



Ron van der Oost, Waternet

Guido Mattens, Stichting Waterproef*

Bart Schaub, Hoogheemraadschap Rijnland

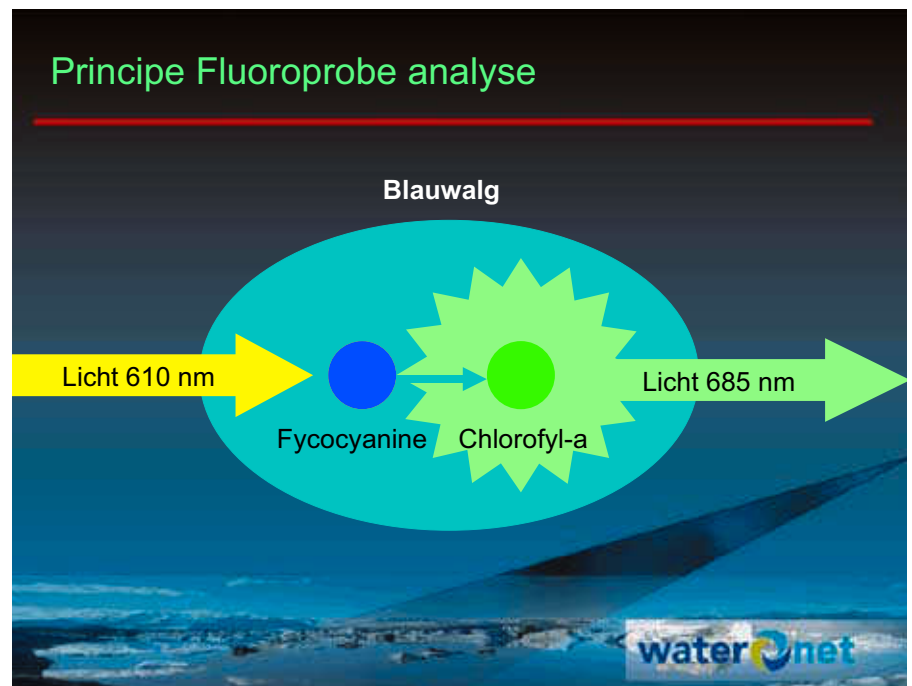
Michelle Talsma, STOWA

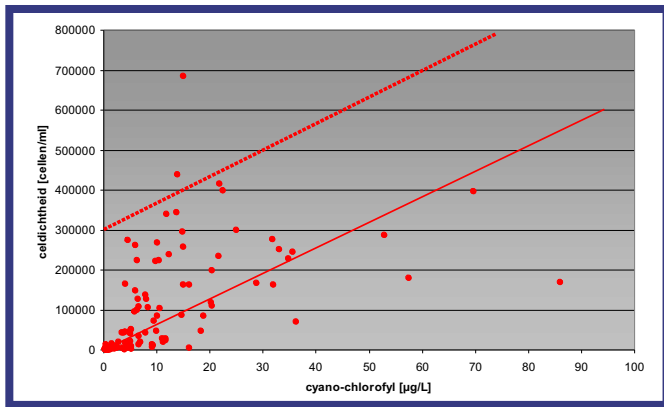
Toepassing fluorescentie bij beoordeling van risico's giftige blauwalgen

Het monitoren van de risico's van giftige blauwalgen is een lastige zaak. Omdat verschillende soorten blauwalgen een zeer groot aantal gifstoffen kunnen produceren waarvan de toxiciteit voor een groot deel nog onbekend is, kan niet worden volstaan met een eenvoudige chemische analyse. In 2008 is door de cyano-werkgroep een risicoanalyse vastgesteld die is gebaseerd op celdichtheid. Omdat cel telling een tijdrovende en dure methode is, heeft STOWA onderzoek uit laten voeren naar de toepasbaarheid van een sneller en goedkoper alternatief: de fluorescentie-analyse van het chlorofyl van blauwalgen (cyano-chlorofyl). In dit onderzoek werd aangetoond dat de fluorescentie-analyse een robuuste methode is waarmee het biovolume van blauwalgen goed kan worden voorspeld. Omdat de fluorescentie-analyse betrouwbaarder lijkt dan de nu gehanteerde cel telling, adviseert de cyano-werkgroep om de risicoanalyse niet uit te voeren op basis van blauwalgen-celdichtheid maar op basis van cyano-chlorofyl of biovolume. De normen voor de risico's van blauwalgen zijn in het huidige protocol aangepast, mede naar aanleiding van de resultaten van deze studie.

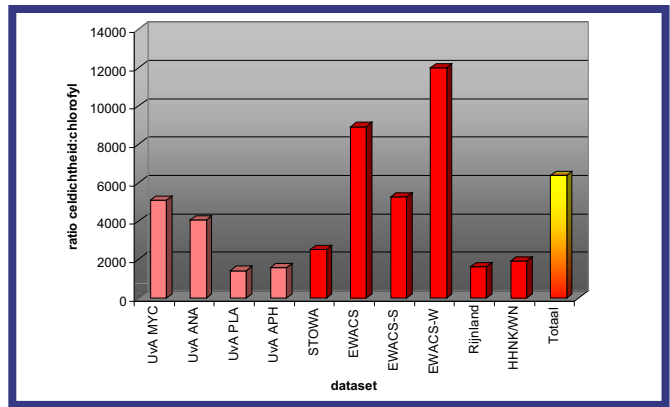
Door de vorming van giftige stoffen (cyanotoxines) kunnen blauwalgen gevaarlijk zijn voor de gezondheid van recreanten¹⁾. In de Europese zwemwaterrichtlijn is opgenomen dat recreanten beschermd moeten worden tegen deze risico's door goede monitoring en adequate maatregelen. Er worden in deze richtlijn echter geen methoden en normen voorgeschreven. De VN-wereldgezondheidsorganisatie WHO gaf in 1999 richtwaarden voor risico's op grond van het aantal giftige blauwalgen, waarop het blauwalgenprotocol van de werkgroep cyanobacteriën is gebaseerd. Het nadeel van deze methode is dat het microscopische onderzoek tijdrovend en duur is, terwijl de risicoanalyse juist een snelle methode nodig heeft om tijdig maatregelen te kunnen nemen. STOWA heeft Waternet onderzoek laten uitvoeren naar de toepasbaarheid van de snelle en goedkope fluorescentie-analyse van het chlorofyl van blauwalgen (cyano-chlorofyl). De resultaten staan in het zojuist verschenen STOWA-rapport 'Toepassing van fluorescentie bij de beoordeling van de risico's van giftige blauwalgen'²⁾.

Afb. 1: Schematische weergave van het principe van de fluorescentiemeting.

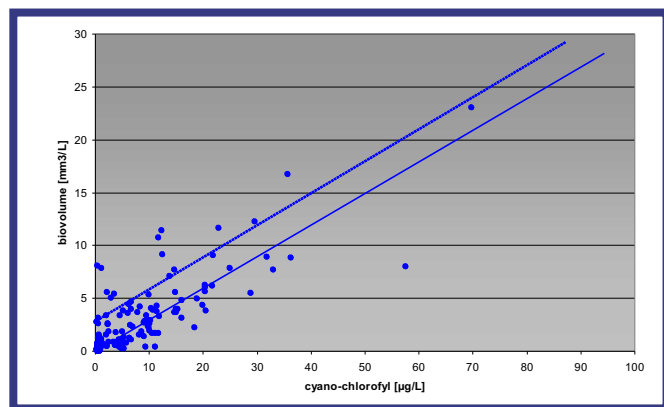




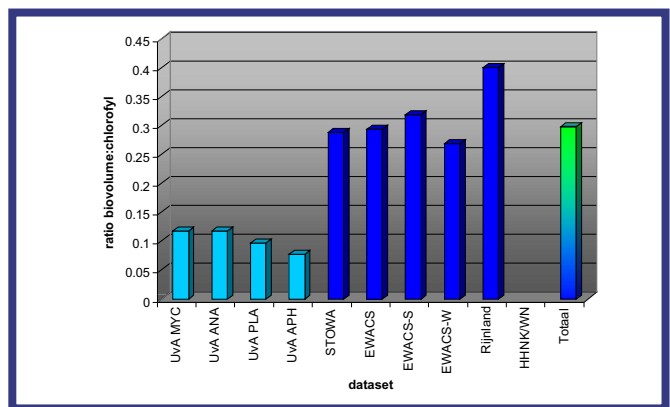
Afb. 2: Relatie tussen cyano-chlorofyl (fluorescentie) en celdichtheid (microscopie) met 95 procent betrouwbaarheidsinterval (gestippelde lijnen).



Afb. 3: Verhouding tussen celdichtheid en cyano-chlorofyl voor verschillende datasets: roze = gekweekte blauwalgen, rood = natuurlijke blauwalgen, rood-geel = gemiddelde totale dataset (zie voor de dataset de codes bij tabel 1).



Afb. 4: Relatie tussen cyano-chlorofyl en biovolume met 95 procent betrouwbaarheidsinterval.



Afb. 5: Verhouding tussen biovolume en cyano-chlorofyl voor verschillende datasets: lichtblauw = gekweekte blauwalgen, blauw = natuurlijke blauwalgen, blauw-groen = gemiddelde totale dataset (zie voor dataset de codes bij tabel 1).

Fluorescentie-analyse van cyano-chlorofyl

De verschillende soorten blauwalgen worden met fluorescentie niet onderscheiden. Het is wel mogelijk om onderscheid te maken tussen vier groepen fytoplankton (blauwalgen, groenalgen, diatomeeën en cryptofyten), die alle karakteristieke kleurstoffen bezitten. De kleurstof in blauwalgen is fycocyanine. Ingestraald licht met specifieke golflengten wordt geabsorbeerd door de kleurstoffen, waarna de energie via het fotosynthese-apparaat aan chlorofyl-a wordt overgedragen. Deze energie wordt omgezet in een lichtuitstraling (fluorescentie) van chlorofyl-a, die zeer gevoelig kan worden gedetecteerd (zie afbeelding 1). Met de fluorescentiemethode wordt dus eigenlijk het chlorofyl van de blauwalgen (cyano-chlorofyl) geanalyseerd. Dit is een goede maat voor de hoeveelheid aanwezige blauwalgen^{3,4}.

Uitvoering van het onderzoek

Het doel van dit onderzoek was om na te gaan of fluorescentiemetingen als alternatief voor microscopische celtellingen kunnen worden gebruikt bij de monitoring van blauwalgen. De fluorescentie-analyses voor dit onderzoek werden bij Waterproef en Rijnland uitgevoerd met een bbe Moldaenke Fluoroprobe. In eerste instantie werd de robuustheid van de methoden (fluorescentie, celdichtheid en biovolume) onderzocht. Vervolgens werden de relaties tussen de fluorescentie en de microscopische parameters (celdichtheid en biovolume) in

veldmonsters onderzocht. Om de invloed van soortverschillen te analyseren werden op de Universiteit van Amsterdam gekweekte reïnculturen van *Microcystis*, *Planktothrix*, *Anabaena* en *Aphanizomenon* onderzocht. De relaties tussen de drie methoden en de concentraties van het cyanotoxine microcystine werden onderzocht om de relevantie voor de analyse van gezondheidseffecten te bepalen. De microcystinegehalten werden gebruikt als maat voor de aanwezigheid van door blauwalgen uitgescheiden giftige stoffen. Naast de monsters die voor het STOWA-onderzoek werden genomen, zijn ook datasets geanalyseerd van de EWACS (Early Warning Against Cyano Scums)-monitoring van de Sloterplas en de Westeinderplassen en van reguliere monitoring van Waternet, Rijnland en Hollands Noorderkwartier.

Robuustheid van de analyses

De lineariteit van de Fluoroprobe in het meetbereik van 0 tot 400 µg chlorofyl per liter en de herhaalbaarheid van de analyse van een standaard controlemonster zijn uitstekend. Er is een statistisch significante lineaire relatie aangetoond tussen de totaalchlorofyl-a-resultaten van de fluorescentie-analyse en de algemeen gebruikte spectroscopische NEN-6520 analyse⁵. De NEN chlorofyl-gehalten waren een factor 1,6 hoger dan de gehalten die met fluorescentie waren bepaald, maar hierop kan de Fluoroprobe worden gekalibreerd. De relatie kan worden gebruikt om de resultaten van de Fluoroprobe te vergelijken met die van andere fluorescentie-apparatuur.

Om de robuustheid van de celtelling te analyseren, zijn vier gelijke monsters aangeboden aan drie goede Nederlandse laboratoria (Het Waterlaboratorium, Koeman & Bijkerk en Aqualab). Uit de zeer grote verschillen tussen celdichtheden en biovolume (tot 59 procent afwijking) bleek dat de microscopische analyses minder nauwkeurig zijn. De fluorescentie-analyse is een meer eenduidige methode die minder spreiding geeft en daardoor betrouwbaarder is.

Vergelijking tussen cyano-chlorofyl, celdichtheid en biovolume

De toepasbaarheid van de fluorescentiemethode is getoetst door vergelijking met microscopische analyses van de celdichtheid en het biovolume van blauwalgen in verschillende datasets. De relatie tussen de blauwalgenceldichtheid en fluorescentie (cyano-chlorofyl) was matig tot slecht (zie afbeelding 2). Hoewel een statistisch significante relatie bestaat tussen deze variabelen, is het 95 procent betrouwbaarheidsinterval te groot voor een goede voorspelling van de celdichtheid met cyano-chlorofyl. Bij verschillende datasets werden bovendien zeer uiteenlopende verhoudingen gevonden tussen de blauwalgenceldichtheid en het cyano-chlorofyl (zie afbeelding 3). Deze verschillen kunnen voor het belangrijkste deel worden verklaard met het feit dat verschillende soorten blauwalgen dominant waren op de verschillende locaties (zie tabel 1) en mogelijk ook door onnauwkeurigheden van de microscopische analyses.

De lineaire relatie tussen het cyano-chlorofyl en het microscopisch bepaalde biovolume is redelijk goed (zie afbeelding 4). Er was een statistisch zeer significante relatie waarvan het 95 procent betrouwbaarheidsinterval klein genoeg was voor een betrouwbare voorspelling van biovolume met cyano-chlorofyl. De verhouding tussen cyano-chlorofyl en blauwalgenbiovolume was bovendien zeer constant voor de verschillende datasets (zie afbeelding 5). Soortverschillen spelen bij de verhouding tussen chlorofyl en biovolume een minder grote rol. Grotere cellen kunnen immers meer chlorofyl bevatten. Omdat het logisch lijkt dat grotere cellen ook meer toxines kunnen bevatten, is deze parameter relevanter voor de risicoanalyse dan de celtelling. De grote verschillen tussen de verhoudingen van gekweekte en natuurlijke blauwalgen worden veroorzaakt door morfologische veranderingen bij de gekweekte blauwalgen.

Vergelijking tussen blauwalgenparameters en microcystinegehalten

De resultaten van de fluorescentie-analyses en het microscopische onderzoek zijn vergeleken met concentraties van de blauwalgengifstof microcystine. Met deze gifstof werden tot 2008 de risico's voor de zwemmers beoordeeld. In afbeelding 6 is te zien dat voor geen van de variabelen voor de hoeveelheid blauwalgen een relatie kan worden aangetoond met dit cyanotoxine, zelfs als alleen monsters met een dominantie van het bekendste microcystine vormende geslacht *Microcystis* in beschouwing werden genomen (rode punten in de grafieken). Dit kan verklaard worden doordat niet alle soorten van de toxische blauwalgeslachten toxines produceren en dat de toxineproductie in de giftige soorten zeer variabel kan zijn, afhankelijk van de groeisnelheid. De onderzochte methoden om de hoeveelheid blauwalgen te bepalen (cyano-chlorofyl, biovolume en celdichtheid) lijken daarom geen van alle een goede maat voor de actuele risico's voor de zwemmers. Deze drie parameters zijn slechts indicatoren voor de hoeveelheid blauwalgen. Omdat de risico's voor de zwemmer met deze methoden vaak worden overschat, zijn de Nederlandse normen hoger dan de WHO-richtwaarden.

Tabel 2. Voorgestelde normen en acties blauwalgenmonitoring

* WHO-norm voor verhoogd gezondheidsrisico

Normen & acties	drijfslag	biovolume mm ³ /l	cyano-chlorofyl µg/l
1. Verhoogde alertheid (minimaal wekelijks monitoren, microscopisch onderzoek toxische soorten)	categorie 1	1	5
2. Waarschuwing plaatsen	categorie 2	5	25
3: Negatief zwemadvies afgeven (in extreme gevallen zwemverbod)	categorie 3	10	50*

dataset*	ratio celdichtheid: chlorofyl	ratio biovolume: chlorofyl	dominante genera**			
UvA MYC	5076	0.118	MY			
UvA ANA	4081	0.117		AN		
UvA PLA	1424	0.096			PL	
UvA APH	1560	0.077				AP
STOWA	2524	0.288	MY	AN	PL	AP
EWACS	8930	0.293	MY	AN		AP
EWACS-S	5274	0.319	MY	AN		
EWACS-W	12001	0.268	MY			AP
Rijnland	1631	0.401	MY		PL	
HHNK/WN	1912		MY	AN	PL	AP
Totaal limit	7193	0.298	MY	AN	PL	AP

Tabel 1. Verhouding tussen microscopie (celdichtheid en biovolume) en fluorescentie.

* UvA = Op de Universiteit van Amsterdam gekweekte *Microcystis* (MYC), *Anabaena* (ANA), *Planktothrix* (PLA) en *Aphanizomenon* (APH).

STOWA = STOWA-onderzoek uit 2008.

EWACS = Early Warning Against Cyano Scums, EWACS-S = Sloterplas, EWACS-W = Westeinderplassen.

Rijnland = Vlietland 2008.

HHNK/WN = reguliere monitoring Hollands Noorderkwartier en Waternet in 2009.

** dominante genera: MY = *Microcystis*, AN = *Anabaena*, PL = *Planktothrix*, AP = *Aphanizomenon*.

Conclusies

Op basis van dit onderzoek wordt geconcludeerd dat fluorescentie een goede maat is voor het biovolume van blauwalgen in veldmonsters. Het is daarmee een goede methode om de aanwezigheid van blauwalgen in zwemwater te kwantificeren. Voor een risicoanalyse van blauwalgen is echter altijd een aanvullende (kwalitatieve) microscopische analyse nodig om na te gaan of de potentieel toxische blauwalgen dominant aanwezig zijn.

In de meeste gevallen kunnen de risico's van blauwalgen al met een visuele inspectie (aanwezigheid drijfslagen) worden bepaald. Als er geen drijfslagen zichtbaar zijn, kunnen blauwalgen toch een risico voor de zwemmers vormen, bijvoorbeeld bij niet-drijfslagvormende blauwalgen zoals *Planktothrix agardhii*. In zulke gevallen moet een andere methode worden gebruikt om de risico's te analyseren. Geen van de nu beschikbare methoden voor blauwalgenmonitoring is echter in staat om deze risico's voor recreanten nauwkeurig te analyseren.

Zo is de microcystine-analyse niet geschikt voor alle soorten blauwalgen in Nederland, omdat ook andere cyanotoxines worden geproduceerd. Met de overige methoden wordt wel de aanwezigheid van blauwalgen vastgesteld, maar niet het risico bepaald. De normen die de WHO aangeeft voor risico's van blauwalgen in recreatiewater zijn de celdichtheid (100.000 cellen/ml), microcystine (20 µg/l) en cyano-chlorofyl (50 µg/l). Met de in dit onderzoek gevonden lineaire relatie tussen cyano-chlorofyl en blauwalgenbiovolume is een risiconorm voor het biovolume van blauwalgen afgeleid van tien kubieke millimeter per liter. De totale dataset van dit onderzoek is geanalyseerd op deze vier normoverschrijdingen voor een negatief zwemadvies. Het bleek dat de norm voor microcystine het minst vaak wordt overschreden. Verreweg de meeste overschrijdingen worden gevonden op grond van de celdichtheid. De normen op basis van cyano-chlorofyl en biovolume worden meer dan microcystine maar minder dan de celdichtheid overschreden.

Aanbevelingen

Naar aanleiding van deze studie heeft de cyanowerkgroep een aantal aanbevelingen gedaan:

- De normen voor risico's van blauwalgen in het blauwalgenprotocol moeten worden aangepast. De risicoanalyse kan beter niet worden uitgevoerd op basis van blauwalgenceldichtheid maar op basis van cyano-chlorofyl (fluorescentie) of biovolume (microscopie). Toepassing van fluorescentie heeft de voorkeur, omdat deze methode minder foutgevoelig is dan microscopie. Bij een cyano-chlorofylgehalte hoger dan 5 µg/l wordt geadviseerd om een kwalitatief microscopisch onderzoek uit te voeren om de dominante soorten blauwalgen te bepalen. In het

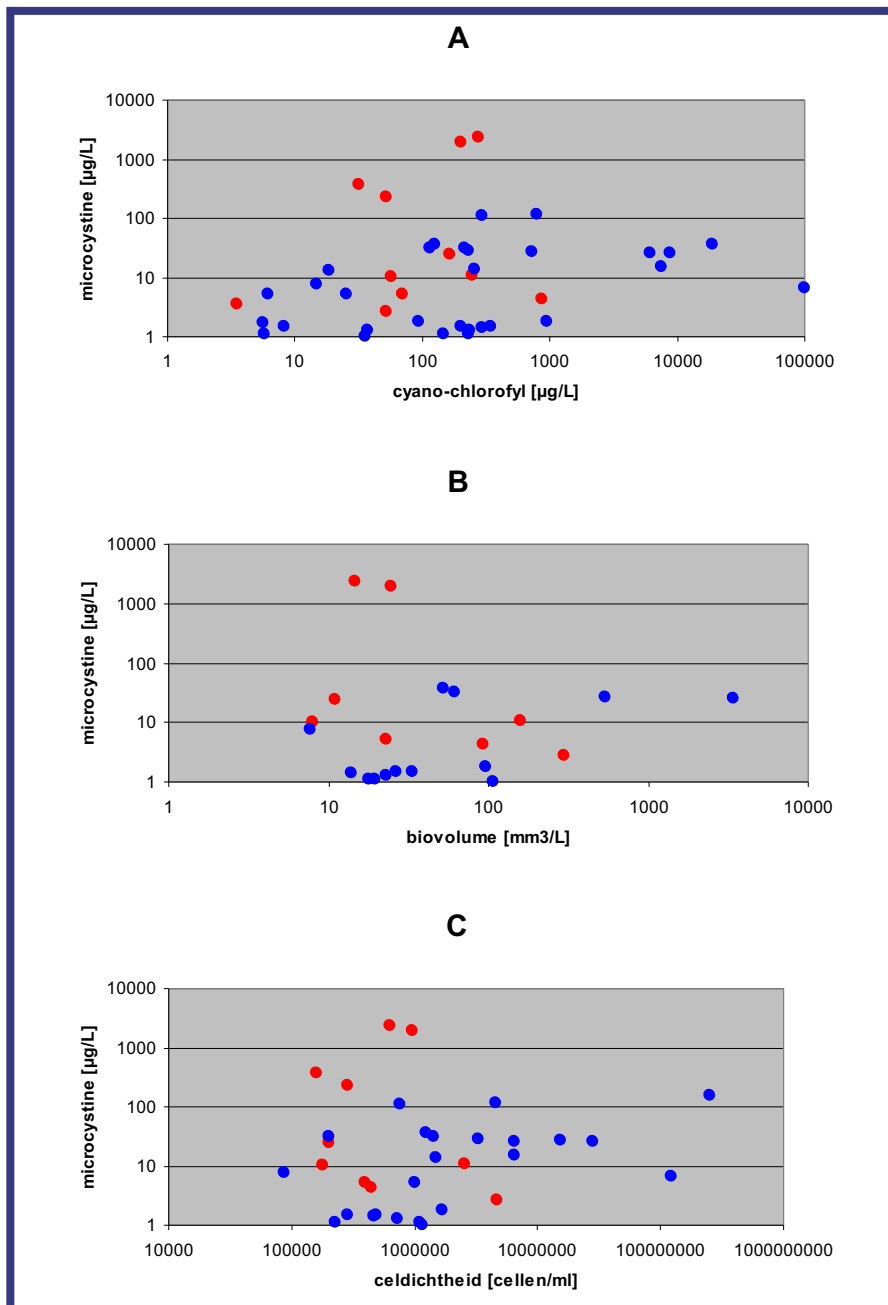
seerd. Hierop zal een toekomstig systeem voor de risicoanalyse van blauwalgen kunnen worden gebaseerd.

NOTEN

* Stichting Waterproef is het laboratorium van het Hoogheemraadschap Hollands Noorderkwartier en Waternet.

LITERATUUR

- 1) Pilotto L., R. Douglas, M. Burch, S. Cameron, M. Beers, G. Rouch, F. Robinson, M. Kirk, C. Cowie, C. Moore en R. Attewell (1997). Health effects of recreational exposure to cyanobacteria (blue-green algae) during recreational water-related activities. Aust. New Zeal. J. Public Health 21, pag. 562-566.
- 2) Van der Oost R. (2010). Toepassing van fluorescentie bij de beoordeling van de risico's van giftige blauwalgen. STOWA. Rapport 2010-18.
- 3) Beutler M., K. Wiltshire, B. Meyer, C. Moldaenke, C. Lüring, M. Meyerhöfer, U. Hansen en H. Dau (2002). A fluorometric method for the differentiation of algal populations in vivo and in situ. Photosynth Res. 72, pag. 39-53.
- 4) Gregor J. en B. Marsalek (2004). Freshwater phytoplankton quantification by chlorophyll a: a comparative study of in vitro, in vivo and in situ methods. Water Research 38, pag. 517-522.
- 5) NEN (2006). Water - Spectrofotometrische bepaling van het gehalte aan chlorofyl-a. NEN-norm 6520:2006.



Afb. 6: Relatie tussen het totaalgehalte microcystine en cyano-chlorofyl (A), biovolume (B) en celdichtheid (C). Weergave op log-log-schaal. Rood = locaties met dominantie van *Microcystis*.

blauwalgenprotocol 2010 is hiervoor een hogere waarde van 12,5 µg/l opgenomen;

- Vanaf 2011 moet de risicoanalyse van blauwalgen worden gebaseerd op drijfvlagen, biovolume of cyano-chlorofyl. De voorgestelde normen en acties zijn weergegeven in tabel 2. Deze normen kunnen in de toekomst naar aanleiding van voortschrijdend inzicht worden aangepast. Inmiddels heeft het Nationaal Water Overleg een blauwalgenprotocol voor dit jaar vastgesteld waarin een aantal aanbevelingen uit deze studie is opgenomen. Volgens dit protocol kunnen de risico's voor de zwemmers dit jaar zowel op basis van celdichtheid, biovolume en cyano-chlorofyl worden beoordeeld. Celdichtheid is nog wel opgenomen als parameter, omdat de meeste waterbeheerders hun monitoringprogramma's voor dit lopende seizoen al vastgesteld

hadden. De normen voor een negatief zwemadvies (zwemverbod) in het blauwalgenprotocol 2010 liggen hoger dan de in dit onderzoek aanbevolen waarden;

- De kwaliteit van de blauwalgenmonitoring moet worden getoetst met een ringonderzoek, waarbij de fluorescentie-analyse en het microscopische onderzoek worden vergeleken. In alle voor dit ringonderzoek aangeboden monsters moet een breed pakket aan toxine-analyses worden uitgevoerd om de relevantie van de uitkomsten te kunnen toetsen;
- Om in de toekomst een meer relevante monitoring van de blauwalgenrisico's uit te kunnen voeren, wordt aanbevolen om onderzoek te doen naar de ontwikkeling van een effectgericht monitoringssysteem met bioassays, waarmee de mogelijke risico's van cyanotoxines voor lever, zenuwstelsel en cellen worden geanalyse-