeniteit van de varianties), dan mogen de n standaardafwijkingen uit duplo's worden samengevoegd en kan s_r , resp. s_R , berekend worden als (NEN 7777: 2011; AP 04 SG: 1998):

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_{i1} - x_{i2})^2}{2n}}$$

$s =$ standaardafwijking, in eenheid analyseresultaat
 $n =$ aantal monsters in duplo geanalyseerd, $n \geq 5$
 $x_{i1} =$ eerste analyseresultaat van een duplo-analyse op monster i
 $x_{i2} =$ tweede analyseresultaat van een duplo-analyse op monster i

Als voor het betreffende meetbereik de variatiecoëfficiënt onafhankelijk mag worden verondersteld van de waarde van de meetgrootte, dan mogen de n variatiecoëfficiënten uit duplo's worden samengevoegd en kan de variatiecoëfficiënt CV_r , resp. CV_R , worden berekend uit de genormaliseerde verschillen als (NEN 7777: 2011; AP 04 SG: 1998):

$$CV = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(x_{i1} - x_{i2})^2}{2n}}}{100(\%)} \times$$

CV = variatiecoëfficiënt, in %

n = aantal monsters in duplo

x_{i1} = geanalyseerd, $n \geq 5$
eerste analyseresultaat van een

duplo-analyse op monster i

x_{i2} = tweede analyseresultaat van een
duplo-analyse op monster i

4.3 SELECTIVITEIT EN ROBUUSTHEID

Afzonderlijke selectiviteitsproeven zijn enkel zinvol in die gevallen waarbij de invloed onvoldoende wordt afgedekt door een ander prestatiekenmerk zoals juistheid. Experimenten hieromtrent situeren zich vaak eerder in het ontwikkelingsstadium van een analysemethode dan in het validatiestadium.

Kies om het effect van een bepaalde invloedsgrootheid te onderzoeken zo mogelijk een praktijkmonster, volgens de aanbevelingen in punt 3.4. Voeg aan verschillende deelmonsters een telkens toenemende hoeveelheid van de invloedsgrootheid toe, zo representatief mogelijk en met minimale verdunning als gevolg. Analyseer de aldus bekomen monsters onder herhaalbaarheidscondities en bepaal de verandering van het analyseresultaat als gevolg van een verandering van de waarde van de invloedsgrootheid. Al naargelang de voorkennis kan het noodzakelijk zijn om bovenvermelde proef uit te voeren in het onderste en bovenste deel van het werkgebied.

In geval er geen enkele voorkennis is met betrekking tot interferenten en er geen referentiematerialen beschikbaar zijn, kan de selectiviteit als volgt onderzocht worden:

- het analyseren van praktijkmonsters met de betreffende analysemethode en met een andere onafhankelijke analyse- of meetmethode (ander scheidings- en/of detectieprincipe);
- het analyseren van opeenvolgende, steeds grotere, verdunningen van praktijkmonsters (op voorwaarde dat de te bepalen component in voldoende hoge concentratie aanwezig is om nog in verdunning gemeten te kunnen worden).

Robuustheid is impliciet begrepen in de intra-reproduceerbaarheid, en zal meestal evenmin een specifieke validatie behoeven. De verhouding tussen intra-reproduceerbaarheid en herhaalbaarheid kan worden gehanteerd als een maat voor (het gebrek aan) robuustheid. In het ideale geval zou deze verhouding 1 moeten bedragen, maar in praktijk zijn verhoudingen tot 1.5 tot 2 niet ongewoon.

Eventuele specifieke experimenten, gericht op de verandering van het analyseresultaat als gevolg van een verandering van de uitvoeringsomstandigheden, kunnen op gelijkaardige wijze opgezet worden als hierboven beschreven voor selectiviteitsonderzoek. Meestal zal het programma voor eerstelijns kwaliteitscontrole zodanig ontworpen worden dat de meest kritische variabelen, namelijk de variabelen met het grootste effect op de juistheid en precisie, expliciet gecontroleerd worden.

4.4 AANTOONBAARHEIDSGRENS EN BEPALINGSGRENS

In deze procedure wordt de aantoonbaarheidsgrens (AG) geoperationaliseerd als 3 maal de standaardafwijking op laag niveau (cfr. punt 2.7) en dit onder intra-reproduceerbaarheidscondities.

Hieronder worden twee benaderingen beschreven, nl. meervoudige analyse van een praktijkmonster met gehalte nabij de aantoonbaarheidsgrens en de duplo-analyse van verschillende praktijkmonsters met gehalte nabij de aantoonbaarheidsgrens.

Eerstgenoemde werkwijze is de meest klassieke maar heeft als nadeel dat de onzekerheid die het gevolg is van de aanwezigheid van interferenten in monsters, verschillende matrixeffecten en dergelijke niet gedekt wordt. Daarom kan de eigenlijke aantoonbaarheidsgrens onder praktijkomstandigheden hoger zijn. Deze beperking wordt enigszins ondervangen door de tweede werkwijze.

De bepalingsgrens wordt op dezelfde manier ingeschat, doch op basis van 6 maal de standaardafwijking.

Met de term 'gehalte nabij de aantoonbaarheidsgrens' (of 'laag gehalte') wordt een gehalte bedoeld dat bij voorkeur in het bereik tussen ca. 1 en 5 maal de aantoonbaarheidsgrens ligt en dat niet meer dan 10 maal de aantoonbaarheidsgrens bedraagt. Indien een parametergroep een groot aantal componenten (bijvoorbeeld >10) bevat kan het praktisch moeilijk zijn om een monster te vinden dat voor elke component ideaal is. In dergelijk geval mag voor enkele componenten van bovenvermelde beperking qua concentratiebereik afgeweken worden of mag de aantoonbaarheidsgrens geëxtrapoleerd worden uit soortgelijke componenten.

4.4.1 MEERVOUDIGE ANALYSE VAN EEN PRAKTIJKMONSTER MET LAAG GEHALTE

Gebruik hiervoor een monster volgens de aanbevelingen in punt 3.4. Analyseer het monster strikt volgens de gebruikelijke analyseprocedure (cfr. Punt 2.12). Analyseer het monster na één of meerdere dagen opnieuw, en vervolg dit totdat tenminste 5 analyseresultaten zijn verkregen. Voer de proeven zo uit dat het geheel de praktijksituatie (qua uitvoerende analisten, omgevingsomstandigheden, volgnummer in reeks, ...) weerspiegelt.

Bereken de standaardafwijking s_R uit de analyseresultaten en hieruit de aantoonbaarheidsgrens $AG_R = 3 s_R$.

Verhoog de waarde van de aantoonbaarheidsgrens met de gemiddelde waarde van de procedureblanco indien deze meetbaar is en een correctie voor de procedureblanco geen deel uitmaakt van de gebruikelijke analyseprocedure.

Wanneer verschillende praktijkmonsters met laag gehalte meervoudig geanalyseerd werden, wordt de hoogste van de bekomen waarden als uiteindelijke maat voor de aantoonbaarheidsgrens en bepalingsgrens, gehanteerd.

4.4.2 DUPLO-ANALYSE VAN VERSCHILLENDE PRAKTIJKMONSTERS MET LAAG GEHALTE

Gebruik monsters volgens de aanbevelingen in punt 3.4. Analyseer (cfr. punt 2.12) minstens 5 verschillende monsters in duplo, voer beide analyses van een paar niet op dezelfde dag uit en spreid het geheel over tenminste evenveel dagen als het aantal monsterparen.

Bereken s_R als (cfr. punt 4.2.2):

$$s_R = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_{i1} - \bar{x})^2 + \sum_{i=1}^n (x_{i2} - \bar{x})^2}{2n}}$$

s_R = intra-reproduceerbaarheidsstandaardafwijking, in eenheid analyseresultaat
 n = aantal monsters in duplo geanalyseerd, $n \geq 5$
 x_{i1} = eerste analyseresultaat van een duplo-analyse op monster i
 x_{i2} = tweede analyseresultaat van een duplo-analyse op monster i

Bereken hieruit de aantoonbaarheidsgrens $AG_R = 3 s_R$.

Verhoog de waarde van de aantoonbaarheidsgrens met de gemiddelde waarde van de procedureblanco indien een correctie voor de procedureblanco geen deel uitmaakt van de gebruikelijke analyseprocedure.

4.5 LINEARITEIT - MODELAFWIJING

Bij de bepaling van de alineariteit, of meer algemeen de modelafwijking ('lack-of-fit'), wordt de experimentele afwijking ten opzichte van het kalibratiemodel gekwantificeerd. Veelal betreft deze enkel het instrumentele gedeelte van de analyse. Hiervoor kunnen in praktijk de experimentele meetwaarden van een kalibratie gebruikt worden.

Leg het kalibratiemodel vast aan de hand van tenminste 6 verschillende concentratieniveau's, gespreid over het gehele werkgebied. Aanbevolen wordt om bij het validatieonderzoek eenmalig elk concentratieniveau in drievoud te meten, zodat kan nagegaan worden hoe de variantie van herhalingsmetingen varieert met de concentratie.

Voer op de bekomen resultaten een gepaste regressie-analyse uit. Indien er een proportioneel verband is tussen de variantie van herhalingsmetingen en de concentratie wordt best een gewogen regressie toegepast. Het louter gebruiken van een correlatiecoëfficiënt ter bepaling van de lineariteit wordt afgeraden omdat dit een maat is voor de correlatie, niet voor de lineariteit. Het weerhouden kalibratiemodel moet uiteraard ook gehanteerd worden bij de verdere praktijktoepassing van de analysemethode.

Bereken de modelafwijking voor een waarde c van de meetgrootheid als:

$$\delta_{c, \text{model}} = X_{c, \text{exp}} - X_{c, \text{model}}$$

met:

$X_{c, \text{exp}}$ experimentele meetwaarde of desgevallend de gemiddelde waarde van de herhalingsmetingen bij een waarde c van de meetgrootheid

$X_{c, \text{model}}$ berekende meetwaarde welke volgens het kalibratiemodel bekomen wordt voor een waarde c van de meetgrootheid

Zet de modelafwijkingen grafisch uit in functie van de meetgrootheid en verifieer of deze random verdeeld zijn, systematische trends wijzen op non-lineariteit. Grote procentuele afwijkingen zijn niet noodzakelijk een indicatie voor alineariteit, maar verdienen niettemin speciale aandacht omdat ze tot een slechte intra-reproduceerbaarheid en hoge meetonzekerheid kunnen leiden. Alternatief kan men de responsfactoren $RF_c = X_c / c$ (of relatieve responsfactoren, bij gebruik van een interne standaard) uitzetten en toetsen ten opzichte van een vastgelegde eis. Meestal houdt zulke eis rekening met de aard van de bepalingmethode.

Een tweede mogelijkheid is de kalibratiegegevens enerzijds met een lineair model en anderzijds met een kwadratisch model te evalueren (ISO 8466-1, 1990). Uit beide modellen wordt de residuele standaardafwijking s_{y1} en s_{y2} verkregen. Het verschil van de varianties DS^2 wordt als volgt berekend:

$$DS^2 = (N - 2)s_{y1}^2 - (N - 3)s_{y2}^2$$

met:

N het aantal concentratieniveaus ($N \geq 6$)
 s_{y1}^2 residuele standaardafwijking bij lineair model
 s_{y2}^2 residuele standaardafwijking bij kwadratisch model
 het aantal vrijheidsgraden f is 1.

Vervolgens worden DS^2 en de variantie van de kwadratische kalibratiefunctie aan een F-test onderworpen om na te gaan of er significante verschillen bestaan. De testwaarde, F_{ber} , wordt bekomen uit:

$$F_{ber} = \frac{DS^2}{s_{y2}^2}$$

Indien $F_{ber} \leq F_{tabel}$, dan leidt de kwadratische functie niet tot een significant beter model, met andere woorden is de kalibratiefunctie lineair.

Indien $F_{ber} > F_{tabel}$, dan wordt het werkgebied verkleind om een lineaire kalibratiefunctie te verkrijgen, ofwel worden de meetwaarden van monsters met de kwadratische functie geëvalueerd.

Een derde mogelijkheid, weliswaar minder fundamenteel, is de berekening van een kwadratische functie, waarna gebruik gemaakt wordt van een t-test om te beoordelen of de coëfficiënt van de kwadratische term significant afwijkt van 0.

Bij vaststelling van een niet-lineair verband wordt aanbevolen om na te gaan hoe relevant het verschil is tussen een resultaat bekomen met een lineaire functie en met een kwadratische functie. Indien dit klein is vergeleken met de meetonzekerheid kan overwogen worden om toch met de lineaire vergelijking door te gaan en de corresponderende fout mee te verrekenen in de globale meetonzekerheid.

4.6 WERKGEBIED

De ondergrens van het werkgebied van een kwantitatieve analysemethode ligt in principe op of boven de bepalingsgrens en binnen het gebied waarvoor de lineariteit werd aangetoond.

Als vuistregel (streefwaarde) wordt in het kader van deze procedure vooropgesteld dat de rapportagegrens, de waarde beneden welke een component als niet kwantificeerbaar ('<') wordt gerapporteerd, hoogstens een vijfde van de toetsingswaarde of normwaarde voor de gemeten monsters bedraagt, tenzij niet haalbaar volgens de huidige stand der techniek². Dit geldt zowel in geval de bepalingsgrens als rapportagegrens fungeert, als in geval van het systematisch gebruik van een rapportagegrens die hoger ligt dan de bepalingsgrens.

² In voorkomend geval wordt dit in de betreffende WAC-procedure en/of in een rapport van LNE of het

referentielaboratorium duidelijk aangegeven.

Wanneer het snijpunt van de kalibratielijn met de Y-as niet significant verschillend is van nul kan het werkgebied uitgebreid worden tot onder het concentratieniveau van de laagste kalibratiestandaard en tot de bepalingsgrens. In het andere geval wordt aanbevolen de laagste kalibratiestandaard als ondergrens van het werkgebied te beschouwen.

In bepaalde gevallen kan het aangewezen zijn om ook waarden tussen de aantoonbaarheidsgrens en de bepalingsgrens te rapporteren, omdat er wel degelijk informatie in zulke waarden kan zitten zodra over een aantal uitslagen wordt uitgemiddeld. Dergelijke werkwijze dient duidelijk te blijken uit het analyseverslag, bijvoorbeeld door de vermelding van de meetwaarden samen met de bepalingsgrens. Met betrekking tot de in eerste alinea beschreven vuistregel is het onverminderd de bepalingsgrens die aan het criterium moet getoetst worden.

In de meeste gevallen is het werkgebied tot boven het lineair gebied uit te breiden door verdunning van het monster of door minder monster in bewerking te nemen. Beperkende factoren voor de bovengrens zijn mogelijk, al naargelang de analysemethode, het optreden van geheugeneffecten, de capaciteit van bepaalde voorbereidingsstappen, ...

5 REFERENTIES

- Anal. Chim. Acta (1997), Hartmann *et al.*, nr 338, p. 19-40.
- AOAC Peer Verified Methods Program – Manual on Policies and Procedures, AOAC International, Arlington VA 22201-3301, USA.
- Accreditatieprogramma voor keuring van partijen grond, bouwstoffen en korrelvormige afvalstoffen - Onderdeel: Samenstelling Grond, versie 9.2a, oktober 2011.
- EPA, 'Definition and procedure for the determination of the method detection limit', revision 1.11, juli 2011.
- Eurachem (2014), *The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics: Second edition*.
- Eurachem/CITAC (2012), *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, 3rd Edition*.
- IUPAC (1995), Nomenclature in Evaluation of Analytical Methods, Including Detection and Quantification Capabilities, IUPAC Recommendations 1995, Pure and Appl. Chem., 1995, 67, 1699 – 1723.
- ISO 3534-1 (2006) Statistics -- Vocabulary and symbols -- Part 1: General statistical terms and terms used in probability.
- ISO 5725-1 to -6 (1994), 'Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results'.
- ISO 8466-1 (1990), 'Water quality – Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics: Part 1 – Statistical evaluation of the linear calibration function', 1st Edition 1990 (E).
- ISO 9169 (2006) Air quality -- Definition and determination of performance characteristics of an automatic measuring system.
- ISO GUM (2008) Evaluation of measurement data — Guide to the expression of uncertainty in measurement
- NEN 7777 (2011), 'Milieu en voedingsmiddelen - Prestatiekenmerken van meetmethoden'.
- Pharmaceutisch Weekblad (1992), 'Richtlijnen voor analytische validatie', van de Vaart, nr. 46, p. 1229-1235.
- RIVM (1994), 'Prestatiekenmerken voor meetmethoden. Termen, definities en testprocedures ten behoeve van het Accreditatieprogramma Normalisatie en Validatie van Milieumeetmethoden', van de Wiel *et al.*, Rapportnr. 219101004.

BIJLAGE A RICHTLIJNEN MET BETREKKING TOT ADDITIE

A.1 ALGEMENE RICHTLIJNEN VOOR ADDITIE

De additie van de component gebeurt proportioneel. Er wordt optimaal tussen 50% en 200% van de in het oorspronkelijk monster aanwezige hoeveelheid toegevoegd.

Het concentratieverschil dient voldoende groot te zijn in verhouding tot de beoogde meetonzekerheid, zonder evenwel de gelijkenis met praktijkmonsters in het gedrang te brengen.

De additie dient zodanig te gebeuren dat er minimale verdunning van het monster (behoud van matrix) optreedt. De verdunning bedraagt bij voorkeur niet meer dan 1% (m/m, v/v of v/m).

De additie dient zodanig uitgevoerd te worden dat de meetonzekerheid op het monster en het geaddieerd monster vergelijkbaar blijven (met behulp van voldoende betrouwbare standaardoplossing, ...).

A.2 SPECIFIEKE RICHTLIJNEN VOOR ADDEREN VAN VERSCHILLENDE MATRICES VOOR ORGANISCHE PARAMETERS

A.2.1 Adderen aan vloeistoffen

Waterige oplossingen

Indien de componenten voldoende goed oplossen in water (bijv. fenolen, polaire pesticiden, ...) wordt in het monster een klein volume ($< 0,1$ % v/v) met een gekende hoeveelheid van de te bepalen stoffen gebracht. Deze stoffen dienen opgelost in een met water mengbaar oplosmiddel (methanol, 2-propanol, aceton, ...). Homogeniseer het monster.

Indien het componenten betreft die niet goed in water oplossen, brengt men in het geval van een vloeistof/vloeistof extractie eerst het monster over naar een scheitrechter en voert men nadien de additie ($< 0,1$ % v/v) uit. Wederom zijn de componenten in een met water mengbaar oplosmiddel opgenomen. Spoel de monsterrecipiënten na met het voor de extractie te gebruiken oplosmiddel.

Een andere mogelijkheid is het toevoegen van een additief waarmee de apolaire componenten in de matrix worden gehouden (bijvoorbeeld: 2-propanol, detergents, ...). In dit geval kan men werken zoals voor polaire verbindingen aangegeven.

BIJLAGE B MINIMALE EISEN MET BETREKKING TOT BEPALINGSGRENZEN

De erkende laboratoria en de VITO hebben in het kader van de ISO 17025 prestatiekenmerken afgeleid voor de parameters die onder de erkenning vallen. Door de VITO werden deze verzameld en verwerkt. Er is bij de verwerking vanuit gegaan dat deze data eveneens de monstervoorbehandeling omvatten. Bij het afleiden van de prestatie-eisen werd geëvalueerd wat in het kader van de wetgeving vereist is en wat analytisch haalbaar is. De resultaten werden besproken in de werkgroepen anorganische en organische parameters.

Indien bij de analyse de maximale bepalingsgrens overschreden wordt, moeten aanpassingen aan de analysegang ervoor zorgen dat de maximale bepalingsgrens toch bereikt wordt. Deze aanpassingen worden op het analyserapport vermeld. Als de bepalingsgrens ondanks de aanpassingen nog steeds boven de maximale bepalingsgrens ligt, wordt de verhoogde bepalingsgrens gerapporteerd samen met de doorgevoerde aanpassingen.

Opm.: De in de onderstaande tabellen opgenomen bepalingsgrenzen zijn deze die met de in dit compendium opgenomen methoden haalbaar zijn. Voor een aantal parameters (o.a. van de Kaderrichtlijn Water) zijn de WAC-methoden niet toereikend om de gewenste bepalingsgrens te halen. In dat geval dienen meer performante, bij voorkeur genormeerde methoden aangewend te worden.

B.1 ANORGANISCHE PARAMETERS

Toelichting legende:

- AW: afvalwater
- OW: oppervlaktewater
- GW: grondwater
- DW: drinkwater
- MKN: milieukwaliteitsnorm
- NM: normwaarde
- LOQ: limit of quantification (bepalingsgrens)
- LOQ_{max}: de maximale bepalingsgrens; de gevalideerde bepalingsgrens mag niet hoger liggen dan de concentratie vermeld onder LOQ_{max}

Tabel 1: Afvalwater (AW) – anorganische parameters

<i>Parameter (AW)</i>	<i>Eenheid</i>	<i>LOQ_{max}/</i> <i>Rapportagegrens</i>
Organoleptische parameters		
kleur	ΔE* _{ab}	
Elementen		
aluminium	µg/l	100
antimoon	µg/l	30
arseen	µg/l	5
barium	µg/l	21
beryllium	µg/l	1
boor	µg/l	210

Parameter (AW)	Eenheid	LOQ_{max}/ Rapportagegrens
cadmium	µg/l	0.8
cerium	µg/l	100
chromium	µg/l	15
fosfor	µg/l	300
ijzer	µg/l	100
kobalt	µg/l	0.6
koper	µg/l	15
kwik	µg/l	0.15
lood	µg/l	15
mangaan	µg/l	20
molybdeen	µg/l	105
nikkel	µg/l	9
seleen	µg/l	5
tellurium	µg/l	30
thallium	µg/l	1
tin	µg/l	12
titanium	µg/l	30
uranium	µg/l	0.5
vanadium	µg/l	5
zilver	µg/l	1
zink	µg/l	60
Anionen		
chloride	mg/l	25
sulfaat	mg/l	25
nitraat	mg/l (mg N/l)	0.5 (0.1)
nitriet	mg/l (mg N/l)	0.1 (0.03)
orthofosfaat	mg/l (mg P/l)	0.15 (0.05)
fluoride	0,2 mg/l	0.2
vrije cyanide	0,01 mg/l	0.01
sulfide	0,2 mg/l	0.2
chromium VI	0,01 mg/l	0.01
vrije chloor	0,1 mg/l	0.1
totaal chloor	mg/l	0.1
Groepsparameters		
bezinkbare stoffen	ml/l	0.1
zwevende stoffen	mg/l	2
BZV	mg O ₂ /l	3
CZV	mg O ₂ /l	7
Kjeldahl stikstof	mg/l	2
totaal stikstof	mg/l	2
TON	mg N/l	0.2

<i>Parameter (AW)</i>	<i>Eenheid</i>	<i>LOQ_{max}/ Rapportagegrens</i>
totaal cyanide	mg/l	0.01
TOC/DOC/NPOC/NPDO	mg/l	10
Kationen		
ammonium	mg/l	0.25

Tabel 2: Oppervlaktewater (OW) – anorganische parameters

<i>Parameter (OW)</i>	<i>Eenheid</i>	<i>Vlarem II Bijlage 2.3.1 art 3 (laagste MKN)</i>	<i>30% NW cfr 2009/90/EC</i>	<i>LOQ_{max}/ Rapportagegrens</i>
Elementen (totaal)*				
antimoon	µg/l	100	30	30
arseen	µg/l	5	1.5	2.5
barium	µg/l	70	21	21
beryllium	µg/l	0.1	0.03	0.5
boor	µg/l	700	210	210
cadmium	µg/l	0.8	0.24	0.4
chroom	µg/l	50	15	15
kobalt	µg/l	0.6	0.18	0.3
koper	µg/l	50	15	15
kwik	µg/l	0.3	0.09	0.15
lood	µg/l	50	15	15
molybdeen	µg/l	350	105	105
nikkel	µg/l	30	9	9
seleen	µg/l	3	0.9	3
tellurium	µg/l	100	30	30
thallium	µg/l	0.2	0.06	0.5
tin	µg/l	40	12	12
titanium	µg/l	100	30	30
uranium	µg/l	1	0.3	0.3
vanadium	µg/l	5	1.5	2.5
zilver	µg/l	0.4	0.12	0.4
zink	µg/l	200	60	60
Elementen (opgelost)*				
antimoon	µg/l	100	30	10
arseen	µg/l	3	0,9	0,9
barium	µg/l	60	18	10
beryllium	µg/l	0,08	0,024	0,1
boor	µg/l	700	210	100
cadmium	µg/l	0,08	0,024	0,1

Parameter (OW)	Eenheid	Vlarem II Bijlage 2.3.1 art 3 (laagste MKN)	30% NW cfr 2009/90/EC	LOQ_{max}/ Rapportagegrens
chrom	µg/l	5	1,5	1,5
kobalt	µg/l	0,5	0,15	0,15
koper	µg/l	7	2,1	3,5
kwik	µg/l	0,07	0,021	0,07
lood	µg/l	1,2	0,36	1,2
molybdeen	µg/l	340	102	10
nikkel	µg/l	4	1,2	1,2
seleen	µg/l	2	0,6	1
tellurium	µg/l	100	30	10
thallium	µg/l	0,2	0,06	0,1
tin	µg/l	3	0,9	0,9
titanium	µg/l	20	6	6
uranium	µg/l	1	0,3	0,3
vanadium	µg/l	4	1,2	1,2
zilver	µg/l	0,08	0,024	0,1
zink	µg/l	20	6	6
Thermische omstandigheden				
temperatuur	°C	25		
impact thermische lozing	°C			
Zuurstofhuishouding				
opgeloste zuurstof (concentratie)	mg O ₂ /l	6	1.8	0.3
opgeloste zuurstof (verzadiging)	%	120	36	
biochemisch zuurstofverbruik (BZV)	mg O ₂ /l	6	1.8	2
chemisch zuurstofverbruik (CZV)	mg O ₂ /l	30	9	7
Zoutgehalte				
elektrische geleidbaarheid	µS/cm	100	30	
chloride	mg/l	20	6	6
sulfaat	mg SO ₄ /l	15	4.5	4.5
Verzuringstoestand				
zuurtegraad (pH)	Sørensen	4.5	1.35	
Nutriënten				
ammoniak	µg/l	30	9	
nitriet	µg N/l	200	60	60
totaal cyanide	µg/l	50	15	15
fluoride	µg/l	900	270	270
Kjeldahl-stikstof	mg N/l	6	1.8	1.8
nitraat	mg N/l	5.65	1.695	1.7

Parameter (OW)	Eenheid	Vlarem II Bijlage 2.3.1 art 3 (laagste MKN)	30% NW cfr 2009/90/EC	LOQ_{max}/ Rapportagegrens
totaal stikstof	mg N/l	1	0.3	0.5
totaal fosfor	mg P/l	0.14	0.042	0.07
orthofosfaat	mg P/l	0.07	0.021	0.05
nitraat+nitriet+ammonium	mg N/l	0.49	0.147	
Diversen				
zwevende stoffen	mg/l	50	15	15

*LOQ_{max} waarden voor de elementen (totaal en opgelost) moeten worden afgeleid zoals beschreven in WAC/III/B/010, WAC/III/B/011 en/of WAC/III/B/014.

Tabel 3: Grondwater (GW) – anorganische parameters

<i>Parameter</i>	<i>Eenheid</i>	<i>Vlarem II Bijlage 2.4.1 MKN</i>	<i>Vlarem II Bijlage 2.4.1 Min. AGW</i>	<i>Vlarem II Bijlage 2.4.1 Min. DW</i>	<i>30% NW* (MKN/AGW/D W) cfr 2009/90/EC</i>	<i>LOQ_{max}/ Rapportag egrens</i>
Fysisch-chemische parameters						
elektrische geleidbaarheid (bij 20°C)	µs/cm	1600	<u>480</u>	1000	150	150
chloride	mg/l	250	<u>35</u>	140	10	10
sulfaat	mg/l SO ₄	250	<u>51</u>	150	15	15
calcium	mg/l	270	<u>51</u>		15	15
magnesium	mg/l	50	<u>8.3</u>		2.5	2.5
natrium	mg/l	150	<u>18</u>		6	6
kalium	mg/l	12	<u>4.1</u>	8	1.2	1.2
aluminium	mg/l	0.2	<u>0.06</u>		0.02	0.02
Parameters voor ongewenste stoffen						
nitraat	mg/l NO ₃ ⁻	<u>50</u>			15	15
nitriet	mg/l NO ₂ ⁻	0.1	0.07	<u>0.07</u>	0.021	0.035
ammonium	mg/l NH ₄ ⁺	0.5	0.47	<u>0.35</u>	0.105	0.175
boor	µg/l	<u>1000</u>	39		300	300
ijzer	mg/l	<u>20</u>	1.1		6	6
mangaan	mg/l	<u>1</u>	0.07		0.3	0.3
koper	µg/l	<u>100</u>	5		30	30
zink	µg/l	500	17	<u>260</u>	78	78
orthofosfaat	mg/l PO ₄	1.34	0.31	<u>0.83</u>	0.249	0.25
fluoride	mg/l	1.5	0.2	<u>0.8</u>	0.24	0.24
barium	mg/l	<u>1</u>			0.3	0.3
Parameters voor toxische stoffen						
arseen	µg/l	20	6	<u>10</u>	3	3
cadmium	µg/l	5		<u>2.5</u>	0.75	0.75
cyanide	µg/l	<u>50</u>			15	15
chroom	µg/l	<u>50</u>	12		15	15
kwik	µg/l	<u>1</u>			0.3	0.3
nikkel	µg/l	40	6	<u>20</u>	6	6
lood	µg/l	20		<u>10</u>	3	3
antimoon	µg/l	<u>10</u>			3	3
seleen	µg/l	<u>10</u>			3	3
kobalt	µg/l	-	-	-		0.3**

NW: normwaarde, MKN: milieukwaliteitsnorm, AGW: achtergrondwaarde, DW: drempelwaarde (VLAREM II, versie 2016)

*Onderlijnde normwaarden (MKN, AGW, DW) zijn weerhouden voor het berekenen van de 30% normwaarde.

**Richtwaarde gezien geen normwaarde gedefinieerd is in VLAREM II

Tabel 4: Drinkwater (DW) – anorganische parameters

<i>Parameter</i>	<i>Eenheid</i>	<i>DW richtlijn* Normwaarde 2023</i>	<i>Eis LOQ % van normwaarde</i>	<i>LOQ_{max}/ Rapportagegrens 2023</i>
Algemeen				
Geleidingsvermogen voor elektriciteit	µS/cm bij 20°C	2500 en geen abnormale verandering	30	750
Waterstofionen-concentratie	pH-eenheden	≥ 6.5 en ≤ 9.5		
Elementen	2			
Aluminium	µg/l	200	30	60
Antimoon	µg/l	10	30	3
Arseen	µg/l	10	30	3
Boor	mg/l	1.5	30	0.45
Cadmium	µg/l	5.0	30	1.5
Chroom	µg/l	50/25 ⁽¹⁾	30	15/7.5
Ijzer	µg/l	200	30	60
Koper	mg/l	2.0	30	0.6
Kwik	µg/l	1.0	30	0.3
Lood	µg/l	10/5 ⁽²⁾	30	3/1.5
Mangaan	µg/l	50	30	15
Natrium	mg/l	200	30	60
Nikkel	µg/l	20	30	6
Seleen	µg/l	20	30	6
Uraan	µg/l	30	30	9
Zink	µg/l	5000 ⁽³⁾	30	60
Anionen				
Bromaat	µg/l	10	30	3
Chloride	mg/l	250	30	75
Fluoride	mg/l	1.5	30	0.45
Nitraat	mg/l	50	30	15
Nitriet	mg/l	0.50	30	0.15
Sulfaat	mg/l	250	30	75
Vrije chloorresten	µg/l	250	30	75
Chloriet	mg/l	0.25	30	0.075
Chloraat	mg/l	0.25	30	0.075
Perchloraat	µg/l	13	30	4
Groepsparameters				
Oxideerbaarheid	mg/l O ₂	5.0	30	1.5
Cyanide	µg/l	50	30	15
Organische koolstof totaal (TOC)		Geen abnormale verandering	30	
Kationen				

Parameter	Eenheid	DW richtlijn* Normwaarde 2023	Eis LOQ % van normwaarde	LOQ_{max}/ Rapportagegrens 2023
Ammonium	mg/l	0.5	30	0.15

*Bron: 20 JANUARI 2023. — Besluit van de Vlaamse Regering over de kwaliteit, kwantiteit en levering van water bestemd voor menselijke consumptie (BS 08.03.2023).

- (1) Uiterlijk op 12 januari 2036 moet aan de parameterwaarde van 25 µg/l worden voldaan. Tot die datum bedraagt de parameterwaarde voor chroom 50 µg/l.
- (2) Uiterlijk op 12 januari 2036 moet aan de parameterwaarde van 5 µg/l worden voldaan. Tot die datum bedraagt de parameterwaarde voor lood 10 µg/l.
- (3) De waterleverancier moet ernaar streven om de waarde van 200 µg/l bij de uitstroom van de waterbehandelingsinstallatie niet te overschrijden.

B.2 ORGANISCHE PARAMETERS

Toelichting legende:

- OW: oppervlaktewater
- GW: grondwater
- DW: drinkwater
- MKN: milieukwaliteitsnorm
- NM: normwaarde
- LOQ: limit of quantification (bepalingsgrens)
- LOQ_{max}: de maximale bepalingsgrens; de gevalideerde bepalingsgrens mag niet hoger liggen dan de concentratie vermeld onder LOQ_{max}

Tabel 5: Oppervlaktewater (OW) – organische parameters

<i>Parameter</i>	<i>Eenheid</i>	<i>OW Bijlage 2.3.1 art 3 (laagste MKN)</i>	<i>30% NW cfr 2009/90/EC</i>	<i>LOQ_{max} / Rapportagegrens</i>
Acrylamide	µg/l			-
Minerale olie (GC)	µg/l			100
Geëmulgeerde of opgeloste koolwaterstoffen (na extractie met ether) minerale oliën	µg/l			
Petroleumether extraheerbare stoffen	mg/l			20
Perchloorethyleen extraheerbare apolaire stoffen	mg/l			0.4
Oliën en Vetten (IR)	mg/l			0.4
Oliën en vetten (gravim)	mg/l			20
EOX	µg Cl/l			5
AOX	µg Cl/l	40	12	20
POX	µg Cl/l			10
VOCl, MAK				
vinylchloride	µg/l	100	30	1
chloorethaan	µg/l			1
1,1-dichlooretheen	µg/l	50	15	1
dichloormethaan	µg/l	20	6	2.5
1,1-dichloorethaan	µg/l	100	30	1
2,2-dichloorpropaan	µg/l			1
1,2-dichlooretheen, cis	µg/l		1.5	1

Parameter	Eenheid	OW Bijlage 2.3.1 art 3 (laagste MKN)	30% NW cfr 2009/90/EC	LOQ_{max} / Rapportagegrens
1,2-dichlooretheen, trans	µg/l		1.5	1
1,2-dichloorethenen (som)	µg/l	10	3	1
broomchloormethaan	µg/l			1
chloroform (trichloormethaan)	µg/l	2.5	0.75	1
1,1,1-trichloorethaan	µg/l	20	6	1
1,1-dichloorpropeen	µg/l			1
koolstoftetrachloride (tetrachloormethaan)	µg/l	12	3.6	1
1,2-dichloorethaan (EDC)	µg/l	10	3	1
trichloorethyleen	µg/l	10	3	1
1,2-dichloorpropaan	µg/l	400	120	1
dibroommethaan	µg/l			1
broomdichloormethaan	µg/l			1
1,3-dichloorpropeen-cis	µg/l	2 (som)	0.3	1
1,3-dichloorpropeen-trans	µg/l		0.3	1
1,1,2-trichloorethaan	µg/l	20	6	1
tetrachloorethyleen	µg/l	10	3	1
1,3-dichloorpropaan	µg/l			1
dibroomchloormethaan	µg/l			1
1,2-dibroommethaan	µg/l	0.003	0.001	1
chloorbenzeen	µg/l	6	1.8	1
1,1,1,2-tetrachloorethaan	µg/l			1
bromoform (tribroommethaan)	µg/l			1
1,1,2,2-tetrachloorethaan	µg/l	100	30	1
broombenzeen	µg/l			1
1,2,3-trichloorpropaan	µg/l			1
2-chloortolueen	µg/l	3 (som monochloortoluenen)	0.3	1
4-chloortolueen	µg/l		0.3	1
1,3-dichloorbenzeen	µg/l	20 (som)	3	1
1,4-dichloorbenzeen	µg/l		3	1
1,2-dichloorbenzeen	µg/l		3	1
1,2-dibroom-3-chloorpropaan	µg/l			1
1,2,4-trichloorbenzeen	µg/l		0.04	0.1
hexachloorbutadieen	µg/l	0.6	0.2	0.1
1,2,3-trichloorbenzeen	µg/l		0.04	0.1
1,3,5-trichloorbenzeen	µg/l		0.04	0.1
trichloorbenzenen (som)	µg/l	0.4	0.12	0.3
tetrachlooretheen + trichlooretheen	µg/l			2
trihalomethanen-totaal	µg/l			4
MAK				
benzeen	µg/l	10	3	1
tolueen	µg/l	90	27	1

Parameter	Eenheid	OW Bijlage 2.3.1 art 3 (laagste MKN)	30% NW cfr 2009/90/EC	LOQ_{max} / Rapportagegrens
ethylbenzeen	µg/l	5	1.5	1
m- + p-xyleen	µg/l		0.8	2
o-xyleen	µg/l		0.4	1
xylenen (som)	µg/l	4	1.2	3
styreen	µg/l			1
isopropylbenzeen	µg/l	1	0.3	1
n-propylbenzeen	µg/l			1
1,3,5-trimethylbenzeen	µg/l			1
tert-butylbenzeen	µg/l			1
1,2,4-trimethylbenzeen	µg/l			1
1,2,3-trimethylbenzeen	µg/l			1
sec butylbenzeen	µg/l			1
p-isopropyltolueen	µg/l			1
n-butylbenzeen	µg/l			1
naftaleen	µg/l	2	0.6	1
methyl-t-butyl-ether (MTBE)	µg/l			4
n-hexaan	µg/l			4
n-heptaan	µg/l			10
n-octaan	µg/l			10
CIKWS (matig vluchtige)				
hexachloorethaan	µg/l	3	0.9	0.5
1,3,5-trichloorbenzeen	µg/l		0.04	0.1
1,2,4-trichloorbenzeen	µg/l		0.04	0.1
1,2,3-trichloorbenzeen	µg/l		0.04	0.1
trichloorbenzenen (som)	µg/l	0.4	0.12	0.3
hexachloorbutadien (HCBd)	µg/l	0.6	0.2	0.1
(1,2,3,5+1,2,4,5)-tetrachloorbenzeen	µg/l	9	2.7	0.2
1,2,3,4-tetrachloorbenzeen	µg/l			0.1
2-chloornaftaleen	µg/l	1 (som)	0.15	0.1
1-chloornaftaleen	µg/l		0.15	0.1
pentachloorbenzeen	µg/l	0.007	0.0021	0.1
hexachloorbenzeen	µg/l	0.05	0.01	0.1
Fenolen				
fenol	µg/l			0.5
2-methylfenol (o-cresol)	µg/l			0.1
3-methylfenol (m-cresol)	µg/l			0.1
4-methylfenol (p-cresol)	µg/l			0.1
2,3-dimethylfenol	µg/l			0.1
2,4-dimethylfenol	µg/l			0.1

<i>Parameter</i>	<i>Eenheid</i>	OW <i>Bijlage 2.3.1</i> art 3 <i>(laagste MKN)</i>	30% NW <i>cfr 2009/90/EC</i>	<i>LOQ_{max} /</i> Rapportagegrens
2,5-dimethylfenol	µg/l			0.1
2,6-dimethylfenol	µg/l			0.1
3,4-dimethylfenol	µg/l			0.1
3,5-dimethylfenol	µg/l			0.1
2-ethylfenol	µg/l			0.1
3-ethylfenol	µg/l			0.1
4-ethylfenol	µg/l			0.1
2-isopropylfenol	µg/l			0.1
2,3,5-trimethylfenol	µg/l			0.1
t-octylfenol	µg/l	0.1	0.03	0.03
nonylfenol	µg/l	0.3	0.09	0.3
bisfenol A	µg/l			0.1
4-chloor-3-methylfenol	µg/l	9	2.7	0.1
4-chloor-3,5-dimethylfenol (dettol)	µg/l			0.1
2-chloorfenol	µg/l	20 (som)	2	0.1
3-chloorfenol	µg/l		2	0.1
4-chloorfenol	µg/l		2	0.1
2,3-dichloorfenol	µg/l			0.1
2,4-dichloorfenol	µg/l	2	0.6	0.1
2,5-dichloorfenol	µg/l			0.1
2,6-dichloorfenol	µg/l			0.1
3,4-dichloorfenol	µg/l			0.1
3,5-dichloorfenol	µg/l			0.1
2,3,4-trichloorfenol	µg/l	6 (som)	0.3	0.1
2,3,5-trichloorfenol	µg/l		0.3	0.1
2,3,6-trichloorfenol	µg/l		0.3	0.1
2,4,5-trichloorfenol	µg/l		0.3	0.1
2,4,6-trichloorfenol	µg/l		0.3	0.1
3,4,5-trichloorfenol	µg/l		0.3	0.1
2,3,4,5-tetrachloorfenol	µg/l			0.1
2,3,4,6-tetrachloorfenol	µg/l			0.1
2,3,5,6-tetrachloorfenol	µg/l			0.1
pentachloorfenol	µg/l	0.4	0.12	0.1
Per- en polyfluoralkylverbindingen (PFAS)				
perfluor-n-butaanzuur (PFBA)	µg/l			0.01
perfluor-n-pentaanzuur (PFPeA)	µg/l			0.01
perfluor-n-hexaanzuur (PFHxA)	µg/l			0.01
perfluor-n-heptaanzuur (PFHpA)	µg/l			0.01

Parameter	Eenheid	OW Bijlage 2.3.1 art 3 (laagste MKN)	30% NW cfr 2009/90/EC	LOQ_{max} / Rapportagegrens
perfluor-n-octaanzuur (PFOA)	µg/l			0.01
perfluor-n-nonaanzuur (PFNA)	µg/l			0.01
perfluor-n-decaanzuur (PFDA)	µg/l			0.01
perfluor-n-undecaanzuur (PFUnDA)	µg/l			0.01
perfluor-n-dodecaanzuur (PFDoDA)	µg/l			0.01
perfluor-n-tridecaanzuur (PFTrDA)	µg/l			0.05
perfluor-n-tetradecaanzuur (PFTeDA)	µg/l			0.01
perfluor-n-hexadecaanzuur (PFHxDA)	µg/l			0.01
perfluor-n-butaansulfonzuur (PFBS)	µg/l			0.01
perfluor-n-pentaansulfonzuur (PFPeS)	µg/l			0.01
perfluor-n-hexaansulfonzuur (PFHxS)	µg/l			0.01
perfluor-n-heptaansulfonzuur (PFHpS)	µg/l			0.01
perfluor-n-octaansulfonzuur (PFOS)	µg/l	0.00065	0.00018	0.01
perfluor-n-nonaansulfonzuur (PFNS)	µg/l			0.01
perfluor-n-decaansulfonzuur (PFDS)	µg/l			0.01
4:2 fluortelomeersulfonzuur (4:2 FTS)	µg/l			0.01
8:2 fluortelomeersulfonzuur (8:2 FTS)	µg/l			0.01
perfluor-n-octaansulfonamide (PFOSA)	µg/l			0.01
N-methylperfluor-octaansulfonamide (MePFOSA)	µg/l			0.01
N-ethylperfluor-octaansulfonamide (EtPFOSA)	µg/l			0.01
N-methylperfluor-octaansulfonamido-azijnzuur (MePFOSAA)	µg/l			0.01
N-ethylperfluor-octaansulfonamido-azijnzuur (EtPFOSAA)	µg/l			0.01
8:2 fluortelomeerfosfaat diester (8:2 diPAP)	µg/l			0.01
6:2/8:2 fluortelomerfosfaat diester (6:2 8:2 diPAP)	µg/l			0.05
perfluor-2-propoxypropaanzuur (HFPO-DA)	µg/l			0.01
4,8-dioxa-3H-perfluornonaanzuur (DONA)	µg/l			0.01
perfluor-4-ethylcyclohexaansulfonzuur (PFECHS)	µg/l			0.01
perfluor-n-octadecaanzuur (PFODA)	µg/l			0.05
perfluor-n-dodecaansulfonzuur (PFDoDS)	µg/l			0.05
perfluor-n-undecaansulfonzuur (PFUnDS)	µg/l			0.05
perfluor-n-tridecaansulfonzuur (PFTrDS)	µg/l			0.05
6:2 fluortelomeerfosfaat diester (6:2 diPAP)	µg/l			0.05
6:2 fluortelomeersulfonzuur (6:2 FTS)	µg/l			0.01
10:2 fluortelomeersulfonzuur (10:2 FTS)	µg/l			0.05
perfluor-n-butaansulfonamide (PFBSA)	µg/l			0.01
N-methylperfluor-n-butaansulfonamide (MePFBSA)	µg/l			0.01
N-methylperfluor-n-butaansulfonylamide acetaat (MePFBSAA)	µg/l			0.01

Parameter	Eenheid	OW Bijlage 2.3.1 art 3 (laagste MKN)	30% NW cfr 2009/90/EC	LOQ_{max} / Rapportagegrens
perfluor-n-hexaansulfonamide (PFHxSA)	µg/l			0.01
perfluorooctaanzuur (totaal van lineaire en vertakte) (PFOAtotaal)	µg/l			0.01
perfluorooctaansulfonzuur (totaal van lineaire en vertakte) (PFOSAtotaal)	µg/l			0.01
perfluorooctaansulfonamide (totaal van lineaire en vertakte) (PFOSAtotaal)	µg/l			0.01
N-methylperfluorooctaansulfonamide (totaal van lineaire en vertakte) (MePFOSAtotaal)	µg/l			0.01
N-ethylperfluorooctaansulfonamide (totaal van lineaire en vertakte) (EtPFOSAtotaal)	µg/l			0.01
perfluorhexaansulfonzuur (totaal van lineaire en vertakte) (PFHxStotaal)	µg/l			0.01
Ultra korte keten PFAS				
trifluorazijnzuur (TFA)	ng/l			4000
perfluor-n-propaanzuur (PFPrA)	ng/l			500
perfluor-n-propaansulfonzuur (PFPrS)	ng/l			1000
trifluor-n-methaansulfonzuur (TFMS)	ng/l			500
pentafluor-n-ethaansulfonzuur (PFETs)	ng/l			500
2,3,3,3-tetrafluor-n-propaanzuur (2,3,3,3-TeFPrA)	ng/l			2500
2,2,3,3-tetrafluor-n-propaanzuur (2,2,3,3-TeFPrA)	ng/l			500
PAKs				
naftaleen	µg/l	2	0.6	1
benzo(a)pyreen	µg/l	0.00017	0.00005	0.03
fenanthreen	µg/l	0.1	0.03	0.03
fluoranthreen	µg/l	0.0063	0.002	0.03
benzo(a)anthraceen	µg/l	0.3	0.09	0.03
chryseen	µg/l	1	0.3	0.03
benzo(b)fluoranthreen	µg/l	0.03 (som)	0.005	0.03
benzo(k)fluoranthreen	µg/l		0.005	0.03
benzo(g,h,i)peryleen	µg/l	0.002 (som)	0.0003	0.03
indeno(1,2,3-c,d)pyreen	µg/l		0.0003	0.03
antraceen	µg/l	0.1	0.03	0.03
fluoreen	µg/l	2	0.6	0.03
dibenzo(a,h)antraceen	µg/l	0.5	0.15	0.03
acenaftteen	µg/l	0.06	0.018	0.03
acenaftyleen	µg/l	4	1.2	0.03
pyreen	µg/l	0.04	0.012	0.03
PCB				

<i>Parameter</i>	<i>Eenheid</i>	OW Bijlage 2.3.1 art 3 (laagste MKN)	30% NW cfr 2009/90/EC	LOQ_{max} / Rapportagegrens
PCB 28	µg/l	0.002 (som)	0.0001	0.02
PCB 52	µg/l		0.0001	0.02
PCB 101	µg/l		0.0001	0.02
PCB 118	µg/l		0.0001	0.02
PCB 153	µg/l		0.0001	0.02
PCB 138	µg/l		0.0001	0.02
PCB 180	µg/l		0.0001	0.02
OCP				
aldrin	µg/l	0.01 (som)	0.00075	0.05
dieldrin	µg/l		0.00075	0.05
isodrin	µg/l		0.00075	0.05
endrin	µg/l		0.00075	0.05
cis-chlordaan	µg/l	0.002 (som)	0.0003	0.05
trans-chlordaan	µg/l		0.0003	0.05
p,p'-DDT	µg/l	0.01	0.003	0.05
p,p'-DDD	µg/l	0.025 (som)	0.003	0.05
p,p'-DDE	µg/l		0.003	0.05
o,p'-DDT	µg/l		0.003	0.05
p,p'-DDT	µg/l		0.003	0.05
o,p'-DDD	µg/l			0.05
o,p'-DDE	µg/l			0.05
lindaan (α-isomeer)	µg/l	0.02 (som)	0.0015	0.05
lindaan (β-isomeer)	µg/l		0.0015	0.05
lindaan (γ-isomeer)	µg/l		0.0015	0.05
lindaan (δ-isomeer)	µg/l		0.0015	0.05
heptachloor	µg/l	0.0000002 (som)	0.00000002	0.05
α-heptachloorepoxide	µg/l		0.00000002	0.05
β-heptachloorepoxide	µg/l		0.00000002	0.05
α-endosulfan	µg/l	0.005 (som)	0.00075	0.07
β-endosulfan	µg/l		0.00075	0.07
endosulfansulfaat	µg/l			0.07
endosulfan (α+β+sulfaat)	µg/l			0.2
2,3,5,6-tetrachloornitrobenzeen (tecnazeen)	µg/l			0.05
pentachloornitrobenzeen (quintozeen)	µg/l			0.05
methoxychlor	µg/l			0.05
dicofol (p,p'-)	µg/l	0.0013	0.0004	0.03
OPP				
azinfos-methyl	µg/l	0.002	0.0006	0.025
azinfos-ethyl	µg/l	0.01	0.003	0.025

Parameter	Eenheid	OW Bijlage 2.3.1 art 3 (laagste MKN)	30% NW cfr 2009/90/EC	LOQ_{max} / Rapportagegrens
bromophos (bromophos-methyl)	µg/l			0.025
bromophos-ethyl	µg/l			0.025
chlorfenvinphos	µg/l	0.1	0.03	0.025
chlorpyrifos	µg/l	0.03	0.009	0.025
chlorpyrifos-methyl	µg/l			0.025
diazinon	µg/l			0.025
dichloorvos	µg/l	0.0006	0.00018	0.025
dimethoat	µg/l	0.02	0.006	0.025
ethoprofos	µg/l			0.025
fenitrothion	µg/l	0.0009	0.00027	0.025
fenthion	µg/l	0.0002	0.00006	0.025
fonofos	µg/l			0.025
malathion	µg/l	0.0008	0.00024	0.025
methidathion	µg/l			0.025
mevinfos	µg/l	0.002	0.0006	0.025
parathion-ethyl	µg/l	0.0002	0.00006	0.025
parathion-methyl	µg/l	0.01	0.003	0.025
pirimiphos-methyl	µg/l			0.025
terbufos	µg/l			0.025
disulfoton	µg/l	0.01	0.003	0.025
ONP				
Triazineherbiciden				
atrazine	µg/l	0.6	0.18	0.025
cyanazine	µg/l			0.025
desethylatrazine	µg/l			0.025
hexazinone	µg/l			0.025
prometryn	µg/l			0.025
propazine	µg/l			0.025
sebutylazine	µg/l			0.025
simazine	µg/l	1	0.3	0.025
terbutryn	µg/l	0.065	0.02	0.025
terbutylazine	µg/l			0.025
uronen (fenylurea) en anilides				
alachlor	µg/l	0.3	0.09	0.025
chloortoluron	µg/l			0.025
diuron	µg/l	0.2	0.06	0.025
isoproturon	µg/l	0.3	0.09	0.025
linuron	µg/l	0.3	0.09	0.025
metabenzthiazuron	µg/l			0.025
metabromuron	µg/l			0.025

Parameter	Eenheid	OW Bijlage 2.3.1 art 3 (laagste MKN)	30% NW cfr 2009/90/EC	LOQ_{max} / Rapportagegrens
metazachlor	µg/l			0.025
metolachlor	µg/l			0.025
metoxuron	µg/l			0.025
monolinuron	µg/l	0.3	0.09	0.025
propachlor	µg/l			0.025
carbendazim	µg/l			0.025
carbetamide	µg/l			0.025
Andere (stikstof)pesticiden (W.7.17)				
desisopropylatrazine	µg/l			0.025
chloridazon (pyrazon)	µg/l	10	3	0.025
ethofumesate	µg/l			0.025
metamitron	µg/l			0.025
desethylterbutylazine	µg/l			0.025
BAM (2,6-dichlorobenzamide)	µg/l			0.025
bromacil	µg/l			0.025
propanil	µg/l	0.2	0.06	0.1
trifluralin	µg/l	0.03	0.009	0.1
demeton	µg/l	0.05	0.015	0.1
triazophos	µg/l			0.1
coumafos	µg/l	0.001	0.0003	0.025
chlorpropham	µg/l			0.025
glyfosaat	µg/l			0.05
AMPA	µg/l			0.05
aclonifen	µg/l	0.12	0.036	0.005
bifenox	µg/l	0.012	0.0036	0.004
cybutryne	µg/l	0.0025	0.00075	0.002
cypermethrin	µg/l	0.00008	0.000024	0.006
quinoxifen	µg/l	0.15	0.045	0.002
Zure herbiciden				
2,4,5-trichloorfenoxo-azijnzuur (2,4,5-T)	µg/l	2	0.6	0.05
2,4dichloorfenoxiazijnzuur (2,4-D)	µg/l	20	6	0.05
bentazon	µg/l	50	15	0.05
dichlorprop	µg/l	20	6	0.05
fenoprop (2,4-P)	µg/l			0.05
fluroxypyr	µg/l			0.05
MCPA	µg/l	0.7	0.21	0.05
MCPB	µg/l			0.05
mecoprop (MCP)	µg/l	10	3	0.05
2,4-DB	µg/l			0.05
dicamba	µg/l			0.3

<i>Parameter</i>	<i>Eenheid</i>	OW Bijlage 2.3.1 art 3 (laagste MKN)	30% NW cfr 2009/90/EC	LOQ_{max} / Rapportagegrens
Niet-ionogene oppervlakteactieve stoffen		1000	300	300
alcoholethoxylaten (AE)	µg/l			10
alkylfenoethoxylaten (APE)	µg/l			10
Kationische oppervlakteactieve stoffen (indiv,)	µg/l	1000	300	10 indiv
Gebromeerde brandvertragers				
BDE 28	µg/l	0.14 (som)	0.007	0.025
BDE 47	µg/l		0.007	0.025
BDE 99	µg/l		0.007	0.025
BDE 100	µg/l		0.007	0.025
BDE 153	µg/l		0.007	0.025
BDE 154	µg/l		0.007	0.025
BDE 209	µg/l			0.04
HBCD	µg/l	0.0016	0.0005	0.02
Organotinverbindingen				
dibutyltindichloride dibutyltinoxide dibutyltinzouten	µg Sn/l	0.08		0.03
tetrabutyltin	µg/l	0.012		0.004
Tributyltin	µg/l	0.0002		0.00006
trifenylnacetaat trifenylnchloride trifenylnhydroxide	µg/l	0.0003		0.0001
Aromatische amines				
aniline	µg/l			0.1
2-chloroaniline 3-chloroaniline 4-chloroaniline	µg/l	1 (som)	0.3 (som)	0.1 indiv
2,3-dichloroaniline 2,4-dichloroaniline 2,5-dichloroaniline 2,6-dichloroaniline 3,5-dichloroaniline	µg/l	0.2 (som)	0.06 (som)	0.01 indiv
3,4-dichloroaniline	µg/l	20 (som met 1,2-dichloorbenzeen)	6	0.1
2-chloro-4-methylaniline 3-chloro-2-methylaniline 4-chloro-2-methylaniline 2-chloro-5-methylaniline 2-chloro-6-methylaniline 4-chloro-3-methylaniline	µg/l	8 (som)	2.4 (som)	0.4 indiv
3,3'-dichlorobenzidine 4,4'-diamino-2,2'-dichlorobiphenyl	µg/l	0.5 (som)	0.15 (som)	0.07 indiv

<i>Parameter</i>	<i>Eenheid</i>	<i>OW Bijlage 2.3.1 art 3 (laagste MKN)</i>	<i>30% NW cfr 2009/90/EC</i>	<i>LOQ_{max} / Rapportagegrens</i>
2-amino-4-chlorophenol	µg/l	10	3	3
4-chloor-2-nitroaniline	µg/l	2	0.6	0.6
benzidine	µg/l	0.6	0.18	0.18
4,4'-diaminodifenylmethaan	µg/l			0.1
4,4'-methylenebis(2-chloroaniline)	µg/l			0.1
2,4-diaminotolueen	µg/l			0.1
Ftaalzuuresters				
dimethylftalaat (DMP)	µg/l			1
diethylftalaat (DEP)	µg/l			1
di-n-butylftalaat (DBP)	µg/l			1
di-isobutylftalaat (DiBP)	µg/l			1
benzylbutylftalaat (BBP)	µg/l			1
di-n-octylftalaat (DnOP)	µg/l			1
dicyclohexylftalaat (DCHP)	µg/l			1
dipropylftalaat (DPrP)	µg/l			1
di-n-pentylftalaat (DnPP)	µg/l			1
di-isopentylftalaat (DIPP)	µg/l			1
n-pentylisopentylftalaat (PIPP)	µg/l			1
di-n-hexylftalaat (DnHxP)	µg/l			1
di-isohexylftalaat (DIHxP)	µg/l			1
di-n-heptylftalaat (DnHpP)	µg/l			1
di(2-ethylhexyl)ftalaat (DEHP)	µg/l			2
di-n-undecylftalaat (DnUP)	µg/l			1
di-isohexylftalaat (mix van isomeren) (DIHxP-mix)	µg/l			5
di-isoheptylftalaat (mix van isomeren) (DIHpP-mix)	µg/l			5
di-isononylftalaat (mix van isomeren) (DINP-mix)	µg/l			5
di-isodecylftalaat (mix van isomeren) (DIDP-mix)	µg/l			5
di-isoundecylftalaat (mix van isomeren) (DIUP-mix)	µg/l			5

Tabel 6: Grondwater (GW) – organische parameters

<i>Parameter</i>	<i>Eenheid</i>	<i>GW MKN Vlarem Bijlage 2.4.1</i>	<i>GW Richtw Vlarebo</i>	<i>30% NW cfr 2009/90/EC</i>	<i>LOQ_{max} / Rapportage grens</i>	<i>LOQ-eis CMA</i>
Acrylamide	µg/l				-	
Minerale olie (GC)	µg/l		300	90	100	
Geëmulgeerde of opgeloste koolwaterstoffen (na extractie met ether) minerale oliën	µg/l	10		3		
Petroleumether extraheerbare stoffen	mg/l				20	
Perchloorethyleen extraheerbare apolaire stoffen	mg/l				0.4	
Oliën en Vetten (IR)	mg/l				0.4	
Oliën en vetten (gravim)	mg/l				20	
EOX	µg Cl/l				5	
AOX	µg Cl/l				20	
POX	µg Cl/l				10	
VOC						
epichloorhydrine	µg/l				-	
vinylchloride	µg/l		2	0.6	1	1
chloorethaan	µg/l				1	
1,1-dichlooretheen	µg/l				1	
dichloormethaan	µg/l		5	1.5	2.5	2.5
1,1-dichloorethaan	µg/l		5	1.5	1	1
2,2-dichloorpropaan	µg/l				1	
1,2-dichlooretheen, cis	µg/l			0.75	1	1.2
1,2-dichlooretheen, trans	µg/l			0.75	1	1.2
1,2-dichloorethenen (som)	µg/l		5	1.5	1	
broomchloormethaan	µg/l				1	
chloroform (trichloormethaan)	µg/l		5	1.5	1	1
1,1,1-trichloorethaan	µg/l		5	1.5	1	1
1,1-dichloorpropeen	µg/l				1	
koolstoftetrachloride (tetrachloormethaan)	µg/l		1.2	0.36	0.6	0.6
1,2-dichloorethaan (EDC)	µg/l		5	1.5	1	1
trichloorethyleen	µg/l	10 miv PER	5	1.5	1	1
1,2-dichloorpropaan	µg/l				1	
dibroommethaan	µg/l				1	

<i>Parameter</i>	<i>Eenheid</i>	GW MKN Vlarem Bijlage 2.4.1	GW Richtw Vlarebo	30% NW cfr 2009/90/EC	LOQ_{max} / Rapportage grens	LOQ-eis CMA
broomdichloormethaan	µg/l				1	
1,3-dichloorpropeen-cis	µg/l				1	
1,3-dichloorpropeen-trans	µg/l				1	
1,1,2-trichloorethaan	µg/l		5	1.5	1	1
tetrachloorethyleen	µg/l	10 miv TRI	5	1.5	1	1
1,3-dichloorpropaan	µg/l				1	
dibroomchloormethaan	µg/l				1	
1,2-dibroomethaan	µg/l				1	
chloorbenzeen	µg/l		5	1.5	1	1
1,1,1,2-tetrachloorethaan	µg/l				1	
bromoform (tribroommethaan)	µg/l				1	
1,1,2,2-tetrachloorethaan	µg/l				1	
broombenzeen	µg/l				1	
1,2,3-trichloorpropaan	µg/l				1	
2-chloortolueen	µg/l				1	
4-chloortolueen	µg/l				1	
1,3-dichloorbenzeen	µg/l		5	1.5	1	1
1,4-dichloorbenzeen	µg/l		5	1.5	1	1
1,2-dichloorbenzeen	µg/l		5	1.5	1	1
1,2-dibroom-3-chloorpropaan	µg/l				1	
1,2,4-trichloorbenzeen	µg/l		5	1.5	0.1	1
hexachloorbutadien	µg/l				0.1	
1,2,3-trichloorbenzeen	µg/l		5	1.5	0.1	1
1,3,5-trichloorbenzeen	µg/l		5	1.5	0.1	1
trichloorbenzenen (som)	µg/l				0.3	
tetrachlooretheen + trichlooretheen	µg/l				2	
trihalomethanen-totaal	µg/l				4	
MAK						
benzeen	µg/l		2	0.6	1	1
tolueen	µg/l		20	6	1	4
ethylbenzeen	µg/l		20	6	1	4
m- + p-xyleen	µg/l			4	2	2
o-xyleen	µg/l			2	1	1
xylenen (som)	µg/l		20	6	3	
styreen	µg/l		10	3	1	2
isopropylbenzeen	µg/l				1	
n-propylbenzeen	µg/l				1	
1,3,5-trimethylbenzeen	µg/l		150	45	1	10
tert-butylbenzeen	µg/l				1	
1,2,4-trimethylbenzeen	µg/l		150	45	1	10
1,2,3-trimethylbenzeen	µg/l		150	45	1	10

<i>Parameter</i>	<i>Eenheid</i>	GW MKN Vlarem Bijlage 2.4.1	GW Richtw Vlarebo	30% NW cfr 2009/90/EC	LOQ_{max} / Rapportage grens	LOQ-eis CMA
sec butylbenzeen	µg/l				1	
p-isopropyltolueen	µg/l				1	
n-butylbenzeen	µg/l				1	
naftaleen	µg/l				1	
methyl-t-butyl-ether (MTBE)	µg/l		20	6	4	4
n-hexaan	µg/l				4	4
n-heptaan	µg/l				10	10
n-octaan	µg/l				10	10
CIKWS (matig vluchtige)						
hexachloorethaan	µg/l				0.5	
1,3,5-trichloorbenzeen	µg/l		5	1.5	0.1	1
1,2,4-trichloorbenzeen	µg/l		5	1.5	0.1	1
1,2,3-trichloorbenzeen	µg/l		5	1.5	0.1	1
trichloorbenzenen (som)	µg/l				0.3	
hexachloorbutadieen (HCBd)	µg/l				0.1	
(1,2,3,5+1,2,4,5)- tetrachloorbenzeen	µg/l		10	3	0.2	2
1,2,3,4-tetrachloorbenzeen	µg/l		5	1.5	0.1	1
2-chloornaftaleen	µg/l				0.1	
1-chloornaftaleen	µg/l				0.1	
pentachloorbenzeen	µg/l		1.4	0.42	0.1	0.3
hexachloorbenzeen	µg/l		0.6	0.18	0.1	0.1
Fenolen		fenolgetal 0.5 µg/l C6H5OH				
fenol	µg/l				0.5	
2-methylfenol (o-cresol)	µg/l				0.1	
3-methylfenol (m-cresol)	µg/l				0.1	
4-methylfenol (p-cresol)	µg/l				0.1	
2,3-dimethylfenol (a)	µg/l				0.1	
2,4-dimethylfenol	µg/l				0.1	
2,5-dimethylfenol	µg/l				0.1	
2,6-dimethylfenol	µg/l				0.1	
3,4-dimethylfenol	µg/l				0.1	
3,5-dimethylfenol	µg/l				0.1	
2-ethylfenol	µg/l				0.1	
3-ethylfenol	µg/l				0.1	
4-ethylfenol	µg/l				0.1	
2-isopropylfenol	µg/l				0.1	

<i>Parameter</i>	<i>Eenheid</i>	<i>GW MKN Vlarem Bijlage 2.4.1</i>	<i>GW Richtw Vlarebo</i>	<i>30% NW cfr 2009/90/EC</i>	<i>LOQ_{max} / Rapportage grens</i>	<i>LOQ-eis CMA</i>
2,3,5-trimethylfenol	µg/l				0.1	
t-octylfenol	µg/l				0.03	
nonylfenol	µg/l				0.3	
bisfenol A	µg/l				0.1	
4-chloor-3-methylfenol	µg/l				0.1	
4-chloor-3,5-dimethylfenol (dettol)	µg/l				0.1	
2-chloorfenol	µg/l		15	4.5	0.1	1
3-chloorfenol	µg/l				0.1	
4-chloorfenol	µg/l				0.1	
2,3-dichloorfenol	µg/l				0.1	
2,4-dichloorfenol	µg/l		9	2.7	0.1	1
2,5-dichloorfenol	µg/l				0.1	
2,6-dichloorfenol	µg/l				0.1	
3,4-dichloorfenol	µg/l				0.1	
3,5-dichloorfenol	µg/l				0.1	
2,3,4-trichloorfenol	µg/l				0.1	
2,3,5-trichloorfenol	µg/l				0.1	
2,3,6-trichloorfenol	µg/l				0.1	
2,4,5-trichloorfenol	µg/l		300	90	0.1	1
2,4,6-trichloorfenol	µg/l		200	60	0.1	1
3,4,5-trichloorfenol	µg/l				0.1	
2,3,4,5-tetrachloorfenol	µg/l				0.1	
2,3,4,6-tetrachloorfenol	µg/l		90	27	0.1	1
2,3,5,6-tetrachloorfenol	µg/l				0.1	
pentachloorfenol	µg/l		9	2.7	0.1	1
Per- en polyfluoralkylverbindingen (PFAS)						
perfluor-n-butaanzuur (PFBA)	µg/l				0.01	
perfluor-n-pentaanzuur (PFPeA)	µg/l				0.01	
perfluor-n-hexaanzuur (PFHxA)	µg/l				0.01	
perfluor-n-heptaanzuur (PFHpA)	µg/l				0.01	
perfluor-n-octaanzuur (PFOA)	µg/l				0.01	
perfluor-n-nonaanzuur (PFNA)	µg/l				0.01	
perfluor-n-decaanzuur (PFDA)	µg/l				0.01	
perfluor-n-undecaanzuur (PFUnDA)	µg/l				0.01	
perfluor-n-dodecaanzuur (PFDoDA)	µg/l				0.01	
perfluor-n-tridecaanzuur (PFTrDA)	µg/l				0.05	
perfluor-n-tetradecaanzuur (PFTeDA)	µg/l				0.01	
perfluor-n-hexadecaanzuur (PFHxDA)	µg/l				0.01	

<i>Parameter</i>	<i>Eenheid</i>	<i>GW MKN Vlarem Bijlage 2.4.1</i>	<i>GW Richtw Vlarebo</i>	<i>30% NW cfr 2009/90/EC</i>	<i>LOQ_{max} / Rapportage grens</i>	<i>LOQ-eis CMA</i>
perfluor-n-butaansulfonzuur (PFBS)	µg/l				0.01	
perfluor-n-pentaansulfonzuur (PFPeS)	µg/l				0.01	
perfluor-n-hexaansulfonzuur (PFHxS)	µg/l				0.01	
perfluor-n-heptaansulfonzuur (PFHpS)	µg/l				0.01	
perfluor-n-octaansulfonzuur (PFOS)	µg/l				0.01	
perfluor-n-nonaansulfonzuur (PFNS)	µg/l				0.01	
perfluor-n-decaansulfonzuur (PFDS)	µg/l				0.01	
4:2 fluortelomeersulfonzuur (4:2 FTS)	µg/l				0.01	
8:2 fluortelomeersulfonzuur (8:2 FTS)	µg/l				0.01	
perfluor-n-octaansulfonamide (PFOSA)	µg/l				0.01	
N-methylperfluorooctaansulfonamide (MePFOSA)	µg/l				0.01	
N-ethylperfluorooctaansulfonamide (EtPFOSA)	µg/l				0.01	
N-methylperfluorooctaansulfonamido-azijnzuur (MePFOSAA)	µg/l				0.01	
N-ethylperfluorooctaansulfonamido-azijnzuur (EtPFOSAA)	µg/l				0.01	
8:2 fluortelomeerfosfaat diester (8:2 diPAP)	µg/l				0.01	
6:2/8:2 fluortelomerfosfaat diester (6:2 8:2 diPAP)	µg/l				0.05	
perfluor-2-propoxypropaanzuur (HFPO-DA)	µg/l				0.01	
4,8-dioxa-3H-perfluornonaanzuur (DONA)	µg/l				0.01	
perfluor-4-ethylcyclohexaansulfonzuur (PFECHS)	µg/l				0.01	
perfluor-n-octadecaanzuur (PFODA)	µg/l				0.05	
perfluor-1-dodecaansulfonzuur (PFDoDS)	µg/l				0.05	
perfluor-1-undecaansulfonzuur (PFUnDS)	µg/l				0.05	
perfluor-1-tridecaansulfonzuur (PFTrDS)	µg/l				0.05	
6:2 fluortelomeerfosfaat diester (6:2 diPAP)	µg/l				0.05	
6:2 fluortelomeersulfonzuur (6:2 FTS)	µg/l				0.01	
10:2 fluortelomeersulfonzuur (10:2 FTS)	µg/l				0.05	

<i>Parameter</i>	<i>Eenheid</i>	<i>GW MKN Vlarem Bijlage 2.4.1</i>	<i>GW Richtw Vlarebo</i>	<i>30% NW cfr 2009/90/EC</i>	<i>LOQ_{max} / Rapportage grens</i>	<i>LOQ-eis CMA</i>
perfluor-n-butaansulfonamide (PFBSA)	µg/l				0.01	
N-methylperfluor-n-butaan-sulfonamide (MePFBSA)	µg/l				0.01	
N-methylperfluor-n-butaan-sulfonylamide acetaat (MePFBSAA)	µg/l				0.01	
perfluor-n-hexaansulfonamide (PFHxSA)	µg/l				0.01	
perfluor-octaanzuur (totaal van lineaire en vertakte) (PFOAtotaal)	µg/l				0.01	
perfluor-octaansulfonzuur (totaal van lineaire en vertakte) (PFOSStotaal)	µg/l				0.01	
perfluor-octaansulfonamide (totaal van lineaire en vertakte) (PFOSAtotaal)	µg/l				0.01	
N-methylperfluor-octaansulfonamide (totaal van lineaire en vertakte) (MePFOSAtotaal)	µg/l				0.01	
N-ethylperfluor-octaansulfonamide (totaal van lineaire en vertakte) (EtPFOSAtotaal)	µg/l				0.01	
perfluor-hexaansulfonzuur (totaal van lineaire en vertakte) (PFHxStotaal)	µg/l				0.01	
Ultra korte keten PFAS						
trifluorazijnzuur (TFA)	ng/l				4000	
perfluor-n-propaanzuur (PFPrA)	ng/l				500	
perfluor-n-propaansulfonzuur (PFPrS)	ng/l				1000	
trifluor-n-methaansulfonzuur (TFMS)	ng/l				500	
pentafluor-n-ethaansulfonzuur (PFEtS)	ng/l				500	
2,3,3,3-tetrafluor-n-propaanzuur (2,3,3,3-TeFPrA)	ng/l				2500	
2,2,3,3-tetrafluor-n-propaanzuur (2,2,3,3-TeFPrA)	ng/l				500	
PAKs		0.2 µg/l totaal (6 refstoffen)				
naftaleen	µg/l		20	6	1	2
benzo(a)pyreen	µg/l	0.033	0.4	0.01	0.03	0.1
fenanthreen	µg/l		20	6	0.03	1

<i>Parameter</i>	<i>Eenheid</i>	GW MKN Vlarem Bijlage 2.4.1	GW Richtw Vlarebo	30% NW cfr 2009/90/EC	LOQ_{max} / Rapportage grens	LOQ-eis CMA
fluorantheen	µg/l	0.033	2	0.01	0.03	0.2
benzo(a)anthraceen	µg/l		2	0.6	0.03	0.2
chryseen	µg/l		0.9	0.27	0.03	0.1
benzo(b)fluorantheen	µg/l	0.033	0.7	0.01	0.03	0.1
benzo(k)fluorantheen	µg/l	0.033	0.4	0.01	0.03	0.1
benzo(g,h,i)peryleen	µg/l	0.033	0.1	0.01	0.03	0.05
indeno(1,2,3-c,d)pyreen	µg/l	0.033	0.06	0.02	0.03	0.03
antraceen	µg/l		20	6	0.03	0.5
fluoreen	µg/l		20	6	0.03	0.5
dibenzo(a,h)antraceen	µg/l		0.3	0.09	0.03	0.06
acenafteen	µg/l		20	6	0.03	0.5
acenaftyleen	µg/l		20	6	0.03	0.5
pyreen	µg/l		20	6	0.03	0.5
PCB						
PCB 28	µg/l	0.1			0.02	
PCB 52	µg/l	0.1			0.02	
PCB 101	µg/l	0.1			0.02	
PCB 118	µg/l	0.1			0.02	
PCB 153	µg/l	0.1			0.02	
PCB 138	µg/l	0.1			0.02	
PCB 180	µg/l	0.1			0.02	
OCP		0.1 µg/l per stof 0.5 µg/l totaal				
aldrin	µg/l	0.1		0.03	0.01	0.01
dieldrin	µg/l	0.1		0.03	0.01	0.01
aldrin+dieldrin	µg/l		0.02	0.006	0.02	
cis-chlordaan	µg/l	0.1		0.03	0.03	0.03
trans-chlordaan	µg/l	0.1		0.03	0.03	0.03
chlordan (cis+trans)	µg/l		0.12	0.036	0.06	
op'-DDD	µg/l	0.1		0.03	0.04	0.04
p,p'-DDD	µg/l	0.1		0.03	0.04	0.04
o,p'-DDE	µg/l	0.1		0.03	0.04	0.04
p,p'-DDE	µg/l	0.1		0.03	0.04	0.04
o,p'-DDT	µg/l	0.1		0.03	0.04	0.04
p,p'-DDT	µg/l	0.1		0.03	0.04	0.04
DDD+DDE+DDT	µg/l		1.2	0.36	0.24	
lindaan (α-isomeer)	µg/l	0.1	0.03	0.03	0.02	0.02

<i>Parameter</i>	<i>Eenheid</i>	GW MKN Vlarem Bijlage 2.4.1	GW Richtw Vlarebo	30% NW cfr 2009/90/EC	LOQ_{max} / Rapportage grens	LOQ-eis CMA
lindaan (β-isomeer)	µg/l	0.1	0.12	0.03	0.025	0.025
lindaan (γ-isomeer)	µg/l	0.1	1.2	0.03	0.05	0.25
lindaan (δ-isomeer)	µg/l	0.1		0.03	0.05	
isodrin	µg/l	0.1		0.03	0.05	
endrin	µg/l	0.1		0.03	0.05	
telodrin	µg/l	0.1		0.03	0.05	
heptachloor	µg/l	0.1		0.03	0.05	
α-heptachloorepoxide	µg/l	0.1		0.03	0.05	
β-heptachloorepoxide	µg/l	0.1		0.03	0.05	
α-endosulfan	µg/l	0.1		0.03	0.07	0.07
β-endosulfan	µg/l	0.1		0.03	0.07	0.07
endosulfansulfaat	µg/l	0.1		0.03	0.07	0.07
endosulfan (α+β+sulfaat)	µg/l		1	0.09	0.2	
2,3,5,6-tetrachloornitrobenzeen (tecnazeen)	µg/l	0.1		0.03	0.05	
pentachloornitrobenzeen (quintozeen)	µg/l	0.1		0.03	0.05	
methoxychlor	µg/l	0.1		0.03	0.05	
dicofol (p,p'-)	µg/l	0.1		0.03	0.03	
OPP						
azinfos-methyl	µg/l	0.1		0.03	0.025	
azinfos-ethyl	µg/l	0.1		0.03	0.025	
bromophos (bromophos-methyl)	µg/l	0.1		0.03	0.025	
bromophos-ethyl	µg/l	0.1		0.03	0.025	
chlorfenvinphos	µg/l	0.1		0.03	0.025	
chlorpyrifos	µg/l	0.1		0.03	0.025	
chlorpyrifos-methyl	µg/l	0.1		0.03	0.025	
diazinon	µg/l	0.1		0.03	0.025	
dichloorvos	µg/l	0.1		0.03	0.025	
dimethoat	µg/l	0.1		0.03	0.025	
ethoprofos	µg/l	0.1		0.03	0.025	
fenitrothion	µg/l	0.1		0.03	0.025	
fenthion	µg/l	0.1		0.03	0.025	
fonofos	µg/l	0.1		0.03	0.025	
malathion	µg/l	0.1		0.03	0.025	
methidathion	µg/l	0.1		0.03	0.025	
mevinfos	µg/l	0.1		0.03	0.025	
parathion-ethyl	µg/l	0.1		0.03	0.025	
parathion-methyl	µg/l	0.1		0.03	0.025	
pirimiphos-methyl	µg/l	0.1		0.03	0.025	
terbufos	µg/l	0.1		0.03	0.025	

<i>Parameter</i>	<i>Eenheid</i>	GW MKN Vlarem Bijlage 2.4.1	GW Richtw Vlarebo	30% NW cfr 2009/90/EC	LOQ_{max} / Rapportage grens	LOQ-eis CMA
disulfoton	µg/l	0.1		0.03	0.025	
ONP						
Triazineherbiciden	µg/l	0.1		0.03	0.025	
atrazine	µg/l	0.1		0.03	0.025	
cyanazine	µg/l	0.1		0.03	0.025	
desethylatrazine	µg/l	0.1		0.03	0.025	
hexazinone	µg/l	0.1		0.03	0.025	
prometryn	µg/l	0.1		0.03	0.025	
propazine	µg/l	0.1		0.03	0.025	
sebutylazine	µg/l	0.1		0.03	0.025	
simazine	µg/l	0.1		0.03	0.025	
terbutryn	µg/l	0.1		0.03	0.025	
terbutylazine	µg/l	0.1		0.03	0.025	
Uronen (fenylurea) en anilides						
alachlor	µg/l	0.1		0.03	0.025	
chloortoluron	µg/l	0.1		0.03	0.025	
diuron	µg/l	0.1		0.03	0.025	
isoproturon	µg/l	0.1		0.03	0.025	
linuron	µg/l	0.1		0.03	0.025	
metabenzthiazuron	µg/l	0.1		0.03	0.025	
metabromuron	µg/l	0.1		0.03	0.025	
metazachlor	µg/l	0.1		0.03	0.025	
metolachlor	µg/l	0.1		0.03	0.025	
metoxuron	µg/l	0.1		0.03	0.025	
monolinuron	µg/l	0.1		0.03	0.025	
propachlor	µg/l	0.1		0.03	0.025	
carbendazim	µg/l	0.1		0.03	0.025	
carbetamide	µg/l	0.1		0.03	0.025	
Andere (stikstof)pesticiden (W.7.17)						
desisopropylatrazine	µg/l	0.1		0.03	0.025	
chloridazon (pyrazon)	µg/l	0.1		0.03	0.025	
ethofumesate	µg/l	0.1		0.03	0.025	
metamitron	µg/l	0.1		0.03	0.025	
desethylterbutylazine	µg/l	0.1		0.03	0.025	
BAM (2,6-dichlorobenzamide)	µg/l	0.1		0.03	0.025	
bromacil	µg/l	0.1		0.03	0.025	
propanil	µg/l	0.1		0.03	0.1	
trifluralin	µg/l	0.1		0.03	0.1	
demeton	µg/l	0.1		0.03	0.1	

<i>Parameter</i>	<i>Eenheid</i>	GW MKN Vlarem Bijlage 2.4.1	GW Richtw Vlarebo	30% NW cfr 2009/90/EC	LOQ_{max} / Rapportage grens	LOQ-eis CMA
triazophos	µg/l	0.1		0.03	0.1	
coumafos	µg/l	0.1		0.03	0.025	
chlorpropham	µg/l	0.1		0.03	0.025	
glyfosaat	µg/l	0.1		0.03	0.05	
AMPA	µg/l	0.1		0.03	0.05	
Zure herbiciden						
2,4,5-trichloorfenoxo-azijnzuur (2,4,5-T)	µg/l	0.1		0.03	0.05	
2,4-dichloorfenoxiazijnzuur (2,4-D)	µg/l	0.1		0.03	0.05	
bentazon	µg/l	0.1		0.03	0.05	
dichlorprop	µg/l	0.1		0.03	0.05	
fenoprop (2,4-P)	µg/l	0.1		0.03	0.05	
fluroxypyr	µg/l	0.1		0.03	0.05	
MCPA	µg/l	0.1		0.03	0.05	
MCPB	µg/l	0.1		0.03	0.05	
mecoprop (MCP)	µg/l	0.1		0.03	0.05	
2,4-DB	µg/l	0.1		0.03	0.05	
dicamba	µg/l	0.1		0.03	0.3	
Kationische oppervlakteactieve stoffen (indiv,)	µg/l				10 indiv	
Gebromeerde brandvertragers						
BDE 28	µg/l				0.025	
BDE 47	µg/l				0.025	
BDE 99	µg/l				0.025	
BDE 100	µg/l				0.025	
BDE 153	µg/l				0.025	
BDE 154	µg/l				0.025	
BDE 209	µg/l				0.04	
HBCD	µg/l				0.02	
DBDPE	µg/l				0.02	
Organotinverbindingen						
dibutyltindichloride dibutyltinoxide dibutyltinzouten	µg Sn/l				0.03	
tetrabutyltin	µg/l				0.004	
tributyltin	µg/l				0.00006	
trifenylinacetaat trifenylinchloride trifenylinhydroxide	µg/l				0.0001	

<i>Parameter</i>	<i>Eenheid</i>	<i>GW MKN Vlarem Bijlage 2.4.1</i>	<i>GW Richtw Vlarebo</i>	<i>30% NW cfr 2009/90/EC</i>	<i>LOQ_{max} / Rapportage grens</i>	<i>LOQ-eis CMA</i>
Aromatische amines						
aniline	µg/l				0.1	
2-chloroaniline 3-chloroaniline 4-chloroaniline	µg/l				0.1 indiv	
2,3-dichloroaniline 2,4-dichloroaniline 2,5-dichloroaniline 2,6-dichloroaniline 3,5-dichloroaniline	µg/l				0.01 indiv	
3,4-dichloroaniline	µg/l				0.1	
2-chloro-4-methylaniline 3-chloro-2-methylaniline 4-chloro-2-methylaniline 2-chloro-5-methylaniline 2-chloro-6-methylaniline 4-chloro-3-methylaniline	µg/l				0.4 indiv	
3,3'-dichlorobenzidine 4,4'-diamino-2,2'-dichlorobiphenyl	µg/l				0.07 indiv	
2-amino-4-chlorophenol	µg/l				3	
4-chloor-2-nitroaniline	µg/l				0.6	
benzidine	µg/l				0.18	
4,4'-diaminodifenylmethaan	µg/l				0.1	
4,4'-methylenebis(2-chloroaniline)	µg/l				0.1	
2,4-diaminotolueen	µg/l				0.1	

Tabel 7: Drinkwater (DW) – organische parameters

<i>Parameter</i>	<i>Eenh eid</i>	<i>DW richtlijn</i>	<i>30% NW cfr 2009/9 0/EC</i>	<i>LOQ_{max} / Rapportagegrens</i>
Acrylamide	µg/l	0.1 ⁽²⁾	0.03	0.03
Minerale olie (GC)	µg/l			100
Geëmulgeerde of opgeloste koolwaterstoffen (na extractie met ether) minerale oliën	µg/l			
Petroleumether extraheerbare stoffen	mg/l			20
Perchloorethyleen extraheerbare apolaire stoffen	mg/l			0.4
Oliën en Vetten (IR)	mg/l			0.4
Oliën en vetten (gravim)	mg/l			20
EOX	µg Cl/l			5
AOX	µg Cl/l			20
POX	µg Cl/l			10
VOCl, MAK				
epichloorhydrine	µg/l	0.1 ⁽²⁾	0.03	0.03
vinylchloride	µg/l	0.5 ⁽²⁾	0.1	0.5
chloorethaan	µg/l			1
1,1-dichlooretheen	µg/l			1
dichloormethaan	µg/l			2.5
1,1-dichloorethaan	µg/l			1
2,2-dichloorpropaan	µg/l			1
1,2-dichlooretheen, Cis	µg/l			1
1,2-dichlooretheen, Trans	µg/l			1
1,2-dichloorethenen (som)	µg/l			1
broomchloormethaan	µg/l			1
chloroform (trichloormethaan)	µg/l		8	8
1,1,1-trichloorethaan	µg/l			1
1,1-dichloorpropeen	µg/l			1
koolstoftetrachloride (tetrachloormethaan)	µg/l			1
1,2-dichloorethaan (EDC)	µg/l	3	0.9	0.9
trichloorethyleen	µg/l		1	1

<i>Parameter</i>	<i>Eenh eid</i>	<i>DW richtlijn</i>	<i>30% NW cfr 2009/9 0/EC</i>	<i>LOQ_{max} / Rapportagegrens</i>
1,2-dichloorpropaan	µg/l			1
dibroommethaan	µg/l			1
broomdichloormethaan	µg/l	60	8	8
1,3-dichloorpropeen-cis	µg/l			1
1,3-dichloorpropeen-trans	µg/l			1
1,1,2-trichloorethaan	µg/l			1
tetrachloorethyleen	µg/l		1	1
1,3-dichloorpropaan	µg/l			1
dibroomchloormethaan	µg/l		8	8
1,2-dibroommethaan	µg/l			1
chloorbenzeen	µg/l			1
1,1,1,2-tetrachloorethaan	µg/l			1
bromoform (tribroommethaan)	µg/l		8	8
1,1,2,2-tetrachloorethaan	µg/l			1
broombenzeen	µg/l			1
1,2,3-trichloorpropaan	µg/l			1
2-chloortolueen	µg/l			1
4-chloortolueen	µg/l			1
1,3-dichloorbenzeen	µg/l			1
1,4-dichloorbenzeen	µg/l			1
1,2-dichloorbenzeen	µg/l			1
1,2-dibroom-3-chloorpropaan	µg/l			1
1,2,4-trichloorbenzeen	µg/l			2
hexachloorbutadieen	µg/l			0.1
1,2,3-trichloorbenzeen	µg/l			2
1,3,5-trichloorbenzeen	µg/l			2
trichloorbenzenen (som)	µg/l	20	6	6
tetrachlooretheen + trichlooretheen	µg/l	10	3	3
trihalomethanen-totaal	µg/l	100	30	30
MAK				
benzeen	µg/l	1	0.3	0.3
tolueen	µg/l			1
ethylbenzeen	µg/l			1
m- + p-xyleen	µg/l		50	50
o-xyleen	µg/l		50	50
xylenen (som)	µg/l	500	150	150
styreen	µg/l	20	6	6
isopropylbenzeen	µg/l			1
n-propylbenzeen	µg/l			1
1,3,5-trimethylbenzeen	µg/l			1

Parameter	Eenh eid	DW richtlijn	30% NW cfr 2009/9 0/EC	LOQ_{max} / Rapportagegrens
tert-butylbenzeen	µg/l			1
1,2,4-trimethylbenzeen	µg/l			1
1,2,3-trimethylbenzeen	µg/l			1
sec butylbenzeen	µg/l			1
p-isopropyltolueen	µg/l			1
n-butylbenzeen	µg/l			1
naftaleen	µg/l			1
methyl-t-butyl-ether (MTBE)	µg/l			4
n-hexaan	µg/l			4
n-heptaan	µg/l			10
n-octaan	µg/l			10
CIKWS (matig vluchtige)				
hexachloorethaan	µg/l			0.5
1,3,5-trichloorbenzeen	µg/l			2
1,2,4-trichloorbenzeen	µg/l			2
1,2,3-trichloorbenzeen	µg/l			2
trichloorbenzenen (som)	µg/l			6
hexachloorbutadien (HCBD)	µg/l			0.1
(1,2,3,5+1,2,4,5)-tetrachloorbenzeen	µg/l			0.2
1,2,3,4-tetrachloorbenzeen	µg/l			0.1
2-chloornaftaleen	µg/l			0.1
1-chloornaftaleen	µg/l			0.1
pentachloorbenzeen	µg/l			0.1
hexachloorbenzeen	µg/l			0.1
Fenolen				
fenol	µg/l			0.5
2-methylfenol (o-cresol)	µg/l			0.1
3-methylfenol (m-cresol)	µg/l			0.1
4-methylfenol (p-cresol)	µg/l			0.1
2,3-dimethylfenol (a)	µg/l			0.1
2,4-dimethylfenol	µg/l			0.1
2,5-dimethylfenol	µg/l			0.1
2,6-dimethylfenol	µg/l			0.1
3,4-dimethylfenol	µg/l			0.1
3,5-dimethylfenol (a)	µg/l			0.1
2-ethylfenol	µg/l			0.1
3-ethylfenol	µg/l			0.1

Parameter	Eenh eid	DW richtlijn	30% NW cfr 2009/9 0/EC	LOQ_{max} / Rapportagegrens
4-ethylfenol (a)	µg/l			0.1
2-isopropylfenol	µg/l			0.1
2,3,5-trimethylfenol	µg/l			0.1
t-octylfenol	µg/l			0.03
nonylfenol	µg/l			0.3
bisfenol A	µg/l			0.1
4-chloor-3-methylfenol	µg/l			0.1
4-chloor-3,5-dimethylfenol (dettol)	µg/l			0.1
2-chloorfenol	µg/l			0.1
3-chloorfenol	µg/l			0.1
4-chloorfenol	µg/l			0.1
2,3-dichloorfenol	µg/l			0.1
2,4-dichloorfenol (b)	µg/l			0.1
2,5-dichloorfenol (b)	µg/l			0.1
2,6-dichloorfenol	µg/l			0.1
3,4-dichloorfenol	µg/l			0.1
3,5-dichloorfenol (b)	µg/l			0.1
2,3,4-trichloorfenol	µg/l			0.1
2,3,5-trichloorfenol	µg/l			0.1
2,3,6-trichloorfenol	µg/l			0.1
2,4,5-trichloorfenol	µg/l			0.1
2,4,6-trichloorfenol	µg/l			0.1
3,4,5-trichloorfenol	µg/l			0.1
2,3,4,5-tetrachloorfenol	µg/l			0.1
2,3,4,6-tetrachloorfenol	µg/l			0.1
2,3,5,6-tetrachloorfenol	µg/l			0.1
pentachloorfenol	µg/l			0.05
Per- en polyfluoralkylverbindingen (PFAS)		0.1 µg/l som		
perfluor-n-butaanzuur (PFBA)	µg/l			0.01
perfluor-n-pentaanzuur (PFPeA)	µg/l			0.01
perfluor-n-hexaanzuur (PFHxA)	µg/l			0.01
perfluor-n-heptaanzuur (PFHpA)	µg/l			0.01
perfluor-n-octaanzuur (PFOA)	µg/l			0.01
perfluor-n-nonaanzuur (PFNA)	µg/l			0.01
perfluor-n-decaanzuur (PFDA)	µg/l			0.01
perfluor-n-undecaanzuur (PFUnDA)	µg/l			0.01
perfluor-n-dodecaanzuur (PFDoDA)	µg/l			0.01
perfluor-n-tridecaanzuur (PFTrDA)	µg/l			0.05

Parameter	Eenh eid	DW richtlijn	30% NW cfr 2009/9 0/EC	LOQ_{max} / Rapportagegrens
perfluor-n-tetradecaanzuur (PFTeDA)	µg/l			0.01
perfluor-n-hexadecaanzuur (PFHxDA)	µg/l			0.01
perfluor-n-butaansulfonzuur (PFBS)	µg/l			0.01
perfluor-n-pentaansulfonzuur (PFPeS)	µg/l			0.01
perfluor-n-hexaansulfonzuur (PFHxS)	µg/l			0.01
perfluor-n-heptaansulfonzuur (PFHpS)	µg/l			0.01
perfluor-n-octaansulfonzuur (PFOS)	µg/l			0.01
perfluor-n-nonaansulfonzuur (PFNS)	µg/l			0.01
perfluor-n-decaansulfonzuur (PFDS)	µg/l			0.01
4:2 fluortelomeersulfonzuur (4:2 FTS)	µg/l			0.01
8:2 fluortelomeersulfonzuur (8:2 FTS)	µg/l			0.01
perfluor-n-octaansulfonamide (PFOSA)	µg/l			0.01
N-methylperfluorooctaansulfonamide (MePFOSA)	µg/l			0.01
N-ethylperfluorooctaansulfonamide (EtPFOSA)	µg/l			0.01
N-methylperfluorooctaansulfonamido-azijnzuur (MePFOSAA)	µg/l			0.01
N-ethylperfluorooctaansulfonamido-azijnzuur (EtPFOSAA)	µg/l			0.01
8:2 fluortelomeerfosfaat diester (8:2 diPAP)	µg/l			0.01
6:2/8:2 fluortelomerfosfaat diester (6:2 8:2 diPAP)	µg/l			0.05
perfluor-2-propoxypropaanzuur (HFPO-DA)	µg/l			0.01
4,8-dioxa-3H-perfluornonaanzuur (DONA)	µg/l			0.01
perfluor-4-ethylcyclohexaansulfonzuur (PFECHS)	µg/l			0.01
perfluor-n-octadecaanzuur (PFODA)	µg/l			0.05
perfluor-n-dodecaansulfonzuur (PFDoDS)	µg/l			0.05
perfluor-n-undecaansulfonzuur (PFUnDS)	µg/l			0.05
perfluor-n-tridecaansulfonzuur (PFTrDS)	µg/l			0.05
6:2 fluortelomeerfosfaat diester (6:2 diPAP)	µg/l			0.05
6:2 fluortelomeersulfonzuur (6:2 FTS)	µg/l			0.01
10:2 fluortelomeersulfonzuur (10:2 FTS)	µg/l			0.05
perfluor-n-butaansulfonamide (PFBSA)	µg/l			0.01
N-methylperfluor-n-butaansulfonamide (MePFBSA)	µg/l			0.01
N-methylperfluor-n-butaansulfonamide acetaat (MePFBSAA)	µg/l			0.01
perfluor-n-hexaansulfonamide (PFHxSA)	µg/l			0.01
perfluorooctaanzuur (totaal van lineaire en vertakte) (PFOAtotaal)	µg/l			0.01
perfluorooctaansulfonzuur (totaal van lineaire en vertakte) (PFOSAtotaal)	µg/l			0.01
perfluorooctaansulfonamide (totaal van lineaire en vertakte) (PFOSAtotaal)	µg/l			0.01
N-methylperfluorooctaansulfonamide (totaal van lineaire en vertakte) (MePFOSAtotaal)	µg/l			0.01
N-ethylperfluorooctaansulfonamide (totaal van lineaire en vertakte) (EtPFOSAtotaal)	µg/l			0.01

Parameter	Eenh eid	DW richtlijn	30% NW cfr 2009/9 0/EC	LOQ_{max} / Rapportagegrens
perfluorhexaansulfonzuur (totaal van lineaire en vertakte) (PFHxStotaal)	µg/l			0.01
Ultra korte keten PFAS				
trifluorazijnzuur (TFA)	ng/l			4000
perfluor-n-propaanzuur (PFPrA)	ng/l			500
perfluor-n-propaansulfonzuur (PFPrS)	ng/l			1000
trifluor-n-methaansulfonzuur (TFMS)	ng/l			500
pentafluor-n-ethaansulfonzuur (PFEtS)	ng/l			500
2,3,3,3-tetrafluor-n-propaanzuur (2,3,3,3-TeFPrA)	ng/l			2500
2,2,3,3-tetrafluor-n-propaanzuur (2,2,3,3-TeFPrA)	ng/l			500
PAKs		0.1 µg/l (10 refstoffs)		
naftaleen	µg/l			1
benzo(a)pyreen	µg/l	0.01	0.003	0.003
fenanthreen	µg/l			0.01
fluorantheen	µg/l			0.01
benzo(a)anthraceen	µg/l			0.01
chryseen	µg/l			0.01
benzo(b)fluorantheen	µg/l			0.01
benzo(k)fluorantheen	µg/l			0.01
benzo(g,h,i)peryleen	µg/l			0.01
indeno(1,2,3-c,d)pyreen	µg/l			0.01
antraceen	µg/l			0.01
fluoreen	µg/l			0.03
dibenzo(a,h)antraceen	µg/l			0.03
acenaftteen	µg/l			0.03
acenaftyleen	µg/l			0.03
pyreen	µg/l			0.01
PCB				
PCB 28	µg/l			0.02
PCB 52	µg/l			0.02
PCB 101	µg/l			0.02
PCB 118	µg/l			0.02
PCB 153	µg/l			0.02
PCB 138	µg/l			0.02

Parameter	Eenh eid	DW richtlijn	30% NW cfr 2009/9 0/EC	LOQ_{max} / Rapportagegrens
PCB 180	µg/l			0.02
OCP		Pesticiden : 0.1 µg/l indiv 0.5µg/l totaal ⁽¹⁾		
aldrin	µg/l	0.03	0.01	0.03
dieldrin	µg/l	0.03	0.01	0.03
cis-chlordaan	µg/l	0.1	0.03	0.03
trans-chlordaan	µg/l	0.1	0.03	0.03
op'-DDD	µg/l	0.1	0.03	0.03
p,p'-DDD	µg/l	0.1	0.03	0.03
o,p'-DDE	µg/l	0.1	0.03	0.03
p,p'-DDE	µg/l	0.1	0.03	0.03
o,p'-DDT	µg/l	0.1	0.03	0.03
p,p'-DDT	µg/l	0.1	0.03	0.03
lindaan (α-isomeer)	µg/l	0.1	0.03	0.03
lindaan (β-isomeer)	µg/l	0.1	0.03	0.03
lindaan (γ-isomeer)	µg/l	0.1	0.03	0.03
lindaan (δ-isomeer)	µg/l	0.1	0.03	0.03
isodrin	µg/l	0.1	0.03	0.03
endrin	µg/l	0.1	0.03	0.03
telodrin	µg/l	0.1	0.03	0.03
heptachloor	µg/l	0.03	0.01	0.03
α-heptachloorepoxide	µg/l	0.03	0.01	0.03
β-heptachloorepoxide	µg/l	0.03	0.01	0.03
α-endosulfan	µg/l	0.1	0.03	0.07
β-endosulfan	µg/l	0.1	0.03	0.07
endosulfansulfaat	µg/l	0.1	0.03	0.07
2,3,5,6-tetrachloornitrobenzeen (tecnazeen)	µg/l	0.1	0.03	0.03
pentachloornitrobenzeen (quintozeen)	µg/l	0.1	0.03	0.03
methoxychlor	µg/l	0.1	0.03	0.03
dicofol (p,p'-)	µg/l	0.1	0.03	0.03
OPP				
azinfos-methyl	µg/l	0.1	0.03	0.03
azinfos-ethyl	µg/l	0.1	0.03	0.03
bromophos (bromophos-methyl)	µg/l	0.1	0.03	0.03
bromophos-ethyl	µg/l	0.1	0.03	0.03
chlorfenvinphos	µg/l	0.1	0.03	0.03
chlorpyrifos	µg/l	0.1	0.03	0.03

Parameter	Eenh eid	DW richtlijn	30% NW cfr 2009/9 0/EC	LOQ_{max} / Rapportagegrens
chlorpyrifos-methyl	µg/l	0.1	0.03	0.03
diazinon	µg/l	0.1	0.03	0.03
dichloorvos	µg/l	0.1	0.03	0.03
dimethoat	µg/l	0.1	0.03	0.03
ethoprofos	µg/l	0.1	0.03	0.03
fenitrothion	µg/l	0.1	0.03	0.03
fenthion	µg/l	0.1	0.03	0.03
fonofos	µg/l	0.1	0.03	0.03
malathion	µg/l	0.1	0.03	0.03
methidathion	µg/l	0.1	0.03	0.03
mevinfos	µg/l	0.1	0.03	0.03
parathion-ethyl	µg/l	0.1	0.03	0.03
parathion-methyl	µg/l	0.1	0.03	0.03
pirimiphos-methyl	µg/l	0.1	0.03	0.03
terbufos	µg/l	0.1	0.03	0.03
disulfoton	µg/l	0.1	0.03	0.03
ONP				
Triazineherbiciden				
atrazine	µg/l	0.1	0.03	0.03
cyanazine	µg/l	0.1	0.03	0.03
desethylatrazine	µg/l	0.1	0.03	0.03
hexazinone	µg/l	0.1	0.03	0.03
prometryn	µg/l	0.1	0.03	0.03
propazine	µg/l	0.1	0.03	0.03
sebutylazine	µg/l	0.1	0.03	0.03
simazine	µg/l	0.1	0.03	0.03
terbutryn	µg/l	0.1	0.03	0.03
terbutylazine	µg/l	0.1	0.03	0.03
Uronen (fenylurea) en anilides				
alachlor	µg/l	0.1	0.03	0.03
chloortoluron	µg/l	0.1	0.03	0.03
diuron	µg/l	0.1	0.03	0.03
isoproturon	µg/l	0.1	0.03	0.03
linuron	µg/l	0.1	0.03	0.03
metabenzthiazuron	µg/l	0.1	0.03	0.03
metabromuron	µg/l	0.1	0.03	0.03
metazachlor	µg/l	0.1	0.03	0.03
metolachlor	µg/l	0.1	0.03	0.03
metoxuron	µg/l	0.1	0.03	0.03

<i>Parameter</i>	<i>Eenh eid</i>	<i>DW richtlijn</i>	<i>30% NW cfr 2009/9 0/EC</i>	<i>LOQ_{max} / Rapportagegrens</i>
monolinuron	µg/l	0.1	0.03	0.03
propachlor	µg/l	0.1	0.03	0.03
carbendazim	µg/l	0.1	0.03	0.03
carbetamide	µg/l	0.1	0.03	0.03
Andere (stikstof)pesticiden (W.7.17)				
desisopropylatrazine	µg/l	0.1	0.03	0.03
chloridazon (pyrazon)	µg/l	0.1	0.03	0.03
ethofumesate	µg/l	0.1	0.03	0.03
metamitron	µg/l	0.1	0.03	0.03
desethylterbutylazine	µg/l	0.1	0.03	0.03
BAM (2,6-dichlorobenzamide)	µg/l	0.1	0.03	0.03
bromacil	µg/l	0.1	0.03	0.03
propanil	µg/l	0.1	0.03	0.03
trifluralin	µg/l	0.1	0.03	0.03
demeton	µg/l	0.1	0.03	0.03
triazophos	µg/l	0.1	0.03	0.03
coumafos	µg/l	0.1	0.03	0.03
chlorpropham	µg/l	0.1	0.03	0.03
glyfosaat	µg/l	0.1	0.03	0.03
AMPA	µg/l	0.1	0.03	0.03
Zure herbiciden				
2,4,5-trichloorfenoxi-azijnzuur (2,4,5-T)	µg/l	0.1	0.03	0.03
2,4-dichloorfenoxiazijnzuur (2,4-D)	µg/l	0.1	0.03	0.03
bentazon	µg/l	0.1	0.03	0.03
dichlorprop	µg/l	0.1	0.03	0.03
fenoprop (2,4-P)	µg/l	0.1	0.03	0.03
fluroxypyr	µg/l	0.1	0.03	0.03
MCPA	µg/l	0.1	0.03	0.03
MCPB	µg/l	0.1	0.03	0.03
mecoprop (MCP)	µg/l	0.1	0.03	0.03
2,4-DB	µg/l	0.1	0.03	0.03
dicamba	µg/l	0.1	0.03	0.3
Kationische oppervlakteactieve stoffen (indiv,)	µg/l			10 indiv
Gebromeerde brandvertragers				
BDE 28	µg/l			0.025
BDE 47	µg/l			0.025
BDE 99	µg/l			0.025

Parameter	Eenh eid	DW richtlijn	30% NW cfr 2009/9 0/EC	LOQ_{max} / Rapportagegrens
BDE 100	µg/l			0.025
BDE 153	µg/l			0.025
BDE 154	µg/l			0.025
BDE 209	µg/l			0.04
HBCD	µg/l			0.02
DBDPE	µg/l			0.02
Organotinverbindingen				
dibutyltindichloride dibutyltinoxide dibutyltinzouten	µg Sn/l			0.03
tetrabutyltin	µg/l			0.004
tributyltin	µg/l			0.00006
trifenylnacetaat trifenylnchloride trifenylnhydroxide	µg/l			0.0001
Aromatische amines				
aniline	µg/l			0.1
2-chloroaniline 3-chloroaniline 4-chloroaniline	µg/l			0.1 indiv
2,3-dichloroaniline 2,4-dichloroaniline 2,5-dichloroaniline 2,6-dichloroaniline 3,5-dichloroaniline	µg/l			0.01 indiv
3,4-dichloroaniline	µg/l			0.1
2-chloro-4-methylaniline 3-chloro-2-methylaniline 4-chloro-2-methylaniline 2-chloro-5-methylaniline 2-chloro-6-methylaniline 4-chloro-3-methylaniline	µg/l			0.4 indiv
3,3'-dichlorobenzidine 4,4'-diamino-2,2'-dichlorobiphenyl	µg/l			0.07 indiv
2-amino-4-chlorophenol	µg/l			3
4-chloor-2-nitroaniline	µg/l			0.6
benzidine	µg/l			0.18
4,4'-diaminodifenylmethaan	µg/l			0.1
4,4'-methylenebis(2-chloroaniline)	µg/l			0.1
2,4-diaminotolueen	µg/l			0.1
Ftaalzuuresters				
dimethylftalaat (DMP)	µg/l			1
diethylftalaat (DEP)	µg/l			1

<i>Parameter</i>	<i>Eenh eid</i>	<i>DW richtlijn</i>	<i>30% NW cfr 2009/9 0/EC</i>	<i>LOQ_{max} / Rapportagegrens</i>
di-n-butylftalaat (DBP)	µg/l			1
di-isobutylftalaat (DiBP)	µg/l			1
benzylbutylftalaat (BBP)	µg/l			1
di-n-octylftalaat (DnOP)	µg/l			1
dicyclohexylftalaat (DCHP)	µg/l			1
dipropylftalaat (DPrP)	µg/l			1
di-n-pentylftalaat (DnPP)	µg/l			1
di-isopentylftalaat (DIPP)	µg/l			1
n-pentylisopentylftalaat (PIPP)	µg/l			1
di-n-hexylftalaat (DnHxP)	µg/l			1
di-isohexylftalaat (DIHxP)	µg/l			1
di-n-heptylftalaat (DnHpP)	µg/l			1
di(2-ethylhexyl)ftalaat (DEHP)	µg/l			2
di-n-undecylftalaat (DnUP)	µg/l			1
di-isohexylftalaat (mix van isomeren) (DIHxP-mix)	µg/l			5
di-isoheptylftalaat (mix van isomeren) (DIHpP-mix)	µg/l			5
di-isononylftalaat (mix van isomeren) (DINP-mix)	µg/l			5
di-isodecylftalaat (mix van isomeren) (DIDP-mix)	µg/l			5
di-isodecylftalaat (mix van isomeren) (DIUP-mix)	µg/l			5
Gehalogeneerde azijnzuren		60 µg/l (som)		
monochloorazijnzuur	µg/l			4
monobroomazijnzuur	µg/l			4
dichloorazijnzuur	µg/l			4
dibroomazijnzuur	µg/l			4
trichloorazijnzuur	µg/l			4
Microcystine-LR	µg/l	1		0.2
17-beta-estradiol	ng/l	1		0.3

(1) M.u.v. dieldrin. aldrin. heptachlor. heptachlorepoxyde

(2) Wordt berekend

Tabel 8: Afvalwater (AW) – organische parameters

<i>Parameter</i>	<i>Eenheid</i>	<i>LOQ_{max} / Rapportagegrens</i>
Minerale olie (GC)	µg/l	100
Petroleumether extraheerbare stoffen	mg/l	20
Perchloorethyleen extraheerbare apolaire stoffen	mg/l	0.4
EOX	µg Cl/l	5
AOX	µg Cl/l	20
POX	µg Cl/l	10
VOCl, MAK		
vinylchloride	µg/l	10
1,1-dichlooretheen	µg/l	10
dichloormethaan	µg/l	10
1,1-dichloorethaan	µg/l	10
2,2-dichloorpropaan	µg/l	10
1,2-dichlooretheen, cis	µg/l	10
1,2-dichlooretheen, trans	µg/l	10
broomchloormethaan	µg/l	10
chloroform (trichloormethaan)	µg/l	1
1,1,1-trichloorethaan	µg/l	10
1,1-dichloorpropeen	µg/l	10
koolstoftetrachloride (tetrachloormethaan)	µg/l	10
1,2-dichloorethaan (EDC)	µg/l	10
trichloorethyleen	µg/l	10
1,2-dichloorpropaan	µg/l	10
dibroommethaan	µg/l	10
broomdichloormethaan	µg/l	10
1,3-dichloorpropeen-cis	µg/l	1
1,3-dichloorpropeen-trans	µg/l	1
1,1,2-trichloorethaan	µg/l	10
tetrachloorethyleen	µg/l	10
1,3-dichloorpropaan	µg/l	10
dibroomchloormethaan	µg/l	10
1,2-dibroommethaan	µg/l	10
chloorbenzeen	µg/l	10
1,1,1,2-tetrachloorethaan	µg/l	10
bromoform (tribroommethaan)	µg/l	10
1,1,2,2-tetrachloorethaan	µg/l	10
broombenzeen	µg/l	10

Parameter	Eenheid	LOQ_{max} / Rapportagegrens
1,2,3-trichloorpropaan	µg/l	10
2-chloortolueen	µg/l	1
4-chloortolueen	µg/l	1
1,3-dichloorbenzeen	µg/l	10
1,4-dichloorbenzeen	µg/l	10
1,2-dichloorbenzeen	µg/l	10
1,2-dibroom-3-chloorpropaan	µg/l	10
1,2,4-trichloorbenzeen	µg/l	0.1
hexachloorbutadieen	µg/l	0.1
1,2,3-trichloorbenzeen	µg/l	0.1
1,3,5-trichloorbenzeen	µg/l	0.1
MAK		
benzeen	µg/l	1
tolueen	µg/l	1
ethylbenzeen	µg/l	1
m- + p-xyleen	µg/l	0.5
o-xyleen	µg/l	0.5
xylenen (som)	µg/l	1
styreen	µg/l	1
isopropylbenzeen	µg/l	0.5
n-propylbenzeen	µg/l	1
1,3,5-trimethylbenzeen	µg/l	1
tert-butylbenzeen	µg/l	1
1,2,4-trimethylbenzeen	µg/l	1
sec butylbenzeen	µg/l	1
p-isopropyltolueen	µg/l	1
n-butylbenzeen	µg/l	1
CIKWS (matig vluchtige)		
hexachloorethaan	ng/l	1000
1,3,5-trichloorbenzeen	ng/l	100
1,2,4-trichloorbenzeen	ng/l	100
1,2,3-trichloorbenzeen	ng/l	100
hexachloorbutadieen (HCBD)	ng/l	100
(1,2,3,5+1,2,4,5)-tetrachloorbenzeen	ng/l	200
1,2,3,4-tetrachloorbenzeen	ng/l	200
2-chloornaftaleen	ng/l	200
1-chloornaftaleen	ng/l	200
pentachloorbenzeen	ng/l	200
hexachloorbenzeen	ng/l	100

Parameter	Eenheid	LOQ_{max} / Rapportagegrens
Fenolen		
fenol	ng/l	500
2-methylfenol (o-cresol)	ng/l	100
3-methylfenol (m-cresol)	ng/l	100
4-methylfenol (p-cresol)	ng/l	100
2,3-dimethylfenol (a)	ng/l	100
2,4-dimethylfenol	ng/l	100
2,5-dimethylfenol	ng/l	100
2,6-dimethylfenol	ng/l	100
3,4-dimethylfenol	ng/l	100
3,5-dimethylfenol	ng/l	100
2-ethylfenol	ng/l	100
3-ethylfenol	ng/l	100
4-ethylfenol)	ng/l	100
2-isopropylfenol	ng/l	100
2,3,5-trimethylfenol	ng/l	100
4-t-octylfenol	ng/l	100
nonylfenol (isomeermengsel)	ng/l	1000
bisfenol A	ng/l	100
4-chloor-3-methylfenol	ng/l	100
4-chloor-3,5-dimetylfenol (dettol)	ng/l	100
2-chloorfenol	ng/l	100
3-chloorfenol	ng/l	100
4-chloorfenol	ng/l	100
2,3-dichloorfenol	ng/l	100
2,4-dichloorfenol	ng/l	100
2,5-dichloorfenol	ng/l	100
2,6-dichloorfenol	ng/l	100
3,4-dichloorfenol	ng/l	100
3,5-dichloorfenol	ng/l	100
2,3,4-trichloorfenol	ng/l	100
2,3,5-trichloorfenol	ng/l	100
2,3,6-trichloorfenol	ng/l	100
2,4,5-trichloorfenol	ng/l	100
2,4,6-trichloorfenol	ng/l	100
3,4,5-trichloorfenol	ng/l	100
2,3,4,5-tetrachloorfenol	ng/l	100
2,3,4,6-tetrachloorfenol	ng/l	100
2,3,5,6-tetrachloorfenol	ng/l	100
pentachloorfenol	ng/l	100

Parameter	Eenheid	LOQ_{max} / Rapportagegrens
Per- en polyfluoralkylverbindingen (PFAS)		
perfluor-n-butaanzuur (PFBA)	ng/l	20
perfluor-n-pentaanzuur (PFPeA)	ng/l	20
perfluor-n-hexaanzuur (PFHxA)	ng/l	20
perfluor-n-heptaanzuur (PFHpA)	ng/l	20
perfluor-n-octaanzuur (PFOA)	ng/l	20
perfluor-n-nonaanzuur (PFNA)	ng/l	20
perfluor-n-decaanzuur (PFDA)	ng/l	20
perfluor-n-undecaanzuur (PFUnDA)	ng/l	20
perfluor-n-dodecaanzuur (PFDoDA)	ng/l	20
perfluor-n-tridecaanzuur (PFTrDA)	ng/l	50
perfluor-n-tetradecaanzuur (PFTeDA)	ng/l	20
perfluor-n-hexadecaanzuur (PFHxDA)	ng/l	20
perfluor-n-butaansulfonzuur (PFBS)	ng/l	20
perfluor-n-pentaansulfonzuur (PFPeS)	ng/l	20
perfluor-n-hexaansulfonzuur (PFHxS)	ng/l	20
perfluor-n-heptaansulfonzuur (PFHpS)	ng/l	20
perfluor-n-octaansulfonzuur (PFOS)	ng/l	20
perfluor-n-nonaansulfonzuur (PFNS)	ng/l	20
perfluor-n-decaansulfonzuur (PFDS)	ng/l	20
4:2 fluortelomeersulfonzuur (4:2 FTS)	ng/l	20
8:2 fluortelomeersulfonzuur (8:2 FTS)	ng/l	20
perfluor-n-octaansulfonamide (PFOSA)	ng/l	20
N-methylperfluorooctaansulfonamide (MePFOSA)	ng/l	20
N-ethylperfluorooctaansulfonamide (EtPFOSA)	ng/l	20
N-methylperfluorooctaansulfonamido-azijnzuur (MePFOSAA)	ng/l	20
N-ethylperfluorooctaansulfonamido-azijnzuur (EtPFOSAA)	ng/l	20
8:2 fluortelomeerfosfaat diester (8:2 diPAP)	ng/l	20
6:2/8:2 fluortelomerfosfaat diester (6:2 8:2 diPAP)	ng/l	50
perfluor-2-propoxypropaanzuur (HFPO-DA)	ng/l	20
4,8-dioxa-3H-perfluornonaanzuur (DONA)	ng/l	20
perfluor-4-ethylcyclohexaansulfonzuur (PFECBS)	ng/l	20
perfluor-n-octadecaanzuur (PFODA)	ng/l	50
perfluor-n-dodecaansulfonzuur (PFDoDS)	ng/l	50
perfluor-n-undecaansulfonzuur (PFUnDS)	ng/l	50
perfluor-n-tridecaansulfonzuur (PFTrDS)	ng/l	50
6:2 fluortelomeerfosfaat diester (6:2 diPAP)	ng/l	50
6:2 fluortelomeersulfonzuur (6:2 FTS)	ng/l	50
10:2 fluortelomeersulfonzuur (10:2 FTS)	ng/l	50
perfluor-n-butaansulfonamide (PFBSA)	ng/l	20
N-methylperfluor-n-butaansulfonamide (MePFBSA)	ng/l	20

Parameter	Eenheid	LOQ_{max} / Rapportagegrens
N-methylperfluor-n-butaansulfonylamide acetaat (MePFBSAA)	ng/l	20
perfluor-n-hexaansulfonamide (PFHxSA)	ng/l	20
perfluorooctaanzuur (totaal van lineaire en vertakte) (PFOAtotaal)	ng/l	20
perfluorooctaansulfonzuur (totaal van lineaire en vertakte) (PFOSStotaal)	ng/l	20
perfluorooctaansulfonamide (totaal van lineaire en vertakte) (PFOSAtotaal)	ng/l	20
N-methylperfluorooctaansulfonamide (totaal van lineaire en vertakte) (MePFOSAtotaal)	ng/l	20
N-ethylperfluorooctaansulfonamide (totaal van lineaire en vertakte) (EtPFOSAtotaal)	ng/l	20
perfluorhexaansulfonzuur (totaal van lineaire en vertakte) (PFHxStotaal)	ng/l	20
Ultra korte keten PFAS		
trifluorazijnzuur (TFA)	ng/l	4000
perfluor-n-propaanzuur (PFPrA)	ng/l	500
perfluor-n-propaansulfonzuur (PFPrS)	ng/l	1000
trifluor-n-methaansulfonzuur (TFMS)	ng/l	500
pentafluor-n-ethaansulfonzuur (PFETs)	ng/l	500
2,3,3,3-tetrafluor-n-propaanzuur (2,3,3,3-TeFPrA)	ng/l	2500
2,2,3,3-tetrafluor-n-propaanzuur (2,2,3,3-TeFPrA)	ng/l	500
PAKs		
naftaleen	ng/l	100
benzo(a)pyreen	ng/l	50
fenanthreen	ng/l	50
fluorantheen	ng/l	50
benzo(a)anthraceen	ng/l	100
chryseen	ng/l	100
benzo(b)fluorantheen	ng/l	50
benzo(k)fluorantheen	ng/l	50
benzo(g,h,i)peryleen	ng/l	50
indeno(1,2,3-cd)pyreen	ng/l	50
antraceen	ng/l	50
fluoreen	ng/l	100
dibenzo(a,h)antraceen	ng/l	100
acenaftteen	ng/l	50
acenaftyleen	ng/l	100
pyreen	ng/l	50
PCB		
PCB 28	ng/l	20
PCB 52	ng/l	20

Parameter	Eenheid	LOQ_{max} / Rapportagegrens
PCB 101	ng/l	20
PCB 118	ng/l	20
PCB 153	ng/l	20
PCB 138	ng/l	20
PCB 180	ng/l	20
OCP		
aldrin	ng/l	400
dieldrin	ng/l	400
cis-chlordaan	ng/l	100
trans-chlordaan	ng/l	100
op'-DDD	ng/l	100
p,p'-DDD	ng/l	100
o,p'-DDE	ng/l	100
p,p'-DDE	ng/l	100
o,p'-DDT	ng/l	100
p,p'-DDT	ng/l	100
α-hexachloorcyclohexaan (α-HCH)	ng/l	100
β-hexachloorcyclohexaan (β-HCH)	ng/l	100
γ-hexachloorcyclohexaan (γ-HCH, lindaan)	ng/l	100
δ-hexachloorcyclohexaan (δ-HCH)	ng/l	100
isodrin	ng/l	400
endrin	ng/l	1000
telodrin	ng/l	400
heptachloor	ng/l	500
α-heptachloorepoxide	ng/l	200
β-heptachloorepoxide	ng/l	200
heptachloorepoxide (som van α- en β-)	ng/l	400
α-endosulfan	ng/l	400
β-endosulfan	ng/l	400
endosulfansulfaat	ng/l	400
2,3,5,6-tetrachloornitrobenzeen (tecnazeen)	ng/l	100
pentachloornitrobenzeen (quintozeen)	ng/l	400
methoxychlor	ng/l	100
dicofol (p,p'-)	ng/l	100
OPP		
azinfos-methyl	ng/l	50
azinfos-ethyl	ng/l	50
bromophos (bromophos-methyl)	ng/l	50
bromophos-ethyl	ng/l	50
chlorfenvinphos	ng/l	50

Parameter	Eenheid	LOQ_{max} / Rapportagegrens
chlorpyrifos	ng/l	50
chlorpyrifos-methyl	ng/l	50
diazinon	ng/l	50
dichloorvos	ng/l	50
dimethoat	ng/l	50
ethoprosfos	ng/l	50
fenitrothion	ng/l	50
fenthion	ng/l	50
fonofos	ng/l	50
malathion	ng/l	50
methidathion	ng/l	50
mevinfos	ng/l	50
parathion-ethyl	ng/l	50
parathion-methyl	ng/l	50
pirimiphos-methyl	ng/l	50
terbufos	ng/l	50
ONP		
Triazineherbiciden		
atrazine	ng/l	50
cyanazine	ng/l	50
desethylatrazine	ng/l	50
hexazinone	ng/l	50
prometryn	ng/l	50
propazine	ng/l	50
sebutylazine	ng/l	50
simazine	ng/l	50
terbutryn	ng/l	50
terbutylazine	ng/l	50
Uronen (fenylurea) en anilides		
alachlor	ng/l	200
chloortoluron	ng/l	200
diuron	ng/l	200
isoproturon	ng/l	200
linuron	ng/l	200
metabenzthiazuron	ng/l	200
metabromuron	ng/l	200
metazachlor	ng/l	200
metolachlor	ng/l	200
metoxuron	ng/l	200
monolinuron	ng/l	200

Parameter	Eenheid	LOQ_{max} / Rapportagegrens
propachlor	ng/l	200
carbendazim	ng/l	200
Andere (stikstof)pesticiden (W.7.17)		
desisopropylatrazine	ng/l	50
chloridazon (pyrazon)	ng/l	200
ethofumesate	ng/l	200
metamitron	ng/l	200
desethylterbutylazine	ng/l	50
BAM (2,6-dichlorobenzamide)	ng/l	200
bromacil	ng/l	200
propanil	ng/l	200
trifluralin	ng/l	200
demeton	ng/l	200
triazophos	ng/l	200
coumafos	ng/l	200
chlorpropham	ng/l	200
glyfosaat	ng/l	200
AMPA	ng/l	200
Zure herbiciden		
2,4,5-trichloorfenoxiazijnzuur (2,4,5-T)	ng/l	200
2,4-dichloorfenoxiazijnzuur (2,4-D)	ng/l	200
bentazon	ng/l	200
dichlorprop	ng/l	200
fenoprop (2,4-TP)	ng/l	200
fluroxypyr	ng/l	200
MCPA	ng/l	200
MCPB	ng/l	200
mecoprop (MCP)	ng/l	200
2,4-DB	ng/l	200
dicamba	ng/l	1200
Kationische oppervlakteactieve stoffen	µg/l	100
Anionische oppervlakteactieve stoffen	µg/l	100
Niet-ionogene oppervlakteactieve stoffen	µg/l	100
Gebromeerde brandvertragers		
BDE 28	ng/l	20
BDE 47	ng/l	20
BDE 99	ng/l	20
BDE 100	ng/l	20

<i>Parameter</i>	<i>Eenheid</i>	<i>LOQ_{max} / Rapportagegrens</i>
BDE 153	ng/l	20
BDE 154	ng/l	20
BDE 183	ng/l	20
BDE 209	ng/l	1000
HBCD	ng/l	100
DBDPE	ng/l	1000
Aromatische amines		
aniline	ng/l	100
2-chloroaniline	ng/l	100
3-chloroaniline	ng/l	100
4-chloroaniline	ng/l	100
2,3-dichloroaniline	ng/l	10
2,4-dichloroaniline	ng/l	10
2,5-dichloroaniline	ng/l	10
2,6-dichloroaniline	ng/l	10
3,5-dichloroaniline	ng/l	10
3,4-dichloroaniline	ng/l	10
2-chloro-4-methylaniline	ng/l	100
3-chloro-2-methylaniline	ng/l	100
4-chloro-2-methylaniline	ng/l	100
2-chloro-5-methylaniline	ng/l	100
2-chloro-6-methylaniline	ng/l	100
3,3'-dichlorobenzidine (4,4'-diamino-3,3'-dichlorobiphenyl)	ng/l	70
2,2'-dichlorobenzidine (4,4'-diamino-2,2'-dichlorobiphenyl)	ng/l	70
benzidine	ng/l	100
4,4'-diaminodifenylmethaan	ng/l	100
2,4-diaminotolueen	ng/l	100
Ftaalzuuresters		
dimethylftalaat (DMP)	µg/l	1
diethylftalaat (DEP)	µg/l	1
di-n-butylftalaat (DBP)	µg/l	1
di-isobutylftalaat (DiBP)	µg/l	1
benzylbutylftalaat (BBP)	µg/l	1
di-n-octylftalaat (DnOP)	µg/l	1
dicyclohexylftalaat (DCHP)	µg/l	1
dipropylftalaat (DPrP)	µg/l	1
di-n-pentylftalaat (DnPP)	µg/l	1
di-isopentylftalaat (DIPP)	µg/l	1
n-pentylisopentylftalaat (PIPP)	µg/l	1
di-n-hexylftalaat (DnHxP)	µg/l	1

Parameter	Eenheid	LOQ_{max} / Rapportagegrens
di-isohexylftalaat (DIHxP)	µg/l	1
di-n-heptylftalaat (DnHpP)	µg/l	1
di(2-ethylhexyl)ftalaat (DEHP)	µg/l	2
di-n-undecylftalaat (DnUP)	µg/l	1
di-isohexylftalaat (mix van isomeren) (DIHxP-mix)	µg/l	5
di-isoheptylftalaat (mix van isomeren) (DIHpP-mix)	µg/l	5
di-isononylftalaat (mix van isomeren) (DINP-mix)	µg/l	5
5di-isodecylftalaat (mix van isomeren) (DIDP-mix)	µg/l	5
di-isoundecylftalaat (mix van isomeren) (DIUP-mix)	µg/l	5

Kwaliteitseisen voor de analysemethoden

INHOUD

1	Doel en toepassingsgebied	3
2	Kwaliteitseisen voor de anorganische parameters (WAC Deel III)	3
3	Kwaliteitseisen voor de organische parameters (WAC Deel IV)	6
4	Kwaliteitseisen voor de bacteriologische parameters (WAC Deel V)	10
4.1	<i>Eerstelijnscontrole</i>	10
4.1.1	Blanco controle totaal kiemgetal	10
4.1.2	Blanco controle overige parameters	10
4.1.3	Frequentie en criteria voor blanco controle	10
4.1.4	Positieve controle in geval van aangekochte kant-en-klare media met kwaliteitscertificaat	11
4.1.5	Positieve controle in geval van zelf bereide media	11
4.1.6	pH controle	11
4.1.7	Opvolging van afwijkende controles	11
4.2	<i>Tweedelijnscontrole</i>	12
4.3	<i>Derdelijnscontrole</i>	12
5	Referenties	12

1 DOEL EN TOEPASSINGSGEBIED

De kwaliteitseisen, opgenomen in deze procedure, zijn algemeen toepasbaar voor de bepaling van diverse parameters in water. Voor de kwaliteitseisen bij de bepaling van organische parameters werden criteria vastgelegd die voor alle procedures beschreven onder WAC/IV van toepassing zijn (met uitzondering van ureum (WAC/IV/A/001) en fenolindex (WAC/IV/B/001)). Voor de kwaliteitseisen bij de bepaling van anorganische en bacteriologische parameters werden in deze procedure algemene richtlijnen vastgelegd. Bijkomend kunnen voor een welbepaalde anorganische en bacteriologische parameter specifieke/bijkomende eisen worden voorgeschreven in de betreffende procedure.

2 KWALITEITSEISEN VOOR DE ANORGANISCHE PARAMETERS (WAC DEEL III)

(1) Lineariteit

- Het kalibratiemodel (lineair of kwadratisch) wordt vastgelegd bij de validatie en dient periodiek gecontroleerd te worden volgens één van de volgende procedures:
 - Minstens halfjaarlijks controle van het kalibratiemodel en bij elke ernstige instrumentele ingreep, of
 - Controle van de residuele standaardafwijkingen bij de lineaire/kwadratische regressie analyse, enkel van toepassing indien het volledige meetgebied wordt gekalibreerd.

(2) Gevoeligheid

- Minstens bij het begin van elke meetreeks dient de toestelgevoeligheid gecontroleerd te worden. Het toestel moet voldoende gevoelig zijn en blijven om de rapportagegrens te kunnen halen. De toegepaste procedure mag ingevuld worden door het laboratorium.
Bv. Ionenchromatografie, spectrofotometrie: oppervlakte van een welbepaalde parameter
De onafhankelijke controlestandaard en/of driftcontrole oplossing mag hiervoor gebruikt worden.

(3) Kalibratie

- Indien de kalibratie gebeurt dmv een kalibratierechte worden bij elke meetreeks minstens 5 kalibratieoplossingen geanalyseerd (eventueel inclusief nul) en verspreid over het lineair gebied. Vervolgens wordt dmv lineaire regressie de vergelijking van de kalibratierechte berekend waarbij de correlatiecoëfficiënt minstens 0.995 bedraagt. Daarbij mag maximum 1 punt verwijderd worden, maar niet het laagste punt, en dienen er minstens 4 punten behouden te worden. Verwijdering van het hoogste kalibratiepunt, resulteert in een inperking van het kalibratiegebied. De afwijking van elk punt tot de rechte mag niet meer dan 10% bedragen (met uitzondering van punt op niveau $\leq 2 \times$ rapportagegrens). De afwijking van het punt op niveau $\leq 2 \times$ rapportagegrens mag maximaal 25% afwijken van de rechte.
- Indien de rapportagegrens lager is dan de $\frac{1}{2}$ van de laagste concentratie van de kalibratie oplossing (verschillend van nul) dient een bijkomende controle te worden uitgevoerd op het niveau van de rapportagegrens. De afwijking van het punt op niveau van de rapportagegrens mag maximaal 25% afwijken van de theoretische waarde.

- Indien niet aan één van de criteria wordt voldaan, zal een nieuwe kalibratie worden opgesteld al dan niet met nieuwe kalibratieoplossingen.

Opmerking: Het criterium van de afwijking van elk kalibratiepunt tot de rechte heeft betrekking op de concentratie.

Opmerking: Standaardoplossingen worden aangemaakt in een vergelijkbaar medium (bv. zuur, H_2O ,...) als de monsters.

Opmerking: De toegestane afwijking dient steeds te worden vastgelegd in relatie met de meetonzekerheid. Bij kleine meetonzekerheden is de toegestane afwijking kleiner.

- Indien bij validatie gebleken is dat er geen lineair maar een kwadratisch verband is tussen concentratie en respons, dan kan een kwadratische curve gebruikt worden voor de kalibratie. Daarbij mag maximum 1 punt verwijderd worden, maar niet het laagste punt, en dienen er minstens 5 punten (verschillend van de oorsprong) behouden te worden. Verwijdering van het hoogste kalibratiepunt, resulteert in een inperking van het kalibratiegebied. De afwijking van elk punt tot de rechte mag niet meer dan 10% bedragen (met uitzondering van punt op niveau $\leq 2 \times$ rapportagegrens). De afwijking van het punt op niveau $\leq 2 \times$ rapportagegrens mag maximaal 25% afwijken van de rechte. Indien niet aan één van de criteria wordt voldaan, zal een nieuwe kalibratie worden opgesteld al dan niet met nieuwe kalibratieoplossingen.

Opmerking: Het criterium van de afwijking van elk kalibratiepunt tot de rechte heeft betrekking op de concentratie.

Opmerking: De toegestane afwijking dient steeds te worden vastgelegd in relatie met de meetonzekerheid. Bij kleine meetonzekerheden is de toegestane afwijking kleiner.

- Indien mogelijk, de kalibratielijnen niet door de oorsprong forceren.
- Na de kalibratie worden volgende oplossingen gemeten en gecontroleerd:
 - o Procedure- en/of kalibratieblanco-oplossing: de blanco meetwaarde is kleiner dan de helft van de rapporteergrens of max. 10% van de meetwaarde, afhankelijk van wat hoogste is van de beiden;
 - o Onafhankelijke controlestandaard en/of driftcontrole: de gemeten concentratie mag maximum 10% afwijken van de werkelijke waarde.
- De kalibratiecurve wordt geverifieerd op het einde van elke meetreeks door analyse van de drift controle. De gemeten concentratie mag maximum 10% afwijken van de werkelijke waarde.
- Bij elke reeks monsters wordt een procedureblanco meegenomen. De procedureblanco doorloopt de volledige analysecyclus. De waarde van de blanco dient opgevolgd te worden. Behoudens vermeld in de procedure, wordt de blancocorrectie niet toegepast.

Opmerking: Voor het controleren van de procedureblanco wordt steeds gebruik gemaakt van wisselende recipiënten.

- Wanneer geen dagelijkse kalibratie wordt uitgevoerd, worden minimaal volgende controles uitgevoerd:
 - o Meting van (hoogste) kalibratiestandaard: de gemeten concentratie mag maximum 10% afwijken van de werkelijke waarde (optioneel).
 - o Procedure- en/of kalibratieblanco-oplossing: de blanco meetwaarde is kleiner dan de helft van de rapporteergrens of max. 10% van de meetwaarde, afhankelijk van wat hoogste is van de beiden;

- o Onafhankelijke controlestandaard en/of driftcontrole: de gemeten concentratie mag maximum 10% afwijken van de werkelijke waarde. Bij een lineaire regressie wordt 1 controlestandaard gemeten, terwijl bij een kwadratische regressie 2 controlestandaarden (bv. concentratieniveau 1/3 en 2/3 van het meetgebied) worden gemeten.

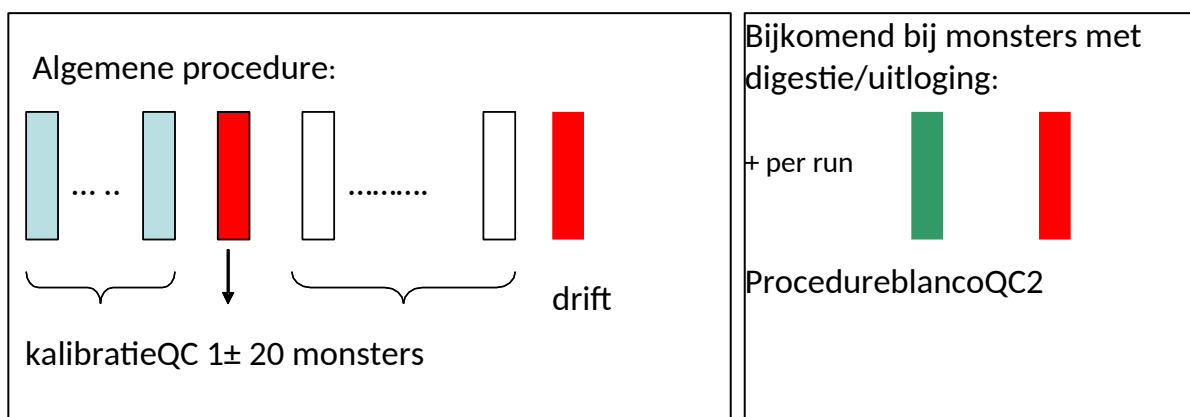
(4) Standaardadditie: Bij de standaardadditiemethode worden bekende hoeveelheden van een analyt toegevoegd aan een onbekende hoeveelheid analyt. De matrix heeft op deze manier hetzelfde effect op de toegevoegde analyt als op de originele analyt in onbekende concentratie. Het matrix-effect wordt hierdoor als het ware gecompenseerd. Aan de hand van de toename in het signaal kan er worden afgeleid hoeveel analyt er in het originele, onbekende monster zat. Deze methode vereist een lineaire respons op de analyt. Hierbij wordt doorgaans aanbevolen om te doperen op een concentratieniveau van bijv. 50, 100 en 150% van de concentratie van de analyt, en dit op minstens 2 concentratieniveaus.

(5) Algemeen toepasbare procedure (inclusief monstervoorbehandeling) voor methoden gebruikmakend van een kalibratielijn

In onderstaand schema wordt volgende verduidelijking van procedure geformuleerd:

- QC 1: onafhankelijk aangemaakte controle;
- Analysereeks van ± 20 monsters: dit is een indicatief aantal, de laboratoria moeten kunnen aantonen dat de frequentie van uitvoering van QA/QC zo gekozen is dat het voldoende kwaliteitsgaranties biedt;
- Drift: kalibratiestandaard of onafhankelijke standaard (QC1);
- Bij monsters met een destructie/uitloging dient per reeks (run van een digestie/uitlogingstoestel) een procedureblanco en een QC monster (QC2) die beiden de hele procedure hebben doorlopen, mee geanalyseerd te worden.

Het ondervangen van mogelijke memory effecten dient bijkomend voorzien te worden.



De criteria voor de kwaliteitscontroles dienen binnen het laboratorium zodanig te worden gedefinieerd dat voldaan wordt aan de wettelijk vastgelegde prestatiekenmerken. De meetwaarde van QC1 dient binnen $\pm 10\%$ te liggen van de werkelijke waarde.

(6) Controlestaal

Bij elke reeks monsters wordt 1 controlestaal meegenomen. Dit controlestaal doorloopt de volledige analysecyclus. Indien meerdere reeksen per dag geanalyseerd worden, volstaat 1 controlestaal per dag.

Als controlestaal kan gebruikt worden :

- een gecertificeerd referentiemateriaal
- een reëel staal
- gedefinieerde synthetische matrix
- een gedopeerd staal, waarbij gedopeerd wordt aan een matrix die representatief is voor de stalen die in het laboratorium geanalyseerd worden. Alle representatieve matrices dienen in de loop der tijd aan bod te komen.

(7) Duplo analyses (als alternatief van controlestaal, indien dit niet beschikbaar is)

Bij elke reeks monsters wordt 1 duplo analyse meegenomen. Indien meerdere reeksen per dag geanalyseerd worden, volstaat 1 duplo analyse per dag.

3 KWALITEITSEISEN VOOR DE ORGANISCHE PARAMETERS (WAC DEEL IV)

Voorafgaande opmerking : een “meetreeks” duurt maximum 72 uur.

(1) Lineariteit

Het kalibratiemodel (lineair, of kwadratisch, of bracketing) wordt vastgelegd bij validatie. Onder ‘bracketing’ wordt verstaan dat er gewerkt wordt met verschillende opeenvolgende lineaire deelgebieden. De lineariteit dient halfjaarlijks en bij elke ernstige instrumentele ingreep gecontroleerd te worden, inclusief berekening en evaluatie van de residuele afwijkingen van elk punt.

(2) Kalibratie

- indien de kalibratie gebeurt dmv de relatieve responsfactor, wordt de RRF bepaald met minstens één kalibratieoplossing. Minstens aan het begin en op het einde van elke meetreeks, en verder om de maximum 15 stalen, wordt de kalibratieoplossing geïnjecteerd. De concentraties in deze kalibratieoplossing liggen ongeveer in het midden van het lineair gebied of zijn representatief voor de verwachte monsterconcentraties. De berekening van de concentraties in een staal gebeurt aan de hand van de gemiddelde RRF van de 2 kalibratieoplossingen waartussen het staal geïnjecteerd werd. De RRFen van de 2 opeenvolgende kalibratieoplossingen mogen niet meer dan 10 % van hun gemiddelde afwijken (behalve voor VOC, fenolen en OPP/triazines : 15%).

- indien de kalibratie gebeurt aan de hand van ‘bracketing’ wordt de kalibratiereeks geïnjecteerd bij het begin en bij het einde van de meetreeks, en verder om de maximum 15 stalen. De berekening van de concentraties in een staal gebeurt aan de hand van de gemiddelde RRF van de 2 injecties van de 2 punten waartussen het staal begrepen is. De RRFen van de 2 opeenvolgende overeenkomstige kalibratieoplossingen mogen niet meer dan 10 % van hun gemiddelde afwijken (behalve voor VOC, fenolen en OPP/triazines : 15%).

- indien de kalibratie gebeurt dmv een kalibratierechte worden bij elke meetreeks minstens 4 kalibratieoplossingen geanalyseerd met concentraties groter dan nul en verspreid over het lineair gebied. De laagste concentratie mag niet hoger zijn dan 2 keer de ondergrens van het meetbereik. Vervolgens wordt dmv lineaire regressie de vergelijking van de kalibratierechte berekend. Daarbij mag maximum 1 punt verwijderd worden en er dienen minstens 4 punten (verschillend van de

oorsprong) behouden te worden. Indien het laagste punt weggelaten wordt dient de rapportagegrens aangepast te worden. Indien het hoogste punt weggelaten wordt, wordt het meetbereik bovenaan ingeperkt. De afwijking van elk punt tot de rechte mag niet meer dan 20% bedragen. Het laagste punt mag 25% afwijken van de rechte. Als de kalibratiestandaarden de staalopwerking doorlopen mogen de punten 20% afwijken en het laagste punt 35%. Voor de meting van pesticiden met LC volgens WAC/IV/A/027 mag de afwijking van elk punt tot de rechte niet meer dan 25% bedragen (<35% voor het laagste punt).

- indien nodig kan een kwadratische curve gebruikt worden voor de kalibratie.

Daartoe worden aan het begin van de meetreeks minimaal 5 kalibratieoplossingen geanalyseerd met concentraties verspreid over het meetgebied. De laagste concentratie mag niet hoger zijn dan 2 keer de ondergrens van het meetbereik. Vervolgens wordt dmv kwadratische curve fitting de vergelijking van de curve berekend. Daarbij mag maximum 1 punt verwijderd worden en er dienen minstens 5 punten (verschillend van de oorsprong) behouden te worden. Indien het laagste punt weggelaten wordt dient de rapportagegrens aangepast te worden. Indien het hoogste punt weggelaten wordt, wordt het meetbereik bovenaan ingeperkt. De afwijking van elk punt tot de curve mag niet meer dan 10% bedragen. Het laagste punt mag 15% afwijken. Als de kalibratiestandaarden de staalopwerking doorlopen mogen de punten 15% afwijken en het laagste punt 25%.

- bij alle kalibraties behalve ahv RRF en 'bracketing' dient bijkomend de drift tijdens de meetreeks gecontroleerd te worden. Daartoe wordt in geval van kalibratierechte één van de kalibratieoplossingen geïnjecteerd, in geval van een kwadratische curve worden 2 kalibratieoplossingen geïnjecteerd waarvan 1 met een concentratie gelegen in het hoogste derde van de curve. De driftcontrole gebeurt minstens op het einde van de meetreeks en verder om de maximum 15 stalen. Voor meetreeksen die langer dan 24 uur duren dient bovendien minstens 1 driftcontrole te gebeuren om de 24 uur. De gemeten concentratie in de driftcontrole mag maximum 20% (voor meting met FID maximum 10%) afwijken van de werkelijke concentratie. Als de kalibratiestandaarden de staalopwerking doorlopen mag de gemeten concentratie maximum 20% afwijken van de werkelijke concentratie.

(3) Controle op de gevoeligheid

Minstens bij het einde van elke meetreeks dient de toestelgevoeligheid gecontroleerd te worden. Het toestel moet voldoende gevoelig zijn en blijven om de rapportagegrens te kunnen halen.

(4) Procedureblanco

Bij elke reeks staalopwerkingen wordt een procedureblanco meegenomen. Indien meerdere reeksen per dag opgewerkt worden dan volstaat 1 procedureblanco. De procedureblanco doorloopt de volledige staalopwerking.

Opmerkingen :

- een staalopwerkingsreeks duurt maximum 24 uur, waarmee bedoeld wordt dat met de staalopwerking van alle stalen een aanvang genomen wordt binnen de 24 uur. Onder staalopwerking wordt verstaan : extractie, verzeping etc. Voorbereidende stappen (bv. mengen met droogmiddel, conservering, deelmonsternamen etc.) worden hiervoor niet tot de staalopwerking gerekend.
- Indien binnen eenzelfde staalopwerkingsreeks verschillende matrices opgewerkt worden voor dezelfde parameters maar elk met hun eigen methode (bv. PLE-extractie voor vaste stalen en vloeistof/vloeistof-extractie voor waterstalen) dan dient voor elke methode een procedureblanco meegenomen te worden.

Het geregistreerde chromatogram dient vrij te zijn van interfererende pieken groter dan 10% van de pieken geregistreerd voor het monster met uitzondering van monsterwaarden kleiner dan 5 maal de gehanteerde rapporteergrens, waarvoor de interfererende pieken niet groter mogen zijn dan de helft van de gehanteerde rapporteergrens.

(5) Terugvinding van de interne standaarden en surrogaatverbindingen

De terugvindingseisen van de interne standaarden en surrogaatverbindingen zijn afhankelijk van de parameter, zie het overzicht in tabel 1. Indien de terugvinding van de interne standaard lager ligt dan de ondergrens in tabel 1 maar hoger is dan 20% mogen de resultaten gerapporteerd worden mits een opmerking op het analyseverslag (behalve als het resultaat kleiner is dan de rapportagegrens, of indien voldoende is aangetoond voor het onderzochte type water dat de lage terugvinding geen invloed heeft op het resultaat, dan is de opmerking op het verslag niet nodig). Als de terugvinding van de interne standaard lager ligt dan 20% (10% voor de PFAS interne standaarden 13C-8:2 diPAP en 13C-PFHxDA) mag geen kwantitatief resultaat gerapporteerd worden. Merk op dat in geval van verdunning van het extract de terugvinding van de interne standaard teruggerekend moet worden naar het oorspronkelijk extract.

(6) Controlestaal

Bij elke reeks staalopwerkingen wordt 1 controlestaal meegenomen. Indien meerdere reeksen per dag opgewerkt worden dan volstaat 1 controlestaal per dag.

Als controlestaal wordt een gedopeerd waterstaal gebruikt. Alle componenten die in de stalen gerapporteerd worden dienen toegevoegd te worden aan het controlestaal.

De matrix die gedopeerd wordt kan een reëel staal zijn, of blancowater (bij analyse van grondwater en drinkwater). Ook mogen synthetische matrices gebruikt worden (cfr. ASTM D5905-98 voor de aanmaak van synthetisch afvalwater en NVN-6419 voor synthetisch grondwater en oppervlaktewater). Alle representatieve matrices dienen in de loop der tijd aan bod te komen.

De terugvinding van alle componenten dient tussen 70% en 130% te liggen. Van een minimum aantal componenten (tabel 2) wordt de gemeten concentratie of de terugvinding bijgehouden op een controlekaart met statistische grenzen. De gekozen componenten dienen representatief te zijn voor de gemeten componenten (qua retentietijd, type verbinding, etc).

(7) Onafhankelijke controlestandaard

De juistheid van de kalibratieoplossingen dient regelmatig (minstens om de 3 meetreeksen) gecontroleerd te worden. Hiervoor wordt na de kalibratie een controlestandaard gemeten die onafhankelijk is van de kalibratieoplossingen. Minstens 1/3 van de componenten die in de stalen gerapporteerd worden en die representatief zijn voor het geheel van de gemeten componenten (qua type en retentietijd) dienen aanwezig te zijn in de controlestandaard. De gemeten concentraties mogen niet meer dan 20% afwijken van de reële concentraties. Als de standaarden de staalopwerking doorlopen, mag de gemeten concentratie in de onafhankelijke controlestandaard maximum 30% afwijken van de werkelijke concentratie.

(8) Criteria voor identificatie : retentietijd en ionenratio's

Retentietijd

Voor een positieve identificatie van een onderzochte component in een staal dient zijn retentietijd van het kwantificeringsion binnen bepaalde grenzen overeen te komen met deze in de

kalibratiestandaard. De andere diagnostische ionen dienen samen te vallen met het kwantificeringsion.

Voor een GC-meting bedraagt de afwijking van de relatieve retentietijd van een component maximum 5 seconden.

Voor een LC-meting bedraagt de afwijking van de relatieve retentietijd van een component in geval van isotoopdilutie (dus de isotoopgemerkte variant van de component wordt als interne standaard gebruikt) maximum 2.5% t.o.v. de retentietijd in de kalibratiestandaard. Als de interne standaard een andere isotoopgemerkte verbinding betreft dan de natieve component die gemeten dient te worden mag de afwijking van de relatieve retentietijd maximum 5% bedragen.

Ionenratio's

Voor analyse met MS (full scan en SIM), HRMS en MS/MS dienen een minimum aantal diagnostische ionen gemeten te worden. Dit aantal wordt gespecificeerd in de individuele analyseprocedures.

Bij de keuze van diagnostisch ion wordt rekening gehouden met volgende principes:

- een ion met een hoge massa (m/z) is te verkiezen boven een ion met een lage massa
- bij voorkeur ionen met een even massa (m/z)
- indien mogelijk wordt het moleculair ion gebruikt als diagnostisch ion
- diagnostische ionen hebben bij voorkeur een intensiteit van minstens 15% t.o.v. de grootste (meest intense) massa
- indien isotoopclusters aanwezig zijn (bvb. chloor) worden bij voorkeur 2 ionen van dezelfde cluster genomen

Voor een positieve identificatie dienen de ionenratio's van een onderzochte component in een staal binnen bepaalde grenzen overeen te komen met deze in de kalibratiestandaard. De ionenratio is gedefinieerd als :

- in geval van MS-meting : de piekoppervlakte van het diagnostisch ion gedeeld door de piekoppervlakte van het meest intense diagnostisch ion, maal 100 %
- in geval van MS/MS : de piekoppervlakte van dochterion gedeeld door de piekoppervlakte van het meest intense dochterion, maal 100 %.

De afwijking t.o. v. kalibratiestandaard is gedefinieerd als :

- het verschil van de ionenratio in de kalibratiestandaard en de ionenratio in het staal, gedeeld door de ionenratio in de kalibratiestandaard, maal 100 %.

De maximale afwijking van de ionenratio's t.o.v. deze in de kalibratiestandaard zijn weergegeven in tabel 3.

Opmerking : voor pieken in de buurt van de bepalingsgrens (1 tot 3 keer de bepalingsgrens) mag de afwijking groter zijn, de beoordeling gebeurt ahv 'expert judgement'.

4 KWALITEITSEISEN VOOR DE BACTERIOLOGISCHE PARAMETERS (WAC DEEL V)

4.1 EERSTELIJNSCONTROLE

4.1.1 Blanco controle totaal kiemgetal

YEA plaat bij 22°C en YEA plaat bij 36°C inzetten. Indien verdunningen van een monster zijn uitgevoerd, bijkomend YEA + 1 ml verdunningsoplossing telkens bij 22°C en bij 36°C incuberen. Deze controles lopen gelijktijdig met de analyses van monsters en worden in dezelfde omstandigheden geïncubeerd en afgelezen.

4.1.2 Blanco controle overige parameters

- Coliformen & *E.coli*
- Enterokokken
- Coagulase positieve Staphylokokken
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Clostridium perfringens*
- *Salmonella* spp.
- *Legionella* species; *Legionella pneumophila*

Indien de membraanfiltratiemethode wordt toegepast, wordt voor elke parameter een blanco controle uitgevoerd door een volume van 100 ml verdunningsoplossing of steriel water te filtreren en de filter op de respectievelijke selectieve agarplaten aan te brengen. Deze controles lopen gelijktijdig met de analyse van monsters en worden in dezelfde omstandigheden geïncubeerd en afgelezen.

Voor *Salmonella* en *Legionella* worden de blanco's gedurende alle stappen van de volledige analysemethode meegenomen maar dienen ze slechts op één selectieve plaat (*Salmonella*: XLD of chromogeen medium / *Legionella*: BCYE + AB of GVPC of MWY) gecontroleerd te worden.

Voor de quanti-tray MPN methode dient een aangepaste procedureblanco uitgevoerd te worden.

4.1.3 Frequentie en criteria voor blanco controle

Voor totaal kiemgetal worden bij elke reeks opwerkingen van monsters de onder 4.1.1. beschreven blanco's meegenomen. Indien meerdere reeksen per dag worden opgewerkt dan volstaat één blanco controle, op voorwaarde dat alle uitvoerders regelmatig aan bod komen bij de blanco controles.

Voor de overige parameters wordt de onder 4.1.2. beschreven blanco controle minimaal wekelijks uitgevoerd. Ook in dit geval dienen alle uitvoerders regelmatig bij de blanco controles aan bod komen.

Het maximale criterium voor de blanco controle is voor:

- totaal kiemgetal ≤ 1 kve/ml
- *Legionella* spp. < rapportagegrens
- andere presumptieve parameters < 1 kve /100 ml

Een iets hogere blancowaarde voor totaal kiemgetal is aanvaardbaar voor monsters met hoog kiemgetal mits motivatie.

4.1.4 Positieve controle in geval van aangekochte kant-en-klare media met kwaliteitscertificaat

Voor de positieve controle kan deels gebruik gemaakt worden van het kwaliteitscertificaat voor het betreffende lot kant-en-klaar voedingsmedium dat ter beschikking gesteld wordt door de producent en waarop de groei wordt geëvalueerd van relevante referentiestammen.

Bijkomend dient het laboratorium zelf minimaal volgende kwantitatieve positieve controles uit te voeren:

- ✓ indien erkend voor pakket W.8.1, W.8.2, W.8.4 of W.8.6: minstens één regelmatig geanalyseerd indicator organisme testen;
- ✓ indien erkend voor pakket W.8.3: een *Legionella pneumophila* testen;
- ✓ indien erkend voor pakket W.8.5: een *Clostridium perfringens* stam testen.

De resultaten van de door het laboratorium uitgevoerde kwantitatieve positieve controles worden geregistreerd en geëvalueerd met behulp van statistische controlekaarten, na log 10 transformatie. Voor *Salmonella spp.* dient een kwantitatieve positieve controle op een niveau in de buurt van de detectielimiet te worden meegenomen.

De minimale frequentie kwantitatieve positieve controle is als volgt:

- indien betreffende parameter (indicator parameter, *Legionella pneumophila*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella spp.*) dagelijks of meerdere malen per week wordt uitgevoerd: tweewekelijks een positieve controle testen;
- indien betreffende parameter wekelijks wordt uitgevoerd: maandelijks een positieve controle testen;
- indien betreffende parameter maandelijks wordt uitgevoerd: tweemaandelijks een positieve controle testen;
- indien betreffende parameter minder frequent dan maandelijks wordt uitgevoerd: elke analysedag een positieve controle testen.

Bijkomend dient steeds een kwantitatieve positieve controle uitgevoerd te worden bij overschakeling naar ofwel media ofwel filters van een andere producent.

4.1.5 Positieve controle in geval van zelf bereide media

Op elk zelf bereid lot van een bepaald voedingsmedium wordt een kwantitatieve positieve controle uitgevoerd vóór het lot in gebruik wordt genomen.

Bijkomend gelden dezelfde minimaal uit te voeren kwantitatieve positieve controles en frequentie als beschreven in 4.1.4.

4.1.6 pH controle

Indien het laboratorium zelf voedingsmedia bereidt dient het een pH controlemeting uit te voeren telkens een nieuwe batch worden bereid. Wanneer de pH niet tussen de opgegeven waarden van de producent valt, mag het medium niet (meer) gebruikt worden. Voor commerciële media voldoet het certificaat van de producent.

4.1.7 Opvolging van afwijkende controles

Indien de resultaten van de positieve controlemonsters niet aan de vooropgestelde criteria voldoen, of de blanco controle een positief resultaat geeft, dient een analyse van de oorzaak en reikwijdte uitgevoerd te worden. Indien hieruit blijkt dat bepaalde resultaten onbetrouwbaar zijn mogen deze niet gerapporteerd worden en dient een herbemonstering te worden uitgevoerd. Indien van toepassing dient ook de impact op eerder gerapporteerde resultaten te worden nagegaan.

4.2 TWEDELIJNSCONTROLE

Indien de derdelijnscontrole niet alle types water omvat, dient een tweedelijnscontrole programma te worden uitgevoerd. Bij voorkeur gebeurt dit door reële positieve monsters door twee uitvoerders te laten analyseren. Indien er geen reële positieve monsters beschikbaar zijn, mag een blanco monster op een relevant niveau beënt worden.

Minimaal dient binnen een termijn van drie jaar elke parameter aan bod te komen in elke matrix waarvoor de erkenning voorzien is.

4.3 DERDELIJNSCONTROLE

Een erkend laboratorium neemt deel aan de ORKA&BACIL ringtesten georganiseerd door VITO in opdracht van het Departement Omgeving.

5 REFERENTIES

- ISO/NP 21253-1, 2019: Water Quality – Multi-compound class methods Part 1 –Criteria for the identification of target compounds by gas and liquid chromatography and mass spectrometry
- NBN EN ISO 11133, 2014: Microbiologie van voedingsmiddelen, diervoeders en water - Bereiding, productie, bewaring en bepaling prestatiekenmerken van kweekmedia /
- ISO 11133, 2014 Microbiology of food, animal feed and water - Preparation, production, storage and performance testing of culture media
- NEN-EN-ISO 11133:2014-11/A1:2018 en / ISO 11133:2014/Amd 1:2018

Tabel 1 : Eisen aan terugvinding van interne standaarden en surrogaten

Methode	Terugvindingseisen voor de interne standaarden en surrogaten
Fenolen (WAC/IV/A/001)	IS : 50%-130% (*)
PAK (WAC/IV/A/002) – meting met MS	IS : 50%-130% (behalve D8-naftaleen : 40%-130%)
PAK (WAC/IV/A/002) – meting met HPLC-UV/FLUO	Surrogaat : 70%-130% (behalve grondwater : 75%-125%) / On-line SPE : matrixadditie 16 PAK 75-125%
OPP en Triazines (WAC/IV/A/010)	40%-130% voor 13C-atrazine 50%-130% voor 13C-HCB
PFAS (WAC/IV/A/025)	IS 30%-200% (behalve 13C-8:2 diPAP en 13C-PFHxDA: 10%-200%)
VOC (WAC/IV/A/016)	IS 50%-150% (berekend tov gemiddelde van de kalibratiestandaarden)
OCP, PCB en hogere CBz (WAC/IV/A/015)	IS 50%-130% (behalve isotoopgemerkte OCP : 50%-150% en isotoopgemerkt trichloorbenzeen : 40-130%) / Surr 80%-120% (ECD)
Minerale Olie (WAC/IV/B/025)	IS 50%-150% (berekend tov gemiddelde van de kalibratiestandaarden)
Ftalaten (WAC/IV/A/004)	IS : 50%-130%
Ftalaten (WAC/IV/A/008)	IS: 50%-150% (behalve D4-DMP: 10-50%)
Octyl- en nonylfenol, bisfenol A (WAC/IV/A/005)	IS : 50%-130% (**)
Kationische surfactanten (WAC/IV/A/022)	nvt (externe standaardmethode)
Pesticiden GC (WAC/IV/A/028)	IS : 50%-130%
Pesticiden LC (WAC/IV/A/027)	IS en Surr.: 50%-140% (***)
BFR (WAC/IV/A/030)	IS : 30%-130% (****)

(*) indien de werkwijze met dubbelde derivatisering toegepast wordt, worden geen eisen gesteld aan de terugvinding van de interne standaard

(**) verminderde terugvinding is het gevolg van ionisatiesuppressie door coëlutie met matrix componenten. De storende invloed van de matrix kan gereduceerd worden door het toepassen van een monsterzuivering a.h.v. vaste fase extractie (zie bv. ISO 24293:2009). Alternatief kan het extract verdund worden.

(***) bij de berekening van de terugvinding wordt rekening gehouden met de terugvinding bekomen bij de validatie, zie WAC/IV/A/027)

(****) voor 13C-BDE-209, 13C-DBDPE en 13C-HBCD wordt vastgesteld dat de respons toeneemt met toenemende concentratie aan natieve verbinding. Voor 13C-BDE-209, 13C-DBDPE en 13C-HBCD zijn terugvindingen hoger dan 130% dus mogelijk maar in dat geval dient geëvalueerd te worden of de verhoogde terugvinding een gevolg is van de aanwezigheid van natieve verbinding in het monster dan wel veroorzaakt wordt door interferentie.

Tabel 2 : Minimum aantal componenten dat op controlekaart genoteerd dient te worden

Methode	Minimaal aantal componenten
Fenolen (WAC/IV/A/001)	2 Alkylfenolen, 2 Chloorfenolen
PAK (WAC/IV/A/002)	4 (inclusief naftaleen)
OPP en Triazines (WAC/IV/A/010)	4 OPP, 3 triazines
PFAS (WAC/IV/A/025)	7 (PFBA, PFOA lineair, PFHxDA, PFBS, PFOS lineair, 6:2 FTS en EtFOSAA)
VOC (WAC/IV/A/016)	10 (benzeen, toluen, een isomeer van xyleen, isomeer van trimethylbenzeen, 1,1-dichloorethaan, chloroform, trichloorethyleen, tetrachloorethyleen, monochloorbenzeen en een isomeer van dichloorbenzeen)
OCP, PCB en hogere CBz (WAC/IV/A/015)	3 OCP, 2 PCB, 1 CBz
Minerale Olie (WAC/IV/B/025)	1 (Minerale olie)
Ftalaten (WAC/IV/A/004 en WAC/IV/A/008)	3
Nonylfenol (WAC/IV/A/005)	2
Kationische surfactanten (WAC/IV/A/022)	2
Pesticiden GC (WAC/IV/A/028)	7
Pesticiden LC (WAC/IV/A/027)	3
BFR (WAC/IV/A/030)	3
Aromatische amines (WAC/IV/A/024)	6

Tabel 3 : Maximale afwijking van de ionenratio's

Ionenratio	Max. afwijking EI-GC-MS	Max. afwijking CI-GC-MS, GC-MS/MS, LC-MS, LC-MS/MS
>50%	+ - 10 %	+ - 30 %
>20% - 50%	+ - 15 %	+ - 30 %
>10% - 20%	+ - 20 %	+ - 30 %
<10%	+ - 50 %	+ - 50 %

Voorwaarden voor rapportering van monsternamegegevens en analyseresultaten door een erkend laboratorium

INHOUD

1	Doel en toepassingsgebied	3
2	Definities	4
3	Principes	4
4	Rapportering van de gegevens van de opdracht	5
4.1	Omschrijving monster	5
4.2	Toetsingskader	6
4.3	<i>Verzegeling monster</i>	6
5	Rapportering van de monsternamegegevens	6
5.1	Minimale gegevens m.b.t. de monstername	6
5.2	Erkenningslogo VLAREL en verwijzing naar de erkenningsstatus voor monsternemingen	7
5.3	Gebruik van opmerkingen m.b.t. de monstername	8
6	Rapportering over kritische termijnen in het analyseproces	9
6.1	Minimale gegevens	9
6.2	Omgang met de voorgeschreven houdbaarheidstermijnen van monsters	9
6.3	Gebruik van opmerkingen m.b.t. de kritische termijnen	10
7	Rapportering van de analyseresultaten en informatie m.b.t. de toegepaste methode	10
7.1	Minimale gegevens	10
7.2	Erkenningslogo VLAREL en verwijzing naar de erkenningsstatus per parameter	11
7.3	Berekening van somgehalten of verschilgehalten	11
7.4	Gebruik van opmerkingen op analyseverslagen	11
8	Rapportering in geval van (gedeeltelijke) uitbesteding	13

1 DOEL EN TOEPASSINGSGEBIED

Deze procedure vervangt de procedure WAC/VI/A/004 van juni 2023.

Deze procedure schrijft voor hoe laboratoria, die erkend zijn in het Vlaamse Gewest volgens het VLAREL of over een nog geldende erkenning beschikken volgens eerdere regelgeving, monsternamegegevens en analyseresultaten dienen te rapporteren, van opdrachten uitgevoerd in de hoedanigheid van erkend laboratorium.

Het doel van deze procedure is het vastleggen van uniforme vereisten voor de rapportering. De voorwaarden in deze procedure zijn te beschouwen als minimale vereisten, die voorrang hebben op eventuele bilaterale afspraken tussen het erkende laboratorium en zijn opdrachtgever, tenzij de bevoegde overheid anders bepaalt.

Het toepassingsgebied van deze procedure omvat alle laboratoria die erkend zijn in het Vlaamse Gewest voor één of meer van de volgende disciplines: water; lucht; mest; diervoeder; bodem; afvalstoffen en andere materialen. Inhoudelijk heeft deze procedure zowel betrekking op monsternames als analyses, voor zover hiervoor de erkenning van laboratoria voorzien is.

De ISO/IEC 17025 norm, die algemene eisen bevat voor de bekwaamheid van laboratoria en door de erkende laboratoria dient toegepast te worden, bevat reeds eisen m.b.t. de rapportering maar deze zijn eerder algemeen geformuleerd en onvoldoende toegespitst op de typische problematiek van milieuanalyses (bv. beperkte houdbaarheid van monsters, ...). Eisen in de ISO/IEC 17025 norm in verband met rapportering, die niet expliciet in deze procedure zijn opgenomen, blijven voor de erkende laboratoria onverminderd van toepassing. Dit geldt ook voor instructies m.b.t. rapportering die van toepassing zijn voor een specifieke discipline (evt. deeldomein), bv.

- Code van Goede Praktijk Bodembescherming (zie <http://www.emis.vito.be/lne-erkenningen-bodem> - meest recente versie);
- Methodes BAM/deel n/20 m.b.t. rapportering (zie <http://www.emis.vito.be/referentielabo-vlm>);
- Ministerieel besluit van 19 maart 2004 houdende vaststelling van de lijst van ammoniakemissiearme stalsystemen (zie <http://navigator.emis.vito.be>).

Deze procedure geldt zowel voor rapportering via papier als via een elektronisch bestand. Bij gebruik van een elektronisch bestand dient dit aan alle vereisten van deze procedure te voldoen; zoniet moet steeds een klassiek analyseverslag op papier, dat aan alle vereisten van deze procedure voldoet, nagestuurd worden.

Bepalingen die weergegeven worden tussen vierkante haken [] behoren niet strikt tot deze procedure maar worden ter verduidelijking toegevoegd.

2 DEFINITIES

Voor de toepassing van deze procedure wordt verstaan onder:

- 1° VLAREL: besluit van de Vlaamse Regering van 19 november 2010 tot vaststelling van het Vlaams reglement inzake erkenningen met betrekking tot het leefmilieu
- 2° 'fit for purpose': geschikt voor gebruik binnen de context die door de opdrachtgever is vooropgesteld (bv. specifieke behoeften) of die geacht mag worden gekend te zijn door een erkend laboratorium (bv. geldende regelgeving)
- 3° erkend laboratorium: laboratorium, erkend door het Vlaamse Gewest, dat in overeenstemming met de bepalingen in het VLAREL monsternemingen, metingen, analyses of beproevingen uitvoert
- 4° opdrachtnemer: erkend laboratorium waarmee de opdrachtgever een contractuele relatie heeft
- 5° eindverslag: het analyseverslag dat de opdrachtgever ontvangt vanwege de opdrachtnemer
- 6° rapportagegrens: de waarde beneden welke een component als niet kwantificeerbaar ('<') wordt gerapporteerd; deze bedraagt minimaal de bepalingsgrens, tenzij anders is vastgelegd in de van toepassing zijnde regelgeving

3 PRINCIPES

Bij het vastleggen van de voorwaarden voor rapportering werd uitgegaan van volgende basisprincipes:

- de door een erkend laboratorium gerapporteerde monsternamegegevens en analyseresultaten moeten 'fit for purpose' zijn, m.a.w. geschikt voor gebruik binnen een vooropgestelde context;
- het erkende laboratorium moet deze 'fit for purpose' monsternamegegevens en analyseresultaten op een zo efficiënt mogelijke wijze kunnen bekomen.

Om dit waar te kunnen maken is het van essentieel belang dat doorheen het volledige analyseproces in zijn breedste betekenis - van het definiëren van de behoefte aan analyses door de opdrachtgever tot en met de rapportering van de resultaten door de opdrachtnemer, d.i. het erkende laboratorium aan wie de opdracht werd toevertrouwd - voldoende overleg gebeurt en duidelijke afspraken gemaakt worden.

Zowel de opdrachtgevers als de erkende laboratoria dragen een deel van de verantwoordelijkheid om op een efficiënte wijze 'fit for purpose' analyseresultaten te kunnen bekomen.

Een erkend laboratorium mag van de opdrachtgever verwachten - en zal de opdrachtgever zo nodig vragen - dat deze:

- de context van de analyseopdracht (aard van het monster, doel) in een zo vroeg mogelijk stadium communiceert naar het laboratorium;
- de analyseopdracht tijdig bevestigt, d.i. uiterlijk bij de monstername (indien deze uitgevoerd wordt door het laboratorium) of bij de aflevering van het monster aan het laboratorium;
- specifieke eisen zoveel mogelijk afstemt op de eisen m.b.t. het gebruik van de erkenning waaraan de laboratoria onderworpen zijn via het VLAREL (bv. het verplicht toepassen van de compendiummethode indien beschikbaar, ...).

Cruciaal is hierbij dat de opdrachtgever de aard van het monster correct aangeeft, evenals de doelstellingen in het kader waarvan de analyse gebeurt.

Van de opdrachtnemer en desgevallend de overige erkende laboratoria die bij de uitvoering van de opdracht betrokken zijn, wordt verwacht dat deze:

- de opdrachtgever zo nodig ondersteunen bij het definiëren van een monstername- en/of analyseopdracht die overeenstemt met de van toepassing zijnde regelgeving;
- over de nodige organisatie/voorzieningen beschikken om de houdbaarheid van monsters te respecteren;
- het nodige analytisch werk uitvoeren tot een 'fit for purpose' resultaat beschikbaar is, ook als dit een bijkomende meting/analyse vergt;
- de eigen organisatie/methodes optimaliseren met het oog op een minimaal gebruik van opmerkingen op monstername- en analyseverslagen.

De eindverantwoordelijkheid voor het juist formuleren van het uit te voeren onderzoek en het aangeven van de van toepassing zijnde regelgeving ligt bij de opdrachtgever.

De eindverantwoordelijkheid voor de volledige en correcte rapportering conform deze procedure wordt toegewezen aan het erkende laboratorium dat als opdrachtnemer fungeert. Dit kan ofwel het laboratorium zijn dat de monstername uitvoert ofwel het laboratorium dat de metingen/analyses (of tenminste een deel ervan) uitvoert, afhankelijk van met wie de opdrachtgever een contractuele relatie heeft. Indien de opdrachtgever voor een bepaalde opdracht met twee of meer verschillende opdrachtnemers een contractuele relatie aangaat, is elk van deze erkende laboratoria verantwoordelijk voor het eigen deel van de opdracht.

De eindverantwoordelijkheid voor de rapportering houdt de verantwoordelijkheid in voor de nodige afstemming tussen alle betrokken erkende laboratoria: het zorgen voor de nodige afspraken i.v.m. de kritische termijnen in het analyseproces, de beschikbaarheid van een monsternameverslag, ...

Wanneer de monstername door een andere hiervoor bevoegde instantie (bv. inspectiedienst; boorbedrijf onder toezicht van een erkend bodemsaneringsdeskundige; exploitant indien voorzien in de regelgeving; ...) of door de opdrachtgever zelf wordt uitgevoerd, blijft de eindverantwoordelijkheid van het erkende laboratorium beperkt tot het sensibiliseren m.b.t. het naleven van de voorwaarden in deze procedure. In dergelijk geval zal het erkende laboratorium bij de analyseresultaten naar de erkenningsstatus verwijzen, maar niet bij de monsternamegegevens.

4 RAPPORTERING VAN DE GEGEVENS VAN DE OPDRACHT

4.1 OMSCHRIJVING MONSTER

De omschrijving van het monster op het analyseverslag moet coherent zijn met de context van de analyseopdracht en met de karakteristieken van het monster (alleszins de visueel waarneembare karakteristieken). Het erkende laboratorium mag van de opdrachtgever verwachten dat deze de aard van het monster correct omschrijft, evenals de doelstellingen in het kader waarvan de analyse gebeurt. Bij ontvangst van het monster dient het erkende laboratorium wel te verifiëren of de verstrekte gegevens overeenkomen met de aard en het uitzicht van het monster. Bij twijfel of het monster overeenkomt met de omschrijving, of indien vastgesteld wordt dat een monster niet zonder meer kan geanalyseerd worden zoals een normaal monster van het type in de omschrijving (bv. monster bevat meer fasen, ...), dient het erkende laboratorium de opdrachtgever te contacteren om de inconsistenties uit te klaren. De hierbij gemaakte afspraken dienen te worden geregistreerd.

4.2 TOETSINGSKADER

Als dienstverlening naar de opdrachtgever of op expliciet verzoek kan een erkend laboratorium toetsingswaarden opnemen in het analyseverslag. In dat geval dient ook eenduidig aangegeven te worden uit welke regelgeving of ander document deze toetsingswaarden afkomstig zijn.

4.3 VERZEGELING MONSTER

Wanneer monsters verzegeld aangeleverd worden, dient het erkende laboratorium op het (monstername- of analyse)verslag te vermelden of de verzegeling intact was bij ontvangst van de monsters. In geval van een niet intacte verzegeling dient het erkende laboratorium hiervan een foto te nemen; deze dient dan bewaard te worden bij de gegevens van de opdracht en op verzoek van een bevoegde instantie overgemaakt te worden als bewijs.

5 RAPPORTERING VAN DE MONSTERNAMEGEGEVENS

Opmerking: onderstaande voorwaarden zijn enkel van toepassing indien de monstername door een erkend laboratorium uitgevoerd is; dit kan het erkende laboratorium zijn dat ook instaat voor de analyses of een ander erkend laboratorium.

5.1 MINIMALE GEGEVENS M.B.T. DE MONSTERNAME

In het analyseverslag, of in een monsternameverslag dat bij het analyseverslag gevoegd is, dienen minimaal volgende gegevens in verband met de monstername opgenomen te worden:

- datum van monstername;
- uur van monstername in geval het afvalwater, oppervlaktewater, grondwater, lucht of afvalstoffen en andere materialen betreft;
- ~~naam~~ identificatie van de monsternemer (bv. initialen, identificatiecode,...);
- identificatie (bij voorkeur via GPS-coördinaten) of een gedetailleerde beschrijving van de plaats waar het monster genomen werd, zo nodig met schets en/of foto's als bijlage;
- registratie van de karakteristieken van de meetplaats en, indien van toepassing, aftoetsing ervan naar conformiteit met het compendium of de andere vereiste methode volgens art. 45 van het VLAREL;
- in geval van bemonstering van een partij: beschrijving van de bemonsterde partij, inclusief partijafbakening of gemengde partij indien van toepassing; hierbij dienen ook de gemaakte keuzes gemotiveerd te worden;
- verwijzing naar de monsternamemethode, bestaande uit ten minste de code van de van toepassing zijnde compendium- of normmethode en de specificatie van de toegepaste monsternametechniek;
- bijkomende informatie indien de monsternamemethode of de regelgeving dit vereist; bv. voor afvalstoffen en andere materialen: aantal genomen grepen, greepgrootte, aantal en grootte (in liter) van laboratoriummonsters, cfr. CMA/1/A.14;
- indien voor de erkenning als laboratorium in de betreffende discipline meerdere deeldomeinen voorzien zijn: het deeldomein waarop de monstername betrekking heeft.

Indien voor de rapportering van hoger vermelde gegevens gebruik gemaakt wordt van een monsternameverslag, waarvan de gegevens niet overgenomen worden in het analyseverslag, dient in het analyseverslag eenduidig naar dit monsternameverslag te worden verwezen; analyse- en

monsternameverslag worden dan beide aan de opdrachtgever bezorgd, gearchiveerd,.....In praktijk kunnen het monsternameverslag en het analyseverslag ook deel uitmaken van een geïntegreerd onderzoeksrapport, dat bv. ook een bespreking van de resultaten en/of technologisch advies bevat.

Indien de monstername is uitgevoerd op vraag van een ander erkend laboratorium dat als opdrachtnemer optreedt, staat het laboratorium dat de monstername uitvoert in voor het ter beschikking stellen van een monsternameverslag dat ten minste de eerder vermelde gegevens bevat, aan het andere laboratorium, en dit uiterlijk bij het aanleveren van de monsters.

De opdrachtnemer die zelf de monstername uitvoert maar voor de analyses, of een deel ervan, beroep doet op een ander erkend laboratorium, hoeft geen volledig monsternameverslag aan dit laboratorium te bezorgen want de opdrachtnemer staat in voor de eindrapportering. In dergelijk geval volstaat het doorgeven van de datum van monstername en desgevallend het deeldomein waarop de monstername betrekking heeft.

Wanneer bij de monstername een bevoegde instantie aanwezig is die bepaalde van de minimale gegevens zelf vastlegt, moet de monsternemer door de vertegenwoordiger van deze bevoegde instantie laten verifiëren of de genoteerde gegevens overeenstemmen.

De naam en het adres van het erkende laboratorium dat de monstername heeft uitgevoerd moeten eenduidig kunnen worden afgeleid uit het analyseverslag, of een monsternameverslag dat bij het analyseverslag gevoegd is, en overeen komen met deze waarop de erkenning is afgeleverd.

5.2 ERKENNINGSLOGO VLAREL EN VERWIJZING NAAR DE ERKENNINGSSTATUS VOOR MONSTERNEMINGEN

Conform art. 49 van het VLAREL dient een erkend laboratorium op het analyseverslag of monsternameverslag het erkenningslogo VLAREL aan te brengen:



Het laboratorium dient bovendien duidelijk te vermelden voor welke monsternemingen het erkend is en voor welke niet. Hiervoor gelden volgende regels:

- bij elke monsternamemethode in een analyse- of monsternameverslag moet duidelijk, via een code/symbool naar keuze, aangegeven worden of deze al dan niet tot het toepassingsgebied van de erkenning van het laboratorium behoort;
- de gebruikte code of het gebruikte symbool moet toegelicht worden, bv. in een voetnoot van het analyse- of monsternameverslag.

Indien voor de erkenning als laboratorium in de betreffende discipline meerdere deeldomeinen voorzien zijn, dient hiermee rekening gehouden te worden bij de verwijzing naar de erkenningsstatus.

Voor de verwijzing naar de erkenningsstatus voor metingen, beproevingen en analyses wordt verwezen naar punt 7.2.

5.3 GEBRUIK VAN OPMERKINGEN M.B.T. DE MONSTERNAME

In de volgende gevallen is een opmerking op het monstername- of analyseverslag noodzakelijk:

- a) *indien, op vraag van de opdrachtgever, de monstername **niet volledig conform** het compendium of de andere vereiste methode volgens art. 45 van het VLAREL werd uitgevoerd.*

In dit geval moet duidelijk aangegeven worden dat het een afwijking op vraag van de opdrachtgever betreft; verder moet gespecificeerd worden op welke punten werd afgeweken van het compendium of de andere vereiste methode volgens art. 45 van het VLAREL. Indien de opdrachtgever heeft meegedeeld waarom hij de aanpassing noodzakelijk achtte, kan dit eveneens worden vermeld.

- b) *indien, **omwille van de plaatselijke omstandigheden**, de monstername **niet volledig conform** het compendium of de andere vereiste methode volgens art. 45 van het VLAREL kon worden uitgevoerd.*

In dit geval moet gespecificeerd worden op welke punten werd afgeweken van het compendium of de andere vereiste methode volgens art. 45 van het VLAREL en omwille van welke plaatselijke omstandigheden dit noodzakelijk was.

Van een erkend laboratorium wordt verwacht dat het eventuele gebreken aan een installatie van de opdrachtgever, die een conforme monstername onmogelijk maken, duidelijk aangeeft. Het remediëren hiervan is de verantwoordelijkheid van de opdrachtgever.

- c) *indien **abnormaliteiten m.b.t. de bedrijfsvoering van de te bemonsteren installatie** gemeld werden door de opdrachtgever of vastgesteld werden.*

In dit geval moet gespecificeerd worden over welke abnormaliteiten m.b.t. de bedrijfsvoering het gaat en of ze door de opdrachtgever gemeld werden dan wel zelf vastgesteld/bevestigd werden door het erkende laboratorium.

Een erkend laboratorium dient geen uitspraak te doen over het al dan niet gegrond zijn van gemelde abnormaliteiten of over de impact die de abnormaliteiten kunnen gehad hebben op de representativiteit van de monstername.

In het volgende geval is een opmerking op het analyseverslag noodzakelijk:

- d) *indien bij ontvangst in het analyselaboratorium een monster **niet conform** het compendium of de andere vereiste methode volgens art. 45 van het VLAREL blijkt **qua conservering, recipiënt of hoeveelheid**.*

In dit geval moet gespecificeerd worden op welke punten niet voldaan was aan de voorschriften van het compendium of de andere vereiste methode volgens art. 45 van het VLAREL.

Het vermelden van opmerkingen m.b.t. de monstername mag niet leiden tot het weglaten van de verwijzing naar de erkenning en ontslaat het erkende laboratorium dus niet van de overige vereisten in deze procedure.

6 RAPPORTERING OVER KRITISCHE TERMIJNEN IN HET ANALYSEPROCES

6.1 MINIMALE GEGEVENS

In het analyseverslag dient minimaal de datum van ontvangst van het monster door het laboratorium opgenomen te worden.

6.2 OMGANG MET DE VOORGESCHREVEN HOUDBAARHEIDSTERMIJNEN VAN MONSTERS

Bij de interpretatie van houdbaarheidstermijnen wordt de datum van monsternamen als dag 0 beschouwd. Indien door het erkende laboratorium een mengmonster dient bereid te worden uit verschillende aangeleverde monsters, is dag 0 de datum van monsternamen van het oudste monster. ~~Bij 24 uur mengmonsters die via een geautomatiseerd systeem gegenereerd worden is er pas sprake van een monster wanneer het volledig samengestelde monster uit het geautomatiseerd systeem wordt genomen.~~

Bij verzamelmonsters cf. WAC/I/A/004, die binnen een bepaalde monsternamenacyclus (doorgaans 24 h) worden samengesteld via een automatisch monsternametoestel, start de houdbaarheidstermijn op het moment dat het verzamelmonster uit het monsternametoestel wordt genomen. Het verzamelmonster van de betreffende monsternamenacyclus wordt ten laatste de volgende werkdag na deze monsternamenacyclus uit het monsternametoestel genomen voor verdere analyse, en dit ongeacht of er al dan niet nog verdere monsternamenacycli zullen plaatsvinden.

Voorbeeld:

- Bij een 3-daagse monsternamenacampagne van afvalwater die start op maandag(nacht) 0:00h, wordt het verzamelmonster van dag 1 op dinsdag uit het monsternametoestel genomen voor verdere voorbehandeling, deelmonsternamen en metingen ter plaatse (d.w.z. dat parameters met een houdbaarheid van 24 u uiterlijk op woensdag geanalyseerd moeten worden). De houdbaarheid van het verzamelmonster van dag 1 start op dinsdag. De verzamelmonsters van dag 2 en dag 3 worden dan respectievelijk op woensdag en donderdag uit het toestel genomen. De houdbaarheid van de verzamelmonsters van dag 2 en dag 3 starten respectievelijk op woensdag en donderdag.
- Indien voorgaande monsternamenacampagne een 5-daagse betreft, worden de verzamelmonsters van dag 1, 2, 3 en 4 op respectievelijk dinsdag, woensdag, donderdag en vrijdag uit het monsternametoestel genomen. Het verzamelmonster van dag 5 loopt af op vrijdag(nacht) om 23:59h. Dit verzamelmonster wordt de eerstvolgende werkdag voor het erkende laboratorium uit het monsternametoestel genomen: dit kan bv. op zaterdag (indien het laboratorium een weekenddienst heeft), op maandag (= eerstvolgende werkdag voor een laboratorium zonder weekenddienst die geen wettelijke verlofdag is), op dinsdag (= eerstvolgende werkdag voor een laboratorium zonder weekenddienst indien maandag een wettelijke verlofdag is).

Daarnaast is, in het kader van de interpretatie van houdbaarheidstermijnen, de datum van de start van de analyse van belang. Bij analyses die een ontsluiting, extractie of andere voorbereidende handeling vereisen is dit normaal de datum waarop voormelde handeling uitgevoerd werd. In de andere gevallen is het de datum waarop het gehalte werd gemeten.

De opdrachtnemer is verantwoordelijk voor het respecteren van de voorgeschreven houdbaarheidstermijn van de monsters voor elke te bepalen parameter. Ingeval de opdrachtgever voor een bepaalde opdracht met twee of meer verschillende opdrachtnemers een contractuele relatie aangaat, is elk van deze erkende laboratoria verantwoordelijk voor het eigen deel van de opdracht.

[Van een erkend laboratorium dat eindverantwoordelijke is voor de rapportering wordt verwacht dat het per parameter(groep) monitort hoe vaak de houdbaarheidstermijn wordt overschreden en

dat het gebruik maakt van de resultaten van deze monitoring bij de continue verbetering van zijn processen of organisatie in het kader van het ISO/IEC 17025 kwaliteitssysteem.]

6.3 GEBRUIK VAN OPMERKINGEN M.B.T. DE KRITISCHE TERMIJNEN

In de volgende gevallen is een opmerking op het analyseverslag noodzakelijk:

- a) indien de **houdbaarheidstermijn van het monster** voor een bepaalde parameter(groep) werd **overschreden**

In dit geval moet duidelijk aangegeven worden welke parameter(groep) het betreft.

Het laboratorium moet op verzoek aan de opdrachtgever meedelen of de overschrijding te wijten is aan het laboratorium zelf, het voorafgaand traject (= het laattijdig bezorgen van het monster of de analyseopdracht) of een combinatie van beide.

- b) indien de **datum van monsternamen niet gekend** is door het laboratorium dat het analyseverslag opstelt.

In dit geval dient duidelijk aangegeven te worden dat de monsternamedatum niet werd doorgegeven aan het laboratorium en dat hierdoor de uitvoering van de analyses binnen de voorgeschreven houdbaarheidstermijnen niet kon gegarandeerd worden.

7 RAPPORTERING VAN DE ANALYSERESULTATEN EN INFORMATIE M.B.T. DE TOEGEPASTE METHODE

7.1 MINIMALE GEGEVENS

In het analyseverslag dienen minimaal volgende gegevens in verband met de analytische resultaten en methoden opgenomen te worden:

- het analyseresultaat en de eenheid waarin dit uitgedrukt is;
- een verwijzing naar de toegepaste ontsluitings-, uitlogings- en analysemethode;
- bijkomende informatie indien de analysemethode of de regelgeving dit vereist;
- relevante afwijkingen of toelichting bij de analyse.

De eenheid waarin het - finale - analyseresultaat uitgedrukt wordt dient in overeenstemming te zijn met het toetsingskader. Ook de naamgeving van de parameters dient zoveel mogelijk afgestemd te worden op de regelgeving.

De verwijzing naar de ontsluitings-, uitlogings- en analysemethode, zoals opgenomen in het analyseverslag, dient tenminste de code van de van toepassing zijnde compendiummethode of de andere vereiste methode volgens art. 45 van het VLAREL te bevatten.

Onder relevante afwijkingen of toelichting bij de analyse wordt alle bijkomende informatie verstaan die noodzakelijk is voor een correcte interpretatie van de analyseresultaten door de opdrachtgever en een eventuele eindgebruiker. Zie ook verder punt 7.4 Gebruik van opmerkingen op analyseverslagen.

De naam en het adres van het erkende laboratorium dat de analyse heeft uitgevoerd moeten eenduidig kunnen worden afgeleid uit het analyseverslag en overeen komen met deze waarop de erkenning is afgeleverd.

7.2 ERKENNINGSLOGO VLAREL EN VERWIJZING NAAR DE ERKENNINGSSTATUS PER PARAMETER

Conform art. 49 van het VLAREL dient een erkend laboratorium op het analyseverslag het erkenningslogo VLAREL aan te brengen:



Het laboratorium dient bovendien duidelijk te vermelden voor welke metingen, beproevingen en analyses het erkend is en voor welke niet. Hiervoor gelden volgende regels:

- bij elk gerapporteerd analyseresultaat moet duidelijk, via een code/symbool naar keuze, aangegeven worden of het al dan niet tot het toepassingsgebied van de erkenning van het laboratorium behoort;
- de gebruikte code of het gebruikte symbool moet toegelicht worden, bv. in een voetnoot van het analyseverslag.

Indien voor de erkenning als laboratorium in de betreffende discipline meerdere deeldomeinen voorzien zijn, dient hiermee rekening gehouden te worden bij de verwijzing naar de erkenningsstatus.

Voor de verwijzing naar de erkenningsstatus voor monsternemingen wordt verwezen naar punt 5.2.

7.3 BEREKENING VAN SOMGEHALTEN OF VERSCHILGEHALTEN

Indien voor de berekening van somgehalten of verschilgehalten een werkwijze is vastgelegd in de betreffende regelgeving, het betreffende compendium of de andere vereiste methode volgens art. 45 van het VLAREL dient deze werkwijze toegepast te worden. Indien geen werkwijze vastgelegd is wordt het “lower bound” principe toegepast.

7.4 GEBRUIK VAN OPMERKINGEN OP ANALYSEVERSLAGEN

In de volgende gevallen is een opmerking op het analyseverslag noodzakelijk:

- a) indien **geen resultaat** bekomen kon worden **of** indien het een component betreft die volgens het compendium of de andere vereiste methode volgens art. 45 van het VLAREL **enkel indicatief of semikwantitatief** bepaald kon worden.

In dit geval wordt, respectievelijk ter vervanging of ter verduidelijking van het resultaat, een symbool naar keuze gebruikt. Dit symbool dient toegelicht te worden via een voetnoot of opmerking op het analyseverslag.

Een rapportagegrens in het resultaatveld wordt beschouwd als een resultaat; een opmerking is dan enkel noodzakelijk indien een te hoge (d.i. een hogere dan volgens de regelgeving vereiste) rapportagegrens wordt doorgegeven (zie punt c)). Ook '>' waarden worden beschouwd als een resultaat, doch het gebruik hiervan is enkel toegelaten indien dit expliciet vermeld wordt in het compendium of de andere vereiste methode volgens art. 45 van het VLAREL (bv. bij bepaling BZV in water).

Het laboratorium dient op verzoek bijkomende informatie, bv. waarom geen resultaat kon bekomen worden, ter beschikking te stellen aan de opdrachtgever.

- b) indien een **afwijking bij de kalibratie of kwaliteitscontrole** de 'fitness for purpose' van het resultaat mogelijk in het gedrang brengt en deze afwijking **niet kon weggewerkt worden** via een hermeting/heranalyse met bijkomende voorzorgen cfr. het compendium of de andere vereiste methode volgens art. 45 van het VLAREL.

In dit geval dient de afwijking duidelijk omschreven te worden: op welke parameter(s) heeft ze betrekking, wat wijkt af en in welke richting.

Het laboratorium dient op verzoek bijkomende informatie, zoals de te verwachten impact op het gerapporteerde analyseresultaat (vermoedelijke onderschatting of overschatting, ...) of wat ondernomen is om deze afwijking weg te werken, ter beschikking te stellen aan de opdrachtgever.

[M.b.t. het wegwerken van dergelijke afwijking wordt vooropgesteld dat een 'redelijke' extra inspanning vanwege het erkende laboratorium (= 1 heranalyse) volstaat, mits hierbij voldoende bijkomende technische voorzorgen werden getroffen (bv. toepassing van een bijkomende zuiveringstechniek, gebruik van een aangepaste hoeveelheid monster, ...).

Indien, op het ogenblik dat de afwijking wordt vastgesteld, de houdbaarheidstermijn van het monster reeds verstreken is hoeft geen heranalyse met bijkomende voorzorgen meer opgestart te worden.]

- c) indien een **hogere dan de volgens de regelgeving of door de klant vereiste rapportagegrens als resultaat wordt doorgegeven**.

In dit geval dient gespecificeerd te worden dat de rapportagegrens werd verhoogd.

Het laboratorium dient op verzoek bijkomende informatie, zoals de reden (verdunding omwille van niet te elimineren matrixeffecten, te hoge blankowaarde, ...) of wat ondernomen is om deze afwijking weg te werken (zie punt b)), ter beschikking te stellen aan de opdrachtgever. [Het verdund inzetten van monsters met het oog op minder matrixeffecten is enkel aanvaardbaar indien dit de 'fitness for purpose' van het analyseresultaat niet in het gedrang brengt. Dit mag bijgevolg geen aanleiding geven tot een te hoge rapportagegrens als resultaat, tenzij wanneer andere technische mogelijkheden om de matrixeffecten te beperken (cfr. compendium of andere vereiste methode) onvoldoende zijn gebleken voor het betreffende monster.

Indien van één of meerdere van de via een specifieke analysemethode te bepalen reeks componenten extreem hoge gehalten in het monster aanwezig zijn, mogen de rapportagegrenzen voor de overige componenten in de regel niet hoger liggen dan de richt- of grenswaarde voor het gehalte van deze componenten volgens de van toepassing zijnde regelgeving.]

- d) indien bij de uitvoering van de monstervoorbehandeling, analyse of bij de berekening van het gehalte **afgeweken** diende te worden **van het compendium** of de andere vereiste methode volgens art. 45 van het VLAREL.

In dit geval dient de afwijking duidelijk omschreven te worden, evenals de reden van de afwijking.

- e) indien **somgehalten of verschilgehalten** worden gerapporteerd waarbij minstens één van de componenten een meetwaarde kleiner dan de rapportagegrens ($<RG$) heeft **en** de toe te passen **werkwijze niet vastgelegd** is in de betreffende regelgeving, het betreffende compendium of de andere vereiste methode volgens art. 45 van het VLAREL.

In dat geval wordt het "lower bound" principe toegepast.

- f) indien **meer dan één resultaat voor een te bepalen parameter** gerapporteerd wordt en deze resultaten significant verschillen, rekening houdend met de context van de analyse.

In dit geval dient het verschil tussen de resultaten nader toegelicht te worden en dient aangegeven te worden welk resultaat het laboratorium het meest betrouwbaar acht.

Het vermelden van opmerkingen m.b.t. houdbaarheidstermijnen (cfr. punt 6.3) of analyses (cfr. punt 7.4) mag niet leiden tot het weglaten van de verwijzing naar de erkenning en ontslaat het erkende laboratorium dus niet van de overige vereisten in deze procedure.

8 RAPPORTERING IN GEVAL VAN (GEDEELTELIJKE) UITBESTEDING

Indien monsternemingen of analyses, welke volgens het VLAREL uitgevoerd dienen te worden door een erkend laboratorium, uitbesteed worden aan een ander erkend laboratorium, gelden volgende richtlijnen voor de rapportering (voor de definitie van de term eindverslag wordt verwezen naar punt 0):

- het monsternamen- of analyseverslag van het uitvoerend laboratorium wordt integraal als bijlage opgenomen bij het eindverslag, d.w.z. eindverslag en bijhorende bijlagen vormen steeds één geheel;
- bij de erkenningsstatus voor de uitbesteede monsternemingen of analyses wordt via een code/symbool naar keuze aangegeven dat het uitbesteede verrichtingen betreft; de gebruikte code of het gebruikte symbool moet toegelicht worden, bv. in een voetnoot van het eindverslag;
- de methodeverwijzing voor de uitbesteede monsternemingen of analyses in het eindverslag wordt vervangen door de term 'uitbesteed' of door de methodeverwijzing van het uitvoerend laboratorium.

Een opdrachtnemer die een deel van de opdracht uitbesteedt, draagt de eindverantwoordelijkheid voor het geheel, conform de bepalingen van de ISO/IEC 17025 norm, en is dus aansprakelijk voor zowel de correcte overdracht van de monsters naar/vanuit het ander uitvoerend laboratorium als voor de door dit laboratorium verstrekte resultaten/gegevens.