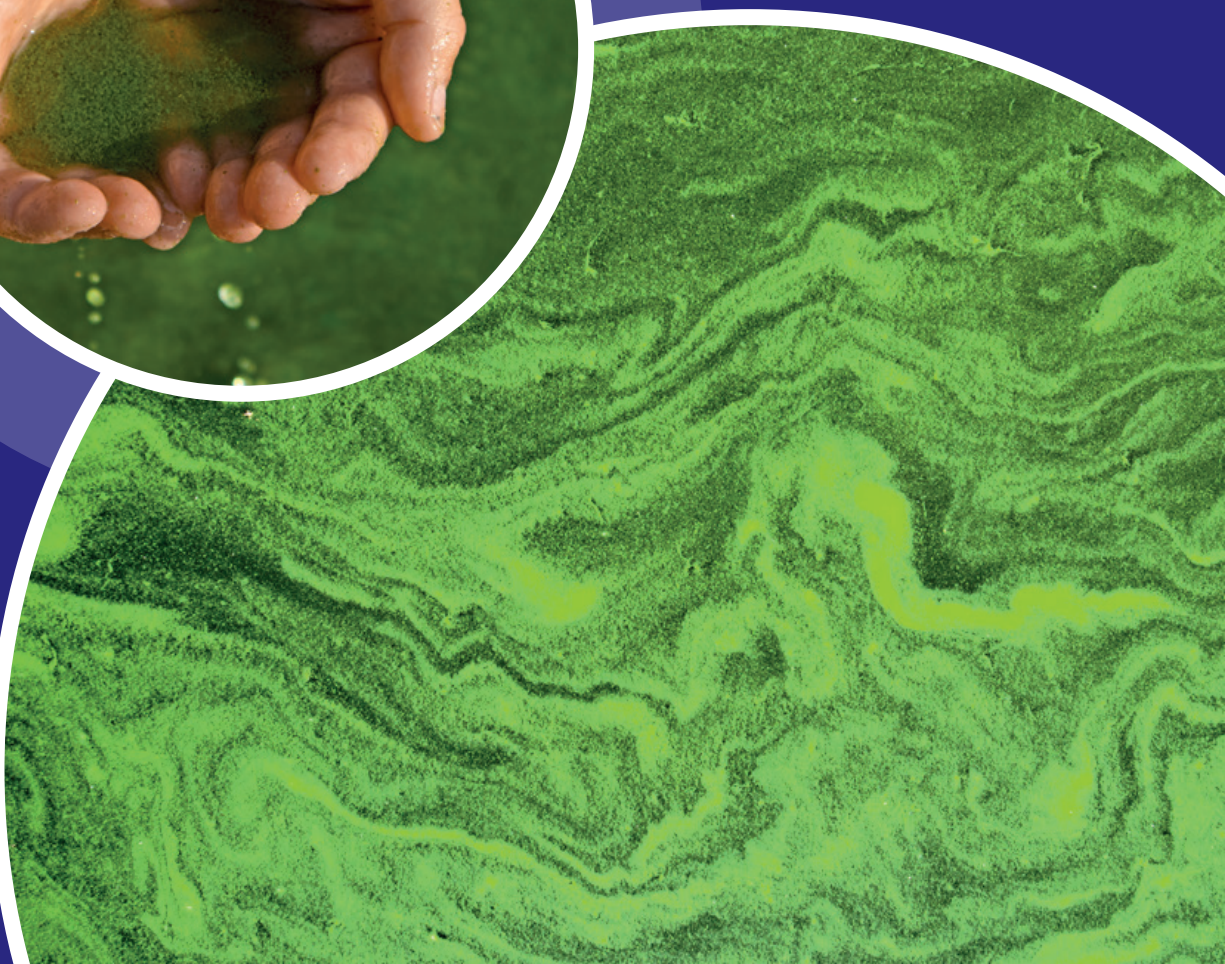
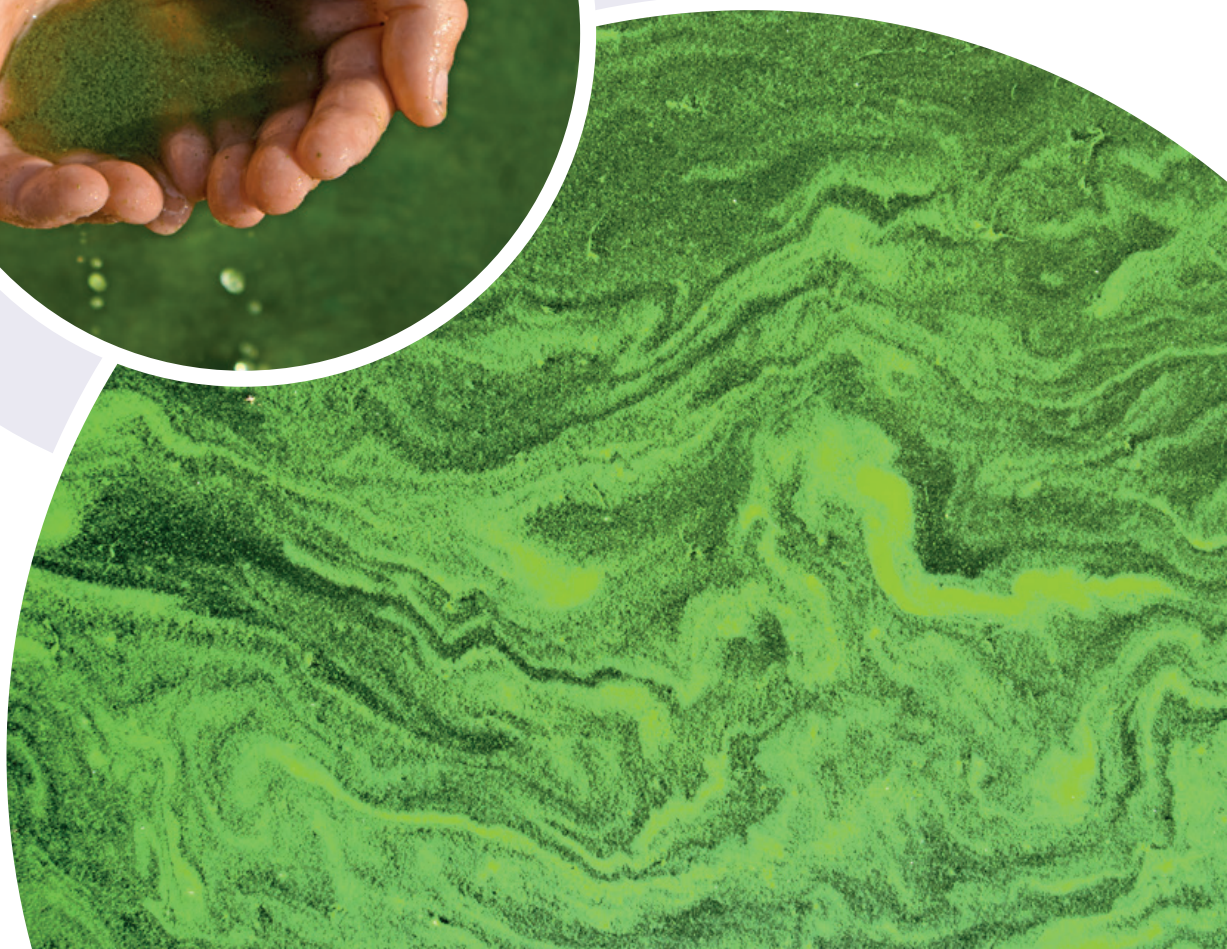


RISICOBEOORDELING BLAUWALGEN IN ZWEMWATER

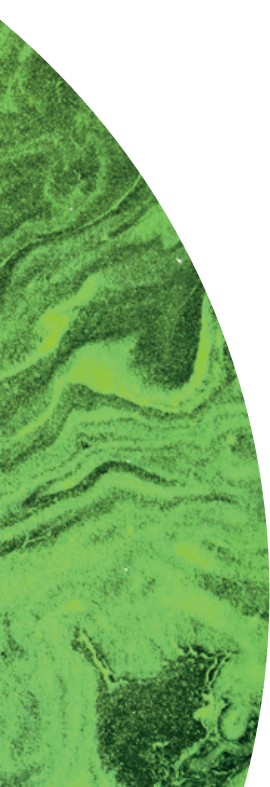
2020
09



2020
09



RISICOBEOORDELING BLAUWALGEN IN ZWEMWATER



TEN GELEIDE

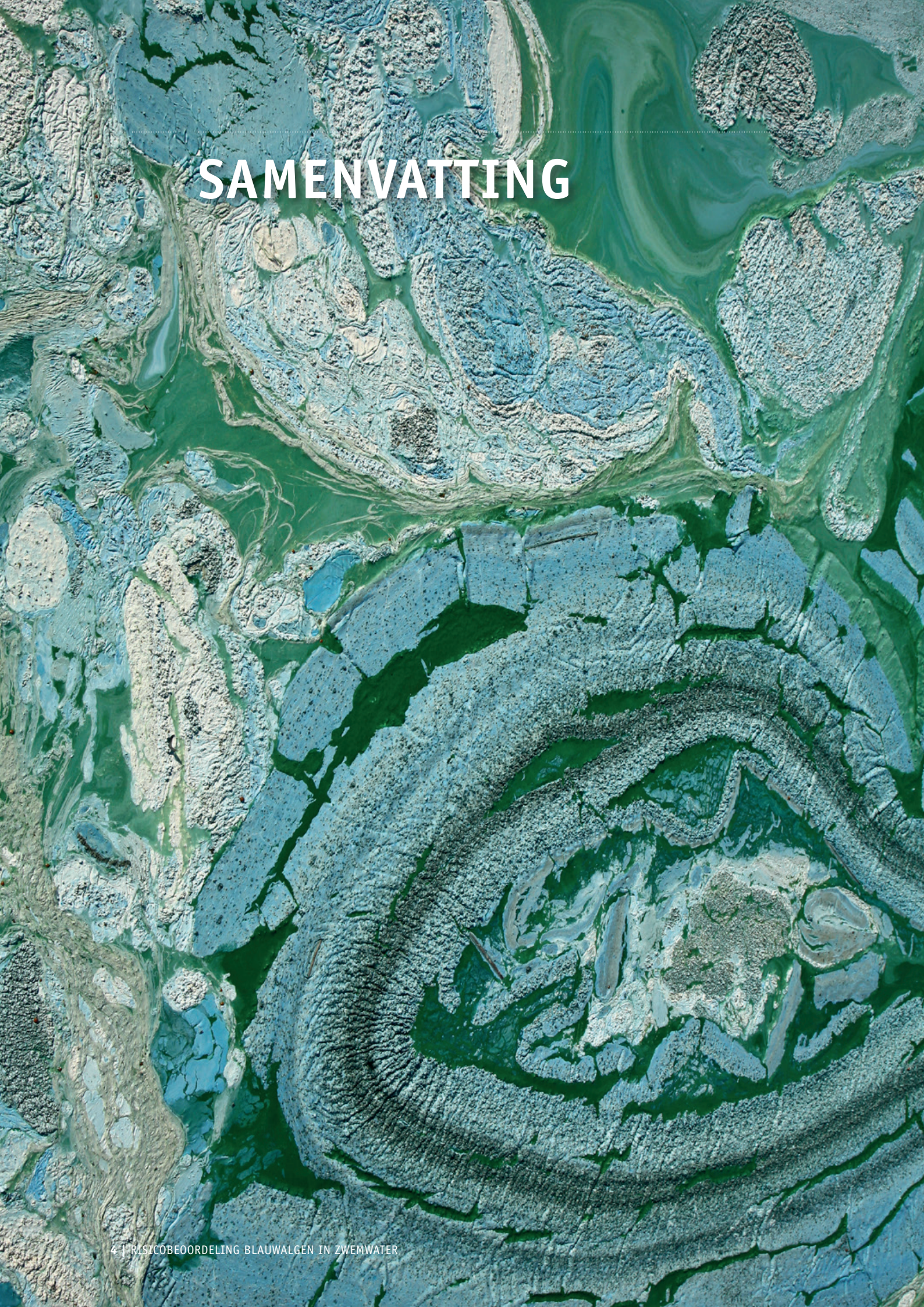
Het identificeren van toxinegenen en het bepalen van toxineconcentraties van blauwalgen geeft een meer betrouwbare inschatting van het daadwerkelijke gezondheidsrisico voor zwemmers dan de huidige analysetechnieken. Dat is de belangrijkste conclusie van een onderzoek naar het gebruik van enkele nieuwe technieken bij de monitoring en risicobeoordeling in zwemwateren. Er is nog wel nader onderzoek nodig voordat deze technieken een plek kunnen krijgen in het Blauwalgenprotocol.

In de Europese Zwemwaterrichtlijn worden blauwalgen (cyanobacteriën) expliciet genoemd als gevaar voor de volksgezondheid. Als er op een bepaalde zwemwaterlocatie een reële kans is op proliferatie (bloei) van blauwalgen, moeten de verantwoordelijke overheden volgens de richtlijn controles uitvoeren en passende maatregelen nemen om zwemmers te beschermen. Het Blauwalgenprotocol is de Nederlandse invulling van deze verplichtingen.

In het Blauwalgenprotocol staat het meten van cyanochlorofyl (met behulp van fluorescentie) en biovolume (met behulp van microscopie) centraal. Dit levert een schatting op van de hoeveelheid blauwalgen in zwemwater, en daarmee op het risico van het aanwezig zijn van blauwalgtoxines. Het zijn die toxines waar zwemmers ziek van (kunnen) worden. De huidige manier van meten leidt echter tot overschatting van het risico voor de volksgezondheid, omdat niet alle blauwalgen toxines produceren. Alleen toxische blauwalgen doen dat,

Er zijn inmiddels diverse nieuwe technieken ontwikkeld die het gezondheidsrisico waarschijnlijk beter inschatten, omdat ze een directe(re) relatie leggen met aanwezige toxines en gezondheid. Met DNA-analyse is het mogelijk om in blauwalgen aanwezige toxinegenen te detecteren en te identificeren. De aanwezigheid van dergelijke genen wijst op de mogelijke productie van toxines, maar in welke concentratie is nog niet af te leiden. Niet elke blauwalg met een toxinegen produceert namelijk toxines. De exacte toxineconcentraties op een bepaald moment zijn wél te meten met de laboratoriumtest ELISA en door chemische analyse met LC-MS/MS.

De nieuwe technieken om toxinegenen en toxineconcentraties te bepalen geven, zo is gebleken uit dit onderzoek, een betere inschatting van de hoeveelheid toxines in het water en daarmee een nauwkeuriger beeld van het gezondheidsrisico. Bovendien gaan de ontwikkelingen van DNA-technieken snel. Het is de verwachting dat binnen enkele jaren DNA-analyses sneller, beter en goedkoper een beeld geven van de kans op voorkomen van toxines. Of die toxines dan daadwerkelijk in het water aanwezig zijn, kan onderzocht worden in een tweede stap, waarbij de ELISA-techniek veelbelovend is. Maar ze zijn tot dusver nog niet uitgebreid toegepast bij blauwalgmonitoring. Het is aan te bevelen met de nieuwe technieken meer ervaring op te doen en dan te bezien of deze opgenomen kunnen worden in de regelgeving (het Blauwalgenprotocol). Als de nieuwe technieken inderdaad betrouwbaar zijn zal het nog enige tijd nemen voordat ze verankerd kunnen zijn in wet- en regelgeving. Daarvoor is onder andere afstemming nodig met de Europese Commissie.



SAMENVATTING

Waterbeheerders voeren op grond van de Europese Zwemwaterrichtlijn analyses uit om in te schatten hoe groot het kans is op het voorkomen van blauwalgen(toxines) in zwemwater. Ze krijgen daarmee een beeld van het gezondheidsrisico voor zwemmers, op basis waarvan er zwemadviezen worden gegeven. De technieken die daarvoor nu worden gebruikt, meten alleen de hoeveelheden blauwalgen, maar niet de toxines die blauwalgen kunnen produceren, terwijl dat nu juist de ziekteverwekkende stoffen zijn.

In dit onderzoek zijn de huidige technieken vergeleken met nieuwe technieken. Het gaat om technieken die direct(er) toxines bepalen. Hiervoor zijn in 2019 in totaal 103 watermonsters (afkomstig van 11 verschillende locaties) geanalyseerd met meerdere methoden. De uitkomsten zijn met elkaar vergeleken, waarbij de analyse van toxines met LC-MS/MS als 'gouden standaard' is genomen. Het uiteindelijke doel is om een (kosten)effectieve analysetechniek te vinden die het meest geschikt is om het gezondheidsrisico voor zwemmers in kaart te brengen.

Uit de dataset blijkt dat de technieken die a) biovolume (van microcystineproducerende blauwalgen), b) het aantal toxinegenen (van microcystineproducerende blauwalgen) en c) de hoeveel toxines bepalen (ELISA) een goede inschatting geven van de hoeveelheid aanwezige toxines zoals die werd bepaald met LC-MS/MS. Het gebruik van fluorescentie (fluoroprobe) leidt tot een overschatting van het risico.

Nader onderzoek is volgens de onderzoekers nodig voordat technieken gericht op toxinebepaling landelijk en uniform gebruikt kunnen worden. Onder meer voor het bepalen van grenswaarden bij de nieuwe technieken: bij welke gevonden waarden geef je een waarschuwing of negatief zwemadvies af?

INHOUDSOPGAVE



	Ten geleide	2
	Samenvatting	4
1	INLEIDING EN DOEL	8
1.1	Aanleiding	9
1.2	Onderzoeksvragen	9
2	AANPAK	10
2.1	Onderzoeksopzet	11
2.2	Uitvoering	13
2.3	Analyse	16
3	RESULTATEN MONITORING	18
3.1	Resultaten per locatie	19
3.1.1	<i>Binnenschelde</i>	19
3.1.2	<i>Kurenpolder</i>	22
3.1.3	<i>Plas te Werve</i>	24
3.1.4	<i>Oudegaasterbrekken</i>	26
3.2	Vergelijking analysemethoden	27
3.2.1	<i>Visuele inspectie</i>	27
3.2.2	<i>Fluoroprobe versus toxinegenen en toxines</i>	28
3.2.3	<i>Biovolume versus toxinegenen en toxines</i>	30
3.2.4	<i>Toxinegenen versus toxines en biovolume</i>	31
3.2.5	<i>Toxines: ELISA en LC-MS/MS</i>	32
3.2.6	<i>Correlaties</i>	34
3.2.7	<i>Risicoinschatting</i>	34
3.3	Conclusies data-analyse	34
4	TOEPASBAARHEID	38
5	CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN	42
5.1	Antwoorden op de onderzoeksvragen	43
5.2	Conclusies en aanbevelingen	43
	BIJLAGEN	46
Bijlage 1	Resultaten per locatie	47
Bijlage 2	Toxineproducerende cyanobacteriën	62
	STOWA IN HET KORT	66
	Colofon	68

The background of the page is a photograph of a body of water completely covered in a thick, vibrant green algal bloom. In the foreground, there are several tall, thin green reeds and clusters of small purple flowers, likely Salvia, which are partially submerged in the water. The text is overlaid on the upper half of the image.

HOOFDSTUK 1

INLEIDING EN DOEL

1.1

AANLEIDING

Waterbeheerders voeren analyses uit om een inschatting te maken van het voorkomen van blauwalgen(toxines) in het zwemwater. Op deze manier krijgen ze een beeld van het gezondheidsrisico voor zwemmers. De daarbij te gebruiken technieken en de wijze waarop dit dient te gebeuren, staan beschreven in een Blauwalgenprotocol.

De in het Blauwalgenprotocol voorgeschreven analysetechnieken en gehanteerde methoden kosten veel tijd en zijn vatbaar voor interpretatieverschillen. Op verzoek van waterbeheerders en provincies heeft STOWA daarom onderzoek laten uitvoeren naar nieuwe technieken die kunnen zorgen voor een nauwkeurigere en snellere bepaling van de gezondheidsrisico's dan de huidige methoden. Dit kan uiteindelijk uitmonden in een uniforme richtlijn van het Rijk en mogelijk aanpassing van het Blauwalgenprotocol.

Dit onderzoek is een onderzoek met een eigen koers: het testen van nieuwe technieken, deze afzetten tegen de huidige standaardmethoden, om vervolgens een advies te geven over (kosten)effectieve technieken om blauwalgen te monitoren. Dit onderzoek staat los van de ontwikkeling van een nieuw Blauwalgenprotocol 2019/2020 (ter vervanging van Blauwalgenprotocol 2012). Parallel aan dit onderzoek hebben de waterschapslaboratoria (ILOW) in 2019 eveneens een onderzoek uitgevoerd naar nieuwe technieken.

1.2

ONDERZOEKSVRAGEN

In dit onderzoek stonden de volgende onderzoeksvragen centraal.

- Is er een relatie te leggen tussen resultaten op basis van nieuwe technieken en resultaten met traditionele analysemethoden?
- Waar liggen de grenswaarden voor 'waarschuwing' en 'negatief zwemadvies' bij gebruik van de nieuwe technieken?
- Is er één analysetechniek (of keten van technieken) die het gezondheidsrisico zo goed inschat (indicator), dat overige detectietechnieken niet meer uitgevoerd hoeven te worden?
- Wat is de toepasbaarheid van nieuwe technieken ten opzichte van de huidige analysetechnieken?

In een evaluatie van het Blauwalgenprotocol 2012¹ zijn op basis van interviews en ervaringen van experts de momenteel toegepaste detectietechnieken én nieuwe technieken reeds beoordeeld op strategisch, tactisch én operationeel niveau. Informatie uit die evaluatie is gebruikt in dit onderzoek.

¹ De Waterspin, 2016. Evaluatie Blauwalgenprotocol 2012. Deel 2: Methoden voor blauwalgen detectie. 18 oktober 2016

HOOFDSTUK 2

AANPAK



Het onderzoek is onderverdeeld in drie fasen:

- Onderzoeksopzet: Vaststellen van te gebruiken nieuwe en huidige technieken in het onderzoek (jan - apr 2019)
- Uitvoering: Testen technieken (mei - sep 2019)
- Analyse: Analyse en advies (okt 2019 - maa 2020)

2.1 ONDERZOEKSOPZET

In de eerste fase, op 18 maart 2019, heeft een expertgroep van diverse kennisinstituten ([Colofon](#)) gezamenlijk (en in overleg met het Platform Blauwalgen) een onderzoeksopzet met gebruik van nieuwe technieken ([Figuur 2.1](#)) vastgesteld, op basis van hun kennis en ervaring. De opzet is op 8 april 2019 aan de begeleidingsgroep (zie [Colofon](#)) voorgelegd en vastgesteld.

Technieken uit het huidige blauwalgenprotocol én nieuwe technieken zijn naast elkaar toegepast in dit onderzoek ([Figuur 2.1](#)). De figuur is opgezet van grof naar fijn: van screening naar nader onderzoek, gebaseerd op het risicopad beschreven in Waterspin, 2016. De detectie van fytoplankton (2.) gebeurt visueel, tijdens een veldbezoek. Na monsternamen worden blauwalgen (3.) gedetecteerd met de huidig gebruikte methode (fluoroprobe) en aanvullend met DNA-analyse van blauwalgen (qPCR blauwalgenen). De aanwezigheid van potentieel toxische geslachten (4.) en soorten (5.) wordt bepaald met microscopie (huidige standaard). Het aantal toxische blauwalgen (6.) wordt ingeschat via het aantal toxinegenen dat aangetoond wordt met DNA-analyse (qPCR toxinegenen). Of de aanwezige blauwalgen met toxinegenen ook daadwerkelijk toxines produceren wordt gemeten via ELISA en LC-MS/MS (7.). Idealiter zijn effectmetingen (7+) nodig om de daadwerkelijke effecten van de toxines na blootstelling te bepalen. De effectmetingen vallen echter buiten dit onderzoek.

FIG 2.1 UITGEVOERDE ANALYSES IN HET ONDERZOEK 2019, GEKOPPELD AAN HET RISICOPAD

RISICOPAD	DETECTIETECHNIEK	PARAMETER	UITVOERDER
1 OPPERVLAK- TEWATER + 2 FYTO- PLANKTON	 Visuele inspectie	Drijfslagcategorie Foto water, drijfslag (indien aanwezig)	MONSTERNEMER
MONSTERNAME WATER + DRIJFLAAG: MONSTERNEMER EXTRACTIE + CONSERVATIE MONSTER: CENTRAAL LAB			
3 BEPALEN AAN- WEZIGHEID BLAUWALG	 Fluoroprobe meting	Concentratie chlorofyl-a	CENTRAAL LAB
	  qPCR Cyano-16S	Schatting aantal cellen blauwalg	DELTAIRES
4 POTENTIEEL TOXISCHE GESLACHTEN + 5 POTENTIEEL TOXISCHE SOORTEN	 Microscopie	Dominante soorten Biovolume potentieel toxische cyanobacteriën	CENTRAAL LAB
6 TOXISCHE BLAUW- ALGEN	  qPCR toxinegenen	Schatting aantal toxische genen	DELTAIRES
7 TOXINES	  ELISA   LC- MS/MS	Schatting concentratie toxines Concentratie van geselecteerde toxines	RIKILT
BUITEN ONDERZOEK			
7+ TOXINES ➔ VERDIE- PINGSSLAG	 PPIA (MCstNOD)  Neuro2a (Ana+STX)	"MC-achtig" effect (toxische equivalenten) Ana/STX	?
 NIEUWE TECHNIEK  METING TWEEWEEKLIJKS  ANALYSE ALLE MONSTERS GELIJKTIJDIG NA ZWEMSEIZOEN			

Meer informatie over de verschillende analysemethoden zijn te lezen in het rapport van de Waterspin (2016). Voor de leesbaarheid van dit rapport, is een samenvattende uitleg van de verschillende analysemethoden opgenomen:

- **Visuele inspectie:** Visuele inspecties zijn bedoeld om drijfvlagen van blauwalgen in of nabij zwemwaterlocaties te signaleren.
- **Fluoroprobe:** de fluoroprobe meet specifieke fluorescente pigmenten in het fytoplankton. De fluorescentie-signalen worden voor blauwalgen omgerekend naar μg cyanochlorofyl/l als maat voor de biomassa blauwalgen. De fluoroprobe maakt geen onderscheid tussen toxische en niet-toxische blauwalgen.
- **Microscopie** (celtellingen en biovolume): Bij de analyse worden de cellen geteld van alle potentieel toxische geslachten en soorten (meer dan de 5 geslachten uit het Blauwalgenprotocol). Bij het tellen kan, indien gewenst, ook een dichtheidsschatting voor verschillende geslachten/soorten gemaakt worden. Door meting van een aantal individuele cellen kan achteraf het biovolume van de potentieel toxische geslachten worden berekend.
- **qPCR toxines:** De productie van toxines door blauwalgen wordt gereguleerd door specifieke genen in het DNA. Alleen blauwalgen met zo'n gen kunnen toxines produceren. Met de qPCR toxine methode worden deze specifieke genen gemeten. De qPCR toxine methode levert daarmee informatie over de potentiële aanmaak van de toxines door blauwalgen. De aanwezigheid van het gen is voorwaarde voor de aanmaak van toxines maar zegt nog niets over de productiesnelheid van de toxines op cel niveau en daarmee de actuele gehalten van toxines in het water. Voor elk toxine-gen wordt een aparte test uitgevoerd. Er zijn momenteel testen beschikbaar voor microcystine (mcy), nodularine (nda) saxitoxine (stx), cylindrospermopsine (cyr) en anatoxine (ana).
- **ELISA:** ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*) testen zijn gebaseerd op de werking van het immuunsysteem bij hogere dieren. Het immuunsysteem reageert op de blootstelling van lichaamsvreemde stoffen (allergenen, toxines) door antistoffen te maken. Deze antistoffen helpen het organisme bij het onschadelijk maken van de stof door er aan te gaan hangen (binden). In een ELISA test wordt dit mechanisme van stofherkenning en binding gebruikt om heel specifiek en gevoelig toxines te meten. Voor de belangrijkste blauwalg toxines zijn zulke testen beschikbaar.
- **LC-MS/MS:** LC-MS/MS is een analytisch chemische methode waarmee de gehalten van blauwalgtoxines wordt gemeten. Bij LC-MS/MS worden de toxinemoleculen in twee stappen gedetecteerd via zeer gevoelige massaspectroscopie. Bij de eerste stap wordt het toxine herkend op basis van zijn totale molecuulmassa. In de tweede stap valt het molecuul uiteen en worden zijn brokstukken herkend. Met de informatie uit deze metingen wordt nauwkeurig de molecuulstructuur van het toxine gereconstrueerd.

LC-MS/MS is de techniek is waarmee het gezondheidsrisico voor zwemmers het best wordt ingeschat: de concentratie toxines wordt bepaald. De concentratie toxines wordt in dit onderzoek gezien als 'standaard' waartegen de andere analysemethoden worden afgezet om een snellere en goedkopere analyse te vinden die de resultaten van de LC-MS/MS techniek zo goed mogelijk benadert.

2.2 UITVOERING

In de tweede fase is het conceptprotocol toegepast in een aantal door waterbeheerders aangedragen blauwalggevoelige plassen (Tabel 2.1), tijdens het zwemseizoen van 2019. Dit betekent dat naast de reguliere bemonstering met huidige technieken, de monsternemer een foto heeft gemaakt van de locatie en extra water bemonsterd voor de analyses met de technieken zoals in Figuur 2.1 opgenomen.

TABEL 2.1 BLAUWALGGEVOELIGE PLASSEN DIE BEMONSTERD ZIJN TIJDENS ZWEMSEIZOEN 2019

Nr.	Naam	Organisatie	Contactpersoon
1	Paterswoldse meer	WS Noorderzijlvest	Jannes Schenkel
2	Plas te Werve	HH van Delfland	Rob Bovelanders
3	Binnenschelde	WS Brabantse Delta	Guido Waajen
4	Twiske Speelsloot	HH Hollands Noorderkwartier	Saskia Zierfuss
5	Zwaansmeer	HH Hollands Noorderkwartier	Saskia Zierfuss
6	Oudegaasterbrekken	Wetterskip Fryslân	Richard Feenstra
7	Zuidlaardermeer	WS Hunze en Aa's	Hermen Klomp
8	Kurenpolder	WS Rivierenland	Arnold Osté
9	Valkenburgse meer	HH van Rijnland	Johan Oosterbaan
10	Kotermeerstal	WS Vechtstromen	Alberta Groteboer
11	Sloterstrand	Waternet	Joost Stoffels

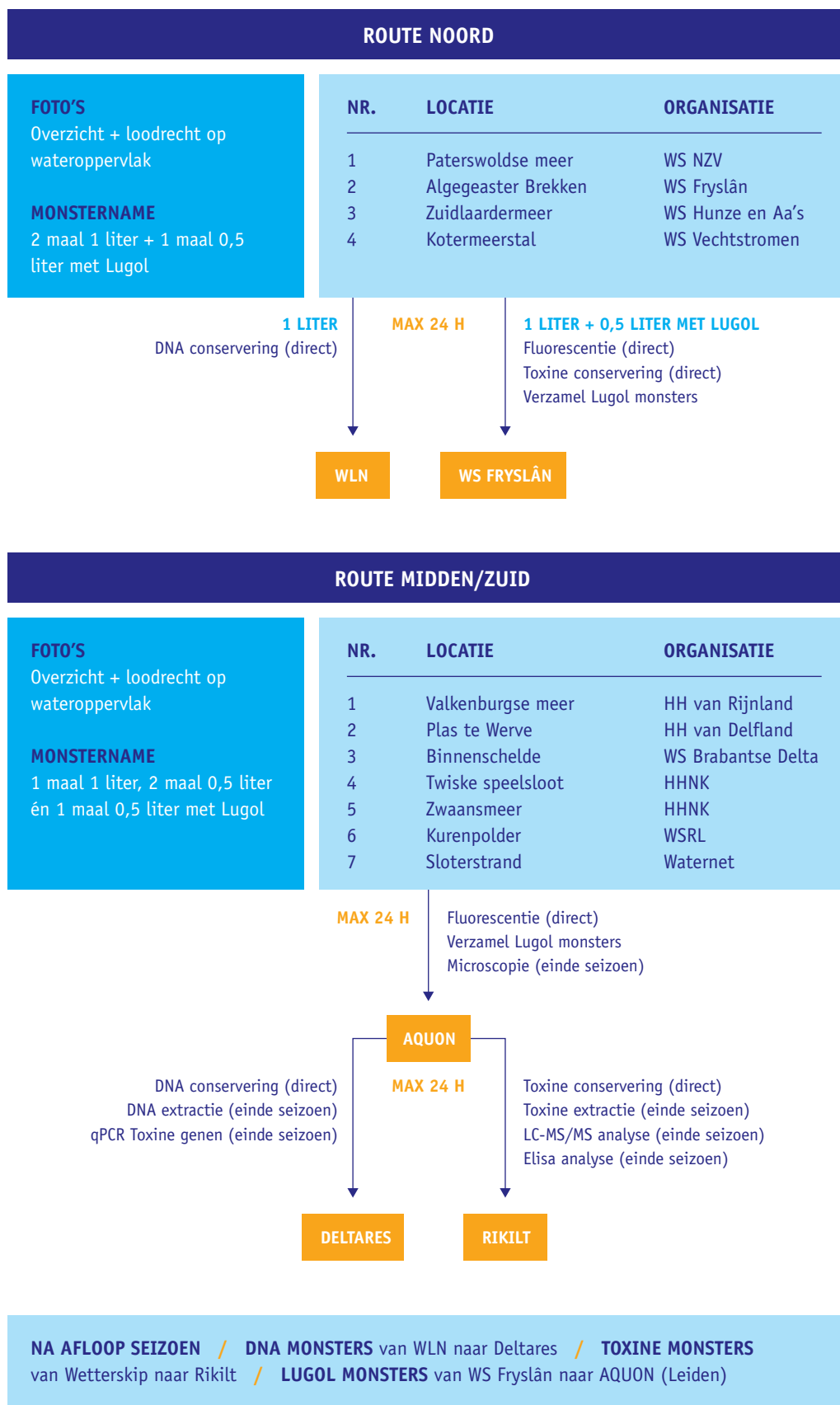
Bij de opzet van het onderzoek zijn de volgende keuzes (met onderbouwing) gemaakt.

- Het onderzoek bevat voldoende cases voor een gedegen onderzoek.
- Naast gebruik van de nieuwe technieken (DNA-analyse, ELISA en LC-MS/MS) zijn ook de huidige gebruikte methoden fluoroprobe en celtelling (biovolume) onderdeel van dit onderzoek. Alleen door ook deze huidige methoden in dit onderzoek voor alle cases op vergelijkbare wijze uit te voeren is een goede vergelijking mogelijk tussen huidige technieken en nieuwe technieken.
- Het laten uitvoeren van identieke analyses door één laboratorium of kennisinstituut voorkomt dat de uitkomsten mogelijk verklaard kunnen worden door verschillen in wijze van analyse. Dit is in het onderzoek haalbaar gebleken voor microscopie (AQUON), DNA-extractie en qPCR toxinegenen (Deltares) en toxine extractie+ELISA+LC-MS/MS (RIKILT). Voor de fluoroprobe-metingen en DNA conservering is dat echter niet haalbaar gebleken. De koerierskosten waren te hoog om alle monsters binnen 24 uur bij AQUON, Deltares en RIKILT te krijgen. Daarom is gekozen voor een Route Noord en een Route Midden/Zuid (Figuur 2.2). Voor elk van de analyses wordt wel één protocol gehanteerd (met uitzondering van fluoroprobe (veldmeting bij route Noord en laboratoriummeting bij Route Midden/Zuid).
- De volgende analyses zijn uitgevoerd op alle monsters:
 - visuele inspectie,
 - fluoroprobe,
 - microscopie,
 - conservering en analyse van qPCR toxinegenen,
 - conservering t.b.v. toxinebepaling (ELISA / LC-MS/MS).

De keuze op welke monsters de toxinebepaling uitgevoerd wordt, wordt gemaakt op basis van de resultaten van de reeds uitgevoerde analyses, aan het einde van het zwemseizoen. De reden dat niet alle monsters meegenomen zijn in ELISA / LC-MS/MS is financieel.

- De analyse qPCR fycocyanine, om een schatting te maken van het aantal blauwalgcellen, is niet uitgevoerd in dit onderzoek. De reden hiervoor is financieel. Eventueel kan deze analyse in een later stadium nog worden uitgevoerd op geconserveerde monsters.

FIG 2.2 ROUTING VAN MONSTERS ONDERZOEK 2019



De protocollen die gevolgd zijn in dit project zijn:

- **Fluoroprobe:** AQUON B HYB 009 - FluoroProbe - v-001.a
- **Filtratieprotocol tbv toxinebepaling:** RIKILT Filtration water samples for Stowa/Aquon
- **Biovolume:** AQUON V HYB 008 - Kwantitatieve bepaling van de celdichtheid en biovolume van potentieel toxische blauwalgen en AQUON F V HYB 008-06 - Kwantitatieve analyse telafspraken potentieel toxische blauwalgen - v-001
- **DNA extractie:** 250 ml oppervlaktewater is gefiltreerd over een 0,22µm membraanfilter, waarvan microbiële DNA is geïsoleerd met behulp van DNeasy PowerBiofilm van Qiagen (Conform NEN6254)
- **DNA analyse:** De aanwezige toxine genen in het geïsoleerde DNA zijn gekwantificeerd met PhytoXigene™ CyanoDTec kit (Diagnostic Technology, Australia) volgens het meegeleverde protocol
- **Toxine extractie:** De filters zijn geëxtraheerd zoals beschreven in de genoemde SOP's (zie Toxine analyse LC-MS/MS)
- **Toxine analyse LC-MS/MS:** LC-MS/MS conform SOP A1167 voor microcystines en nodularine. LC-MS/MS conform SOP A1282 voor anatoxines en cylindrospermopsines
- **Toxine analyse ELISA:** microcystine-ADDA ELISA kit van Enzo en Anatoxin-a ELISA kit van Abraxis

2.3 ANALYSE

In fase 3 zijn de resultaten geanalyseerd middels data-analyse. Ten behoeve van de data-analyse zijn de gegevens afkomstig van de verschillende laboratoria samengevoegd in één werkbaar spreadsheet. Aansluitend is een datacontrole uitgevoerd en zijn zo nodig aanpassingen gedaan aan de invoerdata. Om inzicht te krijgen in de dynamiek van de diverse blauwalgen parameters zijn draaitabellen gegenereerd die per locatie te beoordelen zijn.

Om (lineaire) verbanden met de diverse parameters te leggen en te bepalen zijn correlatie coëfficiënten (r) berekend met Pearson's correlatietoets. Tevens is de significantie (p) van deze correlaties bepaald. In dit onderzoek is Pearson's gebruikt om snel inzicht te krijgen in relaties. Er is geen rekening gehouden met afhankelijkheid van waarnemingen, uitschieters etc. Voor Pearson's correlatietoets is aangehouden: $0.00 < r < 0.30$: nauwelijks of geen correlatie; $0.30 < r < 0.50$: lage correlatie; $0.50 < r < 0.70$: middelmatige correlatie; $0.70 < r < 0.90$: hoge correlatie; $0.90 < r < 1.00$: zeer hoge correlatie.

Op basis van de resultaten zijn de onderzoeksvragen uit [paragraaf 1.2](#) beantwoord.

.....



HOOFDSTUK 3 RESULTATEN MONITORING

In dit onderzoek zijn watermonsters verzameld van 11 locaties verspreid door het land (Tabel 3.1). Het aantal monsters dat per locatie verzameld is, loopt uiteen van 7 tot 12 en was afhankelijk van de intensiteit van de zwemwaterbemonsteringen. De watermonsters zijn verzameld op reguliere zwemwaterlocaties. Er is geen extra moeite ondernomen om drijfslagen te bemonsteren. In totaal zijn er 102 watermonsters verzameld. Op al deze monsters zijn chlorofyl analyses (m.b.v. fluoroprobe), celtellingen & biovolume (m.b.v. microscopie) en DNA-analyses uitgevoerd. Op basis van de uitkomsten van de fluoroprobe analyse zijn keuzes gemaakt voor de analyse van 50 monsters voor de toxine analyse (m.b.v. LC-MS/MS en ELISA). De toxines microcystine, nodularine, anatoxine en cylindrospermopsine zijn bepaald. In Bijlage 2 is een overzicht opgenomen van de toxines die verschillende soorten blauwalg produceren, inclusief een uitleg hoe de verschillende toxines werken.

TABEL 3.1 AANTAL MONSTERS PER ZWEMWATERLOCATIE

Nr.	Naam	Aantal monsters	Aantal monsters
		Chlorofyl, celtelling, biovolume, DNA analyse	Toxine analyse
1	Paterswoldse meer	7	3
2	Plas te Werve	8	8
3	Binnenschelde	9	8
4	Twiske Speelsloot	10	3
5	Zwaansmeer	11	6
6	Oudegaasterbrekken	9	7
7	Zuidlaardermeer	7	3
8	Kurenpolder	11	3
9	Valkenburgse meer	12	3
10	Kotermeerstal	9	3
11	Sloterstrand	10	3
Totaal		103	50

3.1 RESULTATEN PER LOCATIE

Hieronder worden voor een aantal locaties de resultaten gepresenteerd van fluoroprobe, biovolume, DNA en toxines. Aan de hand van deze locaties wordt een zo breed mogelijk beeld geschetst van wat de verschillende methodieken aan resultaten opleveren. De data van de overige locaties zijn terug te vinden in Bijlage 1.

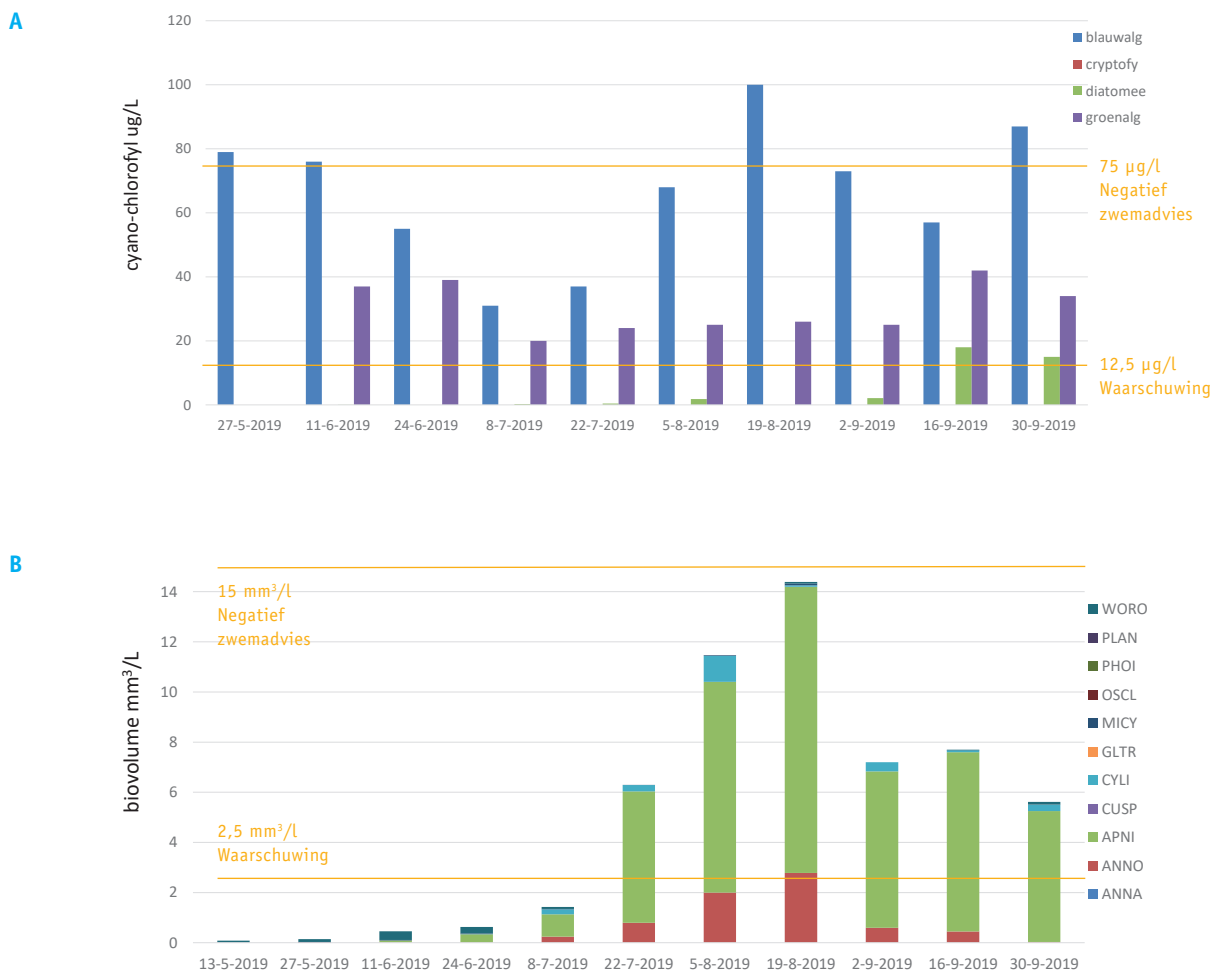
3.1.1 Binnenschelde

In het zwemwaterseizoen van 2019 is op de locatie Binnenschelde (figuur 3.1) bijna het gehele seizoen een concentratie aan cyanochlorofyl gemeten die aanleiding gaf om een waarschuwing voor deze locatie af te geven. De hoogst gemeten concentratie was ca. 100 µg/l en gemeten op 19 augustus. Op dat moment werd de cyanobacterie populatie gedomineerd door het genus *Aphanizomenon*, met ook een behoorlijk aandeel van het genus *Anabaena*. Het biovolume van potentieel toxische blauwalgen steeg pas boven waarschuwnings-niveau vanaf 27 juli. Hoge waarden voor cyanochlorofyl, maar lage waarden voor biovolume in het voorjaar en begin zomer kunnen verklaard worden door het feit dat met een cyanochlorofyl-meting alle blauwalgen meegenomen worden met de biovolume bepaling alleen potentieel toxische blauwalgen. Blijkbaar komen in het eerste deel van het zwemseizoen voornamelijk niet-toxische blauwalgen voor.

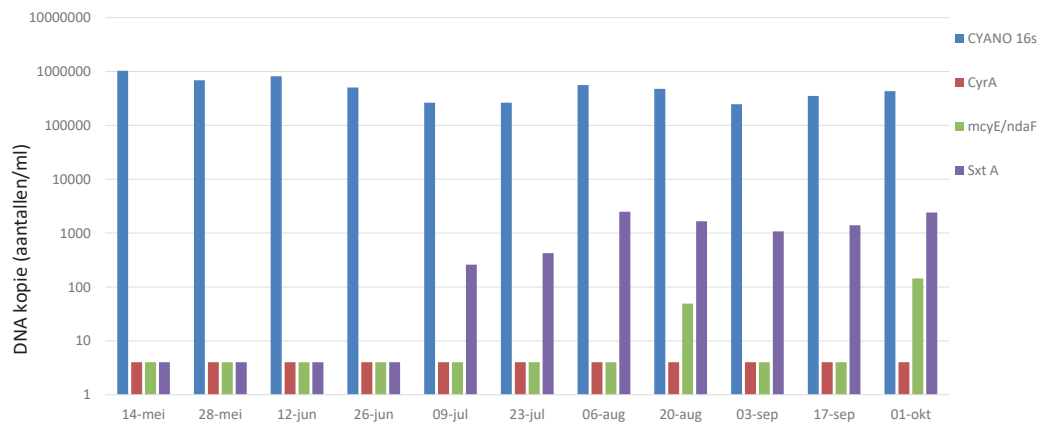
De aanwezigheid van de genera *Aphanizomenon* en *Anabaena* hebben in de maand augustus geleid tot een meetbare hoeveelheid anatoxine, met een maximum van 60 ng/l op 2 september. Op 2 september was de cyanobacterieconcentratie al weer op zijn retour. Op basis van de toxinegenen zou ook het toxine microcystine in het water aangetroffen kunnen worden en dat blijkt ook het geval in juni 2019 (concentraties ca. 0,25 g/l). Dat komt echter niet overeen met de dynamiek van de *mcyE* DNA resultaten, die pas in augustus en september meetbaar zijn. Op basis van de DNA analyse zou er mogelijk saxitoxine in het water aanwezig zou kunnen zijn. De analyse van dit toxine is echter in dit onderzoek niet uitgevoerd.

FIG 3.1 RESULTATEN BINNENSCHELDE ZWEMSEIZOEN 2019

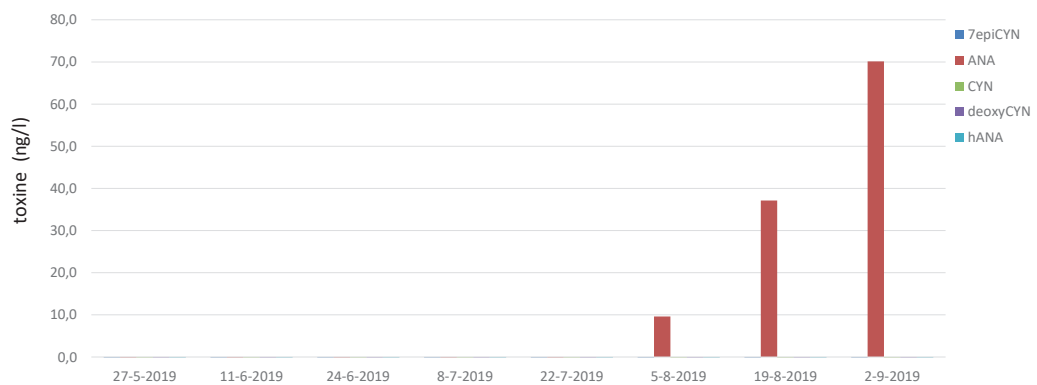
Relevante grenswaarden uit Blauwalgenprotocol (2012) zijn in rood aangegeven. Zie ook Tabel 3.3. A: Hoeveelheid cyanochlorofyl ($\mu\text{g/l}$) per functionele groep. B: Biovolume (mm^3/l) per genus. C: Aanwezigheid van toxinegenen (DNA-kopieën/ml) waarbij *Cyano16S*= algemeen cyanobacterie gen, *CyrA*= gen voor cylindrospermopsine, *McyE/ndaF*= gen voor microcystine en *SxtA*= gen voor saxitoxine. D: Hoeveelheid toxine (ng/l) waarbij 7epiCYN= cylindrospermopsine variant, Ana=anatoxine, CYN= cylindrospermopsine, deoxyCYN=cylindrospermopsine variant en hANA=anatoxine variant, verschillende vormen microcystine (YR, RR, LY, LW, LR, LF, LA, dmRR en dmLR) en nodularine (NOD).



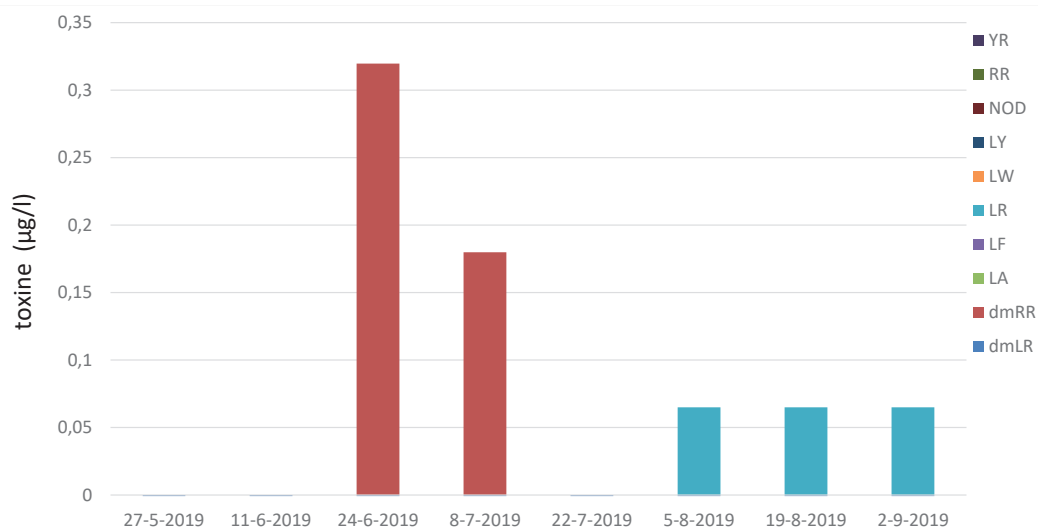
C



D1



D2



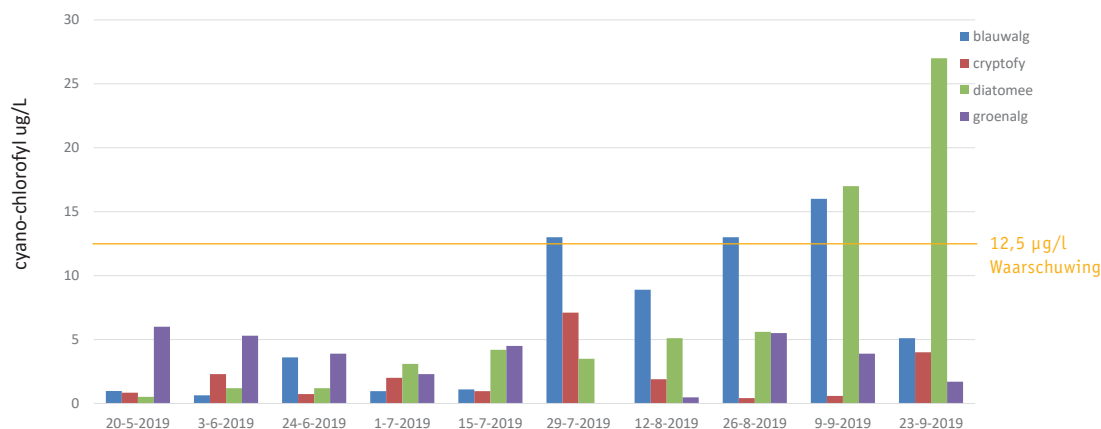
3.1.2 Kurenpolder

Op basis van zowel de fluoroprobe-analyse als op basis van het gemeten biovolume was er op de locatie Kurenpolder (figuur 3.2) in 2019 geen reden tot verhoogde alertheid of actie. Het biovolume werd op 29 juli gedomineerd door het genus *Anabaena*. Later in het seizoen werd de cyanobacteriegemeenschap meer gedomineerd door het genus *Aphanizomenon*. Vanaf 12 augustus komt ook *Cuspidothrix* opzetten. Tegelijk met de opkomst van deze soort komt ook het toxine cylindrospermopsine opzetten. Het is een toxine dat niet vaak gemeten wordt in Nederlandse wateren. Opvallend is dat de genen die coderen voor de productie van cylindrospermopsine ook aangetroffen zijn, al vanaf 30 juli. Dit is veel eerder dan wanneer de potentiële producent *Cuspidothrix* zichtbaar wordt in de biovolume analyses. Opnieuw zijn ook genen aangetroffen die indiceren dat er saxitoxine -producenten in het water voor kunnen komen. Of er daadwerkelijk saxitoxine is geproduceerd is niet te controleren aangezien saxitoxine niet gemeten is in de toxine-analyse.

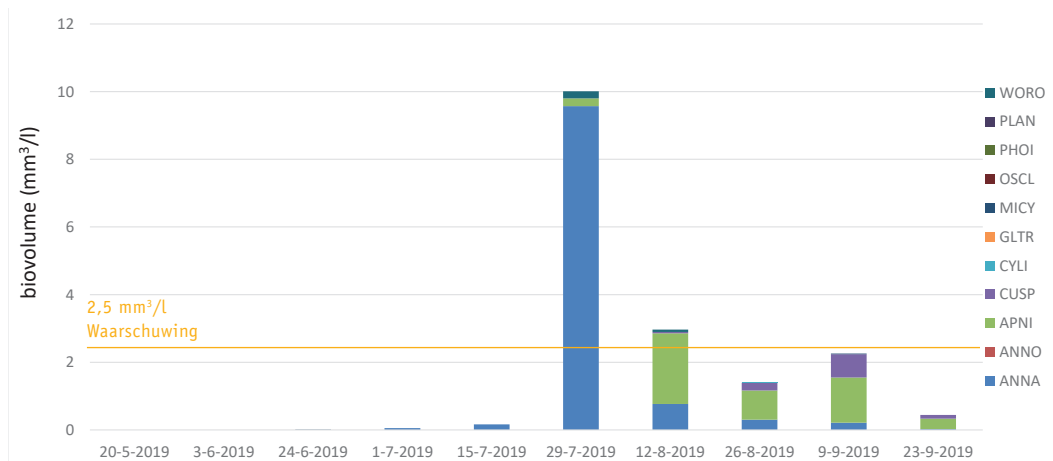
FIG 3.2 RESULTATEN KURENPOLDER ZWEMSEIZOEN 2019

Relevante grenswaarden uit Blauwalgenprotocol (2012) zijn in rood aangegeven. A: Hoeveelheid cyanochlorofyl ($\mu\text{g/l}$) per functionele groep. B: Biovolume (mm^3/l) per genus. C: Aanwezigheid van toxinegenen (DNA-kopieën/ml) waarbij Cyano16S= algemeen cyanobacterie gen, CyrA= gen voor cylindrospermopsine, McyE/ndaF= gen voor microcystine en SxtA= gen voor saxitoxine. D: Hoeveelheid toxine (ng/l) waarbij 7epiCYN= cylindrospermopsine variant, Ana=anatoxine, CYN= cylindrospermopsine, deoxyCYN=cylindrospermopsine variant en hANA=anatoxine variant.

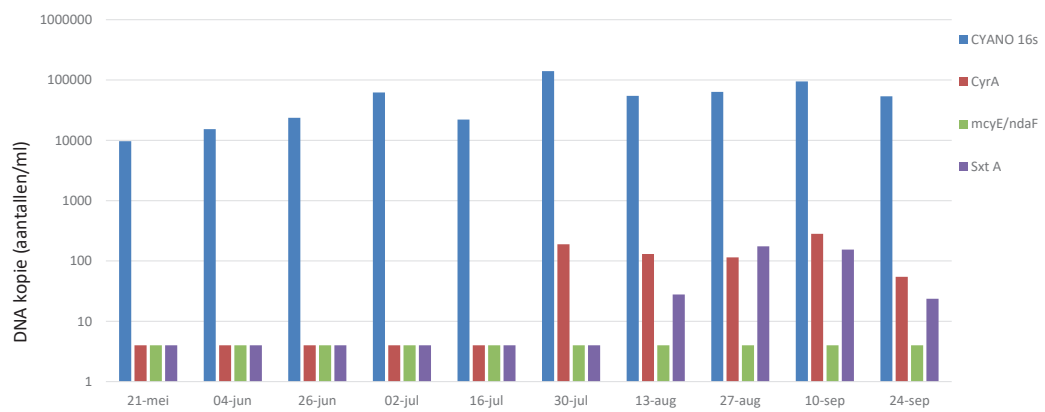
A



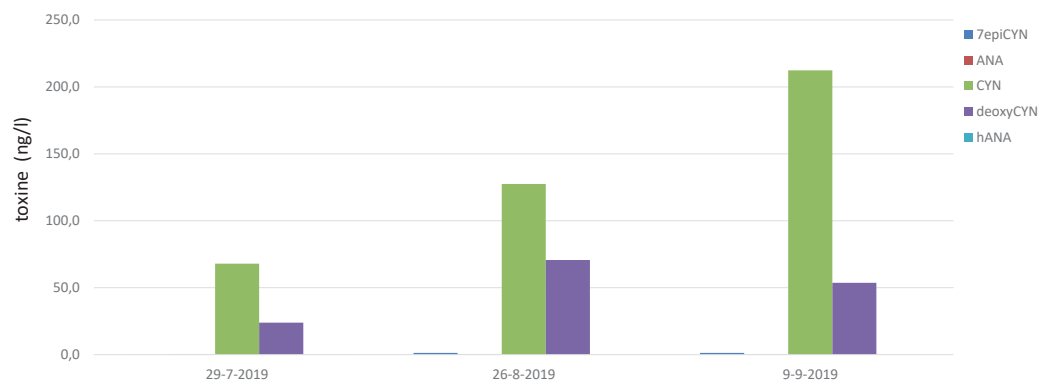
B



C



D



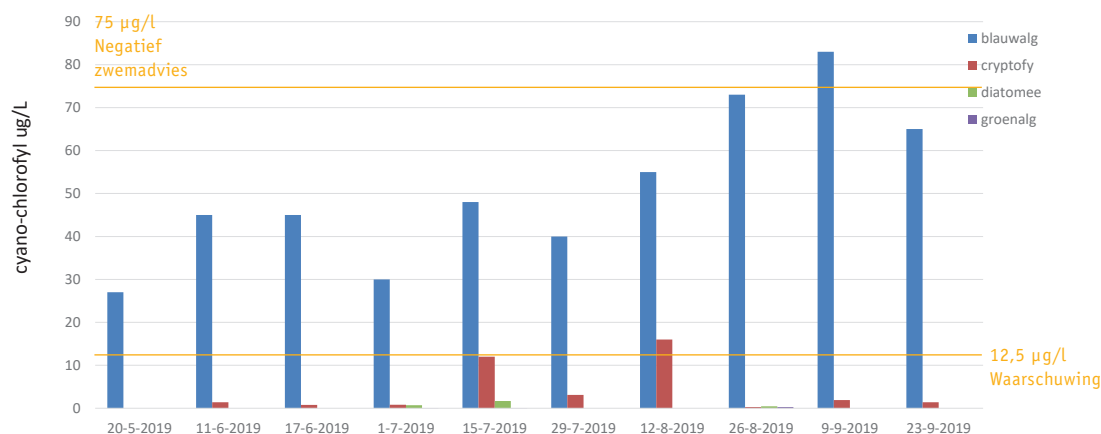
3.1.3 Plas te Werve

De zwemwaterlocatie Plas te Werve (figuur 3.3) is nagenoeg het gehele zwemwaterseizoen 2019 geplaagd door een hoge concentratie cyanobacteriën. Zowel op basis van de fluoroprobe-analyses als op basis van het biovolume was nagenoeg het gehele seizoen een waarschuwing op zijn plaats. Behalve dat er veel biomassa aanwezig was in de plas bleken de aanwezige cyanobacteriën de nodige toxines te kunnen produceren. Het in de plas dominerende genus *Planktothrix* staat bekend als een grote microcystine-produceerder, wat ook wel blijkt uit de toxine-analyses. Vooral vroeg in het seizoen, in juni 2019, worden de hoogste waarden gemeten. De concentraties bleven echter onder de grens van 20 µg/l, de in oudere blauwalgenprotocollen gehanteerde kritieke grens voor het afsluiten van zwemwaterlocaties én de huidige WHO grenswaarde. Ook de genen die coderen voor de productie van microcystines zijn in de plas duidelijk aanwezig. Opnieuw zijn ook genen aangetroffen die indiceren dat er saxitoxine -producenten in het water voor kunnen komen. Of er daadwerkelijk saxitoxine is geproduceerd is niet te controleren aangezien saxitoxine niet gemeten is in de toxine-analyse.

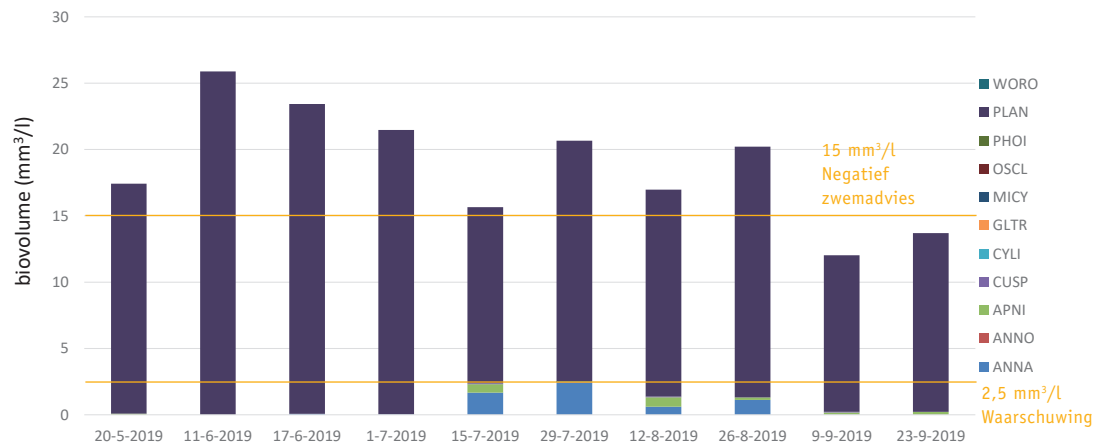
FIG 3.3 RESULTATEN PLAS TE WERVE ZWEMSEIZOEN 2019

Relevante grenswaarden uit Blauwalgenprotocol (2012) zijn in rood aangegeven. A: Hoeveelheid cyanochlorofyl (µg/l) per functionele groep. B: Biovolume (mm³/l) per genus. C: Aanwezigheid van toxinegenen (DNA-kopieën/ml) waarbij Cyano16S= algemeen cyanobacterie gen, CyrA= gen voor cylindrospermopsine, McyE/ndaF= gen voor microcystine en SxtA= gen voor saxitoxine. D: Hoeveelheid microcystine en nodularine (µg/l), onderverdeeld in verschillende vormen microcystine (YR, RR, LY, LW, LR, LF, LA, dmRR en dmLR) en nodularine (NOD).

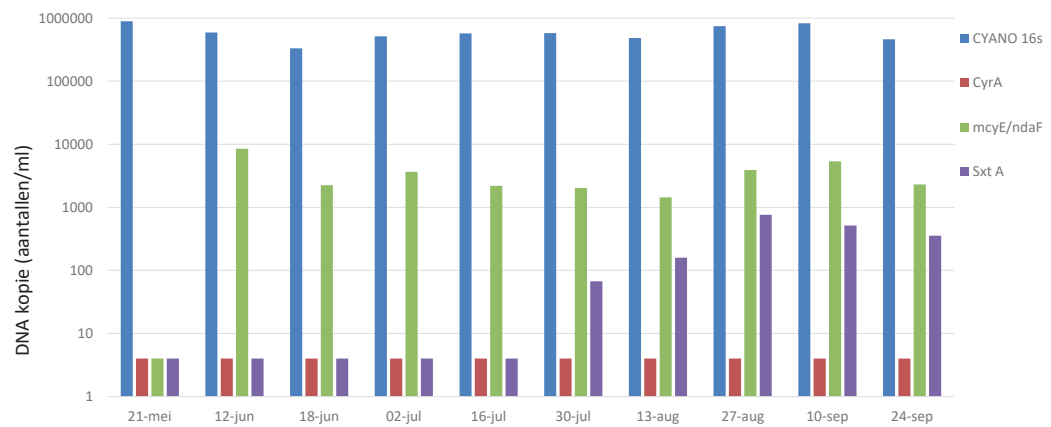
A



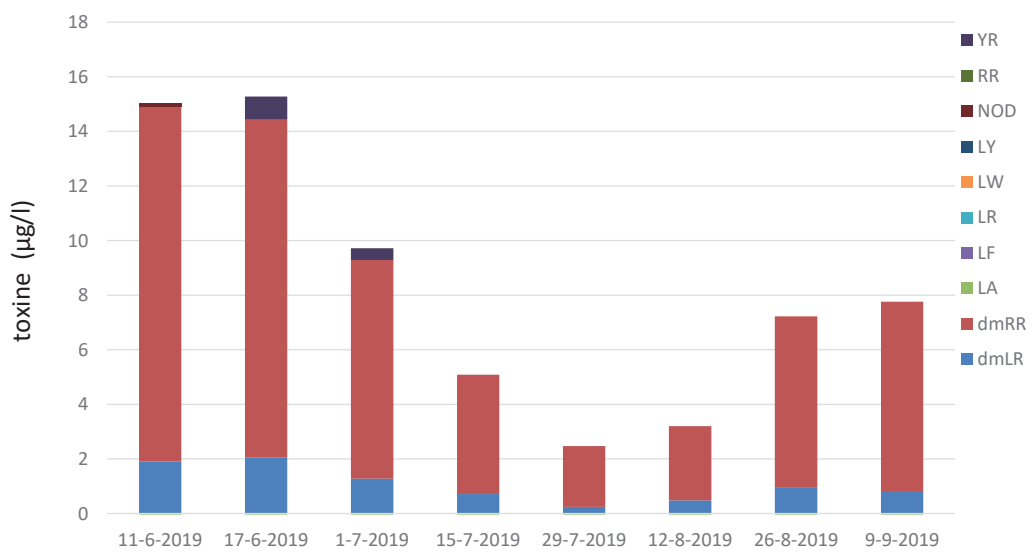
B



C



D



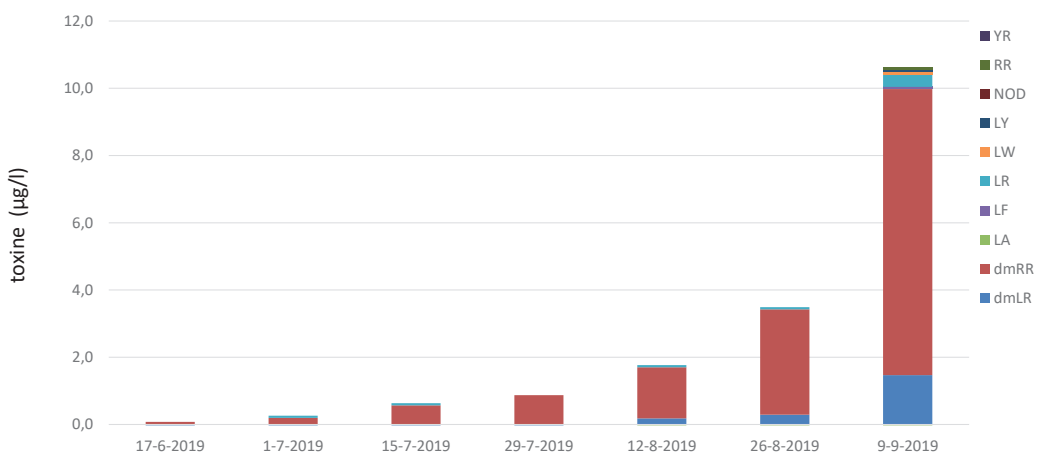
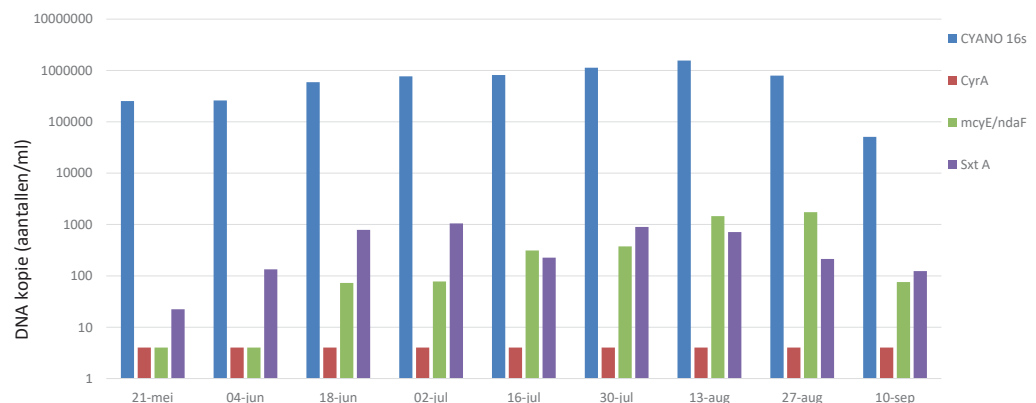
3.1.4 Oudegaasterbrekken

In de Oudegaasterbrekken (figuur 3.4) is op verschillende manieren een duidelijke dynamiek in cyanobacterieontwikkeling gedurende het zwemseizoen van 2019 waarneembaar. Vanaf halverwege juni is op basis van het cyanochlorofyl al een verhoogde alertheid nodig: concentraties zijn vanaf dat moment ruim boven de 12,5 µg/l. De rest van het seizoen blijft de concentratie hoog. Ook op basis van biovolume is vanaf juni een waarschuwing (>2,5 mm³/l) en soms een negatief zwemadvies (>15 mm³/l) op zijn plaats. Dit geldt zeker in september bij de opkomst van de toxine-producerende *Planktothrix* soorten. De gemeten concentratie microcystine lijkt onlosmakelijk verbonden met de aanwezigheid van dit genus. Ook in de concentraties genen die coderen voor de microcystines is deze dynamiek goed waarneembaar. Opnieuw zijn ook genen aangetroffen die indiceren dat er saxitoxine-producenten in het water voor kunnen komen. Of er daadwerkelijk saxitoxine is geproduceerd is niet te controleren aangezien saxitoxine niet gemeten is in de toxine-analyse.

FIG 3.4 RESULTATEN OUDEGAASTERBREKKEN ZWEMSEIZOEN 2019

Relevante grenswaarden uit Blauwalgenprotocol (2012) zijn in rood aangegeven. A: Hoeveelheid cyanochlorofyl (µg/l) per functionele groep. B: Biovolume (mm³/l) per genus. C: Aanwezigheid van toxinegenen (DNA-kopieën/ml) waarbij Cyano16S= algemeen cyanobacterie gen, CyrA= gen voor cylindrospermopsine, McyE/ndaF= gen voor microcystine en SxtA= gen voor saxitoxine. D: Hoeveelheid microcystine en nodularine (µg/l), onderverdeeld in verschillende vormen microcystine (YR, RR, LY, LW, LR, LF, LA, dmRR en dmLR) en nodularine (NOD).





3.2 VERGELIJKING ANALYSEMETHODEN

In [paragraaf 3.1](#) en [bijlage 1](#) is in beeld gebracht hoe de verschillende analysetechnieken samen een beeld vormen van de populatie ontwikkelingen op een (zwemwater)locatie. De vraag is echter hoe deze verschillende technieken zich tot elkaar verhouden. Welke heeft nu de meest voorspellende waarde als het aankomt op de daadwerkelijke risico's die cyanobacteriën met zich mee brengen: de toxines? Om deze vraag te beantwoorden zijn de op dit moment beschreven gehanteerde analysetechnieken in het Zwemwaterprotocol (2012) (te weten fluoroprobe en cellellingen) uitgezet tegen technieken die potentieel snel inzicht kunnen geven in gezondheidsrisico's in een zwemwater, te weten de PCR-technieken om toxine-genen aan te tonen én de toxine-analyse.

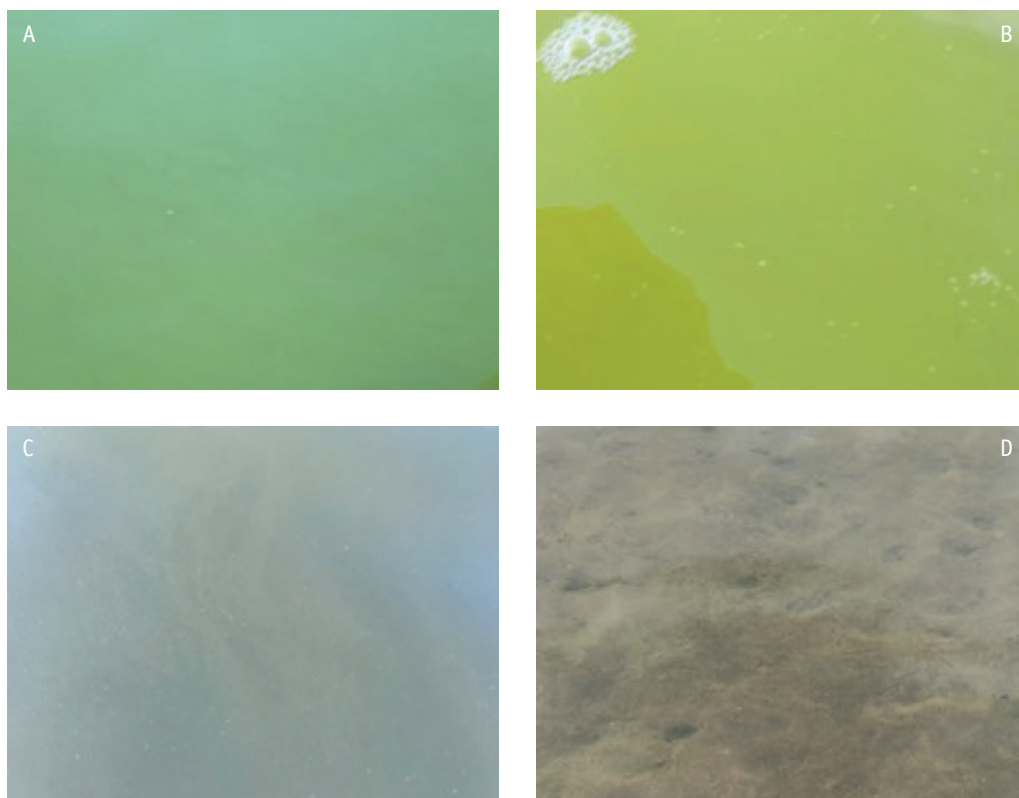
3.2.1 Visuele inspectie

Tijdens alle monsternames zijn de monsternemers verzocht om de visuele inspectie ook vast te leggen met behulp van mobiele telefoons. Het verzoek was onder andere om een verticale opname te maken. Resultaten van dergelijke foto's zijn opgenomen in [figuur 3.5](#). Uit de figuur blijkt dat er behoorlijke verschillen op kunnen treden tussen de kleuringen van het water. De kleurschakeringen geven mogelijk ook al wat inzicht in soortsamenstelling. Zo zijn de foto's uit

de panels A en C gedomineerd door *Planktothrix* en in minder mate door *Anabeana* soorten, panel B wordt gedomineerd door *Aphanizomenon* soorten en in panel D zijn ten tijde van de opname geen blauwalgen aangetroffen. Op termijn valt te onderzoeken of kleurintensiteit ook iets kan zeggen over de aanwezige biomassa.

FIG 3.5 VISUELE WAARNEMING OPPERVLAKTEWATER

A) Put ter Werve 26 augustus 2019, B) Binnenschelde 19 augustus 2019, C) Oudegaasterbrekken 9 september 2019, D) Sloterplas 8 juli 2019.



3.2.2 Fluoroprobe versus toxinegenen en toxines

De fluoroprobe is een zeer algemeen screenende methode voor de dichtheid van cyanobacteriën in oppervlaktewater. Op basis van het in de cellen aanwezige pigment kunnen cyanobacteriën onderscheiden worden van diatomeeën, groenalgen en cryptofyten.

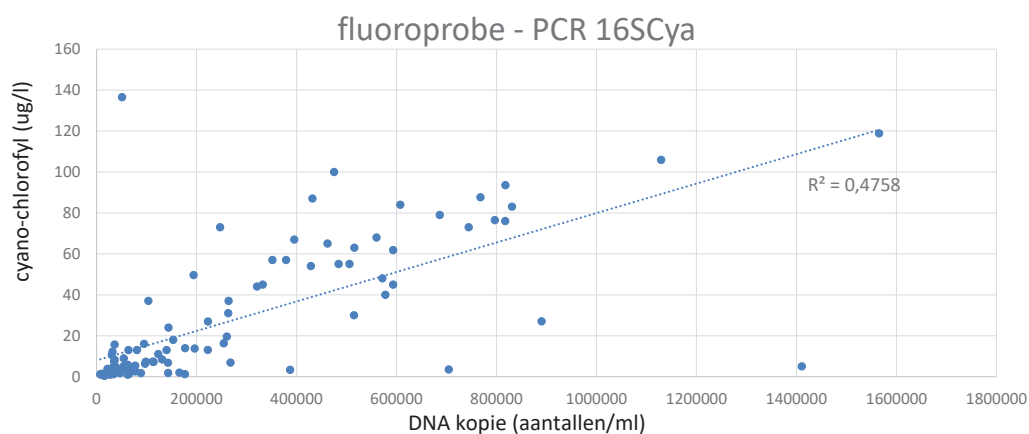
Een andere algemene maat voor de biomassa kan in theorie het aantal genkopieën zijn dat in cyanobacteriën aanwezig is. Uit onderstaande figuur blijkt dat er een lage match is tussen de 2 parameters ($R^2=0,48$) (Figuur 3.6, A).

De relatie tussen de fluoroprobe gegevens en de gemeten toxines (zowel microcystines, anatoxines en cylindrospermopsines) is daarentegen zeer zwak ($R^2=0,07$ voor de gehele dataset en $R^2=0,15$ voor lage waarden) (Figuur 3.6, B). Hieruit kan geconcludeerd worden dat de fluoroprobe geen voorspellende waarde heeft voor toxineconcentraties.

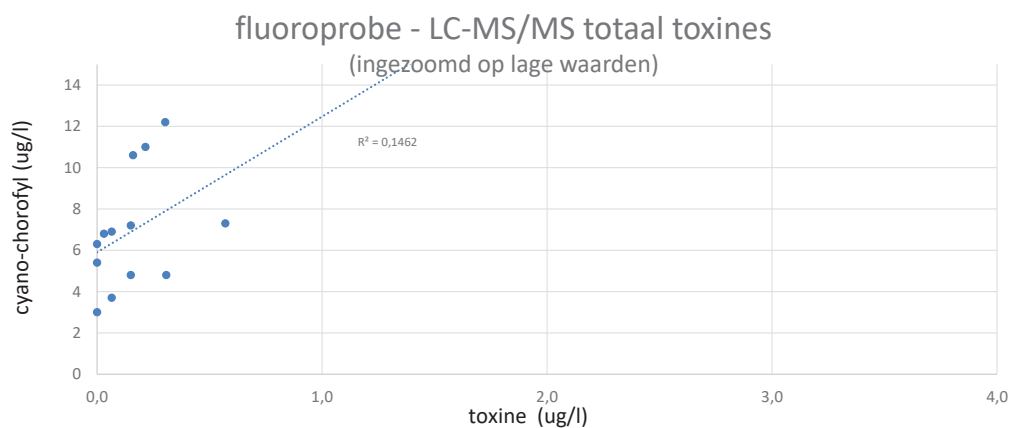
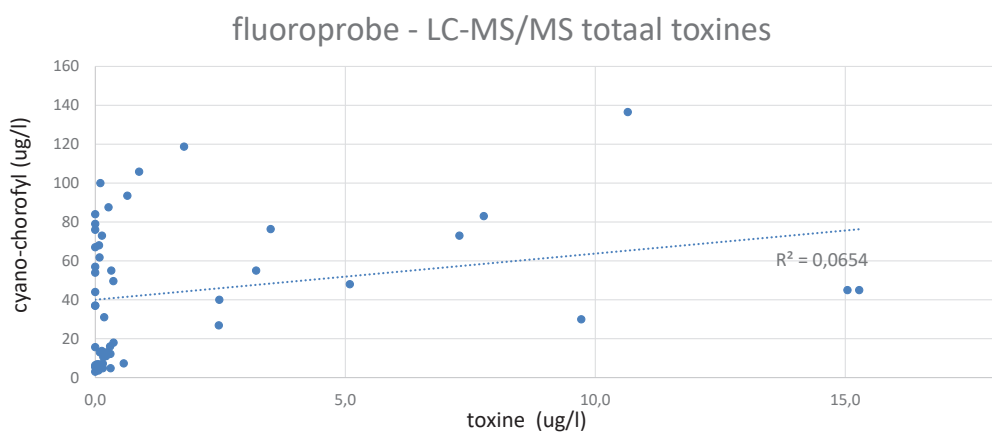
FIG 3.6 RELATIE CYANOCHLOROFYL EN TOXINE(GENEN)

A: Relatie tussen cyanochlorofyl (gemeten met fluoroprobe) en aantal genkopieën (bepaald met qPCR). B: Relatie tussen cyanochlorofyl (gemeten met fluoroprobe) en de totale toxineconcentratie (= alle toxines zoals bepaald met LC-MS/MS), zowel van de hele dataset (boven) als ingezoomd op een deel van de dataset (waarden cyanochlorofyl tot 12,5 µg/l) (onder).

A



B



3.2.3 Biovolume versus toxinegenen en toxines

Het toepassen van microscopie voor de analyse van fytoplankton in zijn algemeen en cyanobacteriën in het bijzonder is een klassieke methode die kennis en kunde vereist van hydrobiologisch analisten. Het berekenen van biovolumes van cyanobacteriën gebeurt door het kwantificeren van het aantal cellen en het vermenigvuldigen van het volume van een beperkt aantal cellen van ieder soort die aanwezig is in het preparaat. Het biovolume is een algemene maat voor de aanwezigheid van cyanobacterie-biomassa. Omdat er inzicht in de aanwezige soorten voorhanden is kan er met deze techniek verder ingezoomd worden op de potentieel toxische genera.

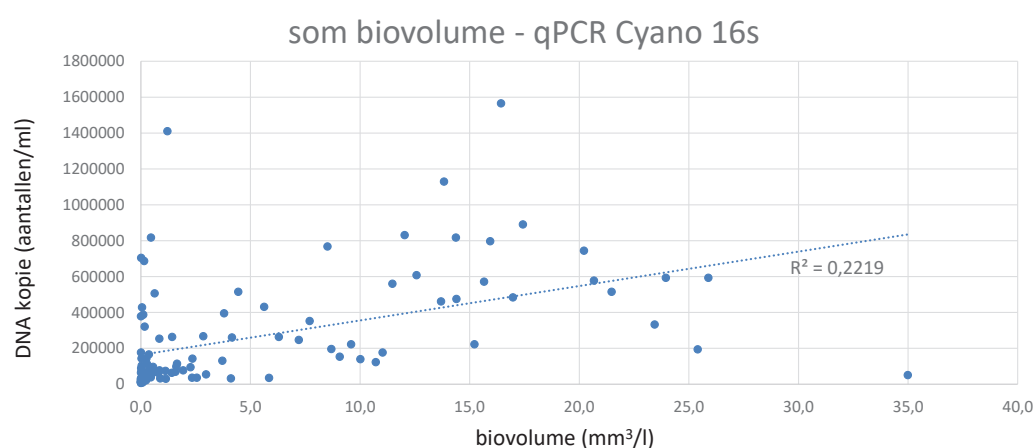
Hieronder is de som van het biovolume van alle potentieel toxische cyanobacteriën in de monsters uitgezet tegen het resultaat van DNA analyse met behulp van de marker die codeert voor alle cyanobacteriën: Cyano 16S-genen. De relatie tussen het biovolume en Cyano 16S is niet sterk ($R^2=0.22$) (Figuur 3.7, A). Er is wel een licht positieve relatie, maar ook lage biovolume-concentraties lijken te matchen met hoge concentraties Cyano 16S-genen en andersom.

Wanneer er meer ingezoomd wordt op genera die in potentie microcystines (*Microcystis*, *Planktothrix* en *Woronichinia*) kunnen produceren dan lijkt er een goede match te ontstaan met de gemeten microcystines ($R^2=0.82$) (Figuur 3.7, B). Hierbij moet wel aangetekend worden dat het aantal datapunten met positieve microcystine-concentraties beperkt is. Deze bevinding verdient mogelijk nadere uitwerking.

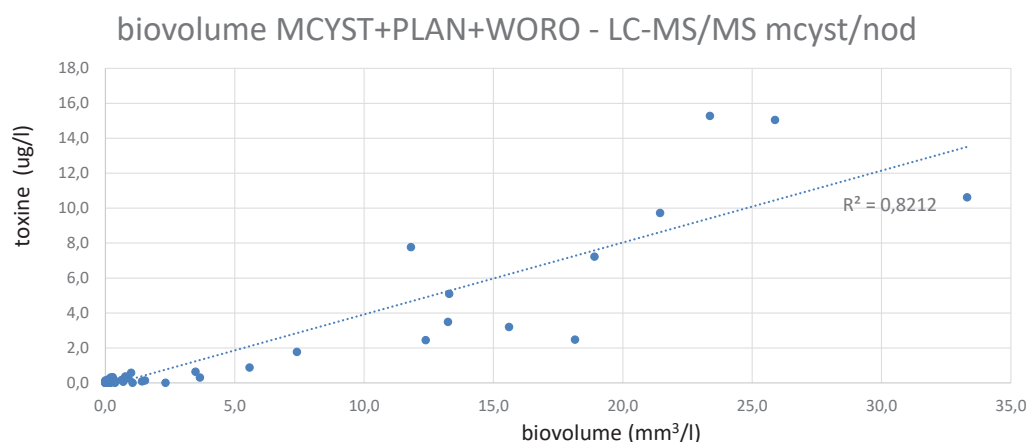
FIG 3.7 RELATIE BIOVOLUME EN TOXINE(GENEN)

A: Relatie tussen biovolume (gemeten met microscopie) en aantal genkopieën (bepaald met qPCR). B: Relatie tussen biovolume van microcystine producerende genera (*Microcystis*, *Planktothrix* en *Woronichinia*) (gemeten met microscopie) en de totale microcystineconcentratie (bepaald met LC-MS/MS).

A



B



3.2.4 Toxinegenen versus toxines en biovolume

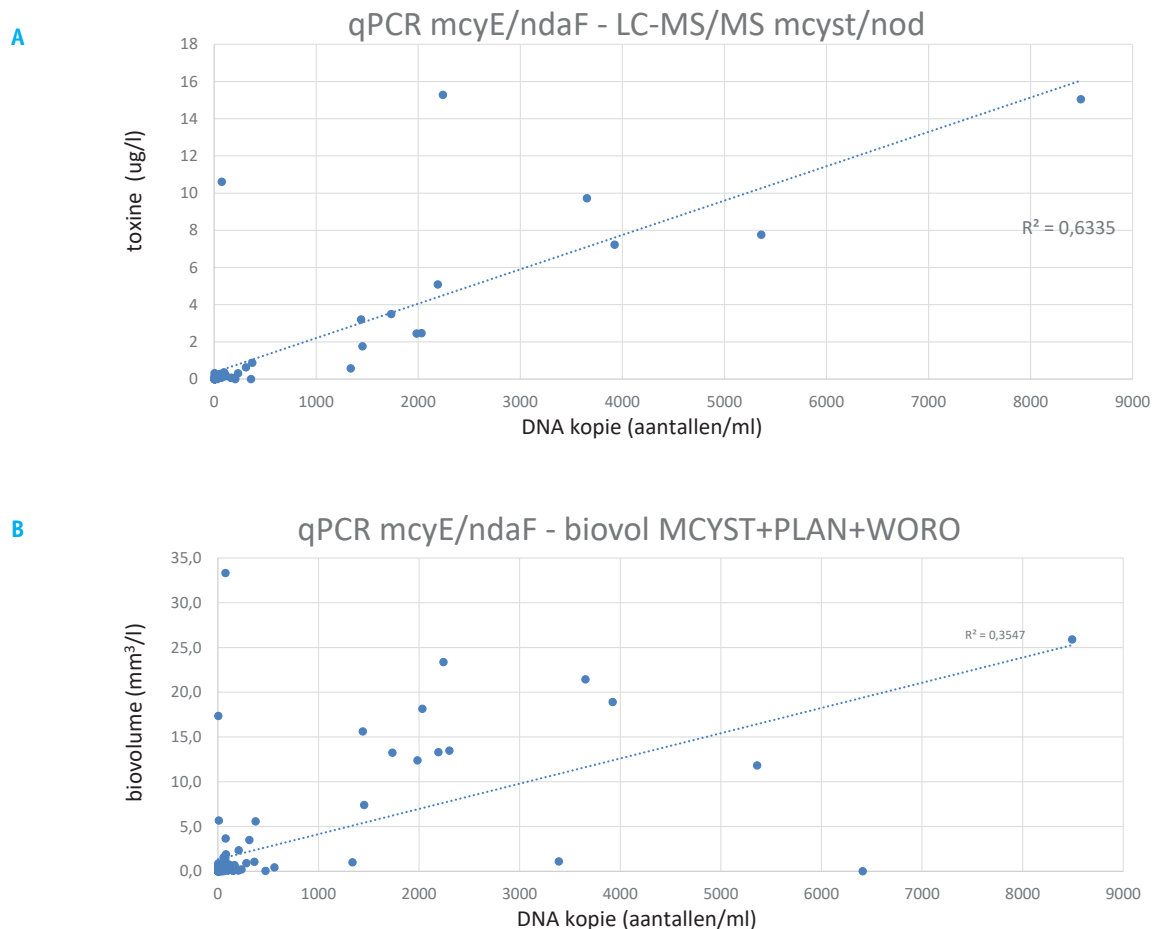
Eén van de veelbelovende technieken voor de toekomst is het gebruik van DNA-technieken voor de detectie van cyanobacteriën in het algemeen en van de toxinegenen in het bijzonder. De aanwezigheid van toxinegenen is een voorwaarde voor de productie van cyanotoxines. In de paragrafen hierboven zijn al enkele grafieken besproken waarin de algemene cyanobacterieprimer Cyano 16S toegepast is. In deze paragraaf meer aandacht voor het toxinegen *mcyE/ndsA*. Deze detecteert microcystine-genen zoals die door diverse genera (zoals *Microcystis*, *Planktothrix*, *Anabaena*) aangemaakt kunnen worden. De genen die coderen voor cylindrospermopsine laten we buiten beschouwing, daar zijn te weinig datapunten voor gevonden. De genen die coderen voor saxitoxine laten we eveneens buiten beschouwing, dat toxine is niet geanalyseerd in de LC-MS/MS assay.

Uit onderstaande figuur blijkt dat er een aardige match is tussen de gemeten toxines en de aanwezige *mcyE* genen ($R^2=0,63$) (Figuur 3.8, A). Ook hier geldt dat de dataset beperkt is ($n=33$) als gevolg van de weinige positieve microcystine-analyses in de LC-MS/MS.

De link tussen microcystine genen en het biovolume van potentiële microcystine producenten is laag ($R^2=0,35$) (Figuur 3.8, B).

FIG 3.8 RELATIE TOXINEGENEN EN TOXINES/BIOVOLUME

A: Relatie tussen aantal genkopieën van microcystine producende genera (*Microcystis*, *Planktothrix* en *Woronichinia*) (*mcyE/ndaF*) (bepaald met qPCR) en de microcystineconcentratie van (bepaald met LC-MS/MS). B: Relatie tussen aantal genkopieën van microcystine producende genera (*Microcystis*, *Planktothrix* en *Woronichinia*) (*mcyE/ndaF*) (bepaald met qPCR) en biovolume van potentiële microcystine producenten (gemeten met microscopie).



3.2.5 Toxines: ELISA en LC-MS/MS

In dit onderzoek zijn op vijftig geselecteerde monsters toxine analyses uitgevoerd met behulp van LC-MS/MS en de ELISA techniek. De laatst genoemde is een reactie waarbij de te meten stof wordt herkend door een antilichaam waarna een kleurreactie kan worden gemeten. De ELISA techniek is eenvoudiger in de uitvoering dan het gebruik van de LC-MS/MS techniek. Er zijn diverse ELISA kits verkrijgbaar met verschillende werkingmechanismen. In dit onderzoek is gewerkt met een microcystine-ADDA ELISA kit van Enzo en met de Anatoxin-a ELISA kit van Abraxis. De kits meten een breed scala aan microcystines en twee veel voorkomende anatoxines. Deze ELISA's zijn ontworpen voor het met minimale voorbereiding meten van toxines in oppervlaktewater. Omdat in deze studie de watermonsters zijn geconcentreerd op filters, zijn de filterextracten gemeten. Om dit te kunnen doen is op een aantal punten van het door de fabrikanten meegeleverde protocol afgeweken.

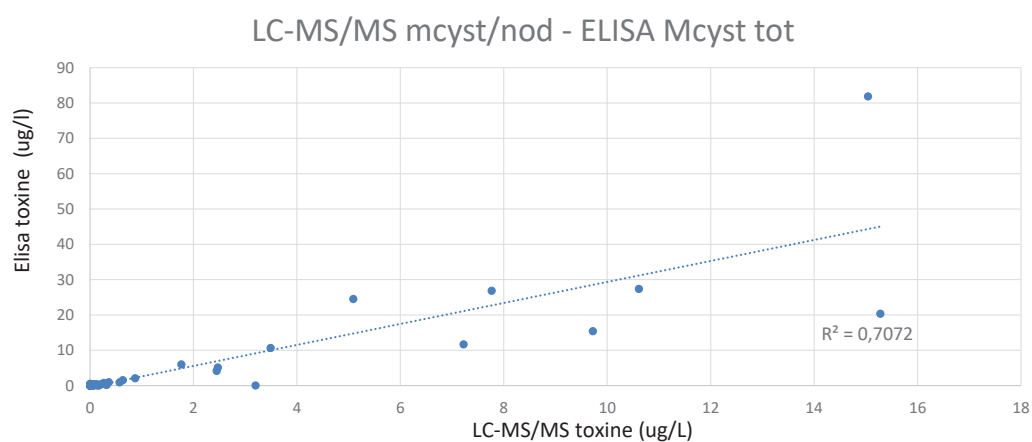
Om vergelijk tussen beide analysetechnieken mogelijk te maken zijn alle microcystines zoals geanalyseerd met LC-MS/MS bij elkaar opgeteld. Een vergelijkbare actie is uitgevoerd voor de anatoxines. Uit onderstaande grafieken blijkt dat de relatie tussen ELISA en LC-MS/MS hoog is ($R^2=0,71$). Voor de anatoxines ontbreekt een dergelijk verband ($R^2=0,007$) er is geen sprake van een relatie.

FIG 3.9 **RELATIE ELISA EN LC-MS/MS**

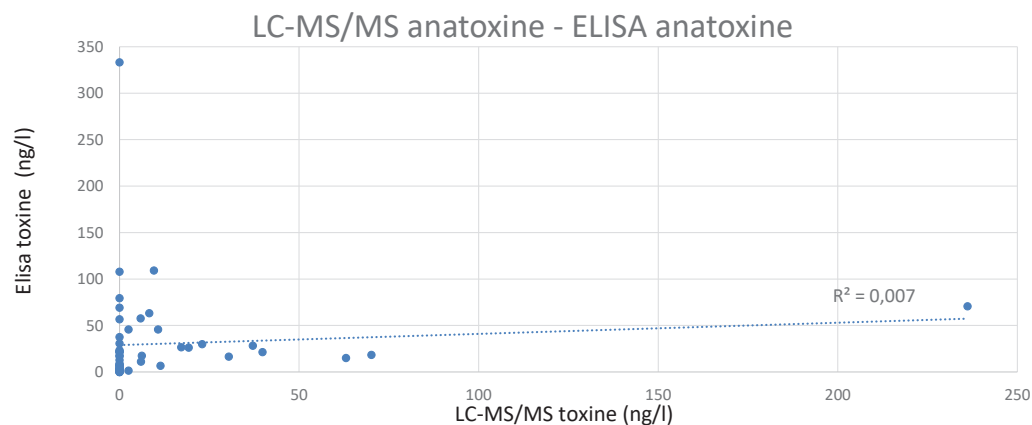
A: Relatie tussen microcystineconcentratie bepaald met LC-MS/MS en toxineconcentratie bepaald met ELISA.

B: Relatie tussen anatoxineconcentratie bepaald met LC-MS/MS en toxineconcentratie bepaald met ELISA.

A



B



3.2.6 Correlaties

In bovenstaande grafieken zijn voor de lineaire relaties de R^2 opgenomen in de grafieken. De bijbehorende Pearson's correlaties (r) zijn voor de technieken die in dit onderzoek vergeleken zijn samengevat in onderstaande Tabel 3.2. Uit de tabel blijkt dat de correlatie met de gemeten toxines (LC-MS/MS) zeer hoog is met de biovolumes, celaantallen (van potentieel microcystine producerende genera, te weten *Planktothrix*, *Microcystis* & *Woronochnia*). PCR *mcvE* (toxinegenen die coderen voor microcystine productie) en ELISA Mcyst (concentratie microcystine) correleren hoog met de gemeten toxines (LC-MS/MS). Alle hoge en zeer hoge correlaties zijn significant ($p < 0,05$).

De analyse voor anatoxine en cylindrospermopsine is hier achterwege gelaten vanwege het lage aantal positieve resultaten in de dataset.

TABEL 3.2 Pearson's correlaties (r) en significantie van de correlatie (p) tussen verschillende technieken. De hoge en zeer hoge correlaties zijn dikgedrukt. Een correlatie is significant wanneer $p < 0,05$.

	Biovolume	Celaantal	cyanobacteriën PCR Cyano	toxinegenen PCR <i>mcvE</i>	toxine Elisa Mcyst	toxine LC-MS/MS Mcyst
Cyanochlorofyl (fluoroprobe)	0,64* ($p=0,00$)	0,67* ($p=0,00$)	0,69 ($p=0,00$)	0,18 ($p=0,07$)	0,21 ($p=0,15$)	0,26** ($p=0,07$)
Biovolume (microscopie mcyst prod)		0,95* ($p=0,00$)	0,44* ($p=0,00$)	0,60 ($p=0,00$)	0,73 ($p=0,00$)	0,91 ($p=0,00$)
Celaantal (microscopie mcyst prod)			0,44* ($p=0,00$)	0,59 ($p=0,00$)	0,72 ($p=0,00$)	0,90 ($p=0,00$)
Cyanobacteriën (PCR Cyano)				0,35 ($p=0,00$)	0,21 ($p=0,14$)	0,20** ($p=0,16$)
Toxinegenen (PCR <i>mcvE</i>)					0,86 ($p=0,00$)	0,80 ($p=0,00$)
Toxines (Elisa Mcyst)						0,84 ($p=0,00$)

0.00 < r < 0.30: nauwelijks of geen correlatie; 0.30 < r < 0.50: lage correlatie; 0.50 < r < 0.70: middelmatige correlatie; 0.70 < r < 0.90: hoge correlatie; 0.90 < r < 1.00: zeer hoge correlatie. * voor deze relatie is gebruik gemaakt van de som van de biovolumes en celaantallen van alle potentieel toxische blauwalgen, ++ relatie met alle gemeten toxines.

3.2.7 Risicoinschatting

Op basis van het vigerende blauwalgenprotocol (2012) worden drie niveaus van potentieel gezondheidsrisico onderscheiden met daaraan gekoppeld de eventueel uit te voeren acties (zie Tabel 3.3). Bij niveau 0 wordt geen actie vereist, bij niveau 1 wordt in principe een waarschuwing afgegeven en bij niveau 2 wordt een negatief zwemadvies afgegeven.

Wanneer bovenstaande grenswaarden worden gehanteerd op de dataset van dit onderzoek (Tabel 3.4), dan blijkt dat op basis van de fluoroprobe gegevens en de biovolume gegevens er in respectievelijk 52% en 61% van de gevallen géén risico voor de volksgezondheid is. Op basis van ELISA en LC-MS/MS is dit een stuk hoger, namelijk respectievelijk 84% en 94%. Dit impliceert dat er in ca. 30-40% van de gevallen op basis van fluoroprobe en biovolume er een waarschuwing of negatief zwemadvies afgegeven wordt wanneer geen toxines zijn aangetroffen.

TABEL 3.3 Schematische beknopte weergave grenswaarden cyano-chlorofyl, biovolume en microcystine, conform Blauwalgenprotocol (2012).

Risiconiveau	Grenswaarden		Actie
	cyanochlorofyl en biovolume	Grenswaarden microcystine	
Risiconiveau 0	< 2,5 mm ³ /l biovolume of < 12,5 µg/l cyanochlorofyl	microcystine <10 µg/l	Geen actie
Risiconiveau 1	2,5 - 15 mm ³ /l biovolume of 12,5 – 75 µg/l cyanochlorofyl	microcystine >10 < 20 µg/l	Waarschuwen
Risiconiveau 2	> 15 mm ³ /l biovolume of > 75 µg/l cyanochlorofyl	microcystine > 20 µg/l	Negatief zwemadvies

TABEL 3.4 Uitkomst van beoordeling van het risiconiveau per analysemethode in aantal en percentage van het totaal aantal monsters dat per analysemethode is geanalyseerd. Risico 0=geen risico voor de volksgezondheid, risico 1= gering risico voor de volksgezondheid, risico 2= risico voor de volksgezondheid.

Risiconiveau →	Risico 0		Risico 1		Risico 2	
	aantal	percentage	aantal	percentage	aantal	percentage
Fluoroprobe	52	52%	36	36%	12	12%
Biovolume	61	61%	27	27%	14	14%
ELISA (M cyst)	42	84%	3	6%	5	10%
LC-MS/MS (M cyst)	47	94%	3	6%	0	0%

3.3 CONCLUSIES DATA-ANALYSE

Op basis van bovenstaande kan het volgende geconcludeerd worden:

- De **cyanochlorofyl-concentratie** (fluoroprobe) correleert significant middelmatig met het biovolume, celaantal en de hoeveelheid cyanobacteriën (bepaald met PCR). Er is nauwelijks of geen correlatie met de aanwezigheid van toxinegenen en toxines.
De cyanochlorofyl-concentratie is een maat voor alle cyanobacteriën zoals die aanwezig kunnen zijn in het water. Het gaat dus ook om niet-toxineproducerende genera. Over het algemeen zal de fluoroprobe een overschatting geven van het aantal in het water aanwezige toxische cyanobacteriën. Bovendien is chlorofyl op celniveau mogelijk onderhevig aan concentratiewisselingen wat zijn weerslag kan hebben op de resultaten.
- Het **biovolume totaal** heeft een zeer hoge significante correlatie met het celaantal. Er is echter een lage tot middelmatige significante correlatie met de hoeveelheid DNA kopieën voor zowel het totaal aan cyanobacterie genen als voor de toxinegenen (microcystine genen). De correlatie met toxines is hoog tot zeer hoog en significant. Met name wanneer wordt ingezoomd op de potentieel microcystine producerende genera is er een sterke significante correlatie.
- Er is een hoge significante correlatie te zien tussen **celaantal** (met name van microcystine producerende genera) en de hoeveelheid toxines (som van microcystines). Een groot deel (ca. 90%) van de toxines die aangemaakt worden door cyanobacteriën blijven celgebonden. Hoge celdichtheden zullen dan vanzelf leiden tot hoge concentraties aan toxines. De soortstelling van de cyanobacteriepopulatie zal mede van invloed zijn op de hoeveelheid aanwezige toxines. Dat verklaart de positieve correlatie wanneer ingezoomd wordt op potentieel microcystine-producerende genera en microcystine.

-
- Er is nauwelijks of geen correlatie tussen de hoeveelheid cyanobacteriën (PCR cyano) en de hoeveelheid toxines. Dit is te verklaren door het feit dat niet alle aanwezige blauwalgen toxines produceren. Bovendien is er weinig bekend over hoeveel genkopieën er van de verschillende genen aanwezig zijn in de diverse cyanobacterie genera. Onder invloed van abiotische factoren zou dit zelfs kunnen fluctueren op celniveau.
 - Er is een hoge significante correlatie tussen de aanwezigheid van **toxinegenen** en toxines, voor microcystine+nodularine. Alle cellen mét een gen produceren ook toxines, maar de hoeveel is afhankelijk van (abiotische) omstandigheden en dus niet altijd gelijk. Er zijn echter in sommige monsters wél toxines gevonden, maar weinig/geen toxinegenen. Dit is opmerkelijk en heeft mogelijk te maken met de efficiëntie van de DNA-extractie die er voor zorgt dat het aantal toxinegenen onder de detectie limiet blijft.

Voor de overig bepaalde toxines (anatoxine en cylindrospermopsine) was het niet mogelijk om correlaties te bepalen vanwege de lage hoeveelheid samples waarin deze toxines zijn aangetroffen.
 - Er is een hoge significante correlatie tussen de hoeveelheid toxines gemeten met ELISA en met LC-MS/MS, voor microcystine+nodularine.
 - In dit onderzoek zouden beduidend minder waarschuwingen en negatieve zwemadviezen afgegeven worden op basis van toxine analyses dan op basis van de biovolumes en de fluoroprobe analyses. Het aantal meldingen op basis van biovolume en fluoroprobe zijn vergelijkbaar met elkaar en zitten aan de ‘veilige kant’ van het beschermen van zwemmers.

.....

A close-up photograph of a green frog with large, prominent eyes, sitting on a lily pad in a pond. The water is green with many yellow lily pads and some reeds are visible in the background. The frog is looking towards the camera.

HOOFDSTUK 4 TOEPASBAARHEID

Er is een korte vragenlijst gestuurd naar deelnemende laboratoria en kennisinstelling over de toepasbaarheid van nieuwe technieken: de kosten, de doorlooptijd en expertise om de technieken uit te kunnen voeren.

De kosten van de verschillende analysemethoden zijn in Tabel 4.1 opgenomen. De verwachting is dat de kosten voor analysemethoden die nu al routinematig zijn (fluoroprobe, celtellingen/biovolume) niet zullen dalen de komende tijd. Voor de analysemethoden die nu niet standaard zijn, is de verwachting dat de kosten wél zullen dalen wanneer het routinematige methoden worden.

TABEL 4.1 ORDEGROOTTE KOSTEN PER MONSTER

Ordegrootte kosten per monster (exclusief monsternamen en administratiekosten), per analysemethode. Dit is een opgave van de deelnemende laboratoria en kennisinstellingen.

Ordegrootte kosten per monster (EUR)	
fluoroprobe	20-30
celaantal / biovolume	80-90
toxinegenen (PCR)	50-75
toxines (Elisa)	300
toxines (LC-MS/MS)	300

De doorlooptijd van de verschillende analysemethoden is over het algemeen 1-2 dagen (Tabel 4.2). Deze doorlooptijd is in de praktijk afhankelijk van tijdstip van aanlevering en het ‘verzamen van monsters’ voor gelijktijdige verwerking (efficiëntie). De verwachting is dat de doorlooptijd van bestaande analyses in de komende jaren niet zal verkorten. Wel zijn snellere analyses mogelijk wanneer veldmeetapparatuur ontwikkeld wordt om *in situ* analyses uit te voeren volgens een gestandaardiseerde methode. Een veld-fluoroprobe bestaat al (AlgaeTorch), net als mogelijkheden voor mobiele DNA-analyse, maar dit wordt nog niet als standaard gebruikt.

TABEL 4.2 DOORLOOPTIJD PER ANALYSEMETHODE

Doorlooptijd (dag)	
fluoroprobe	1
celaantal / biovolume	1
toxinegenen (PCR)	1-2
toxines (Elisa)	1
toxines (LC-MS/MS)	36 uur (spoed)
	6 weken (routine)

Expertise voor het gebruik van de fluoroprobe en microscopie is aanwezig bij de waterschapslaboratoria (Tabel 4.3). Deze expertise wordt de komende tijd nog verder uitgebreid door bijvoorbeeld nieuwe apparatuur. Ook het uitvoeren van een PCR-analyse om cyano-genen en toxinegenen te

bepalen kan bij diverse laboratoria uitgevoerd worden. Laboratoria investeren in het uitvoeren van DNA-analyse. De expertise voor bepalen van toxines met ELISA en LC-MS/MS is minder wijd verspreid aanwezig, maar bij diverse laboratoria is er de wil/wens om dit te op termijn wel te kunnen uitvoeren.

TABEL 4.3 AANWEZIGE EXPERTISE PER ANALYSEMETHODE

Bij de deelnemende laboratoria en kennisinstellingen.

	Huidige expertise	Toekomstige expertise
fluoroprobe	Aquon Deltares Wetterskip lab Aqualysis (veld)	Aquon Deltares Wetterskip lab (nieuwe fluoroprobe) Aqualysis (lab)
celaantal	Aquon Wetterskip lab Aqualysis	Aquon Wetterskip lab Aqualysis
biovolume	Aquon Aqualysis	Aquon Wetterskip lab (indien nodig) Aqualysis
toxinegenen (PCR)	Deltares Wetterskip lab Aqualysis	Aquon (2020) Deltares Wetterskip lab Aqualysis
toxines (Elisa)	RIKILT Wetterskip lab	Aquon (2020) RIKILT Wetterskip lab Aqualysis (indien nodig)
toxines (LC-MS/MS)	RIKILT	RIKILT Wetterskip lab (indien nodig) Aqualysis (indien nodig)

.....



HOOFDSTUK 5 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN

5.1 ANTWOORDEN OP DE ONDERZOEKSVRAGEN

In deze paragraaf zijn antwoorden op de onderzoeksvragen geformuleerd op basis van de resultaten van de monitoring (hoofdstuk 3):

1 Is er een relatie tussen resultaten op basis van nieuwe technieken en resultaten op basis van traditionele technieken?

De hoogste significante correlaties die uit deze dataset naar voren komen, zijn die tussen de gemeten toxines (LC-MS/MS) en:

- Celaantallen/biovolume (gericht op microcystine en potentieel producerende genera);
- PCR mcyE (toxinegenen die coderen voor microcystine productie);
- ELISA Mcyst (concentratie microcystine op basis van ELISA-analyse).

Dit betekent dat het bepalen van celaantallen/biovolume, het uitvoeren van PCR om toxinegenen te bepalen én het bepalen van toxines m.b.v. ELISA goed inzicht geeft in het daadwerkelijke gezondheidsrisico voor zwemmers, omdat er een hoge significante correlatie is met daadwerkelijk gemeten toxines (LC-MS/MS).

2 Waar liggen de grenswaarden voor 'waarschuwing' en 'negatief zwemadvies' bij gebruik van de nieuwe technieken?

De grenswaarden voor het instellen van een waarschuwing of negatief zwemadvies bij gebruik van DNA-analyse van toxinegenen en het bepalen van de toxineconcentraties (met ELISA en LC-MS/MS) kunnen op basis van de resultaten van dit onderzoek niet bepaald worden. Een grenswaarde voor een toxine moet namelijk bepaald worden op basis van toxicologisch onderzoek en niet door de correlatie te bekijken met bijvoorbeeld biovolume. Dit blijkt ook uit [Figuur 3.6](#) waarin te zien is dat de huidige gebruikte grenswaarden voor biovolume (2,5 mm³/l en 15 mm³/l) correleren met zeer lage concentratie microcystine (ze zijn strenger dan de huidige WHO-norm van 20 µg/l).

Op korte termijn (voorjaar 2020) komt de WHO met nieuwe richtlijnen voor microcystine en ander cyanotoxines. Het is aan te raden de daarin genoemde grenswaarden te hanteren.

Voor toxinegenen geldt dat er op basis van een hele set aan toxische cellen (monocultuur) en verschillende verdunningen bepaald zou kunnen worden hoeveel genen passen bij de hoeveelheid cellen en de daarbij behorende toxinegehalten. Dit verdient nader onderzoek.

3 Is er één analysemethode (of keten van methoden) die het gezondheidsrisico zo goed inschat (indicator), dat overige detectieanalysemethoden niet meer uitgevoerd hoeven te worden?

Het gezondheidsrisico voor zwemmers wordt het best ingeschat door inzicht te hebben in de toxineconcentratie in het water. De zwemmer wordt immers ziek van toxines en niet van blauwalgen an sich. De analyse met LC-MS/MS is het meest accuraat in het meten van toxineconcentratie, gevolgd door de analyse van toxineconcentratie met ELISA. Aan metingen met LC-MS/MS zitten echter ook nadelen, waaronder de hoge kosten. Daarom zijn in dit onderzoek alle onderzochte analysemethoden afgezet tegen LC-MS/MS als 'gouden standaard' om een snellere en goedkopere techniek te vinden die bij gebruik de resultaten van de LC-MS/MS-techniek zo goed mogelijk benadert.

Op basis van de dataset van dit onderzoek blijkt er een hoge significante correlatie te zijn tussen de

hoeveelheid toxines (met name microcystine) die werden bepaald met LC-MS/MS enerzijds en anderzijds a) de hoeveelheid toxines die werden bepaald met ELISA (McyE), b) het aantal toxinegenen bepaald via qPCR mcyE én c) het bepaalde biovolume/celaantal (microcystineproducerende blauwalgen). Dit betekent dat alle drie genoemde methoden geschikt zijn om het gezondheidsrisico van zwimmers vergelijkbaar in te schatten als bij het uitvoeren van een LC-MS/MS analyse. Het gebruik van de fluoroprobe geeft een overschatting van het risico voor zwimmers.

Het lijkt verstandig om watermonsters altijd te screenen op het voorkomen van de diverse genera van cyanobacteriën. Op die manier is vlot in te schatten of er sprake is van toxineproducerende genera, welke toxines ze in potentie kunnen produceren én welke qPCR en/of welke toxine-analyse benodigd is voor de monsters. Een gedetailleerde celaantal- of biovolumebepaling is hiervoor niet nodig.

4 **Wat is de toepasbaarheid van nieuwe technieken ten opzichte van huidig gebruikte analysemethoden?**

De deelnemende waterschapslaboratoria kunnen op dit moment niet allemaal de nieuwe technieken van bepaling van toxinegenen en toxines uitvoeren. Wel zijn ze (veelal) bereid om, indien nodig, te investeren in deze technieken. Dit is afhankelijk van de vraag vanuit waterschappen om nieuwe technieken in te gaan zetten. Het is de verwachting dat er voldoende capaciteit zal zijn.

De kosten van het bepalen van toxines is op dit moment hoger dan de kosten voor de huidig gebruikte analysemethoden. Indien de nieuwe technieken routinematig ingezet zullen worden, is de verwachting dat de kosten zullen dalen.

5.2 **CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN**

Zwimmers kunnen ziek worden van blauwalgen door de toxines die zij kunnen produceren. Zwimmers worden dus niet ziek van blauwalgen *an sich*. Daarom is het belangrijk om bij blauwalgmonitoring inzicht te krijgen in de hoeveelheid toxines in het water. De technieken die in het huidige Blauwalgprotocol worden gehanteerd, meten echter geen toxines, maar de hoeveelheid blauwalgen. Dat kan of door bepaling van het biovolume van deze blauwalgen, gecombineerd met een snelle screening van de dominante soorten, of door analyse van het pigment cyanochloforyl (met de fluoroprobe). Aangezien niet alle blauwalgen toxisch zijn en/of toxines produceren, is de risico-inschatting op basis van cyanochloforyl een overschatting van het daadwerkelijke risico. Bij gebruik van een fluoroprobe zit men bij de inschatting van het risico dus aan de veilige kant.

De dataset uit dit onderzoek geeft aan dat a. de hoeveelheid microcystine bepaald met ELISA en b. het aantal toxinegenen die coderen voor microcystine bepaald met DNA-analyse sterk overeenkomen met de daadwerkelijke hoeveelheid toxines in het water. Beide methoden kunnen dan ook een gelijke inschatting van het risico maken als de toxinemetingen met LC-MS/MS. Bijkomende voordeel van het gebruik van DNA-analyse is met eenzelfde monsternamen en -analyse direct ook andere vragen beantwoord kunnen worden, zoals het voorkomen ziekte van Weil of fecale bacteriën. De ontwikkelingen op gebied van DNA-analyse gaan bovendien zo snel dat er op korte termijn naar verwachting sneller dan nu een risico-inschatting gemaakt kan worden.

Bovengenoemde correlaties zijn in dit onderzoek echter alleen voor microcystine aangetoond, niet voor andere toxines als anatoxine en saxitoxine. Er zijn op basis van dit onderzoek geen

‘grenswaarden’ te bepalen die nodig zijn voor een goede risicobeoordeling. Nader onderzoek is daarvoor nodig.

Naast twee eerder genoemde methoden correleert ook het biovolume/celaantal (microcystine-producerende blauwalgen) met de daadwerkelijke hoeveelheid toxines in het water. Het voordeel van het microscopisch bekijken van het watermonster is dat vlot ingeschat kan worden of er toxineproducerende genera aanwezig zijn. Dit geeft een indicatie van de mogelijk aanwezige soorten toxines en geeft richting aan de keuze voor de in te zetten analysetechniek, qPCR en/of toxine-analyse, als besloten wordt tot aanvullend onderzoek.

Het gebruik van fluorescentie leidt tot een overschatting van het risico. Bij toepassing van deze techniek zit men dus aan de veilige kant bij een risico-inschatting. Een waterbeheerder heeft de mogelijkheid om bij een negatief zwemadvies op basis van lichtmicroscopische analyse verder in te zoomen op de samenstelling van een watermonster door het inzetten van een DNA- of toxine-analyse en daardoor het advies te bevestigen of aan te passen. Nader onderzoek is nodig voordat technieken gericht op toxinebepaling landelijk en uniform gebruikt kunnen worden.

Bij een eventueel vervolgonderzoek wordt aanbevolen om de onderzoeksinspanningen primair te richten op:

- de twee methodieken LC-MS/MS (chemische analyse) en qPCR (DNA). Aan de hand van de LC-MS/MS-gegevens de grenswaarden van qPCR definiëren en zo mogelijk bevestigen op basis van literatuur en/of aanvullend labonderzoek;
- het vergroten van de dataset teneinde de correlatie tussen de aanwezigheid van microcystine-genen en de concentratie aan microcystine nog beter te kunnen onderzoeken;
- de resultaten van het parallel gestarte ILOW-onderzoek te vergelijken met de resultaten uit dit onderzoek.

Daarnaast kunnen volgende analyses extra informatie opleveren:

- de analyse van saxitoxines. Uit dit onderzoek blijkt dat saxitoxine-genen vaak voorkomen in de onderzochte wateren, maar er is niet duidelijk of en zo ja: in welke concentraties saxitoxines aanwezig waren in het oppervlaktewater;
- de analyse van anatoxine-genen. In dit onderzoek is een aantal keer anatoxine aangetroffen. In de gebruikte DNA-kit was geen marker opgenomen voor de detectie van anatoxine-genen.

A close-up photograph showing a person's legs from the knees down, standing in water. The water is heavily contaminated with a thick, bright green algal bloom (cyanobacteria) that is splashing around the person's feet. The background shows more of the green water and some ripples. The text 'BIJLAGEN' is overlaid in white capital letters.

BIJLAGEN



BIJLAGE 1 RESULTATEN PER LOCATIE

In deze bijlage zijn de resultaten van het monitoringsonderzoek gepresenteerd in grafieken. Het verloop van de parameter(groepen) cyanochlorofyl, biovolume, toxinegenen en toxines in de tijd is weergegeven. Met bijbehorende dataset kunnen waterbeheerders zelf meer voor hen relevante informatie generen, bijvoorbeeld door zelf correlaties te bepalen voor een locatie.

In [Hoofdstuk 3](#) zijn reeds de resultaten van een viertal locaties weergegeven en besproken. Deze vier locaties zijn gekozen om uitleg te geven over de analyse en patronen zichtbaar te maken van zoveel mogelijk verschillende typen locaties.

- Binnenschelde
- Kurenpolder
- Plas te Werve
- Oudegaasterbrekken

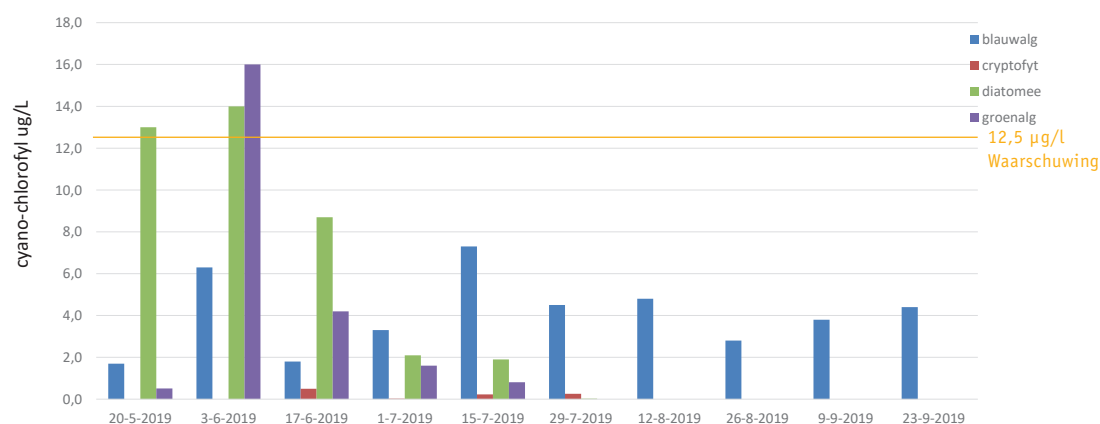
In deze bijlage komen aan de orde:

- Twiske Speelsloot
- Zwaansmeer
- Zuidlaardermeer
- Valkenburgse meer
- Kotermeerstal
- Sloterstrand
- Paterswoldse meer

TWISKE SPEELSLOOT

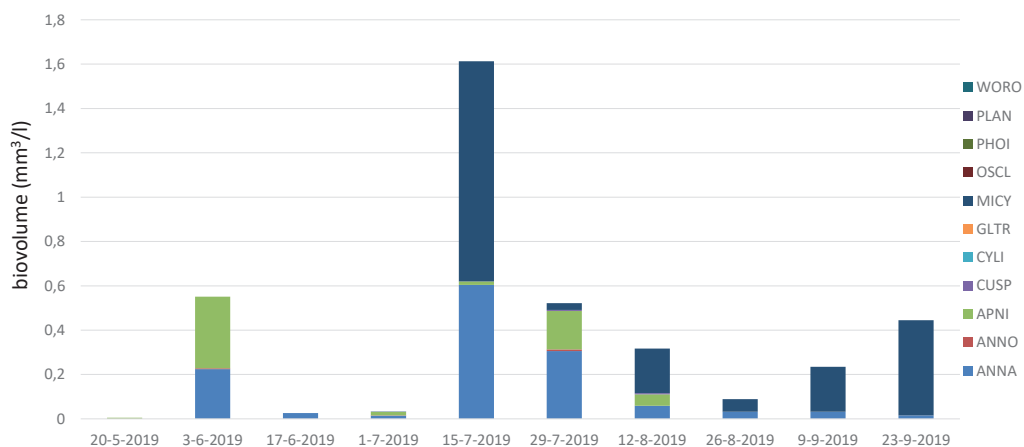
a Resultaten Twiske speelsloot zwemseizoen 2019

Hoeveelheid cyanochlorofyl ($\mu\text{g/l}$) per functionele groep. Relevante grenswaarden uit Blauwalgenprotocol (2012) zijn in rood aangegeven.



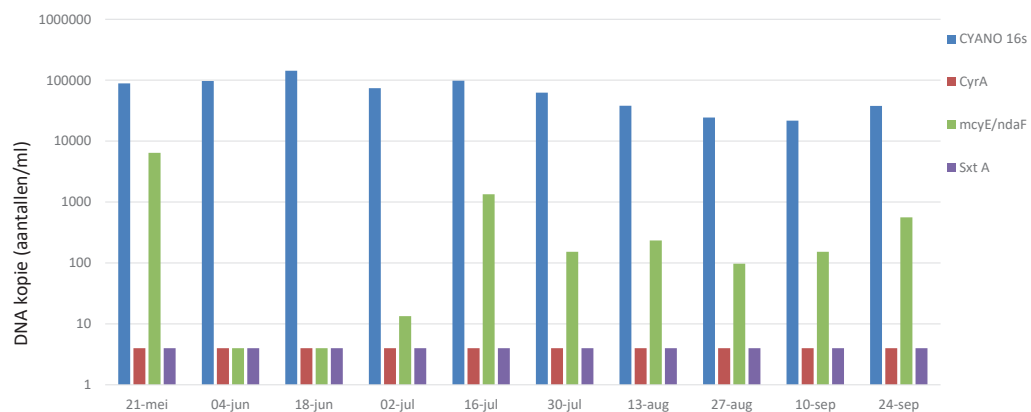
b Resultaten Twiske speelsloot zwemseizoen 2019

Biovolume (mm^3/l) per genus.



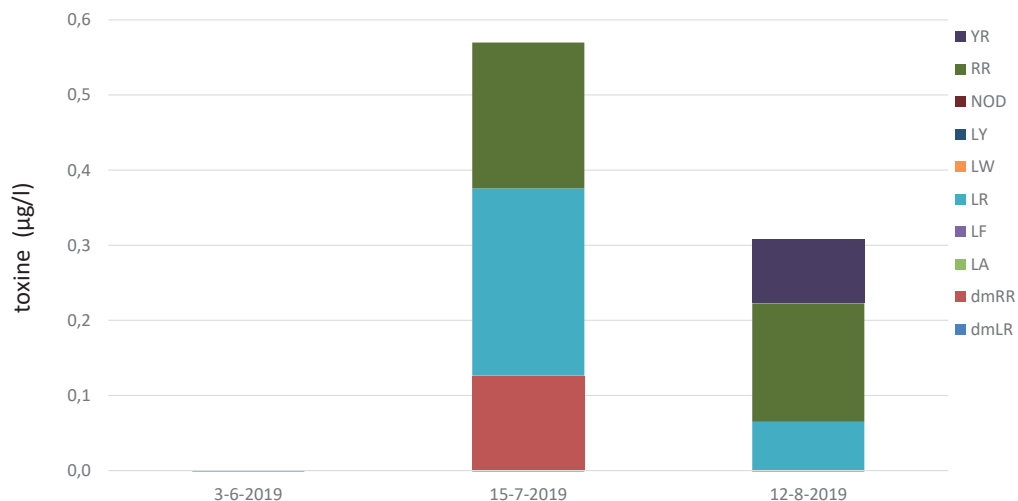
c Resultaten Twiske speelsloot zwemseizoen 2019

Aanwezigheid van toxinegenen (DNA-kopieën/ml) waarbij Cyano16S= algemeen cyanobacterie gen, CyrA= gen voor cylindrospermopsine, McyE/ndaF= gen voor microcystine en SxtA= gen voor saxitoxine.



d Resultaten Twiske speelsloot zwemseizoen 2019

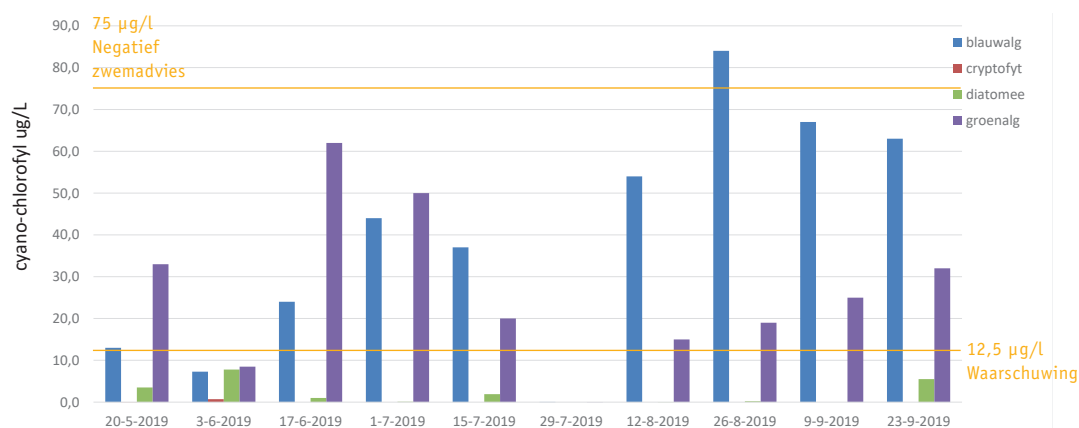
Hoeveelheid microcystine en nodularine (µg/l), onderverdeeld in verschillende vormen microcystine (YR, RR, LY, LW, LR, LF, LA, dmRR en dmLR) en nodularine (NOD).



ZWAANSMEER

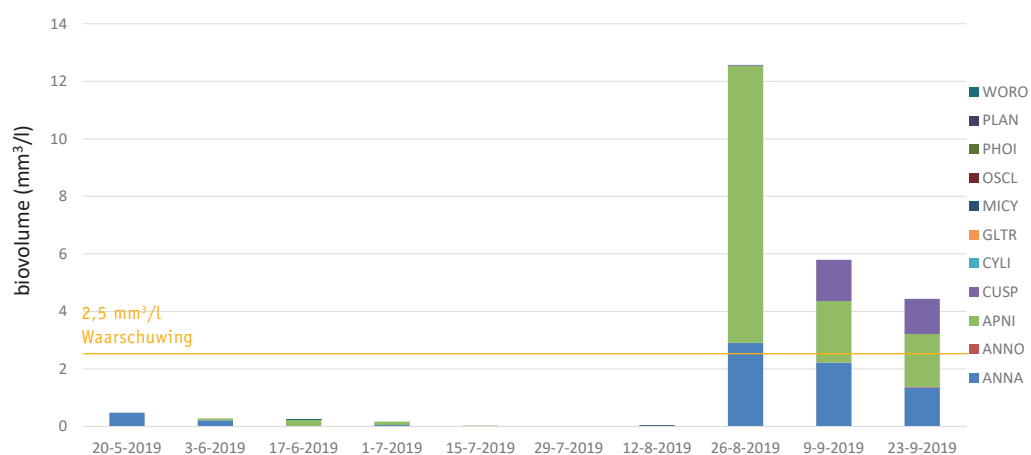
a Resultaten Zwaansmeer zwemseizoen 2019

Hoeveelheid cyanochlorofyl ($\mu\text{g/l}$) per functionele groep. Relevante grenswaarden uit Blauwalgenprotocol (2012) zijn in rood aangegeven.



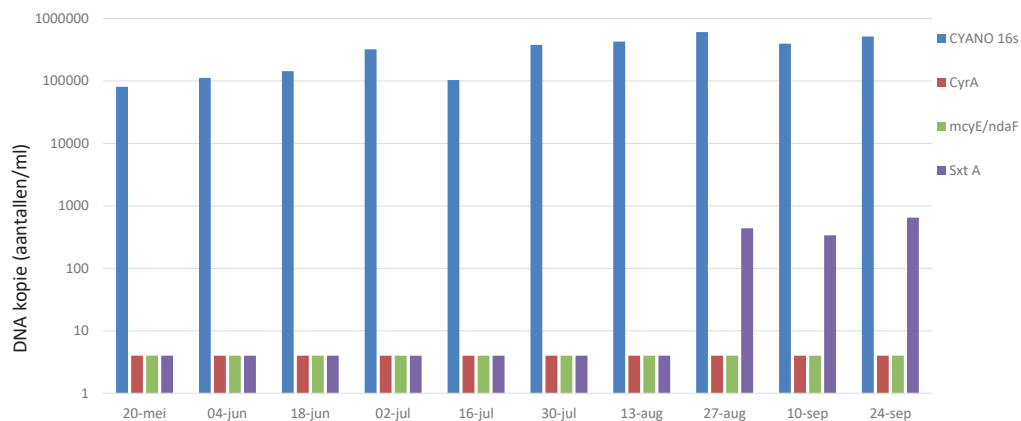
b Resultaten Zwaansmeer zwemseizoen 2019

Biovolume (mm^3/l) per genus. Relevante grenswaarden uit Blauwalgenprotocol (2012) zijn in rood aangegeven.



c Resultaten Zwaansmeer zwemseizoen 2019

Aanwezigheid van toxinegenen (DNA-kopieën/ml) waarbij Cyano16S= algemeen cyanobacterie gen, CyrA= gen voor cylindrospermopsine, McyE/ndaF= gen voor microcystine en SxtA= gen voor saxitoxine.

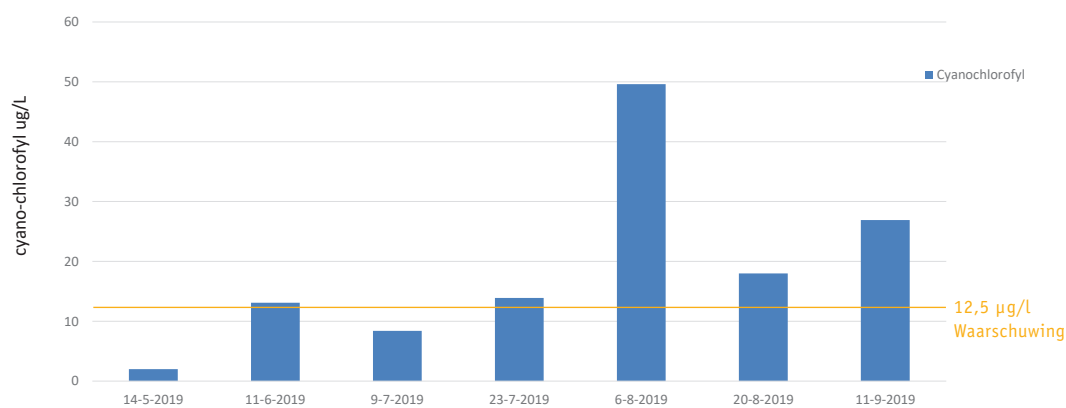


Geen toxines aangetroffen

ZUIDLAARDERMEER

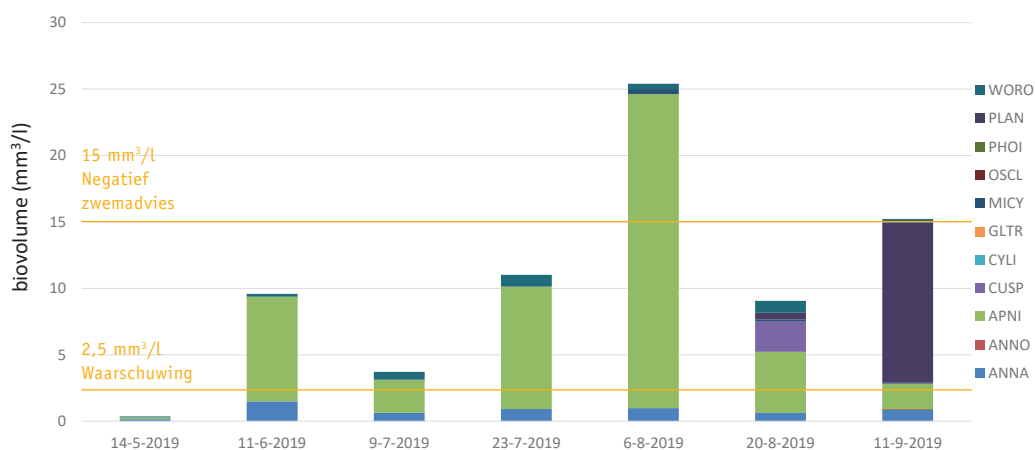
a Resultaten Zuidlaardermeer zwemseizoen 2019

Hoeveelheid cyanochlorofyl ($\mu\text{g/l}$). Relevante grenswaarden uit Blauwalgenprotocol (2012) zijn in rood aangegeven.



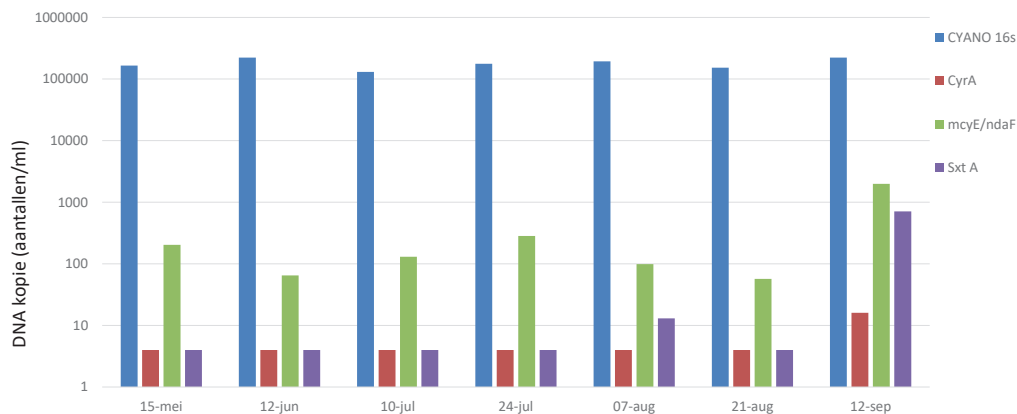
b Resultaten Zuidlaardermeer zwemseizoen 2019

Biovolume (mm^3/l) per genus. Relevante grenswaarden uit Blauwalgenprotocol (2012) zijn in rood aangegeven.



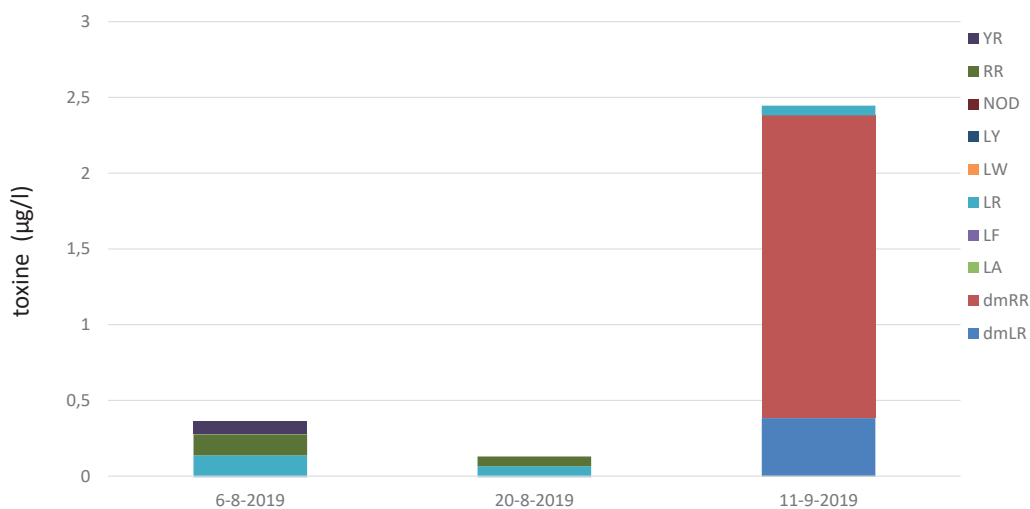
c Resultaten Zuidlaardermeer zwemseizoen 2019

Aanwezigheid van toxinegenen (DNA-kopieën/ml) waarbij Cyano16S= algemeen cyanobacterie gen, CyrA= gen voor cylindrospermopsine, McyE/ndaF= gen voor microcystine en SxtA= gen voor saxitoxine.



d Resultaten Zuidlaardermeer zwemseizoen 2019

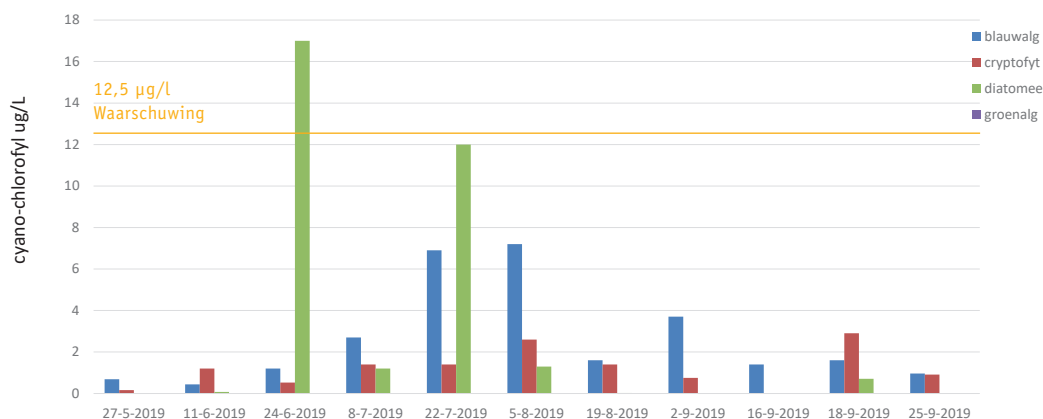
Hoeveelheid microcystine en nodularine (µg/l), onderverdeeld in verschillende vormen microcystine (YR, RR, LY, LW, LR, LF, LA, dmRR en dmLR) en nodularine (NOD).



VALKENBURGSE MEER

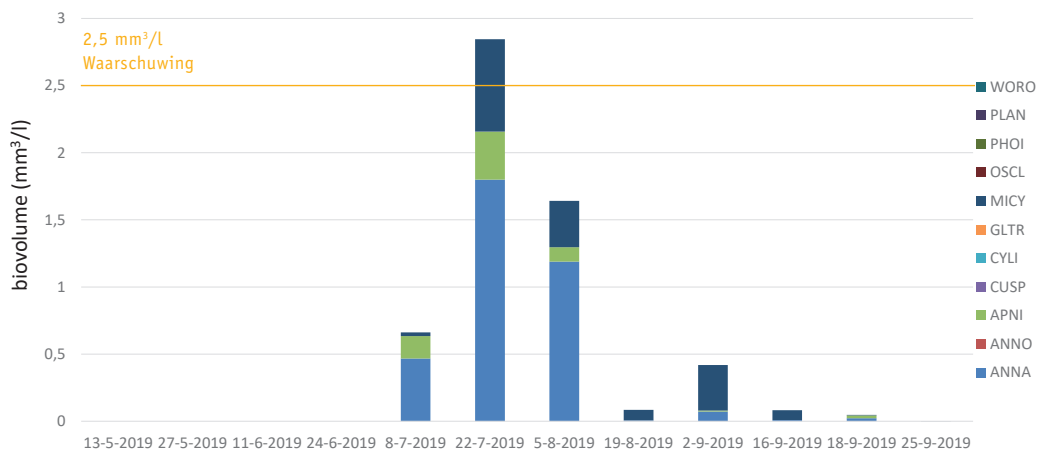
a Resultaten Valkenburgse meer zwemseizoen 2019

Hoeveelheid cyanochlorofyl ($\mu\text{g/l}$) per functionele groep. Relevante grenswaarden uit Blauwalgenprotocol (2012) zijn in rood aangegeven.



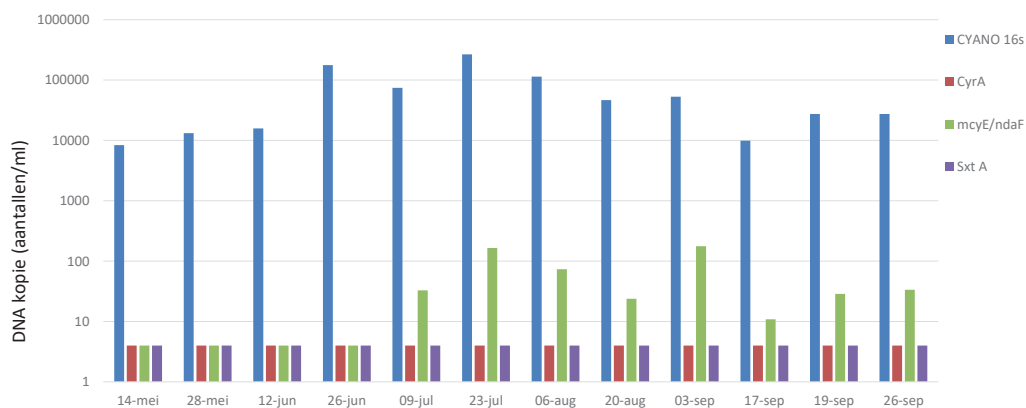
b Resultaten Valkenburgsemeer zwemseizoen 2019

Biovolume (mm^3/l) per genus. Relevante grenswaarden uit Blauwalgenprotocol (2012) zijn in rood aangegeven.



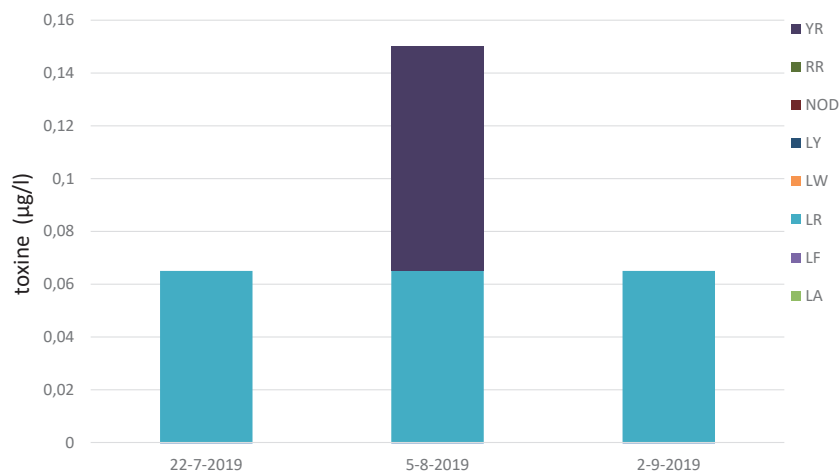
c Resultaten Valkenburgsemeer zwemseizoen 2019

Aanwezigheid van toxinegenen (DNA-kopieën/ml) waarbij Cyano16S= algemeen cyanobacterie gen, CyrA= gen voor cylindrospermopsine, McyE/ndaF= gen voor microcystine en SxtA= gen voor saxitoxine.



d Resultaten Valkenburgsemeer zwemseizoen 2019

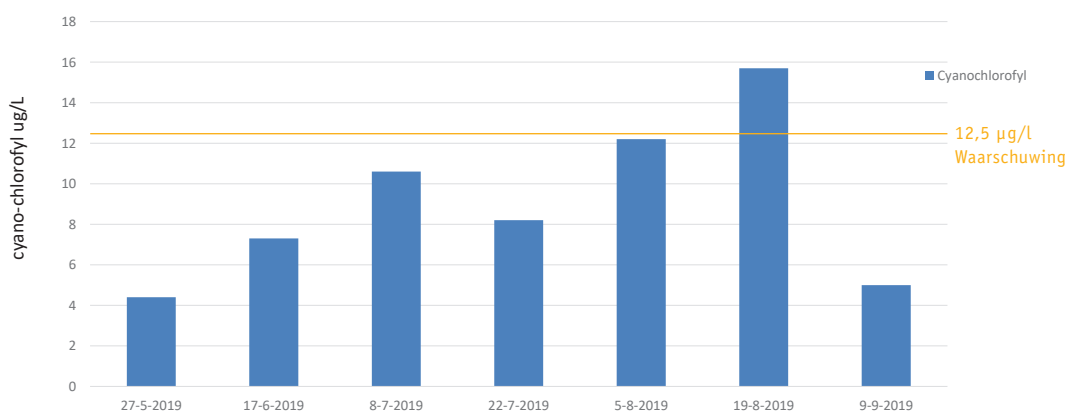
Hoeveelheid microcystine en nodularine ($\mu\text{g/l}$), onderverdeeld in verschillende vormen microcystine (YR, RR, LY, LW, LR, LF, LA, dmRR en dmLR) en nodularine (NOD).



KOTERMEERSTAL

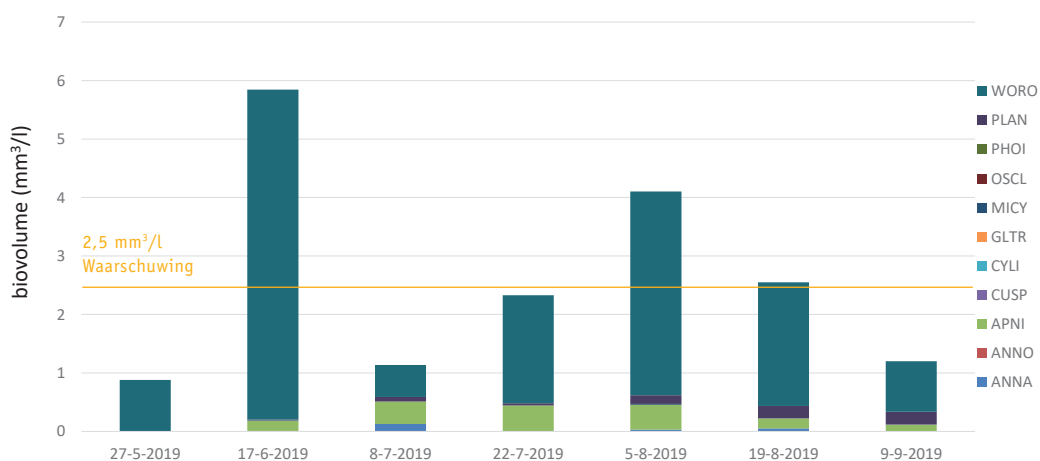
a Resultaten Kotermeerstal zwemseizoen 2019

Hoeveelheid cyanochlorofyl ($\mu\text{g/l}$). Relevante grenswaarden uit Blauwalgenprotocol (2012) zijn in rood aangegeven.



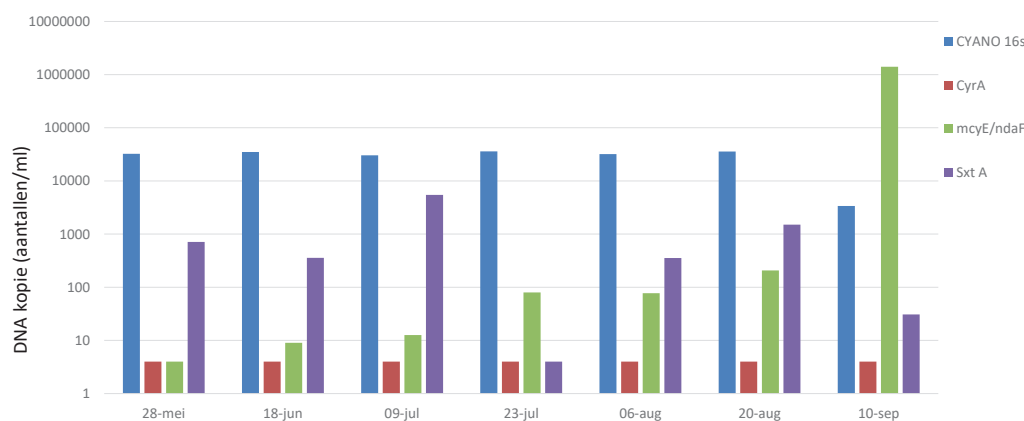
b Resultaten Kotermeerstal zwemseizoen 2019

Biovolume (mm^3/l) per genus. Relevante grenswaarden uit Blauwalgenprotocol (2012) zijn in rood aangegeven.



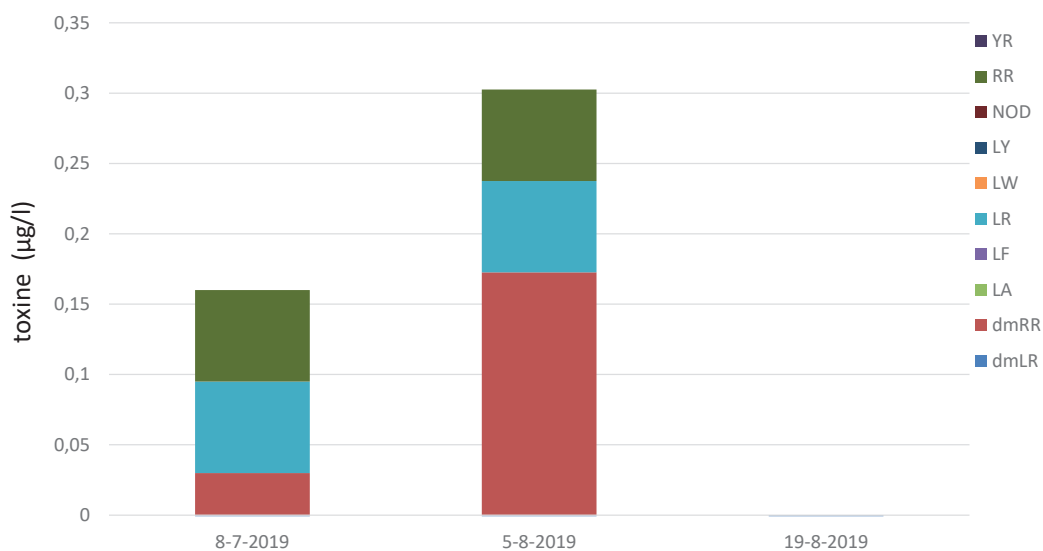
c Resultaten Kotermeerstal zwemseizoen 2019

Aanwezigheid van toxinegenen (DNA-kopieën/ml) waarbij Cyano16S= algemeen cyanobacterie gen, CyrA= gen voor cylindrospermopsine, McyE/ndaF= gen voor microcystine en SxtA= gen voor saxitoxine.



d Resultaten Kotermeerstal zwemseizoen 2019

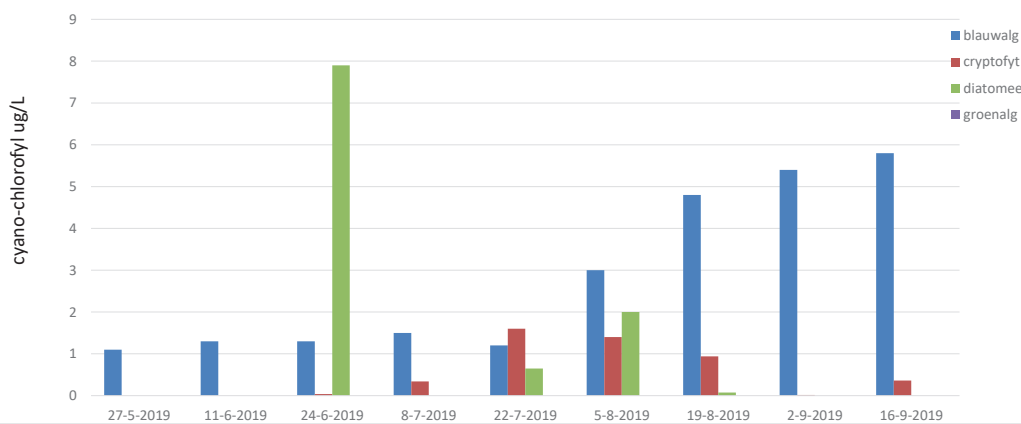
Hoeveelheid microcystine en nodularine (µg/l), onderverdeeld in verschillende vormen microcystine (YR, RR, LY, LW, LR, LF, LA, dmRR en dmLR) en nodularine (NOD).



SLOTERSTRAND

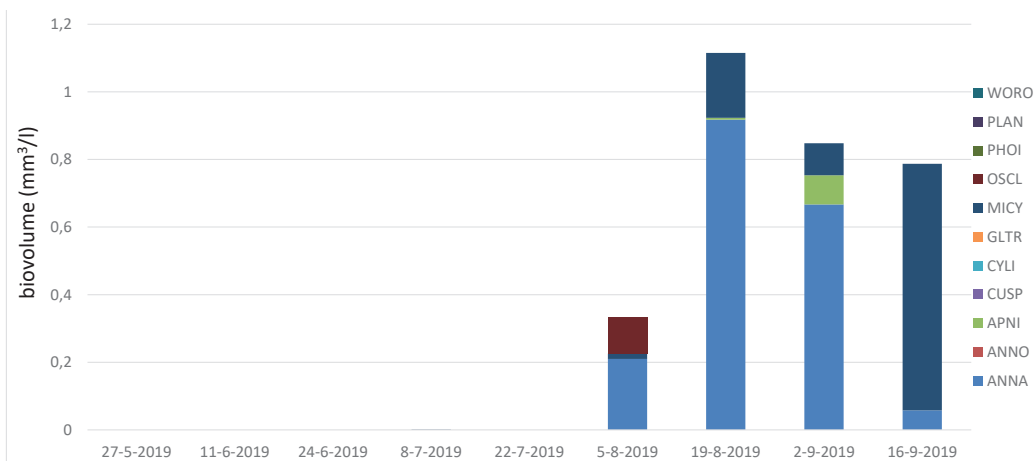
a Resultaten Sloterstrand zwemseizoen 2019

Hoeveelheid cyanochlorofyl ($\mu\text{g/l}$) per functionele groep.



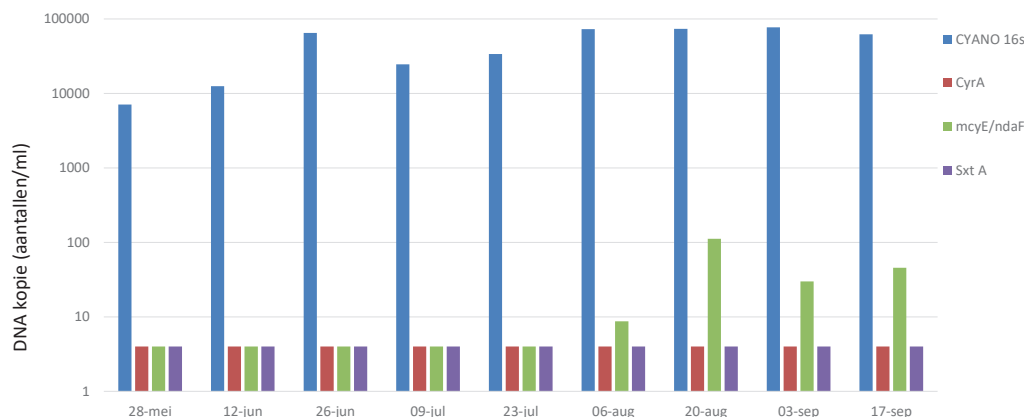
b Resultaten Sloterstrand zwemseizoen 2019

Biovolume (mm^3/l) per genus.



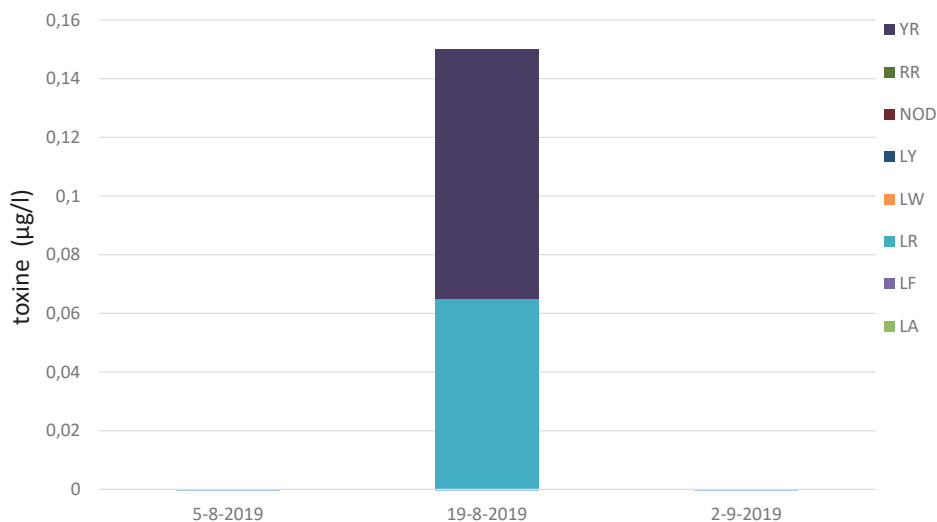
c Resultaten Sloterstrand zwemseizoen 2019

Aanwezigheid van toxinegenen (DNA-kopieën/ml) waarbij Cyano16S= algemeen cyanobacterie gen, CyrA= gen voor cylindrospermopsine, McyE/ndaF= gen voor microcystine en SxtA= gen voor saxitoxine.



d Resultaten Sloterstrand zwemseizoen 2019

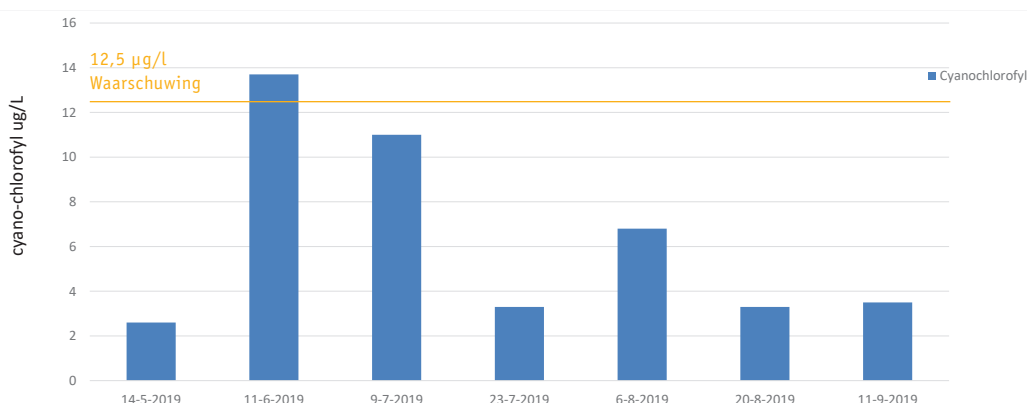
Hoeveelheid microcystine en nodularine (µg/l), onderverdeeld in verschillende vormen microcystine (YR, RR, LY, LW, LR, LF, LA, dmRR en dmLR) en nodularine (NOD).



PATERSWOLDSEMEER

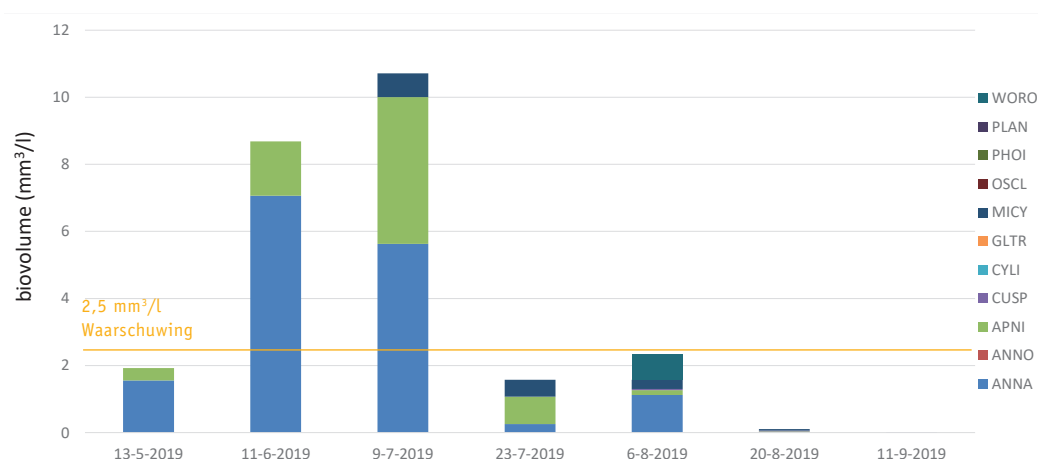
a Resultaten Paterswoldsemeer zwemseizoen 2019

Hoeveelheid cyanochlorofyl ($\mu\text{g/l}$). Relevante grenswaarden uit Blauwalgenprotocol (2012) zijn in rood aangegeven.



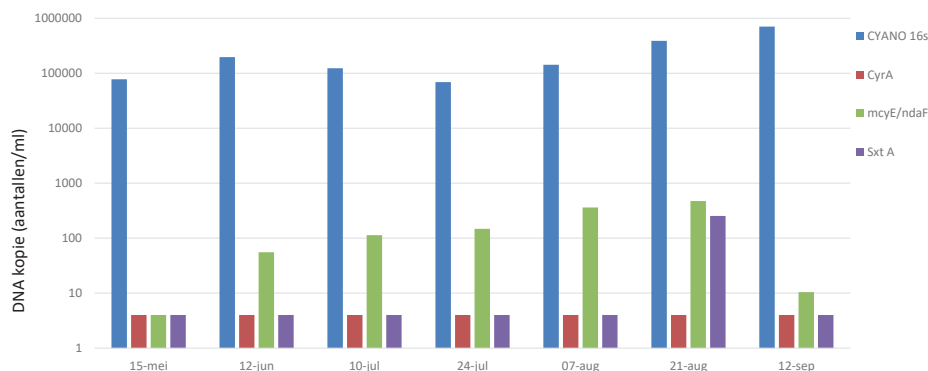
b Resultaten Paterswoldsemeer zwemseizoen 2019

Biovolume (mm^3/l) per genus. Relevante grenswaarden uit Blauwalgenprotocol (2012) zijn in rood aangegeven.



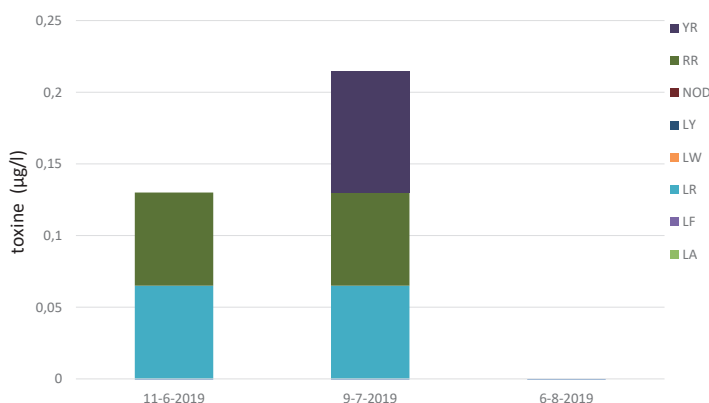
c Resultaten Paterswoldsemeer zwemseizoen 2019

Aanwezigheid van toxinegenen (DNA-kopieën/ml) waarbij Cyano16S= algemeen cyanobacterie gen, CyrA= gen voor cylindrospermopsine, McyE/ndaF= gen voor microcystine en SxtA= gen voor saxitoxine.



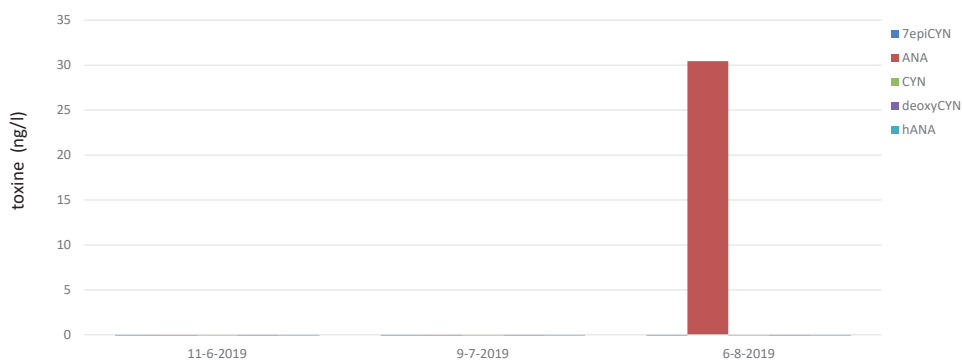
d Resultaten Paterswoldsemeer zwemseizoen 2019

Hoeveelheid microcystine en nodularine (µg/l), onderverdeeld in verschillende vormen microcystine (YR, RR, LY, LW, LR, LF, LA, dmRR en dmLR) en nodularine (NOD).



e Resultaten Paterswoldsemeer zwemseizoen 2019

Hoeveelheid toxine (ng/l) waarbij 7epiCYN= cylindrospermopsine variant, Ana=anatoxine, CYN= cylindrospermopsine, deoxyCYN=cylindrospermopsine variant en hANA=anatoxine variant.





BIJLAGE 2 TOXINEPRODUCERENDE CYANOBACTERIËN

Er worden verschillende groepen van cyanotoxines onderscheiden: neurotoxines, cytotoxines, hepatotoxines en irriterende stoffen (dermatotoxines).

Contact met, of consumptie van, cyanobacteriën kan resulteren in irritaties aan ogen en huid, hoofdpijn, maag- en darmklachten kan veroorzaken, of zelfs tot nog grotere gezondheidsproblemen kan leiden. Zo kan anatoxine-a dodelijk zijn, omdat het niet enzymatisch afgebroken kan worden en er geen tegengif voor bestaat.

NEUROTOXINES

Anatoxine-a en homoanatoxine-a inhiberen postsynaptische depolarisatie. Deze alkaloiden binden irreversibel aan de acetylcholine receptor (kunnen na binding niet door acetylcholine-esterase gescheiden worden van de receptor), waardoor er een continue actiepotentiaal ontstaat. De natrium/kalium-kanalen blijven openstaan met als gevolg een overstimulatie en verkramping van de spieren wat kan resulteren in een ademhalingsstilstand.

Anatoxine-a(s) is een natuurlijk organofosfaat en lijkt qua werking op bepaalde bestrijdingsmiddelen zoals parathion. Dit toxine is een zeer potente remmer van het enzym acetylcholine-esterase.

Saxitoxines, waarvan meer dan tien varianten bekend zijn, remmen de neurologische signaaloverdracht door binding aan de natrium/kalium-kanalen in zenuwcellen. Hierdoor wordt propagatie van de elektrische impuls langs een axon verstoord en zullen bij de synaps geen neurotransmitters (acetylcholine) uitgescheiden worden in de synapsspleet met als gevolg een verstoorde communicatie tussen neuron en spiercel.

β -N-methylamino-L-alanine is een neurotoxisch aminozuur dat als “slow-toxin” recentelijk in verband is gebracht met de ziekte van Alzheimer of vergelijkbare neurodegeneratieve aandoeningen.

CYTOTOXINES

Cylindrospermopsine inhibeert eiwitsynthese, veroorzaakt necrose in lever, nieren, milt, longen en is genotoxisch (kan tot DNA schade leiden).

HEPATOTOXINES

Microcystines inhiberen eiwitfosfatase en resulteren in leverschade. Vanwege het hydrofiele karakter kunnen microcystines alleen door middel van actief, ATP-afhankelijk, transport door de celmembraan geraken. Omdat levercellen een dergelijk transportmechanisme hebben, hopen microcystines zich na consumptie op in de lever alwaar ze levercellen ernstig kunnen beschadigen door het cytoskelet te verstoren. Er zijn meer dan 70 varianten bekend. Microcystines zijn cyclische hepta-peptides wat betekent dat ze uit een ring van zeven aminozuren bestaan. Vijf niet-eiwit-aminozuren vormen de basis, terwijl twee eiwit-aminozuren gevarieerd kunnen voorkomen. De meest bekende variant, microcystine-LR, bevat Leucine (L) en Arginine (R).

Nodularines, waarvan zes varianten bekend zijn, zijn cyclische penta-peptides (bestaan uit vijf aminozuren) en gelijken qua structuur en werking sterk op de microcystines. Nodularines zijn tevens carcinogeen.

IRRITERENDE STOFFEN

Lipopolysacchariden, componenten van de buitenste celwand van cyanobacteriën, kunnen irritaties aan ogen of huid veroorzaken als ook koorts.

Aplysiatoxine, debromoaplysiatoxine en lyngbyatoxine veroorzaken huidirritatie.

naam blauwalg	hepatotoxines			neurotoxines		cytotoxines	hemolytische toxines	dermatotoxines			huidirriterende stoffen
	microcystine	nodularine	onbekend	anatoxine	saxitoxine			onbekend	aplysiatoxine	lyngbyatoxine	onbekend
Anabaena	+			+	+						sp
Anabaena circinalis	+			+							+
Anabaena flos-aquae	+			+							+
Anabaena lemmermannii	+			+							+
Anabaena planctonica				+							+
Anabaena solitaria	+			+							+
Anabaena spiroides	+			+							+
Anabaena variabilis								+			+
Anabaenopsis	+										+
Anabaenopsis millerii	+										+
Aphanizomenon				+	+	+				+	+
Aphanizomenon flos-aquae					+						+
Aphanizomenon gracile	+				+						+
Aphanizomenon ovalisporum						+					+
Arthrospira fusiformis	+			+							+
Coelosphaerium kuetzingianum	+										+
Cylindropermopsis raciborskii					(+)	+					+
Cylindropermum				+							+
Gleotrichia										+	+
Gomphosphaeria aponina	+										+
Hapalosiphon hibernicus	+				+				+		+
Lyngbya									+	+	+
Lyngbya majuscula											+
Lyngbya wollei					+						+
Microcystis	+			(+)						+	+
Microcystis aeruginosa	+			+							+
Microcystis botrys	+										+
Microcystis flos-aquae	+										+
Microcystis ichthyoblabe	+										+
Microcystis novacekii	+										+
Microcystis panniformis	+										+
Microcystis viridis	+										+





naam blauwalg	hepatotoxines		neurotoxines		cytotoxines	hemolytische toxines	dermatotoxines			huidirriterende stoffen
	microcystine	nodularine	onbekend	anatoxine	saxitoxine	cylindrospermopsine	onbekend	aplysiatoxine	lyngbyatoxine	onbekend
Microcystis wesenbergii	(+)									sp
Nodularia spumigena		+								+
Nostoc	+									+
Oscillatoria	+			+				+		+
Oscillatoria limosa	+									+
Oscillatoria nigroviridis								+		+
Oscillatoria tenuis	+									+
Phormidium	+			+						+
Phormidium formosum	+			+						+
Planktothrix	+			+				+		+
Planktothrix agardhii	+									+
Planktothrix formosa				+						+
Planktothrix mougeotii	+									+
Planktothrix rubescens	+									+
Radiocystis fernandoi	+									+
Raphidiopsis curvata						+				+
Raphidiopsis mediterranea				+						+
Schizothrix calcicola								+		+
Snowella lacustris			+							+
Spirulina				+						+
Synechococcus							+			+
Synechocystis	+									+
Trichodesmium lacustre	+			+						+
Umezakia natans						+				+
Woronichinia naegeliana	+		+				+			+

Uit diverse bronnen samengesteld door: Ronald Bijkerk, Koeman en Bijkerk bv, Haren, w w w .koemanenbijkerk.nl; datum 26 november 2009

STOWA IN HET KORT

STOWA is het kenniscentrum van de regionale waterbeheerders (veelal de waterschappen) in Nederland. STOWA ontwikkelt, vergaart, verspreidt en implementeert toegepaste kennis die de waterbeheerders nodig hebben om de opgaven waar zij in hun werk voor staan, goed uit te voeren. Deze kennis kan liggen op toegestap technisch, natuurwetenschappelijk, bestuurlijk-juridisch of sociaalwetenschappelijk gebied.

STOWA werkt in hoge mate vraaggestuurd. We inventariseren nauwgezet welke kennisvragen waterschappen hebben en zetten die vragen uit bij de juiste kennisleveranciers. Het initiatief daarvoor ligt veelal bij de kennisvragende waterbeheerders, maar soms ook bij kennisinstellingen en het bedrijfsleven. Dit tweerichtingsverkeer stimuleert vernieuwing en innovatie.

Vraaggestuurd werken betekent ook dat we zelf voortdurend op zoek zijn naar de ‘kennisvragen van morgen’ - de vragen die we graag op de agenda zetten nog voordat iemand ze gesteld heeft - om optimaal voorbereid te zijn op de toekomst.

STOWA ontzorgt de waterbeheerders. Wij nemen de aanbesteding en begeleiding van de gezamenlijke kennisprojecten op ons. Wij zorgen ervoor dat waterbeheerders verbonden blijven met deze projecten en er ook ‘eigenaar’ van zijn. Dit om te waarborgen dat de juiste kennisvragen worden beantwoord. De projecten worden begeleid door commissies waar regionale waterbeheerders zelf deel van uitmaken. De grote onderzoekslijnen worden per werkveld uitgezet en verantwoord door speciale programmacommissies. Ook hierin hebben de regionale waterbeheerders zitting.

STOWA verbindt niet alleen kennisvragers en kennisleveranciers, maar ook de regionale waterbeheerders onderling. Door de samenwerking van de waterbeheerders binnen STOWA zijn zij samen verantwoordelijk voor de programmering, zetten zij gezamenlijk de koers uit, worden meerdere waterschappen bij één en het zelfde onderzoek betrokken en komen de resultaten sneller ten goede van alle waterschappen.

DE GRONDBEGINSELEN VAN STOWA ZIJN VERWOORD IN ONZE MISSIE:

Het samen met regionale waterbeheerders definiëren van hun kennisbehoeften op het gebied van het waterbeheer en het voor én met deze beheerders (laten) ontwikkelen, bijeenbrengen, beschikbaar maken, delen, verankeren en implementeren van de benodigde kennis.



STOWA

Postbus 2180
3800 CD Amersfoort

BEZOEKADRES

Stationsplein 89, vierde etage
3818 LE Amersfoort

t. 033 460 32 00
e. stowa@stowa.nl
i. www.stowa.nl

COLOFON

Uitgave

Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer | Postbus 2180 | 3800 CD Amersfoort

Auteurs Susan Sollie (Tauw), Edwin Kardinaal (Bureau Waardenburg)

Projectleider Susan Sollie

Contactpersoon namens de opdrachtgever Bas van der Wal (STOWA)

Begeleidingsgroep

Paul Bakker (Ministerie IenW), Michael Bentvelsen (Unie van Waterschappen), Willie van den Berg (Waterproef en ILOW), Marta Demarteau (Aquon), Tineke Dijkstra (FUMO), Richard Feenstra (Wetterskip Fryslân), Ingmar Janse (RIVM), Hans de Kok (Aqualysis), Joep de Koning (Hoogheemraadschap van Delfland), John Laninga (Waterschap Noorderzijlvest), Hans Ruiter (Rijkswaterstaat), Jannes Schenkel (Waterschap Noorderzijlvest), Guido Waajen (Waterschap Brabantse Delta), Bas van der Wal (STOWA), Yvonne Wiersma (Wetterskip laboratorium), Saskia Zierfuss (Hoogheemraadschap Hollands Noorderkwartier).

Expertgroep

Miquel Dionisio Pires (Deltares), Els Faassen (WUR / RIKILT), Edwin Kardinaal (KWR/Bureau Waardenburg), Petra Visser (Universiteit van Amsterdam) en Dedmer van de Waal (NIOO).

Vormgeving Shapeshifter.nl | Utrecht

Fotografie Adobe Stock

Referaat

Blauwalgen vormen een gezondheidsrisico voor zwemmers. Waterbeheerders monitoren het voorkomen van blauwalgen en bepalen het gezondheidsrisico aan de hand het vigerende Blauwalgenprotocol. De daarin opgenomen methoden zijn echter een indirecte maat voor het risico omdat niet de toxines (waar de zwemmer ziek van kan worden) gemeten worden. Dit rapport beschrijft een onderzoek naar het gebruik van nieuwe technieken om een betere risico-inschatting te maken door het inzetten van op DNA-analyse gebaseerde technieken en het meten van toxines.

Wijze van citeren

Sollie, S. en E. Kardinaal, 2020. Risicobeoordeling blauwalgen in zwemwater - Nieuwe technieken voor de bepaling van de aanwezigheid van blauwalgtoxines. STOWA rapport 2020-09

STOWA-rapportnummer 2020-09

ISBN 978.90.5773.873.9

Copyright

De informatie uit dit rapport mag worden overgenomen, mits met bronvermelding. De in het rapport ontwikkelde, dan wel verzamelde kennis is om niet verkrijgbaar. De eventuele kosten die STOWA voor publicaties in rekening brengt, zijn uitsluitend kosten voor het vormgeven, vermenigvuldigen en verzenden.

Disclaimer

Dit rapport is gebaseerd op de meest recente inzichten in het vakgebied. Desalniettemin moeten bij toepassing ervan de resultaten te allen tijde kritisch worden beschouwd. De auteurs en STOWA kunnen niet aansprakelijk worden gesteld voor eventuele schade die ontstaat door toepassing van het gedachtegoed uit dit rapport.

.....



stowa

STICHTING
TOEGEPAST ONDERZOEK WATERBEHEER

stowa@stowa.nl www.stowa.nl
TEL 033 460 32 00 FAX 033 460 32 01
Stationsplein 89 3818 LE AMERSFOORT
POSTBUS 2180 3800 CD AMERSFOORT

