

# Testen Cyanotoxigenen kit

Onderzoek naar een nieuwe DNA-methode voor het bepalen van toxines van cyanobacteriën in zwemwater



# Testen Cyanotoxigenen kit

Onderzoek naar een nieuwe DNA-methode voor het bepalen van toxines van cyanobacteriën in zwemwater

---

<b>Projectnaam:</b>	Testen Cyanobacteriën kit
<b>Projectnummer WLN:</b>	WON 2017-5
<b>Datum:</b>	11 maart 2020
<b>Status:</b>	Definitief
<b>Documentnaam:</b>	Eindrapport test DNA kit cyanobacteriën in zwemwater WON d270121
<b>Vrijgave door:</b>	Peter van der Maas
<b>Goedgekeurd door:</b>	WON werkgroep DNA kit cyanobacteriën
<b>Opdrachtgever:</b>	WON
<b>Contract nummer:</b>	

---



Het kwaliteitsmanagementsysteem van WLN B.V. is gecertificeerd volgens ISO 9001 en is van toepassing op het op projectmatige basis adviseren op het gebied van watertechnologie.

Ondanks alle zorg die aan de samenstelling van deze uitgave is besteed, kan noch de auteur, noch WLN B.V., noch WLN Business B.V. aansprakelijkheid aanvaarden voor schade die het gevolg is van enige fout in deze uitgave.

© WLN Niets uit dit bestek/drukwerk mag worden verveelvoudigd en/of openbaar gemaakt door middel van druk, fotokopie, microfilm of op welke andere wijze dan ook zonder voorafgaande toestemming van WLN B.V., noch mag het zonder een dergelijke toestemming worden gebruikt voor enig ander werk dan waarvoor het is vervaardigd.

# Inhoudsopgave

<b>1</b>	<b>INLEIDING</b> .....	<b>4</b>
1.1	BLAUWALGEN EN TOXINES.....	4
<b>2</b>	<b>ACHTERGRONDINFORMATIE</b> .....	<b>5</b>
2.1	HUIDIGE METHODEN .....	5
2.2	DNA METHODE.....	6
2.3	RELATIE TOXINEGENEN EN TOXINES .....	7
<b>3</b>	<b>ONDERZOEK</b> .....	<b>8</b>
3.1	OPZET VAN HET ONDERZOEK .....	8
3.2	RESULTATEN ONDERZOEK .....	8
<b>4</b>	<b>CONCLUSIES EN ADVIES</b> .....	<b>11</b>
<b>5</b>	<b>REFERENTIES</b> .....	<b>12</b>

# 1 Inleiding

## 1.1 Blauwalgen en toxines

### Achtergrond

Onder sommige omstandigheden, vooral bij hogere temperaturen, kan in oppervlaktewater de concentratie cyanobacteriën<sup>1</sup>, ook wel blauwalgen genoemd, toenemen. Sommige van deze cyanobacteriën scheiden giftige stoffen (toxines) uit. In Nederland bestaat alleen voor de door blauwalgen uitgescheiden toxine 'microcystine' een zwem- en drinkwaternorm. Voor zwemwater in Nederland geldt een waarschuwniveau van 10 µg/L microcystine en een zwemverbod bij 20 µg/L microcystine. De Wereldgezondheidsorganisatie (WHO) heeft voor drinkwater een norm afgegeven van 1,0 µg/L microcystine.

In het Cyanobacteriënprotocol uit 2012 staan geen uniforme analysevoorschriften voor de bepaling van de concentratie microcystines. Dit betekent dat er verschillende analysemethoden worden gebruikt, waardoor de resultaten niet (goed) met elkaar te vergelijken zijn.

De concentratie van cyanobacteriën wordt gemeten door middel van fluorescentie of microscopisch onderzoek (volgens het Cyanobacteriënprotocol uit 2012). Alleen de cyanobacteriën, waarvan uit de literatuur bekend is dat ze tot toxinevormende geslachten behoren, worden geteld. Er wordt van uitgegaan dat alle toxinevormende cyanobacteriën toxines vormen (worst case). Uit DNA-onderzoek blijkt dat cyanobacteriën wel of geen toxine-gen kunnen hebben. Het wel of niet aanwezig zijn van dit gen kan binnen een soort verschillen.

### Nieuwe meetmethode

Recent is op basis van DNA-techniek een kit ontwikkeld waarmee verschillende blauwalgentoxines kunnen worden bepaald. Hierdoor wordt een beter en betrouwbaarder beeld gekregen van de risico's voor de volksgezondheid, omdat alleen die cyanobacteriën worden meegeteld die ook daadwerkelijk de toxine-genen met zich meedragen. Bijkomend voordeel van een eventueel toekomstig gebruik van de DNA-kit is, dat de analysemethode voor alle gebruikers hetzelfde is. N.B. Het daadwerkelijk geproduceerde aantal toxines wordt (net als bij de bestaande methoden) niet gemeten.

In het WON onderzoeksprogramma is de nieuwe DNA-methode vergeleken met de gangbare beoordelingsmethodiek. Het doel van deze vergelijking was oriënterend: biedt de DNA-methode potentie om in de praktijk te worden toegepast als alternatief voor de huidige methoden voor de beoordeling van cyanobacteriën in zwemwater.

### Leeswijzer

In dit rapport wordt verslag gedaan van het oriënterende onderzoek. Hierna wordt in hoofdstuk 2 achtergrondinformatie gegeven over de huidige meetmethoden voor waterkwaliteitsbeoordeling en de nieuwe methode op basis van DNA. In hoofdstuk 3 is de opzet van het uitgevoerde onderzoek beschreven.

---

<sup>1</sup> De officiële naam voor deze groep is *Cyanobacteriën*, afgeleid van de blauw-groene cyaankleur. Verwarrend is dat voor deze groep in de volksmond ook de naam blauwalgen wordt gebruikt, wat onjuist is. De cyanobacteriën behoren namelijk tot de bacteriën en niet tot de algen.

## 2 Achtergrondinformatie

### 2.1 Huidige methoden

Het toxine (microcystine) gehalte is in de praktijk moeilijk eenduidig vast te stellen; de doorlooptijd van de analyse is veelal lang en de analyse is kostbaar. Om deze reden wordt in Nederland een inschatting gemaakt van de potentiële hoeveelheid toxines, gebaseerd op de hoeveelheid (biomassa) aan cyanobacteriën. Hiervoor worden fluorescentiemetingen en microscopisch onderzoek toegepast.

#### Fluorescentie

De verschillende cyanobacterie soorten bevatten een unieke samenstelling van pigmenten die specifieke golflengtes absorberen. Hierdoor kan met behulp van fluorescentie de concentratie van de soorten worden gemeten; deze wordt uitgedrukt in  $\mu\text{g/L}$  (relatieve eenheden).

Wanneer de concentratie cyanobacteriën bekend is, kan deze worden omgerekend naar een concentratie microcystine. Hiervoor wordt een factor gebruikt, die op basis van praktijkonderzoek is vastgesteld (Chorus and Bartram, 1999). Als omrekeningsfactor wordt  $0,23 \mu\text{g}$  microcystine per  $\mu\text{g}$  cyanobacteriën gehanteerd. (Izydorczyk et al., 2009).

#### Microscopisch onderzoek

De verschillende cyanobacteriën worden per soort/geslacht geteld. In de meeste gevallen wordt alleen naar de meest voorkomende, potentieel toxische cyanobacteriën gekeken (*Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Planktothrix* en *Woronichinia*). De basis hiervoor ligt bij voortschrijdend wetenschappelijk inzicht (WHO Toxic Cyanobacteria in Water Working Group, Revision of Toxic Cyanobacteria in Water). Toxiciteit kan voor andere soorten en geslachten niet worden uitgesloten. Om deze reden wordt door andere instanties de uitgebreide lijst gebruikt. Er zijn twee stromingen: alle (potentieel) toxische geslachten kwantificeren of alleen de 'big five'. Daarna wordt het biovolume bepaald door het aantal teleenheden per soort/geslacht met een vastgestelde grootte te vermenigvuldigen.

Het biovolume in  $\text{mm}^3$  wordt vermenigvuldigd met de theoretische waarde van  $1 \mu\text{g}$  bij een biovolume van  $0,33 \text{ mm}^3$  ( $0,2 \text{ pg}$  microcystine per cel, conform Falconer, 2005). Er wordt vanuit gegaan dat alle cyanobacteriën microcystine produceren.

#### Huidige methoden gebruikt in dit onderzoek

Waterschap Hunze en Aa's en Waterschap Noorderzijlvest beoordelen het zwemwater middels microscopisch onderzoek. Wetterskip Fryslân beoordeelt het zwemwater met behulp van fluorescentie. Bij overschrijding van vastgestelde grenzen wordt een 'quick scan' naar de samenstelling van de cyanobacteriën populatie gedaan.

De omrekeningen zijn gebaseerd op waarden uit de praktijk. In het algemeen kennen de microscopische analyses en fluorescentiemetingen een vergelijkbaar niveau. De gemeten waarden worden voor zwemwater getoetst aan de normen die zijn weergegeven in tabel 1. Aan de hand van de toetsing wordt besloten of een waarschuwing geplaatst moet worden (risiconiveau 1) of een negatief zwemadvies wordt afgegeven (risiconiveau 2).

Tabel 1. Normen voor de biomassa aan cyanobacteriën in zwemwater volgens het Cyanobacteriën protocol 2012

	Microscopische analyse		Fluorescentie	
	Cel dichtheid	Biovolume	Cyano-chlorofyl	Microcystine
	Cellen/ml	mm <sup>3</sup> /l	µg/l	µg/l
<b>Risiconiveau 1</b> waarschuwing plaatsen	50.000	2,5	12,5	10
<b>Risiconiveau 2</b> negatief zwemadvies	300.000	15	75	20

## 2.2 DNA methode

Bij deze methode wordt de aanwezigheid van toxinegenen door middel van moleculaire DNA-techniek (op basis van real time PCR) aangetoond. Met de DNA-methode kan onderscheid gemaakt worden tussen de hoeveelheid genen van toxinevormende en niet-toxinevormende cyanobacteriën. Cyanobacteriën die geen drager van een toxinegen zijn, kunnen geen toxines produceren. Hierdoor is het mogelijk de toxineproductie nauwkeuriger te voorspellen. Wanneer het aantal toxinegenen (kopieën/ml) bepaald is, kan worden vastgesteld hoeveel toxine er maximaal geproduceerd kan worden. Bij de berekening van de microcystine concentratie wordt ervan uitgegaan dat alle toxinegenen 'aan' staan (worst case).

WLN is lid van Isle Utilities, een organisatie die voor haar leden innovaties in de watertechnologie scout. In deze database met innovatieve technologieën is een test gevonden die, op basis van DNA-PCR-technologie, toxinegenen in cyanobacteriën kan meten. Deze techniek, de Phyttoxinegene™ CyanoDTec kit, is ontwikkeld en op de markt gebracht door de firma Diagnostic Technology uit Australië. De test kwantificeert de hoeveelheid cyanobacteriën, samen met het aantal genen dat verantwoordelijk is voor de productie van de toxines.

Daarnaast is de firma Sylphium molecular ecology (gelieerd aan Bureau Waardenburg Vestiging Noord (voormalig Koeman & Bijkerk)) ook bezig met de ontwikkeling van een moleculaire (DNA) techniek om (op basis van real time PCR) toxinegenen in cyanobacteriën aan te tonen (presentatie WON (11 juli 2016). Beide kits onderscheiden verschillende toxinegenen.

Deze verschillende toxinegenen kits corresponderen met de volgende toxines:

- de Phyttoxinegene™ CyanoDTec: microcystine, cylindrospermospine en saxitoxine;
- Sylphium: microcystine, cylindrospermospine, saxitoxine en anatoxine.

WLN heeft in 2017 de Phyttoxinegene™ CyanoDTec kit van Diagnostic Technology getest. De kit van Sylphium molecular ecology was ten tijde van het onderzoek nog niet operationeel.

## 2.3 Relatie toxinegenen en toxines

Door Diagnostic Technology is onderzoek in Ohio uitgevoerd, wat heeft geresulteerd in een door hen gedefinieerde correlatie tussen het aantal kopieën microcystine toxinegenen en de concentratie microcystine. Belangrijk hierbij is, dat het om een onderzoek van toxines in drinkwater gaat, waardoor de correlatie niet is bepaald voor gehalten hoger dan 1,6 µg/L microcystine. De WHO-norm voor drinkwater is immers 1,0 µg/L microcystines.

De firma Sylphium molecular ecology heeft onderzoek naar cyanotoxine genen in Nederlands oppervlaktewater gedaan. Daaruit bleek dat 1 miljoen (M) kopieën microcystine toxinegenen per ml overeenkomen met maximaal 10 µg microcystine per liter (J.A. Warmink, Sylphium niet gepubliceerde gegevens). Deze waarden komen overeen met in de literatuur gevonden waarden (Francy et al., 2016; Singh et al, 2015).

Aangezien het in dit onderzoek om zwemwater gaat, waarbij de verwachte microcystine gehalten hoger dan 1,6 µg/L zijn, is in dit onderzoek de correlatie van Sylphium molecular ecology gebruikt:  
1 M kopieën/ml microcystine toxinegenen = maximaal 10 µg/L microcystine

## 3 Onderzoek

### 3.1 Opzet van het onderzoek

Door Waterschap Hunze en Aa's, Waterschap Noorderzijlvest en Wetterskip Fryslân zijn monsters van verschillende zwemwaterlocaties aangeleverd. Deze monsters zijn door de waterschappen met de gangbare methoden onderzocht: respectievelijk via microscopisch onderzoek (Hunze en Aa's en Noorderzijlvest) en fluorescentie (Wetterskip Fryslân). WLN heeft 40 monsters geselecteerd en aanvullend met de DNA kit van Diagnostic Technology onderzocht. De resultaten van de huidige methoden zijn vergeleken met de resultaten van de DNA kit. Bij enkele monsterpunten was een drijfslag aanwezig. Afhankelijk van de wijze van monsternamen kan dit van invloed zijn op de meetresultaten. Deze monsters zijn niet meegenomen in de vergelijking van de twee meetmethoden (in tabel 3, blauw weergegeven in de kolom risiconiveau).

### 3.2 Resultaten onderzoek

In tabel 3 zijn de meetresultaten en de bijbehorende risiconiveaus weergegeven. Voor het bepalen van het risiconiveau op basis van de resultaten van de DNA-methode, is de genoemde correlatie van Sylphium gebruikt (niet gerapporteerd, maar wel bevestigd in de literatuur (Francy, 2016 en Singh et.al 2015), waarbij 1 miljoen kopieën microcystine toxinegenen overeenkomen met maximaal 10 µg microcystine/L. Deze 10 µg/l is de waarschuwnorm uit het Cyanobacteriën protocol uit 2012.

Boven de 10 µg/L microcystine is geen relatie bekend met het aantal kopieën microcystine toxinegenen. Het risiconiveau 2, negatief zwemadvies, is daarom niet aangegeven.

Uit tabel 3 blijkt dat het aantal overschrijdingen gebaseerd op de resultaten van de DNA-methode aanzienlijk lager is dan het aantal overschrijdingen bepaald met de huidige methoden. De verklaring hiervoor moet worden gezocht in het feit dat de DNA-methode de niet-toxinevormende cyanobacteriën niet meeneemt in de berekening.

Met de DNA kit van Diagnostic Technology worden, naast de microcystine vormende, ook cylindrospermospine en saxitoxine vormende cyanobacteriën gemeten. In tabel 4 zijn ook de meetresultaten voor deze twee andere soorten cyanobacteriën weergegeven. In alle geanalyseerde monsters, behalve De Vleijen, Ameland, 16 mei 2017, komen cylindrospermospine en/of saxitoxine vormende cyanobacteriën voor. Er zijn in het Cyanobacteriën protocol uit 2012 geen wettelijke normen voor de toegestane concentraties cylindrospermospine en saxitoxine gegeven. Cylindrospermospine en saxitoxine zijn zeker zo toxisch voor de volksgezondheid als microcystine. Saxitoxine is een krachtig neurotoxicum. Cylindrospermospine is giftig voor lever- en nierweefsel en wordt verondersteld de eiwitsynthese te remmen en DNA en/of RNA covalent te modificeren.



Tabel 3: Overzicht vergelijking resultaten bepaling risiconiveau DNA-methode (risiconiveau *Syphium*) en de huidige methoden.

Waterschap	Locatie	Datum	DNA methode			Huidige methode		
			Aantal kopieën toxinegenen/ml	Beoordeling norm > 1M	Risiconiveau	microscop	Fluorescentie	Risiconiveau
						Biovolume (mm <sup>3</sup> /l)	Chlorofyl-a van toxische cyanobacteriën (µg/l)	
Hunze en Aa's	Meerwijck	11-7-2017	132000			2.92		1
Hunze en Aa's	Planzuid	1-8-2017	331000			17.30		2
Hunze en Aa's	Koetshuis Borgerswold	1-8-2017	40000			0.00		0
Hunze en Aa's	Grunostrand Harkstede strand	14-8-2017	0			3.95		1
Hunze en Aa's	Pagedal	11-9-2017	385000			12.34		1
Noorderzijvest	Lauwersmeer, strand Kleine Zwaan	3-7-2017	319000			26.90		2
Noorderzijvest	Lauwersmeer, strand Kleine Zwaan	24-7-2017	1182000	>1M		4.00		1
Noorderzijvest	Leekstermeer paviljoen Cnossen, Leek/Nietap	24-7-2017	156000			20.50		2
Noorderzijvest	Leekstermeer paviljoen Pools, Sandebuurt/Poffert	24-7-2017	392000			51.00		2
Noorderzijvest	Leekstermeer paviljoen Pools, Sandebuurt/Poffert	7-8-2017	250000			4.50		1
Noorderzijvest	Leekstermeer paviljoen Cnossen, Leek/Nietap	21-8-2017	403000			4.40		1
Noorderzijvest	Leekstermeer paviljoen Pools, Sandebuurt/Poffert	21-8-2017	1248000	>1M		28.50		2
Noorderzijvest	Lauwersmeer, strand Kleine Zwaan	4-9-2017	576000			9.80		1
Noorderzijvest	Lauwersmeer, strand Kleine Zwaan	21-8-2017	1292000	>1M		12.60		1
Fryslân	De Driesprong, Langelille	8-5-2017	143000				65.00	1
Fryslân	Uilesprong, Tjeukermeer	8-5-2017	134000				40.00	1
Fryslân	De Leyen Rottevalle	29-5-2017	1444000	>1M			59.00	1
Fryslân	Uilesprong, Tjeukermeer	22-5-2017	201000				21.00	1
Fryslân	De Driesprong, Langelille	6-6-2017	465000				7.00	0
Fryslân	De Vleijen, Ameland	16-5-2017	0				33.00	1
Fryslân	Dagrecreatie Klein Zwitserland (Burgumermar)	26-6-2017	1706000	>1M			52.00	1
Fryslân	Zwemplaats Earnewald	17-7-2017	394000				56.00	1
Fryslân	Kleine Wielen Leeuwarden (Lytse Wielen)	17-7-2017	247000				70.00	1
Fryslân	De Leyen Rottevalle	24-7-2017	776000				29.00	1
Fryslân	Heegermeer Indijk	24-7-2017	93000				37.00	1
Fryslân	Fluessen Elahuizen (De Lange Hoek)	24-7-2017	109000				43.00	1
Fryslân	Plas Hee West Terschelling (Duinmeertje Hee)	27-6-2017	233000				16.00	1
Fryslân	De Vleijen, Ameland	25-7-2017	0				21.00	1
Fryslân	Herbemonstering Plas Hee	3-7-2017	63000				52.00	1
Fryslân	Zwemplaats Earnewald	31-7-2017	416000				7.00	0
Fryslân	De Leyen Rottevalle	7-8-2017	13438000	>1M			28.00	1
Fryslân	Heegermeer Indijk	7-8-2017	164000				11.90	0
Fryslân	Langweerder Wielen Langweer	7-8-2017	941000				11.90	0
Fryslân	De Watermolen, Opende	21-8-2017	1390000	>1M			25.00	1
Fryslân	De Leyen Rottevalle	21-8-2017	2599000	>1M			43.00	1
Fryslân	Oudegaaster Brekken Oudega (Aldegeaster Brekken)	21-8-2017	1147000	>1M			28.00	1
Fryslân	Heegermeer Heeg	21-8-2017	1073000	>1M			56.00	1
Fryslân	Fluessen Galamadammen (De Kuilart)	21-8-2017	217000				27.00	1
Fryslân	De Watermolen, Opende	4-9-2017	843000				9.90	0
Fryslân	De Leyen Rottevalle	4-9-2017	1410000	>1M			7 **	

• := drijfslaag aanwezig

\*\* : Chlorofyl-A van cyanobacteriën (dus niet specifiek de toxische cyanobacteriën)

Tabel 4: Resultaten cylindrospermopsine, saxitoxine en microcystine

Waterschap	Locatie	datum	Aantal kopieën toxinegenen/ml cylindrospermopsine	Aantal kopieën toxinegenen/ml saxitoxine	Aantal kopieën toxinegenen/ml microcystine
Hunze en Aa's	Meerwijk	11-7-2017	0	12000	132000
Hunze en Aa's	Plan Zuid	1-8-2017	201000	215000	331000
Hunze en Aa's	Koetshuis Borgerswold	1-8-2017	97000	67000	40000
Hunze en Aa's	M1709870 Grunostrand Harkstede strand	14-8-2017	0	10000	0
Hunze en Aa's	Pagedal	11-9-2017	394000	209000	385000
Noorderzijlvest	Lauwersmeer, Kleine Zwaan	3-7-2017	688000	485000	319000
Noorderzijlvest	8: Lauwersmeer, Strand Kleine Zwaan	24-7-2017	1146000	911000	1182000
Noorderzijlvest	Leekstermeer Cnossen	24-7-2017	22000	19000	156000
Noorderzijlvest	Leekstermeer Pools	24-7-2017	13000	19000	392000
Noorderzijlvest	Leekstermeer Pools	7-8-2017	0	10000	250000
Noorderzijlvest	11005901 - 2 - Cnossen	21-8-2017	0	17	403000
Noorderzijlvest	11005201 - 3 - Pools	21-8-2017	646000	354000	1248000
Noorderzijlvest	8 Kleine Zwaan	4-9-2017	373000	203000	576000
Wetterskip	De Driesprong, Langelille	8-5-2017	0	14000	1292000
Wetterskip	De Driesprong, Langelille	8-5-2017	0	14000	143000
Wetterskip	Uilesprong, Tjeukermeer	8-5-2017	0	9000	134000
Wetterskip	De Leyen, Rottevalle (De Leien)	29-5-2017	92000	50000	1444000
Wetterskip	Uilesprong, Tjeukemeer (De Uilesprong)	22-5-2017	85000	34000	201000
Wetterskip	De Driesprong, Langelille	6-6-2017	0	23000	465000
Wetterskip	De Vleijen, Ameland	16-5-2017	0	0	0
Wetterskip	Dagrecreatie Klein Zwitserland (Burgumermar)	26-6-2017	18000	15000	1706000
Wetterskip	Zwemplaats Earnewald (It Wiid)	17-7-2017	10000	894000	394000
Wetterskip	Kleine Wielen Leeuwarden (Lytse Wielen)	17-7-2017	20000	1741000	247000
Wetterskip	De Leyen Rottevalle (De Leien)	24-7-2017	169000	127000	776000
Wetterskip	Heegermeer Indijk	24-7-2017	380000	418000	93000
Wetterskip	Fluessen Elahuizen (De Lange Hoek)	24-7-2017	868000	907000	109000
Wetterskip	Plas Hee West Terschelling (Duinmeertje Hee)	27-6-2017	0	0	233000
Wetterskip	De Vleijen Ameland	25-7-2017	0	24000	0
Wetterskip	Herbemonstering Plas Hee	3-7-2017	0	0	63000
Wetterskip	Zwemplaats Earnewald	31-7-2017	183000	102000	416000
Wetterskip	De Leyen Rottevalle	7-8-2017	707000	229000	13438000
Wetterskip	Heegermeer Indijk	7-8-2017	656000	630000	164000
Wetterskip	Langweerder Wielen Langweer	7-8-2017	709000	510000	941000
Wetterskip	De Watermolen Opende	21-8-2017	0	0	1390000
Wetterskip	De Leyen Rottevalle (De Leien)	21-8-2017	58000	71000	2599000
Wetterskip	Oudegaaster Brekken Oudega (Aldegeaster Brekken)	21-8-2017	730000	454000	1147000
Wetterskip	Heegermeer Heeg	21-8-2017	446000	208000	1073000
Wetterskip	Fluessen Galamadammen (De Kuilart)	21-8-2017	634000	701000	217000
Wetterskip	De Watermolen, Opende	4-9-2017	0	0	843000
Wetterskip	De Leyen, Rottevalle (De Leien)	4-9-2017	31000	24000	1410000

## 4 Conclusies en advies

Uit dit verkennende onderzoek kan worden geconcludeerd dat de DNA-methode een potentieel zeer interessant alternatief is voor de huidige methode(n) voor de bepaling van het risico van de aanwezigheid van microcystine.

De voordelen van de DNA-methode zijn:

- De bepaling geeft een beter beeld of er microcystine kan worden geproduceerd dan de huidige gebruikte methoden, omdat alleen die cyanobacteriën worden meegenomen die het toxinegen daadwerkelijk in zich hebben.
- De DNA-methode is een uniforme methode voor de bepaling van het risiconiveau. Op dit moment worden verschillende methoden gebruikt. De resultaten van deze methoden kunnen tot verschillen in het vaststellen van het risiconiveau leiden.
- De DNA-methode geeft minder overschrijdingen van de waarschuwingnorm voor zwemwater aangaande microcystine, dan de huidige methoden. De cyanobacteriën die geen toxinegenen bevatten worden niet meegenomen in het bepalen van het risiconiveau. Hierdoor wordt het werkelijke risiconiveau nauwkeuriger bepaald.
- De DNA-methode toont meerdere toxinegenen aan naast die voor microcystine. Voor de hier gebruikte kit zijn dat genen voor: cylindrospermospine en saxitoxine. Voor dagelijks beheer zijn deze extra toxinegenen metingen nog niet bruikbaar, omdat er nog geen normen beschikbaar zijn waaraan getoetst kan worden.
- De DNA-methode is een snellere methode dan de huidige methode, waardoor er sneller op een overschrijding gereageerd kan worden.

Voordat de DNA-methode voor de reguliere waterkwaliteitsmonitoring kan worden ingezet, is het noodzakelijk dat de methode wordt gevalideerd. Deze validatie ontbreekt nu en is onontbeerlijk voor acceptatie door het werkveld.

In het kader van validatie moet de betrouwbaarheid en robuustheid van de methode worden vastgesteld. Aandachtspunten daarbij zijn:

- o De correlatie tussen concentraties toxinegenen van 1M/ml en microcystine concentraties van 10 µg/L is een enkele aanname die nadere bevestiging behoeft;
- o De correlatie tussen concentraties toxinegenen > 1M/ml en microcystine concentraties >10 µg/L is nog niet bekend.

Ook dient er een traject te worden doorlopen ten behoeve van wettelijk verankering, waarbij de methode, na validatie, in het Cyanobacteriënprotocol moet worden vastgelegd. Aandachtspunten daarbij zijn:

- o In het huidige Cyanobacteriënprotocol geldt voor een negatief zwemadvies een norm van > 20 µg/L microcystine. De relatie tussen deze norm en het aantal microcystine toxinegenen per ml moet nog worden vastgesteld;
- o Laatste vraag is wat de gevolgen voor de volksgezondheid zijn van de aanwezigheid van cylindrospermospine en saxitoxine vormende soorten cyanobacteriën.

Intussen is onder STOWA vlag een vergelijkbaar onderzoek uitgevoerd (STOWA rapport 2020-09 'Risicobeoordeling blauwalgen in zwemwater'). Dat onderzoek komt tot vergelijkbare conclusies als voorliggend onderzoek. Om te voorkomen dat er twee parallelle sporen gelopen gaan worden, wordt geadviseerd om eventueel vervolgonderzoek ten behoeve van validatie en wettelijke verankering uit te voeren onder STOWA vlag.

## 5 Referenties

Chorus, I. & J. Bartram, 1999. Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management. World Health Organization. St Edmundsbury Press, Bury St Edmunds, Suffolk.

Falconer IR. 2005. Cyanobacterial toxins of drinking water supplies: cylindrospermopsins and microcystins. New York (NY): CRC Press.

Finlay K, Patoine A, Donald DB, Bogard MJ and Leavitta PR (2010). Experimental evidence that pollution with urea can degrade water quality in phosphorus-rich lakes of the Northern Great Plains. *Limnol. Oceanogr.*, 55(3), 2010, 1213–1230.

Izydorczyk, K. et al. (2009), Establishment of an Alert Level Framework for cyanobacteria in drinking water resources by using the Algae Online Analyser for monitoring cyanobacterial chlorophyll a, *Water Research*, 43, 989-996.

Francy, D. S., Brady, A. M. G., Ecker, C. D., Graham, J. L., Stelzer, E. A., Struffolino, P., Dwyer, D. F., & Loftin, K. A. (2016). Estimating microcystin levels at recreational sites in western Lake Erie and Ohio. *Harmful Algae*, 58, 23–34.

Singh, S., Rai, P.K., Chau, R., Ravi, A.K., Neilan, B.A., Asthana, R.K. (2015). Temporal variations in microcystin-producing cells and microcystin concentrations in two fresh waterponds. *Water Research*, 69, 131-142.

Sollie, S. en Kardinaal, E. (2020). Risicobeoordeling blauwalgen in zwemwater. STOWA rapport 2020-09. Stowa, Amersfoort.