



Nieuwsbrief van de werkgroep Cyanobacteriën nummer 8, februari 2007

Het Cyanobacteriën overleg

De werkgroep Cyanobacteriën brengt twee maal per jaar een Nieuwsbrief uit over de stand van zaken van het onderzoek naar cyanobacteriën (blauwalgen) en hun toxines (gifstoffen), de wetgeving, praktische beheersaangelegenheden en eventuele nieuwsfeiten. Het overleg van de werkgroep heeft als doel het uitwisselen van informatie, het afstemmen van onderzoek en het ondersteunen van beleidsvorming op het gebied van cyanobacteriën, met name gericht op monitoring van overlast en risico's. Informatie van en over de werkgroep is te vinden op de website van STOWA (www.stowa.nl) onder het kopje "Thema cyanobacteriën". Als u vragen of opmerkingen heeft over cyanobacteriën dan kunt u de werkgroep via cyano@stowa.nl benaderen.

Deelnemers aan het overleg zijn wetenschappers en waterkwaliteitsbeheerders. Momenteel zijn de leden: Hans Ruiten (RIZA, voorzitter), Minke de Vries (Wetterskip Fryslân, secretaris), Cees Collé (IPO-WHVBZ, Provincie Gelderland), Rixt Hovenkamp (HH Hollands Noorderkwartier), Jasper Stroom (HH Rijnland), Michelle Talsma (STOWA), Petra Visser (Universiteit van Amsterdam), Anna-Maria de Roda-Husman (RIVM), Ciska Schets (RIVM), Bas Ibelings (NIOO-CL, KNAW), Miquel Lurling (Wageningen Universiteit en Researchcentrum) en Ron van der Oost (Waternet, redactie nieuwsbrief).

Op het laatste blauwalgen overleg is besloten om in alle publieksgerichte informatie voortaan te spreken over **blauwalgen** in plaats van cyanobacteriën omdat hier regelmatig verwarring over bestaat. Wij willen voorstellen dat alle andere organisaties in hun publieksinformatie hetzelfde doen.

LET OP!

Omdat de volgende nieuwsbrieven digitaal zullen worden verspreid verzoeken we alle belangstellenden om hun e-mail adres te versturen naar Jet Gerssen van STOWA gerssen@stowa.nl, met "CYANO NIEUWS" in onderwerp (subject) regel. Mensen die niet reageren zullen de volgende nieuwsbrief dus niet ontvangen!!

In deze Nieuwsbrief: - standaardisering cyanotoxine monitoring, deel 2
- resultaten ringtest microcystine analyse 2006
- Onderzoek naar gezondheidsklachten door cyanobacteriën (PLONZ)
- Cyanokit voor bepaling van soortensamenstelling cyanobacteriën
- Monitoring van cyanobacteriën in stedelijk water

Standaardisering Nederlandse cyanotoxine monitoring (2)

Ron van der Oost, Waternet (Waterproef Lab), Toxicologie, ron.van.der.oost@waternet.nl

In het protocol van de Commissie Integraal Waterbeheer (CIW), dat door de meeste Nederlandse Waterschappen wordt gehanteerd, is een raamwerk beschreven voor de monitoring van cyanotoxines. Het is echter niet duidelijk wat de beste manier is om binnen de grenzen van dit raamwerk de risico's voor de zwemmers te bepalen. Daarom voert Waternet (Waterproef laboratorium) in opdracht van STOWA een onderzoek uit om te komen tot een optimale monitoring procedure.

Bemonstering

De werkgroep Cyanobacteriën heeft een concept bemonsteringsprotocol geschreven waarin de strategie en de uitvoering van de bemonstering zijn weergegeven. In 2006 is er een vragenlijst naar de waterschappen, provincies en Rijkswaterstaat gestuurd waarin werd gevraagd of met dit protocol goed valt te werken en of er voorstellen voor aanpassing waren. Aan de hand van de reacties is het protocol geëvalueerd en het concept aangepast tot een definitief protocol. Het definitieve voorschrift "Protocol voor het nemen van oppervlaktewatermonsters voor onderzoek naar toxines van cyanobacteriën en voor de globale bepaling van de algensamenstelling" is te vinden op de website van STOWA (www.stowa.nl), onder "Thema cyanobacteriën".

Kwaliteit van de extractie

De voorlopige richtlijn voor extractie van monsters van oppervlaktewater voor de ELISA analyse van microcystines, waarbij monsters werden geëxtraheerd door ze na methanol toevoeging 20 minuten te verhitten in kokend water, is in 2006 iets aangepast omdat het niet nodig bleek om het extract te filtreren en te centrifugeren. De kwaliteit van de extractie is onderzocht met een microscopisch onderzoek en met een nationale ringtest (zie het volgende artikel in deze Nieuwsbrief). Bij de vergelijking tussen de snelle extractiemethoden is de microcystine opbrengst vergeleken en werd niet onderzocht of de cyanobacteriën daadwerkelijk kapot werden gemaakt tijdens de extractie. Uit een microscopisch onderzoek bleek dat bij geen van de onderzochte soorten cyanobacteriën (Anabaena, Microcystis en Planktothrix) de cellen kapot gingen tijdens de extractie. Bij Anabaena en Microcystis werd na de extractie wel een afname van de celdiameter waargenomen, waaruit blijkt dat een deel van de celinhoud werd uitgescheiden. Bij Planktothrix werd geen afname van de celdiameter aangetoond. Bij Microcystis en Planktothrix werden na de extractie echter hoge microcystine gehalten aangetoond, wat er op duidt dat de intracellulaire toxines vrijkomen. Na de extractie van Anabaena kwam daarentegen vrijwel geen microcystine uit de cellen.



Conclusies

Op grond van alle resultaten van dit onderzoek lijkt het aanbevolen extractieprotocol betrouwbaar voor monsters met een Microcystis dominantie. Het protocol is echter ongeschikt voor monsters met Anabaena dominantie, omdat is aangetoond dat alle snelle extractiemethoden (zoals koken, vries-dooi, magnetron en ultrasoon) niet efficiënt waren bij deze algensoort. Het is nog niet geheel duidelijk of de methode ook betrouwbaar is voor monsters met Planktothrix dominantie. Er zijn aanwijzingen dat de cyanotoxines uit gekweekte Planktothrix cellen wel worden geëxtraheerd, maar er is nog geen bewijs dat dit ook bij veldmonsters gebeurt, waarin de cellen in het algemeen wat taaier zijn. Daarom is het belangrijk om bij elk geval van algenbloei een monster te onderzoeken op (globale) soortensamenstelling.

Het rapport van deel 1 & 2 van de hierboven samengevatte studie, met de herziene protocollen voor bemonstering en extractie, is te vinden op de STOWA website (www.stowa.nl, "Thema cyanobacteriën").

Microcystine ringtest in 2006

Ron van der Oost, Waternet (Waterproef Lab), Toxicologie, ron.van.der.oost@waternet.nl

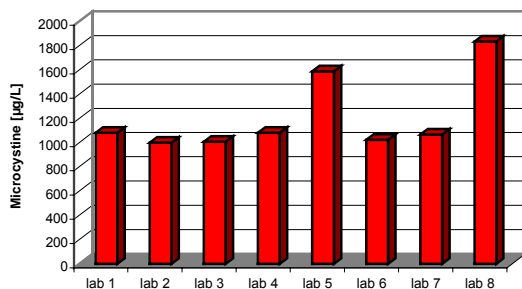
Uitvoering

In de zomer van 2006 werden er in het kader van een ringonderzoek vier ingevroren monsters van cyanobacteriën verstuurd naar acht laboratoria. De monsters moesten worden geëxtraheerd en (na verdunning) worden geanalyseerd op microcystine. Het doel van dit onderzoek was om de kwaliteit van de extractie en de analyse van microcystines in de Nederlandse laboratoria te toetsen.

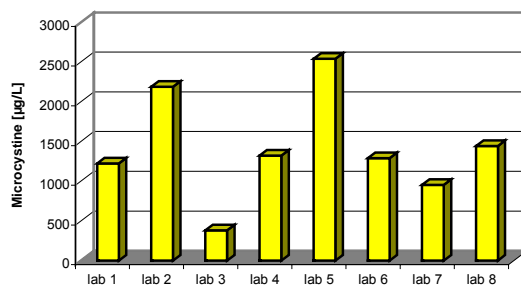
Resultaten

De gemiddelde resultaten van de analyses die met de door de werkgroep Cyanobacteriën aanbevolen methode werden geëxtraheerd zijn weergegeven in de grafieken op de volgende pagina. De resultaten van de ringtest monsters bleken redelijk tot goed overeen te komen voor de monsters van een kweek met *Microcystis* (figuur A) en een veldmonster met *Microcystis* dominantie (figuur C). De relatieve variatie was bij deze monsters minder dan 30%. De interlab variatie was groter bij de monsters van een *Planktothrix* kweek (figuur B) en een veldmonster met *Anabaena* dominantie (figuur D). Op grond van een statistische classificatie met de zogenaamde Z-waarde bleken vrijwel alle gemiddelde resultaten acceptabel te zijn, met uitzondering van slechts één resultaat dat van twijfelachtige kwaliteit bleek. Hierbij moet echter worden aangetekend dat de individuele resultaten van een van de laboratoria een zeer grote spreiding vertoonden, maar dat de gemiddelde waarden hiervan nog net acceptabel waren. De verschillen tussen de microcystine resultaten na extractie met de aanbevolen methode en de resultaten met de eigen methoden van enkele laboratoria waren niet groot. De reproduceerbaarheid van de microcystine analyse is onderzocht in een internationale ringtest, georganiseerd door Juan Ribo van de Universiteit van Catalonië (Barcelona, Spanje). Helaas hebben niet alle laboratoria met de beide ringtesten meegedaan.

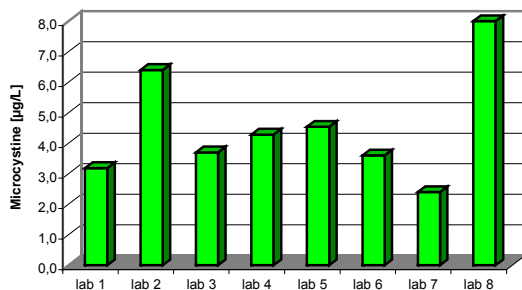
A: *Microcystis* UvA kweek



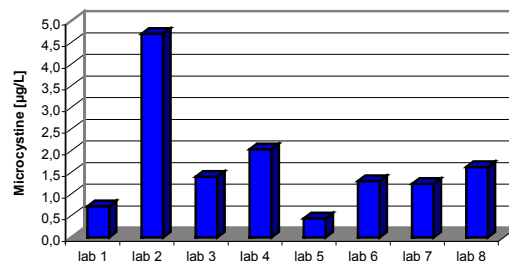
B: *Planktothrix* UvA kweek



C: Sloterplas (*Microcystis* dominantie)



D: Geestmerambacht (*Anabaena* dominantie)



Conclusies

Concluderend kan worden gezegd dat de resultaten van de ringtest in het algemeen bevredigend zijn. Er moet echter naar worden gestreefd om de kwaliteit van de extractie en analyse van met name *Anabaena* en *Planktothrix* monsters in de toekomst verder te verbeteren. Indien mogelijk zal er in 2007 een vervolg op deze ringtest worden uitgevoerd met verse monsters.

Onderzoek naar gezondheidsklachten door cyanobacteriën in het kader van PLONZ

Ciska Schets en Ana Maria de Roda Husman, RIVM-MGB,

Onderzoek

Vooralsnog is het onduidelijk of en in welke mate blauwalgen in Nederland gezondheidsklachten bij waterrecreanten veroorzaken. Drijfslagen van blauwalgen worden veel gerapporteerd en daarom lag in 2005 binnen het Project Landelijk Onderzoek Naar Zwemwaterklachten (PLONZ) de nadruk op ziekteuitbraken die mogelijk gerelateerd waren aan blauwalgen. Dergelijke incidenten werden in 2005 niet gemeld. Om toch een mogelijk verband tussen gezondheidsklachten en de aanwezigheid van blauwalgen in recreatiewater te kunnen onderzoeken heeft het RIVM in 2006 voor een andere onderzoeksstrategie gekozen. Op een drietal locaties waarvan bekend was dat er jaarlijks drijfslagen van blauwalgen voorkwamen, werd gedurende het badseizoen de microcystine concentratie in het zwemwater gemeten. Wanneer de concentratie microcystinen boven 10 µg/L kwam en de weersvoorspellingen gunstig waren voor de vorming en instandhouding van drijfslagen en grote bezoekersaantallen te verwachten waren, werd epidemiologisch onderzoek uitgevoerd. Een dergelijk onderzoek kon in 2006 op één locatie uitgevoerd worden. Aan 230 bezoekers van een recreatieplas werd gevraagd of zij aan het onderzoek wilden deelnemen. Er werd een vragenlijst uitgedeeld en de deelnemers werden na 5-7 dagen opgebeld. Uiteindelijk werden 201 personen bereikt voor het invullen van de vragenlijst (respons 87,4 %), dit waren 166 zwemmers en 35 niet-zwemmers. Tijdens de telefoongesprekken werden de vragenlijsten ingevuld en vragen naar gezondheidsklachten beantwoord.

Resultaten

In totaal rapporteerden 27 zwemmers (16%) gezondheidsklachten die mogelijk water gerelateerd waren; de 35 niet-zwemmers gaven aan geen gezondheidsklachten te hebben gehad. Zwemmers met gezondheidsklachten brachten meer tijd in het water door dan zwemmers zonder gezondheidsklachten. De gezondheidsklachten die gemeld werden, zijn de veelvoorkomende gezondheidsklachten die gedurende het badseizoen in relatie tot waterrecreatie worden gemeld. Maagdklachten werden het vaakst genoemd, gevolgd door huidklachten. De gerapporteerde klachten kunnen door cyanobacteriën veroorzaakt zijn, maar ook door andere pathogene micro-organismen die in het water aanwezig waren. De symptomen die karakteristiek als reactie op blootstelling aan cyanotoxinen worden beschouwd, zoals spier- en gewrichtspijn, blaren in de mond, blaren rond mond en neus en astmatische klachten, werden niet gemeld.

Slechts weinig mensen hebben een drijfslag van cyanobacteriën of dode dieren in het water gezien. Degenen die aangaven contact met de drijfslagen te hebben gehad rapporteerden geen gezondheidsklachten.



DNA technieken voor de detectie van blauwalgen; praktijktesten Cyanokit en Q-MAAP

Edwin Kardinaal, DHV & Gabriel Zwart, edwin.kardinaal@dhv.nl

In opdracht van vijf waterschappen en Rijks waterstaat heeft het NIOO in de zomer en najaar van 2005 het project Cyanokit/Q-MAAP uitgevoerd. In dit project werden DNA technieken voor de detectie van blauwalgen uitgetest in praktijktesten en werd gepoogd deze technieken ook kwantitatief te maken. In juni 2006 is de eindrapportage opgeleverd, hieronder volgt een samenvatting van de belangrijkste bevindingen uit dit project.

Toxische blauwalgen vormen een gezondheidsrisico voor mens en milieu. Niet alle blauwalgen zijn toxisch. De detectie van toxische blauwalgen gebeurt nu met een microscoop, wat een aantal nadelen heeft:

- toxische en niet-toxische blauwalgen zijn moeilijk of niet te onderscheiden.
- de methode is subjectief (afhankelijk van microscopist)
- bepalen van de hoeveelheid (kwantificering) is foutgevoelig en tijdrovend.

Toxische en niet-toxische blauwalgen zijn te onderscheiden op basis van verschillen in DNA kenmerken. DNA technieken zijn objectiever en nauwkeuriger dan microscopie en de gevoeligheid van de DNA technieken is groot waardoor vroegtijdige waarschuwing mogelijk wordt. In dit project zijn twee DNA technieken onderzocht voor detectie en kwantificering:

1. CYANOKIT is een methode die onderscheid maakt tussen verschillende *Microcystis* 'soorten'. Hierdoor wordt het mogelijk vroegtijdig te zien of er risicosoorten aanwezig zijn. Er is onderzoek gedaan naar een kwalitatieve screening en een kwantificering methode.
2. Q-MAAP is gericht op de vier belangrijkste toxische geslachten in Nederland (*Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon* en *Planktothrix*). De methode is bedoeld om deze geslachten te kwantificeren en maakt geen onderscheid tussen toxische en niet toxische 'soorten'.

Resultaten en conclusies:

CYANOKIT Screening:

- Het Waterlaboratorium (HWL) in Haarlem bleek in staat de assay op goede wijze uit te voeren.
- De praktijktest liet zien dat in bijna alle plassen waar *Microcystis* voorkomt zowel toxische als niet-toxische *Microcystis* 'soorten' voorkomen.
- Toxische soorten werden vaak gedetecteerd terwijl microcystines (nog) niet meetbaar waren. Deze DNA methode is gevoeliger dan de gebruikte methode om toxines te meten.
- De betrouwbaarheid van CYANOKIT screening kan verder worden verhoogd door gebruik van apparatuur van goede kwaliteit (temperatuur stabiliteit en homogeniteit).

CYANOKIT Kwantificering:

- Ribo Technologies in Groningen is er niet in geslaagd de kwantificering van Cyanokit op te zetten.

Q-MAAP

- De ontwikkeling van Q-MAAP is niet geslaagd. De gekozen techniek voor kwantificering bleek niet voor deze toepassing geschikt te zijn.

Toepassing

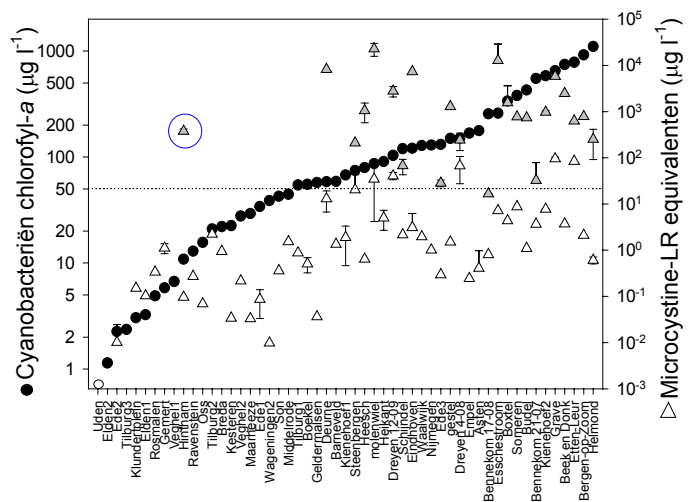
De screening op toxische *Microcystis* soorten met de Cyanokit is ver ontwikkeld en kan al door HWL worden toegepast. Deze techniek kan in een vroeg stadium aantonen of er risico-soorten aanwezig zijn in oppervlakte water. Als ook andere algensoorten aangetoond kunnen worden en kwantificering van de resultaten mogelijk is zal deze techniek een microscopisch onderzoek kunnen vervangen

Bloei van cyanobacteriën in stadswateren

Miquel Lurling, Aquatische Ecologie & Waterkwaliteitsbeheer, WUR: miquel.lurling@wur.nl

De leerstoelgroep Aquatische Ecologie en Waterkwaliteitsbeheer van de Wageningen Universiteit en Researchcentrum (WUR) is in 2006 begonnen met een inventarisatie van cyanobacteriënbloei in stedelijk water. Met name het voorkomen van drijfslagen, de soortensamenstelling en de hoeveelheid gifstoffen worden in kaart gebracht. Om een eerste indruk te verkrijgen is in de zomer van 2006 (juli, augustus) een kleine selectie van 50 verschillende stadswateren in Noord-Brabant en Gelderland bemonsterd. Twee vijvers zijn gedurende 2006 intensiever bemonsterd om een indruk te verkrijgen van het verloop van de cyanobacteriebloei in deze vijvers.

In 17 van de 50 onderzochte wateren werden vrijwel geen cyanobacteriën aangetroffen of was de hoeveelheid cyanobacteriën chlorofyl-a minder dan $20 \mu\text{g l}^{-1}$. In 13 wateren waren cyanobacteriën in grote hoeveelheden aanwezig of dominant, variërend van $22 \mu\text{g l}^{-1}$ (Breda; totaal chl-a = $30 \mu\text{g l}^{-1}$) tot $176 \mu\text{g l}^{-1}$ (Asten), maar er was geen drijfslaag. De resterende twintig wateren hadden een cyanobacteriën drijfslaag. Zestig procent van de wateren had een cyanobacteriën-chlorofyl-a gehalte van $\geq 50 \mu\text{g l}^{-1}$ (zie figuur hiernaast).



De cyanobacteriën-chlorofyl-a (zwarte cirkel; $\mu\text{g l}^{-1}$) en microcystine-LR concentratie ($\mu\text{g l}^{-1}$) in de waterkolom (witte driehoek) en in drijfslagen (grijze driehoek) voor de bemonsterde stadswateren. De blauwe cirkel indiceert een dikke benthische laag van *Aphanocapsa*. De stippellijn geeft $50 \mu\text{g l}^{-1}$ chlorofyl-a aan en $20 \mu\text{g l}^{-1}$ microcystine.

De meest potente drijfslagvormer was *Microcystis*. In 11 drijfslagen waren *Microcystis* soorten (*M. aeruginosa* en *M. flos-aquae*) dominant, terwijl ze in drie andere drijfslagen subdominant waren. *Anabaena* soorten waren in zes drijfslagen dominant, subdominant in 1 drijfslag en in een redelijke hoeveelheid aanwezig in drie andere drijfslagen. *Woronichinia naegeliana* was in twee drijfslagen de dominerende soort en was subdominant in vier andere drijfslagen. *Planktothrix agardhii* vormde in één water een stevige drijfslag en was in vier andere drijfslagen een subdominante drijfslag-vormer. *Aphanizomenon flos-aquae* werd slechts in één drijfslag als subdominante medevormer aangetroffen. In de eerste screening werd in twee wateren *Cylindrospermopsis* aangetroffen.



De hoogste microcystine-concentratie gemeten in de waterkolom was $95 \mu\text{g l}^{-1}$. In zes wateren werd de richtlijn van $20 \mu\text{g l}^{-1}$ microcystine l^{-1} , waarbij een zwemwater gesloten wordt, overschreden (zie figuur). In drijfslagen zijn microcystine-concentraties variërend van $17 \mu\text{g l}^{-1}$ (drijfslag van *Anabaena*) tot ruim $28000 \mu\text{g l}^{-1}$ (drijfslag van *Microcystis*) gemeten.

In de loop van 2007 worden ook de resultaten van uitgebreidere toxineanalyses verwacht. Dit zal een indicatie geven van het voorkomen en de concentraties van diverse cyanogiften.

Waar worden microcystine analyses uitgevoerd?

Hieronder een lijstje met ons bekende laboratoria waar bepalingen van microcystines worden gedaan, ook in opdracht van derden. Neem voor informatie contact op via de vermelde telefoonnummers of via e-mail. De lijst is zeker niet volledig en we houden ons aanbevolen voor aanvullingen of wijzigingen (s.v.p. per e-mail melden aan ron.van.der.oost@waternet.nl).

| Laboratorium | Techniek | Telefoon | e-mail |
|--------------------------------------|------------------------------|----------------------------|--|
| ELTI Support, Nijmegen | ELISA | 024-3778261 | e.meulenberg@eltisupport.nl |
| Waterschap Rivierenland, Tiel | ELISA | 0344-649300 0344-649313 | j.van.rooy@wsrl.nl b.bongers@wsrl.nl |
| Wetterskip Fryslân, Leeuwarden | ELISA | 058-2339655 | mdevries2@wetterskipfryslan.nl |
| Waterschap Hunze en Aa's, Veendam | ELISA | 0598-693650 0598-693662 | r.dilling@hunzeenaas.nl j.hatzman@hunzeenaas.nl |
| Waterproef, Edam | ELISA | 0299-391700 | info@waterproef.nl |
| Omegam, Amsterdam | HPLC-MS | 020-5976680 | klantenservice@omegam.nl |
| Het waterlaboratorium, Haarlem | ELISA HPLC-MS Cyanokit | 023-5175900 023-5175948 | hans.spiering@hetwaterlaboratorium.nl |
| Waterschapsbedrijf Limburg, Roermond | ELISA | 0475-394318 0475-394237 | laboratorium@wbl.nl t.duyzings@wbl.nl |

Een ELISA kit van SDI voor het bepalen van microcystines is verkrijgbaar via MicroLan in Waalwijk (joep.appels@microlan.nl; tel. 0416-540775).

Deze Nieuwsbrief is samengesteld door Ron van der Oost, Waternet (Waterproef Lab).
E-mail: ron.van.der.oost@waternet.nl
De nieuwsbrief is als pdf-file verkrijgbaar op www.stowa.nl (thema cyanobacteriën) en op www.shallowlakes.net/platform-ehm/ (sectie 'downloaden').