

# Het koloniegetal als alternatief voor celtellingen van cyanobacteriën

Op basis van het koloniegetal kan een statistisch gemotiveerde uitspraak worden gedaan over het celgetal op grenswaarden. Tot een niveau van 50.000 cellen per ml kan het aantal celtellingen c.q. biovolumebepalingen daardoor sterk worden beperkt en blijft van het totale monsteraanbod nog slechts 22 procent over voor de bewerkelijke celtelling. Aldus Jo Klaessens van StatAlike en Ernst Lo, Wim Bolkenbaas en Daan van Grinsven van Aquon: het nieuwe instituut voor wateronderzoek en advies, dat sinds afgelopen zomer het Gemeenschappelijk Waterschaps Laboratorium, Delta Waterlab en de laboratoria van het Hoogheemraadschap van Rijnland en Waterschap Rivierenland omvat.

In Nederland wordt de EU-Zwemwater-richtlijn uitgevoerd middels het blauwalgenprotocol. Dit protocol is een voorzorgsmaatregel om recreanten te beschermen tegen intoxicatie van blauwalgen en is gebaseerd op risicogrenzen die door de VN-wereldgezondheidsorganisatie WHO zijn vastgesteld. De blauwalganalyse bestaat uit een biovolumebepaling, waarbij het celgetal wordt vermenigvuldigd met een gemiddelde waarde voor het volume. Dit is zeer arbeidsintensief en dus kostbaar. Daarbij neemt de onzekerheid van de telresultaten toe met afnemende concentratie van blauwalgen, terwijl de analysetijd toeneemt en onnodige analyses plaatsvinden.

Het protocol schrijft voor dat voorafgaande aan de celtelling op vers monstermateriaal eerst het aantal toxische blauwalgsoorten in het monster moet worden bepaald. Wij hebben deze kwalitatieve bepaling uitgebreid door behalve het aantal soorten ook het aantal kolonies te tellen en deze te vergelijken met de daaropvolgende celtelling.

## Methode

Gedurende 2010 zijn monsters van zowel zwem- als stadswater uit Limburg, Noord-Brabant en Zuid-Holland geanalyseerd op blauwalgen.

## Screening

De eerste stap bestaat uit een kolonietelling van toxische blauwalgen op soort, waarbij een gehomogeniseerd submonster van 80 µL met behulp van een variabele volumepipet op een objectglas is gepipetteerd en afgedekt met een dekglas (24 x 55 mm). Met

behulp van een conventionele microscoop is bij een vergroting van tien maal het hele submonster gescreend op het voorkomen van blauwalg, waarbij de kolonies per genus zijn geteld.

## Celtelling

Het celgetal is vervolgens bepaald volgens NEN 15204. Hiervoor is een monster gedurende twaalf uur bij 20°C geacclimatiiseerd in een klimaatkast. Uit het gehomogeniseerde monster is een submonster van 1.100 µL gepipetteerd in een bezinkcuvet met behulp van een variabele volumepipet en afgedekt met een dekglas (22 x 22 mm). Het bezinkcuvet is vervolgens gedurende vier uur in de klimaatkast geplaatst bij 20°C, voor het bezinken van de blauwalgkolonies. De celtelling vond plaats op een omkeermicroscoop. Uit elk bezinkcuvet is het celgetal bepaald door een celtelling van minimaal 100 kolonies.

## Data-analyse

Het statistische model is gebaseerd op de observatie dat het aantal cellen gedeeld door het aantal getelde kolonies van een monster een log-normale verdeling volgt. Indien deze variabele een bepaalde verdeling volgt, biedt dat de mogelijkheid tot het berekenen van betrouwbaarheidsintervallen. Het wordt mogelijk om, op basis van het vastgestelde aantal kolonies van een monster, het 95% betrouwbaarheidsinterval van het aantal cellen in het monster te bepalen. Dit wordt bepaald in de vorm van een eenzijdige grenswaarde, zodat met 95% zekerheid het aantal cellen kleiner is dan de grenswaarde. Alvorens het log-normale model te kunnen gebruiken, dient te worden aangetoond dat dit inderdaad opgaat. Dit gebeurt door eerst



Afb. 2.

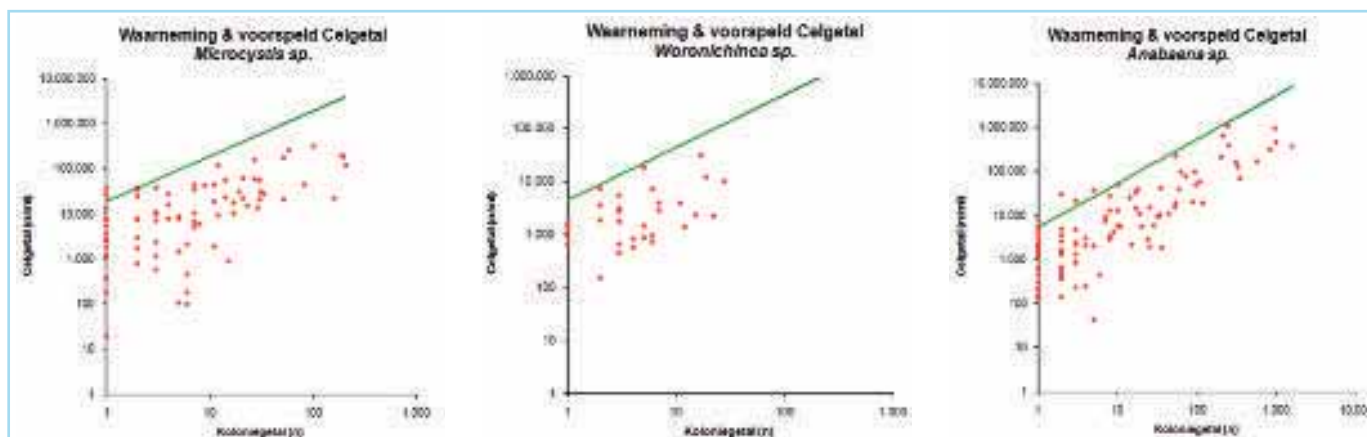
een log-transformatie uit te voeren op de waarnemingen en vervolgens te onderzoeken of de variabele normaal verdeeld is. Hiervoor is de Kolmogorov-Smirnovtoets gebruikt.

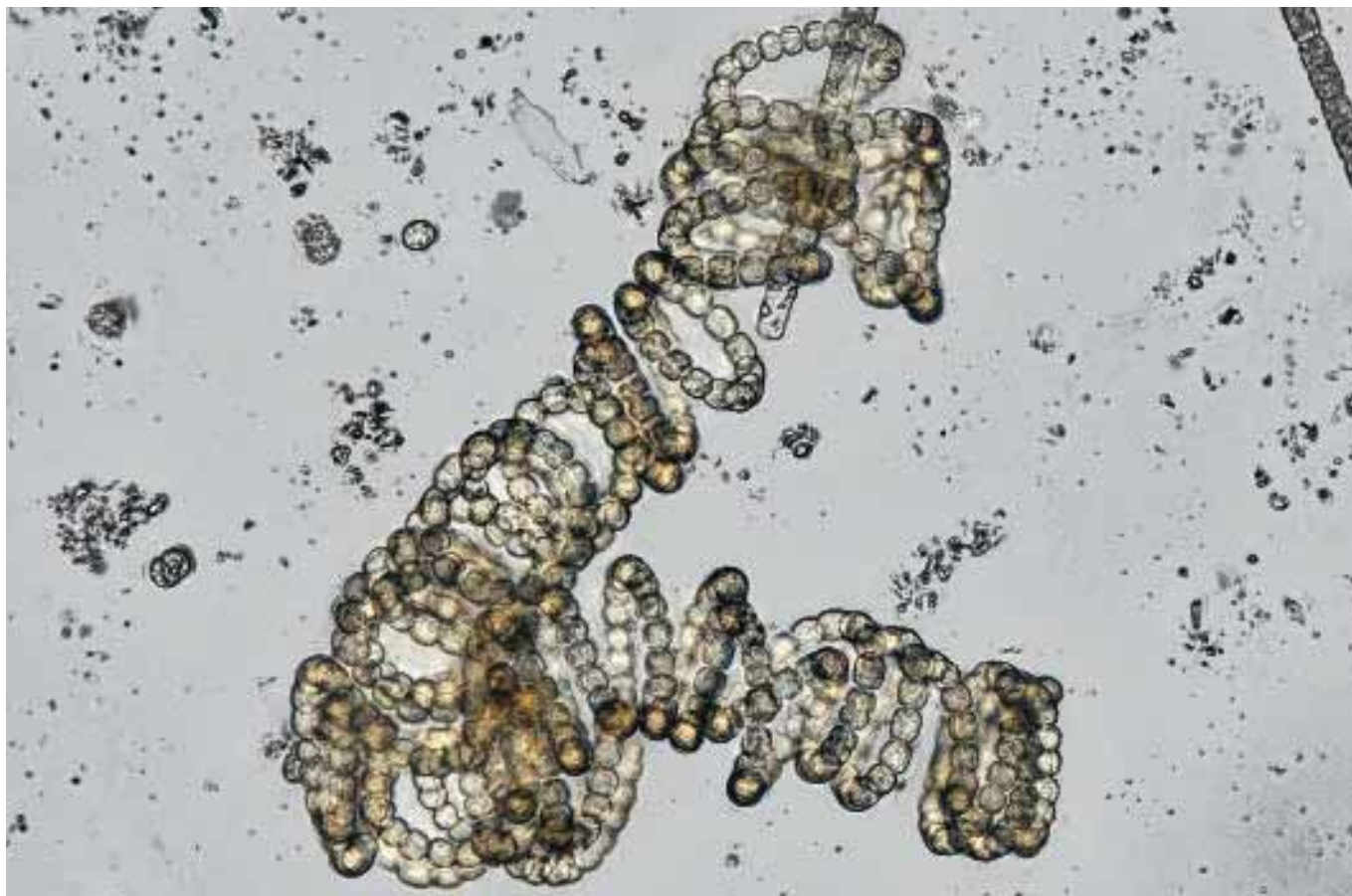
Met deze toets onderzoekt men de hypothese of de waarden een normale verdeling volgen. Dat gebeurt door de feitelijke cumulatieve verdeling van de waarnemingen te vergelijken met de theoretische verdeling. Als het verschil niet groter wordt dan een bepaalde kritieke waarde, kan de hypothese worden geaccepteerd. Voor de afzonderlijke genera is vastgesteld of de log-normale verdeling opgaat. Daarna is het celgetal per ml uit het koloniegetal voorspeld aan de hand van de éénzijdige betrouwbaarheidsinterval.

## Validatie

Het model is gevalideerd door toetsing van de originele dataset met een tolerantie van vijf foute voorspellingen op 100 waarne-

Afb. 1: Validatie per genus van gemeten (rode stip) en voorspelde waarden (groene lijn).





Driedimensionaal beeld van *Anabaena* sp.

mingen. Er wordt uitgegaan van log-getransformeerde meetwaarden.

Uit de validatie van het gemeten celgetal versus de voorspelde waarde blijkt een zeer goede overeenkomst met de theorie (zie afbeelding 1).

De waargenomen overschrijdingspercentages variëren van 2,1 tot 5,9 procent (zie afbeelding 2).

De lakmoesproef bestond uit een validatie op de monsters die gedurende 2010 geteld zijn. In de monsters kunnen meerdere genera voorkomen. De celaantallen per genus zijn volgens het voorspelde model op de totale dataset toegepast op monsterniveau, waarbij getoetst is of overschrijdingen zouden hebben plaatsgevonden. Op de totale dataset

bleek dat in drie procent van de gevallen een overschrijding werd waargenomen, hetgeen ruim onder de norm van vijf procent lag. Indien men toetste op een grenswaarde van 50.000 cellen per ml, werd geen enkele overschrijding geconstateerd.

### Discussie

Het totale monsteraanbod in 2010 bestond uit 1533 monsters. Indien een interventiegrens van 50.000 cellen per ml zou zijn gehanteerd, zouden hier slechts 368 (22%) celtellingen overblijven. Deze uitsluitingsmethode duurt slechts 15 minuten inclusief rapportage en levert een aanzienlijke besparing op ten opzichte van de bewerkelijke celtelling die één tot anderhalf uur duurt en kan gemiddeld binnen vier uur na binnenkomst op het laboratorium worden gerapporteerd.

Dit jaar is het gebruik van fluorescentie toegestaan. Hierbij worden *in situ* blauwalgen gemeten, maar heeft het nadeel dat dit vals positieven kan opleveren, doordat deze methode geen onderscheid kan maken tussen toxische en niet-toxische genera. Dit probleem doet zich niet voor bij de hier beschreven alternatieve methode. Gedurende dit jaar zal deze analyse worden herhaald en vergeleken met fluorescentiemetingen.

Het is verleidelijk om op basis van de uitkomsten van dit onderzoek hogere grenzen te hanteren dan 50.000 cellen/ml en zo een nog grotere besparing op analysekosten te bereiken. Dit wordt met klem afgeraden, omdat dan een onterecht signaal voor een volksgezondheidsrisico wordt afgegeven. Afbeelding 2 toont weliswaar aan dat met statistische zekerheid bovengrenzen kunnen worden aangegeven, maar dit impliceert ook dat 95 procent van de waarden onder deze grens liggen. Tot de interventiegrens van 50.000 cellen per ml is niemand geïnteresseerd in de werkelijke waarde zolang deze maar niet hoger is. Bij waarden hoger dan 50.000 cellen per ml is het statistisch model te ruw om op basis hiervan waarschuwingen te geven dan wel zwemwater te sluiten.

**Ernst Lo, Wim Bolkenbaas en Daan van Grinsven (Aquaon)  
Jo Klaessens (StatAlike)**

Voor meer informatie: (0411) 61 85 38 of 06 15 87 82 08.

