



Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu
*Ministerie van Volksgezondheid,
Welzijn en Sport*

Blauwalgenprotocol 2020

RIVM-briefrapport 2020-0107
F.M. Schets et al.



Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu
*Ministerie van Volksgezondheid,
Welzijn en Sport*

Blauwalgenprotocol 2020

RIVM-briefrapport 2020-0107
F.M. Schets et al.

Colofon

© RIVM 2020

Delen uit deze publicatie mogen worden overgenomen op voorwaarde van bronvermelding: Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), de titel van de publicatie en het jaar van uitgave.

DOI 10.21945/RIVM-2020-107

F.M. Schets (auteur), RIVM
R. van der Oost (auteur), Waternet
D.B. van de Waal (auteur), NIOO-KNAW
M. Lammertink (auteur), Waterschap Rijn en IJssel
D. Slot (auteur), Hoogheemraadschap van Rijnland
G.H.Th.M. van Druten (auteur), Provincie Overijssel

Contact:

F.M. Schets

Centrum voor Zoönosen en Omgevingsmicrobiologie

Ciska.schets@rivm.nl

Contactpersoon opdrachtgever:

P. Bakker

Afdeling Waterkwaliteit en -kwantiteit

Ministerie van Infrastructuur en Waterstaat

Paul.bakker@minienw.nl

Dit onderzoek werd verricht in opdracht van Ministerie van Infrastructuur en Waterstaat in het kader van project M/270106

Dit is een uitgave van:

**Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu**

Postbus 1 | 3720 BA Bilthoven

Nederland

www.rivm.nl

Publiekssamenvatting

Blauwalgenprotocol 2020

Wanneer er veel blauwalgen in zwemwater zitten, kunnen ze voor overlast (zoals stank) en gezondheidsrisico's (zoals milde huid- en maagdarmklachten) voor zwemmers zorgen. De kwaliteit van water van officiële zwemlocaties moet voldoen aan Europese eisen.

Om de gezondheid van zwemmers op deze zwemlocaties te beschermen, gebruiken waterbeheerders in Nederland daarom het Blauwalgenprotocol. Dit protocol vertelt hen hoe ze zwemlocaties moeten controleren op blauwalgen en welke maatregelen ze moeten nemen. Het Blauwalgenprotocol 2020 doet dit volgens de nieuwste inzichten

Het Blauwalgenprotocol 2020 is een update. De update was nodig omdat er sinds het laatste Blauwalgenprotocol, uit 2012, nieuwe inzichten zijn hoe de aanwezigheid van blauwalgen kan worden gevolgd. Ook wil de overheid de blauwalgenproblematiek in heel Nederland op dezelfde manier aanpakken.

Blauwalgen kunnen soms giftig zijn. Omdat het niet altijd mogelijk is de giftige van de niet-giftige te onderscheiden, gaat het Blauwalgenprotocol 2020 er voor de zekerheid vanuit dat ze allemaal giftig kunnen zijn. Waterbeheerders controleren zwemlocaties door lokaal de situatie te bekijken. Daarna onderzoeken ze het water in het laboratorium. Ze volgen hierbij een verplichte, vaste procedure. Zo wordt vastgesteld hoeveel blauwalgen er in het water zitten en hoe groot het risico is. Waterbeheerders mogen ook extra onderzoek doen als zij dat nodig vinden.

Als het risico bekend is, worden de maatregelen genomen die daarbij horen en worden de zwemmers geïnformeerd. Dit kan een waarschuwing, een negatief zwemadvies of een zwemverbod zijn. Dit wordt ter plaatse aangegeven en op www.zwemwater.nl.

Door het Blauwalgenprotocol 2020 na te leven tijdens het zwemseizoen (1 mei – 1 oktober) voldoet Nederland aan de eisen van de Europese Zwemwaterrichtlijn.

Kernwoorden: blauwalgen, zwemlocaties, proliferatie, protocol, Europese Zwemwaterrichtlijn

Synopsis

Cyanobacteria protocol 2020

Water with a lot of cyanobacteria may cause nuisance (such as bad odour) and health risks (such as mild skin and gastrointestinal complaints) to bathers. The water quality at official bathing sites should comply with European requirements.

To protect bathers' health at these bathing sites, water managers in the Netherlands use the Cyanobacteria Protocol. This protocol tells them how to inspect bathing sites for cyanobacteria and which measures they should take. The 2020 Cyanobacteria Protocol does so according to the latest insights.

The 2020 Cyanobacteria Protocol is an update. The update was needed because there are new understandings of how to monitor cyanobacteria since the latest Cyanobacteria Protocol dating from 2012. Additionally, the government also wants to handle the cyanobacteria issue in an identical way in the whole of the Netherlands.

Cyanobacteria can sometimes be toxic. However, since it is not always possible to distinguish between toxic and non-toxic cyanobacteria, the 2020 Cyanobacteria Protocol assumes that they can all be toxic, just to make sure. Water managers check bathing sites by on-site inspections, after which they examine the water in the laboratory. They do this according to an obligatory, standard procedure. In this way, they determine how many cyanobacteria are present in the water and what the risk level is. Water managers may do extra tests if they consider this necessary.

When the risk level is known, measures are taken accordingly and the bathers will be informed. This can be a warning, an advice against bathing or a swimming ban. This is announced at the bathing site and on www.zwemwater.nl.

By complying with the 2020 Cyanobacteria Protocol during the bathing season (May 1st – October 1st), the Netherlands complies with the requirements in the European Bathing Water Directive.

Keywords: cyanobacteria, bathing sites, proliferation, protocol, European Bathing water Directive

Inhoudsopgave

Samenvatting — 9

1 Inleiding — 11

2 Gezondheidsklachten door blauwalgen — 13

3 Uitgangspunten van het Blauwalgenprotocol — 15

4 Verantwoordelijkheden — 19

5 Wanneer is een zwemlocatie een risicolocatie voor proliferatie van blauwalgen? — 21

6 Monitoring van blauwalgen — 23

6.1 Veldinspectie — 23

6.1.1 Visuele inspectie — 23

6.2 Bepalen van het risiconiveau — 24

6.2.1 Bemonstering — 24

6.2.2 Fluorescentiemeting in het laboratorium — 25

6.2.3 Bepaling van het risiconiveau — 25

6.2.4 Microscopische analyse (facultatief) — 26

6.2.5 Bepaling van microcystine (facultatief) — 26

6.2.6 Rapportage — 27

7 Drijfvaagcategorieën — 29

7.1 Drijfvaag categorie I — 29

7.2 Drijfvaag categorie II — 29

7.3 Drijfvaag categorie III — 30

8 Maatregelen — 31

9 Toelichting — 33

9.1 Toepasbaarheid Blauwalgenprotocol 2020 — 33

9.2 Fluorescentiemeting — 33

9.3 Uitgaan van het toxische potentieel van alle blauwalgen — 34

9.4 Correlatie biovolume en chlorofyl-a geassocieerd met blauwalgen — 34

9.5 Toxine-bepalingen — 35

9.6 Benthische blauwalgen — 36

9.7 Alternatieve technieken voor blauwalgen monitoring — 36

9.8 Onderwerpen die nader onderzoek behoeven — 36

10 Dankwoord — 39

11 Te raadplegen literatuur — 41

Bijlage 1 — 43

Bijlage 2 — 47

Bijlage 3 — 49

Bijlage 4 – 57

Bijlage 5 – 73

Samenvatting

De Europese Zwemwaterrichtlijn (2006/7/EC) noemt drijfslagen of bloeien van blauwalgen een gevaar voor de volksgezondheid waarmee adequaat moet worden omgegaan. Het uitvoeren van een passende controle op officiële zwemlocaties en het beschermen van de gezondheid van zwemmers door een goede informatievoorziening aan het publiek zijn belangrijke verplichtingen uit deze richtlijn. Nederland voldoet aan deze verplichtingen door middel van het Blauwalgenprotocol.

Uit de evaluatie van het gebruik het Blauwalgenprotocol 2012 is gebleken dat een meer uniforme aanpak van de blauwalgenproblematiek in Nederland wenselijk is, zodat op alle zwemlocaties op dezelfde manier wordt gereageerd op de proliferatie van blauwalgen. Het verkrijgen van deze uniformiteit vereist een stringenter opvolging van het Blauwalgenprotocol. Bij de naleving van het Blauwalgenprotocol 2020 geldt het voorzorgprincipe: er wordt vanuit gegaan dat alle blauwalgen potentieel toxisch zijn. Daarnaast voorziet het Blauwalgenprotocol 2020 in de facultatieve mogelijkheid een meer gerichte risico analyse uit te voeren op basis van vastgestelde aanwezigheid van specifieke toxische blauwalgen of toxines in het water.

Volgens het Blauwalgenprotocol 2020 worden zwemlocaties visueel geïnspecteerd op de aanwezigheid van (drijfslagen van) blauwalgen. Bij aanwezigheid van een drijfslag wordt de drijfslagcategorie vastgesteld door middel van visuele waarneming, facultatief aangevuld met microscopisch onderzoek naar de samenstelling van de drijfslag. Bij afwezigheid van een drijfslag wordt het water onderzocht op de aanwezigheid van blauwalgen door middel van een fluorescentiemeting in het laboratorium, waarmee het gehalte chlorofyl-a geassocieerd met blauwalgen wordt vastgesteld. Een fluorescentiemeting in het veld om het risiconiveau te bepalen is niet langer toegestaan. Een fluorescentiemeting kan facultatief gecombineerd worden met een microscopisch onderzoek. Dit kan enerzijds gedaan worden om het aandeel toxische blauwalgen vast te stellen voor een correctie van de fluorescentiemeting in situaties waarin de aanname dat alle blauwalgen potentieel toxisch zijn zou leiden tot een overschatting van het risico. Anderzijds kan met microscopisch onderzoek het biovolume van potentieel toxische blauwalgen worden vastgesteld in situaties waarin de fluorescentiemeting een onbetrouwbaar resultaat geeft of twijfel bestaat over het resultaat van de fluorescentiemeting. Dit biovolume dient omgerekend te worden naar de concentratie chlorofyl-a geassocieerd met blauwalgen.

Op basis van de aanwezige drijfslagcategorie of het gehalte chlorofyl-a geassocieerd met blauwalgen wordt voor een zwemlocatie het risiconiveau vastgesteld. Het risiconiveau geeft aan hoe waarschijnlijk het optreden van gezondheidsklachten is bij zwemmen op de betreffende zwemlocatie. Aan de hand van het risiconiveau worden maatregelen ingesteld, zoals een waarschuwing, een negatief zwemadvies of een zwemverbod.

De risico's van blauwalgen worden gevormd door de toxinen die zij produceren. Toxine-analyses zijn echter nog niet bruikbaar voor het dagelijks beheer op zwemlocaties, omdat voor de meeste toxinen nog geen normen beschikbaar zijn waaraan getoetst kan worden. Een uitzondering hierop vormt de microcystine-analyse, die als facultatief in het Blauwalgenprotocol 2020 is opgenomen.

De handelingsperspectieven die het Blauwalgenprotocol 2020 waterbeheerders biedt, zijn gebaseerd op de huidige kennis. Voor sommige onderwerpen is het geven van algemene handelingsperspectieven op basis van de huidige kennis nog niet mogelijk. Voor toekomstige versies van het Blauwalgenprotocol initieert het Platform Blauwalgen daarom nader onderzoek naar onder andere toxine-analyses en normering, sensoren, ringonderzoeken, en bentische blauwalgen. Voor bentische blauwalgen is in het Blauwalgenprotocol 2020 voorlopig een facultatieve indicatieve risicobeoordeling op basis van abundantie opgenomen.

1 Inleiding

In de Europese Zwemwaterrichtlijn (2006/7/EC) worden blauwalgen (cyanobacteriën) expliciet genoemd als gevaar voor de volksgezondheid waar adequaat mee moet worden omgegaan. Uit het zwemwaterprofiel van een zwemlocatie blijkt of dit relevant is voor een bepaalde zwemlocatie. Indien het zwemwaterprofiel of de dagelijkse praktijk aangeeft dat er een reële kans op proliferatie (=bloei) van blauwalgen bestaat, moet een passende controle uitgevoerd worden en moeten maatregelen genomen worden zodat de gezondheid van de zwemmers beschermd wordt. Een belangrijke maatregel is een goede informatievoorziening aan het publiek. Het Blauwalgenprotocol 2020 is de Nederlandse invulling van deze verplichtingen alsmede de actualisatie van het Blauwalgenprotocol 2012, en geeft aan hoe om te gaan met blauwalgen op officiële zwemlocaties. Omdat elke situatie uniek is, is een goede locatie-specifieke risicoanalyse vereist (zwemwaterprofiel), waarbij de gezondheid van de zwemmers voorop staat.

Uit de evaluatie van het Blauwalgenprotocol 2012 is gebleken dat de organisaties die dit protocol toepassen hier heel verschillend mee omgaan, variërend van het zo letterlijk mogelijk volgen van het Blauwalgenprotocol, tot het gebruiken van het Blauwalgenprotocol als basis om een eigen werkwijze of protocol op te stellen. De verschillende mogelijkheden die het protocol biedt om een risiconiveau vast te stellen worden benut, waarbij een breed palet aan analysemethoden wordt gebruikt. Afwijken van de in het Blauwalgenprotocol 2012 beschreven meest gebruikelijke methoden gebeurt met medeweten en goedvinden van de provincie of omgevingsdienst (De Haan, 2016; Gerritsen, 2016).

Een meer uniforme aanpak is wenselijk omdat verschillende aanpakken leiden tot verschillende resultaten en daarmee tot verschillen in het vaststellen van het risiconiveau. Dit kan leiden tot verschillen in het wel of niet nemen van maatregelen, het nemen van andere maatregelen, of het nemen van maatregelen op een ander moment tijdens de proliferatie van blauwalgen.

Om meer uniformiteit te verkrijgen, wordt een stringentere opvolging van het Blauwalgenprotocol vereist. Hiertoe is een vaststellingstraject via het Cluster MRE (Monitoring, Rapportage en Evaluatie) voorzien en zal het Blauwalgenprotocol 2020 worden genoemd in het Besluit Kwaliteit Leefomgeving dat onderdeel uitmaakt van de Omgevingswet. De praktische uitvoering zal worden opgenomen in de bijbehorende Regeling, waarin ook het versiebeheer zal worden geregeld. De werkwijze in de vigerende versie dient nagevolgd te worden door provincies, waterbeheerders en locatiebeheerders.

Een belangrijke praktische wijziging om de uniformiteit te bevorderen is dat de fluorescentiemeting in het veld niet meer gebruikt mag worden om het risiconiveau te bepalen dat resulteert in maatregelen.

Een belangrijke inhoudelijke wijziging ten opzichte van het Blauwalgenprotocol 2012 is dat er in het Blauwalgenprotocol 2020 van uitgaan wordt dat alle blauwalgen potentieel toxisch zijn in plaats van

dat men zich alleen richt op een vijftal potentieel toxische blauwalggeslachten. Het Blauwalgenprotocol 2020 voorziet echter wel in de facultatieve mogelijkheid een meer gerichte risico analyse uit te voeren op basis van vastgestelde aanwezigheid van specifieke toxische blauwalgen of toxinen in het water.

Het Blauwalgenprotocol is een uitvoeringsdocument voor overheden. Het is echter geen statisch document, maar een protocol dat regelmatig aangepast zal worden aan voortschrijdende inzichten en nieuwe ontwikkelingen. Het is de bedoeling het Blauwalgenprotocol elke twee jaar te evalueren. Het Ministerie van Infrastructuur en Waterstaat neemt hiertoe het initiatief.

2 Gezondheidsklachten door blauwalgen

Blauwalgen behoren tot de natuurlijke algenpopulatie in het water. Onder gunstige groeiomstandigheden, waaronder een watertemperatuur van 20-30°C, rustige weersomstandigheden, weinig stroming in het water en nutriëntenrijk water, kunnen ze zich sterk vermeerderen en tot 'bloei' komen. Dan kunnen stinkende drijfslagen ontstaan die aanleiding zijn tot verminderd doorzicht, zuurstoftekort in het water, dood van ander waterleven en stank door rotting van afstervende blauwalgcellen. Veel blauwalggeslachten zijn in staat toxinen te produceren; bij algenbloei kunnen deze ophopen. Daarnaast kunnen uit afstervende cellen in drijfslagen de toxinen vrijkomen.

Op basis van de werkingsmechanismen kunnen deze toxinen onderverdeeld worden in hepatotoxinen (leverschade, tumoren), neurotoxinen (verlamming), cytotoxinen (celnecrose) en irritantia (huidklachten, maagdarmklachten, tumoren). Veel kennis over de werkingsmechanismen van blauwalgtoxinen is afkomstig van waarnemingen bij dieren.

Blauwalgtoxinen kunnen gezondheidsklachten veroorzaken bij mens en dier. Bij gezondheidsklachten bij mensen die mogelijk het gevolg zijn van blootstelling aan blauwalgen is het vaak niet mogelijk om vast te stellen of blauwalgen daadwerkelijk de veroorzakers van de klachten zijn. Uit een overzicht van ongeveer 50 anekdotische gevallen en *case reports* van gezondheidsklachten door blootstelling aan blauwalgen in de periode 1934-2003, bleek dat de gerapporteerde symptomen meestal mild, zeer divers en weinig specifiek waren (hooikoortsachtige-, maagdarm-, griepachtige-, luchtweg- of huidklachten). Een scala aan water overdraagbare micro-organismen veroorzaakt vergelijkbare symptomen. In veel gevallen ontbraken gegevens zodat geen bewijs voor blauwalgen als veroorzaker van de klachten werd gevonden. Bij oudere gerapporteerde gevallen speelde ook de ontoereikendheid van de analytische technieken mee. Uit een aantal recentere epidemiologische studies waarin het verband tussen gezondheidsklachten bij zwemmers en de aanwezigheid van blauwalgen in zwemwater werd onderzocht, werden bij zwemmers alleen milde gezondheidsklachten waargenomen (Stewart et al., 2006; Lévesque et al., 2014).

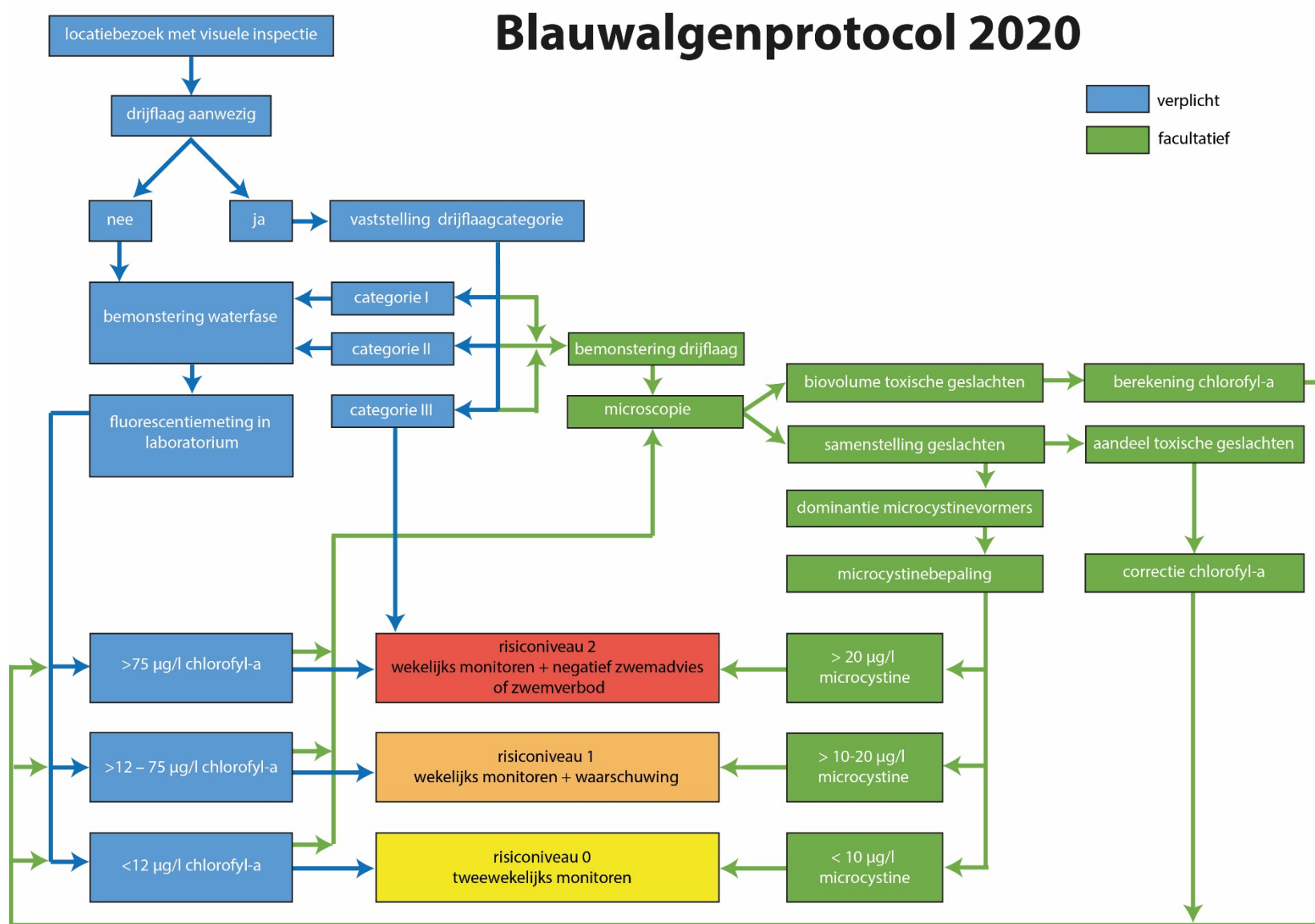
Dieren worden wel vaak (dodelijk) vergiftigd door blauwalgen. Zij zwemmen in water met een actieve blauwalgenbloei, drinken van dit water en likken of poetsen hun vacht of veren na het zwemmen, waardoor zij een hoge dosis blauwalgtoxinen binnen kunnen krijgen (Stewart et al., 2008).

3 Uitgangspunten van het Blauwalgenprotocol

1. Drijfslagen of bloeien (Hst. 7) van blauwalgen zijn een potentieel risico voor de volksgezondheid. Het naleven van het protocol helpt de gezondheid van de zwemmer te beschermen.
2. Met het Blauwalgenprotocol wordt invulling gegeven aan de verplichtingen uit de Europese Zwemwaterrichtlijn en wordt voldaan aan de nationale wet- en regelgeving.
3. Het vigerende zwemwaterprofiel geeft aan of een zwemlocatie een risicolocatie voor blauwalgen is (Hst. 5, Bijlage 1).
4. Bij monitoring van blauwalgen gaat het om het voorzorgprincipe. Hierbij wordt er vanuit gegaan dat alle blauwalgen potentieel toxisch zijn. Zie punt 10 voor uitleg over afwijkende situaties.
5. Visuele inspectie (§ 6.1.1) maakt het mogelijk proactief zwemmers te informeren en potentiële risico's te beoordelen.
6. De geïnspecteerde plek is in principe het punt waar bemonstering voor de parameters volgens de Europese Zwemwaterrichtlijn plaatsvindt (verder controlepunt genoemd), zoals opgenomen in het zwemwaterprofiel. Als de risico's op bloei van blauwalgen elders in de zwemzone potentieel afwijken van dit controlepunt kunnen provincie en waterbeheerder onderling afspreken om de zwemzone op aanvullende punten te inspecteren.
7. Er wordt gewerkt conform de in het Blauwalgenprotocol aangegeven gestandaardiseerde bemonstering- en analyseprotocollen (Bijlagen 2-4).
8. De drijfslagcategorie wordt vastgesteld door middel van visuele waarneming, facultatief aangevuld met microscopisch onderzoek naar de samenstelling van de drijfslag (Hst. 7).
9. De hoeveelheid blauwalgen op een zwemlocatie wordt vastgesteld middels een fluorescentiemeting in het laboratorium, waarbij de concentratie chlorofyl-a geassocieerd met blauwalgen wordt bepaald, facultatief aangevuld met microscopisch onderzoek. Zie ook punt 11.
10. Met behulp van een fluorescentiemeting in het laboratorium worden alle blauwalgen gedetecteerd. Soms zijn echter niet alle op een zwemlocatie aanwezige blauwalgen toxisch. In deze situaties leidt de aanname dat alle blauwalgen potentieel toxisch zijn tot een overschatting van het risico. In dergelijke situaties kan met behulp van microscopie worden vastgesteld wat het aandeel van de toxische blauwalgen is. Het gemeten gehalte chlorofyl-a geassocieerd met blauwalgen kan vervolgens hiervoor gecorrigeerd worden (§ 6.2.4, Bijlage 4).
11. Bij microscopisch vastgestelde dominante aanwezigheid van microcystine-producerende blauwalggeslachten, kan een microcystine-bepaling uitgevoerd worden (§ 6.2.5). De resultaten hiervan mogen gebruikt worden voor het bepalen van het risiconiveau.
12. Indien er op een bepaalde zwemlocatie twijfel bestaat over de betrouwbaarheid van de fluorescentiemeting (bijvoorbeeld door aanwezigheid van humus of andere water karakteristieken), kan het risiconiveau worden vastgesteld met behulp van een microscopische biovolume-bepaling (§ 6.2.4, Bijlage 4). Het

- vastgestelde biovolume van toxische blauwalgen dient echter te allen tijden omgerekend te worden naar een chlorofyl-a concentratie ten behoeve van de bepaling van het risiconiveau en de rapportage aan de opdrachtgever (§ 6.2.4, § 9.4).
13. Het instellen van maatregelen wordt gedaan aan de hand van het vastgestelde risiconiveau (§ 6.2.3). Het risiconiveau wordt vastgesteld op basis van de aanwezige drijfslagcategorie (Hst. 7), of het gehalte chlorofyl-a geassocieerd met blauwalgen. Dit gehalte chlorofyl-a geassocieerd met blauwalgen kan gecorrigeerd zijn voor het vastgestelde aandeel toxische blauwalgen (zie punt 10) of berekend zijn vanuit het vastgestelde biovolume van toxische blauwalgen (zie punt 12). Indien microscopisch is vastgesteld dat microcystine-producerende geslachten dominant zijn, kan het risiconiveau ook bepaald worden op basis van de resultaten van een microcystine-bepaling (§ 6.2.5).
 14. Fluorescentiemeting in het veld voor het bepalen van het risiconiveau van een zwemlocatie is niet meer toegestaan. Volgens het Blauwalgenprotocol 2020 wordt een fluorescentiemeting altijd in het laboratorium uitgevoerd, facultatief gecombineerd met microscopisch onderzoek en/of een microcystine-bepaling.
 15. Voor bentische blauwalgen is in het Blauwalgenprotocol 2020 een indicatieve risicobeoordeling op basis van abundantie opgenomen (§ 9.6, Bijlage 5).

In navolgend schema is het Blauwalgenprotocol 2020 schematisch weergegeven. In de volgende paragrafen worden de onderdelen uitgelegd en toegelicht.



Figuur 1: Schema Blauwalgenprotocol 2020 – blauwe route = verplicht, groene route = facultatief

4 Verantwoordelijkheden

De locatiebeheerder, de waterbeheerder en de provincie zijn gezamenlijk verantwoordelijk voor een zwemlocatie. Afstemming over beheer en communicatie tijdens het zwemseizoen moet voorafgaand aan, maar ook tijdens, het zwemseizoen plaatsvinden.

De formele rollen zijn:

- De provincie¹ is verantwoordelijk voor het geven van een waarschuwing, een negatief zwemadvies, het instellen van een zwemverbod en de communicatie hierover naar de burgers en de locatiebeheerders.
- De waterbeheerder is verantwoordelijk voor het bewaken van de waterkwaliteit en de monitoring op de zwemlocatie en advisering aan de provincie. De provincie maakt afspraken met de locatiebeheerder over de inrichting en het beheer van de zwemlocatie met betrekking tot hygiëne en veiligheid.

¹ Een provincie kan haar taken (deels) mandateren. Daarom kan in voorkomende gevallen waar dit protocol provincie vermeldt, ook waterschap, omgevingsdienst of uitvoeringsdienst gelezen worden.

5 Wanneer is een zwemlocatie een risicolocatie voor proliferatie van blauwalgen?

Een zwemlocatie is een risicolocatie voor proliferatie van blauwalgen als er op de locatie in de afgelopen vijf jaar overschrijdingen van een blauwalgennorm zijn waargenomen; ook de mate en/of tijdsduur van de overschrijding worden bij deze beoordeling betrokken. Bijlage 1 geeft een protocol voor het beoordelen van de kans op proliferatie van blauwalgen op een zwemlocatie. Dergelijke informatie is opgenomen in het zwemwaterprofiel van een zwemlocatie.

Het Blauwalgenprotocol is van toepassing op alle zwemlocaties, maar in de praktijk worden de handelingen uit het Blauwalgenprotocol uitgevoerd voor die zwemlocaties waarvan volgens bovengenoemd protocol is vastgesteld dat het risicolocaties voor proliferatie van blauwalgen zijn.

6 Monitoring van blauwalgen

Monitoring van blauwalgen bestaat uit visuele inspectie van de zwemlocatie en het nemen en analyseren van monsters. Zwemlocaties die risicolocaties voor blauwalgen zijn, worden minimaal tweewekelijks geïnspecteerd op de aanwezigheid van blauwalgen. Hierbij wordt het schema uit het Blauwalgenprotocol 2020 gevolgd.

6.1 Veldinspectie

Door middel van veldinspectie wordt vastgesteld of er blauwalgen of drijfslagen hiervan op een zwemlocatie aanwezig zijn. Veldinspectie wordt visueel uitgevoerd. Bij de aanwezigheid van drijfslagen wordt een foto genomen en deze wordt bewaard voor latere referentie. De organisatie die de foto laat maken is verantwoordelijk voor de opslag van de foto. De foto's dienen minimaal vijf jaar bewaard te worden, zodat ze ook gebruikt kunnen worden voor historisch onderzoek van een zwemlocatie en evaluatie van het Blauwalgenprotocol.

6.1.1 Visuele inspectie

Per zwemlocatie wordt door provincie, waterbeheerder en locatiebeheerder voorafgaand aan het zwemseizoen afgesproken en vastgelegd of, en zo ja, hoe, visuele inspectie uitgevoerd gaat worden, wie waarvoor verantwoordelijk is en wat er bij een dergelijke inspectie vastgelegd dient te worden. De provincie heeft hierin een coördinerende rol en toetst gedurende de zomer of de samenwerking, rolverdeling en communicatie goed verlopen en stelt deze indien nodig bij.

Bij inwerkingtreding van de Omgevingswet leest bovenstaande alinea als volgt:

Per zwemlocatie wordt door provincie, waterbeheerder en locatiebeheerder voorafgaand aan het zwemseizoen afgesproken en vastgelegd of, en zo ja, hoe, visuele inspectie uitgevoerd gaat worden, en wat er bij een dergelijke inspectie vastgelegd dient te worden. De beheerder van het oppervlaktewaterlichaam waarin de zwemlocatie is gelegen heeft hierin de eindverantwoordelijkheid.

De keuze voor de frequentie van visuele inspectie kan per zwemlocatie en per periode verschillen. De frequentie kan afhankelijk zijn van de weersomstandigheden, de indicaties van een (drijfslagen)voorspellingsstelsel en de te verwachten bezoekersaantallen. Bij het vastleggen van een schema voor de visuele inspectie moet er rekening mee worden gehouden dat het vóórkomen van drijfslagen van dag tot dag (en soms binnen een dag) sterk varieert. In periodes van het badseizoen met een hoog risico op de bloei van blauwalgen wordt dagelijkse visuele inspectie daarom aanbevolen. Bij dagelijkse visuele inspectie is direct reageren op aanwezige (drijfslagen van) blauwalgen mogelijk en kan sneller een risiconiveau bepaald of aangepast worden. Visuele inspectie wordt bij voorkeur in de ochtend uitgevoerd.

Visuele inspectie kan, behalve door een locatiebezoek, mogelijk ook uitgevoerd worden met een webcam, het dagelijks sturen van digitale foto's, of *remote sensing*. De initiatiefnemer tot deze alternatieve inspectietechnieken moet vooraf aantonen aan de provincie dat hiermee minimaal een gelijkwaardig beoordelingsniveau mogelijk is als met (dagelijkse) visuele inspectie tijdens

een locatiebezoek. Een dergelijke inspectie vervangt echter nooit de fluorescentiemeting in het laboratorium. Voor digitale beelden geldt, net als voor ter plaatse genomen foto's, een bewaartplicht van vijf jaar door de instantie die de beelden laat maken.

De provincie ziet er op toe dat inspecties daadwerkelijk en met de afgesproken frequentie worden uitgevoerd. Wanneer het in de praktijk voor de overeengekomen uitvoerende partij (bijvoorbeeld de waterbeheerder) niet mogelijk is om de inspecties in de gewenste frequentie uit te voeren, kan deze taak door een andere partij worden overgenomen (bijvoorbeeld een locatiebeheerder). Het is aan de uitbestedende partij (bijvoorbeeld de waterbeheerder) om te toetsen of de uitvoerende partij (bijvoorbeeld een locatiebeheerder) voldoende kennis heeft van de categorie-indeling van drijfslagen van blauwalgen en blauwalgen in het veld goed kan herkennen. De handreiking voor het indelen van drijfslagcategorïeën (Hst. 7) en de daaruit volgende risiconiveaus (§ 6.2.3) bieden hiervoor ondersteuning. Bij delegering meldt de uitvoerende partij (bijvoorbeeld de locatiebeheerder) zijn bevindingen aan de uitbestedende partij (bijvoorbeeld de waterbeheerder).

Bij inwerkingtreding van de Omgevingswet leest bovenstaande alinea als volgt:

De beheerder van het oppervlaktewaterlichaam waarin de zwemlocatie is gelegen ziet er, in het geval dat deze taak door haar wordt gedelegeerd aan de houder/exploitant van de zwemlocatie, op toe dat inspecties daadwerkelijk en met de afgesproken frequentie worden uitgevoerd. Voorwaarde hierbij is dat de uitvoerende partij voldoende kennis heeft van de categorie-indeling van drijfslagen van blauwalgen en blauwalgen in het veld goed kan herkennen. De handreiking voor het indelen van drijfslagcategorïeën (Hst. 7) en de daaruit volgende risiconiveaus (§ 6.2.3) bieden hiervoor ondersteuning. Bij (verdere) delegering meldt de uitvoerende partij zijn bevindingen aan de beheerder van het oppervlaktewaterlichaam waarin de zwemlocatie is gelegen. De beheerder van het oppervlaktewaterlichaam waarin de zwemlocatie is gelegen draagt zorg voor rapportage aan de provincie.

6.2 Bepalen van het risiconiveau

In deze paragraaf wordt beschreven hoe het risico van blauwalgen op een zwemlocatie op basis van een veldinspectie (§ 6.1) en bemonstering vastgesteld dient te worden. Uit het vastgestelde risiconiveau volgen uit te voeren maatregelen. Deze zijn beschreven in Hoofdstuk 8.

6.2.1 Bemonstering

Bij aanwezigheid van een drijfslag van blauwalgen op een zwemlocatie wordt visueel vastgesteld om welke categorie drijfslag het gaat (Hst. 7). Bij afwezigheid van een drijfslag (categorie 0) en bij aanwezigheid van een drijfslag categorie I of II wordt een monster van de waterkolom genomen om het gehalte chlorofyl-a geassocieerd met blauwalgen te bepalen. Wanneer in deze situaties echter wel grote plakmaten blauwalgen aanwezig zijn, wordt aanbevolen deze te bemonsteren en te behandelen als een drijfslag categorie I-II. Het monster wordt genomen voor een fluorescentiemeting in het laboratorium volgens een procedure waarvan de kwaliteit middels een protocol wordt geborgd (§ 6.2.2).

Bij aanwezigheid van een drijfslag categorie I-II kan aanvullend facultatief een monster van de drijfslag genomen worden om microscopisch vast te stellen welke blauwalgen in de drijfslag aanwezig zijn. Dit kan eventueel leiden tot naar beneden bijstellen van de chlorofyl-a geassocieerd met blauwalgen-concentratie bij aanwezigheid van niet-toxische blauwalgeslachten (Bijlage 3).

De aanwezigheid van een drijfslag categorie III leidt automatisch tot risiconiveau 2. Het nemen van een monster van de drijfslag om aanvullend microscopische vast te stellen welke blauwalgen aanwezig zijn is facultatief.

De bemonstering van een zwemlocatie vindt plaats volgens Bijlage 2. Het is van belang dat de bemonstering uitgevoerd wordt door bevoegde mensen die voldoende zijn opgeleid. Het monster wordt genomen op het vooraf afgesproken controlepunt. De waterbeheerder draagt verantwoordelijkheid voor het nemen van een monster.

6.2.2 *Fluorescentiemeting in het laboratorium*

Als kwantitatieve maat voor de aanwezigheid van potentieel toxische blauwalgen wordt chlorofyl-a geassocieerd met blauwalgen gebruikt, dat met een fluorescentieanalyse op het laboratorium wordt bepaald (STOWA, 2010).

Het principe van de meting is dat licht van een specifieke golflengte de pigmenten (kleurstoffen) in blauwalgen (fycocyanine en fycoerytrine) activeert. Die energie hiervan wordt overgedragen naar chlorofyl-a, dat hierdoor licht met een andere golflengte gaat uitstralen (fluoresceren). De intensiteit van dit lichtsignaal is een maat voor de hoeveelheid chlorofyl-a in de blauwalgen.

De fluorescentiemeter die hiervoor wordt gebruikt moet uitgerust zijn met modules om de specifieke golflengten voor zowel fycocyanine als fycoerytrine uit te stralen. Het resultaat van de fluorescentiemeting op basis van algoritmen die tenminste het signaal van deze twee golflengten gebruiken is de maat voor het chlorofyl-a dat is geassocieerd met blauwalgen (zie Bijlage 3).

In vorige versies van het Blauwalgenprotocol werd dit aangeduid als cyanochlorofyl, maar dit is geen officieel erkende term. In het huidige Blauwalgenprotocol wordt daarom gesproken van chlorofyl-a geassocieerd met blauwalgen, waarmee het chlorofyl-a van blauwalgen wordt bedoeld.

De fluorescentiemeting wordt uitgevoerd volgens het protocol dat is opgenomen in Bijlage 3.

Bij hoge humusgehalten (bij de Fluoroprobe >10) moet aan de rapportage een opmerking worden toegevoegd dat de fluorescentiemeting onvoldoende betrouwbaar is om het risiconiveau te bepalen. Het risiconiveau moet dan aan de hand van een biovolume-bepaling worden vastgesteld (§ 6.2.4).

6.2.3 *Bepaling van het risiconiveau*

Op basis van de in het laboratorium gemeten concentratie chlorofyl-a geassocieerd met blauwalgen (eventueel gecorrigeerd voor het voor het geschatte aandeel niet-toxische blauwalgen (Bijlage 3) worden in het Blauwalgenprotocol 2020 twee waarden onderscheiden die het risiconiveau bepalen:

- ≥ 12 – 75 μg per liter = risiconiveau 1
- ≥ 75 μg per liter = risiconiveau 2

6.2.4 *Microscopische analyse (facultatief)*

Op monsters met chlorofyl-a geassocieerd met blauwalgen-concentraties boven 12 µg/l en op monsters van drijfslagen categorie I-II kan een microscopisch onderzoek worden uitgevoerd om:

1) inzicht te krijgen in de blauwalgensamenstelling en vast te stellen wat het relatieve aandeel van toxische blauwalgen is. Dit kan leiden tot een correctie van het gehalte chlorofyl-a geassocieerd met blauwalgen of een microcystine-bepaling bij geconstateerde dominantie van microcystinevormers.

Een hulpmiddel hierbij is de lijst met voor Nederland op dit moment meest relevante potentieel toxische en niet-toxische blauwalggeslachten in Bijlage 4. In deze lijst worden tevens de toxinen genoemd die deze geslachten kunnen produceren, zodat een indicatie verkregen wordt van de mogelijk voorkomende toxinen op de onderzochte zwemlocatie. De lijst is continu onder revisie en het microscopisch onderzoek beperkt zich dan ook niet tot de genoemde geslachten. Indien een niet in de lijst opgenomen potentieel toxisch blauwalggeslacht wordt aangetroffen, wordt dit in de analyse meegenomen. Indien men denkt een nieuwe soort of een nieuw geslacht gevonden te hebben, dient een monster ter verificatie naar een ander (ervaren) laboratorium gestuurd te worden.

2) het biovolume te bepalen van de aanwezige toxische blauwalgen in situaties waarin er twijfel bestaat over de betrouwbaarheid van de fluorescentiemeting. Het risiconiveau kan in dat geval worden bepaald op basis van het biovolume van de toxische blauwalgen (Bijlage 4) dat vervolgens moet worden omgerekend naar een gehalte chlorofyl-a geassocieerd met blauwalgen. Dit kan dan weer getoetst worden aan de in § 6.2.3 aangegeven waarden die de risiconiveaus bepalen. Voor de omrekening wordt in het Blauwalgenprotocol 2020 een factor 3 gebruikt: Chlorofyl-a (µg/L) = 3 * biovolume (mm³/L).

6.2.5 *Bepaling van microcystine (facultatief)*

Als de (eventueel gecorrigeerde) concentratie chlorofyl-a geassocieerd met blauwalgen hoger is dan 75 µg/L, en er is met microscopische onderzoek een dominantie (>50%) van microcystine-producerende blauwalgen vastgesteld, kan een microcystine-analyse worden uitgevoerd. Voor de uitvoering hiervan kunnen de volgende documenten worden geraadpleegd: Van der Oost, 2009; Van der Oost, 2009a; Van der Oost, 2009b.

In het Blauwalgenprotocol 2020 worden twee waarden onderscheiden die het risiconiveau bepalen:

- 10 – 20 µg microcystine per liter = risiconiveau 1
- ≥20 µg microcystine per liter = risiconiveau 2

De WHO geeft in de *Guidelines for safe recreational water environments – volume 1* (WHO, 2003) aan dat een microcystine-concentratie van 10-20 µg/L moet leiden tot een waarschuwing (risiconiveau 1) en dat bij microcystine-concentraties ≥20 µg/L een zwemverbod aan te bevelen is (risiconiveau 2). In het Blauwalgenprotocol worden deze waarden eveneens gehanteerd, waarbij dient te worden opgemerkt dat er in Nederland bij risiconiveau 2 gekozen kan worden voor een negatief zwemadvies of een zwemverbod.

6.2.6 *Rapportage*

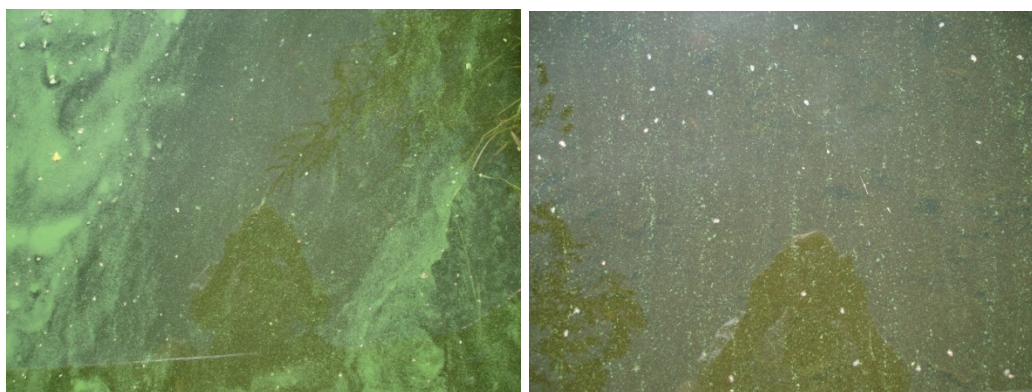
Voor de rapportage wordt bij voorkeur gebruik gemaakt van een standaard rapportageformulier. Hierin worden de waarnemingen van de fluorescentiebepaling genoteerd en worden de eventueel nodige correcties van het chlorofyl-a geassocieerd met blauwalgen-gehalte berekend. Tevens wordt hierin opgenomen welke potentieel toxische blauwalgen bij het microscopisch onderzoek zijn aangetroffen. Ook wordt het vastgestelde risiconiveau opgenomen. Binnen het Platform Blauwalgen wordt aan een dergelijk formulier gewerkt. Bij beschikbaar komen van een dergelijk formulier zal dit als (online) bijlage worden toegevoegd aan het Blauwalgenprotocol.

7 Drijfslagcategorieën

Voor drijfslagen van blauwalgen op zwemlocaties worden drie categorieën gehanteerd. De aanwezigheid van drijfslagen van de verschillende categorieën leidt tot het indelen van de situatie op een zwemlocatie in een van de risiconiveaus (§ 6.2.3). Aan elk risiconiveau zijn te ondernemen maatregelen gekoppeld (Hst. 8).

7.1 Drijfslag categorie I

Er zijn (gif)groene bolletjes of draadjes (cellen van blauwalgen) op het wateroppervlak en in de waterkolom aanwezig (Figuur 2). Er zijn nog geen aaneengesloten lagen van blauwalgen. Er is geen stank. In deze situatie is er eigenlijk geen drijfslag aanwezig, maar er zijn wél drijvende (clusters van) cellen. Er is een duidelijk zichtbare hoeveelheid biomassa blauwalgen aanwezig, die na verdere accumulatie door wind of groei van de populatie drijfslagen kan vormen. Er is nog geen direct risico, maar wel een mogelijk begin van een bloei. Het maakt dan ook niet uit of de beginnende drijfslag in de zwemzone wordt aangetroffen of in de nabijheid daarvan: de kans op toxiciteit en drijfslagvorming is relevant. Een drijfslag van deze categorie kan snel veranderen, maar wordt nog niet aangemerkt als Risiconiveau 1. De concentratie blauwalgen in de waterkolom is mogelijk wel hoog, daarom moet altijd een monster worden genomen om op het laboratorium het gehalte chlorofyl-a geassocieerd met blauwalgen te bepalen. Het resultaat hiervan kan leiden tot Risiconiveau 1.



Figuur 2 Drijfslagen in categorie I (foto's: Waternet)

7.2 Drijfslag categorie II

Er zijn veel cellen en dichte plakkaten van blauwalgen op het wateroppervlak binnen of nabij de zwemzone aanwezig, maar de waterfase is op veel plekken nog te zien (Figuur 3). Het is niet mogelijk om overal door de drijfslag heen te kijken en er zijn delen (groter dan 10 x 10 cm) min of meer aaneengesloten drijfslagen. Er is geen stank. Dergelijke drijfslagen geven aan dat al enige accumulatie door bijvoorbeeld de wind heeft plaatsgevonden. Een drijfslag als deze komt weinig midden op het water voor, maar aan de oevers des te meer. Deze drijfslagen zullen minder snel verschijnen en verdwijnen dan drijfslagen van categorie I. Deze drijfslagen kunnen onder invloed van tijdstip op de dag, wind en weer sterk in omvang en voorkomen verschillen. Een drijfslag van deze categorie leidt meestal tot het Risiconiveau 1. Om het risiconiveau vast te

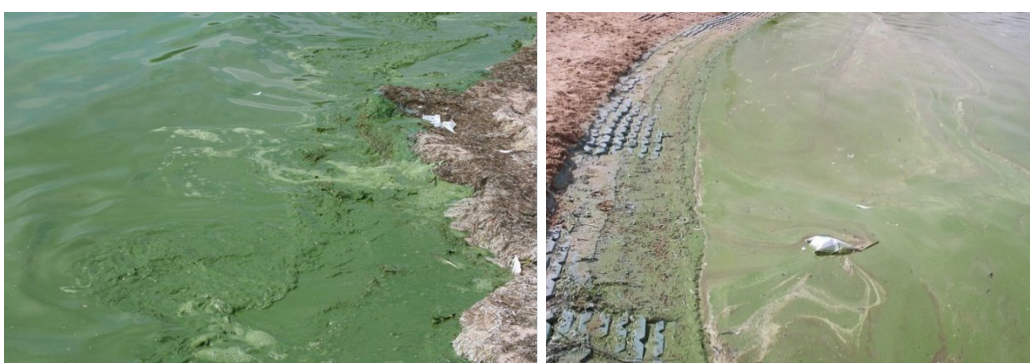
stellen, wordt het gehalte chlorofyl-a geassocieerd met blauwalgen in de waterfase bepaald.



Figuur 3 Drijfslagen in categorie II (foto's: Waternet)

7.3 Drijfslag categorie III

Binnen of nabij de zwemzone zijn veel cellen en dichte plakken van blauwalgen op het wateroppervlak aanwezig en zelden of nooit kan door de drijfslag heen gekeken worden en is de waterfase te zien (Figuur 4). De drijfslagen hebben een aanzienlijke massa en consistentie en mengen niet snel in het water. Er kan verkleuring zijn opgetreden: een schakering van kleuren tussen het oorspronkelijke gifgroen, wit en lichtblauw, wat een teken van rotting is. Ook kan schuimvorming en stank optreden. De kans op hoge toxinegehalten in de waterkolom en/of drijfslagvorming is groot. Deze drijfslagen blijken vaak alleen mechanisch te verwijderen te zijn. Draaiende wind en/of stroming hebben hiervoor vaak te weinig vat op de drijfslag. Alleen in uitzonderlijke gevallen (bij een combinatie van veel wind en neerslag) verdwijnt de drijfslag vanzelf. Een drijfslag van deze categorie leidt tot Risiconiveau 2. Bemonsteren van de drijfslag kan uitgevoerd worden om microscopisch te (laten) bevestigen welke blauwalgen in de drijfslag aanwezig zijn.



Figuur 4 Drijfslagen in categorie III (foto's: Waternet)

8 Maatregelen

Risiconiveau 1 leidt tot het instellen van een waarschuwing. De provincie neemt de beslissing om te waarschuwen, zij kan daarbij advies inwinnen bij de waterbeheerder.

Risiconiveau 2 leidt tot een negatief zwemadvies of een zwemverbod. Bij dit risiconiveau is het gewenste gedrag dat zwemmers het water niet in gaan. Een negatief zwemadvies is hiervoor de eerste optie. De provincie heeft naast een negatief zwemadvies ook de mogelijkheid om een zwemverbod in te stellen. Hiervoor kan gekozen worden in uitzonderlijke situaties zoals de samenloop met andere risico's. Een negatief zwemadvies of zwemverbod kan alleen worden ingesteld en opgeheven door de provincie. De provincie kan hierbij advies inwinnen bij de waterbeheerder.

Maatregelen kunnen gelden voor de gehele zwemlocatie, maar ook voor gedeeltes van de zwemlocatie.

Indien een zwemlocatie volgens de monitoringsmethodieken een ander risiconiveau krijgt, kan het zwemadvies voor de zwemlocatie (waarschuwing, negatief zwemadvies of zwemverbod) veranderen. Dit mag gedaan worden op basis van de concentratie chlorofyl-a geassocieerd met blauwalgen (al dan niet in combinatie met microscopische analyse) (§ 6.2.4), de drijf laagcategorie (Hst. 7) of de microcystine-concentratie (§ 6.2.5).

De provincie is verantwoordelijk voor de communicatie met de gebruikers van de zwemlocatie en is het eerste aanspreekpunt voor de locatiebeheerder. In de praktijk kan er rechtstreekse communicatie tussen de locatiebeheerder en de waterbeheerder zijn. De waterbeheerders dienen bij calamiteiten bereikbaar te zijn voor de communicatie met de locatiebeheerder en *vice versa*. Gebruikers worden ter plekke geïnformeerd door middel van bebording en via www.zwemwater.nl.

9 Toelichting

Het Blauwalgenprotocol 2020 wijkt op verschillende punten af van het Blauwalgenprotocol 2012. De aanpassingen komen voort uit voortschrijdende inzichten en/of zijn gebaseerd op de bevindingen die naar voren zijn gekomen bij de evaluatie van het Blauwalgenprotocol 2012 (De Haan, 2016; Gerritsen, 2016). In 2019 zijn bovendien de leden van het Platform Blauwalgen geraadpleegd. Deze toelichtende paragraaf is bedoeld om de gemaakte keuzes nader te duiden. De keuzes zijn deels gemaakt op basis van het onderzoek uitgevoerd binnen het Platform Blauwalgen (Sollie en Kardinaal, 2020).

9.1 Toepasbaarheid Blauwalgenprotocol 2020

Hoewel met het Blauwalgenprotocol 2020 invulling wordt gegeven aan de Europese Zwemwaterrichtlijn en het daarmee primair bedoeld is voor officiële zwemlocaties, is het protocol ook toe te passen op andere locaties waar incidenteel mensen (bijvoorbeeld bij zwemevenementen in oppervlaktewater) of dieren (zoals honden) te water gaan, bijvoorbeeld stadswater.

9.2 Fluorescentiemeting

Om meer uniformiteit te bewerkstelligen bij het vaststellen van het risiconiveau bij proliferatie van blauwalgen is het volgens het Blauwalgenprotocol 2020 niet meer toegestaan om het risiconiveau van een zwemlocatie te bepalen met behulp van een fluorescentiemeting in het veld. De fluorescentiemetingen in het veld kunnen onvoldoende worden gestandaardiseerd en de resultaten daarvan kunnen daardoor sterk afwijken van de resultaten van de gestandaardiseerde laboratorium analyses. Een fluorescentiemeting mag daarom alleen worden uitgevoerd in het laboratorium en wordt facultatief gecombineerd met microscopisch onderzoek om inzicht te krijgen in het risiconiveau.

Het wordt aanbevolen om alle apparatuur die in Nederland door de verschillende laboratoria wordt gebruikt voor de monitoring van blauwalgen gezamenlijk te laten kalibreren. Procedures hiervoor worden bij voorkeur gezamenlijk ontwikkeld.

Net als veel andere analysemethoden heeft de fluorescentiemeting een aantal aandachtspunten waarmee rekening moet worden gehouden (Gerritsen, 2016). In de praktijk is gebleken dat de uitslag van de fluorescentiemeting soms afwijkingen vertoont. Het rode pigment fycoerytrine van *Planktothrix rubescens* heeft een ander excitatiespectrum dan dat van fycocyanine, wat in de meeste blauwalgen voorkomt. Deze soort kan echter wel worden gedetecteerd als de fluorescentiemeter wordt uitgerust met een aanvullende module om fycoerytrine te activeren. In sommige gevallen kan de fluorescentiemeting lager uitvallen, bijvoorbeeld door het afnemen van fycocyanine als de cellen gebrek aan stikstof hebben, waardoor blauwalgen geclassificeerd worden als groenalgen. Ook bij hoge gehalten van humuszuur kan de fluorescentiemeting lagere uitslagen geven. Daarnaast kan een bloei van groenalgen, goudalgen of kiezelalgen in een specifieke verhouding een fluorescentiemeter 'blind' maken voor blauwalgen, maar dat gebeurt vooral bij chlorofyl-a-concentraties geassocieerd met blauwalgen die lager zijn dan de concentraties die leiden tot risiconiveau 1. In die gevallen wordt er dus minder

chlorofyl-a geassocieerd met blauwalgen gemeten, terwijl er wel potentieel toxische blauwalgen aanwezig zijn. Dit zijn echter uitzonderingen die in de praktijk zelden worden waargenomen. Wanneer twijfel bestaat over de betrouwbaarheid van de fluorescentiemeting, dan kan het risiconiveau worden vastgesteld op basis van een biovolume-bepaling van de potentieel toxische blauwalgen (§ 6.2.4, Bijlage 4).

9.3 **Uitgaan van het toxische potentieel van alle blauwalgen**

In het Blauwalgenprotocol 2020 wordt niet meer alleen gekeken naar de in Nederland tot nu toe meest-voorkomende potentieel toxische blauwalggeslachten *Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Planktothrix* en *Woronichinia*, maar wordt ervan uitgegaan dat alle blauwalgen potentieel toxisch zijn.

De achterliggende motivatie is dat de WHO Toxic Cyanobacteria in Water Working Group, die werkt aan de revisie van het document Toxic Cyanobacteria in Water, ook uitgaat van het toxisch potentieel van alle blauwalgen.

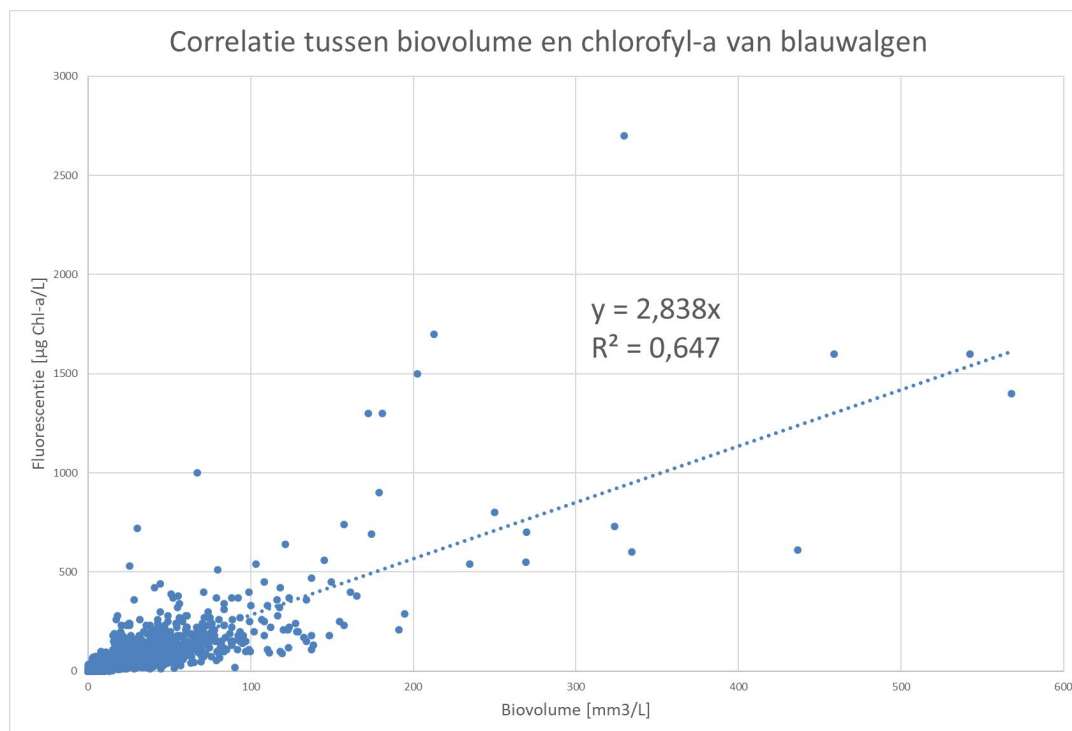
Wereldwijd zijn minstens 46 geslachten cyanobacteriën bekend die een toxisch effect hebben op gewervelde organismen, waaronder de mens. Toxiciteit kan voor andere geslachten niet worden uitgesloten. Omdat het onderzoek voortgaat en meer regio's in de wereld betreft, is het aannemelijk dat nog meer toxische geslachten en soorten worden gevonden. Het is daarom volgens de WHO verstandig om het voorzorgsprincipe te hanteren en van een toxisch potentieel van elke cyanobacteriepopulatie uit te gaan en te kijken naar alle blauwalgen.

Voor de dagelijkse praktijk van het Blauwalgenprotocol 2020 is dit mogelijk als met een fluorescentiemeting het chlorofyl-a geassocieerd met blauwalgen wordt bepaald. Soms zijn echter niet alle aanwezige blauwalgen toxisch. Voor sommige zwemlocaties is zelfs bekend dat alleen niet-toxine producerende blauwalgen voorkomen of dominant zijn. In deze situaties leidt de aanname dat alle blauwalgen potentieel toxisch zijn tot een overschatting van het risico. In dergelijke situaties kan met behulp van microscopie worden vastgesteld wat het aandeel van de toxische blauwalgen is. Het gemeten gehalte chlorofyl-a geassocieerd met blauwalgen kan vervolgens hiervoor gecorrigeerd worden. Indien deze optionele correctie wordt uitgevoerd, kan worden uitgegaan van een lijst met potentieel toxische blauwalgen die op dit moment in Nederland relevant zijn. De voorgestelde werkwijze is gebaseerd op een kleinschalig onderzoek en zal in de toekomst nog nader onderzocht en onderbouwd moeten worden. Voorlopig kan de aangegeven procedure echter gevolgd worden. In een volgende versie van het Blauwalgenprotocol zullen de adviezen uit het gereviseerde WHO document Toxic Cyanobacteria in Water in beschouwing genomen worden.

9.4 **Correlatie biovolume en chlorofyl-a geassocieerd met blauwalgen**

Het met de Fluoroprobe bepaalde chlorofyl-a geassocieerd met blauwalgen in µg/L vertoont een redelijke lineaire relatie met het microscopisch bepaalde biovolume (mm³/L), zoals in Figuur 5 is te zien. Deze figuur bevat meer dan 3800 metingen van biovolume en chlorofyl-a geassocieerd met blauwalgen van Aquon en STOWA. Met deze dataset werd een correlatiefactor van 2,8 gevonden met een correlatiecoëfficiënt $R^2 = 0,65$. In een eerder onderzoek werd een correlatiefactor van 3,3 gevonden (Van der Oost, 2010). Met behulp van de correlatie tussen biovolume en chlorofyl-a van blauwalgen kan het

biovolume worden omgerekend naar chlorofyl-a geassocieerd met blauwalgen, en worden getoetst aan de normen die het Blauwalgenprotocol 2020 voorschrijft.



Figuur 5: correlatie tussen biovolume en chlorofyl-a van blauwalgen

9.5 Toxine-bepalingen

Het is duidelijk dat de gezondheidsrisico's van blauwalgen bepaald worden door de toxinen die zij produceren. Er zijn methoden beschikbaar om blauwalgtoxinen (LCMS/MS, HPLC, ELISA) en toxinegenen (PCR) te bepalen, maar deze hebben als nadeel dat ze (nog) niet allemaal eenvoudig routinematig door elk laboratorium uitgevoerd kunnen worden. Bovendien richten zij zich vaak op een (beperkt aantal) specifieke toxine(n). Op dit moment zijn dergelijke bepalingen wel geschikt voor nader onderzoek.

Voor het dagelijks beheer op een zwemlocatie zijn toxinen-metingen nog niet bruikbaar, omdat voor de meeste toxinen nog geen algemeen geaccepteerde normen beschikbaar zijn waaraan getoetst kan worden.

Op dit moment is een risicobepaling op basis van toxinen alleen mogelijk voor microcystinen; deze is als facultatief in het Blauwalgenprotocol 2020 opgenomen.

In de toekomst kunnen mogelijk ook de risico's van andere toxinen worden bepaald met snelle analysemethoden, zoals ELISA, en is er voor meerdere toxinen een toetsingskader beschikbaar. Ook op dit punt zullen in een volgende versie van het Blauwalgenprotocol de adviezen uit het gereviseerde WHO document Toxic Cyanobacteria in Water meegenomen worden.

9.6 Benthische blauwalgen

Benthische blauwalgen behoren tot de groep van draadvormige blauwalgen die op een vaste ondergrond groeien. Ze vormen vaak uitgestrekte bruingroene tot zwarte viltige, soms slijmerige, matten op verschillende substraten, zoals een zandige of stenige bodem, waterplanten, of drijvend afval. Deze zogenaamde benthische matten kunnen uit meerdere soorten bestaan. Van een aantal soorten is vast komen te staan dat ze neurotoxinen kunnen produceren.

Benthische blauwalgen liggen als matten op de bodem van de zwemlocatie. De matten kunnen wel loslaten en eventueel aanspoelen. Benthische blauwalgen hebben binnen het Blauwalgenprotocol 2020 een aparte status omdat zij niet volgens de daarin voorgeschreven systematiek kunnen worden onderzocht en opgevolgd. Informatie over hoe te handelen bij verdenking op de aanwezigheid van benthische blauwalgen, foto's ter herkenning van blauwalgmatten en een procedure voor een indicatieve risicobeoordeling op basis van abundantie zijn opgenomen in Bijlage 5.

In de toekomst zal worden onderzocht in hoeverre benthische blauwalgen in Nederland negatieve gevolgen kunnen hebben voor de humane gezondheid. Sterfte van honden na het inslikken van deze algen is wel gerapporteerd.

9.7 Alternatieve technieken voor blauwalgen monitoring

De technieken waarmee de monitoring van blauwalgen op zwemlocaties kan worden uitgevoerd zijn steeds in ontwikkeling. In de toekomst hebben mogelijk andere methoden dan die in het Blauwalgenprotocol 2020 zijn opgenomen de voorkeur.

Zo is er voor een aantal potentieel toxische blauwalgen een qPCR-methode beschikbaar om hun aanwezigheid in oppervlaktewater vast te stellen. Deze qPCR-methoden richten zich op de detectie van enkele specifieke blauwalggeslachten. Het Blauwalgenprotocol 2020 richt zich op alle blauwalgen en daarom zijn de huidige qPCR-methoden meer geschikt voor nader onderzoek bij aangetoonde aanwezigheid van blauwalgen, dan voor het dagelijks beheer op een zwemlocatie.

Technieken die men wil toepassen voor routinematige monitoring van zwemlocaties en dagelijks beheer, dienen volledig ontwikkeld en in de praktijk getest te zijn, alvorens zij opgenomen kunnen worden in het Blauwalgenprotocol.

Verzoeken tot het opnemen van volledig gevalideerde (in lijn met NEN 7777:2011 of conform NEN-EN-ISO 22118:2011) nieuwe analysetechnieken in het Blauwalgenprotocol kunnen ter evaluatie worden voorgelegd aan het Landelijk Zwemwateroverleg (LZO) binnen de regiekolom van de Stuurgroep Water, voorzien van voldoende onderbouwende data en motivatie. Het LZO benadert en raadpleegt experts, bijvoorbeeld uit het Platform Blauwalgen of het Plankton Overleg Nederland (PON) voor de beoordeling van de ingediende verzoeken. Goedgekeurde alternatieve methoden mogen worden gebruikt nadat zij onderdeel zijn geworden van een volgende versie van het Blauwalgenprotocol.

9.8 Onderwerpen die nader onderzoek behoeven

In het Blauwalgenprotocol 2020 worden praktische handvaten gegeven waarmee waterbeheerders kunnen omgaan met blauwalgen op zwemlocaties. Een aantal onderwerpen is in deze versie van het Blauwalgenprotocol niet

opgenomen omdat er onvoldoende gegevens beschikbaar zijn die tot een handelingsperspectief ten aanzien van deze onderwerpen kunnen leiden. Dat wil echter niet zeggen dat het belang van deze onderwerpen niet wordt onderkend. Ten behoeve van volgende versies van het Blauwalgenprotocol zullen deze onderwerpen door het Platform Blauwalgen worden opgepakt voor nader onderzoek of nadere invulling. Het betreft onder andere het opstellen van NEN-normen, het gebruik van sensoren, ringonderzoeken, uniformering van het beoordelen van nieuwe analysemethoden, toxinen en marine blauwalgen.

10 Dankwoord

De auteurs danken alle leden van het Landelijk Zwemwateroverleg (LZO), het Plankton Overleg Nederland (PON) en het Platform Blauwalgen voor hun bijdrage aan het Blauwalgenprotocol 2020.

11 Te raadplegen literatuur

De Haan, M. 2016 Evaluatie blauwalgenprotocol 2016 – Deel 1: Bevindingen bij gebruik van 'Blauwalgenprotocol 2012'. Referentienummer WAT_BE7645_R001F02.

Gerritsen, A. 2016 Evaluatie Blauwalgenprotocol 2012 – Deel 2: Methoden voor blauwalgen detectie.

Lévesque, B, Gervais, M, Chevalier, P, Gauvin, D, Anassour-Laouan-Sidi, E, Gingras, S, Fortin, N, Brisson, G, Greer, C, and Bird, D. 2014. Prospective study of acute health effects in relation to exposure to cyanobacteria. *Sci Total Environ* 466-467:397-403. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.07.045.

NEN 6520:2006/C1:2011 nl Water – Spectrofotometrische bepaling van het gehalte aan chlorofyl-a.

NEN-EN 15204:2006 en Kwaliteit van water – Richtlijn voor het tellen van fytoplankton met behulp van omgekeerde microscopie (Utermöhl-techniek).

NEN 7777:2011 Milieu en voedingsmiddelen - Prestatiekenmerken van meetmethoden.

NEN-EN-ISO 22118:2011 Microbiologie van voedingsmiddelen en diervoeders - Polymerase chain reaction (PCR) voor de detectie van pathogenen in voedingsmiddelen – Prestatiekenmerken.

NEN-EN 16695:2015 en Waterkwaliteit – Richtlijn voor het schatten van het fytoplankton biovolume.

NPR 9060:2016 Water – Hydrobiologische methoden – Microscopisch onderzoek blauwalgen (Cyanobacteriën) ten behoeve van risicobeoordeling oppervlaktewater.

RWS. 2011. Handreiking blauwwiermatten - De herkenning, risico's en maatregelen. Rijkswaterstaat Waterdienst, 7-7-2011. www.helpdeskwater.nl.

RWS Waterdienst. 2008 Blauwalgen in het zwemwaterprofiel – Handreiking om het risico op proliferatie van toxische blauwalgen te beoordelen. Registratienummer MD-WR20070080.

Sollie, S. en E. Kardinaal, 2020. Risicobeoordeling blauwalgen in zwemwater - Nieuwe technieken voor de bepaling van de aanwezigheid van blauwalgtoxines. STOWA-rapport nummer 2020-09. ISBN 978.90.5773.873.9.

Stewart, I, Webb, PM, Schluter, PJ, and Shaw, GR. 2006. Recreational and occupational field exposure to freshwater cyanobacteria – a review of anecdotal and case reports, epidemiological studies and the challenges for epidemiologic assessment. *Environ Health* 5:6. doi: 10.1186/1476-069X-5-6.

Stewart, I, Seawright, AA, and Shaw, GR. 2008. Cyanobacterial poisoning in livestock, wild mammals and birds – an overview. *Adv Exp Med Biol* 619: 613-637. doi: 10.1007/978-0-387-75865-7_28.

Van der Oost, R. 2009. Cyanotoxine monitoring. STOWA-rapport nummer 2009-21. ISBN 978.90.5773.438.0.

Van der Oost, R, 2009a. Protocol voor het nemen van oppervlaktewatermonsters voor onderzoek naar toxines van cyanobacteriën en voor de analyse van de algensamenstelling. STOWA-rapport nummer 2009-21A. ISBN 978.90.5773.439.7.

Van der Oost, R, 2009b. Protocol voor de extractie van oppervlaktewater met *Microcystis* of *Planktothrix* dominantie voor de ELISA analyse van microcystines. STOWA-rapport nummer 2009-21B. ISBN 978.90.5773.441.0.

Van der Oost, R, 2010. Toepassing van fluorescentie bij de beoordeling van de risico's van giftige cyanobacteriën. STOWA-rapport nummer 2010-18. ISBN 978.90.5773.474.8.

Bijlage 1

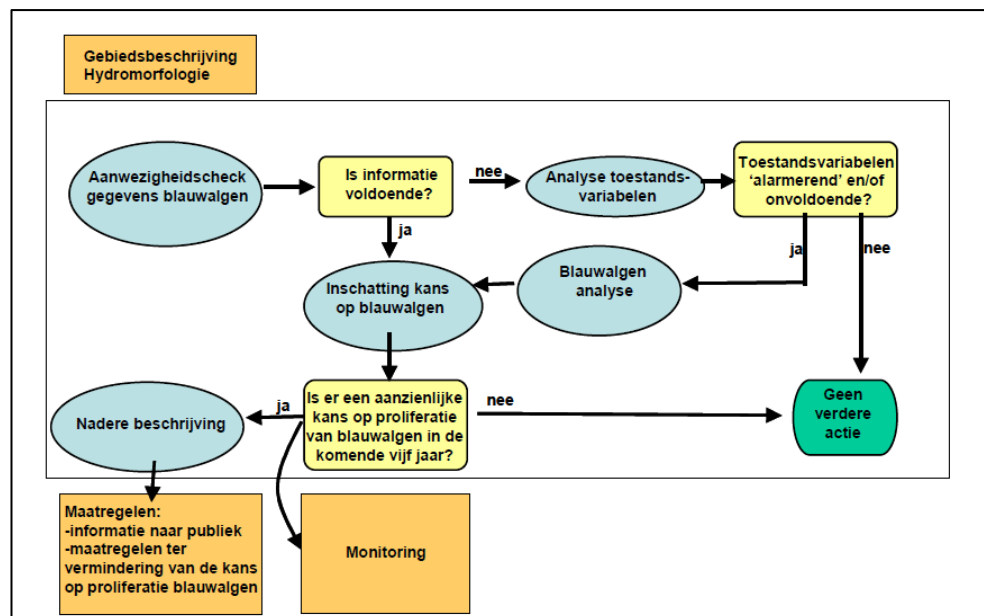
Protocol voor het schatten van de kans op proliferatie van blauwalgen op een zwemlocatie

1. Inleiding

Het vaststellen of een zwemlocatie een risicolocatie is voor proliferatie van blauwalgen kan worden uitgevoerd in stappen, afhankelijk van de hoeveelheid beschikbare informatie. Wanneer te weinig informatie beschikbaar is, dient altijd een extra meetinspanning plaats te vinden. De te volgen stappen zijn opgenomen in Figuur 1 en worden in dit protocol toegelicht.

Wanneer de relevante stappen zijn doorlopen en de inschatting luidt dat het onwaarschijnlijk is dat er in de komende vijf jaar een bloei van blauwalgen optreedt, is de beoordeling gereed. Wanneer op grond van de verzamelde gegevens blijkt dat er een aanzienlijke kans is dat er in de komende vijf jaar proliferatie van blauwalgen optreedt, dient een nadere beschrijving van het systeem te worden gemaakt, én dient in komende zwemseizoenen een passende controle te worden uitgevoerd.

De nadere beschrijving heeft tot doel inzicht te geven in de werking van het systeem met betrekking tot het ontstaan van de proliferatie van blauwalgen en maakt het daarnaast mogelijk om de meest effectieve maatregelen tegen deze proliferatie te beoordelen. Het oordeel en de onderbouwing maken deel uit van het zwemwaterprofiel van een zwemlocatie.



Figuur 1 Stappenplan voor het schatten van de kans op proliferatie van blauwalgen op een zwemlocatie

2. Gebiedsbeschrijving en hydromorfologie

In de gebiedsbeschrijving van de zwemlocatie en de hydromorfologie van het water dienen onder andere het oppervlak van het waterlichaam en de zwemzone en een beschrijving van de overige functies die in het waterlichaam zijn vertegenwoordigd te worden opgenomen. Middels een duidelijke kaart worden de ligging en de begrenzing van de zwemlocatie in het waterlichaam weergegeven en indien aanwezig de ligging van steigers, strand en ligweiden. In het kader van de eventuele blauwalgenproblematiek is inzicht in de diepte van het waterlichaam eveneens gewenst.

2.1 Inventarisatie (historische) blauwalgegevens

Het is van belang dat er voldoende gegevens worden gebruikt voor de beoordeling van potentiële risicolocaties. Wanneer gegevens ontbreken is analyse van toestandsvariabelen noodzakelijk. Bruikbare gegevens uit het verleden (en hun minimaal vereiste frequentie) met betrekking tot de aanwezigheid van blauwalgen kunnen zijn:

1. Resultaten van blauwalgenanalyses of snelle microscopische schattingen; minimaal gedurende één zwemseizoen uitgevoerd
2. Informatie over de aanwezigheid van drijfslagen van blauwalgen, zowel binnen als in de nabijheid van de zwemzone; minimaal van één zwemseizoen, minimaal 10 inspecties uitgevoerd
3. Informatie over kolonies van blauwalgen (vlokjes, sprietjes, bolletjes in de waterkolom) of algen/blauwalgen op oever/waterlijn; minimaal van één zwemseizoen, minimaal 10 inspecties uitgevoerd
4. Informatie over toxine-concentraties in waterfase en/of drijfslagen
5. Informatie over ziekte/sterfte van dieren met sterke aanwijzing dat blauwalgen hieraan (mede) ten grondslag liggen
6. Informatie over gezondheidsklachten bij zwemmers met sterke aanwijzing dat blauwalgen hieraan (mede) ten grondslag liggen

Ad. 1 – 3 Blauwalgen en drijfslagen

- Locatie van de drijfslaag en windrichting
- Kleur en dikte van de drijfslaag (cm)
- Oppervlakte van de drijfslaag vermeld in m²
- Duur van de aanwezigheid van de drijfslaag
- Blauwalgsamenstelling van de drijfslaag
- Digitale foto's

Ad. 5 Dierziekte/sterfte

- Ziekte of sterfte van dieren met een mogelijk verband met blootstelling aan blauwalgen
- Welk(e) dier(en) betrof het en hoeveel
- Optredende verschijnselen (verlamming, ademhalingsproblemen en/of vreemde nekhouding kunnen duiden op neurotoxines of botulisme)
- Gegevens over blauwalgen in het verdachte oppervlaktewater; omgevingsonderzoek naar meer dode dieren
- Pathologisch onderzoek bij de dode dieren, bijv. blauwalgen en/of toxines in maagdarmlkanaal, toxines in weefsels zoals lever
- Andere factoren die de sterfte zouden kunnen verklaren, zoals botulisme, zuurstofloosheid, virusinfectie

Ad. 6 Gezondheidsklachten bij mensen

- Gezondheidsklachten bij zwemmers met een mogelijk verband met blootstelling aan blauwalgen
- Welke van deze gezondheidsklachten: jeuk, huiduitslag, maagdarmklachten (misselijkheid, buikpijn, diarree), griepachtige verschijnselen, hoofdpijn, geïrriteerde ogen, oorpijn en blaren rond de mond
- Nader onderzoek naar aanleiding van gezondheidsklachten, zoals toxine-meting, blauwalgen en/of fytoplankton-inventarisatie, bacteriologisch onderzoek, onderzoek naar de parasiet die zwemmersjeuk veroorzaakt, en de uitkomsten hiervan

2.2 Analyse toestandsvariabelen

Op basis van historische gegevens van de toestandsvariabelen doorzicht, chlorofyl en zuurgraad, kan een schatting gemaakt worden van de aanwezigheid van blauwalgen in het zwemwater. De toestandsvariabelen moeten ten minste gedurende één zwemseizoen gemeten zijn en minimaal 10 metingen omvatten. Als blijkt dat de minimale gegevens niet beschikbaar zijn, worden deze aangevuld door nader onderzoek gedurende ten minste één zwemseizoen.

Als bij analyse van de gegevens blijkt dat

- het doorzicht minder dan 1 meter was, zonder aanwijsbare oorzaak, anders dan de groei van algen of blauwalgen,
- *en/of* de pH hoger was dan 9 zonder aanwijsbare oorzaak, anders dan de groei van algen of blauwalgen,
- *en/of* bovenmatige waterplantengroei optrad,
- *en/of* de chlorofyl-a geassocieerd met blauwalgen-concentratie ≥ 12 µg/l was,

dan wordt gedurende een zwemseizoen een blauwalgeninventarisatie uitgevoerd. Wanneer geen van deze situaties zich heeft voorgedaan is verdere actie niet nodig.

2.3 Te weinig gegevens

Wanneer er geen of te weinig historische blauwalgengegevens zijn en geen of te weinig metingen van de toestandsvariabelen, dient inspectie en monitoring van de zwemlocatie plaats te vinden conform het Blauwalgenprotocol 2020, waarbij minimaal 10 inspecties moeten worden uitgevoerd om voldoende gegevens te verkrijgen voor een beoordeling.

3. Schatting van de kans op proliferatie van blauwalgen

Als er voldoende informatie is, al dan niet na aanvullende metingen, volgt de schatting van de kans op mogelijke proliferatie van blauwalgen in de toekomst aan de hand van de onderstaande beoordelingscriteria. Als één van deze criteria op enig moment in de afgelopen vijf jaar 'waar' was, is er een aanzienlijke kans dat er in de komende vijf jaar sprake zal zijn van proliferatie van blauwalgen. In dit geval is een nadere beschrijving van het watersysteem noodzakelijk én er dient een passende controle en monitoring te worden uitgevoerd in de komende zwemseizoenen, waarbij het Blauwalgenprotocol 2020 gevolgd wordt.

Beoordelingscriteria:

- drijfslag aanwezig
- ziekte/sterfte van dieren, met sterke aanwijzing dat blauwalgen hieraan (mede) ten grondslag lagen
- gezondheidsklachten bij zwemmers, met sterke aanwijzing dat blauwalgen hieraan (mede) ten grondslag lagen
- de concentratie chlorofyl-a geassocieerd met blauwalgen was ≥ 12 ug/l

Wanneer geen van de criteria 'waar' was, is proliferatie van blauwalgen in de komende vijf jaar niet te verwachten en is verdere actie niet nodig. Dit ontslaat de beheerder van de zwemlocatie echter niet van alertheid ten aanzien van proliferatie van blauwalgen. Veranderingen in het watersysteem kunnen leiden tot een andere situatie ten aanzien van proliferatie van blauwalgen en vereisen in ieder geval een aanpassing van het zwemwaterprofiel.

4. Nadere beschrijving

Als blijkt dat er een aanzienlijke kans is op het optreden van proliferatie van blauwalgen in de komende zwemseizoenen, wordt een meer diepgaande beschrijving gegeven van het watersysteem, met als doel inzicht te krijgen in de oorzaken (bronnen) die proliferatie van blauwalgen teweegbrengen en versterken. De werkwijze voor deze nadere beschrijving zal per watersysteem verschillen, maar dient in ieder geval gericht te zijn op de factoren die invloed hebben op de levenscyclus en groeikansen van blauwalgen. Een goede schatting van de invloed van verschillende bronnen geeft een rationale voor te nemen maatregelen. In veel gevallen is nader onderzoek vereist om tot een dergelijk inzicht te komen. De nadere beschrijving en nader onderzoek geven bij voorkeur informatie over de hydromorfologie van de zwemlocatie (o.a. diepte, ligging, windrichting, aanwezigheid diepere delen of putten, gemengd of met spronglaag, stromend of stagnant, geïsoleerd of in verbinding met ander oppervlaktewater, aanwezigheid kwel), nutriëntenconcentraties (o.a. stikstof, fosfaat, zout), vegetatie (o.a. emergente, ondergedoken en drijvende waterplanten) en visstand.

Gebaseerd op: Blauwalgen in het zwemwaterprofiel - Handreiking om het risico op proliferatie van toxische blauwalgen te beoordelen. RWS Waterdienst, registratienummer MD-WR20070080, september 2008; update 2018.

Bijlage 2

Protocol voor het nemen van oppervlaktewatermonsters ten behoeve van blauwalgenanalyses

1. Toestellen en hulpmiddelen

- monsterflessen met inhoud van 1 liter
- steekbuis, voor nemen van watermonsters in de waterkolom
- emmer, eventueel met schenkruit en/of touw
- trechter
- kunststof wegwerphandschoenen
- vervoermiddel voor transport van monsters (gekoeld en donker)
- fototoestel
- lieslaarzen of waadpak
- windmeter (optioneel)

2. Werkwijze

2.1 Voorbereiding

Controleer vóór vertrek of de benodigde toestellen en hulpmiddelen aanwezig zijn. Neem de gebruikelijke voorzorgsmaatregelen met betrekking tot veiligheid en gezondheid.

2.2 Monsterlocatie

Er moeten/kunnen per monsterlocatie watermonsters worden genomen voor fluorescentieanalyse op blauwalgen in de volgende vier situaties. Er dient in de eerste drie gevallen een foto gemaakt te worden:

- **een categorie III drijfslag op de monsterlocatie:** Bemonstering is facultatief. Er kunnen monsters worden genomen van de drijfslag op de monsterlocatie (voor de vaststelling van de samenstelling) en van de waterfase onder de drijfslag (om het chlorofyl-a geassocieerd met blauwalgen te bepalen).
- **een categorie III drijfslag buiten de monsterlocatie (maximaal 500 meter afstand):** Bemonstering is facultatief. Er kunnen monsters worden genomen in de drijfslag buiten de monsterlocatie (voor de vaststelling van de samenstelling) en op het controlepunt binnen de monsterlocatie waar volgens de Europese Zwemwaterrichtlijn de reguliere watermonsters worden genomen (om het chlorofyl-a geassocieerd met blauwalgen te bepalen).
- **blauwalgdominantie (categorie I en II drijfslagen) op de monsterlocatie:** Bij zichtbare dominantie van blauwalgen in de waterkolom (maar nog geen aanwezigheid van een drijfslag) in de vorm van kolonies bestaande uit klontjes (aaneengeplakte losse cellen) of vlokjes (draadjes / sprietjes), moet een watermonster worden genomen. Dit gebeurt op het controlepunt.
- **geen zichtbare blauwalgen:** Alleen op risicolocaties volgens het zwemwaterprofiel moet ook een monster worden genomen voor een risicoanalyse als er geen aanwezigheid van blauwalgen zichtbaar is. Dit gebeurt op het reguliere controlepunt.

2.3 Bemonstering

Bepaal met behulp van visuele inspectie of op de zwemlocatie een drijfslaag of blauwalgdominantie aanwezig is. Maak hiervoor gebruik van Hoofdstuk 7 in het Blauwalgenprotocol 2020. Vul een fles voor de bepaling van de algensamenstelling. Hieronder wordt per situatie aangegeven hoe bemonsterd moet worden:

- **een categorie III drijfslaag**
 - neem het monster op de plek waar de drijfslaag het dikst is
 - plaats de fles schuin in de drijfslaag, de opening van de fles net onder het wateroppervlak, zodat de drijfslaag in de fles spoelt
- **blauwalgdominantie (categorie I en II drijfslagen)**
 - neem het monster op de plek waar de blauwalgdominantie het meest duidelijk is (bijv. een 'wolk' van blauwalgen)
 - gebruik een steekbuis voor een verticale bemonstering van de waterkolom tot een diepte van 50 cm en breng het water over in een schone emmer
 - giet het water uit de emmer met een trechter in de monsterfles
- **geen drijfslaag**
 - neem het monster op het reguliere controlepunt
 - gebruik een steekbuis voor een verticale bemonstering van de waterkolom tot een diepte van 50 cm en breng het water over in een schone emmer
 - giet het water uit de emmer met een trechter in de monsterflessen

2.4 Transport, bewaren en conserveren van monsters

Voorzie de monsterflessen van etiketten met eenduidige herkenningsinformatie. Plaats na monsternamen de flessen in een donkere koelkast of koelbox met koelelementen. Neem het monster zo vers mogelijk, in ieder geval binnen 24 uur, in behandeling. Conserveer monsters voor eventueel microscopisch onderzoek die langer dan 48 uur bewaard moeten worden met lugol volgens NEN-EN 15204:2006.

Gebaseerd op: Protocol voor het nemen van oppervlaktewatermonsters voor onderzoek naar toxines van cyanobacteriën en voor de analyse van de algensamenstelling, STOWA rapportnummer 2009-21A, ISBN 978.90.5773.439.7, 2009; update 2018.

Bijlage 3

Protocol voor het bepalen van het chlorofyl-a geassocieerd met blauwalgen met behulp van een fluorescentiemeting

1. Toepassingsgebied

Dit voorschrift is van toepassing op de analyse van chlorofyl-a in oppervlaktewater. Chlorofyl-a in oppervlaktewater kan bepaald worden met behulp van de Fluoroprobe of een andere fluorimeter. Dit protocol geeft een gedetailleerde werkwijze voor de Fluoroprobe. [De onderdelen in dit protocol die specifiek of uitbreidend van toepassing zijn op de Fluoroprobe zijn in het document in blauwe tekst weergegeven.](#) Bij gebruik van een andere fluorimeter dan de Fluoroprobe dient de gebruiksaanwijzing van de gebruikte fluorimeter als leidraad. Een alternatieve fluorimeter dient aan specifieke eisen te voldoen, die vergelijkbaar zijn met de Fluoroprobe.

[De Fluoroprobe bepaalt het chlorofyl-a van verschillende groepen algen met combinaties van zes excitatiegolflengten \(370, 470, 525, 570, 590 en 610nm\). De metingen worden 12x uitgevoerd en daarvan worden gemiddelden bepaald. Als een ander apparaat wordt gebruikt zullen vergelijkbare algoritmen moeten worden toegepast en moeten de resultaten een lineair verband hebben met het microscopisch bepaalde biovolume van de blauwalgen. Een geschikt alternatief lijkt de PHYTO-PAM, met 4 verschillende excitatie golflengtes meet \(470, 520, 645 en 665 nm\), en die is gekalibreerd met verschillende soorten algen, waaronder blauwalgen \(persoonlijke mededeling Mike Lurling \(WUR\); notitie 'Bepaling van chlorofyl-a en de hoeveelheid blauwalg \[cyanobacteriën\] met behulp van in vivo fluorescentie'\). Het met de Fluoroprobe bepaalde chlorofyl-a geassocieerd met blauwalgen \(\$\mu\text{g/L}\$ \) is ongeveer drie keer het biovolume van de blauwalgen \(\$\text{mm}^3/\text{L}\$ \).](#)

Een alternatieve fluorimeter moet, net als de Fluoroprobe, het chlorofyl-a van zowel blauwalgen met fycocyanine als blauwalgen met fycoerytrine (*Planktothrix rubescens*) kunnen bepalen. Ook moet er een indicator van het humusgehalte worden gemeten, omdat een hoog humusgehalte de fluorescentie kan verstoren.

2. Definities

Fluorescentie is een natuurkundig verschijnsel. Bij een fluorescentiemeting wordt het te onderzoeken monster bestraald met UV of zichtbaar licht. Moleculen in het monster absorberen de fotonen uit dit licht, waardoor één of meerdere elektronen van de moleculen in een aangeslagen toestand belanden; ze worden geëxciteerd. Vervolgens vallen de elektronen terug naar de grondtoestand, waarbij de geabsorbeerde energie vrij komt. Bij het vrijkomen van de energie wordt licht uitgezonden (emissielicht) dat wordt gemeten als fluorescentiesignaal.

3. Beginsel

In het meetinstrument worden zes lichtbundels met specifieke golflengtes door de cuvet met het monster gestuurd. Door die lichtbundels wordt de energie van de kleurstof, die in het fytoplankton aanwezig is (voor blauwalgen fycocyanine of fycoerytrine) verhoogd. Deze energie wordt overgebracht op het chlorofyl.

Het chlorofyl gaat hierdoor licht uitstralen. De lichtuitstralingen worden gedetecteerd en weergegeven in μg chlorofyl-a per liter voor de verschillende algen. Er moeten specifieke algoritmen worden toegepast om de signalen van de fluorescentie bij zes golflengten te 'vertalen' naar de chlorofyl-a gehalten geassocieerd met blauwalgen.

4. Veiligheid en milieu

Blauwalgen kunnen toxinen bevatten. Draag daarom handschoenen bij het uitschenken van monsters met blauwalgen. Analyseresiduen kunnen in principe afgevoerd worden door de gootsteen; volg hiervoor echter altijd het beleid van de eigen organisatie.

5. Omgevingscondities

De analysewerkzaamheden dienen op het laboratorium bij UV-vrij licht plaats te vinden.

Er moet daarom een folie op het raam worden aangebracht dat geen UV-licht doorlaat.

6. Hulpmiddelen en Apparatuur

a. Hulpmiddelen

- kwartscuvetten (minimaal 10 ml) voor de fluorescentiemeting
- [bijgeleverd krasvrij OG kwartscuvet 25 ml](#)
- Greiner buisjes 10 ml om het controlemonster in te vriezen
- maatkolven voor eventuele verdunningen

b. Reinigen glaswerk

Reinig maatkolven die gebruikt worden voor verdunningen volgens het standaard laboratorium voorschrift. De cuvetten worden gespoeld met verdund zoutzuur (ca. 3 molair) en na afloop van de meting weggezet in schoon demiwater (of, indien nodig, in verdund zoutzuur).

c. Apparatuur

- [bbe moldaenke Fluoroprobe](#) of andere fluorimeter
- waterbad
- vriezer -75°C

d. Software

Specifieke software voor het uitvoeren van algoritmen om de fluorescentie-signalen bij zes excitatiegolflengten om te rekenen naar een chlorofyl-a concentratie die is geassocieerd met blauwalgen [bbe Fluoroprobe versie 2.2.8](#); voor de meting van de Fluoroprobe referentiecuvet: [bbe++ versie 2.6 E1](#)

7. Reagentia, standaarden en kwaliteitscontroles

a. Reagentia en hulpstoffen

Ethanol 70% (brandgevaarlijk en carcinogeen) of 3M zoutzuur voor het spoelen van de cuvetten. De oplossingen wordt bewaard bij kamertemperatuur en zijn 4 maanden houdbaar.

b. Kwaliteitscontroles

Controlemonster (voor alle fluorimeters)

Voor de kwaliteitscontrole wordt een reïncultuur van een blauwalg gebruikt. Deze reïncultuur wordt gekweekt op het laboratorium van Aquon. Verdunningen van de cultuur worden verdeeld in plastic buizen (porties van ca. 10 ml) ingevroren bij -75 tot -80°C . Optioneel kan daarnaast ook een ingevroren standaard met chlorella-poeder worden toegepast. Beide controlemonsters kunnen door Aquon op droogijs naar

de verschillende laboratoria worden gebracht, zodat er landelijk uniforme standaarden zijn.

- Haal een buisje met blauwalg cultuur uit de -75/80°C vriezer.
- Zet deze in het donker (bijv. lichtdichte bak of donker glaswerk) in een volledig gevulde beker (of erlenmeyer) met water en laat ontdooien tot er bijna geen ijs meer zichtbaar is (12-15 minuten, en opletten dat het monster niet helemaal ontdooit).
- Vul een maatcilinder met \pm 400 ml leidingwater.
- Schenk de blauwalg cultuur direct na het ontdooien kwantitatief over in de maatcilinder en vul aan met leidingwater tot 500 ml. Let op dat ook evt. materiaal in de dop wordt meegenomen. Dit is het controlemonster.
- Laat het controlemonster 3 minuten roeren met zichtbare kolk. Het is belangrijk om het monster meteen na het mengen te meten, omdat de fluorescentie snel kan veranderen.
- Spoel de meetcuvet een keer voor met het controlemonster en vul daarna de cuvet met de optimale hoeveelheid van deze oplossing.
- Let op dat de cuvet niet zonder handschoenen wordt beetgepakt op de vlakken die in de lichtweg van de fluorescentiemeting zitten.
- Maak de cuvet aan de buitenkant droog en schoon en meet deze met de fluorescentiemeter.

Referentiecuvet of kalibratiecuvet

- Meet 1x per week (indien er monsters binnen komen) ter controle van de Fluoroprobe de referentiecuvet, volgens de instructies op het koffertje van de cuvet.
- Zet de Fluoroprobe aan en doe de referentiecuvet in de cuvethouder.
- Zorg in het programma Fluoroprobe dat de meting op *continuously* staat.
- Open het programma bbe++ en start de meting.
- Stop de meting na het aantal uur wat aangegeven staat op het koffertje van de referentiecuvet.
- Sla de gegevens met export (ASCII) en als *.bdb-file.
- Verwerk de gegevens van de laatste 12 metingen: Sample temp, led1(525nm), led2(570nm), led3(610nm), led4 (590nm), led5 (470nm) en led6 (370nm) in een rekenblad.
- Documenteer als de referentiecuvet gemeten is en voldoet.
- Toets de resultaten aan de kwaliteitseisen.
- Als het resultaat niet voldoet aan de eisen dan moet de referentiecuvet in dezelfde week nogmaals worden gemeten en opgeslagen (als *.bdb file). Mocht deze nog steeds niet voldoen dan kan de bdb file voor advies opgestuurd worden naar bbe.

Volg bij gebruik van een andere fluorimeter dan de Fluoroprobe de voor dat apparaat beschreven kalibratieprocedure.

8. Monster voor analyse

a. Monsterconservering

Het monster is 1 dag gekoeld houdbaar. Als niet wordt gekoeld moet het monster op dezelfde dag worden gemeten. Er is geen conservering mogelijk.

b. Zekerheidsstelling van het monster

Laat het monster op kamertemperatuur komen zodat er geen condensvorming meer plaatsvindt op de cuvet. Het monster moet voor de meting minimaal 30 minuten in het donker (of in bruine/groene flessen)

worden bewaard. Homogeniseer het monster zorgvuldig. De meting is het zekerheidsstelmoment.

Voer bij gebruik van de Fluoroprobe aanvullend de volgende stappen uit.

- **0%- zerometing**
Dek de lens goed af met een niet doorschijnend stukje karton, en voer een 0-meting uit. Noteer in het logboek of deze voldoet.
- **100% blanco meting**
Vul de cuvet met demiwater en meet met de Fluoroprobe. Noteer in het logboek of deze blanco meting voldoet.

Volg bij gebruik van een andere fluorimeter de voor dat apparaat beschreven procedure.

9. Meting van de fluorescentie

a) Algemene opmerkingen:

- Indien monsters direct uit een koelruimte komen (4 °C) ontstaat er condens op de cuvet. De monsters kunnen geplaatst worden in een waterbad of laat ze op temperatuur komen in een afgesloten bak of een donkere afgeschermd plek.
- Houd de monsters weg bij UV licht, en laat ze voor de meting minimaal 30 minuten in het donker staan.
- Spoel de cuvet eerst voor met het desbetreffende monster.
- Indien de transmissie kleiner is dan 80% (of een andere waarde indien dit bij een andere fluorimeter dan de Fluoroprobe staat aangegeven), moet het monster verdund worden, dit wordt gedaan met behulp van leidingwater.
- Indien het totaal chlorofylgehalte >200µg/l (of een andere waarde indien dit bij een andere fluorimeter dan de Fluoroprobe staat aangegeven), dient het monster verdund te worden met leidingwater.
- Mochten er in het monster waterplanten of andere dingen drijven die niet behoren tot het fytoplankton, dan moet het monster eerst worden gezeefd over een diameter van 1mm.
- Verdunningen worden gemaakt in een maatkolf.

b) Analyse met de Fluoroprobe

1. Samenstelling van de meetreeks

- 0% zerometing
- 100% blanco meting
- Controlemonster
- Analysemonsters
- 100% blanco meting
- 0% zerometing

2. De meting

- Schakel de Fluoroprobe aan (ON/OFF) op de voeding.
- Doe dit 30 minuten voor aanvang van de metingen.
- Zet de roersnelheid (Stirrer speed) op 6.
- Zet de computer aan, en log in en start het Online FLP programma.
- Kies menu item 'probe' en klik op 'test connection', toets OK en de Fluoroprobe is klaar voor gebruik.
- Voer een nulmeting uit door te kiezen menu item 'probe' en daarna tabblad 'start measurement' of F5. Scherm hiervoor het rechter venster van de probe af met een stuk niet doorschijnend karton. Zet vervolgens de afschermkap over het meetgedeelte (dit gebeurt

bij elke meting). De waarde van de metingen dient 0.00 ± 0.10 % te zijn.

- Indien 1 of meer van de 12 metingen niet voldoen, voer dan een Transmissie kalibratie uit.
- Ga dan naar menu item 'Calibration/transmission/OK/offset/start/' (even wachten op de 12 metingen) 'apply/cancel'. Maak hiervan een notitie op het logboekformulier.
- Deze data exporteren als txt file door te kiezen menu item 'File' en dan tabblad 'export'. Het bestand wordt geëxporteerd naar de resultatenfile van het desbetreffende jaar. Open een nieuwe map met de meetdatum. Sla het bestand op met de naam: zero1.txt
- Voer daarna een 100% transmissiemeting uit (blanco).
- Vul hiervoor de cuvet met ca. 25 ml demiwater en zet deze in de cuvet houder.
- Voer de 100% meting uit door te kiezen menu item 'Probe' en daarna tabblad 'start measurement'. De waarde van de metingen dient $100.00 \pm 1,50\%$ te zijn.
- Indien 1 of meer van de 12 metingen niet voldoen, maak dan eerst de cuvet goed schoon met 70% ethanol. Voldoet hij dan nog niet, voer dan een 100% transmissiecalibratie uit. Ga naar menu item 'Calibration/transmission/OK/gradient/start/' (even wachten op de 12 metingen) 'apply/cancel'. Maak hiervan een notitie op het logboekformulier.
- Data exporteren zoals hiervoor. Sla het bestand op met de naam: Blanco1.txt. Indien je gebruik maakt van 2 cuvetten noteer dan in de textfile welke cuvet je gebruikt door k1 of k2 erbij te zetten.
- Voer daarna de meting van het controlemonster uit zoals beschreven in 7. Data exporteren als txt.file zoals eerder beschreven. Noem deze: cm.txt. + je gebruikte cuvet. Voer de resultaten van het controlemonster in en noteer of het blauwalgchlorofyl gehalte voldoet op het logboekformulier.
- Voer de metingen van de monsters uit die op de werklijst staan. Vul de cuvet met 25 ml monstermateriaal. Start vervolgens de meting door te kiezen menu item 'Probe' en daarna tabblad 'start measurement'. Data opslaan als txt.file zoals eerder beschreven. Vermeld het monsternummer en de code van de klant en de gebruikte cuvet in de tekstfile en vermeld hierbij ook eventuele verdunningen, bijv: 277888-MBP003k1(10x).txt.
- Als er geen transmissie waarden gemeten kunnen worden staat er 'invalid', dan moet een verdunning van het monster gemaakt worden met leidingwater.

3. Het beëindigen van de analyse

Beëindig de meting met een 100% blanco-meting en een 0% zero-meting, net zoals de metingen die in het begin van de serie zijn uitgevoerd. Sla de resultaten op en noem deze bijv. blanco2k1(k2).txt en zero2.txt indien je gebruik maakt van 2 cuvetten.

4. Het verwerken van de gegevens

- Open de file waarin de Fluoroprobe data worden opgeslagen en maak een map aan voor de serie die is gemeten.
- Vul een Blauwalgen rapportageformulier in en neem de resultaten desgewenst op in LIMS.

- Vul bij de mapnaam de naam van de map waarin je de Fluoroprobe textfiles hebt opgeslagen.

Analyse met een andere fluorimeter

- **Samenstelling van de meetreeks**
 - Nulmeting en blancoanalyse met demiwater (moeten aan kwaliteitseisen voldoen van fluorimeter)
 - Controlemonster
 - Analysemonsters
 - Nulmeting en blancoanalyse met demiwater (moeten aan kwaliteitseisen voldoen van fluorimeter)
- **De meting**
 - Voer de fluorescentiemetingen uit volgens de specificaties en kwaliteitscontroles van de fluorimeter.
- **Het verwerken van de gegevens**

Vul een Blauwalgen rapportageformulier in en neem de resultaten desgewenst op in LIMS.

10. Berekeningen

- Van elke algengroep worden per monster 12 chlorofylmetingen verricht door de Fluoroprobe. De gemiddelde resultaten en de spreiding van de 12 metingen worden m.b.v. de software RB3220 Fluoroprobe blauwalgen berekend.
- Bij gebruik van een andere fluorimeter worden voor de specifieke blauwalgen algoritmen en voor het algoritme voor *Planktothrix rubescens* per monster 10-12 chlorofylmetingen verricht. De gemiddelde resultaten en de spreiding van deze metingen worden berekend.
- Bereken het totaal chlorofyl-a dat is geassocieerd met blauwalgen door de resultaten van de metingen van blauwalgen en *Planktothrix rubescens* op te tellen. Houd hierbij rekening met de eventueel gebruikte verdunningen. Vul het totaalresultaat in op een Blauwalgen rapportageformulier en voer het desgewenst in LIMS in.

11. Evaluatie en controles

Van het controlemonster wordt het gehalte aan chlorofyl-a geassocieerd met blauwalgen bijgehouden in een controlekaart.

Bij gebruik van de Fluoroprobe geldt:

- de 0-meting mag zijn $0,00 \pm 0,10\%$
- de blanco mag zijn $100 \pm 1,50\%$

Bij gebruik andere fluorimeters kan een vergelijkend onderzoek uitgevoerd worden met een laboratorium dat een Fluoroprobe gebruikt.

12. Standaardinstellingen Fluoroprobe

De standaardinstellingen van de Fluoroprobe zijn te vinden onder:

Open het online.FLP programma.

Open in online.FLP het tabblad common parameters.

In het vak times bevinden zich de standaardinstellingen.

Instellingen Fluoroprobe voor de meting van monsters:

Warm up: 10 sec.

Measuring duration: 20 1/10sec.
Measuring interval: 0 sec.
Led measuring time: 10 1/10sec.
Measuring interval: 300 sec
Vak Measurement: number 12.

Instellingen voor het meten van de referentiecuvet:

Zijn hetzelfde als voor de meting van monsters, met uitzonderingen:
Measuring interval op 10 sec.
In vak <measurment> selecteer je <continuously>.

Veranderen van de instellingen van de Fluoroprobe:

Open het online.FLP programma versie 2.2.8.
Start een meting met de Fluoroprobe (zie sectie 9 van deze bijlage).
Ga na de meting naar tabblad common parameters. Je kunt hier de instellingen veranderen voor het meten van de referentiecuvet of het meten van de monsters. Als je dat hebt gedaan dan kies je Send en vervolgens ja om de veranderingen te bevestigen. De instellingen zijn dan veranderd.

Standaard selectie:

Je kunt met de Fluoroprobe 4 verschillende algengroepen en humus tegelijk meten:

- Green Algae.
- Bluegreen.
- In plaats van Diatoms wordt de module Planktothrix geïnstalleerd (zie hieronder).
- Cryptophytae
- Yellow substances.

Veranderen van de algengroepen:

In tabblad parameters of fit kun je kiezen welke algengroepen je wilt meten. Selecteer de gewenste algengroepen en kies daarna Send en ja om de verandering te bevestigen.
Een verplichte optie voor het blauwalgen protocol is de algengroep Planktothrix Rubescens. Selecteer in tabblad parameters of fit Planktothrix i.p.v. Diatoms. Kies Send en kies ja om de verandering te bevestigen. Als de opdrachtgever ook het chlorofyl-a gehalte van diatomeeën wil weten kan dit worden bepaald door de resultaten van de uitgevoerde analyse te herberekenen met de aangepaste parameters.

Storing

Het gebeurt wel eens dat de computer geen signaal krijgt van de probe. Kies COM4, start de computer opnieuw en kies Probe/test connection. Je krijgt ook een storing als je programma online FLP 2 keer is geopend. Sluit een programma.

13. Literatuur

- Van der Oost, 2010. Toepassing van fluorescentie bij de beoordeling van de risico's van giftige blauwalgen. STOWA-rapport nummer 2010-18.
- BBE Fluoroprobe user manual version 2,0 E1, 04/08.
- User manual Fluoroprobe versie 2.6 E1 voor de referentiecuvet.

Ron van der Oost (Waternet), [voor Fluoroprobe gebaseerd op Waterproof SPV A3220](#); februari 2020

Bijlage 4

Protocol voor microscopische analyse van blauwalgen in oppervlaktewater

1. Doel en toepassingsgebied

Dit voorschrift is van toepassing op blauwalgen uit het plankton van zoete tot brakke, stilstaande en stromende oppervlaktewateren. Het bevat richtlijnen voor een kwalitatieve analyse van drijfslaagmonsters (A) en een kwantitatieve analyse van planktonmonsters (B en C), verzameld op zwemwaterlocaties volgens het voorschrift in Bijlage 2 van het Blauwalgenprotocol 2020.

De beschreven methoden zijn bedoeld voor de volgende toepassingen:

- vaststellen van het aandeel potentieel toxische blauwalgen ten behoeve van een correctie van het fluorometrisch gemeten gehalte chlorofyl-a geassocieerd met blauwalgen, voor vaststelling van het risiconiveau op zwemlocaties;
- identificatie van de belangrijkste (blauw)algentaxa in een drijfslaag of in de waterfase, eventueel gevolgd door een microcystine-bepaling bij vastgestelde dominantie van potentieel microcystine-vormers;
- vaststellen van het absolute biovolume van potentieel toxische blauwalgen in situaties waarin de fluorescentiemeting een onbetrouwbaar resultaat geeft; dit biovolume dient omgerekend te worden naar een gehalte chlorofyl-a geassocieerd met blauwalgen ten behoeve van het vaststellen van het risiconiveau op zwemlocaties.

2. Beginsel

De microscopische analyse wordt facultatief uitgevoerd om de belangrijkste organismen in een drijfslaag te identificeren en als aanvulling op de fluorometrische bepaling van het gehalte chlorofyl-a geassocieerd met blauwalgen in de waterfase.

De identificatie van organismen in een drijfslaag is een kwalitatieve analyse aan een monster van de drijfslaag, waarbij men in ieder geval het dominante taxon door microscopisch onderzoek vaststelt. Drijfslagen bestaan meestal uit blauwalgen, maar kunnen ook gevormd worden door sommige andere algen (bijvoorbeeld *Botryococcus*), dierlijk plankton en stuifmeel.

Wanneer het gehalte chlorofyl-a geassocieerd met blauwalgen in de waterfase groter is dan 12 µg/l kan men een schatting maken van het biovolume-aandeel van toxische en niet-toxische blauwalgen, door middel van microscopisch onderzoek van enkele druppels Lugol-geconserveerd monster. Daarbij determineert men de blauwalgen tot op geslacht. Om onderscheid te kunnen maken tussen toxische en niet-toxische blauwalggeslachten gaat men uit van de lijsten in Tabel 2 en 3 in dit protocol. Er wordt uitgegaan van de veronderstelling dat de niet-toxische blauwalgen te vinden zijn in de categorie "niet met zekerheid aangetoond als toxisch" in Tabel 3.

Wanneer uit deze analyse blijkt dat de relatieve abundantie van toxische blauwalgen groter is dan 90%, hanteert men het gemeten gehalte chlorofyl-a geassocieerd met blauwalgen voor de risicobeoordeling.

Wanneer de relatieve abundantie van toxische blauwalgen kleiner is dan 90%, dan heeft de waterbeheerder de keuze uit twee opties:

- Vaststelling van het risiconiveau van blauwalgen op basis van de fluorescentiemeting en het aandeel van toxische en niet-toxische geslachten in het biovolume;
- Bepaling van het absolute biovolume van toxische blauwalgen door microscopisch onderzoek van bezinkingsplankton in een bekend volume deelmonster. Dit gemeten biovolume rekent men vervolgens om naar gehalte chlorofyl-a geassocieerd met blauwalgen voor de risicobeoordeling. De biovolume-bepaling baseert men op een vast biovolume per individu (cel, filament, kolonie), waarbij men determineert tot op geslachtsniveau (genusniveau). De lijst met deze vaste biovolumes voor toxische en niet-toxische genera, maakt onlosmakelijk deel uit van dit voorschrift en is opgenomen in Tabel 4 aan het einde van dit protocol.

Als blijkt dat de fluorescentie-analyse onbetrouwbaar is door verstoringen met humus of andere algen dan moet altijd optie ii) worden toegepast.

3. Normen en documenten

- NEN-EN 14996:2006 Water - Richtlijn voor de kwaliteitsborging van biologische en ecologische beoordelingen in het aquatische milieu.
- NEN-EN 15204:2006 Kwaliteit van water - Richtlijn voor het tellen van fytoplankton met behulp van omgekeerde microscopie (Utermöhl-techniek).
- NPR 9060:2016 Water - Hydrobiologische methoden - Microscopisch onderzoek blauwalgen (Cyanobacteriën) ten behoeve van risicobeoordeling oppervlaktewater.
- Handboek Hydrobiologie Bijkerk R (red) (2014) Handboek Hydrobiologie: biologisch onderzoek voor de ecologische beoordeling van Nederlandse zoete en brakke oppervlaktewateren. Deels aangepaste versie. Rapport 2014-02. Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer, Amersfoort.

4. Termen en definities

- Abundantie** In dit document: het aantal algen in een bepaald volume oppervlaktewater, uitgedrukt in aantal cellen of individuen per volume-eenheid. In het algemeen: het aantal planten of dieren van een soort of soortgroep in een bepaald gebied, doorgaans uitgedrukt per oppervlakte-eenheid of volume-eenheid (NPR 9060).
- Biovolume** Het totale volume van een organisme, bij (blauw)algen het volume van de cel inclusief de celwand, maar exclusief een eventuele lorica (huisje) of slijmmantel.
- Deelmonster** Een representatief deel van het monster waaraan de analyse wordt uitgevoerd.
- Filament** Bij (blauw)algen een draad van achter elkaar geplaatste cellen, meestal in één rij, die zich door deling ontwikkelt en waarbij de cellen aan de uiteinden aan elkaar blijven vastzitten.
- Geslacht** In dit voorschrift: de taxonomische eenheid die één niveau hoger is dan de soort, bijvoorbeeld *Microcystis* is

	naam van het geslacht. <i>Microcystis wesenbergii</i> van een soort uit dit geslacht. De wetenschappelijke benaming is genus (meervoud: genera).
Individu	De gebruikelijke verschijningsvorm van een (blauw)alg; afhankelijk van de soort kan dit zijn, een losse cel, een kolonie (of coenobium) van cellen, een filament, of een kolonie van filamenten (bij <i>Gloeotrichia</i> en <i>Nostoc</i>).
Relatieve abundantie	Bij algen: de abundantie van een bepaalde taxon of groep algen gedeeld door de totale abundantie van alle algen in het deelmonster, doorgaans uitgedrukt als percentage
Taxon	Een taxonomische eenheid van niet nader gespecificeerd niveau binnen het hiërarchisch taxonomisch systeem, bijvoorbeeld soort, geslacht, familie, klasse.
Waarneming	Een getelde eenheid, in dit geval van (blauw)algen, dat als een zelfstandig deeltje door het water beweegt en kan bestaan uit één of meerdere cellen.

5. Chemicaliën

Alkalische lugol	Oplossing van 150 gram kaliumjodide en 50 gram jood in 1 liter demiwater waaraan 100 gram natriumacetaat wordt toegevoegd (zie Bijlage 12 in het Handboek Hydrobiologie voor bereiding)
Immersie-olie	Middelmatig viskeuze olie voor olie-immersie-objectieven zonder PCB's of epoxyhars (zie ISO 8036)
Kaliumhydroxide	Oplossing van 1 M KOH (voor eventuele loogbehandeling)
Verdunningsvloeistof	Leidingwater waaraan per liter 3 milliliter zure Lugol is toegevoegd om deelmonsters te verdunnen of de bezinkcuve te voorzien van een laagje vloeistof voorafgaand aan het pipetteren van het deelmonster (zie Handboek Hydrobiologie voor bereiding)
Zoutzuur	Oplossing van 1 M HCl (voor eventuele loogbehandeling)
Zure lugol	Oplossing van 150 gram kaliumjodide en 50 gram jood in 1 liter demiwater waaraan 100 milliliter ijsazijn wordt toegevoegd (zie Bijlage 12 in het Handboek Hydrobiologie voor bereiding)

6. Apparatuur en hulpmiddelen

Centrifugebuis	Afsluitbaar met een inhoud van 50 milliliter voor eventuele loogbehandeling
Cuvet	Een cilindervormig sedimentatiekamertje met een bodem van dun (0,15-0,17 millimeter) glas en een bekend bezinkingsoppervlak
Dekglasjes	Afmetingen bij voorkeur 24x24 millimeter
Objectglasjes	Afmetingen 76x26 millimeter
Omkeermicroscop	Een binoculaire microscoop die geschikt is voor de detectie van kolonies van cyanobacteriën met cel afmetingen rond 1 µm. De microscoop is uitgerust met grootveld oculairs (10x of 12,5x) waarvan één is voorzien een oculairmicrometer, een condensor met een numerieke apertuur van minimaal 0,5 en hoge apertuur objectieven van 10x, 20x en 60x (zie Bijlage 16 van het Handboek Hydrobiologie voor de minimale vereisten).

	Specificaties en instellingen volgens het principe van Köhler, zoals beschreven in NEN-EN 15204.
Pasteurpipet	Voor het opbrengen van druppels monster op een objectglaasje
Pipettips	Voor gebruik met onderstaande volumepipetten en met een zodanig afgesneden tip dat de opening een diameter heeft van circa 3 millimeter
Reageerbuisjes	Glazen buisjes om een deelmonster in te doen tijdens de voorbehandeling, kunnen ook centrifugebuisjes zijn
Parafilm	Om reageerbuisjes af te dekken
Sedimentatiecuvetten	Cuvetten met een bodemdikte van niet meer dan 0,15-0,17 millimeter
Staande microscoop	Een binoculaire microscoop die geschikt is voor de detectie van kolonies van cyanobacteriën met cel afmetingen rond 1 µm. Zie de optische specificaties hierboven bij Omkeermicroscoop (zie Bijlage 15 van het Handboek Hydrobiologie voor de minimale vereisten). Specificaties en instellingen volgens het principe van Köhler, zoals beschreven in NEN-EN 15204.
Droogstoof	Stoof met instelbare temperatuur op 80 ± 5 °C (voor eventuele loogbehandeling)
Volumepipetten	Om volumes te kunnen pipetteren van 0,2 tot 5,0 milliliter of meer (afhankelijk van het cuvet) en met een bekende afwijking

7. Analyse

7.1 Identificatie van blauwalgeslachten in drijfslagen

7.1.1 Opzet

Van een levend (niet-geconserveerd) monster van een drijfslaag neemt men een deelmonster om door microscopisch onderzoek vast te stellen waaruit de drijfslaag bestaat. Een volledige taxalijst is niet nodig, het gaat om de identificatie van het hoofdbestanddeel van de drijfslaag. De relatieve abundantie van de onderscheiden taxa schat men in vier klassen; een bepaling van de dichtheid is niet nodig.

7.1.2 Inzetten

- Conserveer en homogeniseer het drijfslaagmonster niet. Indien het monster door transport geschud is, wacht dan tot de drijfslaag zich in de pot hersteld heeft.
- Zuig met een pasteurpipet een klein beetje van de bovenste halve centimeter van de drijfslaag op.
- **Bij gebruik van een omkeermicroscoop**
- Laat een druppel van het opgezogen materiaal in een bezinkcuvet vallen. Plaats het cuvet direct in de houder op de tafel van de omkeermicroscoop.
- **Bij gebruik van een staande microscoop**
- Leg een druppel in het midden van een schoon objectglaasje en dek de druppel af met een dekglasje. Klem het preparaat op de kruistafel van de staande microscoop.
- Plaats het restant van het drijfslaagmonster in de koelcel met de dop van de pot los.

7.1.3 Bepaling

- Scan het deelmonster achtereenvolgens bij een zwakke vergroting (100x en 200x) om een indruk te krijgen van de samenstelling van de drijfslaag. De vraag is of het om blauwalgen gaat of om andere organismen of objecten. Als de drijfslaag bestaat uit blauwalgen, bepaal dan of het filamenteuze taxa betreft, of chroococcale taxa.
- Gebruik een sterkere vergroting (400x of 600x) voor een verdere identificatie van de organismen of andersoortige bestanddelen van de drijfslaag; determineer de organismen tot op minimaal geslachtsniveau en zo mogelijk tot op soort.
- Schat het abundantieniveau van de onderscheiden taxa 'op het oog' in vier klassen, op grond van hun biovolume-aandeel en het aantal waarnemingen volgens Tabel 1.

Tabel 1 Schatting van de abundantie van blauwalgen in een drijfslaagmonster

Biovolume-aandeel	Abundantieniveau
> 50%	Dominant
5-50%	Abundant
< 5% en > 2 waarnemingen	Frequent
< 5% en 1 - 2 waarnemingen	Schaars

7.2 Schatting van het biovolume-aandeel van toxische blauwalgen voor correctie chlorofyl-a geassocieerd met blauwalgen

7.2.1 Opzet

De analyse kan facultatief worden uitgevoerd aan monsters waarvan het gehalte chlorofyl-a geassocieerd met blauwalgen hoger is dan 12 µg/l. Van een met zure of alkalische lugol geconserveerd en goed gehomogeniseerd monster neemt men een deelmonster van enkele druppels, om door microscopisch onderzoek vast te stellen of het aandeel van toxische blauwalgen in het totale biovolume van blauwalgen, groter of kleiner is dan 90%. Door de conservering met lugol is het niet nodig om aerotopen te laten knappen. Het biovolume schat men op basis van een standaard biovolume per individu en geslacht, volgens Tabel 4. Losgeraakte cellen van kolonievormende soorten rekent men om naar individuen met behulp van de geslachtspecifieke waarde cel/individu volgens dezelfde Tabel 4.

7.2.2 Voorbehandeling

- Controleer het monster visueel op de aanwezigheid van grote kolonies blauwalgen. Indien deze voorkomen en niet verkleinen door intensief schudden (dat geldt vooral voor *Gloeotrichia*), zeef dan een bekend volume monster over een 25 µm filtertje en maak een schatting van het aantal kolonies en het biovolume per milliliter van deze fractie.
- **Indien de monsters levend en gekoeld worden ontvangen**
Homogeniseer het monster (zie Bijlage 13 van het Handboek Hydrobiologie) en doe met een volumepipet een deelmonster van vijf milliliter in een geëtiketteerd reageerbuisje. Voeg met een pasteurpipet direct één tot twee druppels zure of alkalische lugol toe tot een stabiele cognackleur ontstaat. Dek het buisje af met parafilm en meng de lugol met het deelmonster door het buisje enkele keren te kantelen.
- **Indien de monsters geconserveerd worden ontvangen**
Controleer de staat van fixatie van het monster en voeg zo nodig enkele druppels zure of alkalische lugol toe. Homogeniseer het monster (zie Bijlage 13 van het Handboek Hydrobiologie).

7.2.3 Inzetten (zie NPR 9060)

- Breng van het gehomogeniseerde (deel)monster met een pasteurpipet met grove (of afgebroken) punt twee tot drie druppels op een geëtiketteerd objectglasje. Dek de vloeistof af met een dekglasje en laat het preparaat vijftien minuten staan.
- Plaats het monsterrestant in de koelcel en laat bij een levend monster de dop los.

7.2.4 Bepaling

- Plaats het preparaat op de kruistafel van een staande microscoop, of omgekeerd op de tafel van een omkeermicroscoop.
- Bekijk het preparaat op enkele plaatsen langs de rand en in het midden bij achtereenvolgens een zwakke vergroting (200x) en een sterke vergroting (600x) om een indruk te krijgen van de taxasamenstelling van het deelmonster. Zitten er blauwalgen in en zo ja, zijn het vooral filamenteuze taxa (zoals *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Limnothrix*, *Planktolyngbya* en *Planktothrix*), grote chroococcale blauwalgen (zoals *Microcystis* en *Woronichinia*), of kleine chroococcale blauwalgen (zoals *Aphanothece* en *Cyanocatenula*).
- Ziet men geen blauwalgen, dan kan op basis van deze waarneming direct worden geconcludeerd dat het risiconiveau van de locatie laag (0) is. Als de opdrachtgever een nauwkeuriger analyse wenst, dan kan de analyse met een geconcentreerd monster worden uitgevoerd of worden geanalyseerd zoals beschreven in § 6.3 van deze bijlage.
- Ziet men wel blauwalgen, scan het preparaat bij een sterke vergroting (600x) om ook kleine blauwalgen te herkennen (zoals bijvoorbeeld *Cyanocatenula* en *Cyanogranis*). Begin de scan aan de rand van het preparaat (scan bij ronde cuvetten volgens de middenlijn), werk door naar het midden en tel de blauwalgen per geslacht en individu. Tel individuen die gedeeltelijk buiten het beeldveld vallen alleen mee wanneer zij in de bovenste helft van het beeldveld liggen. Beëindig de scan wanneer er minstens twintig individuen zijn geteld². Maak zo nodig een tweede of derde scan (Figuur 1). Wanneer men in deze scan(s) geen grote kolonies van *Microcystis* of *Woronichinia* heeft gezien, maar in de eerste visuele beoordeling (stap 2) wel, probeer dan een schatting van de relatieve dichtheid van deze kolonies te maken. Daartoe scant men het preparaat bij een zwakke vergroting (200x) tot men minimaal twee kolonies heeft gezien. Bij dominantie van microcystine-vormers kan een microcystine-bepaling worden uitgevoerd.
- Bereken vervolgens het totale aantal waargenomen individuen per geslacht, waarbij men rekening houdt met het verschil in oppervlakte van de scans bij verschillende vergroting. De oppervlakte van de scan bij 200x is drie keer groter dan de scan bij 600x, bij gelijke lengte van de scans³.
- Bereken uit het aantal waargenomen individuen per geslacht het totale biovolume van toxische en niet-toxische blauwalgen met behulp van de waarde $\mu\text{m}^3/\text{individu}$ in Tabel 4.
- Bereken de verhouding tussen toxische en niet-toxische blauwalgen.

² Bij een dekglas van 24x24 mm² en drie druppels monster met een gehalte aan blauwalgen geassocieerd chlorofyl-a van minstens 12 $\mu\text{g/l}$, zul je in een volledige scan bij 600x gemiddeld minstens twee filamenten van *Anabaena* of *Planktothrix* kunnen verwachten en bij 200x gemiddeld minstens zes. Grotere kolonies van *Microcystis* zul je in één scan bij 600x niet tegen hoeven komen.

³ Hierbij veronderstellen we dat de individuen volgens het toeval verdeeld zijn in het preparaat.

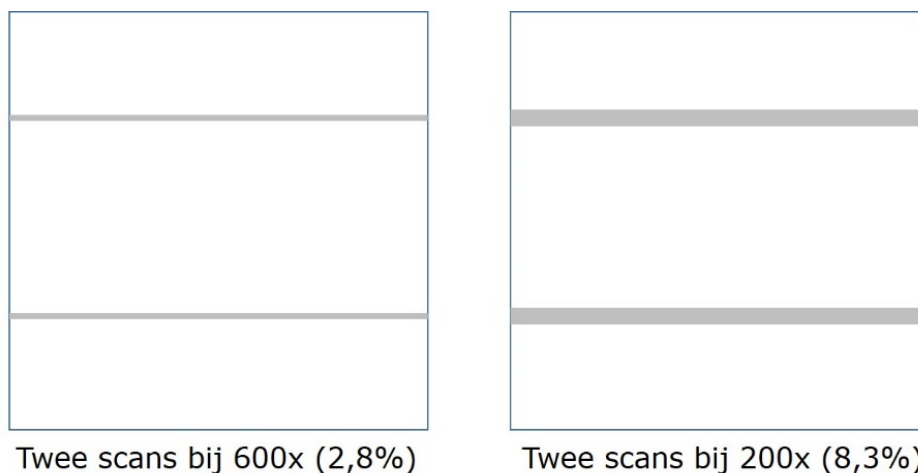
- Is de verhouding toxische/niet-toxische blauwalgen groter of gelijk aan 90%, dan is het fluorometrisch bepaalde gehalte van chlorofyl-a geassocieerd aan blauwalgen uitgangspunt voor de risicobeoordeling.
- Is de verhouding toxische/niet-toxische blauwalgen kleiner dan 90%, dan kan het laboratorium in overleg met de opdrachtgever 2 keuzes maken:
 - Als het laboratorium in staat is om op basis van deze microscopische analyse en de fluorescentiemeting een goede benadering voor het risiconiveau (0, 1 of 2) te geven, dan kan met fluorescentie bepaalde chlorofyl-a geassocieerd aan blauwalgen gecorrigeerd worden met het percentage toxische blauwalgen van de microscopische analyse. Omdat de fluorescentie van niet-toxische draadvormige algen ca. 100x lager is dan die van coccalen wordt voor de correctie van het chlorofyl-a geassocieerd aan blauwalgen de onderstaande formule gehanteerd:

$$\text{CHL-a}_{\text{TOX}} = 0.03 * \%_{\text{TOX}} * \text{CHL-a}_{\text{totaal}} / (3 - 0.0297 * \%_{\text{NTLF}})$$

Waarin:

- CHL-a_{totaal} = totaal chlorofyl-a geassocieerd met blauwalgen
- CHL-a_{TOX} = chlorofyl-a geassocieerd met toxische blauwalgen
- %_{TOX} = percentage biovolume toxische blauwalgen
- %_{NTLF} = percentage biovolume van niet-toxische blauwalgen met lage fluorescentie

- Als de bovenstaande optie niet mogelijk is of als de opdrachtgever een hogere nauwkeurigheid wenst, dan kan het monster worden ingezet voor een bepaling van het absolute biovolume van toxische blauwalgen volgens § 6.3.
- Als uit de microscopische analyse in § 6.2 blijkt dat het risiconiveau hoger is dan op basis van de fluorescentiemeting werd bepaald (bijvoorbeeld door storende humus concentraties of andere algen), dan kan het monster worden ingezet voor een bepaling van het absolute biovolume van toxische blauwalgen volgens § 6.3



Figuur 1 Twee microscopische scans van een 24x24 mm preparaat bij een sterke en een zwakke vergroting, waarbij een oppervlakte-aandeel van 2,8% respectievelijk 8,3% bekeken wordt.

7.3 Microscopische bepaling van het biovolume van toxische blauwalgen voor berekening van het gehalte chlorofyl-a geassocieerd aan blauwalgen

7.3.1 Opzet

De analyse voert men uit aan een lugol-geconserveerd deelmonster, wanneer uit analyse § 7.2 is gebleken dat het biovolume-aandeel toxische blauwalgen in dit monster kleiner is dan 90%. Door microscopisch onderzoek volgens de Utermöhl-methode bepaalt men het biovolume van toxische blauwalgen, op basis van een vast biovolume per geslacht en individu. Een lijst van deze vaste biovolumes is opgenomen in Tabel 4. Het totale biovolume van toxische blauwalgen rekent men vervolgens om naar een gehalte blauwalg-chlorofyl-a, met behulp van de regressie in Bijlage 3 van het Blauwalgenprotocol 2020. Let op: er hoeven dus geen niet-toxische blauwalgen geteld te worden.

N.B. Het staat laboratoria vrij om de juistheid van de biovolume-bepaling te vergroten, door geen individuen maar cellen te tellen, gebruik te maken van een door meting vastgesteld biovolume en het aantal waarnemingen af te stemmen op een gewenst betrouwbaarheidsinterval. Voor dit doel is ook een voorschrift voor een loogbehandeling volgens Box (1981) toegevoegd, om kolonies van *Microcystis* en *Woronichinia* uiteen te laten vallen in losse cellen.

7.3.2 Voorbehandeling

- Zorg dat alle vloeistoffen en hulpmiddelen op omgevingstemperatuur zijn, te weten de temperatuur op het laboratorium; dit bevordert een goede bezinking.
- **Indien de monsters levend en gekoeld worden ontvangen**
- Homogeniseer het monster (zie Bijlage 13 van het Handboek Hydrobiologie) en doe met een volumepipet een deelmonster van vijf milliliter in een geëtiketteerd reageerbuisje. Voeg met een pasteurpipet direct één tot twee druppels zure of alkalische lugol toe tot een stabiele cognackleur ontstaat. Dek het buisje af met parafilm en laat het deelmonster een uur bij kamertemperatuur staan voor acclimatisatie.

N.B.: het staat laboratoria vrij om de grootte van het deelmonster anders te kiezen en de dosering van de lugol hierop aan te passen. Voor een snelle acclimatisatie raden we aan om het volume niet te groot te laten zijn.

- **Indien de monsters geconserveerd en gekoeld worden ontvangen**

Controleer de staat van fixatie en voeg zo nodig enkele druppels zure of alkalische lugol toe. Homogeniseer het monster (zie Bijlage 13 van het Handboek Hydrobiologie) en doe met een volumepipet een deelmonster van vijf milliliter in een geëtiketteerd reageerbuisje. Dek het busje af met parafilm en laat het deelmonster een uur bij kamertemperatuur staan voor acclimatisatie.

N.B.: het staat laboratoria vrij om de grootte van het deelmonster anders te kiezen en de dosering van de lugol hierop aan te passen. Voor een snelle acclimatisatie raden we aan om het volume niet te groot te laten zijn.

- Voer een loogbehandeling uit (§ 7.3) wanneer uit de scan de aanwezigheid van meerdere grote kolonies van *Microcystis* of *Woronichinia* gebleken is en een nauwkeuriger biovolumebepaling gewenst is.
- Plaats het restant van het monster in de koelcel, laat bij een levend monster de dop los.

7.3.3 Loogbehandeling

- Homogeniseer het monster en breng 25 ml monster over in een 50 ml centrifugebuis.
- Voor met basische lugol geconserveerde monsters: voeg 0,25 ml 1,0 M kaliumhydroxide toe en meng de inhoud van de bus.
- Voor met zure lugol geconserveerde monsters: voeg 0,50 ml 1,0 M kaliumhydroxide toe en meng de inhoud van de bus.
- Voor levende monsters: voeg 0,25 ml 1,0 M kaliumhydroxide toe en meng de inhoud van de bus.
- Sluit de bus af en plaats hem in een stoof bij 80 ± 5 °C gedurende 30 minuten. Lugol-geconserveerde monsters zullen hierbij ontkleuren.
- Ontlucht de bus, sluit hem weer goed en schud de bus krachtig gedurende 15 seconden.
- Neutraliseer de inhoud van de bus met 0,25 of 0,50 ml 1,0 M zoutzuur, voor basische respectievelijk zure lugol-monsters. Lugol-geconserveerde monsters zullen hierbij weer bruin kunnen worden.
- Laat de bus afkoelen tot kamertemperatuur in een bekerglas met koud leidingwater (of kort in smeltend ijs). Het water in het bekerglas warmt snel op en het afkoelen gaat sneller als het water tussendoor vervangen wordt door nieuw koud water.

7.3.4 Inzetten

- Zet de deelmonsters bij voorkeur zo snel mogelijk na ontvangst en acclimatisatie in (vaak is de ontvangst in de loop van de middag), zodat ze overnacht kunnen bezinken.
- Neem per deelmonster twee geëtiketteerde sedimentatiecuvetten en doe hierin zoveel verdunningsvloeistof dat het cuvet met het te pipetteren deelmonster juist wordt afgevuld (dit vermindert de kans op drijvende en/of zwevende algen).
- Pipetteer in het ene bezinkingscuvet 0,2 milliliter deelmonster en in het andere 1,0 milliliter deelmonster en noteer het gepipetteerde volume op het etiket. Bij cuvetten met een veel groter bezinkingsoppervlak dan

ongeveer 1,25 cm² gaat men uit van respectievelijk 0,16 en 0,80 milliliter deelmonster per cm² bezinkingsoppervlak.

N.B. Het staat laboratoria vrij om de volumes van het deelmonster te optimaliseren voor hun eigen configuratie.

- Zet voor een monster dat een loogbehandeling heeft ondergaan zowel een behandeld als een onbehandeld deelmonster in, zodat men de overige blauwalgen naast *Microcystis* en *Woronichinia* in een ongelooft maar lugol-geconserveerd monster kan tellen.
- Dek de bezinkingscuvetten af met een dekglasje.
- Zet de cuvetten voor sedimentatie weg op een donkere, trillings- en tochtvrije plaats bij kamertemperatuur, gedurende minimaal vier uur per centimeter cuvethoogte.

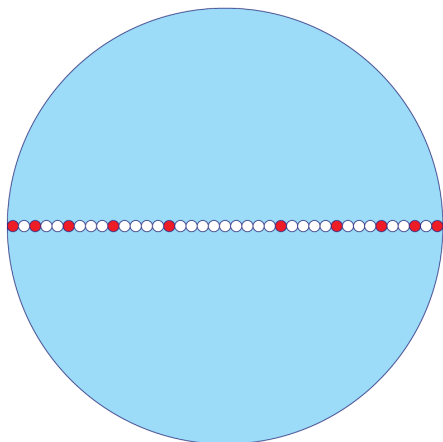
7.3.5 Bepaling

- Bij alle onderstaande handelingen moet rekening worden gehouden met mogelijke concentrische bezinking. Plaats het cuvet met 1,0 milliliter deelmonster in de houder op de tafel van de omkeermicroscop en beoordeel de dichtheid van toxische blauwalg-individen (of losse cellen van *Microcystis* of *Woronichinia*) in beeldvelden langs de rand van het cuvet en meer naar het midden bij de sterkste vergroting (600x). Zijn dit er gemiddeld meer dan twintig, plaats dan het cuvet met 0,2 milliliter deelmonster en gebruik dit voor de bepaling.
- **Bij gemiddeld meer dan drie toxische individuen per beeldveld (600x)**
Onderzoek tien beeldvelden bij de sterkste vergroting (600x) en tel het aantal toxische individuen per genus. Tel individuen die deels buiten het beeldveld liggen alleen mee wanneer zij in de bovenste helft van het cuvet liggen. Kies bij gebruik van een rond sedimentatiecuvet de tien beeldvelden zoals aangegeven in Figuur 2a, om te corrigeren voor een eventueel randeffect (concentrische bezinking).
- **Bij gemiddeld drie of minder toxische individuen per beeldveld (600x)**
Onderzoek dertig beeldvelden bij de sterkste vergroting (600x) en tel het aantal toxische individuen per genus. Tel individuen die deels buiten het beeldveld liggen alleen mee wanneer zij in de bovenste helft van het cuvet liggen. Kies bij gebruik van een rond sedimentatiecuvet de dertig beeldvelden zoals aangegeven in Figuur 2b, om te corrigeren voor een eventueel randeffect (concentrische bezinking).
- **Wanneer het aantal getelde individuen van toxische filamenteuze genera nog kleiner is dan tien**
Tel het aantal toxische, filamenteuze vormen per genus in tien beeldvelden bij 200x. Kies bij gebruik van een rond sedimentatiecuvet de twintig beeldvelden zoals aangegeven in Figuur 2c, om te corrigeren voor een eventueel randeffect (concentrische bezinking).
- Bereken voor elk toxisch blauwalggeslacht, aangetroffen in stap 2 en 3, het biovolume door het aantal waarnemingen per geslacht te vermenigvuldigen met de bijbehorende vaste biovolume waarde per individu in Tabel 4.
- Bereken voor elk toxisch blauwalggeslacht het biovolume in μm^3 per milliliter monster door het bepaalde biovolume te delen door de grootte van het onderzochte volume deelmonster. Bereken de grootte van het onderzochte volume deelmonster, $V_{\text{onderzocht}}$, uit het gepipetteerde

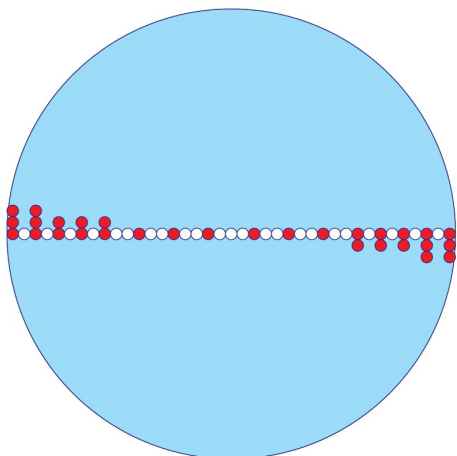
volume deelmonster, $V_{\text{deelmonster}}$ en het onderzochte deel van de cuvetbodem in procenten, $O_{\text{onderzocht}}$. volgens onderstaande formule:

$$V_{\text{onderzocht}} = V_{\text{deelmonster}} \times O_{\text{onderzocht}} / 100$$

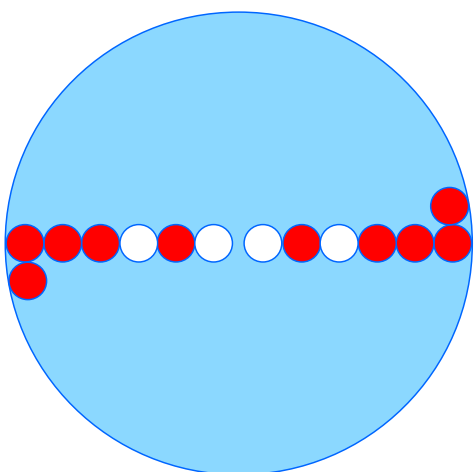
- Bereken het totale biovolume van toxische genera in μm^3 per milliliter monster, door de berekende biovolumes per geslacht te sommeren.
- Reken dit totale biovolume van toxische blauwalgen om naar mm^3/liter en vervolgens naar chlorofyl-a geassocieerd met blauwalgen via de regressie in Bijlage 3 van het Blauwalgenprotocol 2020. Dit kan eenvoudig door het biovolume (mm^3/L) met 3 te vermenigvuldigen.
- Neem het zodanig bepaalde gehalte aan chlorofyl-a geassocieerd met blauwalgen als uitgangspunt voor de risicobeoordeling.



Figuur 2a Het tellen van twee keer vijf beeldvelden bij een sterke vergroting in een rond cuvet



Figuur 2b Het tellen van twee keer vijftien beeldvelden bij een sterke vergroting in een rond cuvet



*Figuur 2c
Het tellen van twee keer vijf beeldvelden bij een zwakke vergroting in een rond cuvet*

Tabel 2 Overzicht toxische blauwalgen

toxisch									
genus blauwalg	in Nederland	planktisch/benthisch	hepatoxines			neurotoxines			cytotoxines cylindrospermo psine
			microcystine	nodularine	onbekend	anatoxine	saxitoxine	onbekend	
Anabaena	+	P	+			+			+
Anabaenopsis	+	P	+						
Aphanizomenon	+	P	?			+	+		+
Chrysoosporum	+	P							+
Cuspidothrix	+	P				+	+		
Cylindrospermopsis	+	P			+				+
Cylindrospermum	+	P			+	+	+		
Dolichospermum	+	P	+			+	+		
Geitlerinema	+	P	+				+		
Gloeotrichia	+	P/B	+						
Hapalosiphon	?	P/B	+						
Hydrocoleum	+	B					?		
Leptolyngbya	+	B(P)	+					+	
Limnothrix	+	P/B	+				+		
Lyngbya	+	B(P)					+		+
Merismopedia	+	P(B)	+						
Microcoleus	+	B				+			
Microcystis	+	P	+			+			
Nodularia	+	P		+					
Nostoc	+	P	+						
Oscillatoria	+	B	+			+			+
Phormidium	+	B	+			+	+		
Planktothrix	+	P	+			+			
Pseudanabaena	+	P/B				+			
Radiocystis	+	P	+						
Raphidiopsis	+	P				+	+		+
Scytonema	?	B(P)					+		
Sphaerospermopsis	+	P							?
Synechocystis	+	P/B	+						
Trichodesmium	+	P	?				?		
Trichormus	+	B(P)	+						
Tychonema	+	P/B				+			
Umezakia natans	-	P							+
Woronichinia	+	P	?						

Gebaseerd op Bernard *et al.* (2017). Genera en soorten waarvoor de productie van toxines door geïsoleerde stammen in het laboratorium is aangetoond. Bij vermoedens van toxineproductie door alleen onderzoek van watermonsters, is achter het genus een ? geplaatst onder het betreffende toxine. De genera *Gloeotrichia* en *Synechocystis* zijn respectievelijk gebaseerd op Carey *et al.* (2007 en 2012) en Domingos *et al.* (1999).

Tabel 3 Overzicht niet-toxische blauwalgen

niet met zekerheid aangetoond als toxisch		
genus blauwalg	in Nederland	planktisch / benthisch
Aphanocapsa (muv A. cumulus)	+	P
Aphanothece (muv A. halophytica)	+	P/B
Borzia	+	P/B
Chroococcus	+	P(B)
Coelomoron	+	P
Coelosphaerium	+	P
Cyanobacterium	?	B
Cyanobium	?	P/B
Cyanocatena	+	P
Cyanocatenula	+	P
Cyanodictyon	+	P
Cyanogranis	+	P
Cyanonephron	+	P
Cyanostylon	+	P
Eucapsis	+	P
Gomphosphaeria	+	P/B
Heteroleibleinia	+	B
Jaaginema	+	B(P)
Komvophoron	+	P/B
Leibleinia	+	B
Lemmermanniella	+	P
Pannus	+	P
Planktolyngbya	+	P
Rhabdoderma	+	P
Rhabdogloea	+	P
Romeria (muv R. carauru)	+	P/B
Snowella	+	P
Siphonosphaera	+	P
Spirulina (muv marine strains)	+	P
Synechococcus (muv marine strains)	+	P

Gebaseerd op Bernard *et al.* (2017). Genera en soorten waarvoor de productie van toxines door geïsoleerde stammen in het laboratorium is aangetoond. Bij vermoedens van toxineproductie door alleen onderzoek van watermonsters, is achter het genus een ? geplaatst onder het betreffende toxine. De genera *Gloeotrichia* en *Synechocystis* zijn respectievelijk gebaseerd op Carey *et al.* (2007 en 2012) en Domingos *et al.* (1999).

Tabel 4 Overzicht biovolumes van blauwalgen per cel en individu in μm^3

Chroococcale genera	cel/individu	μm^3 /cel	μm^3 /individu	Filamenteuze genera	cel/individu	μm^3 /cel	μm^3 /individu
Toxisch				Toxisch			
Merismopedia	60	0,4	23	Anabaena	40	30	2197
Microcystis	240	39,0	9360	Anabaenopsis	9	167	1503
Radiocystis	100	15,0	1500	Aphanizomenon	26	57	1482
Synechocystis	1	30,0	30	Chrysoosporum	28	62	1736
Woronichinia	149	24,0	3576	Cuspidothrix	21	49	1029
				Cylindrospermopsis	10	70	700
Niet-toxisch				Cylindrospermum	30	30	900
Aphanocapsa	340	0,6	204	Dolichospermum	24	133	3192
Aphanothece	120	1,5	180	Geitlerinema	36	30	1080
Chroococcus	35	0,5	18	Gloeotrichia	-	80	84800
Coelomoron	16	6,0	96	Limnothrix	20	30	600
Coelosphaerium	40	2,0	80	Microcoleus	80	120	9600
Cyanobium	1	3,0	3	Nodularia	60	190	11400
Cyanocatena	10	0,5	5	Nostoc	-	-	28260
Cyanocatenula	8	0,5	4	Planktothrix	80	31	2480
Cyanodictyon	60	1,0	60	Pseudanabaena	28	40	1120
Cyanogranis	30	0,5	15	Raphidiopsis	19	48	912
Cyanonephron	30	2,0	60	Sphaerospermopsis	55	50	2750
Cyanostylon	4	300,0	1200	Trichodesmium	20	138	2760
Eucapsis	16	2,0	32	Trichormus	30	70	2100
Gomphosphaeria	60	140,0	8400	Tychonema	60	70	4200
Lemmermanniella	100	1,0	100				
Pannus	100	1,0	100	Niet-toxisch			
Rhabdoderma	16	15,0	240	Borzia	6	30	180
Rhabdogloea	16	30,0	480	Komvophoron	18	190	3420
Siphonosphaera	60	1,5	90	Planktolyngbya	20	6	120
Snowella	12	14,0	148	Romeria	5	14	70
Synechococcus	1	4,0	4	Spirulina	-	-	100

De biovolumina per cel in deze bijlage zijn berekend uit de gemiddelde celdimensies van de meest voorkomende soorten van een genus. Het aantal cellen per individu is gebaseerd op datasets van Koeman en Bijkerk bv en Bureau Waardenburg, opgebouwd uit de resultaten van zwemwatercontroles (2017-2019) en routinematige fytoplanktonanalyses. Voor enkele genera is dit aantal gebaseerd op de determinatieliteratuur. Het biovolume per individu is berekend als het product van beide grootheden en niet ontleend aan het gemiddelde biovolume per waarneming uit onze datasets. Voor *Gloeotrichia* en *Nostoc* is het biovolume per individu (kolonie van filamenten) ontleend aan een lijst van het Finse Milieu-instituut (SYKE) uit 2005. Strikt bentische of epifytische genera zijn weggelaten.

1. Literatuur

- Bernard C, Ballot A, Thomazeau S, Maloufi S, Furey A, Mankiewicz-Boczek J, Pawlik-Skowronska B, Capelli C, Salmaso N (2017) Appendix 2. Cyanobacteria associated with the production of cyanotoxins. In: J. Meriluoto, L. Spoof and G.A. Codd (eds) Handbook on cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis. J Wiley & Sons, Chichester: 503-527.
- Box JD (1981) Enumerations of cell concentrations in suspensions of colonial freshwater microalgae with particular reference to *Microcystis aeruginosa*. Br J Phycol 16: 153-164.
- Carey CC, Haney JF, Cottingham KL (2007) First report of microcystin-LR in the cyanobacterium *Gloeotrichia echinulata*. Environ Toxicol 22: 337-339.
- Carey CC, Ewing HA, Cottingham KL, Weathers KC, Thomas RQ, Haney JF (2012) Occurrence and toxicity of the cyanobacterium *Gloeotrichia echinulata* in low nutrient lakes in the northeastern United States. Aquat Ecol 46: 395-409.
- Domingos P, Rubim TK, Molica RJR, Azevedo SMFO & Carmichael WW (1999) First report of microcystin production by picoplanktonic cyanobacteria isolated from a Northeast Brazilian drinking water supply. Environ Toxicol 14: 31-35.

Opgesteld door Ronald Bijkerk (Bureau Waardenburg Vestiging Noord), januari 2020

Bijlage 5

Protocol voor het omgaan met benthische blauwalgen op zwemlocaties

1. Introductie

Blauwalgmatten kunnen bij gunstige condities (nutriënten, lage begrazingsdruk, voldoende lichtinval, etc.) toxinen produceren, lichtstress en verstikking veroorzaken bij waterplanten door bedekking, en de esthetiek van een zwemlocatie verminderen. Bij rottingsprocessen kan ook het giftige H₂S-gas vrijkomen en stankoverlast veroorzaken. De economische schade voor waterschappen, gemeenten, uitbaters en andere betrokkenen kan bij hevige overlast aanzienlijk zijn.

Benthische blauwalgen behoren tot de groep van draad- en bolvormige blauwalgen die op een vaste ondergrond groeien. Ze vormen uitgestrekte, bruingroene tot zwarte, viltige, soms slijmerige matten. Ze worden aangetroffen op zand, steen, waterplanten, hout, drijvend afval en objecten, zoals ballenlijnen, steigers en fontein. De matten vormen een symbiose van diverse soorten (blauw)algen, schimmels en/of bacteriën. Matten kunnen worden aangevreten door wormen, ciliaten, slakken, nematoden en andere organismen. Veelal is een deel van het substraat, zoals zand en vegetatie, ingekapseld door de blauwalgen en omgeven door detritus en slijm. In de slijmmantel zijn vaak ook andere organismen te vinden, die de slijmmantel gebruiken als natuurlijke barrière tegen parasieten en virussen.

2. Hoe en wanneer worden matten opgemerkt?

De aanwezigheid van blauwalgmatten zal veelal worden opgemerkt wanneer losgeraakte plakkaten, vlokken of bollen van blauwalgen en substraat aanspoelen. De bron kan op enige afstand van een zwemlocatie liggen. Soms breken stukken van een mat los door wind en golfslag, omwoeling van de bodem en vegetatie door benthische fauna, vissen, baggeren of recreatie, gasvorming bij fermentatie, of door sterke zuurstofverzadiging van de (blauw)algenmat zelf. Fragmenten van een mat vormen dan losgekomen plakkaten of afgeronde bollen. Soms zijn er hele lappendekens aan matten aanwezig, die loskomen en gaan drijven in plakkaten ter grootte van een hand of soms nog groter. Ze kunnen sterk lijken op bijvoorbeeld de uitwerpselen van watervogels.

Daarnaast kunnen matten door gerichte visuele inspectie van het substraat (bodem, vegetatie, objecten) worden gevonden. Het gebruik van een onderwaterkijker kan de herkenning onder water vergemakkelijken. Matten komen voor op die plaatsen waar het helder genoeg is om zonlicht door te laten dringen. Fragmenten van een blauwalgmat kunnen ook gevonden worden als er drijfvlagen van planktonische blauwalgen aanwezig zijn of als er sedimentatie voorkomt. Het licht kan de matten dan niet goed bereiken door troebel water of sediment. Veel draadvormige soorten kunnen echter in de matten bewegen door naast elkaar te schuiven ('gliding') en door roterende bewegingen te maken. Door gebruik te maken van omgevingselementen kunnen ze naar het lichtoptimum toe kruipen. Ook kunnen (delen van) matten afbreken en aan de oppervlakte gaan drijven om toch bij het lichtoptimum te

komen. Bij het bereiken van geschikt substraat kan de mat opnieuw gaan groeien, niet vitale stukken mat sterven af.

Benthische (blauw)algen komen niet alleen voor in stilstaande, beschutte wateren, maar ook in stromende wateren met turbulentie. Hoe hoger de turbulentie van het water, hoe beter ze zich hechten aan substraat. Matten van benthische (blauw)algen starten al vroeg in het voorjaar met groeien (medio februari/maart), zelfs bij vrij lage watertemperaturen (8-11 °C). Onder gunstige condities zijn matten nog tamelijk uitbundig te vinden in oktober/november, ondanks de startende kou. De matten zijn tevens niet alleen in voedselrijke wateren te vinden, maar ook in voedselarme wateren. Ze kunnen goed omgaan met sterk fluctuerende omstandigheden en komen ook voor bij droogte, hitte (voor zover er geen DNA-schade plaatsvindt) en kou.

Voor het herkennen van blauwalgmatten is als hulpmiddel Figuur 1 toegevoegd. Daarnaast heeft AQUON in 2018 intern een herkenningssheet en een bemonsteringsboekje uitgegeven voor Monstername & Logistiek (opvragen kan via zwemwater@aquon.nl).

3. Monstername en onderzoek

3.1 Monstername

Het verdient aanbeveling materiaal te verzamelen voor een specialistische analyse wanneer:

- over een grotere oppervlakte duidelijk blauwalgmatten zijn waar te nemen ($\geq 10\%$ bedekkingsgraad in de zwemzone nabij het controlepunt)
- meerdere dagen achtereen plakmaten, vlokken of bollen blauwalgen aanspoelen
- dieren (honden, vogels) met duidelijke verlamingsverschijnselen worden aangetroffen; de dieren zijn binnen een uur voorafgaand aan het optreden van de verschijnselen in het betreffende water geweest

Materiaal van matten kan eenvoudig met een voet losgewoeld worden of van objecten worden afgeschraapt, waarna het materiaal van het wateroppervlak kan worden geschept. Gebruik hiervoor een pot (500 – 1000 ml), maximaal voor 80% gevuld, voorzien van een duidelijke codering met locatie en datum. Let bij de bemonstering op kleurschakeringen in de mat, aangezien dit een signaal kan zijn dat er meerdere (blauw)algen in de mat aanwezig zijn. Zorg dat de verschillende kleurschakeringen bemonsterd worden.

Sommige soorten benthische blauwalgen kunnen dermatoxinen aanmaken die op de huid kunnen inwerken en LPS stoffen aanmaken waar mensen allergisch op kunnen reageren. Draag bij de bemonstering daarom altijd beschermende handschoenen. Houd ook rekening met aerosolen, die toxinen kunnen bevatten (denk aan sproeiers en fonteinen). Inhalatie van aerosolen kan luchtwegklachten veroorzaken, vooral bij mensen met een recente geschiedenis van bijvoorbeeld astma of bronchitis. Laat bij de bemonstering van fonteinen of sproeiers de locatiebeheerder de sproeier of fontein vooraf aan de bemonstering uitzetten. Zorg voor een tijdsinterval van maximaal een half uur tussen het uitzetten en de bemonstering, zodat het materiaal zo vers en representatief mogelijk is.

3.2 Bepalen van de bedekkingsgraad

Omdat blauwalgmatten doorgaans heterogeen in een waterlichaam aanwezig zijn (bijvoorbeeld met clustering in een bepaalde hoek), is het niet mogelijk om de abundantie in een cel aantal per ml of een biovolume per ml uit te drukken. Het is wel mogelijk om de abundantie van matten ten tijde van de bemonstering in te schatten. Hiervoor is een codering aangemaakt om het bedekkingspercentage van alle substraten (inclusief drijvend op het wateroppervlak) te registreren: het bedekkingspercentage.

Het bedekkingspercentage is een zeer grove inschatting van de abundantie van matten en is een momentopname, vergelijkbaar met het vaststellen van een drijfslagcategorie. Houd bij het schatten van het bedekkingspercentage ook rekening met de windrichting. Als er veel matten in een hoek gedreven zijn, geef dit dan aan in een opmerking. Matten die buiten de zwemzone ophopen, kunnen bij het draaien van de wind de zwemzone in drijven.

Als hulpmiddel kan een IJkkaart gebruikt worden (STOWA 2014 - Handboek Hydrobiologie, Deel III Macro, Hoofdstuk 11 Vegetatie: Achtergrondinformatie, Figuur 11.12).

3.3 Onderzoek van monsters

Het monstermateriaal moet vers en niet-geconserveerd worden aangeleverd aan het laboratorium (gekoeld 4-5 °C) en binnen 24-48 uur microscopisch worden onderzocht. De monsters worden op kamertemperatuur gebracht en bij kamertemperatuur geanalyseerd, omdat de beweging van de blauwalgen een specifiek determinatiekenmerk kan zijn. Daarnaast is het nodig om te voorkomen dat er H₂S vrij komt uit rottend materiaal, wat op zichzelf weer toxisch is (monsterpreparatie altijd in een zuurkast). Bij het microscopisch onderzoek wordt gekeken naar de soorten/genera die in het monster aanwezig zijn; bij potentieel toxische soorten/genera is het aan te bevelen een waarschuwing of negatief zwemadvies af te geven (afhankelijk van de veldsituatie).

Bij de aanvraag van een optionele toxine-analyse is het belangrijk om bij het betreffende laboratorium te informeren hoe het materiaal het beste bewaard kan worden, voorafgaand aan de toxine-analyse (RIKILT/WUR kunnen hier bij helpen). Toxine-analyses geven inzicht in de aanwezigheid en concentraties van diverse blauwalgtoxinen (normwaarden zijn nog niet vastgesteld; hoge toxineconcentraties kunnen echter wel aanleiding geven tot het afgeven van een negatief zwemadvies of zwem- en strandverbod).

4. Handelingsperspectief

De bedekkingsgraad is ingedeeld zoals aangegeven in Tabel 1 en leidt tot de daar aangegeven maatregelen. Het protocol is schematisch weergegeven in figuur 2.

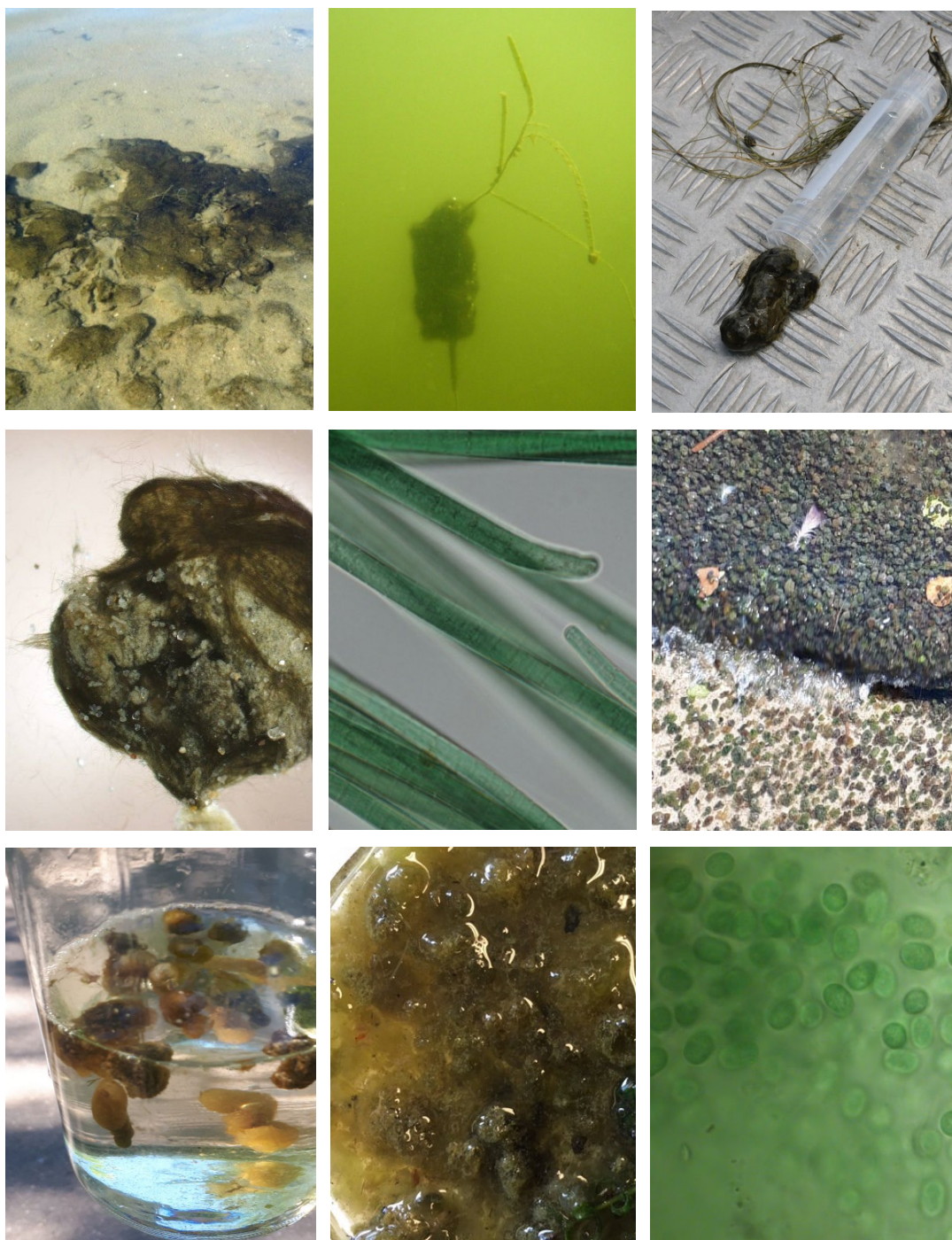
Tabel 1 Bedekkingspercentage blauwalgmatten, monitoringsfrequentie en maatregelen

categorie	bedekkingspercentage blauwalgmatten	monitoringsfrequentie	maatregel
0	afwezig	tweewekelijks	geen Risiconiveau 0
1	< 10%	tweewekelijks*	geen Risiconiveau 0
2	≥ 10% - 50%	wekelijks*	waarschuwing Risiconiveau 1
3	≥ 50%	wekelijks	negatief zwemadvies of zwem- en strandverbod# Risiconiveau 2

* opschalen mogelijk als de situatie daar om vraagt, bijvoorbeeld n.a.v. uitslagen van een optionele toxine-analyse

een strandverbod is belangrijk omdat aan de watterand veel materiaal kan aanspoelen, dit kan bijvoorbeeld door honden worden opgegeten

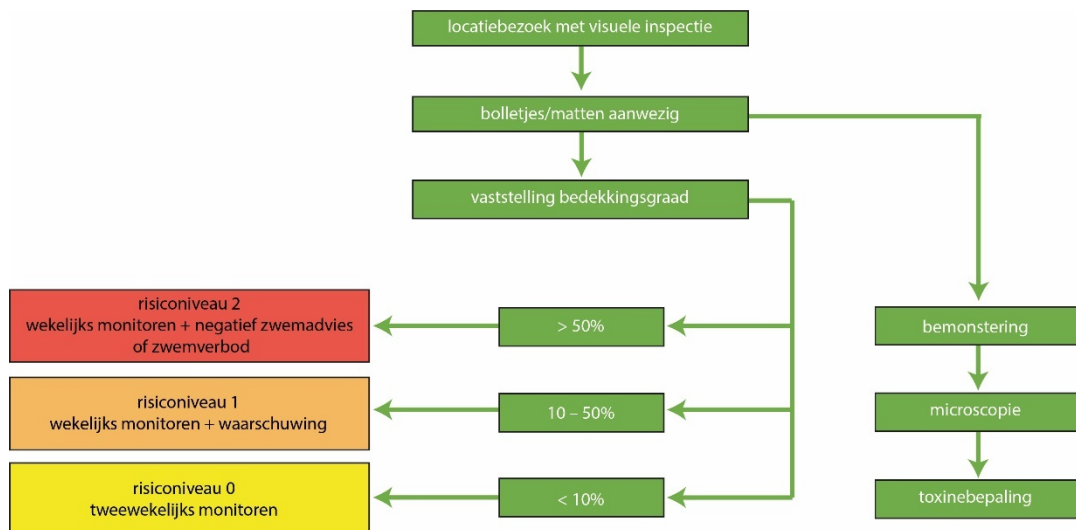
Bij visuele inspecties en/of meldingen van beheerders van zwemlocaties, omgevingsdiensten, gemeenten en burgers kan het nodig zijn om de zwemlocatie een extra keer te bezoeken. Na storm kan het bijvoorbeeld zijn dat aanwezige matten massaal loskomen, waardoor de situatie plotseling kan veranderen. Of vooraf aan een evenement als het al bekend is dat er matten op een zwemlocatie aanwezig zijn, of wanneer er klachten zijn van recreanten (gezondheidsklachten, stankoverlast, esthetiek van een plas, e.d.).



Figuur 1

1. Mat met Phormidium op een zandbodem, 2. Klont blauwalgdraden gehecht aan een waterplant, 3. Bemonsterde mat van Phormidium; het buisje op de rechterfoto is 12 cm lang, 4. Stereo-microscopische opname van een klont blauwalgdraden, 5. Microscopische opname van Phormidium-draden, 6. Een golf vol met Aphanothece bollen, 7. Bemonsterde mat van Aphanothece; glazen pot 1 liter deels afgevuld, 8. Aphanothece mat in een petrischaal – de kleuren van de bollen kunnen variëren van groen, blauwgroen tot bruin-zwart, 9. Microscopische opname van Aphanothece-cellen.

Gebaseerd op: Handreiking blauwwiermatten. De herkenning, risico's en maatregelen. RWS Waterdienst, 2011 en Vakinhoudelijk advies Aquon 2018. Opgesteld door Marta Demarteau, Aquon, 2019.



Figuur 2: Schema benthische blauwalgen in Blauwalgenprotocol 2020

RIVM

De zorg voor morgen begint vandaag