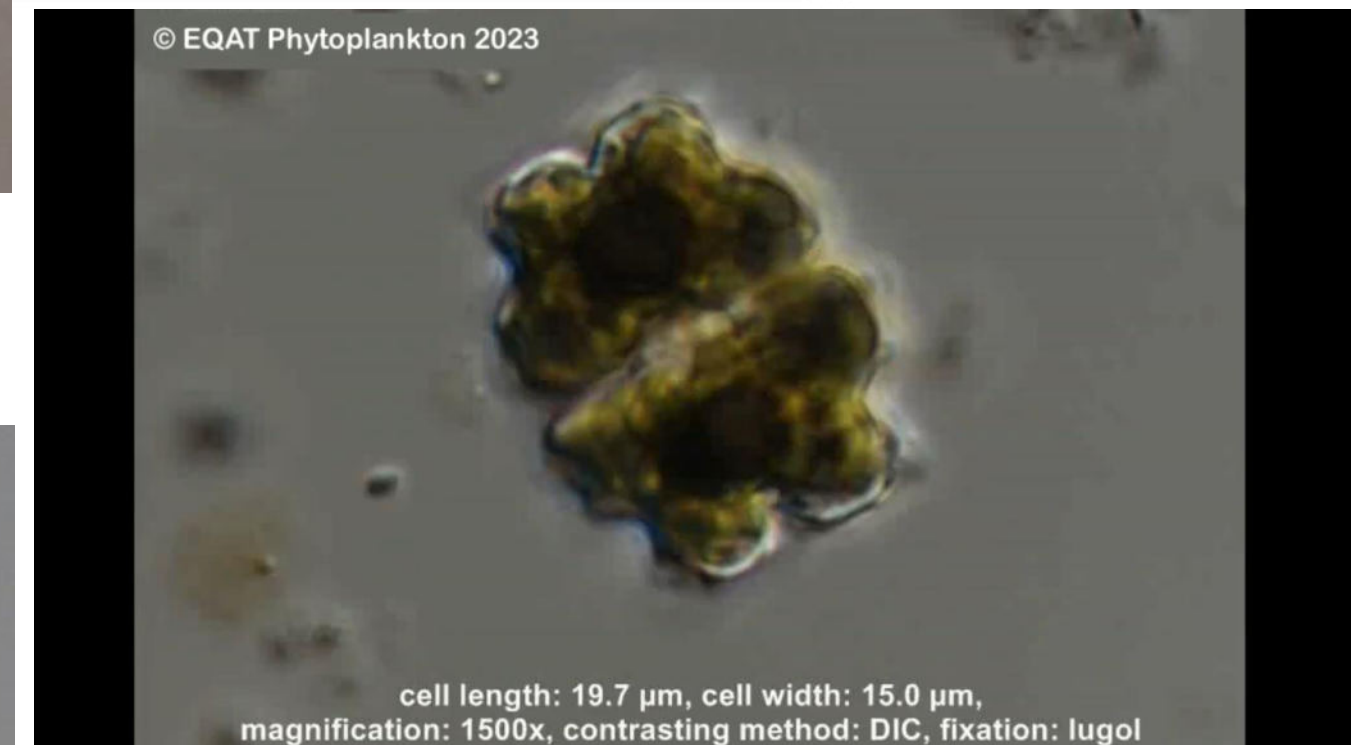
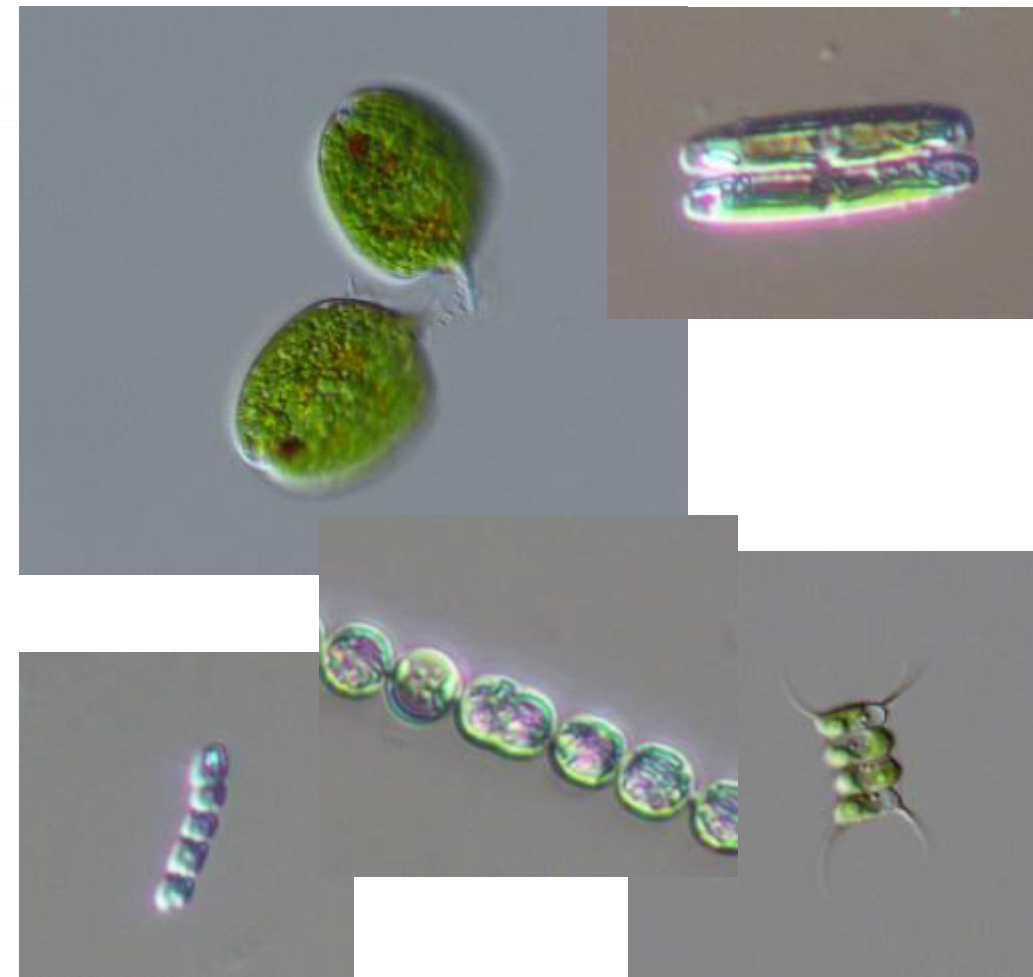


EQAT Ringversuche Phytoplankton

Webseite: www.planktonforum.eu

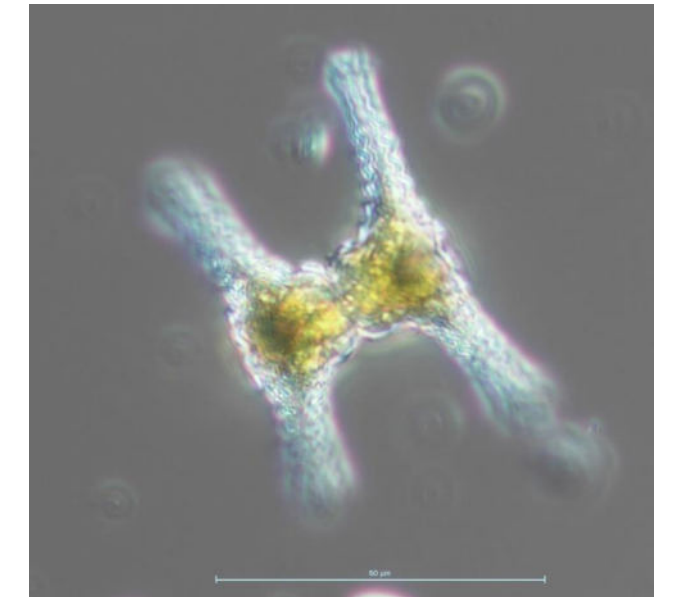
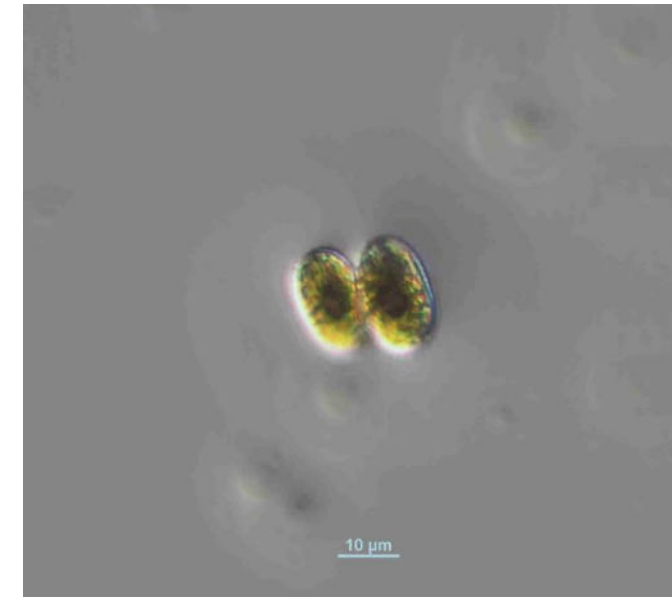


Dr. Elly Spijkerman (QSÜ Plauen) & Dr. Tilo Hegewald (Referat Wassergüte)

Gliederung Vortrag

- Etwas über mich
- Ringversuche Phytoplankton Gestaltung
- Arbeitsmethodik Phytoplankton-Analyse
- Methodik von Ringversuche
- Beispiel Ergebnisse aus der Ringversuch 2023
- Qualitätssicherung (QMH, Homogenität, Stabilität)
- Messunsicherheit
- Webseite

- Fragen immer gleich stellen!



Elly Spijkerman

- geboren 1968 in Krommenie (Provinz Noord-Holland)
- Biologie Studium in Amsterdam (1986-1991, UvA)
- Doktorarbeit Ökophysiologie von Zieralgen (1991-1998, Dr. Peter Coesel, Prof. J. Ringelberg)
- ‚Post-Doc‘-Stelle: UvA (1998-2000, Prof. H. van den Ende), UFZ (2002, Prof. W. Geller) und Universität Potsdam (2002-2016, Prof. U. Gaedke)
- Habilitation 2009 (Ökophysiologie und Limnologie)
- Nicht-Akademisch: Beratungsfirma Witteveen+Bos (2001, Abteilung Wasserqualität); Algenol Biofuels (2015-2016, R&D)
- Seit 2018 LTV, QSÜ Plauen (Biologin, Ringversuche)
- 43 Fachbeiträge in internationalen begutachtenden Zeitschriften und 2 Buchkapiteln



EQAT Ringversuch Phytoplankton seit 2002 (10 Mal)

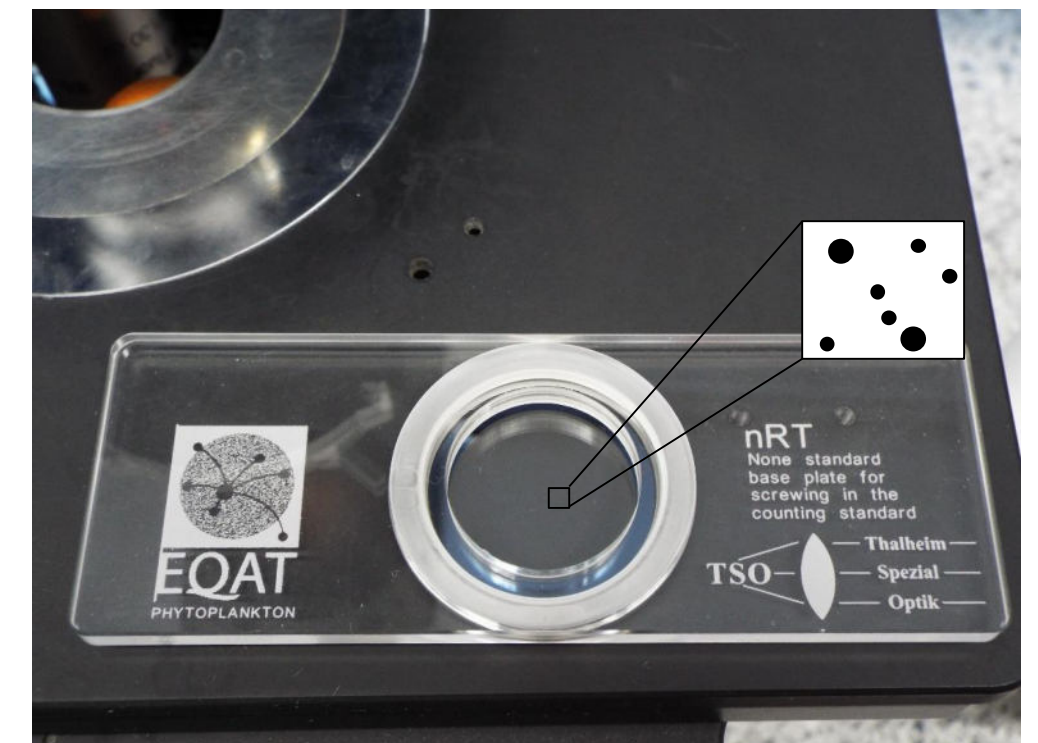
- Zusammenarbeit von LTV und ATT AK Biologie
- Ringversuche zur Phytoplanktonanalyse existierten noch nicht (Entwicklung durch Andreas Meybohm, Jan Trübsbach und Tilo Hegewald)
- 3 Komponenten Test mit internationale Teilnehmern
- seit 2013 als Ringversuchsanbieter akkreditiert nach DIN EN ISO/IEC 17043:2010

Ringversuchsaufbau:

- Komponente 1: Referenzzählkammer mit unterschiedlich-großen, Poisson-verteilten Punkten
 - Komponente 2: natürliche Phytoplanktonprobe mit 3-5 Taxa gemischt aus Algenkulturen
 - Komponente 3: Taxonomische Bestimmung von 10 Taxa an Hand von Video-Aufnahmen
- seit 2018 innerhalb der LTV als Betrieb gewerblicher Art
 - ab 2025 nur Teilnehmer innerhalb die EU

Komponente 1: Referenzzählkammer

- Planktonzählkammer, wie im Arbeitsprozess am Umkehrmikroskop, mit einer festgelegten Anzahl von Mikrostrukturen mit 3 verschiedenen, vor-definierten Durchmessern eingraviert auf den Bodengläschen
- aus Eigen-Entwicklung!
- Vorteile:
 - räumliche Partikelverteilung entspricht Poisson-Verteilung (kein Aufsetzfehler möglich)
 - keine Fehler durch Falsch-Bestimmung von Organismen möglich
- zu prüfende Fähigkeiten:
 - Auszählung von definierten Teilflächen der Referenzzählkammer
 - Vermessung des Durchmessers von Mikropartikel
 - Berechnung der Partikel- und der Volumenkonzentration
 - Kalibration des mikroskopischen Systems

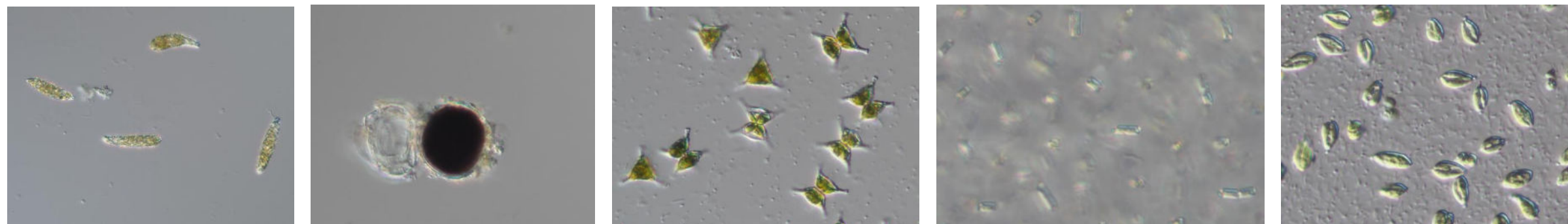


Komponente 2: Natürliche Phytoplanktonprobe

- Lugol-Fixierte Probe von der 3-5 Taxa gezählt und vermessen werden sollen
- Bestimmung der Phytoplankton-Konzentration entsprechend der DIN EN 15204: 2006
- Berechnung des Algenbiovolumens als Biomasseparameter nach DIN EN 16695: 2015

Zu prüfende Fähigkeiten:

- Auszählung von Algen auf definierten Teilflächen der Zählkammer (Zählstrategie)
- Vermessung verschiedene Algentaxa und Berechnung des Zellvolumens (Auswahl geeigneter Volumenformeln)
- Berechnung der Zell- und Biovolumenkonzentration



Algenkulturen

Komponente 3: Taxonomische Bestimmung

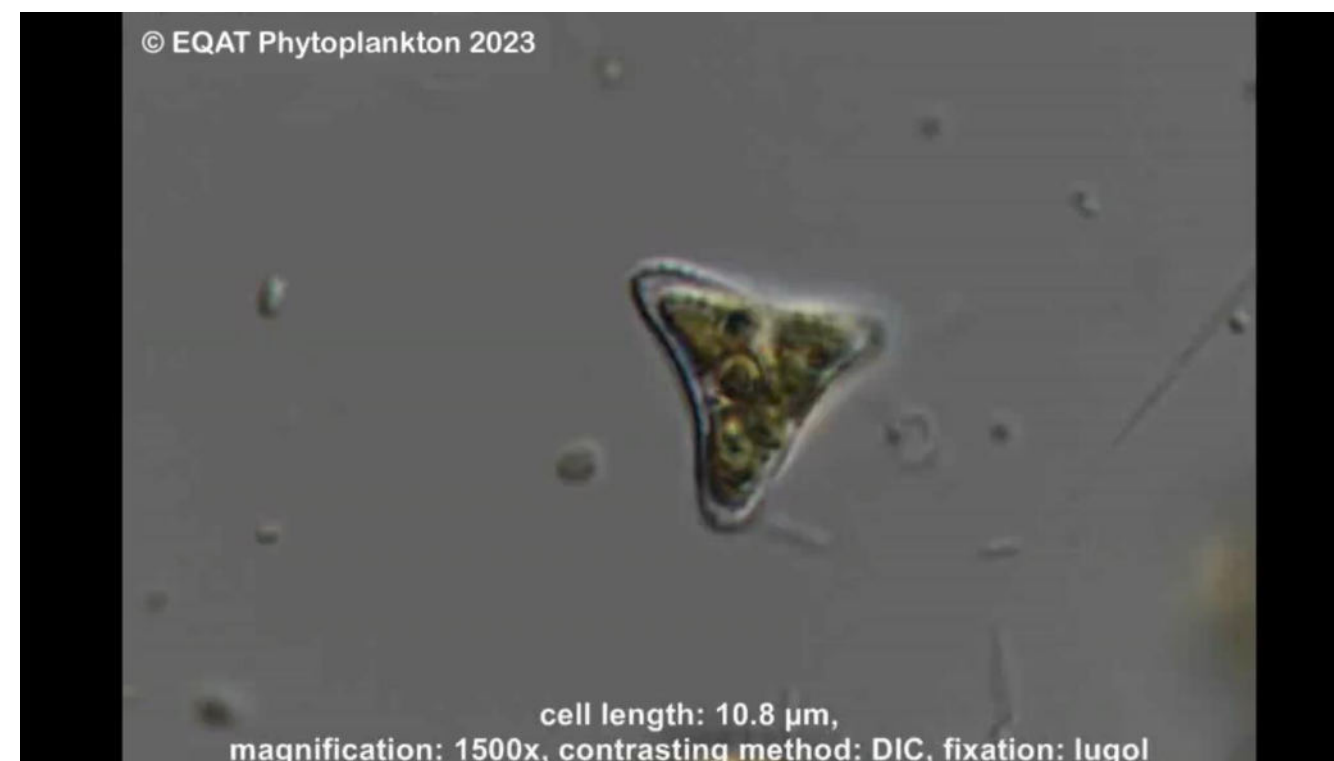
- 10 Videos mit Phytoplankton die,
- auf vorgeschriebenen Bestimmungsniveaus taxonomisch bestimmt werden sollen

Zu prüfende Fähigkeiten:

- Individuelle Artenkenntnisse (Erfahrung)
- Umgang mit der verfügbaren taxonomischen Literatur bei der Artenbestimmung
- Wissen über Systematik und morphologischen Variabilität von Phytoplanktonorganismen

Beispiel aus Ringversuch 2023

Video 9 (*Goniochloris mutica* / *G. pulchra*,
Xanthophyceae)

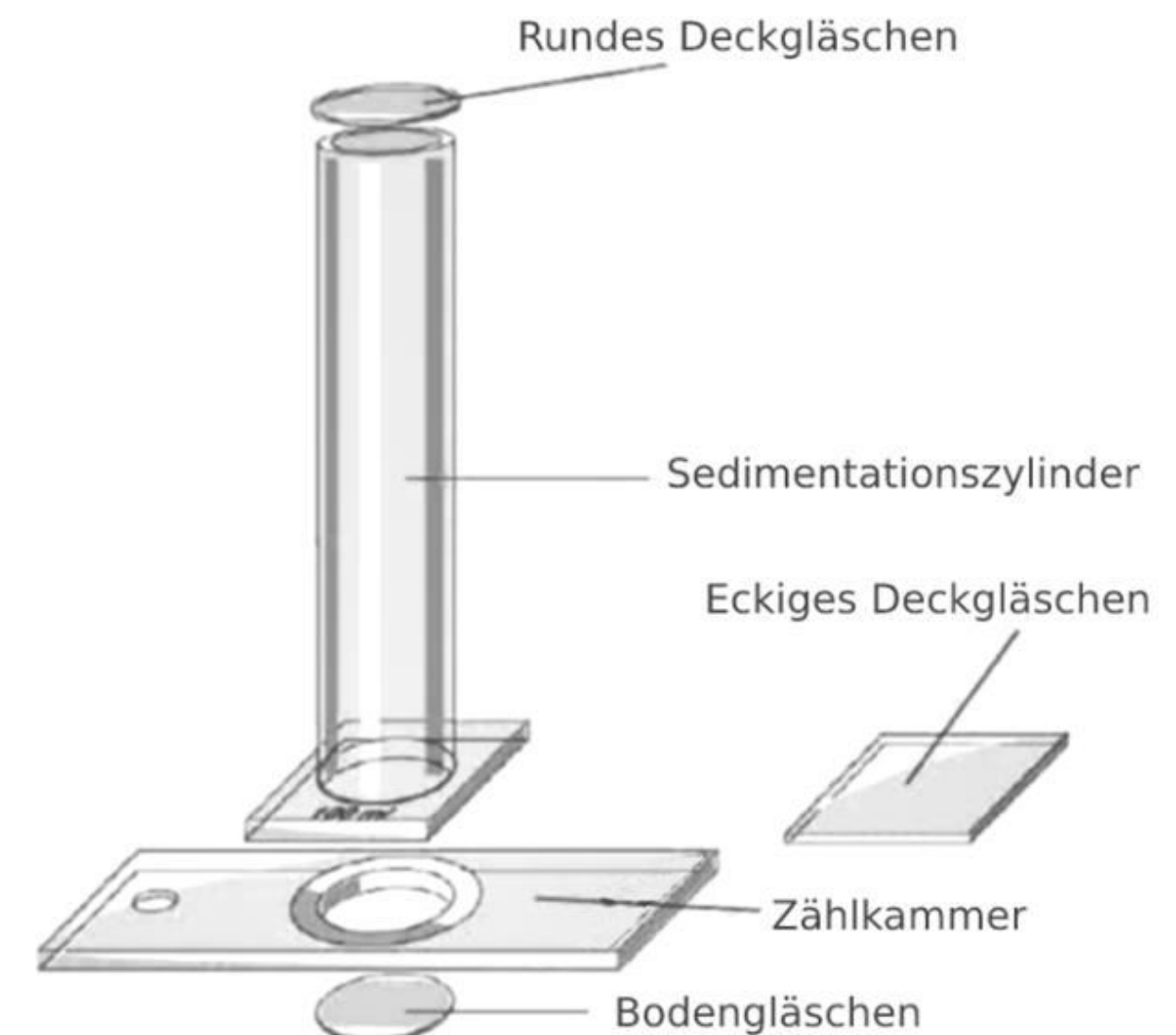


Arbeitsmethodik Phytoplankton-Analyse

- vor-Ort Lugol-fixierte Freiland-Probe
- Analyse mittels Umkehrmikroskopie (Utermöhl-Technik)
- Bestimmung Sedimentationsvolumina an Hand von Chlorophyll-Konzentration (und Trübung)

Nachdem das Phytoplankton absedimentiert ist:

- Abschieben Sedimentationszylinder mit eckigem Deckglas
- mikroskopische Auszählung der Algen (Zählstrategie)
- Vermessung der dominanten Arten und Zellvolumen-Berechnung
- Berechnung von Zell- und Biovolumen-Konzentrationen
- Protokoll-Erstellung



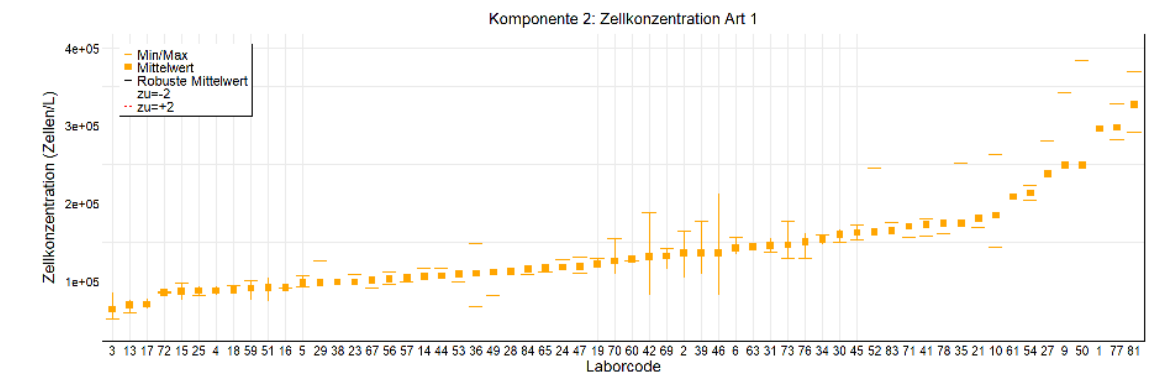
Chronologischer Ablauf des Ringversuchs

- Identische Proben werden an teilnehmende Laboratorien verschickt
- Proben werden von Teilnehmern bearbeitet
- Ergebnisse werden an Ringversuchsanbieter gesendet (Im Internetportal eingegeben)
- Auswertung und Beurteilung der Ergebnisse durch den Ringversuchsanbieter
- Zertifikat- und Ergebnisblätter-Versand an Teilnehmer
- Berichterstellung durch den Ringversuchsanbieter



Methodik von Ringversuche: Komponente 1 & 2

- Identische Proben werden an teilnehmende Labore verschickt → Homogenitätstest
- Proben werden von Teilnehmern bearbeitet → Stabilität über Bearbeitungszeitraum
- Ergebnisse Auswertung nach den DIN 38402-45:2024:
 - * Ausreißer-Eliminierung (nur bei 10.000-Fach Abweichung)
 - * Schätzverfahren nach HAMPEL (Robuster Mittelwert $\hat{\mu}$)
 - * Q-Methode (Berechnung der Wiederhol- und der Vergleichs-Standardabweichung)
- Wiederhol-Standardabweichung, Abweichung zwischen die 3 Wiederhol-Messungen
- Vergleichs-Standardabweichung, Abweichung zwischen die Teilnehmern



$$Z = \frac{y - \hat{\mu}}{S_{Soll}} = \text{Sollstandardabweichung für die Berechnung der } z\text{-Scores}$$

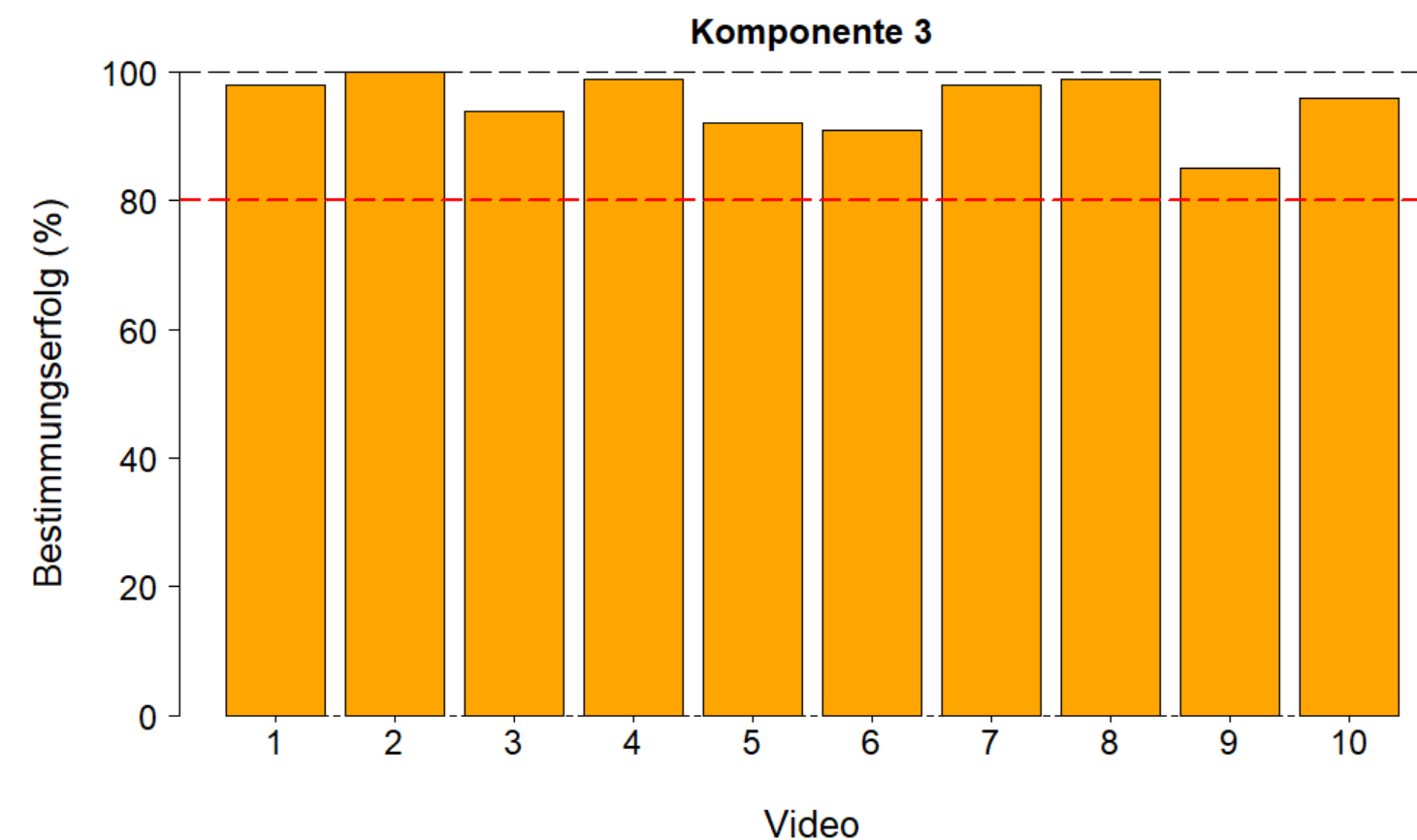
(aus z-Scores unter Berücksichtigung von ein asymmetrisches Toleranzintervall)

• $z\text{-Score} < |2| = \text{Bestanden}$

DIN 38402-45:2024 Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung - Allgemeine Angaben (Gruppe A) - Teil 45: Ringversuche zur Eignungsprüfung von Laboratorien (A 45)

Methodik von Ringversuche: Komponente 3

- 10 Videos mit Phytoplankton die,
- auf vorgeschriebenen Bestimmungsniveaus taxonomisch bestimmt werden sollen
- Qualitative Bewertung an Hand von Scores zwischen 0 und 1
- Gesamt-Score > 80% = Bestanden



Beispiel von Ergebnissen des Ringversuchs 2023

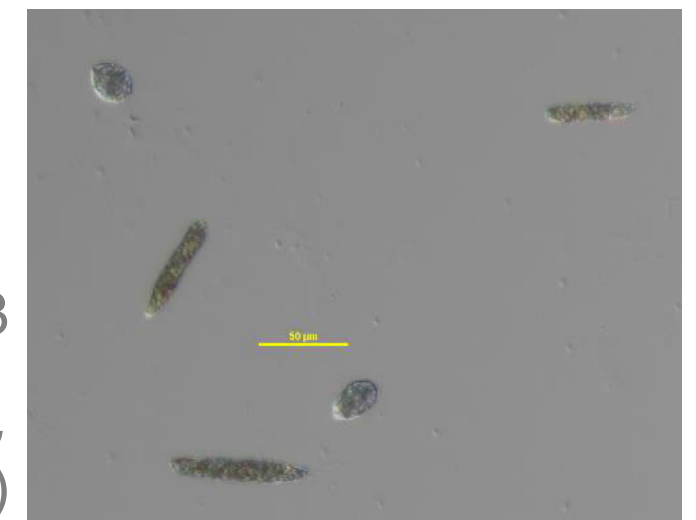
Ringversuch Meta-Daten

63 Anmeldungen, 61 Teilnehmer haben Ergebnisse eingereicht; davon sind

- Deutschland: 25; Österreich: 3; Niederlanden: 8; England: 2; Frankreich: 6; Spanien: 1; Portugal: 6; Italien: 4; Norwegen: 2; Finnland: 1; Litauen: 1; Rumänien: 2.
- Komponente 1: Referenzzählkammer. 6 Teilnehmer nicht Bestanden (9,8%)
Meiste Abweichungen in Partikelkonzentration große Partikel, geringste Abweichungen beim Durchmesser.
- Komponente 2: Natürliche Probe. 7 Teilnehmer nicht Bestanden (11,5%)
Meiste Abweichungen bei der Biovolumenkonzentration von Art 3 (*Staurastrum chaetoceras*), geringste Abweichungen bei der Zellkonzentration von Taxa 1 (*Euglena gracilis*).
- Komponente 3: Taxonomische Bestimmungen. 4 Teilnehmer nicht Bestanden (6,7%)
Meiste Abweichungen bei Video 9 (*Goniochloris mutica*)
- Allgemein: Sehr gute Teilnehmerperformance!

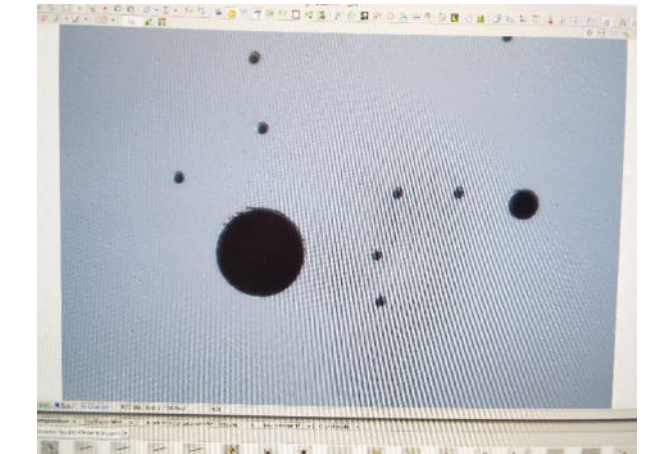
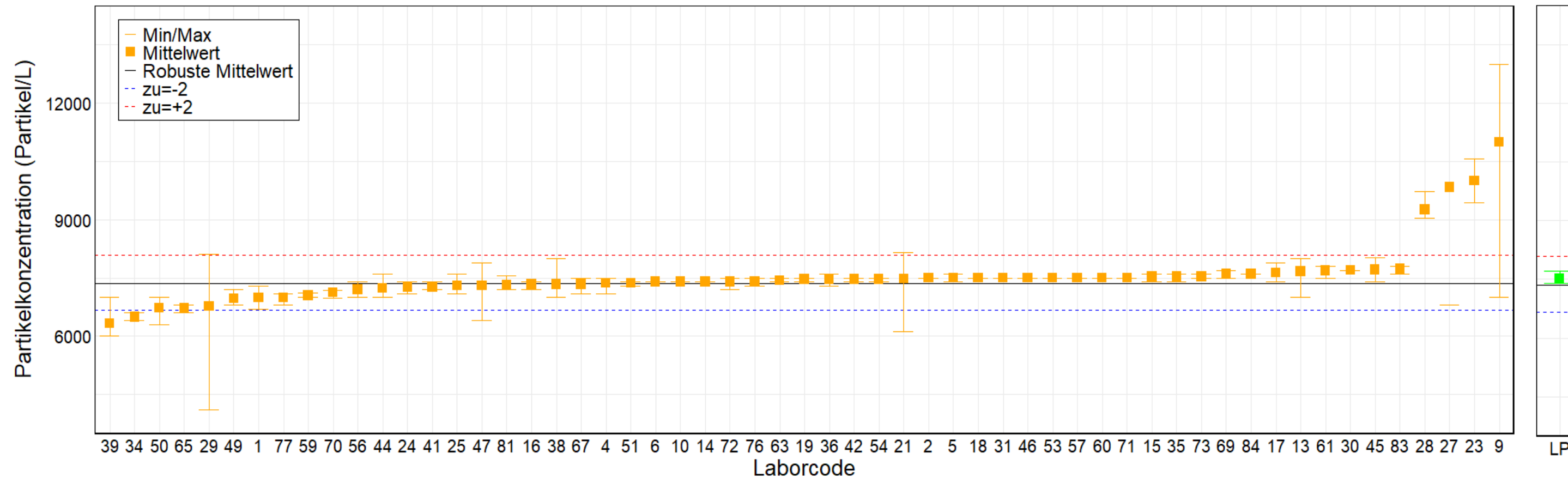
Ringversuch 2023

Taxa 1 (*Euglena gracilis*,
Euglenophyceae)



Ringversuch 2023. Partikelkonzentration (groß) in der Referenzzählkammer

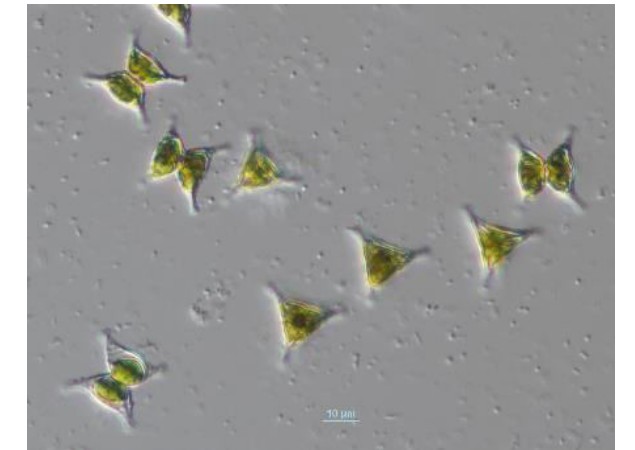
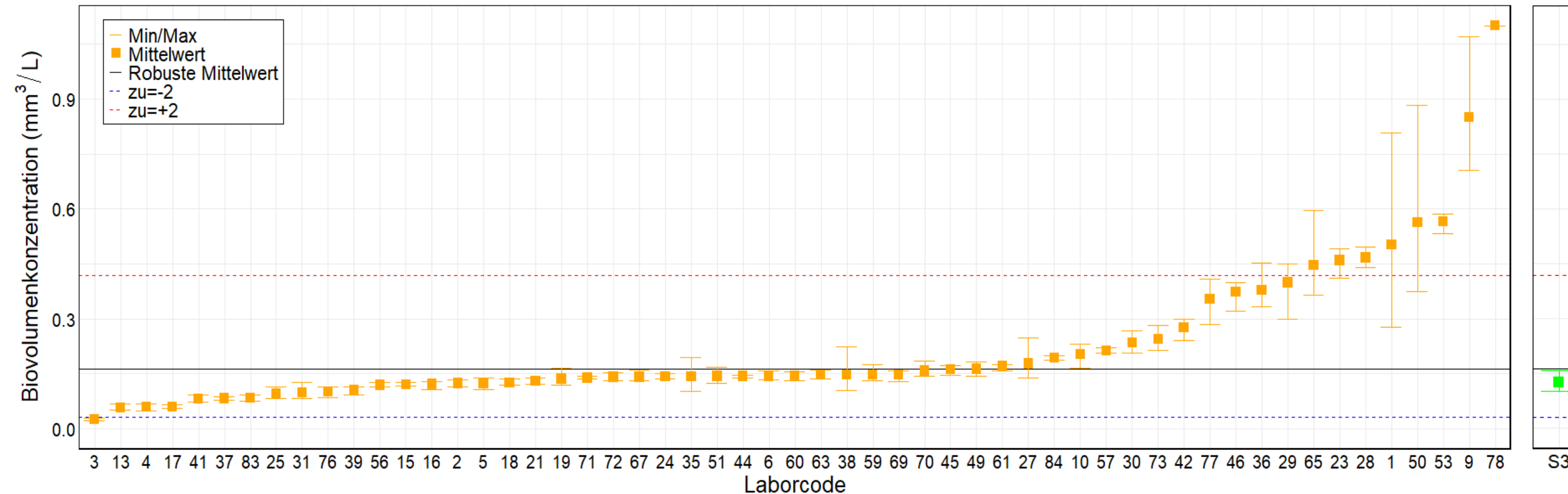
Komponente 1: Große Partikelkonzentration



- Orangefarbener Kästchen sind die Mittelwerte ($n=3$) für jedes Labor, den robusten Mittelwert (fette schwarze Linie: 7.361 Partikel/L), die untere und obere Toleranzgrenze bei $zu=|2|$ (blaue und rote gestrichelte Linien: 6.672 bzw. 8.084 Partikel/L). Die Whisker reichen bis zum Minimum und Maximum. Mittelwerte von 4 Laboren lagen außerhalb der Skala (Labor 3, 78, 37 und 52).
- Die Vergleichsstandardabweichung betrug 5,81% und die Wiederhol-standartabweichung 0,85%. Die spezifische Messunsicherheit (u) betrug 11,4%.

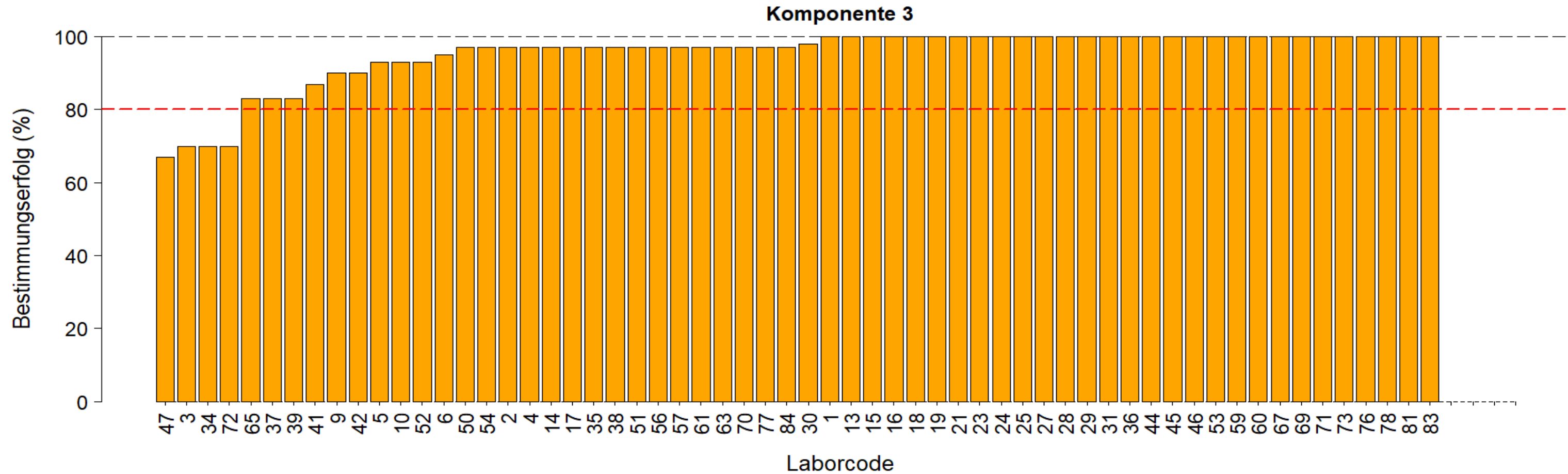
Ringversuch 2023. Biovolumenkonzentration von Art 3 *Staurastrum chaetoceras*

Komponente 2: Biovolumenkonzentration Art 3



- orangefarbener Kästchen sind die Mittelwerte (n=3) für jedes Labor, den robusten Mittelwert (fette schwarze Linie: 0,163 mm³/L), die untere und obere Toleranzgrenze bei $zu=|2|$ (blaue und rote gestrichelte Linien: 0,031 bzw. 0,417 mm³/L). Die Whisker reichen bis zum Minimum und Maximum. Mittelwerte von 4 Laboren lagen außerhalb der Skala (Labor **14**, **52**, **54** und **81**).
- Die Vergleichsstandardabweichung betrug 58,25% und die Wiederholstandardabweichung 12,61%. Die spezifische Messunsicherheit (u) betrug 115,1%.

Ringversuch 2023. Taxonomie



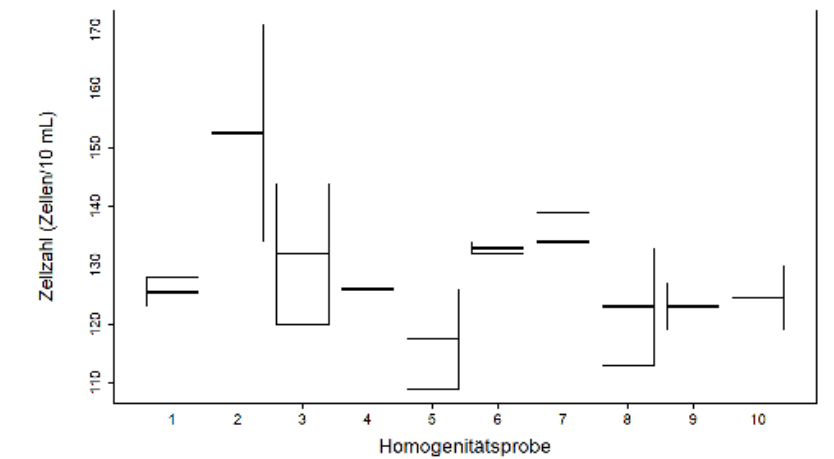
- das Qualitätsziel liegt bei 80% (rote gestrichelte Linie)
- qualitative Bewertung (Bewertungs-Scores zwischen 0 und 1)
- Gesamtpunktzahl für jeden Teilnehmer

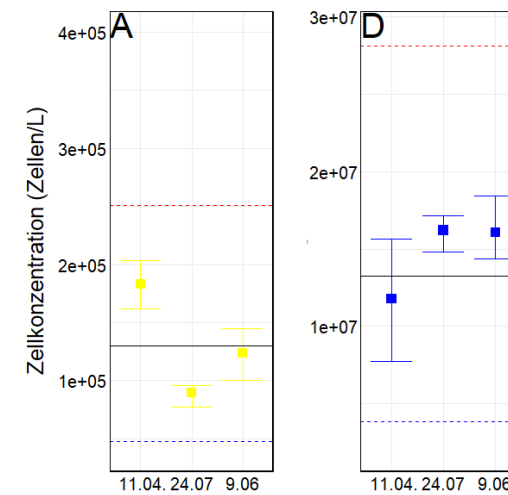
Qualitätssicherung (QMH)

- Referenzzählkammer: Kontrolle der von Dienstleister gefertigten Kammern durch Auszählung und Vermessung der Mikropartikel auf 10 Kammern (Test ob Fehler zwischen den Kammern < 5%)
- Natürliche Phytoplankton-Probe
 - Überprüfung Zielkonzentrationen
 - Überprüfung ob optisch „Klar und Machbar“
 - Homogenität (identische Proben werden verschickt)
 - Stabilität (keine Änderung der Probenqualität während des Analyse-Zeitraums)
- Taxonomie:
 - Taxonomische Absicherung durch externe Expertise
 - deutliche Sichtbarkeit der Bestimmungsmerkmale im Video
 - realistische Anforderung auf Bestimmungsniveau
- Verschicken von Proben mit Nachverfolgung, sicheres und klares Webportal
- Kontakt mit Teilnehmer, Benachrichtigung über die zu erreichenden Ziele

Qualitätssicherung (Homogenität)

- 10 zufällig ausgewählte Flaschen der natürlichen Phytoplankton-Probe
- Doppel-Ansatz
- eine „Leitart“ wird gezählt, vorzugsweise in der gesamten Kammer (kleinste Zählfehler), und in ausreichende Menge (>100 Zellen)
- Zählung wird auf Homogenität getestet (Methodik DIN ISO 13528:2020)
- Anhang B.2:
Die Standardabweichung zwischen Proben soll $< 0,3 * \text{die Standardabweichung für die Eignungsbeurteilung}$ ausmachen (,Fitness for purpose‘, Zählfehlergrenze über denen keinen systematische Abweichungen auftreten)
- Standardabweichung zwischen Proben darf nicht mehr als 10% zur Standardabweichung für die Eignungsprüfung beitragen (sonst Verbesserung der Probenherstellung erforderlich)





Qualitätssicherung (Stabilität)

- Sicherstellen der Stabilität der natürliche Probe während des **Bearbeitungszeitraums** und während des **Transports**
- 3 zufällig ausgewählte Flaschen der natürliche Phytoplankton-Probe (Stabilitätsproben)
- 1 Zusatz-Flasche wird zu einer nicht existierenden Adresse geschickt (Post-Probe) und wird nach Rücklieferung ins Ringversuchslabor bewusst fehlerhaft gelagert (solange bis der letzte Teilnehmer seine Ringversuchsprobe bekommen hat)
- danach korrekte Lagerung der Post-Probe und gemeinsame Zählung mit eine Stabilitätsprobe
- Stabilitätsproben werden gestreckt über die gesamte Analysephase gezählt
- alle Proben werden wie von den Teilnehmern gezählt (in 3-fach-Ansatz)
- Ergebnisse werden auf Tendenzen untersucht und der Median muss innerhalb der $zu = |2|$ -Scores-Grenzen des Ringtests liegen

Messunsicherheit

- die spezifische Messunsicherheit (u) wird berechnet wie in ISO 21748:2017 vorgegeben
- S_l ist die Standardabweichung der Reproduzierbarkeit (Variation zwischen Teilnehmern), S_r die Standardabweichung der Wiederholbarkeit (Variation innerhalb eines Teilnehmers) und m die Anzahl der Wiederholungen
- Für jeder Parameter wird die spezifische Messunsicherheit (u), was ein Vertrauensniveau von etwa 95 % ergibt, in Bericht gemeldet

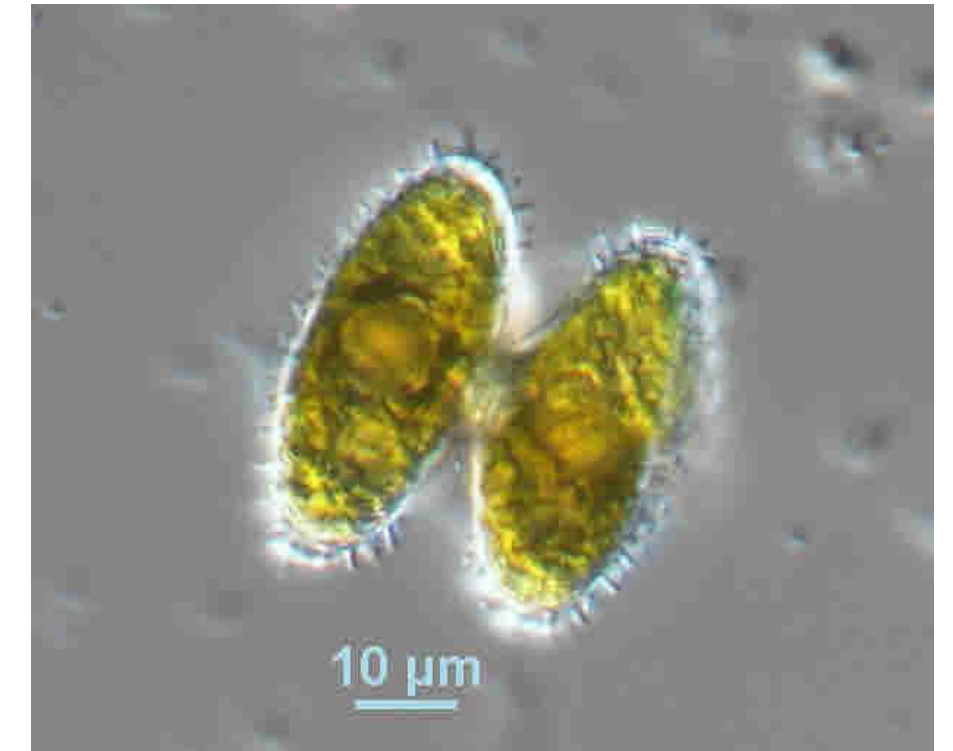
$$u = 2 * \sqrt{\left(S_l^2 + \left(\frac{S_r^2}{m} \right) \right)}$$

- Im RV von 2023 würde für u Werten zwischen 5,1% (Durchmesser Mikropartikel groß) und 115% (Biovolumenkonzentration von *Staurastrum chaetoceras*) berichtet

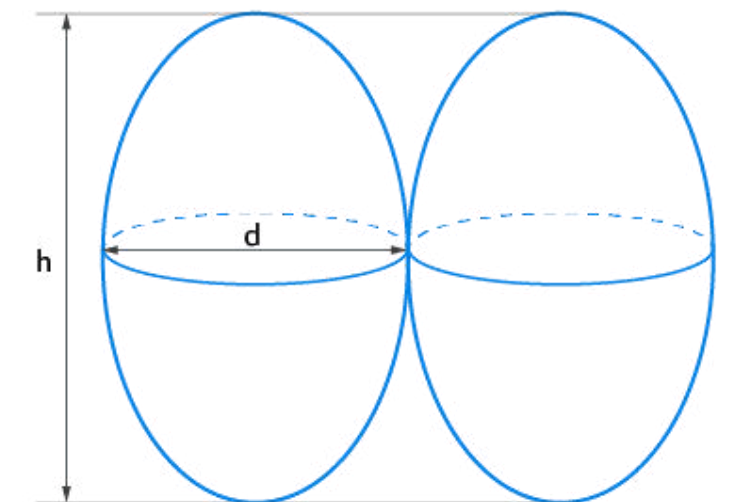
ISO 21748:2017 Guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty evaluation

EQAT Ringversuche Webseite

- www.planktonforum.eu
- Neben Informationen über unsere Ringversuche Phytoplankton
- Bilderdatenbank mit Fotos von 390 Algen Taxa
- Formeldatenbank mit Formeln zur Zellvolumen Berechnung (DIN EN 16695:2015)
- Literaturdatenbank mit Bestimmungsliteratur
- Elly.spijkerman@ltv.sachsen.de 03741-1564 134



Staurastrum gladius aus Eibenstock



Vielen Dank für ihre Aufmerksamkeit