



Blauwalgen ringtest 2011

Ron van der Oost & Tjeerd Bruinsma

Waternet

Amsterdam, mei 2012

Mai Thao Nguyen

Waterproef

Colofon

Titel	Blauwalgen ringtest 2011		
Projectnummer	67303-1		
Rapportnummer	12.025623		
		paraaf:	date:
Projectleider	Ron van der Oost		
Kwaliteitsborging	Blauwalgen platform		
Teamleider	Joost Kappelhof		
Auteur	Ron van der Oost		
Opdrachtgever	STOWA		
Contactpersoon	Bas van der Wal		

Citeren als: Ron van der Oost, Tjeerd Bruinsma en Thao Nguyen, Blauwalgen Ringtest 2011, Waternet rapportnr. 12.025623

Blauwalgen ringtest 2011

Inhoud

1. Inleiding	4
2. Uitvoering van de experimenten	4
2.1 Bemonsteren	4
2.2 Homogeniseren en verdelen van de monsters	5
2.3 Deelnemers en analyses	6
2.4 Data-analyse en classificatie van resultaten	7
3. Resultaten	8
3.1 Chlorofyl volgens NEN-6520	8
3.2 Cyano-chlorofyl met fluorescentie	11
3.3 Microscopische quickscan	13
3.4 Microscopische celdichtheid en soortensamenstelling	14
3.5 Microscopisch biovolume	19
3.6 Microcystine	22
3.7 Diversen	26
4. Beoordeling van de resultaten	27
5. Classificatie van de monsters	32
6. Discussie & conclusies	33
7. Aanbevelingen	35
8. Referenties	36

Bijlage:

Onderzoek optimalisatie PP2A en AChE bioassays

1 Inleiding

In 2010 is een nieuw protocol vastgesteld voor de monitoring van blauwalgen, dat in de toekomst zal worden aangepast naar aanleiding van ervaringen van waterbeheerders/provincies en aanvullend onderzoek. Door een aantal belangrijke leemten in de kennis is de waarde van het huidige protocol onduidelijk. In het in dit rapport beschreven onderzoek wordt getracht een antwoord op de volgende vragen te vinden:

- Hoe vergelijkbaar zijn de resultaten van de analyses van celdichtheid, biovolume en cyano-chlorofyl van de laboratoria van de Nederlandse waterbeheerders?
- Worden onverantwoord hoge toxinegehalten (microcystine, anatoxine, saxitoxine, etc.) waargenomen op locaties die wel voldoen aan de normen van het nieuwe blauwalgenprotocol?
- Kunnen de risico's voor de zwemmer worden beoordeeld met effectgerichte toetsen (bioassays) of PCR-analyse van de toxinevormende genera?
- Is er een relatie tussen de cyanotoxinegehalten en de dominante geslachten blauwalgen (op basis van celdichtheid, biovolume, cyano-chlorofyl) of nieuwe parameters (PCR-data of bioassay-effecten)?

Het doel van de landelijke ringtest blauwalgen is meer inzicht te verwerven in de risico's van blauwalgen in zwemwater en uiteindelijk te komen tot de meest geschikte methode om de risico's voor de zwemmers snel en betrouwbaar te monitoren. Dit onderzoek werd aanbevolen in het STOWA-rapport "Toepassing van fluorescentie bij de beoordeling van de risico's van giftige blauwalgen, Ron van der Oost, 2010". De conclusies en aanbevelingen van dit rapport worden gesteund door de landelijke werkgroep Cyanobacteriën (thans platform Blauwalgen).

2 Uitvoering van de experimenten

2.1 Bemonstering

In de zomer van 2011 is een uitgebreid ringonderzoek uitgevoerd. Tweemaal is een serie van zes veldmonsters genomen van het water: eenmaal in het voorseizoen en eenmaal in het naseizoen. De monsters werden genomen in het beheersgebied van Waternet en het Hoogheemraadschap Hollands Noorderkwartier (HHNK) toen op meerdere locaties blauwalgen aanwezig waren.

Serie 1: 12 juli 2011

R1 locatie: het groene strandje; Ouderkerkerplas te Ouderkerk aan de Amstel

R2 locatie: Marina Almeerderstrand; IJsselmeerdijk te Almere

R3 locatie: Eilandenbuurt te Almere-Buiten

R4 locatie: Jagersveld te Zaandam

R5 locatie: de Kuifeend te Zaandam

R6 locatie: het Zuiderstrand te Zaandam.

Serie 2: 27 september 2011

R7 locatie het Zuiderstrand te Zaandam

R8 locatie: Alkmaardermeer locatie Dorregeest te Uitgeest.

R9 locatie: Sloterplas te Amsterdam

R10 locatie: Zilverstrand te Almere Poort

R11 locatie :surfstrandje te Almere Haven

R12 locatie: Venegat strand, 't Twiske te Landsmeer.

2.2 Homogeniseren en verdelen van de monsters

Het water werd op de dag van bemonstering gehomogeniseerd en verdeeld in identieke deelmonsters. Homogenisatie heeft plaatsgevonden in een 5 liter bekglas met behulp van een magneetroerder. Na tien minuten roeren is 200 ml monster met een gekalibreerde dispenser overgebracht in glazen flessen. Na toevoeging van 600 ml kraanwater is het cyano-chlorofylgehalte van de watermonsters bepaald volgens de fluorescentiemethode (bbe Fluoroprobe). De streefwaarde van het cyano-chlorofyl per watermonster werd vastgesteld op 5 tot 100 microgram per liter (rond de normen van het blauwalgen protocol). Als kwaliteitseis werd per monster een afwijking ten opzichte van de gemiddeld gemeten waarde van maximaal 5% vastgesteld. Monsters die niet aan deze eis voldeden zijn uit de reeks verwijderd. De monsters werden opgeslagen in een lichtarme omgeving bij een temperatuur tussen de 4 en 8 °C.

De deelmonsters werden snel op koeling verstuurd naar alle deelnemende laboratoria en Wageningen Universiteit en Research centrum (WUR). De monsters voor de noordelijke laboratoria werden per koerier verstuurd, de monsters voor de laboratoria in Midden Nederland werden afgeleverd door Tjeerd Bruinsma (Waternet) en de monsters voor de zuidelijke laboratoria werden afgeleverd door MicroLan (waarvoor dank).

2.3 Deelnemers en analyses

Alle deelnemers en geplande en uitgevoerde analyses zijn weergegeven in Tabel 1.

Tabel 1: Overzicht deelnemende labs en analyses Ringtest 2011											
parameters >											
Laboratoria	Chlorofyl NEN	Cyano chlorofyl FLUO	Microscopie quickscan	Microscopie celdichtheid	Microscopie biovolume	microcystine ELISA	flowcytometrie	PP2A en AChE bioassays	PCR cyano	Toxine analyses	Remote sensing
SERIE 1											
GWL Boxtel											
Aquon Breda											
Aquon Rijnland											
Waterproef											
WGS Groot Sallant											
Rijkswaterstaat											
WS Hunze & Aa											
Omegam											
Koeman & Bijkerk											
Aqualab zuid											
Grontmij											
Deltares											
WUR											
Water Insight											
aantal/parameter	5	3	2	7	7	2	0	1	0	2	1
SERIE 2											
GWL Boxtel											
Aquon Breda											
Aquon Rijnland											
Waterproef											
WGS Groot Sallant											
Rijkswaterstaat											
WS Hunze & Aa											
Omegam											
Koeman & Bijkerk											
Aqualab zuid											
Grontmij											
Deltares											
WUR											
Water Insight											
aantal/parameter	7	3	3	8	8	2	0	1	1	2	0

meting uitgevoerd	
meting gepland, niet uitgevoerd	

2.4 Data-analyse en classificatie van resultaten

Van elk monster werden het gemiddelde van de analyses bij alle laboratoria, de absolute en relatieve standaarddeviaties en de minimale en maximale waarden bepaald. Deze waarden zijn weergegeven in tabellen en grafieken. De relatieve standaarddeviatie van de resultaten, een analyse die door verschillende laboratoria is uitgevoerd, is een belangrijke maat voor de robuustheid van deze analyse en voor de vergelijkbaarheid tussen de verschillende laboratoria.

Met de gemiddelde resultaten van de analyses kunnen de zogenaamde Z-scores worden bepaald. Met de Z-score worden de data geclassificeerd met betrekking tot de afwijking van het gemiddeld gevonden resultaat (mean), afhankelijk van de standaarddeviatie (sd). De Z-score wordt bepaald met de formule:

$$Z = \frac{X_{\text{lab}} - \text{mean}}{\text{sd}}$$

waarin X_{lab} de door een laboratorium waargenomen waarde is.

Met de Z-scores kunnen de resultaten van elk monster worden geëvalueerd. Hoe dichterbij nul ligt, hoe beter het resultaat is. De kwaliteit van de analyse van een bepaald laboratorium wordt vastgesteld aan de hand van de volgende criteria:

- $0 < |Z| < 2$: acceptabele waarde
- $2 < |Z| < 3$: twijfelachtige waarde
- $|Z| \geq 3$: niet-acceptabele waarde.

Waarin $|Z|$ de absolute waarde is van de Z-score (= de 'afstand' tot nul) is.

Alle twaalf monsters van de ringtest zijn geclassificeerd voor de parameters chlorofyl, celdichtheid, biovolume en microcystine, gemeten door alle deelnemende laboratoria volgens het onderstaande schema:

Advies		Geen risico		Waarschuwing		Niet zwemmen
chlorofyl [$\mu\text{g/L}$]		$< 12,5$		$\geq 12,5$		≥ 75
celdichtheid [cellen/ml]		< 50.000		≥ 50.000		≥ 300.000
biovolume [mm^3/L]		$< 2,5$		$\geq 2,5$		≥ 15
microcystine [$\mu\text{g/L}$]		< 10		≥ 10		≥ 20

3 Resultaten

3.1 Chlorofyl volgens NEN-6520

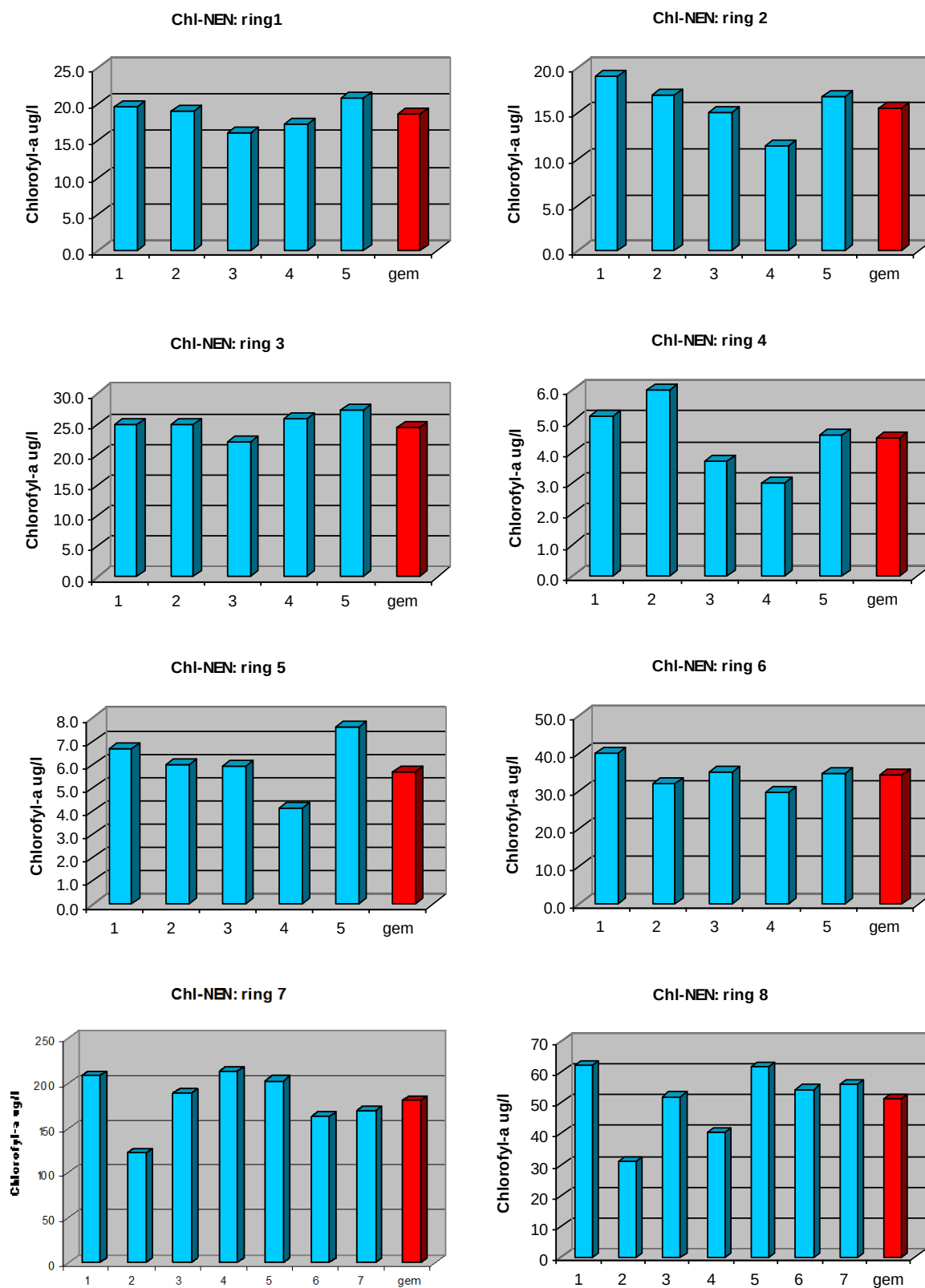
De resultaten van de chlorofylanalyses volgens NEN 6520 zijn weergegeven in Tabel 2 en Figuur 1.

Tabel 2: Resultaten chlorofyl-a volgens NEN 6520

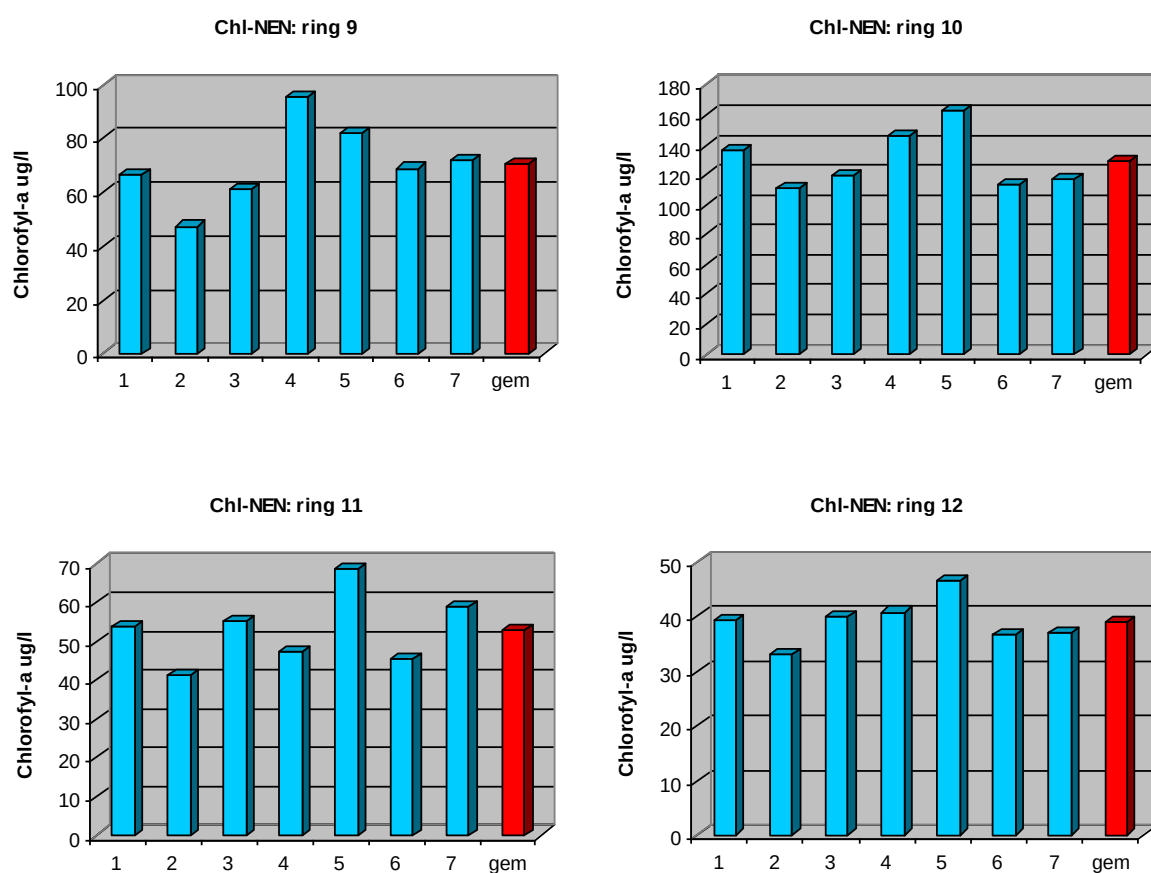
	Ring 1 Chlorofyl-a in µg/l	Ring 2 Chlorofyl-a in µg/l	Ring 3 Chlorofyl-a in µg/l	Ring 4 Chlorofyl-a in µg/l	Ring 5 Chlorofyl-a in µg/l	Ring 6 Chlorofyl-a in µg/l
Lab 1	19,6	19,0	25,0	5,2	6,7	40,1
Lab 2	19,0	17,0	25,0	6,0	6,0	32,0
Lab 3	16,0	15,0	22,0	3,7	5,9	35,0
Lab 4	17,3	11,4	25,9	3,0	4,1	29,6
Lab 5	20,9	16,8	27,3	4,6	7,6	34,8
gem	18,6	15,8	25,0	4,5	6,0	34,3
stdv	1,9	2,8	1,9	1,2	1,3	3,9
% stdv	10,4	18,0	7,8	26,3	21,1	11,4
max.	20,9	19,0	27,3	6,0	7,6	40,1
min.	16,0	11,4	22,0	3,0	4,1	29,6

	Ring 7 Chlorofyl-a in µg/l	Ring 8 Chlorofyl-a in µg/l	Ring 9 Chlorofyl-a in µg/l	Ring 10 Chlorofyl-a in µg/l	Ring 11 Chlorofyl-a in µg/l	Ring 12 Chlorofyl-a in µg/l
Lab 1	209,1	62,1	66,6	136,1	53,6	39,3
Lab 2	122,1	31,0	47,3	111	41,4	33,1
Lab 3	162,8	54,4	68,8	114	45,6	36,7
Lab 4	190	52	61	120	55	40
Lab 5	213,7	40,6	95,5	145,9	47,3	40,8
Lab 6	170,3	55,2	72,0	117,7	58,7	37,4
Lab 7	203,5	61,6	82,1	163,4	68,74	46,6
gem	183,5	50,3	70,2	131,7	51,9	39,4
stdv	35,2	12,2	16,7	20,5	9,6	4,4
%stdv	19,2	24,3	23,8	15,5	18,59	11,3
max.	213,7	62,1	95,5	163,4	68,7	46,6
min.	122,1	31,0	47,3	111,0	41,4	33,1

Figuur 1: Resultaten chlorofyl-a volgens NEN 6520; gemiddelde in rood



Figuur 1 (vervolg): Resultaten chlorofyl-a volgens NEN 6520; gemiddelde in rood



De verschillen in NEN-chlorofyl, gemeten door zeven laboratoria, zijn in het algemeen niet groot. De betrouwbaarheid van deze analyse lijkt daarom goed.

3.2 Cyano-chlorofyl met fluorescentie

De resultaten van de cyano-chlorofylanalyses met fluorescentie zijn weergegeven in Tabel 3 en Figuur 2.

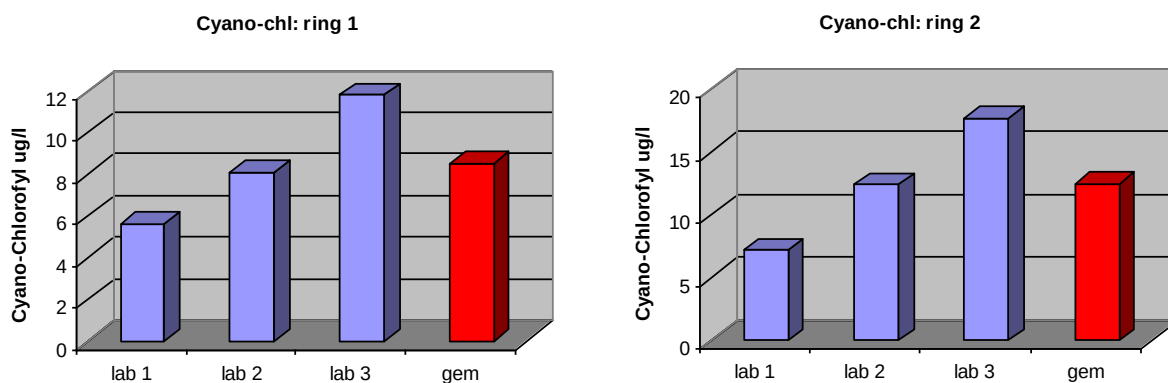
Tabel 3: Resultaten cyano-chlorofyl met Fluoroprobe (zonder NEN-correctie)

	Ring 1 Cyanochlorofyl µg/l	Ring 2 Cyanochlorofyl µg/l	Ring 3 Cyanochlorofyl µg/l	Ring 4 Cyanochlorofyl µg/l	Ring 5 Cyanochlorofyl µg/l	Ring 6 Cyanochlorofyl µg/l
Lab 1	5,6	7,2	5,4	2,2	2,6	19,2
Lab 2	8,1	12,4	7,6	2,6	3,2	23,9
Lab 3	11,8	17,7	14,5	3,2	18,8	28,7
QC*	7,9	10,2	5,4	2,7	2,9	20,0
mean	8,5	12,4	9,2	2,7	8,2	23,9
stdv	3,1	5,2	4,7	0,5	9,2	4,8
% stdv	36,7	42,2	51,5	19,7	112,1	19,8
max	11,8	17,7	14,5	3,2	18,8	28,7
min	5,6	7,2	5,4	2,2	2,6	19,2

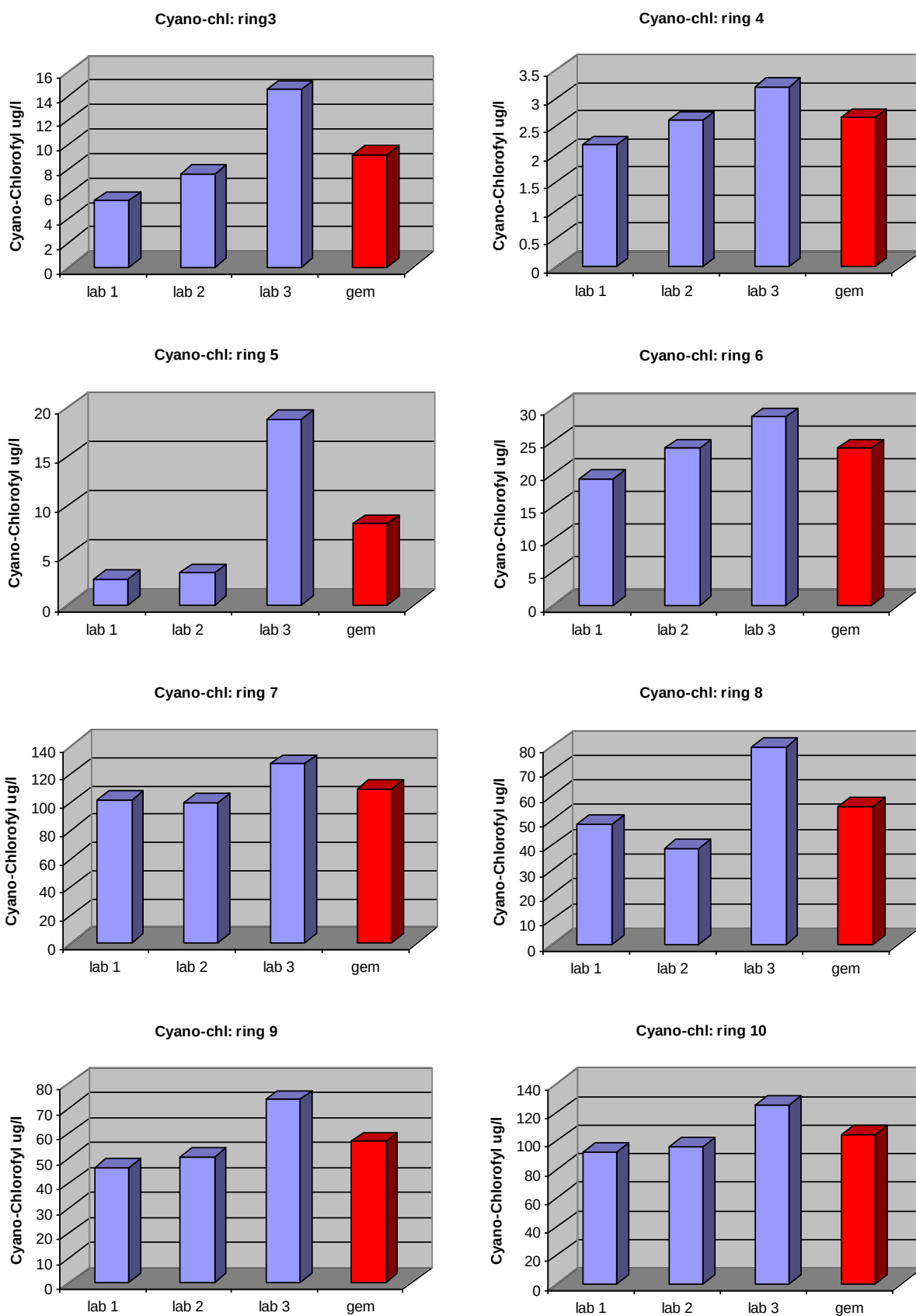
	Ring 7 Cyanochlorofyl µg/l	Ring 8 Cyanochlorofyl µg/l	Ring 9 Cyanochlorofyl µg/l	Ring 10 Cyanochlorofyl µg/l	Ring 11 Cyanochlorofyl µg/l	Ring 12 Cyanochlorofyl µg/l
Lab 1	101	48,5	46,2	92,3	36,8	16,1
Lab 2	99,5	38,8	50,6	96,2	35,8	13,9
Lab 3	126,8	79,7	73,7	125,4	48,1	22,6
QC*	86,6	42,0	45,2	75,5	26,5	9,8
mean	109,1	55,7	56,8	104,6	40,2	17,5
stdv	15,3	21,4	14,8	18,1	6,8	4,5
% stdv	14,1	38,4	26	17,3	17	25,8
max	126,8	79,7	73,7	125,4	48,1	22,6
min	99,5	38,8	46,2	92,3	35,8	13,9

*: Ter vergelijking zijn de gemiddelde waarden van de Fluoroprobe metingen toegevoegd, waarmee de kwaliteit van de homogenisatie werd gecontroleerd (QC). Deze waarden zijn niet meegenomen voor het bepalen van de gemiddelden en standaarddeviaties.

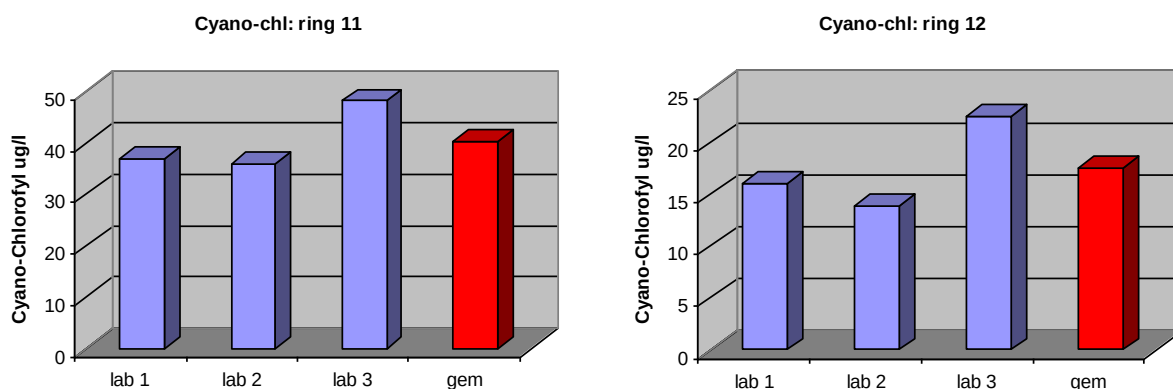
Figuur 2: Resultaten cyano-chlorofyl met Fluoroprobe (zonder NEN-correctie); gemiddelde in rood



Figuur 2 (vervolg): Resultaten cyano-chlorofyl met Fluoroprobe (zonder NEN-correctie); gemiddelde in rood



Figuur 2 (vervolg): Resultaten cyano-chlorofyl met Fluoroprobe (zonder NEN-correctie); gemiddelde in rood



De resultaten van lab 1 en 2 zijn over het algemeen goed vergelijkbaar, maar lab 3 geeft vaak afwijkende waarden, waardoor de spreiding van deze analyse groter wordt.

3.3 Microscopische quickscan

De resultaten van de microscopische quickscan in combinatie met cyano-chlorofylanalyses (Fluoroprobe) zijn weergegeven in Tabel 4.

Tabel 4: Resultaten microscopische quickscan

	Ring 1		Ring 2		Ring 3		Ring 4		Ring 5		Ring 6	
	Lab 1	Lab 2	Lab 1	Lab 2	Lab 1	Lab 2	Lab 1	Lab 2	Lab 1	Lab 2	Lab 1	Lab 2
% potentieel toxisch	71	0	68	0	100	0	83	0	100	0	100	100
% draadvormers	29	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0
% Coccalen		0	32	0	0	0	12	0	0	0	0	0
CyanoChl µg/l	15,6	0	23,7	0	14,6	0	5	0	6,1	0	45,8	19,2
CyanoChl Tox µg/l	15,5	0	16,1	0	14,6	0	5	0	6,1	0	45,8	19,2
Advies*												

	Ring 7		Ring 8		Ring 9		Ring 10		Ring 11		Ring 12	
	Lab 1	Lab 2	Lab 1	Lab 2	Lab 1	Lab 2	Lab 1	Lab 2	Lab 1	Lab 2	Lab 1	Lab 2
% potentieel toxisch	98	99	99	100	98	100	85	98	89	99	90	98
% draadvormers	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
% Coccalen	2	1	1	0	2	0	15	2	11	1	10	2
CyanoChl µg/l	190	101	74,3	48,5	96,6	46,2	184	92,3	68,7	36,8	26,7	16,1
CyanoChl Tox µg/l	190	101	74,3	48,5	96,6	46,2	184	92,3	68,7	36,8	26,7	16,1
Advies*												

*: Advies Geen risico Waarschuwing Niet zwemmen

De verschillen tussen de twee laboratoria worden vooral veroorzaakt, doordat lab 1 een NEN-correctie toepast door het chlorofylgehalte met een constante factor te vermenigvuldigen, terwijl lab 2 dat niet doet. Lab 2 meldde dat bij de analyse van enkele monsters (R7 t/m R11) met de fluoroprobe bij de kiezelwieren een gehalte van 0 µg/l werd gemeten, terwijl ze wel werden waargenomen met de microscoop. De kiezel-

wieren zaten vaak in Microcystiskolonies, maar kwamen ook vrij voor in de waterfase. Onbekend is wat de fluoroprobe met het signaal met de kiezelwieren heeft gedaan en of dit het cyano-signaal beïnvloedt.

3.4 Microscopische celdichtheid

De resultaten van de analyses van de microscopische celdichtheid giftige blauwalgen zijn weergegeven in Tabel 5 en Figuur 3.

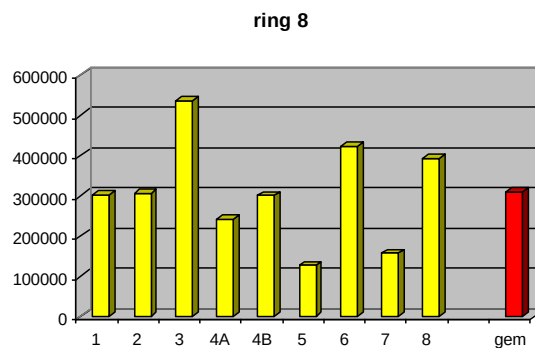
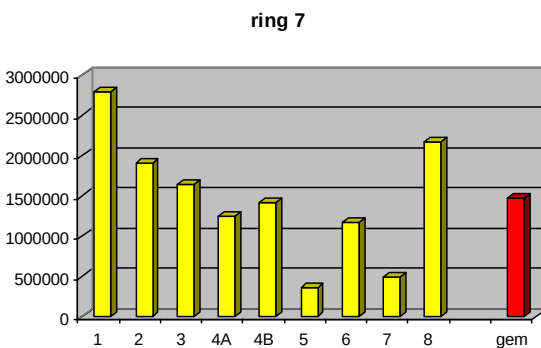
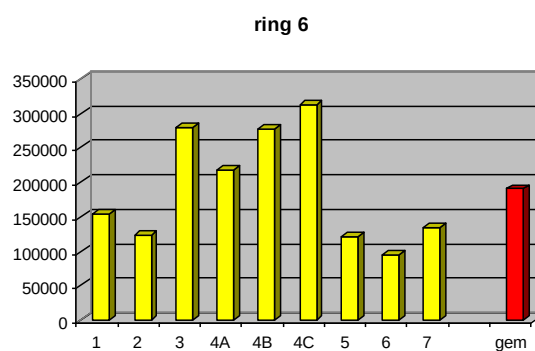
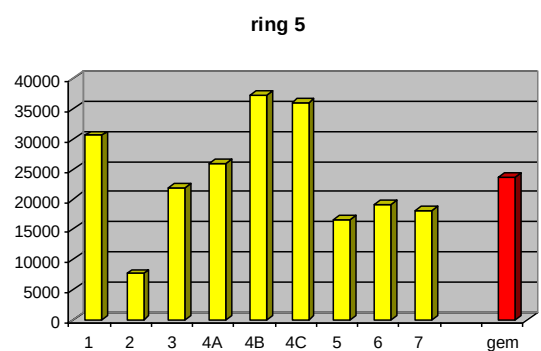
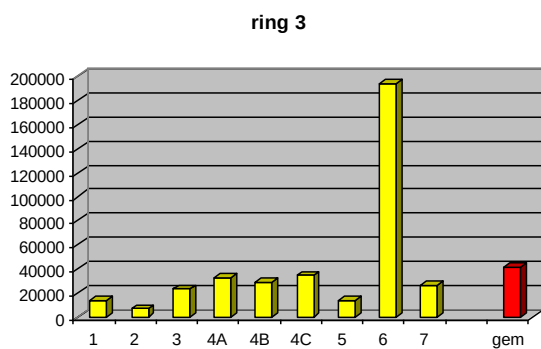
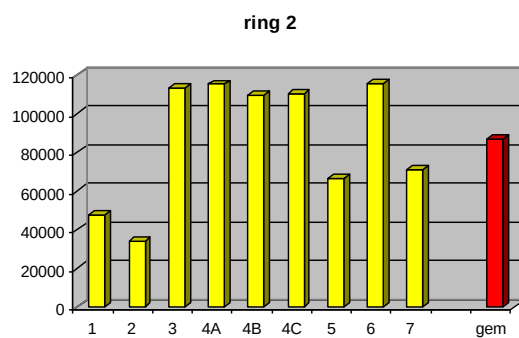
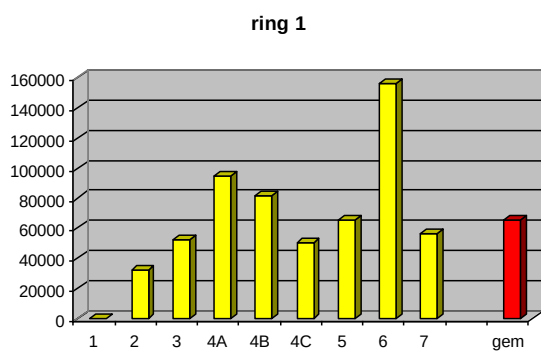
Tabel 5: Resultaten microscopische celdichtheid toxische genera

Aantal	Ring 1	Ring 2	Ring 3	Ring 4	Ring 5	Ring 6
Lab 1	359	47534	13618	21709	30550	154883
Lab 2	31896	33965	6961	8291	7651	123358
Lab 3	52259	113258	23203	21039	21928	279108
Lab 4A	94694	115131	32238	25516	25926	217559
Lab 4B	81389	109509	28966	21891	37241	277278
Lab 4C	50388	110075	34674	28577	35891	312092
Lab 5	65445	66496	14231	16680	16699	121350
Lab 6	156148	115575	193916	29859	19060	94622
Lab 7	55950	71019	26835	14172	18073	134142
gem	65392	86949	41627	20859	23669	190488
stdv	43573	32371	57862	6930	9662	82026
% stdv	66,6	37,2	139,0	36,8	42,5	42,8

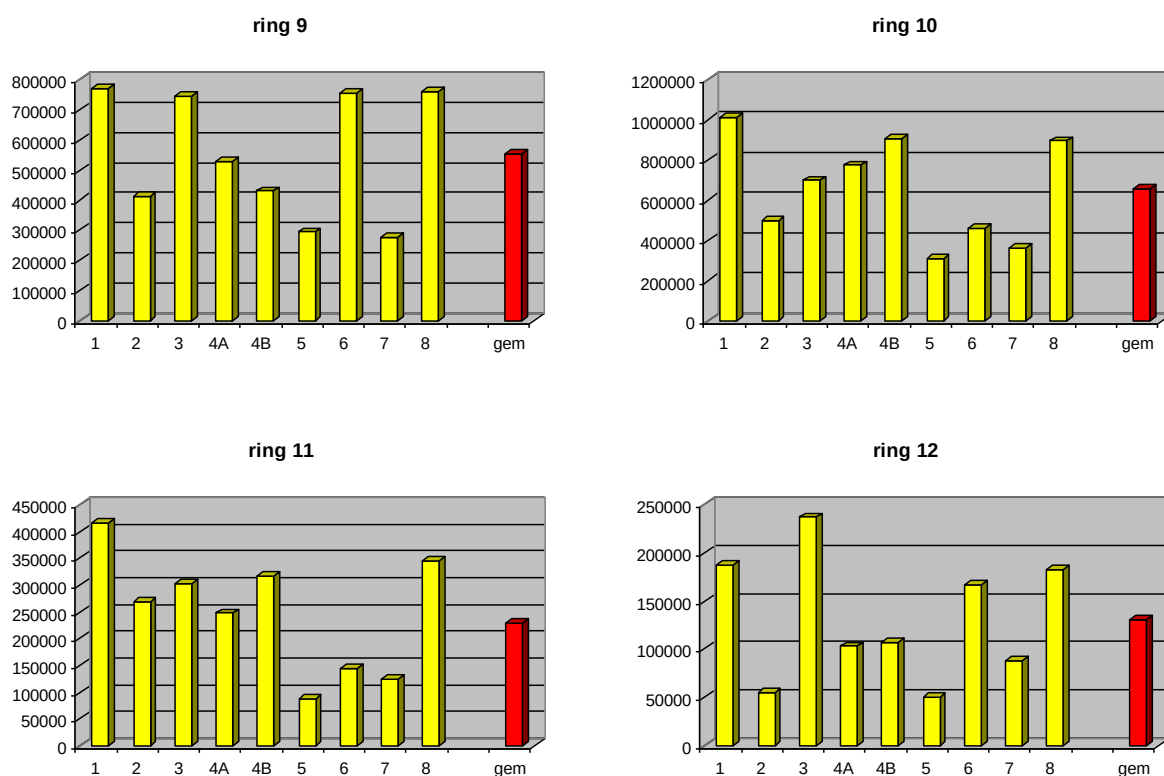
Aantal	Ring 7	Ring 8	Ring 9	Ring 10	Ring 11	Ring 12
Lab 1	2795463	302963	771947	1013775	357565	186862
Lab 2	1899613	304194	412267	495439	268256	54421
Lab 3	1646244	537000	745241	698000	303000	236675
Lab 4A	1250367	242473	527227	773333	247458	103113
Lab 4B	1416667	300000	430508	906667	316949	107486
Lab 5	356472	126037	294316	307032	86838	50137
Lab 6	1163052	422203	752855	458993	142671	166903
Lab 7	491012	156727	276993	359225	124988	88068
Lab 8	2166070	393551	759594	894173	344874	182517
gem	1464996	309461	552328	656293	229355	130687
stdv	774632	129023	207992	259215	123585	65007
% stdv	52,9	41,7	37,7	39,5	53,9	49,7

Laboratorium 4 heeft de monsters door meerdere analisten laten analyseren. Laboratorium 8 heeft alleen resultaten voor de tweede serie doorgegeven, omdat de monsters van serie 1 waren zoekgeraakt.

Figuur 3: Resultaten microscopische celdichtheid toxische genera; gemiddelde in rood



Figuur 3 (vervolg): Resultaten microscopische celdichtheid toxische genera; gemiddelde in rood



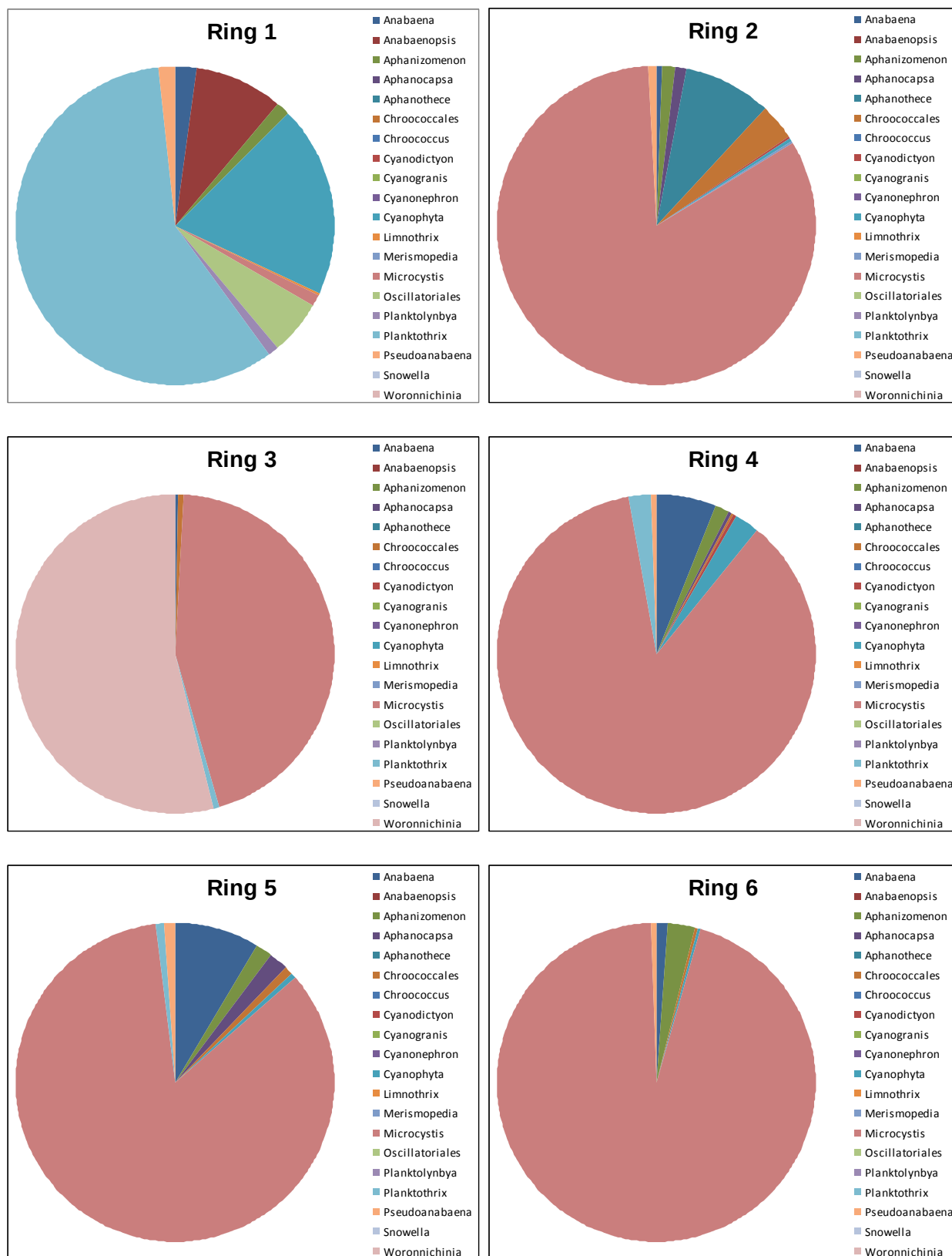
Er worden zeer grote spreidingen gevonden in de microscopisch bepaalde celdichtheid op verschillende laboratoria, zowel in aantallen cellen als in aantal waargenomen geslachten. Het aantal genera dat door de verschillende laboratoria werd gerapporteerd is weergegeven in Tabel 6.

Tabel 6: Aantal gerapporteerde genera per monster

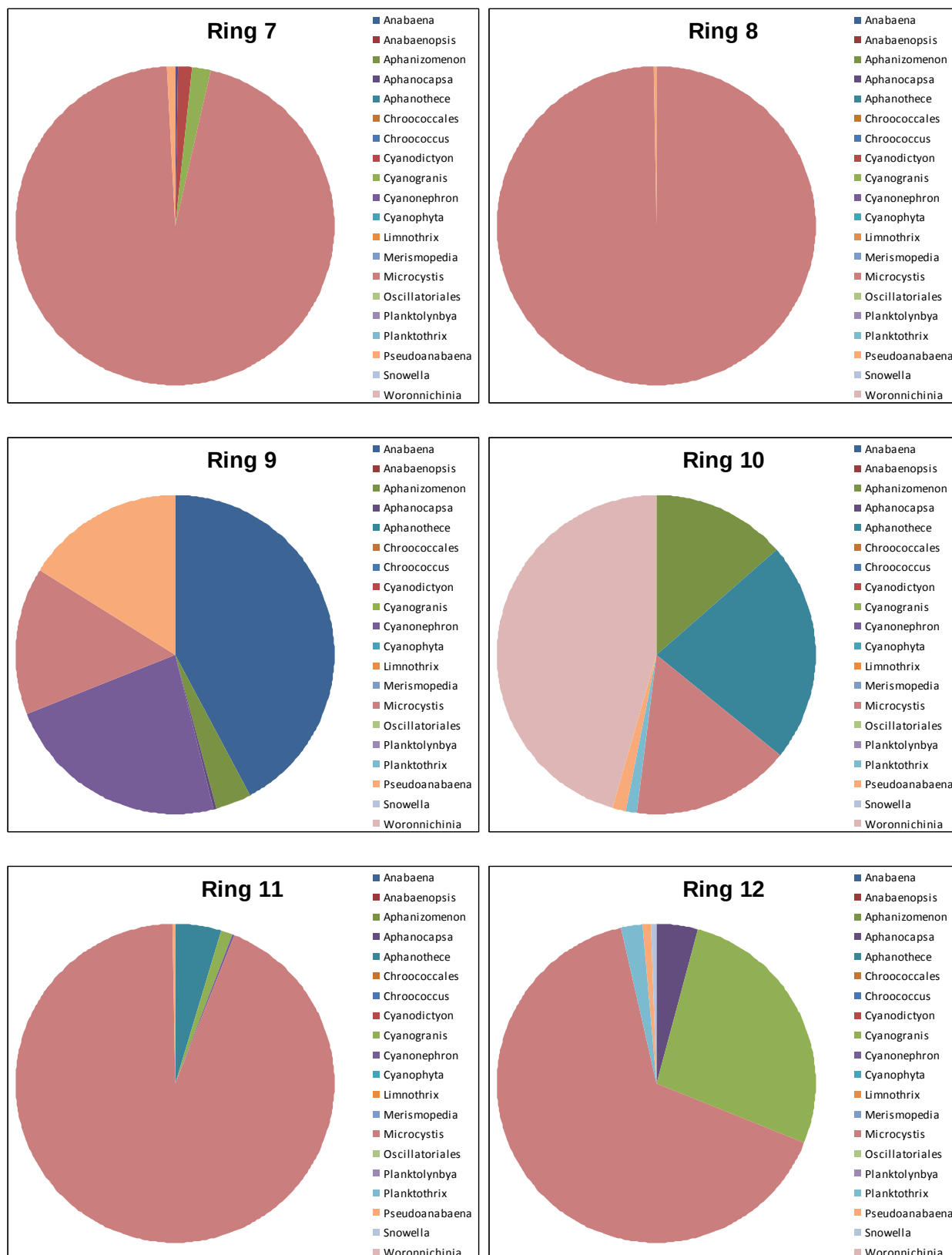
Aantal genera	Ring 1	Ring 2	Ring 3	Ring 4	Ring 5	Ring 6
Lab 1	5	11	2	6	8	4
Lab 2	5	3	3	3	3	3
Lab 3	4	4	2	4	3	3
Lab 4A	5	4	3	4	4	3
Lab 4B	4	4	2	3	3	3
Lab 4C	5	5	6	5	5	6
Lab 5	3	3	1	3	3	3
Lab 6	8	6	4	5	4	5
Lab 7	3	2	3	2	3	3
Aantal genera	Ring 7	Ring 8	Ring 9	Ring 10	Ring 11	Ring 12
Lab 1	10	3	9	5	5	3
Lab 2	1	1	1	1	1	1
Lab 3	5	2	4	2	2	4
Lab 4A	3	2	3	1	1	6
Lab 4B	1	1	1	1	1	1
Lab 5	1	1	2	1	1	2
Lab 6	3	2	1	3	2	4
Lab 7	1	1	1	1	1	2
Lab 8	4	3	1	1	1	2

De gemiddeld waargenomen samenstelling van de blauwalgen genera (genera of geslachten) in de verschillende monsters zijn weergegeven in Figuur 4.

Figuur 4: Gevonden genera per monster



Figuur 4 (vervolg): Gevonden genera per monster



3.5 Microscopisch biovolume

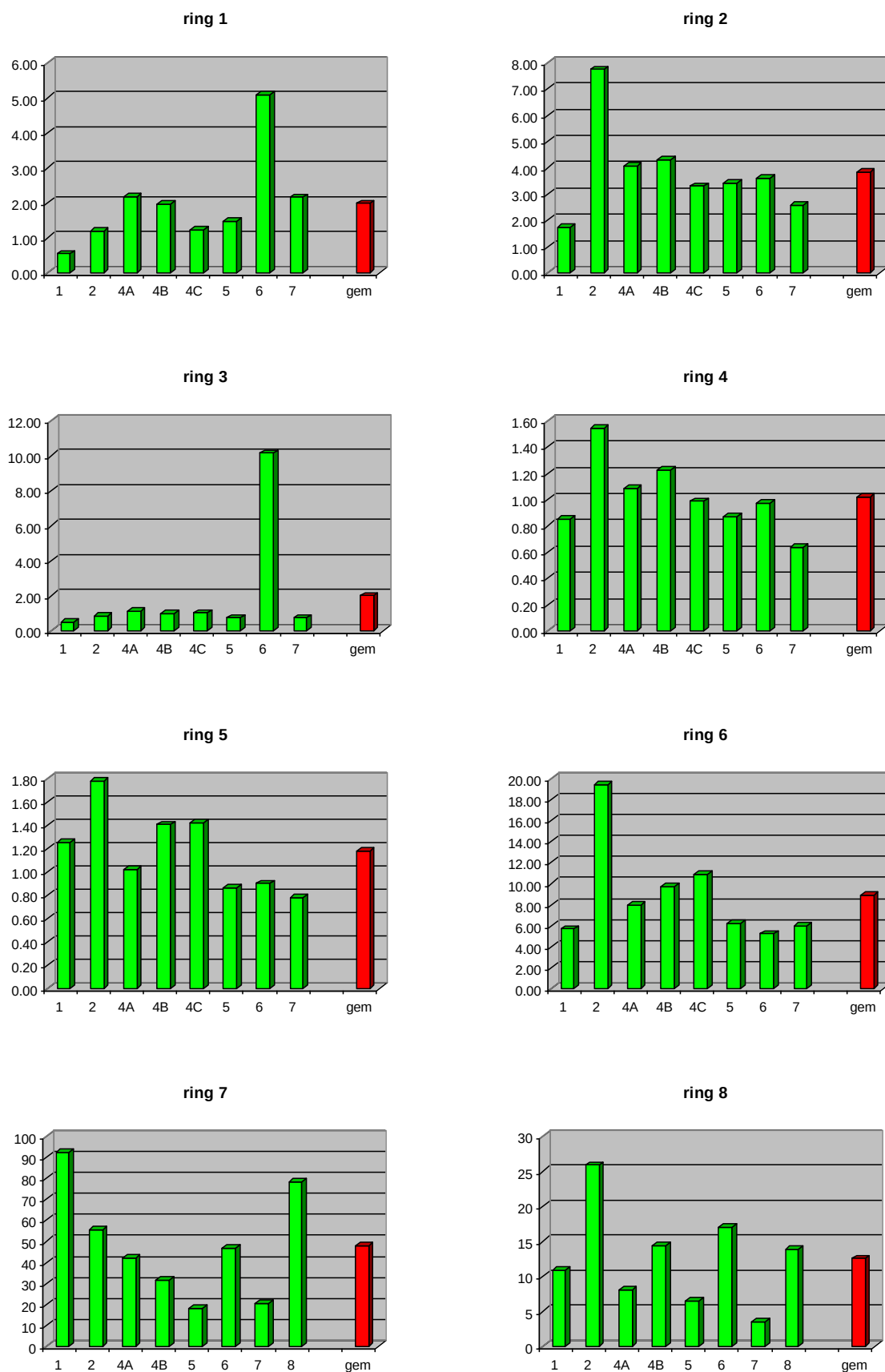
De resultaten van het microscopisch bepaalde biovolume van de giftige blauwalgen zijn weergegeven in Tabel 7 en Figuur 5.

Tabel 7: Resultaten microscopisch bepaald biovolume toxische genera

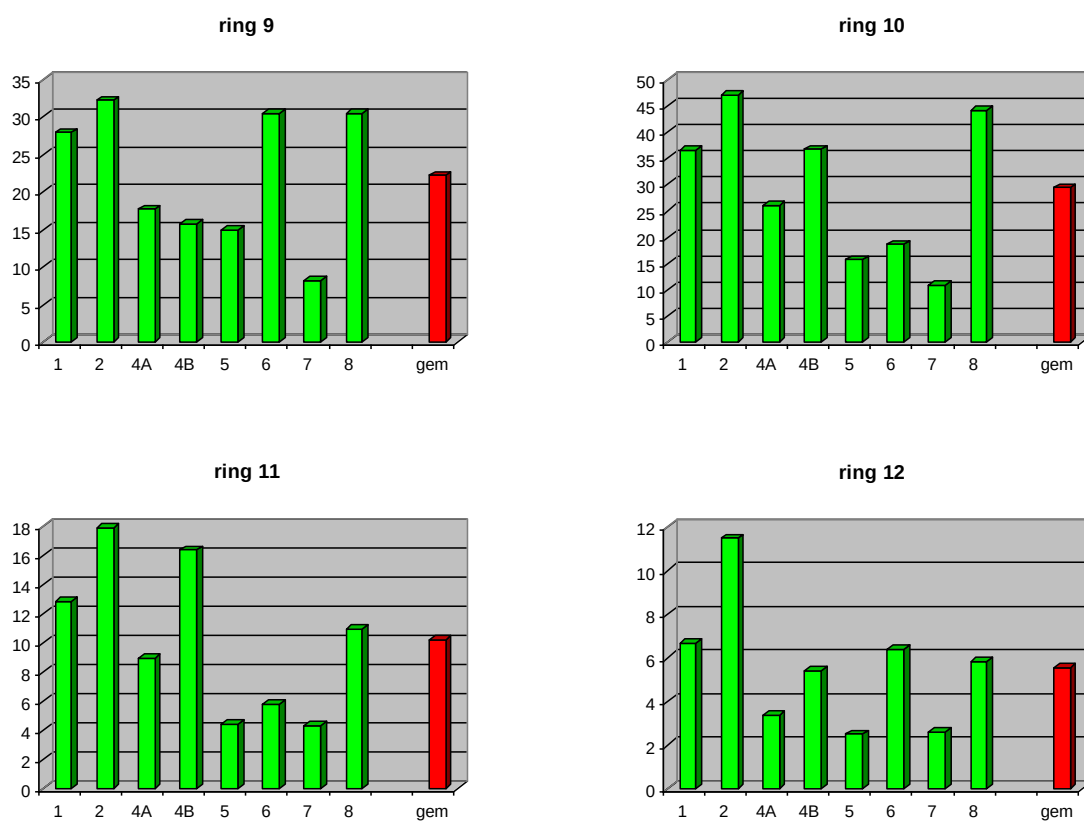
Biovolume [mm ³ /L]	Ring 1	Ring 2	Ring 3	Ring 4	Ring 5	Ring 6
Lab 1	0,54	1,72	0,50	0,85	1,26	5,66
Lab 2	1,21	7,75	0,85	1,54	1,78	19,3
Lab 4A	2,16	4,06	1,09	1,09	1,02	7,97
Lab 4B	1,98	4,31	0,96	1,23	1,41	9,66
Lab 4C	1,24	3,30	1,01	0,99	1,42	10,8
Lab 5	1,48	3,41	0,73	0,87	0,86	6,24
Lab 6	5,08	3,60	10,1	0,97	0,90	5,19
Lab 7	2,16	2,59	0,74	0,64	0,78	5,96
gem	1,98	3,84	2,00	1,02	1,18	8,86
stdv	1,37	1,78	3,29	0,27	0,35	4,71
% stdv	69,1	46,3	164,5	26,7	29,3	53,1

Biovolume [mm ³ /L]	Ring 7	Ring 8	Ring 9	Ring 10	Ring 11	Ring 12
Lab 1	92,3	10,9	27,9	36,5	12,8	6,64
Lab 2	55,3	25,8	32,2	47,0	17,8	11,4
Lab 4A	42,1	8,13	17,7	25,9	8,9	3,37
Lab 4B	31,7	14,4	15,7	36,6	16,3	5,41
Lab 5	18,1	6,43	15,0	15,6	4,4	2,49
Lab 6	46,7	17,1	30,4	18,5	5,7	6,37
Lab 7	20,6	3,52	8,1	10,7	4,3	2,58
Lab 8	78,2	13,9	30,5	44,0	10,9	5,83
gem	48,1	10,8	22,2	29,4	10,1	5,52
stdv	26,3	8,24	9,1	13,6	5,2	2,93
% stdv	54,8	76,3	41,0	46,3	51,7	53,0

Figuur 5: Resultaten microscopisch bepaald biovolume toxische genera; gemiddelde in rood



Figuur 5 (vervolg): Resultaten microscopisch bepaald biovolume toxische genera; gemiddelde in rood



Net als bij de microscopisch bepaalde celdichtheid worden ook bij de berekende biovolumina zeer grote spreidingen waargenomen. Zoals verwacht blijkt het microscopische onderzoek dus erg foutgevoelig te zijn.

3.6 Microcystine

De resultaten van de microcystine-analyses met ELISA, PP2A-bioassay (MC/LR-equivalenten), chemische LC/MS-analyse, PCR-microcystine synthetasegen (serie 2) zijn weergegeven in respectievelijk de Tabellen 8, 9, 10 en 11 en in Figuur 3.

Tabel 8: Microcystine gemeten met ELISA

	Ring 1 Microcystine µg/l	Ring 2 Microcystine µg/l	Ring 3 Microcystine µg/l	Ring 4 Microcystine µg/l	Ring 5 Microcystine µg/l	Ring 6 Microcystine µg/l
Lab 1	2,2	3,5	1,9	2,3	2,1	6,6
Lab 2	1,2	2,9	0,9	0,9	0,9	5,8
Mean	1,7	3,2	1,4	1,6	1,5	6,2
stdv	0,7	0,4	0,7	1,0	0,8	0,6
%stdv	41,0	13,3	50,5	60,6	55,7	8,9
	ring 7 Microcystine µg/l	ring 8 Microcystine µg/l	ring 9 Microcystine µg/l	ring 10 Microcystine µg/l	ring 11 Microcystine µg/l	ring 12 Microcystine µg/l
Lab 1	17,5	0,9	1,4	1,2	2,7	0,9
Lab 2	26,3	0,9	0,9	1,2	2,3	0,4
Mean	21,9	0,9	1,2	1,2	2,5	0,6
stdv	6,2	0,0	0,4	0,0	0,2	0,4
%stdv	28,5	1,6	32,6	0,5	9,7	59,8

Tabel 9: Microcystine-equivalenten met PP2A-bioassay

	Ring 1 Microcystine µg/l	Ring 2 Microcystine µg/l	Ring 3 Microcystine µg/l	Ring 4 Microcystine µg/l	Ring 5 Microcystine µg/l	Ring 6 Microcystine µg/l
Lab 1	2,0	3,0	2,7	2,6	2,5	7,4
	Ring 7 Microcystine µg/l	Ring 8 Microcystine µg/l	Ring 9 Microcystine µg/l	Ring 10 Microcystine µg/l	Ring 11 Microcystine µg/l	Ring 12 Microcystine µg/l
Lab 1	32	1,1	1,6	1,7	1,6	<1

Tabel 10: Totaal microcystine met LC/MS

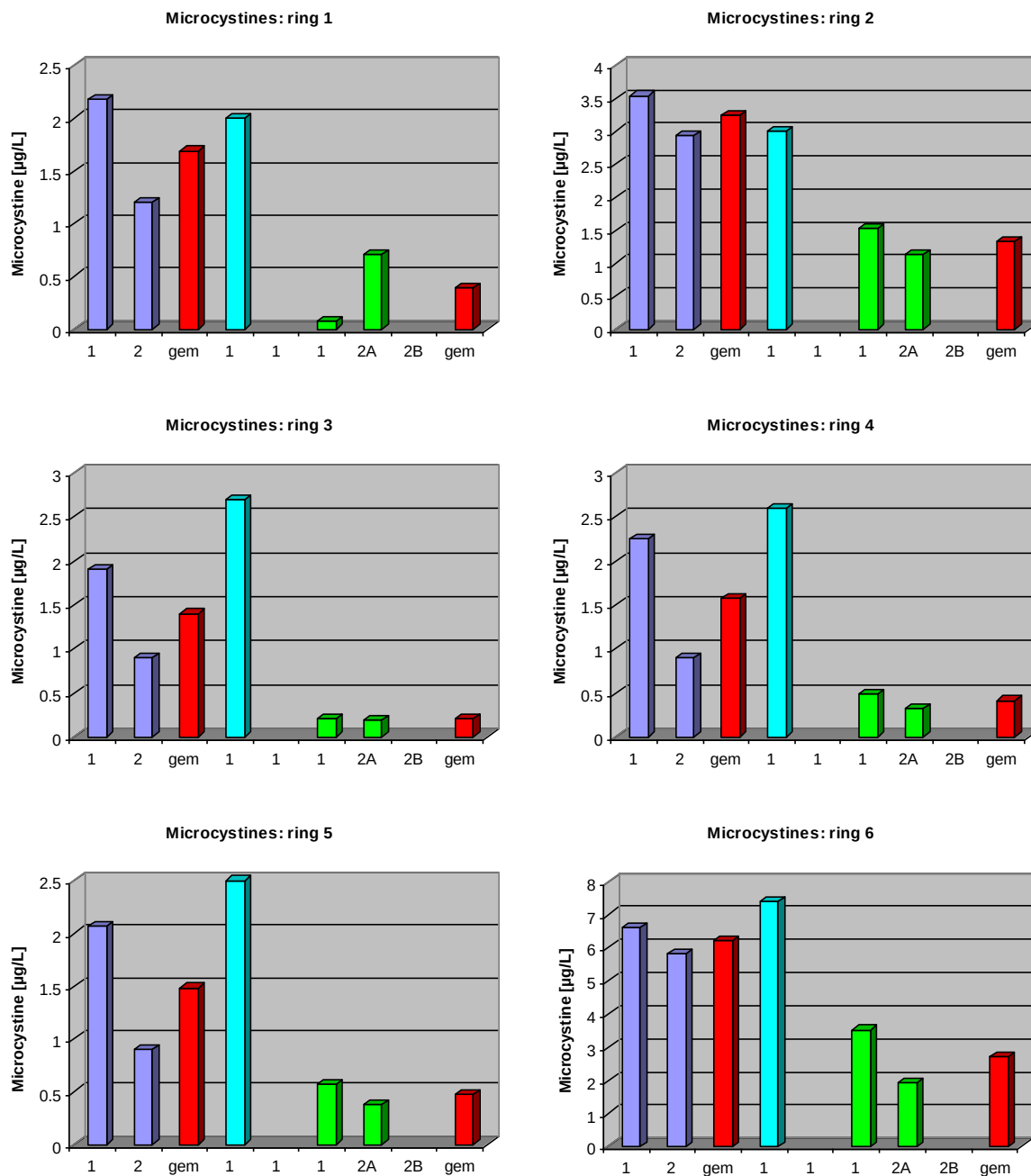
	Ring 1 Microcystine µg/l	Ring 2 Microcystine µg/l	Ring 3 Microcystine µg/l	Ring 4 Microcystine µg/l	Ring 5 Microcystine µg/l	Ring 6 Microcystine µg/l
Lab 1	0,1	1,5	0,2	0,5	0,6	3,5
Lab 2	0,7	1,1	0,2	0,3	0,4	1,9
Mean	0,4	1,3	0,2	0,4	0,5	2,7
stdv	0,45	0,27	0,01	0,12	0,14	1,14
% stdv	116,2	20,6	7,1	28,8	29,6	42,1

	Ring 7 Microcystine µg/l	Ring 8 Microcystine µg/l	Ring 9 Microcystine µg/l	Ring 10 Microcystine µg/l	Ring 11 Microcystine µg/l	Ring 12 Microcystine µg/l
Lab 1	12,7	0,0	1,6	1,3	1,8	0,0
Lab 2A	26,0	1,0	0,6	0,9	1,7	0,4
Lab 2B	26,0	0,8	0,4	0,8	1,4	0,3
Mean	21,6	0,6	0,9	1,0	1,6	0,2
stdv	7,7	0,5	0,6	0,2	0,2	0,2
% stdv	35,6	83,7	74,1	23,8	12,8	81,2

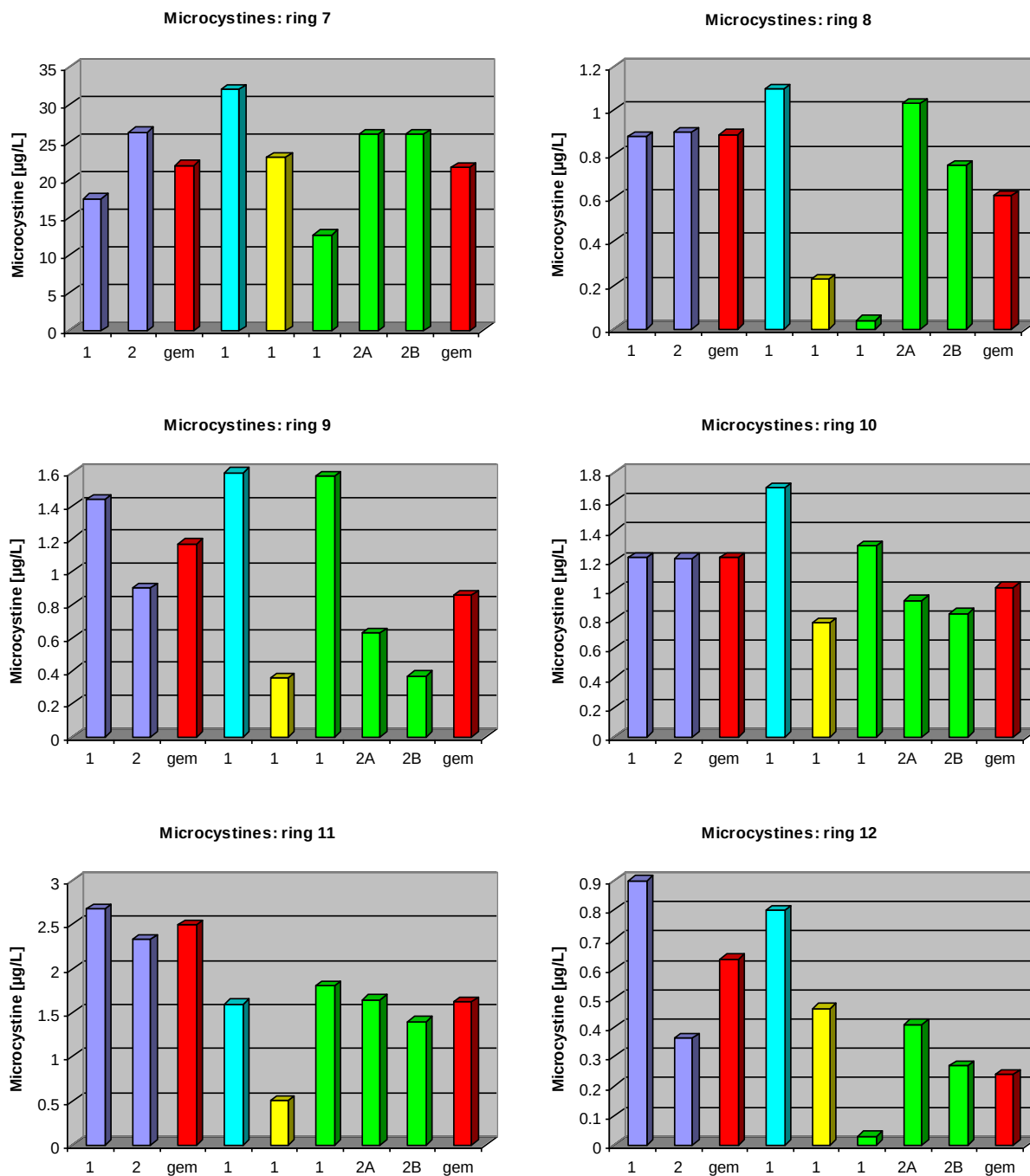
Tabel 11: Microcystine-toxine synthetasegen met PCR (polymerase-kettingreactie)

	Ring 7 Genkopieën/ml	Ring 8 Genkopieën/ml	ring 9 Genkopieën/ml	Ring 10 Genkopieën/ml	Ring 11 Genkopieën/ml	Ring 12 Genkopieën/ml
Lab 1	1379966	13693	21432	46596	30135	27929

Figuur 6: Resultaten diverse microcystine-analyses; paars = ELISA; blauw = PP2A-bioassays (MC-equivalenten); geel = PCR (MC-genkopieën/60.000); groen = LC/MS; gemiddelden ELISA en LC/MS in rood



Figuur 6 (vervolg): Resultaten diverse microcystine-analyses; paars = ELISA; blauw = PP2A bioassays (MC-equivalenten); geel = PCR (MC-genkopieën/60.000); groen = LC/MS; gemiddelden ELISA en LC/MS in rood



Het principe van de drie microcystine-analyses is zeer verschillend: herkenning van de microcystinestructuur met antilichamen (ELISA), het remmende effect van microcystines op de fosfatase-reactie (PP2A), de chemische analyse van verschillende MC-congeneren en de aanwezigheid van DNA fragmenten van het gen dat verantwoordelijk is voor de productie van microcystine. Ondanks de duidelijke verschillen zijn ook overeenkomsten te zien. De PP2A-bioassay is vrij goed vergelijkbaar met het met ELISA gemeten microcystine. In de eerste serie waren de met LC/MS bepaalde gehalten een stuk lager, maar in de tweede serie lagen de gemiddelden van deze gehalten meer in de buurt van de ELISA- en PP2A-resultaten. De met PCR bepaalde hoeveelheid kopieën van het microcystine-gen (Tabel 11) vertoonden een redelijk goede correlatie met de chemisch bepaalde microcystineconcentraties.

3.7 Diversen

De resultaten van de overige uitgevoerde analyses zijn weergegeven in Tabel 12 (Analyses overige toxinen) en Tabel 13 (remote sensing met WISP, serie 1).

Tabel 12: Analyses overige cyanotoxines met LC/MS

	Ring 1 Anatoxine µg/l	Ring 2 Anatoxine µg/l	Ring 3 Anatoxine µg/l	Ring 4 Anatoxine µg/l	Ring 5 Anatoxine µg/l	Ring 6 Anatoxine µg/l
Lab 1	0,003	0,01	0,108	0,005	0,008	0,001
Lab 2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Ring 7 Anatoxine µg/l	Ring 8 Anatoxine µg/l	Ring 9 Anatoxine µg/l	Ring 10 Anatoxine µg/l	Ring 11 Anatoxine µg/l	Ring 12 Anatoxine µg/l
Lab 2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04
	Ring 1 Saxitoxine µg/l	Ring 2 Saxitoxine µg/l	Ring 3 Saxitoxine µg/l	Ring 4 Saxitoxine µg/l	Ring 5 Saxitoxine µg/l	Ring 6 Saxitoxine µg/l
Lab 2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Ring 7 Saxitoxine µg/l	Ring 8 Saxitoxine µg/l	Ring 9 Saxitoxine µg/l	Ring 10 Saxitoxine µg/l	Ring 11 Saxitoxine µg/l	Ring 12 Saxitoxine µg/l
Lab 2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Ring 1 Cylindrospermopsine µg/l	Ring 2 Cylindrospermopsine µg/l	Ring 3 Cylindrospermopsine µg/l	Ring 4 Cylindrospermopsine µg/l	Ring 5 Cylindrospermopsine µg/l	Ring 6 Cylindrospermopsine µg/l
Lab 2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Ring 7 Cylindrospermopsine µg/l	Ring 8 Cylindrospermopsine µg/l	Ring 9 Cylindrospermopsine µg/l	Ring 10 Cylindrospermopsine µg/l	Ring 11 Cylindrospermopsine µg/l	Ring 12 Cylindrospermopsine µg/l
Lab 2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabel 13: Remote sensing chlorofyl met WISP

	Locatie 1 Chlorofyl µg/l	Locatie 2 Chlorofyl µg/l	Locatie 3 Chlorofyl µg/l	Locatie 4 Chlorofyl µg/l	Locatie 5 Chlorofyl µg/l	Locatie 6 Chlorofyl µg/l
Lab 1	nb*	10.6	48.3	nb*	nb*	nb*

*: nb = niet goed te bepalen in verband met bewolking.

4 Beoordeling van de resultaten

Om de afwijkingen met de gemiddelden van de ringtest te bepalen zijn de Z-waarden bepaald voor de laboratoria die NEN-chlorofyl, cyano-chlorofyl, celdichtheid en/of biovolume hebben geanalyseerd. Deze waarden zijn voor alle monsters weergegeven in de Tabellen 13-16.

Tabel 13: Z-waarden chlorofyl met NEN 6520

	Ring 1	Ring 2	Ring 3	Ring 4	Ring 5	Ring 6
Lab 1	0,5	1,1	0,0	0,6	0,5	1,5
Lab 2	0,2	0,4	0,0	1,3	0,0	-0,6
Lab 3	-1,3	-0,3	-1,6	-0,7	-0,1	0,2
Lab 4	-0,7	-1,6	0,4	-1,3	-1,5	-1,2
Lab 5	1,2	0,3	1,2	0,1	1,2	0,1
	Ring 7	Ring 8	Ring 9	Ring 10	Ring 11	Ring 12
Lab 1	0,9	1,0	-0,3	0,3	0,1	0,0
Lab 2	-1,8	-1,8	-1,5	-1,0	-1,3	-1,4
Lab 3	-0,6	0,3	-0,1	-0,8	-0,8	-0,6
Lab 4	0,3	0,1	-0,6	-0,5	0,2	0,2
Lab 5	1,0	-0,9	1,6	0,8	-0,6	0,4
Lab 6	-0,4	0,4	0,1	-0,6	0,6	-0,4
Lab 7	0,7	0,9	0,8	1,7	1,7	1,8

Tabel 14: Z-waarden cyano-chlorofyl met fluorescentie

	Ring 1	Ring 2	Ring 3	Ring 4	Ring 5	Ring 6
Lab 1	-0,9	-1,0	-0,8	-0,9	-0,6	-1,0
Lab 2	-0,1	0,0	-0,3	-0,1	-0,5	0,0
Lab 3	1,1	1,0	1,1	1,0	1,2	1,0
	Ring 7	Ring 8	Ring 9	Ring 10	Ring 11	Ring 12
Lab 1	-0,5	-0,3	-0,7	-0,7	-0,5	-0,3
Lab 2	-0,6	-0,8	-0,4	-0,5	-0,6	-0,8
Lab 3	1,2	1,1	1,1	1,1	1,2	1,1

Tabel 15: Z-waarden microscopisch bepaalde celdichtheid

Z-waarde	Ring 1	Ring 2	Ring 3	Ring 4	Ring 5	Ring 6
Lab 1	-1,49	-1,22	-0,48	0,12	0,71	-0,43
Lab 2	-0,77	-1,64	-0,60	-1,81	-1,66	-0,82
Lab 3	-0,30	0,81	-0,32	0,03	-0,18	1,08
Lab 4A	0,67	0,87	-0,16	0,67	0,23	0,33
Lab 4B	0,37	0,70	-0,22	0,15	1,40	1,06
Lab 4C	-0,34	0,71	-0,12	1,11	1,27	1,48
Lab 5	0,00	-0,63	-0,47	-0,60	-0,72	-0,84
Lab 6	2,08	0,88	2,63	1,30	-0,48	-1,17
Lab 7	-0,22	-0,49	-0,26	-0,96	-0,58	-0,69

Tabel 15 (vervolg): Z-waarden microscopisch bepaalde celdichtheid

Z-waarde	Ring 7	Ring 8	Ring 9	Ring 10	Ring 11	Ring 12
Lab 1	1,72	-0,05	1,06	1,38	1,04	0,86
Lab 2	0,56	-0,04	-0,67	-0,62	0,31	-1,17
Lab 3	0,23	1,76	0,93	0,16	0,60	1,63
Lab 4A	-0,28	-0,52	-0,12	0,45	0,15	-0,42
Lab 4B	-0,06	-0,07	-0,59	0,97	0,71	-0,36
Lab 5	-1,43	-1,42	-1,24	-1,35	-1,15	-1,24
Lab 6	-0,39	0,87	0,96	-0,76	-1,74	0,56
Lab 7	-1,26	-1,18	-1,32	-1,15	-0,84	-0,66
Lab 8	0,91	0,65	1,00	0,92	0,93	0,80

Tabel 16: Z-waarden microscopisch bepaald biovolume

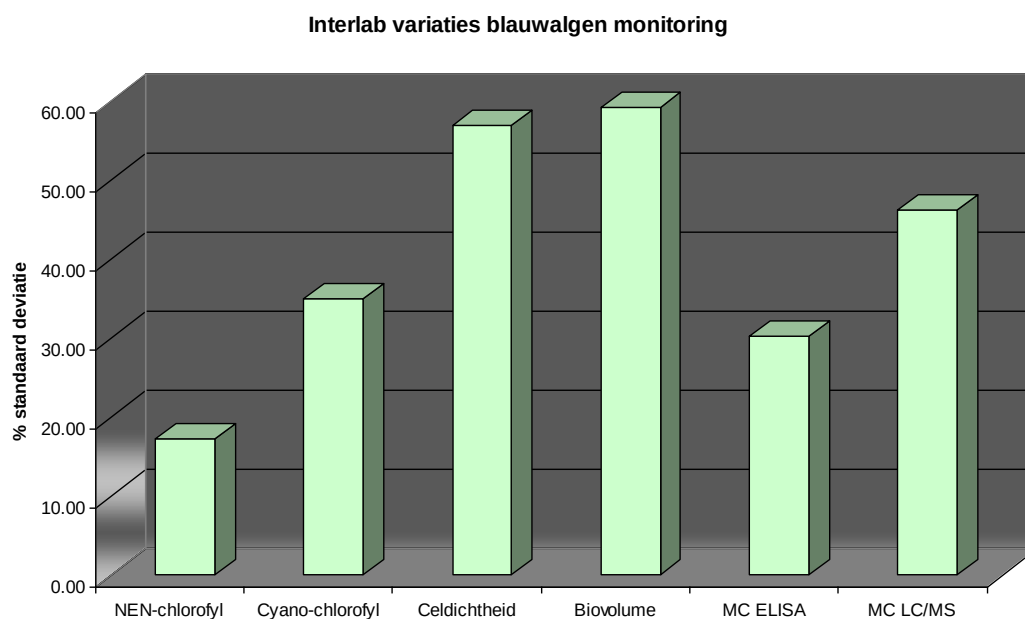
Z-waarde	Ring 1	Ring 2	Ring 3	Ring 4	Ring 5	Ring 6
Lab 1	-1,05	-1,19	-0,46	-0,63	0,23	-0,68
Lab 2	-0,57	2,20	-0,35	1,91	1,74	2,24
Lab 4A	0,13	0,12	-0,28	0,24	-0,45	-0,19
Lab 4B	0,00	0,26	-0,32	0,75	0,65	0,17
Lab 4C	-0,54	-0,30	-0,30	-0,12	0,70	0,42
Lab 5	-0,37	-0,24	-0,39	-0,56	-0,91	-0,56
Lab 6	2,26	-0,14	2,47	-0,19	-0,81	-0,78
Lab 7	0,13	-0,70	-0,38	-1,40	-1,15	-0,62
Z-waarde	Ring 7	Ring 8	Ring 9	Ring 10	Ring 11	Ring 12
Lab 1	1,67	0,01	0,63	0,52	0,51	0,38
Lab 2	0,27	1,83	1,10	1,30	1,46	2,03
Lab 4A	-0,23	-0,32	-0,50	-0,26	-0,24	-0,73
Lab 4B	-0,62	0,44	-0,71	0,53	1,17	-0,04
Lab 5	-1,14	-0,53	-0,79	-1,01	-1,09	-1,04
Lab 6	-0,06	0,76	0,90	-0,80	-0,84	0,29
Lab 7	-1,04	-0,88	-1,54	-1,37	-1,12	-1,00
Lab 8	1,14	-1,31	0,92	1,08	0,15	0,11

Bij de microscopisch bepaalde celdichtheid vallen enkele metingen van lab 6 in de categorie 'twijfelachtige waarde' ($2 < |Z| < 3$) en bij het biovolume vallen enkele metingen van de labs 2 en 6 in deze categorie. Er zijn geen metingen gevonden die vallen in de categorie 'niet-acceptabele waarde' ($|Z| > 3$). Het feit dat in het algemeen vooral 'acceptabele waarden' zijn gerapporteerd wil echter niet zeggen dat alle analysesresultaten erg nauwkeurig zijn. De Z-waarden zullen namelijk lager zijn bij hogere standaarddeviaties (stdv) van de waarden van de verschillende laboratoria en geven daarom een vertekend beeld. De (vaak zeer hoge) standaarddeviaties van de verschillende analyses, weergegeven in Tabel 17 en Figuur 7, geven een beter beeld van de kwaliteit van de analyses.

Tabel 17: Procentuele standaarddeviaties van de analyses die door meerdere laboratoria zijn uitgevoerd

	Ring 1	Ring 2	Ring 3	Ring 4	Ring 5	Ring 6
NEN-chlorofyl	10,4	18,0	7,8	26,3	21,1	11,4
Cyano-chlorofyl	36,7	42,2	51,5	19,7	112,1	19,8
Celdichtheid	66,6	37,2	139,0	36,8	42,5	42,8
Biovolume	69,1	46,3	164,5	26,7	29,3	53,1
MC ELISA	41,0	13,3	50,5	60,6	55,7	8,9
MC LC/MS	116,2	20,6	7,1	28,8	29,6	42,1
	Ring 7	Ring 8	Ring 9	Ring 10	Ring 11	Ring 12
NEN-chlorofyl	19,2	24,3	23,8	15,5	18,5	11,3
Cyano-chlorofyl	14,1	38,4	26	17,3	17	25,8
Celdichtheid	52,9	41,7	37,7	39,5	53,9	49,7
Biovolume	54,8	76,3	41,0	46,3	51,7	53,0
MC ELISA	28,5	1,6	32,6	0,5	9,7	59,8
MC LC/MS	35,6	83,7	74,1	23,8	12,8	81,2

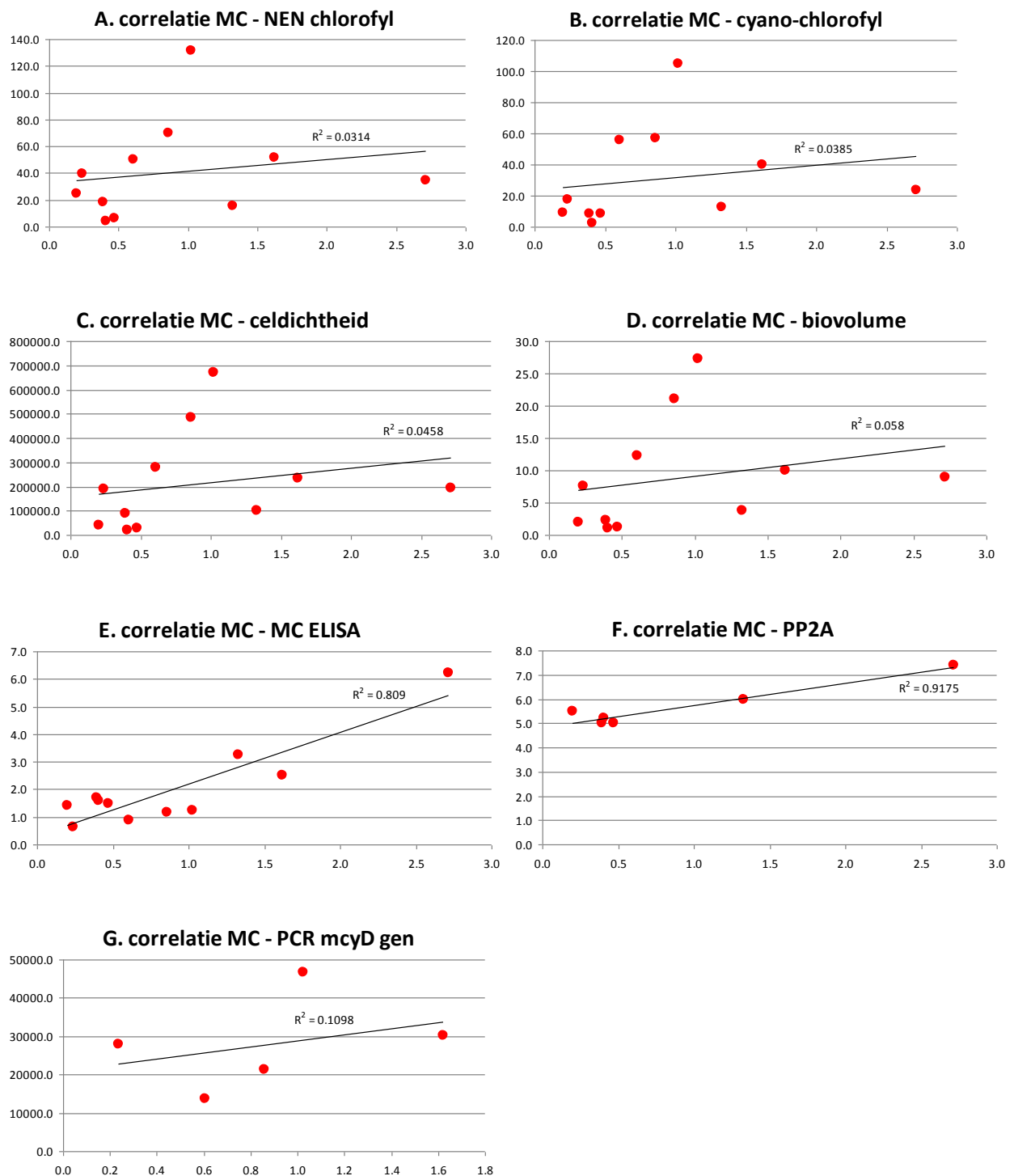
Figuur 7: Gemiddelde procentuele standaarddeviaties van de analyses die door meerdere laboratoria zijn uitgevoerd



Uit de gemiddelde standaardafwijkingen blijkt dat vooral de microscopische en de chemische analyses slecht reproduceerbaar zijn tussen de verschillende laboratoria. De chemische analyses werden echter maar door twee laboratoria uitgevoerd, die vooral in de monsters met microcystinegehalten dichtbij de detectiegrens zeer grote afwijkingen te zien gaven. De resultaten van de NEN-chlorofylanalyses waren gemiddeld het best vergelijkbaar tussen de verschillende laboratoria, gevolgd door de microcystine ELISA- en cyano-chlorofylanalyses.

De correlaties tussen de gemiddelden van de chemisch bepaalde totale microcystinegehalten (twee labs) en de overige parameters zijn weergegeven in Figuur 8.

Figuur 8: Correlaties tussen chemisch bepaald totaal-microcystine (MC) en overige parameters



Om de figuren overzichtelijk te houden zijn de waarden van ring 7 (met een zeer hoog microcystinegehalte) niet weergegeven in de bovenstaande grafieken. Als deze waarden wel worden meegenomen ontstaat een vertekend beeld dat minder duidelijk is, omdat de overige punten dan op een kluitje liggen. Uit de grafieken 8A t/m 8D blijkt dat de relatie tussen de chemisch bepaalde microcystinegehalten en de gerapporteerde gehalten NEN-chlorofyl, cyano-chlorofyl, celantallen en biovolumina slecht is, mede door

de monsters waarin *Microcystis* niet het dominante geslacht was (Ring 1, 3, 9 en 10). Zoals verwacht zijn de correlaties tussen chemisch bepaald microcystine en de microcystine ELISA-assay en de PP2A-bioassay veel beter. De PCR-analyse gaf wel de hoogste respons voor het monster met het hoogste microcystinegehalte (niet opgenomen in de figuur), maar de correlatie bij de monsters met lagere microcystinegehalten was minder goed.

5 Classificatie van de monsters

Om de consequenties van de risicoanalyse met verschillende monitoringsmethoden op het nemen van maatregelen te vergelijken zijn de metingen voor de twaalf monsters geclassificeerd op basis van de normen in het huidige blauwalgenprotocol en dat van 2010 (celdichtheid). Deze classificaties zijn weergegeven in Tabel 18.

Tabel 18: Classificatie van de monsters op basis van de verschillende parameters

	NEN-chl						cyano-chl (QS)					celdichtheid								biovolume								microcystine							
lab	1	2	3	4	5			1	2	3	1	2	1	2	3	4A	4B	4C	5	6	7	1	2	4A	4B	4C	5	6	7	1	2	1	1	2	
ring 1																																			
ring 2																																			
ring 3																																			
ring 4																																			
ring 5																																			
ring 6																																			
lab	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	1	2	1	2	3	4A	4B	5	6	7	8	1	2	4A	4B	5	6	7	8	1	2	1	1	2A	2B
ring 7																																			
ring 8																																			
ring 9																																			
ring 10																																			
ring 11																																			
ring 12																																			

Advies		Geen risico		Waarschuwing		Niet zwemmen
chlorofyl [$\mu\text{g/L}$]		< 12,5		$\geq 12,5$		≥ 75
celdichtheid [cellen/ml]		< 50.000		≥ 50.000		≥ 300.000
biovolume [mm^3/L]		< 2,5		$\geq 2,5$		≥ 15
microcystine [$\mu\text{g/L}$]		< 10		≥ 10		≥ 20

Het meest opvallende van Tabel 18 is dat op grond van de toxine-analyses veel minder maatregelen hoeven te worden genomen dan op grond van de monitoringsmethoden die in het huidige blauwalgenprotocol zijn opgenomen (cyano-chlorofyl en biovolume). De grootste verschillen in classificatie ('geen risico' tot een 'zwemverbod') worden gevonden bij de microscopische analyses.

6 Discussie & conclusies

Het doel van dit onderzoek, het beantwoorden van de in de inleiding geformuleerde vragen, is deels geslaagd.

6.1 Vergelijkbaarheid van de monitoringsmethoden tussen verschillende laboratoria?

Het is lastig om een goede vergelijkende analyse van de resultaten te geven, omdat niet alle analyses door evenveel laboratoria zijn uitgevoerd en omdat bij een aantal parameters zeer weinig laboratoria een resultaat hadden geleverd (onder andere fluorescentie, MC-ELISA en chemie). Uit dit onderzoek zijn echter wel enkele belangrijke conclusies te trekken. Van de onderzochte parameters bleek de vergelijkbaarheid het best bij de chlorofylanalyse volgens NEN, waarbij de variatie tussen de laboratoriumresultaten het laagst was en veel berekende Z-waarden kleiner waren dan 1. Deze analyse wordt echter niet toegepast bij de risicoanalyse volgens het landelijke blauwalgenprotocol, maar slechts gebruikt om de cyano-chlorofylanalyse met fluorescentie te kalibreren. Tijdens de ringtest bleek echter dat slechts één lab de omrekening naar NEN-chlorofyl toepast bij de risicoanalyse. Daarnaast is niet consequent gecorrigeerd voor de aanwezigheid van niet-giftige blauwalgen. Voor een meer vergelijkbare fluorescentie-monitoring van cyano-chlorofyl is het nodig dat de Nederlandse laboratoria vergelijkbare procedures hanteren. De microscopische analyses bleken bij deze ringtest het minst reproduceerbaar te zijn tussen de verschillende laboratoria. Voor een aantal monsters werden bij twee laboratoria Z-waarden bepaald die duiden op twijfelachtige resultaten. Mede door de hoge standaarddeviaties waren de Z-waarden voor alle overige resultaten acceptabel. Door de grote verschillen tussen de resultaten van de analyses op verschillende laboratoria blijft een acceptabele Z-waarde echter twijfelachtig, omdat de interlaboratorium-vergelijkbaarheid van de analyses niet goed is. De waarde van de verschillende analyses wordt beter geïllustreerd met de procentuele standaarddeviaties tussen de resultaten van de verschillende laboratoria, die voor de meeste analyses te hoog waren. De conclusie is dat de vergelijkbaarheid van de methoden die in het huidige blauwalgenprotocol worden voorgeschreven niet goed is.

6.2 Hoge toxinegehalten op locaties die wel aan de huidige normen voldoen?

De classificaties aan de hand van de resultaten van de verschillende analyses liepen sterk uiteen (Tabel 18). Als we uitgaan van het feit dat de toxinegehalten de belangrijkste factoren zijn voor de risico's voor de recreanten, dan wordt met de methoden die in het blauwalgenprotocol worden toegepast (cyano-chlorofyl en biovolume toxische genera) een overschatting gegeven van de risico's voor de zwemmers. Op de locaties die op basis van het huidige blauwalgenprotocol geen overschrijding te zien gaven, werden geen hoge toxinegehalten waargenomen (onder voorbehoud). Omdat microcystine echter niet het enige toxine is dat een risico vormt, moeten ook andere toxines worden geanalyseerd. Naast de chemische analyse van microcystines is slechts in een aantal gevallen anatoxine-a aangetoond. In geen van de ringtest monsters werden saxitoxines en cylindrospermopsine aangetroffen. De gerapporteerde concentraties anatoxine-a waren maximaal 0,1 µg/L, hetgeen niet hoog is. Er zijn nog geen WHO-richtlijnen voor anatoxine in zwemwater (Thijs, 2010), hoewel er voorstellen zijn voor normen voor anatoxine-a (3 µg/L), homoanatoxine (6 µg/L), anatoxine-a(s) (20 µg/L) en saxitoxine (3 µg/L) (Finke, 2007). De in de ringtestmonsters aangetroffen gehalten liggen dus ver onder deze richtaarden. Omdat er situaties denkbaar zijn waarbij hogere gehalten neurotoxines worden waargenomen werd in 2008 overgestapt op een classificatie op basis van de hoeveelheid blauwalgen, in plaats van de microcystine concentraties. In een zeer uitgebreide studie van de WUR werden in de waterfase echter nooit gehalten neurotoxines waargenomen die een risico voor de zwemmers zouden vormen (Faassen en Lurling, 2010). In een UvA-literatuurstudie van Nele Thijs (2010) is wel aangetoond dat er hoge gehalten neurotoxines worden gevonden, maar uitsluitend in drijfslagen. In het geval van drijfslagen met toxische blauwalgen worden echter op grond van de visuele inspectie van het blauwalgen protocol toch al maatregelen genomen om de zwemmers te beschermen, dus een neurotoxine analyse is daarvoor niet nodig. Op grond van de resultaten van deze ringtest lijkt het er niet op dat de huidige monitoring een onderschatting van de risico's geeft, maar eerder een overschatting.

6.3 Beoordeling van de risico's van cyanotoxinen met bioassays en PCR mogelijk?

De monsters van de ringtest zijn onderzocht met twee bioassays: acetylcholinesteraseremming (AChE) als indicator voor neurotoxiciteit en eiwitfosfataseremming (PP2A) als indicator voor levertoxiciteit. Daarnaast is een PCR-analyse (*Polymerase Chain Reaction*) toegepast, waarbij de genen voor microcystine-productie werden gekwantificeerd.

- Hoewel in de literatuur is beschreven dat het effect van de toxines van *Anabaena* kan worden gemeten met de AChE-bioassay (Hendriksen et al, 1997) lijken de mogelijkheden hiervoor beperkt, omdat alleen het effect van anatoxine-a(s) wordt gemeten. Het meer voorkomende cyanotoxine anatoxine-a is een zeer potente stimulator van de neuromusculaire nicotine-acetylcholine-receptoren en is niet detecteerbaar met de AChE-assay. Saxitoxines binden aan eiwitten van de natriumkanalen in de axons. Of deze neurotoxines een meetbare inhibitie van AChE veroorzaken is twijfelachtig (Mike Lurling, persoonlijke mededeling). De waarde van AChE als indicator van neurotoxiciteit is dus beperkt. De nog steeds meest gangbare bioassay om neurotoxiciteit aan te tonen is die met muizen, maar dat is geen bruikbare bioassay voor zwemwatermonitoring. Met de acetylcholinesterase-bioassay (AChE) werden bij geen van de monsters van de ringtest effecten aangetoond.
- De PP2A-bioassay is een test die het effect van microcystine-achtige toxinen aantoont. De resultaten van deze bioassay vertoonden een goede correlatie met de gemiddelde microcystinegehalten die met ELISA- of LC/MS-analyse waren bepaald. Het voordeel van de bioassay is dat hier het levertoxische effect van het hele mengsel cyanotoxinen wordt bepaald als equivalenten van microcystine-LR (de meest giftige vorm) en dat daarbij ook de mengseltoxiciteit (synergisme [versterking] of antagonisme [verzwakking]) wordt meegenomen. Met de andere methoden wordt alleen een gesommeerd microcystinegehalte bepaald, waarvan de toxische werking niet bekend is. Het feit dat fosfatase ook door andere chemicaliën wordt geremd kan als een nadeel worden gezien, maar voor de zwemmer is het niet interessant waardoor het gezondheidsrisico wordt bepaald, als het maar bekend is... Hoewel het aantal metingen nog beperkt is, lijkt de PP2A-bioassay een goed toepasbare methode voor de risicoanalyse van de meest voorkomende cyanotoxinen.
- De correlatie tussen de PCR-analyse en de chemische microcystineanalyse is niet sterk bij lage MC-concentraties, maar bij een overschrijding van de microcystinenorm (Ring 7) werd een duidelijk verhoogd signaal gemeten ten opzichte van de andere monsters. Hoewel ook hier het aantal vergelijkende metingen nog te beperkt is om harde conclusies te trekken, lijkt de methode op termijn geschikt voor een risicoanalyse van microcystines.

Als voorlopige conclusie kan worden gesteld dat het risico op levertoxiciteit met de PP2A-bioassay en de PCR kan worden bepaald, maar dat voor het risico op neurotoxiciteit nog geen toepasbare analyse is.

6.4 Relatie tussen cyanotoxine gehalten en overige parameters?

Tussen de chemisch bepaalde microcystineconcentraties en de parameters celdichtheid, biovolume en cyano-chlorofyl zijn geen goede correlaties aangetoond, maar de correlaties tussen toxineconcentraties en de microcystine-ELISA, de PP2A-bioassay en de *mcyD*-gen PCR waren goed. Deze laatste tests lijken daarom beter geschikt om de risico's voor de zwemmers te analyseren. De mogelijke risico's van neurotoxinen worden echter bij deze assays niet meegenomen. Zoals onder paragraaf 6.2 is vermeld, lijken concentraties neurotoxinen in de waterfase echter niet hoog, zodat risico's hiervan alleen in drijfslagen te verwachten zijn. Om deze aanname hard te maken zal echter nog aanvullend onderzoek nodig zijn.

7 Aanbevelingen

Op basis van de conclusies kan een aantal aanbevelingen worden gedaan voor toekomstige aanpassingen van het blauwalgenprotocol:

Screening

Geen van de onderzochte methoden om de hoeveelheid blauwalgen te monitoren (celdichtheid, biovolume en cyano-chlorofyl) lijkt een betrouwbare schatting van de risico's te geven, omdat er geen goede relatie is met de toxinegehalten (microcystine). De variatie tussen de laboratoria trad het minst op bij de fluorescentieanalyse. Deze methode is bovendien goedkoop en snel. De gehalten die door de laboratoria werden gemeten kwamen redelijk overeen met de gehalten die als kwaliteitscontrole voor het homogeniseren werden bepaald. Bij deze analyse zijn echter ook factoren die de betrouwbaarheid van de resultaten kunnen verstoren, zoals de aanwezigheid van humuszuren, sedimentdeeltjes en groenalgen. Er zijn laboratoria die melden dat de veldmeters niet onderling vergelijkbaar zijn en dat de resultaten niet goed overeenkomen met laboratoriummetingen. Hiervoor moeten betere procedures worden vastgelegd. Daarnaast moet een algemeen geaccepteerde methode voor de NEN-correctie worden vastgelegd en moeten afspraken worden gemaakt over de correctie voor niet-giftige blauwalgen. Als aan deze voorwaarden is voldaan lijkt de fluorescentieanalyse van cyano-chlorofyl de meest geschikte methode om snel een eerste indruk te krijgen van de mogelijke risico's van blauwalgen. Bij overschrijding van de norm moet echter altijd een nadere risicoanalyse worden uitgevoerd.

Risicoanalyse

Een nadere risicoanalyse gebeurt nu bij de meeste laboratoria met een microscopische quickscan of een microscopische analyse van het biovolume. Op basis van de resultaten van dit onderzoek en de eerdergenoemde rapporten van de WUR (Faassen en Lurling, 2010) en de UvA (Thijs, 2010) lijken de risico's van neurotoxinen zich te beperken tot drijfslagen (waarbij een visuele inspectie al voldoende is voor maatregelen). Voor een risicoanalyse van de levertoxische toxines lijken de microcystine-ELISA-analyse, de PP2A-assay en de McyD-PCR-analyse op dit moment de beste snelle en betaalbare methoden voor een realistische inschatting van de risico's voor zwemmers. De microcystine-ELISA is al eerder toegepast en gevalideerd voor de monitoring (Van der Oost, 2009), dus deze test verdient voorlopig de voorkeur. De PP2A bioassay is qua uitvoering eenvoudiger dan de MC-ELISA-assay en geeft (in theorie) een betere analyse van het effect van het totale mengsel van cyanotoxines (en overige stoffen die dit toxische effect veroorzaken). Dit lijkt na verdere praktijktoetsing een veelbelovende test voor toekomstige monitoring. De toepasbaarheid van de PCR-analyse – die geen gehalte of effect van toxines analyseert, maar alleen een indicatie geeft van de hoeveelheid algen die over het gen beschikken om deze toxines aan te maken – zal ook nog meer in de praktijk moeten worden getoetst.

8 Referenties

- Finke, J, 2007. Cyanobacterial Neurotoxins, MSc scriptie Universiteit van Amsterdam.
- Hendriksen P, Carmichael WW, An J, Moestrup ø, 1997. Detection of an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in natural blooms and cultures of cyanobacteria/blue green algae from Danish lakes and in the stomach contents of poisoned birds. *Toxicon* 35 (6): 901-913.
- Faassen, E en M Lurling, 2010. Inventarisatie van cyanotoxines in Nederlands oppervlaktewater Wageningen Universiteit en Research Center, WUR Rapport M35X.
- Thijs, N, 2010. The occurrence of cyanobacterial neurotoxins in lakes; *A comparison between available measurements and guidelines*. Universiteit van Amsterdam.
- Van der Oost, R, 2009. Cyanotoxine monitoring: standaardisatie en validatie van methoden voor de Nederlandse waterkwaliteitsbeheerders. STOWA rapport 2009-21.

Bijlage: Onderzoek cyanotoxine-bioassays

Op het laboratorium van Waterproef zijn enkele proeven uitgevoerd met een aantal bioassays om de effecten van cyanotoxines te analyseren.

Extractiemethoden

Onderzocht zijn drie methoden om de watermonsters met blauwalgen te extraheren:

- Koken: 1 ml monster wordt met methanol verdund (1:1) en 30 minuten in een kokend waterbad geplaatst (vergelijkbaar met de extractievoorschrift voor de microcystine ELISA assay). Het monster wordt (eventueel na verdunning) onderzocht in de bioassay.
- Filtreren: 200 ml monster wordt over een 0.8 µm nylon membraan gefiltreerd. Het filter wordt onder licht roeren 30 minuten geëxtraheerd in een oplossing van 80% MeOH, 0.1% TFA, and 0.1% Tween 20. De oplossing wordt vijf minuten bij 400 rpm gecentrifugeerd. Het supernatant wordt (eventueel na verdunning) onderzocht in de bioassay.
- Lyseren: aan 1 ml monster wordt 100 µl reagent A and 10 µl reagent B van een QuikLyse-kit toegevoegd. De oplossing wordt twee minuten geschud en acht minuten geïncubeerd bij kamertemperatuur. Het gefiltreerde extract wordt (eventueel na verdunning) onderzocht in de bioassay.

De kookmethode bleek het meest geschikt om watermonsters te extraheren voor de bioassays, omdat de recovery van de filtratiemethode te laag was en de procedure blanco QuikLise-methode een sterk effect had op de PP2A-bioassay. Alle monsters van de ringtest zijn daarom met deze methode geëxtraheerd.

Bioassays

- Levertoxiciteit: eiwitfosfataseremming-assay (PP2A)
Voor het testen van de levertoxiciteit werd een MicroCystestkit aangeschaft (ZEU-INMUNOTEC.S.L.). Deze eenvoudige test werd uitgevoerd met 96-well-platen, zodat grote series monsters tegelijk (in duplo) kunnen worden gemeten. Aan 50 µl monster (of microcystine-LR standaarden) wordt 70 µl fosfatase-oplossing en 90 µl chromogeensubstraat toegevoegd. De platen worden afgesloten met een zelfklevend plastic en 30 min bij 37 °C geïncubeerd. Na de incubatie wordt 70 µl stop-oplossing toegevoegd, waarna de absorptie bij 405 nm wordt gemeten in een spectrofotometer (*'platereader'*). Uit tests is gebleken dat methanolconcentraties tot 5% de analyse niet verstoren. Het extract moet dus minimaal 10x worden verdund voor een betrouwbare meting. In de praktijk betekent dit dat een detectiegrens van 1 µg MC-equivalenten per liter kan worden gehaald, hetgeen overeenkomt met de WHO-drinkwaternorm.
- Neurotoxiciteit: acetylcholinesteraseremming-assay (AChE)
De acetylcholinesteraseremming-assay is gebaseerd op remming van de enzymactiviteit. AChE heeft een zeer hoge catalytische activiteit. Anatoxine-a(s) remt AChE, overigens net zoals alle organofosfaatbestrijdingsmiddelen. Er zijn proeven gedaan met de AChE-bioassay (aangeschaft bij BioAssay Systems), omdat dit de enige beschikbare snelle neurotoxanalyse is. De test werd uitgevoerd in 96-well-platen, door aan 200 µl water 200 µl standaard (*Calibrator*) of 10 µl monster met 190 µl vers bereide werkoplossing (*Working Reagent*). Na voorzichtig mengen wordt de optische dichtheid bij 412 nm spectrofotometrisch gemeten na twee en tien minuten. In geen van de ringtestmonsters werd met deze bioassay een effect gemeten.